

Белтъци

Цели

Цели на преподавателя: да се разгледа значението, съставът и структурата на белтъците, да се свърже структурата на белтъците с тяхната функция и да се дадат примери за приложение на тези познания в клиничната практика.

След работа с този раздел студентите ще могат да демонстрират:

А. Знания

- 1) да дефинират понятието белтъци;
- 2) да изброят основните характеристики на мономерите, изграждащи белтъците;
- 3) да пишат общата формула на α -амино киселина и формулите на двадесетте L- α -аминокиселини, изграждащи белтъците;
- 4) да дефинират понятието пептидна връзка;
- 5) да дадат примери за нековалентни връзки и взаимодействия в белтъчните молекули;
- 6) да изброят особеностите на полипептидните вериги;

Б. Разбирания

- 1) да опишат особеностите на пептидната връзка и следствията от нейната резонансна стабилизация за структурната организация на белтъчните молекули;
- 2) да обяснят значението на нековалентните взаимодействия за възникване и поддържане на вторична, третична и четвъртична структура на белтъци;
- 3) да обяснят как се нагъват новосинтезирани полипептидни вериги;
- 4) да разбират и обяснят какво представлява денатурация и ренатурация;
- 5) да обяснят усложняващата се структура на белтъци от първична до четвъртична;
- 6) да обяснят принципите на методите за пречистване и разделяне на аминокиселини, пептиди и белтъци;

В. Умения

- 1) да класифицират двадесетте α -амино киселини в зависимост от химическата структура на радикалите и от полярността на радикалите;
- 2) по стойностите на pI да преценяват какви аминокиселинни остатъци (кисели или базични) преобладават в даден белтък;
- 3) да прилагат познанията върху α -амино киселини, за да представят първичната структура на белтъци като изписват полипептидна верига по различни начини: посредством структурни формули, с трибуквените и еднобуквените съкращения на аминокиселините

остатъци;

- 4) да визуализират посредством програмата RasMol вторичната, третичната и четвъртична структура на белтъци; да маркират и изследват различни групи и участъци в белтъчните молекули;
- 5) да разграничават и сравняват различни белтъци от гледна точка на връзката между структура и функции на белтъци, като се аргументират с конкретни примери;
- 6) да ползват, анализират и коментират лабораторни изследвания, необходими за поставяне на диагноза и изясняване механизма на някои заболявания, свързани с променени структура, функция, промени в количеството или недостатъчност на белтъци;
- 7) да прилагат знанията от този раздел за разбиране механизма и/или възможностите за терапия на някои заболявания;
- 8) да прилагат знанията от този раздел за решаване на клинични случаи (генетични заболявания напр. сърповидноклетъчна анемия);
- 9) да осъществяват търсене по биохимичен термин в рамките на сайта или извън сайта.

2.1. Значение, състав и свойства на белтъци

2.1.1. Резюме

Белтъците са хетеробиополимери, които се получават при поликондензация на 20 т.н. "природни" α -аминокиселини, 19 от които са оптично-активни (всички от L-стеричен ред), една е оптически неактивна (Гли) и една е циклична иминокиселина (Про). Мономерите са свързани помежду си чрез пептидни връзки. Значението на белтъците произтича от разнообразието им и жизнено важни функции, които те изпълняват в организма (структуро-образуваща, каталитична, защитна, регулаторна, транспортна, двигателна, рецепторно-сигнална и складова).

α -Въглеродният атом на аминокиселините, който носи amino- и карбоксилната група, е асиметричен с изключение при глицин. Според химическата структура на радикалите аминокиселините се делят на алифатни, с хидроксилна група, S-съдържащи, ароматни, кисели, киселинни амиди и базични. Според полярността на радикалите аминокиселините се делят на хидрофобни (неполярни) и хидрофилни (полярни). Разнообразието функционални групи в радикалите, наред с крайните amino- и карбоксилна групи, са от значение за структурата, свойствата и функциите на белтъчната молекула.

Част от полярните групи са йоногенни и могат да имат различен заряд при промяна на рН. При физиологично рН положително заредени са ϵ -амино-групата на лизина, имидазоловия пръстен на хистидина, гуанидо-групата на аргинина и крайната amino-група. При физиологично рН отрицателно заредени са β -карбоксилната група на аспарагиновата киселина, γ -карбоксилната група на глутаминовата киселина и крайната карбоксилна група. Наличието на базични и киселинни групи придава на белтъците амфотерни свойства и обуславя сумарния заряд на белтъчните молекули.

2.1.2. Определение и значение на белтъци

Белтъците са хетеробиополимери - високомолекулни съединения, изградени от мономери – 20 вида т.н. "природни" α -аминокиселини, 19 от които са оптично-активни (всички от L-стеричен ред), една е оптически неактивна (Гли) и една е циклична иминокиселина (Про). Аминокиселините са свързани

в полипептидни вериги чрез пептидни връзки. Молекулната маса на белтъците е от 10 000 до стотици хиляди.

Белтъците се делят на прости и сложни.

Простите при хидролиза се разграждат само до аминокиселини, а сложните - до аминокиселини и небелтъчна съставка. Според формата си белтъците се делят на глобуларни (сферични - с компактно нагънати вериги, със съотношение на осите за дължина към ширина обикновено 3-4 към 1 до 10 към 1) и фибриларни (силно удължени молекули, в които дългата ос надвишава късата ос стотици пъти).

Молекулата на даден белтък съдържа една или повече полипептидни вериги. Всяка полипептидна верига съдържа различен брой от двадесетте вида мономери. При вариране броя и подреждането на мономерите, организмите могат да синтезират огромен брой различни вериги, респ. белтъци с разнообразни функции.

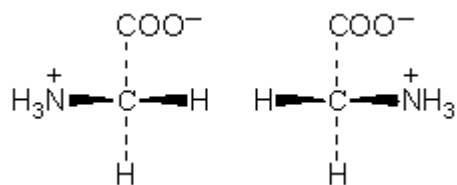
Значението на белтъците произтича от разнообразните и жизнено важни функции, които те изпълняват в организма:

- 1) структурообразуваща функция: Белтъците имат много добре изразена способност заедно с други високомолекулни съединения да изграждат по-сложни комплекси, които образуват различни вътреклетъчни и междуклетъчни структури.
- 2) каталитична функция: Част от белтъците са ензими, т.е. биокатализатори на определени химични реакции.
- 3) защитна функция: Част от тях са антитела, които свързват и обезвреждат попаднали в организма чужди макромолекули. Други белтъци участват в кръвосъсирването и предотвратяват загуба на кръв при увреждане на кръвоносни съдове.
- 4) регулаторна функция: Част от тях са хормони. Други, напр. ДНК-свързващи белтъци повлияват експресията на гените.
- 5) транспортна функция: Белтъците свързват обратимо и пренасят по кръвен път различни вещества - например хемоглобинът пренася кислород и въглероден двуокис, трансферин пренася Fe; церулоплазминът - Cu, албуминът - висши мастни киселини, билирубин и др. Разположените в мембраните белтъци осигуряват специфичен активен пренос на вещества през мембраните.
- 6) двигателна функция: Съкратителните белтъци актин и миозин са в основата на мускулното съкращение, а техни аналози - в "реснички" и "опашки" като двигателен апарат на едноклетъчни и др.
- 7) рецепторна и сигнална функция: Част от белтъците са рецептори на хормони или други вещества. Рецепторите разпознават и предават хормоналния сигнал към вътрешността на клетката.
- 8) "складова" функция: Във феритина се складира запаси от желязо, в миоглобина - кислород и др. Освен това те са източник на биологично активни вещества, които се образуват при дисимиляцията им. Те могат да бъдат и източник на енергия - в крайни ситуации след изчерпване на другите енергетични източници (въглехидрати и мазнини).

2.1.3. Химическа структура на аминокиселините, изграждащи белтъците

Общата формула на α -аминокиселините е дадена на фиг. 2-1. Всички аминокиселини имат карбоксилна група и аминогрупа при общ α -въглероден атом (при пролин вместо амино- има циклична имино-група). Тези именно групи участват в образуване на ковалентните пептидни връзки и изграждат скелета на полипептидните вериги. При неутрални рН стойности свободните L- α -аминокиселини в разтвор са преобладаващо под форма на цвитерйон, т.е. заредена е както карбоксилната, така и амино-групата.

α -Въглеродният атом в аминокиселините е асиметричен, с изключение при глицин, в който R = H, т.е. α -въглеродният атом няма четири различни заместители.



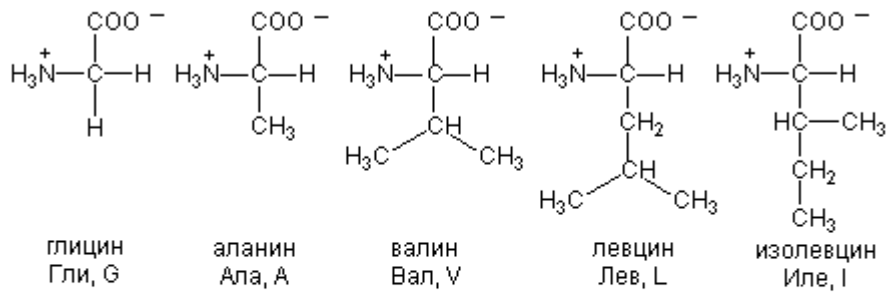
Фиг. 2-1. Абсолютна конфигурация на L-аминокиселина (вляво) и D-аминокиселина (вдясно). При физиологично рН (около 7) карбоксилната и амино-групата са заредени.

Аминокиселините, изграждащи белтъците, в зависимост от химическата структура на радикалите се разпределят в подгрупи, както следва:

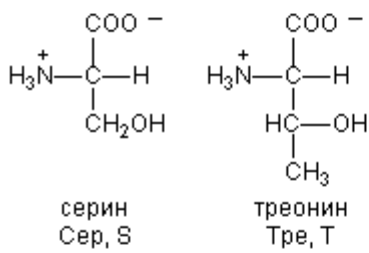
- 1) Алифатни аминокиселини: **глицин, аланин, валин, левцин, изолевцин;**
- 2) Хидрокси-аминокиселини: **серин, треонин;**
- 3) S-съдържащи аминокиселини: **цистеин, метионин;**
- 4) Ароматни аминокиселини: **фенилаланин, тирозин, триптофан;**
- 5) Циклична имино-киселина: **пролин;**
- 6) С допълнителна базична група: **лизин, аргинин, хистидин**
- 7) С допълнителна карбоксилна група и техните амиди: **аспарагинова киселина, глутаминова киселина, аспарагин, глутамин.**

Техните формули и съкращения (трибуквени- на български, и еднобуквени- на английски) може да видите, като щракнете върху названието на аминокиселината. Всички формули заедно са дадени по-долу.

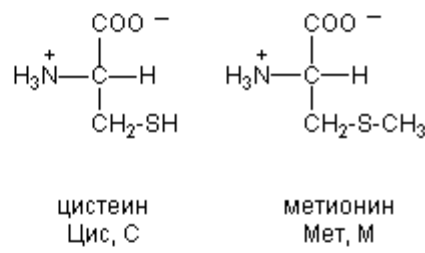
Алифатни аминокиселини



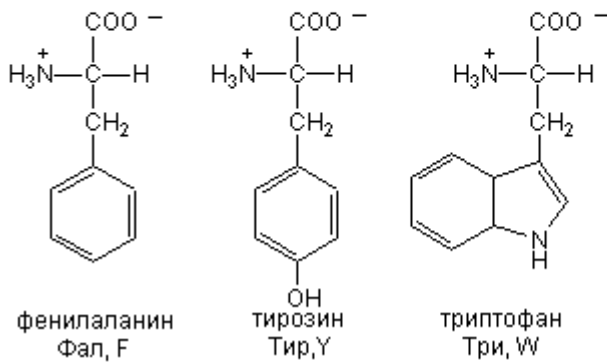
Хидроксиаминокиселини



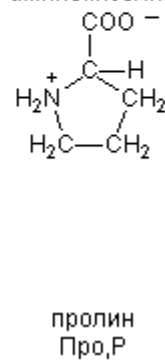
S - съдържащи аминокиселини



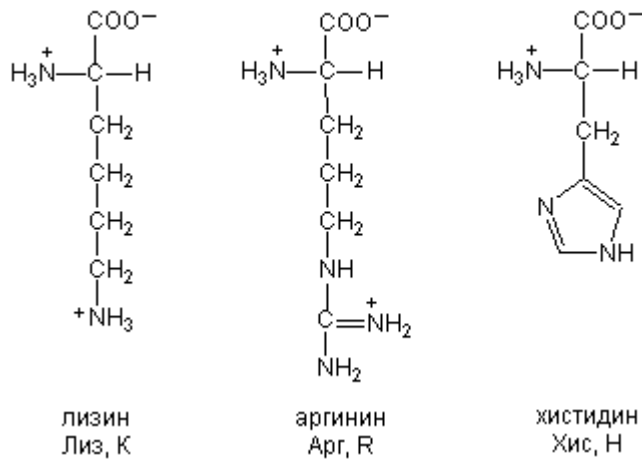
Ароматни аминокиселини



Циклична аминокиселина



С допълнителна базична група



С допълнителна карбоксилна група и техните амиди



Тези аминокиселини са еднакви и същи за всички организми. За всяка от тях има поне един специфичен кодон в ДНК. Чрез допълнителни химически модификации някои от тези аминокиселини, вече включени в полипептидна верига, се превръщат в производни аминокиселини: напр. цистин (при окисление на два цистеинови остатъка), хидроксипролин и хидроксилизин в колаген, десмозин в еластин, γ -карбоксилглутамат в протромбин и др., т.е. те са резултат от следтранслационна модификация.

2.1.4. Относителна хидрофобност на аминокиселинните радикали

Въз основа на относителната хидрофилност или хидрофобност на радикалите (склонността да се свързват или не с вода), аминокиселините се разделят най-общо на хидрофилни (Арг, Хис, Лиз, Асп, Глу, Асп, Глн, Цис, Сер, Тре, Гли) и на хидрофобни (Ала, Вал, Лев, Иле, Мет, Про, Фал, Тир, Три) [1]. Поради наличието на различни групи, някои от аминокиселините са амбивалентни, т. е. в зависимост от микрообкръжението променят отношението си от хидрофобни на хидрофилни.

Относителната хидрофобност се измерва като енергия на пренос (kcal/mol) на аминокиселината от неполярен разтворител във вода. Като мярка за хидрофобността се използва и т.н. хидропатичен индекс (табл. 2-1) [2]. Отрицателните, респ. положителните стойности на тази величина показват,

че аминокиселинният остатък в даден белтък може да се намира във водно, респ. хидрофобно обкръжение.

Като цяло полярността на радикалите варира широко, от силно неполярни (хидрофобни, напр. триптофан, фенилаланин, изолевцин) до силно полярни (хидрофилни, напр. лизин, аргинин). Но във всяка група също има различни степени на полярност поради присъствието на различни функционални групи. Например и трите ароматни аминокиселини фенилаланин, тирозин и триптофан могат да участват в хидрофобни взаимодействия, но тирозинът заради фенолната група и триптофанът заради N-атом в индоловия пръстен са по-полярни от фенилаланин.

Табл. 2-1. Стойности за хидропатичните индекси на

аминокиселинните остатъци*.

Амино-киселина	Хидропатичен индекс	Амино-киселина	Хидропатичен индекс
Аланин	1.8	Пролин	- 1.6
Валин	4.2	Серин	- 0.8
Левцин	3.8	Треонин	- 0.7
Изолевцин	4.5	Аспарагин	- 3.5
Цистеин	2.5	Глутамин	- 3.5
Метионин	1.9	Аспартат	- 3.5
Фенилаланин	2.8	Глутамат	- 3.5
Глицин	- 0.4	Хистидин	- 3.2
Триптофан	- 0.9	Лизин	- 3.9
Тирозин	- 1.3	Аргинин	- 4.5

* По данни на [2].

Замяната на полярен остатък с хидрофобен или обратно, се нарича неконсервативна замяна. Такава замяна се наблюдава напр. на шеста позиция в β -веригите на патологичния хемоглобин S, който съдържа валин вместо глутамат. Обратно, в случаите, когато един остатък се заменя с друг, който има близка относителна хидрофобност, напр. валин с левцин, казваме, че замяната е консервативна.

2.1.5. Значение на радикалите за структурата, свойствата и функциите

Свойствата на аминокиселинните радикали, изграждащи белтъците, са основни структурни детерминанти, т.е. те определят структурата, свойствата и функциите на белтъците. Хидрофобните остатъци участват в хидрофобни, а полярните - в електростатични взаимодействия, които са от значение за оформяне на уникалната структура на даден белтък. За това допринасят и цистеиновите остатъци, които образуват помежду си дисулфидни връзки. Глицинът, най-малката и с най-проста структура аминокиселина, се вмести в участъци, недостъпни за по-големи остатъци. Тези участъци често са място, където полипептидната верига се огъва.

При физиологично рН положително заредените, както и отрицателно заредените групи, реагират като слаби киселини и слаби основи и придават на белтъците амфотерни свойства. Тези групи участват в пренос на заряди в ензимната катализа или в дихателната верига. Хистидинът със своето имидазолово ядро допринася за буферните свойства на белтъците при физиологично рН.

Ароматните аминокиселини поглъщат светлина в ултравиолетовата област (250-290nm). От трите ароматни най-голям принос за екстинкцията на белтъци при 280 nm има триптофанът. Затова концентрацията на безцветни белтъци, които съдържат ароматни аминокиселини може да се определя чрез директно измерване на екстинкцията при 280 nm, без да е необходимо оцветяването им.

Карбоксилни и amino-групи в ензимни белтъци често се използват за свързване на различни субстрати. Алкохолната група на серина и сулфхидрилната група на цистеина участват в активните центрове на различни ензими. Цистеиновите остатъци могат да образуват помежду си дисулфидни връзки, които се срещат в доста белтъци и допринасят за стабилизиране на структурата им. Серинът и треонинът (с алкохолна група) и тирозинът (с фенолна група) могат да бъдат обратимо ковалентно модифицирани чрез фосфорилиране-дефосфорилиране и това има голямо значение за регулиране на ензимната активност.

2.1.6. Зарядови свойства на аминокиселини

В свободните и във включените в белтъци аминокиселини има няколко групи, които се отнасят като слаби киселини: -COOH група – в С-края и в аспарагинова и глутаминова киселина; $-\text{NH}_3^+$ - в N-края и в лизин; и други групи в хистидин, аргинин, цистеин и тирозин. (фиг. 2-3).

В разтвор тези протонирани групи са в равновесие със съответните спрегнати бази.

Спрегната киселина (формата, която преобладава под pK_a)	pK_a интервал за групата	Спрегната база (формата, която преобладава над pK_a)
C - крайна група -COOH	\rightleftharpoons 2.5 - 3.4	-COO ⁻ + H ⁺
радикал на Асп $\text{HC}-\text{CH}_2-\text{COOH}$	\rightleftharpoons 3.7-4.3	$\text{HC}-\text{CH}_2-\text{COO}^- + \text{H}^+$
радикал на Глу $\text{HC}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COOH}$	\rightleftharpoons 3.7-4.3	$\text{HC}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COO}^- + \text{H}^+$
радикал на Хис $\text{HC}-\text{CH}_2-\text{C}_5\text{H}_4\text{N}^+$	\rightleftharpoons 6.1 - 6.4	$\text{HC}-\text{CH}_2-\text{C}_5\text{H}_4\text{N} + \text{H}^+$
N - крайна аминогрупа -NH ₃ ⁺	\rightleftharpoons 7.9 - 8.2	-NH ₂ + H ⁺
радикал на Цис $\text{HC}-\text{CH}_2\text{SH}$	\rightleftharpoons 9.0-9.5	$\text{HC}-\text{CH}_2\text{S}^- + \text{H}^+$
радикал на Тир $\text{HC}-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_4\text{OH}$	\rightleftharpoons 10.0 - 10.2	$\text{HC}-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_4\text{O}^- + \text{H}^+$
радикал на Лиз $\text{HC}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_3^+$	\rightleftharpoons 10.4 - 10.8	$\text{HC}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_2 + \text{H}^+$
радикал на Арг $\text{HC}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{C}(=\text{NH}_2)_2^+$	\rightleftharpoons 12.4 - 12.8	$\text{HC}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{C}(=\text{NH}_2)_2 + \text{H}^+$

Фиг. 2-3 Дисоциация на аминокиселинните радикали.

С увеличение на рН зарядът на радикалите се мени. Под pK_a преобладава спрегнатата киселина, а над pK_a преобладава спрегнатата база.

Протонната дисоциация на киселините се характеризира с константата на дисоциация K_a (индексът **a** идва от английското название на киселина - acid), представяна обикновено като pK_a ($pK_a = -\log K_a$). Тази константа отразява относителната сила (реципрочен афинитет към протона) на дадена група като слаба киселина. Съгласно уравнението на Henderson-Hasselbalch (ур. 2-1) pK_a на дадена група е това рН, при което са дисоциирали 50 % от групата, т.е. концентрацията на спрегнатата база е равна на тази на спрегнатата киселина (тъй като $\log 1=0$):

$$pH = pK_a + \log \frac{[\text{спрегната база}]}{[\text{спрегната киселина}]} \quad (\text{ур. 2-1})$$

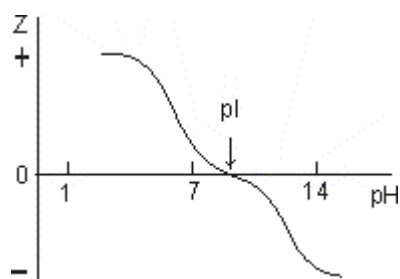
В зависимост от обкръжението, в което се намират групите, стойностите на pK_a могат да варират в определен интервал, както личи от фиг. 2-3. Крайните карбоксилна и amino-групи имат по-ниски стойности за pK_a отколкото, ако са във вътрешността на веригата.

В разтвор свободните аминокиселини съществуват в зависимост от рН в различни йонни форми. При моноаминокарбоксилната аминокиселина валин pK_a за α -СООН група е 2.2 и за ϵ -NH₂ -групата е 9.7. При рН < 2.2 валинът има заредена амино-група (заряд +1). При физиологично рН около 7 сумарният заряд е 0 (заредени са и амино- и карбоксилната групи). Тази форма се нарича цвистерйон. При нея броят на положителните заряди е равен на броя на отрицателните заряди. При рН > 9.7 заредена е само карбоксилната група. Изцяло незаредена форма не съществува при никое рН. Поради наличието на допълнителна група йонните форми на лизин и аспартат са четири при рН около 7.

Това рН, при което аминокиселината е електрически неутрална и се намира в цвистерйонна форма, се нарича изоелектрично рН или изоелектрична точка (pI). При моноамино-монокарбоксилните киселини pI е средно аритметично от pK_a на карбоксилната и амино-група, напр. $pI_{\text{валин}} = (2.2+9.7)/2 = 5.95$. При аминокиселини с допълнителни функционални групи pI приблизително е средно аритметично от pK_a на групите с еднакъв заряд. Напр. при лизин (с допълнителна амино-група) pK_a за α -СООН група е 2.2, за α -амино групата е 9.0 и за ϵ -NH₂ -групата е 10.5 и $pI_{\text{лизин}} = (9.0+10.5) / 2 = 9.75$.

2.1.7. Зарядови свойства на белтъци

В белтъците α -амино и α -карбоксилните групи са ангажирани в пептидните връзки. От значение за сумарния заряд и за буферните свойства на белтъците са само крайните групи и тези от страничните радикали (фиг. 2-3). Сумарният заряд на белтъчната молекула зависи от аминокиселинния състав и от рН на средата. В киселата област е потисната дисоциацията на киселите групи и зарядът поради наличие на положително заредени групи е положителен и твърде висок (фиг. 2-4). С увеличение на рН зарядът намалява, минава през нула и започва да нараства в отрицателна посока. В алкалната област дисоциацията на базичните групи е потисната и поради наличието на отрицателно заредени карбоксилни групи сумарният заряд е отрицателен.



Фиг. 2-4. Зависимост на сумарния заряд Z на белтъчната молекула от рН. По Т.Николов [3] с разрешение.

Пресечната точка на кривата с абсцисата е pI (това рН, при което сумарният заряд е нула).

Изчисляването на pI за белтъци чрез уравнението на Henderson-Hasselbalch е неточно. Предпочита се експериментално определяне на pI - като рН, при което белтъкът, имайки сумарен заряд нула (равен брой положителни и отрицателни заряди), не се движи в електрично поле. Изоелектричната точка за даден белтък зависи от природата на буфера, от йонната сила на разтвора, от конформацията на белтъка и др. Нейната стойност дава, макар и приблизителна, представа за аминокиселинния състав. Белтъци, които съдържат повече аргинин, лизин и хистидин, имат по-високи pI и се наричат алкални белтъци, например за цитохром c $pI=10.0$. Обратно, белтъци, в които преобладават глутаминова

и аспарагинова киселини, имат по-ниски pI (кисели белтъци, напр. пепсин с $pI \sim 1$, серумен албумин ($pI = 5.9$ и др.).

Белтъците действат като буферни системи в широк pH диапазон, определян от pK на големия брой различни дисоцииращи групи в радикалите им. Буферният капацитет на всяка група е най-силен при pH около pK на групата. С най-голямо физиологично значение за буферните свойства на белтъците е хистидин, тъй като неговият имидазолов пръстен има pK_a между 6 и 7, т.е. най-близо до физиологични pH .

2.2. Структура на белтъци

2.2.1 Резюме

Белтъците имат четири нива на организация: първична, вторична, третична и четвъртична структури. Първичната структура е последователността на аминокиселинните остатъци и локализацията на дисулфидни връзки в полипептидните вериги. Определя се от ковалентни пептидни връзки между остатъците. Тя е генетично детерминирана и определя по-висшите нива на организация.

Вторичната структура представлява локално нагъване на част от полипептидната верига в α -спирални или β -верижни участъци, стабилизирани главно от водородни връзки между близко разположени пептидни групи.

Третичната структура се отнася до пространствените взаимоотношения между всички аминокиселинни остатъци във веригата, т.е. до цялостното пространствено нагъване на полипептидната верига и нейното фиксиране чрез нековалентни взаимодействия (хидрофобни, електростатични или други) между отдалечени по веригата аминокиселинни остатъци. Дисулфидните връзки (в белтъци, съдържащи цистеинови остатъци) също допринасят за стабилизиране на третичната структура.

Четвъртичната структура се определя от пространственото разположение на две или повече полипептидни вериги (наречани субединици), обединени в едно цяло в структурно и функционално отношение. Тя, както вторичната и третичната структури, зависи от нековалентни взаимодействия.

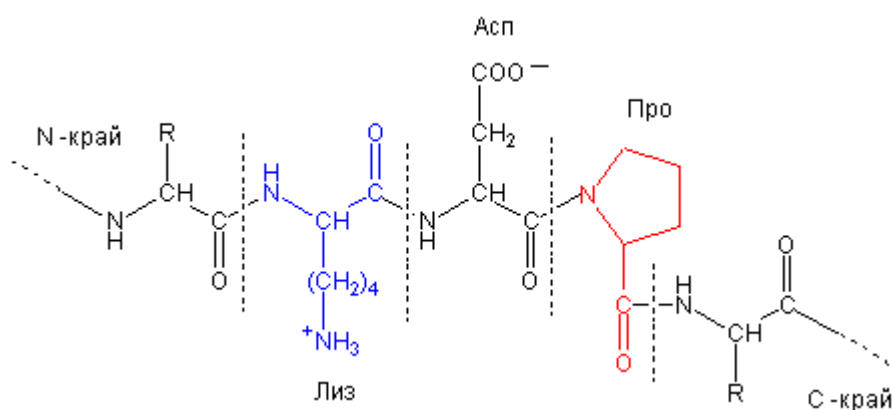
Денатурацията е процес, при който се нарушават нековалентни взаимодействия, засягат се по-висшите нива на организация без първичната структура и се губи биологичната активност.

Нагъването на полипептидните вериги в пространството се улеснява от специални ензими (пролил рацемаза и протеин дисулфид изомераза) и специални белтъци, наречени шаперони. Шапероните при физиологични условия предотвратяват неправилното нагъване и "нежеланите" взаимодействия между аминокиселинните радикали в новосинтезиращите се полипептидни вериги.

2.2.2. Първична структура на белтъчните молекули

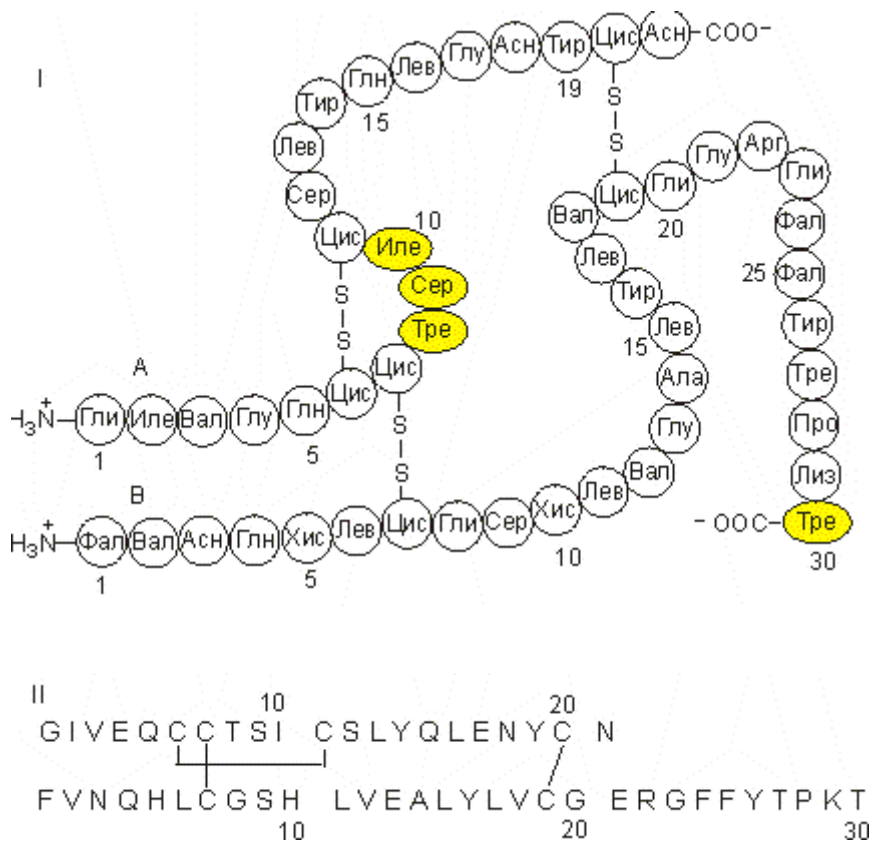
За да бъде разбрана по-лесно сложната пространствена организация на белтъчните молекули, съдържащи хиляди атоми, тяхната структура се разглежда на четири равнища: първично, вторично и третично и четвъртично равнище. Съответно се използват термините първична, вторична, третична и четвъртична структура.

Първичната структура представлява подреждането на аминокиселините в полипептидните вериги на молекулата, т.е. аминокиселинната последователност. При наличие на дисулфидни връзки (вътрешноверижни или междуверижни) се указва тяхната локализация, т.е. посочва се между кои цистеинови остатъци е образувана дадена дисулфидна връзка. Първичната структура зависи само от ковалентни пептидни връзки. Тя детерминира останалите нива на организация. Тя е свързващото звено между генетичната информация и физиологичната функция. На първично равнище белтъчната молекула може да бъде представена опростено като линеен запис чрез последователно изписване с обикновените структурни формули на аминокиселинните остатъци в посока от N към C края, както е показано на фиг. 2-5.



Фиг. 2-5. Част от една полипептидна верига, изписана с обикновените структурни формули.

Изписването на първичната структура по този начин отнема време и място. Броят на остатъците в белтъците е различен (от стотина в цитохром *c* до няколко хиляди в други белтъци. Напр. във веригата на белтъка апо-В100 има 4536 остатъка. Тъй като гръбнакът на всички вериги е еднакъв поради повтаряне на групировката $>\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-$, използва се и съкратен начин за представяне на първичната структура чрез трибуквените или еднобуквените съкращения на аминокиселините. На фиг. 2-6 е представена молекулата на хормона инсулин от човек, използван за лечение на диабет. Инсулинът се състои от две вериги: верига А (21 остатъка) и верига В (30 остатъка). Две междуверижни дисулфидни връзки свързват тези вериги, а във верига А има вътрешноверижна дисулфидна връзка.



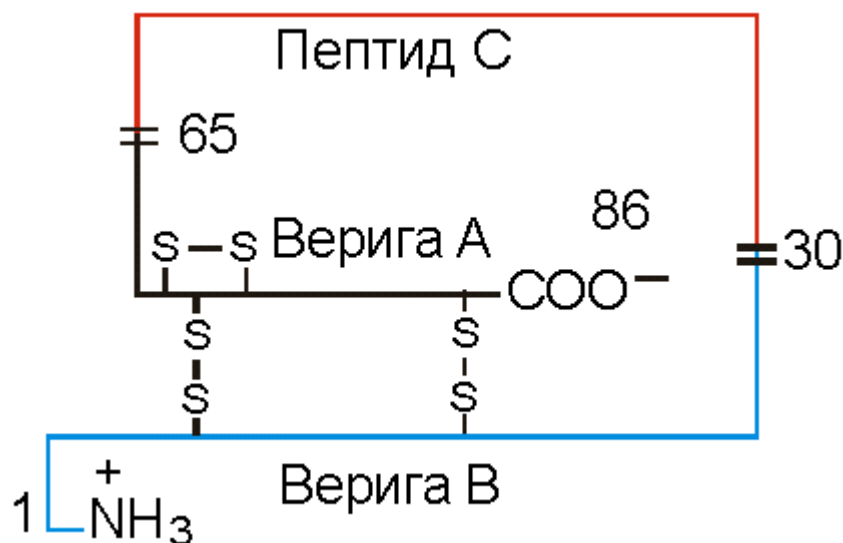
Фиг. 2-6. Съкратено представяне на първичната структура на двете вериги (А и В) на човешки инсулин в посока от N- към С-края.

Оцветени са остатъците А8, А9, А10 от верига А и В30 от верига В, които в различни животински видове се различават от тези в човек (вж т. 2.5.4). Данните са по [5] и [4].

I - чрез трибуквени съкращения; II - чрез еднобуквени съкращения.

Въпреки ниската молекулна маса на инсулин (5 734 KDa), той се причислява към белтъците, тъй като се синтезира като неактивен предшественик препроинсулин (11 500 KDa).

От него след протеолитично отцепване на пептид от N-края, наричан сигнален (вж гл.14), се получава проинсулин (9 000 KDa) (фиг. 2-7). От проинсулин след отделяне на пептид С и два дипептида се оформят веригите А и В на мономера инсулин.



Фиг. 2-7. Схематично представяне на полипептидната верига на проинсулин с 86 аминокиселинни остатъци. От тази обща верига след хидролитно отделяне на пептид С (в червено) и два дипептида се получават двете вериги на инсулин: верига А с 21 остатъци (в черно) и верига В с 30 остатъци (в синьо).

Както личи от фиг. 2-5 и фиг. 2-6, полипептидните вериги, изграждащи белтъците, се характеризират със следните особености:

- 1) Веригите имат два различни края: азотен или N-край (свободна аминокиселинна група) и въглероден или С-край (свободна карбоксилна група). Тези групи при рН 7 са в йонизирано състояние.
- 2) Няма циклизация на веригата - краищата са свободни.
- 3) Няма разклонения, защото в образуване на пептидната връзка участвуват само α -амино и α -карбоксилни групи.
- 4) Веригите имат еднакъв скелет, тъй като се повтаря една и съща групировка $>CH-CO-NH-$.
- 5) разнообразието на природните полипептиди и белтъци е следствие от различия в аминокиселинната последователност.

Названията на аминокиселинните остатъци в пептидната верига добиват окончание -ил, напр. пептид, съдържащ глицин, аланин, лизин и валин ще се чете като глицил-аланил-лизил-валин. Последният аминокиселинен остатък в С-края не променя названието си.

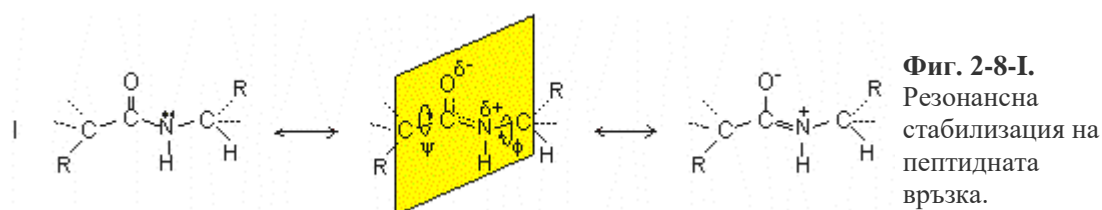
Огромно количество белтъци вече имат изяснена първична структура. Данните се съхраняват в електронен вид в специални масиви от база данни, напр. Protein Data Bank (PDB) или European Molecular Biology Laboratory Data Library (EMBL), които са достъпни чрез Интернет. Електронната търсачка PubMed (The National Library of Medicine's Search Service) [6] има достъп до повече от 11 млн заглавия в Medline, PreMedline и други база-данни с връзки към изходните свързани с Интернет списания.

При опростеното представяне на белтъчната молекула в една равнина (фиг. 2-5 и 2-6), не се вземат предвид нито особеностите на пептидната връзка, нито другите възможни взаимодействия. Но в действителност те съществуват и обуславят по-висшите структури.

2.2.3. Връзки в белтъците

Пептидната връзка е ковалентна връзка, която се получава при кондензация на $-COOH$ група от една аминокиселина и амино-група от друга аминокиселина.

Резонансната стабилизация на пептидната връзка е представена на фиг. 2-8-I. Полудвойните връзки в пептидната група обуславят равнина на спрежение. Четирите атоми C, O, N, H, както съседните α -C атоми, лежат в тази равнина и поради това свободно въртене около осите на полудвойните връзки не е позволено. Свободно въртене под определен ъгъл е позволено само около съседните на пептидната група прости връзки N-C $_{\alpha}$ (ъгъл ϕ) и C $_{\alpha}$ -C (ъгъл ψ). Тези ъгли ϕ (phi) и ψ (psi) са въведени от Рамачандран. Радикалите, прикрепени към α -C атоми, са в предпочитана транс-позиция спрямо равнината на пептидната връзка. Друго важно следствие от мезомерията на пептидната връзка е възможността да се образуват водородни връзки между близко разположени пептидни групи.



Наред с ковалентните пептидни и дисулфидни връзки, в белтъците има и голям брой други нековалентни взаимодействия, които, макар и значително по-слаби, са важни за структурата, свойствата и биологичната активност на белтъците (табл. 2-2).

Табл. 2-2. Видове връзки и взаимодействия в белтъчните молекули*

Връзки или взаимодействия	Енергия на връзката (kJ/mol)
Ковалентни пептидни връзки	около 400
Ковалентни дисулфидни връзки	около 214
Водородни връзки	4.2 - 25
Хидрофобни взаимодействия	< 4.2
Йонни връзки	< 21

*Данните са по Т. Николов [3].

Водородни връзки възникват, когато Н атом е между два по-електроотрицателни атоми, с единия от които е ковалентно свързан. Напр. Н, свързан към N от една пептидна група, се привлича от О на друга пептидна група. Водородните връзки са по-слаби от ковалентните връзки, но поради големия им брой между близко разположени пептидни групи, те имат значение за стабилизиране на вторичната структура. Водородни връзки има и между повърхностно разположени полярни радикали и водни молекули.

Хидрофобни взаимодействия има между неполярни радикали, които в разтворимите глобуларни белтъци се разполагат във вътрешността на молекулата. При белтъци, вградени в хидрофобни мембрани, е налице повърхностно разположение на неполярни остатъци, които участват в хидрофобни взаимодействия с мембранните липиди.

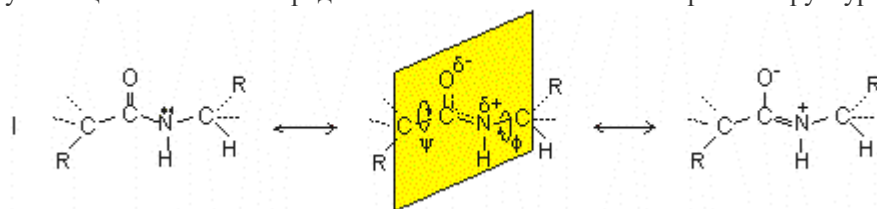
Електростатични взаимодействия има между заредени групи от радикалите (привличане и отблъскване). Тези заредени групи са обикновено по повърхността на белтъчната молекула, но има случаи, когато такива групи с важна функция са в жлеб, разположен във вътрешността на молекулата.

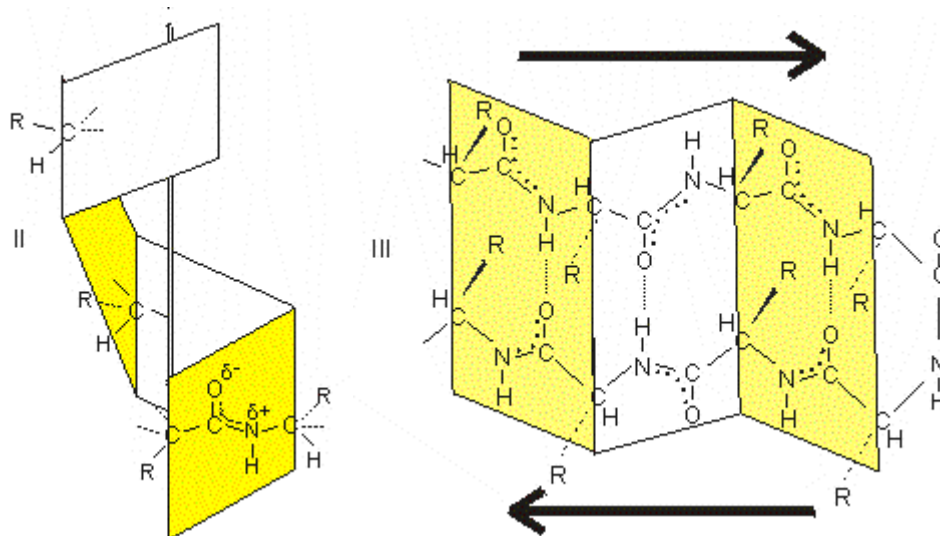
Ван дер Ваалсовите взаимодействия на привличане и отблъскване са много слаби и действат на къси разстояния между временно индуцирани диполи. Оптималното контактно разстояние между два атома е сумата от техните Ван дер Ваалсови радиуси. При него привличането е максимално, а отблъскването минимално.

2.2.4. Вторична структура

Теоретично ъглите на въртене ϕ (около оста N-C $_{\alpha}$) и ψ (около оста

C $_{\alpha}$ -C) (фиг. 2-8-I) могат да заемат стойности от -180° до $+180^{\circ}$, но на практика много от тези стойности са забранени поради пространствено пречене между радикалите. Т.е. само теоретично са възможни безброй конформации на полипептидната верига при различно завъртане на плоскостите на пептидните групи една спрямо друга. Поради възникването на голям брой водородни връзки между близко разположени пептидни групи и поради пространствено пречене между радикалите, тези ъгли ϕ и ψ не могат да имат произволно значение и веригата в отделни участъци се огъва по определен начин - т.е. възниква вторична структура.





Фиг. 2-8. Особенности на пептидната връзка и видове вторична структура.

I - Резонансна стабилизация на пептидната връзка. При определени стойности на ϕ (около оста N-C $_{\alpha}$) и ψ (около оста C $_{\alpha}$ -C) възниква α -спирала (II) или β -структура (III) - вж също табл. 2-3.

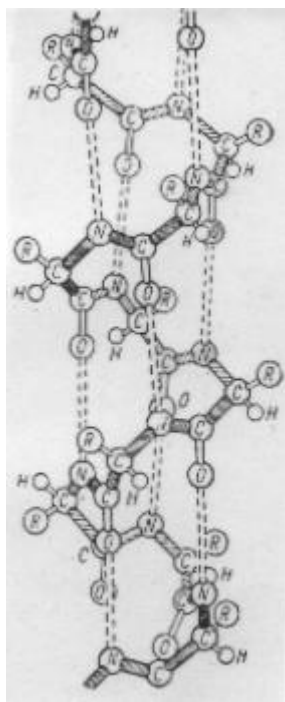
Вторичната структура се отнася до локалното нагъване на части от полипептидната верига под форма на α -спирала (фиг. 2-8-II), β -структура (фиг. 2-8-III) или друг тип спирала с определени параметри (табл. 2-3). Тези параметри са: ъгли на Рамачандран ϕ и ψ , брой остатъци на един оборот на спиралата (n), разстояние между α -C атоми на съседни остатъци (d) и ход на спиралата ($p = n \times d$). Термодинамично най-стабилни са α -спиралата и β -структурата. Различните видове структура се стабилизират от водородни връзки между близко разположени пептидни групи.

При α -спиралата водородните връзки са вътрешноверижни и успоредни на оста на спиралата през 4 остатъка (между CO групата на остатък m и NH групата от остатък $m+4$), както личи от модела на Полинг (фиг. 2-9) и различните компютърни изображения на α -спиралата (фиг. 2-10). α -Спиралата е възможно най-компактната форма на полипептидната верига ($n = 3.6$, докато за β -веригата $n = 2.0$ - вж табл. 2-3).

Табл. 2-3. Видове вторични структури с характерните им параметри.

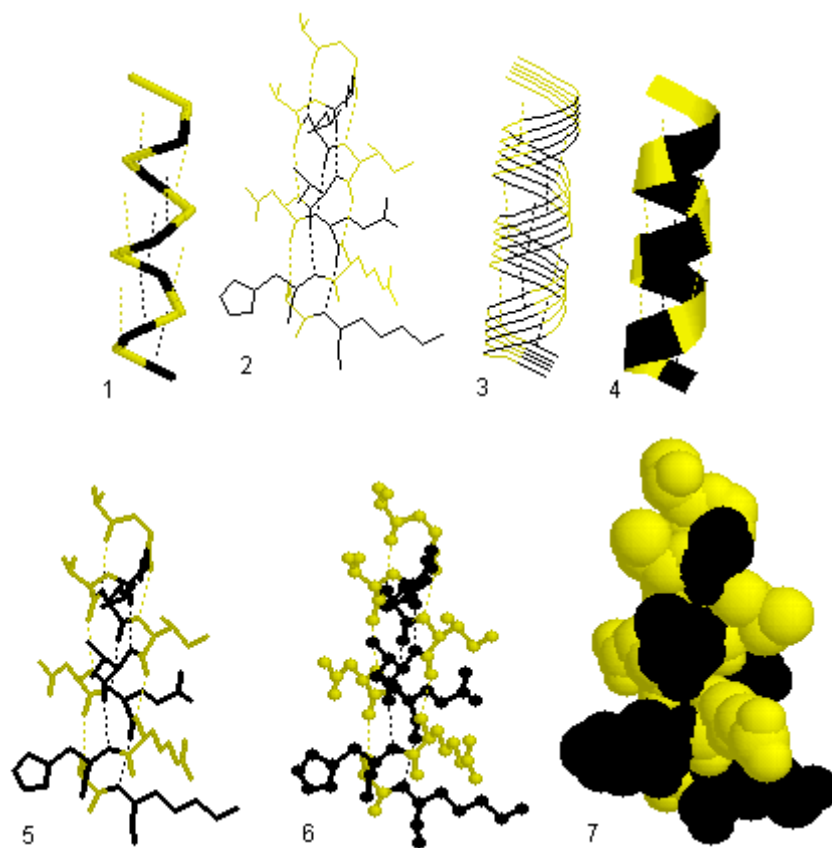
Структура	n	p (nm)	ϕ ($^{\circ}$)	ψ ($^{\circ}$)
α -Спирала с десен ход	3.6	0.54	- 57	- 47
β -Верига в паралелен β -лист	2.0	6.4	- 119	+ 113
β -Верига в антипаралелен β -лист	2.0	6.8	- 139	+ 135
Спирала от полипролинов тип II	3.0	9.4	- 78	+ 149

n - брой аминокиселинни остатъци за един оборот на веригата;
 p - ход на спиралата; ($p = n \times d$), където d - разстояние между α -C атоми на съседни остатъци; ϕ и ψ - ъгли на Рамачандран.



Фиг. 2-9. Теоретичен модел на Полинг за дясно-завита α -спирала.

Във всеки оборот на спиралата участват 3.6 аминокиселинни остатъка,
т.е $n = 3.6$;
 d - разстояние между α -C атоми на съседни остатъци; $d = 0.15$ nm;
 p - ход на спиралата; $p = n \times d = 0.54$ nm.



Фиг. 2-10. Различни изображения на α -спирален участък чрез компютърната програма Raswin [7]. Фрагментът съдържа в посока от N към С-края (отгоре надолу) следните 13 остатъци: Ала, Гли, Сер, Тре, Лев, Иле, Вал, Асн, Глн, Арг, Хис, Ала, Лиз.[8]

1 - модел тип "гръбнак" (backbone); 2 - модел тип "жица" (wireframe); 3 - модел тип "прозрачна панделка" (strands); 4 - модел тип "плътна панделка" (ribbon); 5 - модел тип "пръчки" (sticks); 6 - модел тип "топки и пръчки" (balls and sticks); 7 - пълен пространствен модел" (full space).

С редуващ се цвят са открити отделните аминокиселинни остатъци. Водородните връзки (вътрешноверижни и успоредни на оста на спиралата) са представени с пунктири.

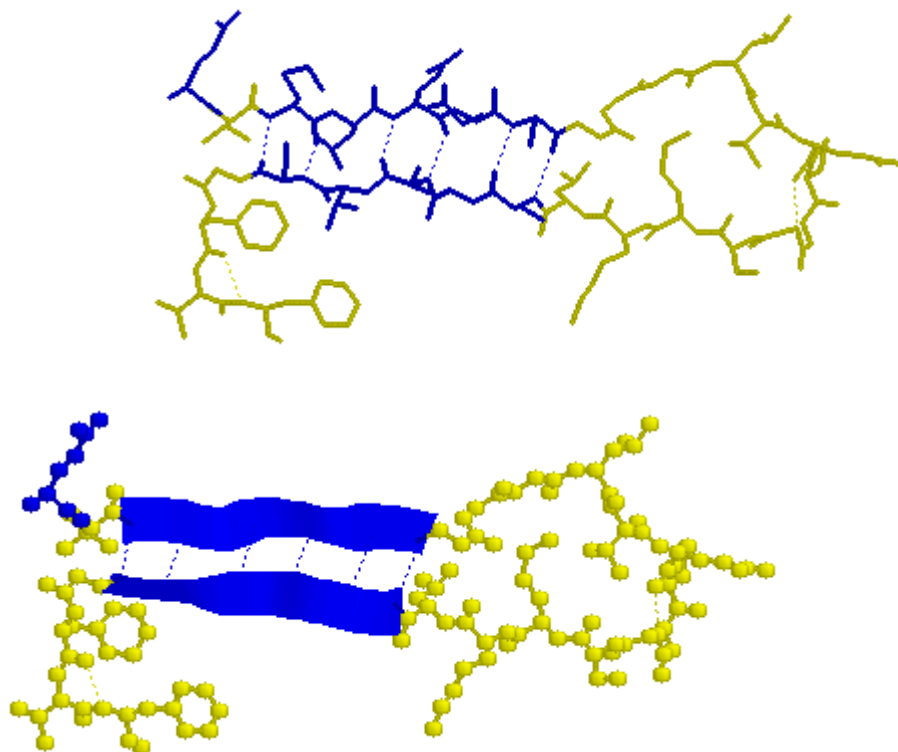
β -Веригата е сравнително най-опънатата форма на полипептидната верига ($n=2$ - вж табл. 2-3). Водородни връзки се образуват между близко разположени пептидни групи от различни вериги или между различни участъци на една верига (фиг. 2-8-III и фиг. 2-11). Водородните връзки са приблизително перпендикулярни на осите на веригите. Сближените вериги образуват леко зигзаговидно нагъната повърхност (като мех на хармоника), която може да се идеализира като равнина. Страничните остатъци (R) са разположени почти перпендикулярно на мислената равнина, в която лежи "хармониката" и са алтернативно повтарящи се от двете ѝ страни.

Възникващата система от паралелни (еднопосочни) или антипаралелни (разнопосочни) вериги се означава като мотив от типа β -лист. Преобладават антипаралелните β -листове (фиг. 2-11). Броят на β -верижните участъци в β -листа може да варира от 2 до 15. Вериги с обща формула (- Гли - X) позволяват

да бъдат плътно опаковани и имат висока механична стабилност - напр. като при фиброин от коприна.

Мотивът е повтаряща се комбинация от елементи на вторичната структура, напр. $\alpha\beta\alpha\beta$, $\beta\beta$ (β -лист), $\alpha\beta$ (гривна), гръцки ключ и др.

α -Спиралните и β -верижните участъци съставляват около 50 % от цялата верига. Останалите участъци в местата на огъване се означават като бримки и са не по-малко важни за биологичната функция на даден белтък. Бримките не трябва да се бъркат с термина "случайно нагъната верига", използван за денатурирани вериги.



Фиг. 2-11. Различни начини на представяне на структура от типа β -лист чрез програмата Raswin [7].

Част от полипептидна верига съдържа в посока от N- към С-края следните остатъци: Глу, Вал, Лиз, Лев, Глу, Глу, Сер, Гли, Гли, Гли, Лев, Вал, Глн, Про, Гли, Гли, Сер, Мет, Лиз, Лев, Сер, Цис, Ала, Тре, Сер, Гли, Фал, Тре, Фал, Сер.[9]

N-краят е в левия горен край и е в син цвят. Водородните връзки (представени с пунктири) между остатъците в двата антипаралелни β -участъци стабилизират β -структурата.

1 - Всички остатъци са представени с модел тип "пръчки и топки"; 2- β -верижните участъци са представени с модел тип "панделка"; а остатъците в местата на огъване - с модел "пръчки и топки". Атомните координати са по [10].

2.2.5. Третична структура на белтъчните молекули

Далечните нековалентни взаимодействия между аминокиселинните остатъци определят по-висшата третична структура на белтъчната молекула - т. е. начинът на пространствено нагъване на цялата верига, която може да съдържа α -спирални и/или β -структурни участъци. На фиг. 2-12 са дадени

примери за нековалентни взаимодействия между отдалечени радикали.
Те могат да бъдат:

1) хидрофобни взаимодействия - между неполярни аминокиселинни остатъци;

2) полярни взаимодействия между полярни остатъци:

а) йонни (привличане между противоположно заредени групи) или отблъскване между едноименно заредени групи);

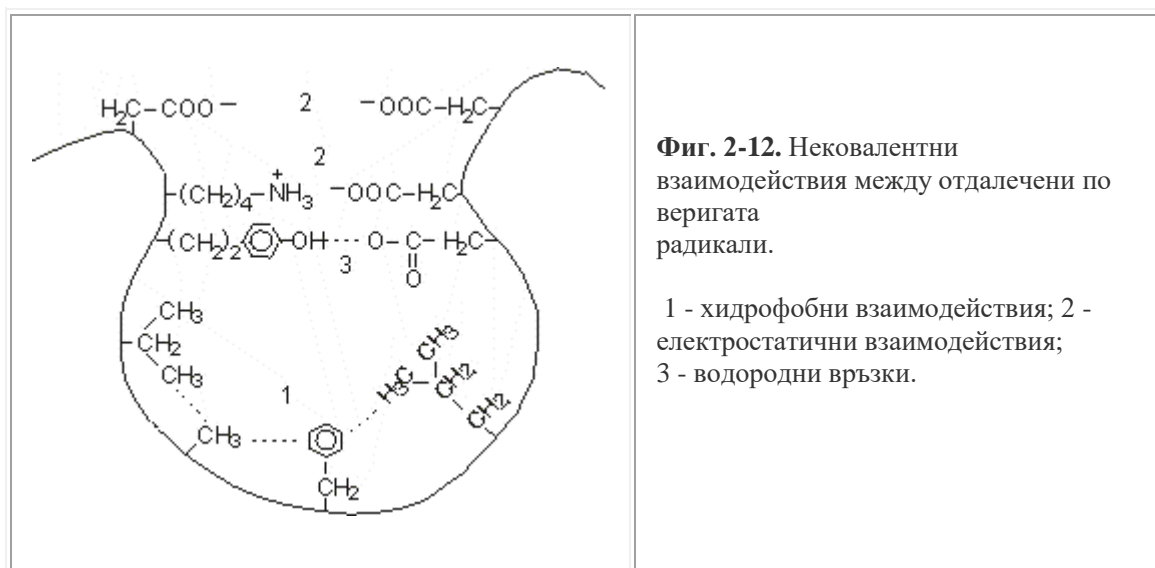
б) йон-диполни - между заредена група и полярна, но недисоциираща група;

в) водородни връзки между радикали.

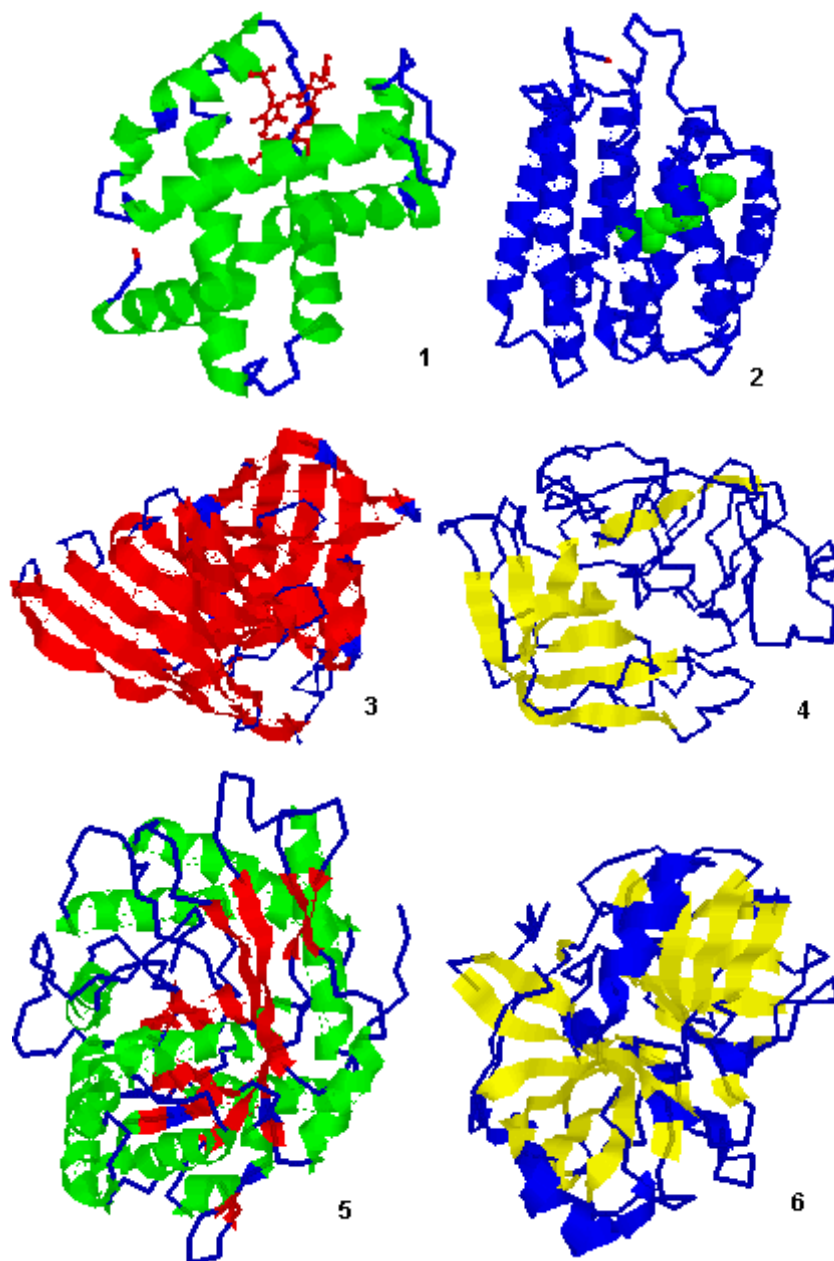
В белтъците, които съдържат цистеинови остатъци или пролин, има още две причини, които обуславят и поддържат третичната структура:

1) дисулфидни връзки - вътрешоверижни или междуверижни (вж. фиг. 2-6);

2) включването на пролин може да огъне веригата, тъй като целият петатомен пръстен се включва във веригата (вж фиг. 2-5).



На фиг. 2-13 е показана третична структура на различни белтъци, но в рамките на отделните фрагменти личи добре и локалната вторична структура.



Фиг. 2-13. Третична структура на белтъци. .

1 - α_1 -субединица на хемоглобин, съдържаща хем [9], 2 - бактериородопсин [11]; 3 - фрагмент от верига Н на имуноглобулин G [12]; 4 - химотрипсин [13]; 5 - алдолаза [14]; 6 - химотрипсиноген [15].

Фигурите са приготвени с програмата Raswin [7], ползвайки данните за съответните атомни координати от Protein Data Bank [10].

На фиг. 2-13-1 е дадена третичната структура на α_1 -субединица на хемоглобин [9]. Около 75 % от нея се състои от 8 α -спирални участъка, съединени с къси неструктурирани участъци. Освен α -спиралните участъци, представен е и хемът (небелтъчна лиганда, необходима за свързване на кислород). Тези осем участъци се означават с латинските букви от А до Н, а остатъците във всеки от тях се означават с съответната буква на участъка и номера, който те заемат в

него. Например F8 и F7 са двата хистидинови остатъци, разположени от двете страни на хема. Останалата част от веригата е под форма на къси участъци, свързващи спиралните участъци. Освен водно-разтворими белтъци като хемоглобин, и някои мембранно разположени белтъци съдържат α -спирални участъци. Такъв е бактериородопсинът (фиг. 2-13-2). Седемте α -спирални участъци са в по-тъмен цвят. С пунктир са представени водородните връзки, стабилизиращи спиралните участъци. С по-светъл цвят и чрез пълния пространствен модел е представена небелтъчната лиганда 11-цис-ретинал.

Други белтъци съдържат предимно β -структурни участъци, най-често антипаралелни, съединени с къси участъци. Такива има напр. в Cu, Zn-супероксид дисмутаза, конканавалин А, в тежките вериги на имуноглобулини (фиг. 2-13-3), в химотрипсин (фиг. 2-13-4) и много други. На фиг. 2-13-3 с пунктир са дадени водородните връзки между антипаралелни β -верижни участъци, групирани в β -лист.

Някои белтъци съдържат както α -спирални, така и β -структурни участъци. Такива са напр. триозофосфат изомерата, пируват киназа, лактат дехидрогеназа, химотрипсиноген (фиг. 2-13-5), алдолаза (фиг. 2-13-6) и много други.

Третичната структура е високоспецифична - полипептидната верига се нагъва по строго определен начин - в резултат на което възниква уникална пространствена (3D) структура. Всяко изменение на тази структура, дори минимално, се отразява на биологичните функции и свойства. Следователно, на ниво третична структура белтъците имат определена форма и големина в пространството.

Дотук разгледаните белтъци спадат към глобуларните белтъци, тъй като молекулите им имат сферична или леко удължена форма (съотношението на дългата към късата ос е под 10:1). Във вътрешността на глобулата се ориентират хидрофобните остатъци, а по повърхността – хидрофилните остатъци. Около последните се ориентират водни диполи (хидратационна обвивка). По повърхността, обаче, може да има и зони от хидрофобни аминокиселини, често от значение за активността на белтъка. Глобуларните белтъци имат обикновено каталитична или регулаторна роля. Обикновено по повърхността или близо до нея при каталитичните белтъци се разполагат активният център и други регулаторни центрове.

Белтъци, при които дългата ос е много по-дълга от късата ос, се наричат фибриларни. Те имат структуро-образуваща функция. Изграждат разнообразни структури – кости, кожа, сухожилия. Те са неразтворими във вода. Примери за фибриларни белтъци са еластин (изграждащ сухожилия), фибрин (изграждащ кръвния съсирек), кератин, колаген и др. Кератинът участва в изграждане на епидермиса и роговите образувания - косми, нокти, рога и копита). При кератина три α -спирализирани вериги с десен ход се усукват в суперспирала с ляв ход (фибрила). Между веригите възникват напречни киселинно-амидни връзки между -COOH на Глу и ϵ -амино-групата на Лиз. Такива връзки са характерни за кератини в рогови образувания, но са по-редки в кератин от епидермис. Колаген (главният компонент на съединителната тъкан, наричана още екстрацелуларен матрикс), ще бъде разгледан в т. 2.3.4.

2.2.6. Четвъртична структура

Четвъртичната структура се определя от пространственото разположение на две или повече полипептидни вериги (наричани субединици или протомери), образуващи общ комплекс. Всяка субединица има своя първична, вторична и третична структура. Първичната структура на субединиците може да бъде еднаква, или различна и съответно белтъците биват хомо- или хетеро-олигомери. Субединиците са свързани чрез нековалентни взаимодействия (водородни връзки, хидрофобни и електростатични взаимодействия). Едни от субединиците изпълняват каталитична функция, а други разпознавателна и регулаторна функции. Промяната в пространственото разположение на субединиците променя свойствата на молекулата. Затова белтъците с четвъртична структура имат важна роля за регулацията на вътреклетъчните процеси.

За белтъци, изградени от няколко полипептидни вериги, които са свързани чрез ковалентни дисулфидни връзки (напр. имуноглобулини) или за белтъци, съдържащи само една полипептидна верига, не може да се говори, че имат четвъртична структура. Ако все пак между субединиците на даден белтък са налице ковалентни връзки, то те са резултат от следсинтетична модификация.

Белтък с четвъртична структура е хемоглобин (фиг. 2-14). Той е изграден от четири субединици - две α - и две β -вериги, всяка с 141 и 146 остатъка съответно. Означенията α - и β - тук се отнасят до различия в първичната структура. Всяка от субединиците е глобуларен белтък и в съвкупност комплексът от 4 субединици също има форма на глобула. Всяка от веригите носи хем (Fe-порфиринов комплекс). Връзките между четирите вериги на хемоглобина са слаби, нековалентни: хидрофобни, полярни (йонни, йон-диполни, дипол-диполни) и водородни. Полученият тетрамер има биологична активност, а при разграждането му до субединици, се намалява афинитетът към кислород.



Фиг. 2-14. Хемоглобин - пример за белтък с четвъртична структура.

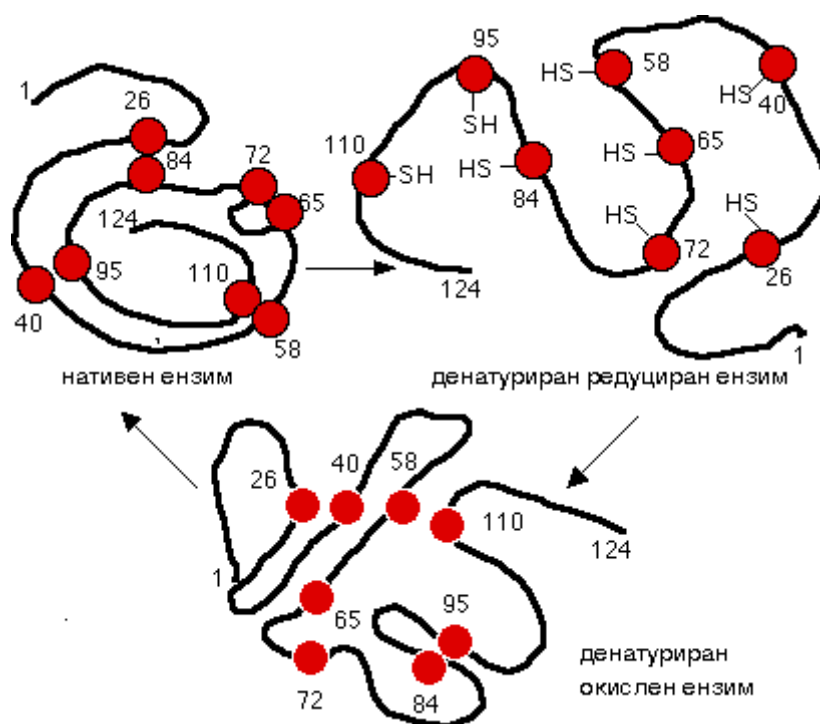
Четирите субединици, както и четирите хемове са представени с различен цвят.

Фигурата е приготвена с програмата Raswin [7], ползвайки атомните координати на файл 1hba [9] в PDB [10].

По-висшите нива на белтъчната молекула са детерминирани от първичната структура. За нейното първостепенно значение говори примера с HbS, който се отличава от нормалния HbA само по един аминокиселинен остатък в двете β -вериги, но това е причина за заболяване - сърповидно-клетъчна анемия (вж т.2.5.7).

2.2.7. Денатурация и ренатурация

Денатурацията е процес, при който под въздействия на различни химични и физични агенти (висока температура, киселини, основи, детергенти, лъчения) се нарушава конформацията на молекулата, променят се физикохимичните свойства и се губи биологичната активност. Тя може да бъде обратима или необратима. При обратимата денатурация след отстраняване на денатуриращото въздействие молекулата отново приема нативна конформация (ренатурация). На фиг. 2-15 е показана денатурация и ренатурация на рибонуклеаза. Тя има осем цистеинови остатъка, образуващи 4 дисулфидни връзки. При комбиниране на тези осем остатъци са възможни 105 конформации и само една от тях е нативна. Останалите 104 се означават като "разбъркана" конформация. В последно време се знае, че има специални ензими (протеин дисулфид изомерази), които улесняват образуване на правилните дисулфидни връзки.



Фиг. 2-15. Денатурация и ренатурация на ензима рибонуклеаза.

В нативния ензим осемте цистеинови остатъци, представени чрез номерирани кръгчета, са свързани чрез дисулфидни връзки. В редуцирания денатуриран ензим всеки от осемте цистеинови остатъци има свободна тиолова група. В денатурирания окислен ензим има дисулфидни връзки, но не между "правилните" цистеинови остатъци, характерни за нативната конформация.

Възможността за ренатурация на рибонуклеаза и примерът с Hb S доказват, че първичната структура е определяща за структурата и свойствата на белтъчната молекула.

2.2.8. Нагъване на новосинтезирани полипептидни вериги

В клетките има специални белтъци, които улесняват процеса на нагъване. Наред със споменатите протеин дисулфид изомерази, които катализират

преместване на дисулфидни връзки, това са шапероните и ензимите от групата на цис-транс пролил изомеразите.

Шапероните (70 kDa) са семейство белтъци, които при физиологични условия предотвратяват неправилното огъване и "нежеланите" взаимодействия между аминокиселинните радикали в новосинтезиращи се полипептидни вериги.

Първичната структура на белтъка детерминира неговите по-висши структури, но шапероните улесняват достигането на термодинамично най-стабилната белтъчна конформация. За правилното нагъване на новообразуващата се полипептидна верига шапероните се свързват временно с хидрофобните участъци на новообразуващата се верига, защитавайки ги от въздействието на разтворителя. За осъществяване на дейността си шапероните изискват енергия под форма на АТФ.

Шапероните се наричат още топлинно-шокови или стресови белтъци, тъй като се синтезират усилено при топлинен шок вероятно с цел да противодействат на денатурацията на клетъчните белтъци.

Освен това система от шаперони улеснява транспорта на белтъци в различни клетъчни отделения. Напр. един шаперон поддържа новосинтезирания белтък в разгънато състояние докато мине през митохондрийната мембрана, а друг шаперон в матрикса улеснява нагъването на белтъка.

За оформяне конформацията на новосинтезираните белтъчни молекули, пролил рацемазата катализира изоергичното цис-транс-превръщане на вече включен в полипептидната верига пролин.

2.3. Връзка между белтъчната структура и биологичната функция

2.3.1 Резюме

2.3.1. Резюме

Структурата и промени в структурата на белтъци са решаващи за функциите на белтъците. Това се илюстрира с примери за кислород-пренасящите белтъци миоглобин и хемоглобин, за колаген (главният структурообразуващ белтък) и за имуноглобулините (защитни антитела).

Глобуларните кислород-свързващи белтъци миоглобин и хемоглобин имат много близка вторична и третична структура. Тя осигурява подходящо обкръжение за еднакви за двата белтъка хем (Fe-порфиринов комплекс), който свързва кислорода. Fe²⁺ йон в хема е координационно свързан към четирите N атоми от порфириновия пръстен и към N атом от Хис F8 (проксимален Хис). В окислено състояние шестата лиганда е O₂, вмъкнат между Fe²⁺ йон и Хис E7 (дистален Хис).

Кривите за асоциация/дисоциация на кислород отразяват различията в свързването и отдаването на кислород от мономера Mb (с третична структура) и тетрамера Hb (с четвъртична структура) при различно парциално налягане на кислорода (pO₂). Кривата за Mb е правоъгълна хипербола. Mb

в мускулите лесно свързва отделения от Hb O₂, съхранява го и го предава на митохондриите. Свързването не зависи от рН, СО₂ и 2,3-бисфосфоглицерат.

Кривата за Hb е сигмоида и това е свързано с четвъртичната му структура. Свързването на O₂ към първата субединица води до конформационни промени в останалите субединици, което улеснява свързването му. Този ефект се означава като положителна кооперативност. В белите дробове рO₂ е около 90-100 mm Hg и там Hb е максимално наситен с O₂. В тъканите рO₂ е от около 40 mm Hg, а в капилярите - около 20 mm Hg. Тетрамерната структура позволява много по-голямо отдаване на O₂ при по-ниски рO₂ отколкото е възможно при единичната верига на Mb.

Повишеното съдържание на СО₂ и протони в тъканните капиляри улеснява отделянето на O₂ от оксиHb. Обратно, повишеното съдържание на O₂ в белодробните капиляри улеснява отделянето на СО₂ и протони от Hb. Тези взаимозависимости се означават като ефект на Бор.

HbA свързва отрицателно-заредения 2,3-бисфосфоглицерат в празнината между четирите субединици и това снижава афинитета на Hb към O₂. В свързването участват три положително заредени групи от всяка β-субединица, една от които е Hис21. Феталният HbF вместо β вериги съдържа γ вериги. В γ веригите Hис21 е заменен със Сер. Поради това HbF има по-нисък афинитет за 2,3-фосфоглицерат и последният не инхибира свързването на O₂ към HbF. Това позволява HbF да свързва лесно O₂, освободен от майчиния HbA.

Колагенът е най-застъпеният белтък в нашето тяло, съставна част на екстрацелуларния матрикс. Известни са досега 30 различно кодирани полипептидни вериги, които при своето комбиниране дават 19 типа колаген, различната структура на които осигурява различните им функции.

Здравината на колаген тип I се обуславя от уникалния аминокиселинен състав и характерната първична структура с повтаряща се последователност от (Гли-Х-Про/Хип). Всеки трети остатък е глицин. Има и хидрокси-пролин и хидрокси-лизин, получени чрез посттранслационни модификации. Тази първична структура предопределя спирала с ляв ход с параметри, отлични от тези на α-спиралата. Три полипептидни вериги с ляв ход образуват устойчива на развиване тройна суперспирала с десен ход, наречена тропоколаген, който е основната структурна единица на колаген. Трите вериги са в близък контакт и се свързват чрез водородни връзки. Само глицин, най-малката аминокиселина, приляга по размери в сърцевината на суперспиралата. Това обяснява защо глицин е на всяка трета позиция.

Вътреклетъчните посттранслационни модификации на проколаген са условие за образуване на тройната спирала. Извън клетките от проколаген се отцепват N- и C- крайните пропептиди. Получените тропоколагенови молекули се свързват една с друга и образуват колагенови фибрили. В тях всяка тропоколагенова молекула се отмества с около 23 % от своята дължина по отношение на съседните. Колагеновите фибрили се пакетират в колагенови влакна. В техните рамки продължава зреенето на колаген, водещо до по-нататъшно усилване здравината на колаген чрез образуване на стабилни ковалентни напречни връзки, усилващи якостта на влакната.

Имуноглобулините, наричани антитела, са защитни белтъци, които разпознават и свързват чужди за организма макромолекули, след което ги бележат и предават на фагоцитите за разрушаване. Всеки имуноглобулин се състои от две леки (L) и две тежки вериги (H), свързани помежду си чрез

дисулфидни връзки. Известни са пет класа имуноглобулини: IgG, IgM, IgA, IgE, IgD.

Всеки човек може да произвежда антитела срещу 10^6 [1] до 10^9 [16] антигени. Генерирането на такъв огромен брой антитела осигурява ефикасна защита срещу чужди макромолекули.

2.3.2. Кислород-пренасящи белтъци

Структурата на глобуларните белтъци миоглобин (Mb) и тетрамера хемоглобин (Hb) е идеално пригодена за изпълнение на функциите им. Hb пренася O_2 от белите дробове до тъканите, а обратно CO_2 и протони. Mb съхранява O_2 в мускулите и го пренася до митохондриите. За целта Mb трябва да може да свързва O_2 добре при ниското pO_2 в тъканите, при което Hb освобождава кислород.

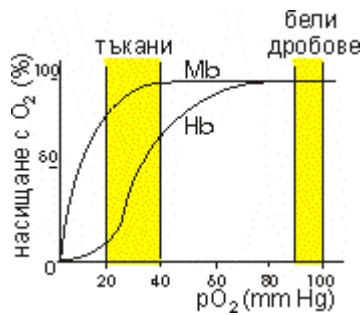
2.3.2.1. Структурни прилики между миоглобин и субединиците на хемоглобин, важни за свързването на кислород

И двата белтъка свързват O_2 . Почти идентичната вторична и третична структура на мономера Mb и на субединиците на тетрамера Hb осигурява подходящо обкръжение за желязо-порфириновия пръстен (хем), който е пряко ангажиран в свързването на O_2 . Без хем веригата се денатурира и не може да свързва кислород. Полипептидната верига е така нагъната в пространството, че повечето от хидрофобните остатъци са във вътрешността на молекулата, а полярните са по нейната повърхност. Fe^{2+} йон в хема е координационно свързан към четирите N атоми от порфириновия пръстен и към N атом от Хис F8 (дистален Хис). В окислено състояние шестата лиганда е O_2 , вмъкнат между Fe^{2+} йон и Хис E7 (проксимален Хис). Плоскостта на хема е разположена във хидрофобна гънка близо до повърхността, където Fe^{2+} йон е защитен от окисление. Mb и Hb без хем или с окислен Fe^{3+} йон в хема (метмиоглобин и метхемоглобин) не могат да свързват кислород.

2.3.2.2. Разлики в кривите за асоциация/дисоциация на O_2 при Mb и Hb

Тези криви отразяват различията в свързването и отдаването на кислород от мономера Mb (с третична структура) и тетрамера Hb (с четвъртична структура) при различно парциално налягане на кислорода (pO_2). P_{50} е това pO_2 , при което белтъкът е наситен наполовина с O_2 . За миоглобин $P_{50} = 2.8$, а за хемоглобин $P_{50} = 26$.

Кривата за Mb е правоъгълна хипербола (фиг. 2-16). При ниското pO_2 в мускулите (20-40 mm Hg) около 90 % от Mb е наситен с O_2 и не го отдава. Едва когато pO_2 спадне към 5 mm Hg, миоглобинът започва да отдава O_2 на митохондриите.



Фиг. 2-16. Криви на асоциация/дисоциация на кислород от миоглобин и хемоглобин в зависимост от парциалното му налягане (pO₂).

За разлика от него, хемоглобин освобождава по-лесно O₂ в тъканите.

Кривата за Hb е сигмоида и това е свързано с четвъртичната му структура.

В дезокси-състояние конформацията на тетрамера Hb се означава като Т форма

(от англ. tight). Свързването на O₂ към първата субединица води до конформационни промени в останалите субединици, което улеснява свързването му от тях.

Този ефект се означава като положителен кооперативен ефект на свързване.

Конформацията на окси-Hb се означава като R форма (от англ. relaxed). В

белите дробове pO₂ е около 90-100 mm Hg и там Hb е максимално наситен с

O₂. В тъканите pO₂ е около 40 mm Hg, а в капилярите - около 20 mm Hg. Свързването

на веригите в тетрамер позволява много по-голямо отдаване на O₂ при тези

по-ниски pO₂ отколкото е възможно при единичната верига на Mb.

Концентрациите на CO₂, протони и 2,3-бисфосфоглицерат не повлияват

свързването на O₂ към Mb в тъканите, но за Hb влиянието на тези три ефектора

се описва с т. н. ефект на Бор. Повишеното съдържание на CO₂ и протони

в тъканите, както и наличието на 2,3-бисфосфоглицерат изместват кривата

за Hb надясно, което улеснява отделянето на O₂ от оксиHb в тъканите. Обратно,

повишеното съдържание на O₂ в белите дробове улеснява отделянето на CO₂

и протони от Hb.

2.3.2.3. Разлики в структурата на HbA и HbF

HbA ($\alpha_2\beta_2$) свързва отрицателно-заредения 2,3-бисфосфоглицерат

в централната празнина между четирите субединици (фиг. 2-17). Това снижава

афинитета на Hb към O₂ и стабилизира дезокси-формата Т. В свързването на

отрицателно-заредения 2,3-бисфосфоглицерат участват по три положително

заредени групи от всяка β -субединица (амино-група от N-крайния Вал, Лиз

EF6 и Хис21).

Феталният HbF ($\alpha_2\gamma_2$) съдържа две α и две γ вериги (вместо 2 β

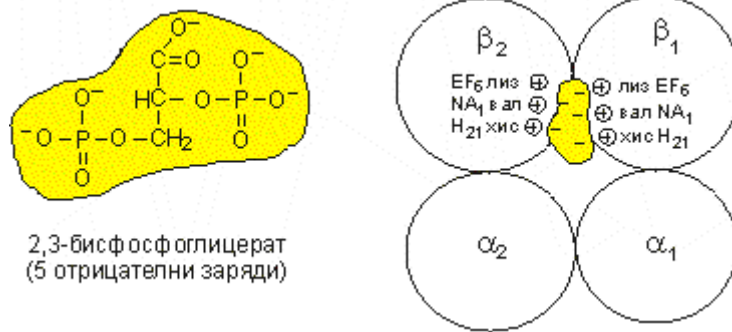
вериги). В γ веригите на HbF Хис21 е заменен със Сер. Поради тази структурна

разлика HbF има по-нисък афинитет за 2,3-фосфоглицерат и последният

влияе много по-слабо върху свързването на кислород към HbF (не го инхибира).

За HbA P₅₀ = 26 mm Hg, а за HbF P₅₀ = 20 mm Hg. Това позволява HbF да извлича

(да свързва лесно) O₂, освободен от майчиния HbA.



Фиг. 2-17. Свързване на 2,3-бисфосфоглицерат (2,3-БФГ) към двете β -субединици на деоксиНбА посредством електростатични взаимодействия. Вляво - формула на 2,3-бисфосфоглицерат с пет отрицателни заряда; Вдясно - йонни връзки между петте отрицателно заредени групи на 2,3-БФГ и положително заредените Лиз EF6, Вал NA1 и ХисH21 от всяка от двете β -субединици.

2.3.3. Колагени

2.3.3.1. Различни типове колаген

Колагенът е най-застъпеният белтък не само в екстрацелуларния матрикс, но и въобще в тялото. Той съставлява около 25 % от белтъците в тялото, като концентрацията му варира: 4 % в черния дроб, 10 % в белите дробове, 12-24 % в аортата, 50 % в хрущялите, 64 % в корнеата, 23 % в кортикалните кости, 74 % в кожата [16]. Известни са засега 30 различни полипептидни вериги за колаген, всяка кодирана от различен ген. В зависимост от комбинацията им и от съдържанието на допълнителни въглехидратни съставки, са установени 19 типа колаген [17]

Различната структура на тези типове колаген осигурява различните им функции. В очната корnea колагенът е прозрачен, в костите и зъбите той съдържа калциево-фосфатен полимер хидроксилапатит, кожният колаген е с хлабави и гъвкави влакна. Характерната за колаген тип I тройна спирала се среща в повечето от другите типове колаген, но дължината ѝ може да варира, а освен това някои от колагените съдържат и глобуларни участъци в N- и C-краищата.

2.3.3.2. Структура на колаген, тип I

Колаген тип I има уникален аминокиселинен състав (вж табл. 2-4). От общо 1050 остатъци в полипептидната верига 33 % са глицин, т. е. всеки трети остатък е глицин. Освен това има и необичайни остатъци: 3-хидрокси-пролин, 4-хидрокси-пролин и 5-хидрокси-лизин, получени чрез посттранслационни модификации (вж т. 2.5.6).

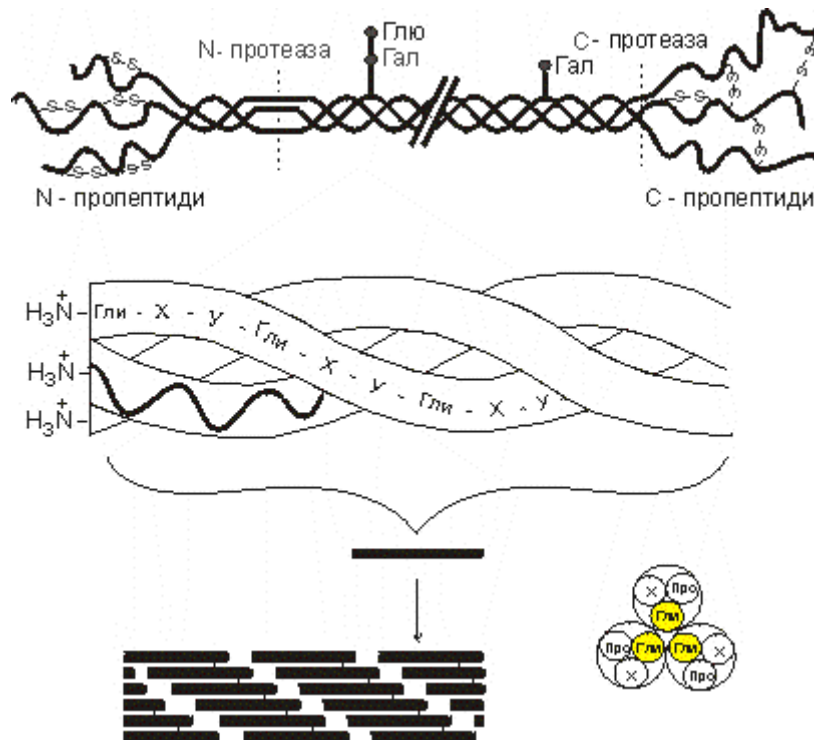
По протежение на веригата се повтаря последователността (Гли-Х-Про/Хип), където Хип е хидроксипролин, а Х - коя да е аминокиселина [18].

Табл. 2-4. Аминокиселинен състав на колаген тип I*

Аминокиселинен остатък	%
глицин	33
пролин	10
3-хидроксипролин и 4-хидрокси-пролин	10
хидроксизин	1
други	46

*По данни на [17].

Високият процент на глицин и пролин и наличието на хидроксипролин и хидроксизин не е случаен. Характерната първична структура предопределя възникването на особен тип спирала с ляв ход, (подобна на спиралата, образувана от синтетичен полипролин (т.н. полипролинова спирала, тип II, чиито параметри са сравнени в табл. 2-3 с тези на други вторични структури). Този тип спирала не съдържа вътрешно верижни водородни връзки. Три полипептидни вериги (две α_1 и една α_2 вериги) с ляв ход образуват тройна суперспирала с десен ход (фиг. 2-18), наречена тропоколаген, който е основната структурна единица на колаген. Трите вериги са в близък контакт, както личи от напречния пререз. Веригите се свързват една с друга чрез водородни връзки. Само глицин, най-малката аминокиселина, приляга по размери в сърцевината на суперспиралата. Това обяснява защо глицин е на всяка трета позиция.



Фиг. 2-18. Структура на проколаген, тропоколаген и колагенови фибрили (тип I).

Най-горе - тройна спирала на проколаген с десен ход, съдържаща три спирали с ляв ход от полипролинов тип II. В една от веригите е показан повтарящият се елемент в първичната структура, а в другата е представена вторичната структура. И трите вериги са от полипролинов тип II (вж табл. 2-3). Първоначално образуващите се сигнални препептиди не са представени. Виждат се само препептидите в аминокиселинния край.

Тропоколаген се получава след поредица от промени в тройната спирала: различни вътреклетъчни химически модификации (описани в текста), екзоцитоза и извънклетъчно отстраняване на крайните препептиди. Напречният пререз на тропоколаген показва необходимостта всеки трети остатък да бъде глицин, за да се осъществи близък контакт между веригите.

Ковалентните напречни връзки, образуващи се във и между отделните тропоколагенови молекули водят до бавно зреене на колаген. Във формиращите се колагенови фибрили (най-долу) има характерно (около 23 %) отместване на тропоколагеновите молекули една спрямо друга. Пакетирането на фибрилите във влакна не е представено.

Тройната суперспирала е много устойчива на развиване, тъй като тя е с десен ход, а съставящите я три спирали - с обратен ляв ход (принцип, използван и при изработване на здрави стоманени конструкции).

Тропоколагеновите молекули се обединяват във фибрили, като всяка тропоколагенова молекула се отмества с около 23 % от своята дължина по отношение на съседните. Между отделните молекули остава празни пространства, в които в костите се отлага хидроксилапатитни кристали.

2.3.3.3. Значение на следсинтетичната обработка (зреене) на колаген за здравината на колагеновите фибрили

Първоначално синтезираните α -вериги в ендоплазмения ретикулум са под форма на препроколаген, съдържащи в N-края сигнален "пре"-пептид, насочващ полипептидната верига във везикулите на ендоплазмения ретикулум. След отделянето на сигналния пептид се получава проколаген, който съдържа препептиди (в N-края 150 остатъка и 250 остатъка в C-края).

Вътреклетъчните посттранслационни модификации на проколаген започват с хидроксилиране на пролин и лизин. Определени хидроксилинови остатъци се гликозилират с галактозни или глюкозни остатъци (създават се O-гликозидни връзки). Определени аспарагинови остатъци се гликозилират (създават се N-гликозидни връзки). Образуват се дисулфидни връзки (вътрешно верижни в N-пропептидите, а в C-пропептидите вътрешно-верижни и междуверижни).

Описаните модификации са условие за образуване на тройната спирала. След това проколагенът се транспортира до апарата на Голджи, където завършва O-гликозилирането и проколагенът се секретира извън клетките.

Извън клетките от проколаген се отцепват N- и C- крайните препептиди. Получават се тропоколагенови молекули, които се свързват една с друга,

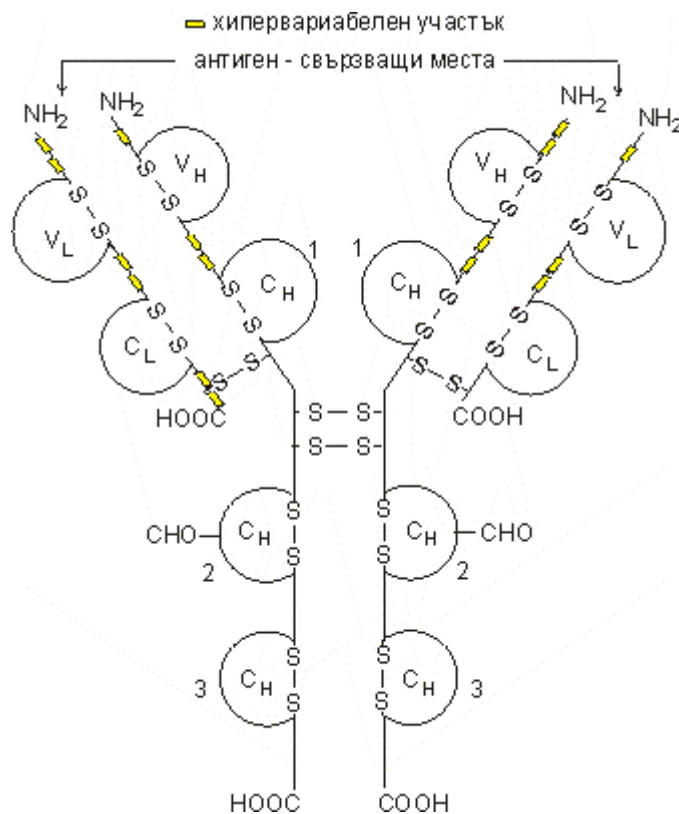
и образуват колагенови фибрили. В тях всяка тропоколагенова молекула се отмества с около 23 % от своята дължина по отношение на съседните. Колагеновите фибрили се пакетират в колагенови влакна. В техните рамки продължава зреенето на колаген, водещо до по-нататъшно усилване здравината на колаген. Лизил оксидаза катализира окислително дезаминиране на ϵ -амино-групи на лизин и хидроксилизин до алдехиди. Тези реактивни алдехиди реагират помежду си (алдолна кондензация) или с неокислени лизини дават Шифови бази. Чрез тези две реакции се формират стабилни ковалентни напречни връзки, усилващи якостта на влакната.

2.3.4. Имуноглобулини

Имуноглобулините, наричани антитела, са защитни белтъци, които разпознават и свързват чужди за организма макромолекули (белтъци, нуклеинови киселини, полизахариди), след което ги бележат и предават на фагоцитите за разрушаване. Антитела се образуват и срещу ниско-молекулни вещества, ако са прикрепени към макромолекула. Групата, която се разпознава от антитялото, се нарича антигенна детерминанта или епитоп.

Имуноглобулините се синтезират от плазмени клетки, произлизащи от В-лимфоцитите. Известни са пет класа имуноглобулини (табл. 2-5).

На фиг. 2-19 е представена схематично структурата на имуноглобулин от най-разпространения клас IgG. Всеки имуноглобулин се състои от две леки (L от англ. light) и две тежки вериги (H от англ. heavy), свързани помежду си чрез дисулфидни връзки.



Фиг. 2-19. Схема за структурата на имуноглобулин от клас IgG.

Молекулата съдържа две тежки вериги (H) и две леки вериги (L). C_H и V_H - константен (непроменлив) и вариабелен (променлив) участък в тежката верига; C_L и V_L - константен и вариабелен участък в леката верига; CHO - въглехидратна съставка. Хипервариабилните участъци са в жълт цвят, а антиген-свързващите участъци са означени със стрелки.

В рамките на всяка от веригите има и вътрешноверижни дисулфидни връзки. Всяка от веригите съдържа вариабилен (V от англ. variable) и константен (C от англ. constant) участъци. Леките вериги съдържат 220, а тежките 440 аминокиселинни остатъци. Вариабилните участъци на L и H веригите оформят две места за свързване на определен антиген. H веригите са гликопротеини (съдържат въглехидратна съставка).

Вариабилните места за свързване на антигена са специфични, а константните участъци са еднакви за всички имуноглобулини в даден клас.

Останалите четири класа имуноглобулини се отличават от IgG по вида на тежката верига, по броя на мономерите, по застъпеността в серума (вж табл. 2-5) и по функциите, които изпълняват. Секретираният имуноглобулин може да бъде под форма на мономер (M), димер (D), тример (T), или пентамер (P). IgD няма секреторна форма.

Табл. 2-5. Видове имуноглобулини в зависимост от вида на тежката верига*

Клас имуноглобулини	Тежка верига H	Лека верига L	Структура	Концентрация в серума (mg/dL)
IgA	α	λ или κ	$\lambda_2\alpha_2$ или $\kappa_2\alpha_2$ M, D, T**	200
IgD	δ	λ или κ	$\lambda_2\delta_2$ или $\kappa_2\delta_2$ -	3
IgE	ϵ	λ или κ	$\lambda_2\epsilon_2$ или $\kappa_2\epsilon_2$ M	0.05
IgG	γ	λ или κ	$\lambda_2\gamma_2$ или $\kappa_2\gamma_2$ M	1000
IgM	μ	λ или κ	$\lambda_2\mu_2$ или $\kappa_2\mu_2$ P	120

* По данни на [1] и [19]

** M - мономер, D - димер, T - тример, P - пентамер; IgD няма секреторна форма.

IgG са основният и най-масово представен в кръвта клас антитела.

Чрез H-веригите те се прикрепват към рецептори на фагоцити, които поглъщат и разрушават свързания от IgG антиген (микроорганизъм). IgG могат да се свързват и към белтъци от системата на комплемента и да ги активират. Единствено IgG могат да преминават през плацентата от майката в плода.

IgM са първите антитела, които се синтезират в B-лимфоцитите.

При диференциация на B-лимфоцитите могат да се образуват различни антитела срещу един и същи антиген. В резултат на разместване на гени в ДНК L-вериги от IgM могат да се прегрупират с H-вериги от друг клас и така да се получат и други имуноглобулини IgA, IgG или IgE, които са с еднаква антигенна специфичност като изходния IgM (този процес се нарича превключване от клас в клас).

IgA се съдържат в слюнка, слъзи, мляко, чревни секрети като мономери, димери или тримери. IgE участват в алергични реакции с увеличено освобождаване на хистамин. Участват и в защитата срещу чревни паразити.

Функцията на IgD е неясна.

Всеки човек може да произвежда антитела срещу 10^6 [1] до 10^9 [19] антигени. Генерирането на такъв огромен брой антитела осигурява ефикасна защита срещу чужди макромолекули. То е възможно поради комбинацията и пренареждането на различни структурни гени, отговорни за синтезата на вариабилните участъци в H и L веригите (виж глава 15).

2.3.5. Инсулин

Както бе посочено (т. 2.2.2, фиг. 2-5 и 2-6), инсулин се синтезира като по-високомолекулен предшественик препроинсулин. Сигналният пептид в N-края (с 23 остатъци) е необходим за насочване на полипептидната верига към цистерните на ендоплазмения ретикулум, след което той се отделя, тъй като повече не е необходим. Получаващият се проинсулин съдържа от N-към C-края фрагментите, съответстващи на B-веригата, C-пептида (свързващ пептид) и A-веригата. Ролята на C-пептида е да осигури правилна конформация, за да могат да се образуват правилните дисулфидни връзки (фиг. 2-7 и фиг. 2-6). След това C- пептид, заедно

с още два дипептида, бива отделен. Активният инсулин има кратък полуживот в кръвта (3-5 минути). Наличието на дисулфидни връзки позволява лесно и бързо дезактивиране на хормона чрез тяхната редукция под действие на специфичен ензим (глутатион-инсулин трансхидрогеназа).

За клиничното приложение на тези познания- вж т. 2.5.4. и глава 18; за производството на човешки инсулин чрез генно инженерство - виж т. 16.7.7.

Други примери включват рецепторите, свързващи специфично определени хормони и предаващи хормоналния сигнал в клетката (глава 17), регулаторните хромозомни белтъци (глава 3) и други. На ензимите и техните функции е посветена глава 4.

2.4. Методи за пречистване на аминокиселини, пептиди и белтъци

2.4.1. Резюме

Съдържащите се в биологични течности аминокиселини и белтъци се изолират и пречистват, за да е възможно тяхното измерване, изучаване и използване. Разделянето (фракционирането) се постига чрез различни методи въз основа на различия по сумарен заряд, молекулни размери, разтворимост, афинитет към специфични вещества и др. свойства.

Електрофорезата е метод за разделяне на заредени молекули въз основа главно на различия в сумарния им заряд. Посоката на придвижване към един от полюсите на външно електрично поле се определя от знака на сумарния заряд на молекулите, а скоростта на придвижване - от съотношението заряд/молекулна маса, както и от интензитета на полето, формата на молекулите и структурата на носещия гел. При $pH =$ или > 8.6 серумните белтъци са заредени отрицателно и в агарозен гел се разделят на следните фракции: албумин, α_1 -, α_2 - и β -глобулини и γ -глобулини.

Изоелектричното фокусиране, SDS-полиакриламидната електрофореза и капилярната електрофореза са важни разновидности на електрофорезата.

При хроматографските техники веществата се разпределят между статична и подвижна фаза. Разделянето зависи от относителната способност на веществата да се свързват по-силно с едната или другата фаза. При разпределителната хроматография аминокиселините се разделят въз основа на различната им разтворимост в два несмесващи се разтворители (полярен и неполярен).

При йонообменната хроматография аминокиселините, пептидите и белтъците се разделят въз основа на зарядови различия. При нея смес от аминокиселини (напр. белтъчен хидролизат) се пропуска през колона, съдържаща йонообменна смола със заредени групи, които свързват противоположно заредените аминокиселини. Чрез създаване на градиент за рН и солевата концентрация на елуентите, отделните аминокиселини се отмиват постепенно от колоната и се разделят. В съвременния вариант йонообменната хроматография се прилага в специални апарати под високо налягане (HPLC-техника), осигуряващо изключително висока разделителна способност и повторимост на резултатите. При обратно-фазовата HPLC-техника смолата съдържа хидрофобни групи, за да се свържат и забавят хидрофобните молекули. В този случай елуирането от колоната става с органични разтворители. Цялата процедура в аминокиселинните анализатори (елуиране, събиране на отделни фракции, анализ на всяка фракция, записване на резултатите е автоматизирана.

Афинитетната хроматография се основава на специфично нековалентно свързване на белтъци към различни лиганди, вкл. и антитела, прикрепени към хроматографска колона. Последващото елуиране се прави с чист лиганд в по-висока концентрация отколкото тази на свързания към колоната лиганд.

2.4. Методи за пречистване на аминокиселини, пептиди и белтъци

Съдържащите се в биологични течности аминокиселини, пептиди и белтъци се изолират и пречистват, за да е възможно тяхното измерване, изучаване и използване. Разделянето (фракционирането) се постига чрез различни методи въз основа на различия по сумарен заряд, молекулни размери, разтворимост, афинитет към специфични вещества и др. свойства. В клиничната практика тези методи се използват както за диагностика на заболявания, така и за препаративно получаване и пречистване на различни биопродукти.

2.4.2. Електрофоретични техники

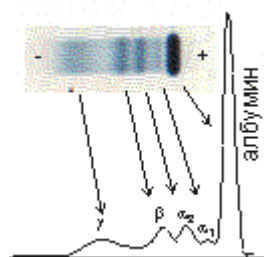
2.4.2.1. Принцип

Електрофорезата е метод за разделяне на заредени молекули или по-големи частици въз основа главно на различия в сумарния заряд. Посоката на придвижване към един от полюсите на външно електрично поле се определя от знака на сумарния заряд на молекулите. Скоростта на придвижване се определя от съотношението заряд/молекулна маса. Освен това разделянето зависи и от интензитета на полето и формата на молекулите в сместа, както и от структурата на носещия гел (агаров, агарозен, целулозно-ацетатен, полиакриламиден гел, хартия или друг). При подбиране на различни експериментални условия електрофоретичните методи се прилагат успешно както за разделяне на смеси от аминокиселини, така и на смеси от пептиди и белтъци в аналитичен и в препаративен вариант. Буферът, в който се разтваря сместа за разделяне, се избира да има рН, различно

от pI на веществата, които трябва да се разделят или пречистват. При $pH > pI$, аминокиселините и белтъците са заредени отрицателно и се движат към анода. При $pH < pI$ те са заредени положително и се движат към катода.

2.4.2.2. Агарозна електрофореза на серумни белтъци

Плазмените белтъци имат йоногенни групи, които определят сумарния заряд на дадена белтъчна молекула. При разделяне на тези белтъци чрез електрофореза върху агарозен гел обикновено се използва буфер с $pH =$ или > 8.6 . Изоелектричните точки на плазмените белтъци са между 5 и 7. При $pH =$ или > 8.6 и над него те са заредени отрицателно и движейки се към анода с различна скорост, изминават различно разстояние и се разделят на следните фракции: албумин, α_1 -, α_2 - и β -глобулини, фибриноген и γ -глобулини (фиг. 2-20). В клиничната практика се предпочита използването на серум вместо плазма, тъй като фибриногенът на плазмата може да бъде взет погрешно за парапротеин. При сканиране на електрофореграмата се получава т.н. денситограма, в която на всяка фракция съответства пик с определена ширина и височина. От площта под всеки пик може количествено да се определи даден белтък. Тези фракции са сумарни и съдържат множество индивидуални белтъци, които могат да бъдат допълнително разделени и пречистени чрез по-прецизни техники, напр. полиакриламидна електрофореза, имуноелектрофореза или други. Въпреки това, поради наличие на главен белтък във всяка от тях, електрофоретичният анализ на плазмени или серумни белтъци върху агарозен гел е полезен и често използван метод в диагностиката (виж т. 2.5.2).



Фиг. 2-20. Електрофореза на серумни белтъци от здрав човек върху агарозен гел, трис-вероналов буфер, $pH 9.2$. Горне - електрофореграма, долу денситограма. В посока към анода най-бързо се движи албумин, следван от α_1 , α_2 , β , γ -глобулини.

Електрофореграмата и денситограмата са любезно предоставени от доц. Н. Койчева и гл. ас. Н. Деникова от Катедра по клинична лаборатория и имунология, Медицински Университет-София.

2.4.2.3. Други електрофоретични техники

При изоелектрично фокусиране се създава pH градиент в електрично поле с помощта на полиамино-поликарбоксилни киселини с известни pI , наречени амфолини. Всеки белтък от сместа се движи до такъв участък от градиента, който има pI , еднакво с това на белтъка. Поради високата разделителна способност и непредвидено свързване на амфолините с белтъци от пробата са възможни артефакти, т.е. да се открият повече фракции от действително наличните.

SDS-полиакриламидната електрофореза разделя белтъците въз основа на техния размер. SDS е съкращение от английското название на натриев додецил сулфат (Sodium Dodecyl Sulfate). Белтъците се нагряват в присъствие на SDS и редуциращ агент (меркаптоетанол), което води до разкъсване и редуциране на дисулфидните връзки и топлинна денатурация. С това към разтвора се експонират хидрофобни групи, скрити преди това в нативната структура. Те свързват додециловия радикал и около белтъка се образуват отрицателно заредени мицели от SDS-молекули. При полиакриламидна електрофореза всички белтъци,

обградени от тези мицели, се движат към анода, като по-големите молекули се движат по-бавно от по-малките поради ситовия ефект на гела.

Капилярната електрофореза се използва засилено напоследък за диагностика поради високата скорост на разделяне (за няколко минути) и поради това, че са нужни много малки количества от изследваните вещества. При този метод се провежда свободна електрофореза в капилярни тръбички с диаметър 0.05-0.3 mm. Около отрицателно заредените стени на капилярите се движи поток от катиони към катода, увличайки със себе си разделяните молекули, независимо от техния заряд. Положително заредените молекули се движат с този поток най-бързо, последвани от неутралните и отрицателно-заредените молекули.

2.4.3. Хроматографски методи

При хроматографските техники веществата се разпределят между статична и подвижна фаза. Разделянето зависи от относителната способност на веществата да се свързват по-силно с едната или другата фаза.

2.4.3.1. Разпределителна хроматография

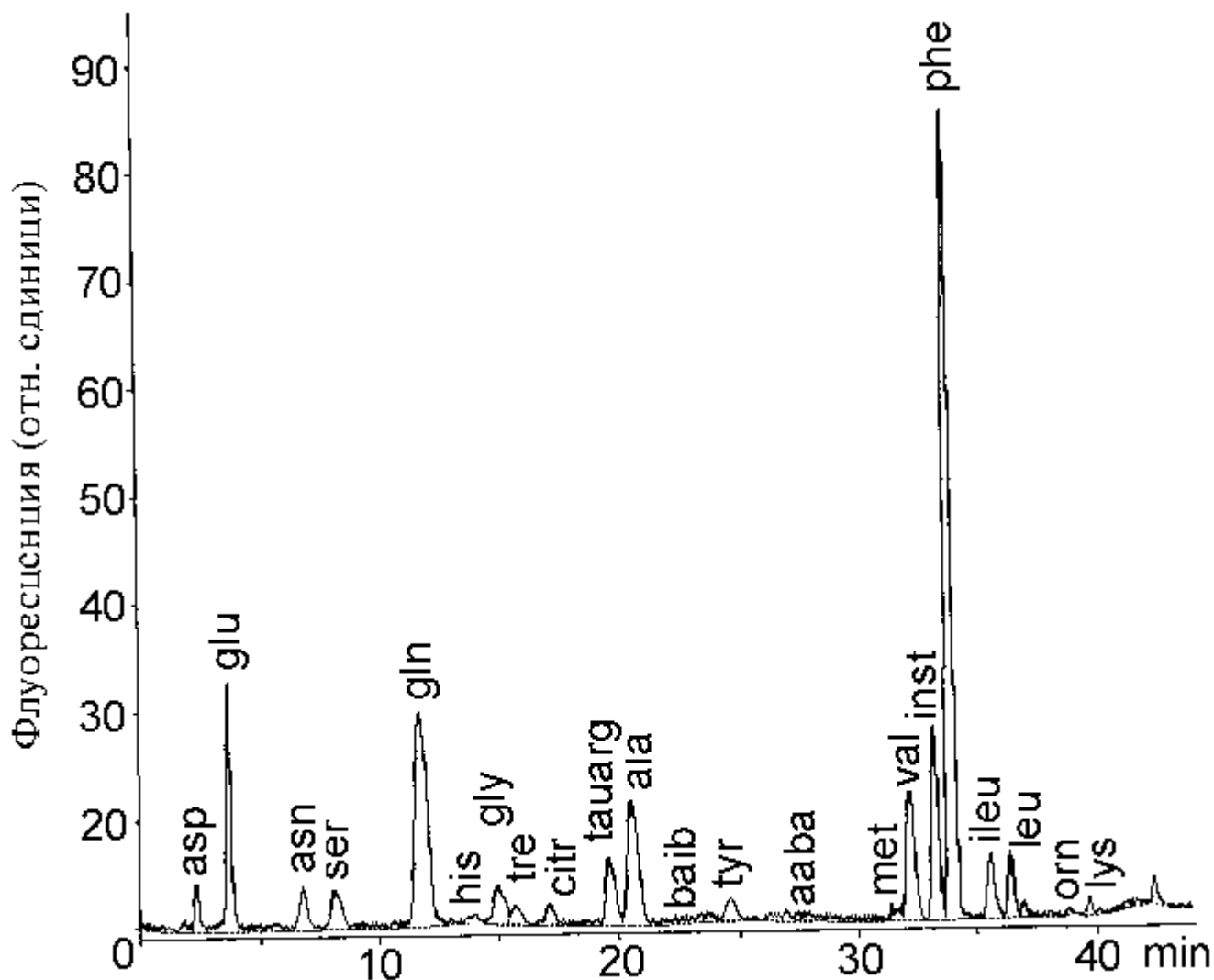
Чрез този метод аминокиселините се разделят въз основа на различната им разтворимост в два несмесващи се разтворителя. Единият разтворител е полярен - обикновено вода, фиксирана неподвижно чрез водородни връзки върху твърд носител (напр. хартия). Другият разтворител е органичен. Подходящ неполярен разтворител за аминокиселините е n-бутанол. Този неполярен разтворител се всмуква от твърдия носител, пълзи по него и затова се нарича подвижна фаза. Хидрофобните аминокиселини се разтварят в различна степен в органичния n-бутанол и заедно с него пълзят по хартията с различна скорост. Водноразтворимите аминокиселини изостават в своето движение. След време сместа се разделя на отделни аминокиселини, които се проявяват (стават забележими по хартията) след оцветяване с нинхидрин или флуорескамин. Оцветяването на аминокиселините петна с нинхидрин позволява количественото им определяне при наличие на дори само на 1 μg от тях. Флуорескамин е хиляда пъти по-чувствителен и улавя количества от аминокиселини от порядъка на 1 ng. Идентифицирането на неизвестните петна става чрез сравняване на техните R_f -стойности с тези на стандартните двадесет аминокиселини (свидетели). R_f -стойността е отношението между пътя, изминат от аминокиселината, и пътя, изминат от разтворителя.

2.4.3.2. Йонообменна хроматография

При този метод аминокиселините, пептидите и белтъците се разделят въз основа на зарядови различия. Това е най-използваният съвременен метод за разделяне, доказване и определяне на аминокиселини в белтъчен хидролизат. При нея хидролизатът се пропуска през колона, съдържаща йонообменна смола със заредени групи, които свързват противоположно заредени аминокиселини. Чрез създаване на градиент за рН и солевата концентрация на елуентите, отделните аминокиселини се отмиват постепенно от колоната и се разделят.

В съвременния вариант йонообменната хроматография се прилага в специални апарати под високо налягане (HPLC-техника - англ. High Pressure Liquid Chromatography), осигуряващо

изключително висока разделителна способност и повторимост на резултатите. При обратно-фазовата HPLC-техника смолата съдържа хидрофобни групи, за да се свържат и забавят хидрофобните молекули. В този случай елуирането от колоната става с органични разтворители. Колкото е по-висок процентът на органичния разтворител, толкова по-бързо се извличат неполярните компоненти. Цялата процедура в аминокиселинните анализатори (елуиране, събиране на отделни фракции, анализ на всяка фракция, записване и отпечатване на резултатите) е напълно автоматизирана. В съвременните клинични лаборатории така се разделят аминокиселини от плазма на пациенти с диагностична цел (фиг. 2-21).

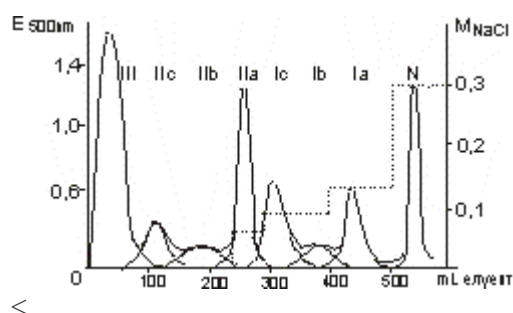


Фиг. 2-21. HPLC-хроматография на аминокиселини в плазма на новородено. Използвана е обратно-фазова колона. Аминокиселините се определят по флуоресценцията на техните производни, получени при въздействие с ОРА (орто-фталалдехид). Хроматограмите са любезно предоставени от М. Иванова и И. Кременски, лаборатория по молекулярна патология, Медицински Университет-София.

Над всеки пик апаратът изписва латинското съкращение на аминокиселина: asp - аспарат, glu - глутамат, asn - аспарагин, ser- серин, gln - глутамин, his - хистидин, gly - глицин, tre - треонин, citr - цитрулин, tau - таурин, ala - аланин, tyr - тирозин, aaba - α -аминоизобутират, met - метионин, val - валин, inst - вътрешен стандарт, phe - фенилаланин, ileu - изолевцин, leu - левцин, orn - орнитин, lys - лизин. Стойностите се отчетени спрямо референтни нормални граници за плазмени аминокиселини от 100 здрави деца за възрастовата група от 0 до 30 дни.

Пикът за фенилаланин е много висок, тъй като детето е със заболяването фенилкетонурия - виж т. 2.5.3.

Подборът на експерименталните условия дава възможност чрез йонообменна хроматография да се разделят успешно и с много висока чувствителност най-различни белтъци. На фиг. 2-22 е даден пример за разделяне на модифицирани с пиридоксалфосфат цитохроми *c*, различаващи се по мястото на заместване и по броя на заместените лизинови остатъци. Наред с немодифицирания белтък (N) се виждат три монозаместени по различни лизинови остатъци производни (Ia, Ib, Ic), три дизаместени (IIa, IIb, IIc) и едно тризаместено производно (III). Сравняването на тези модифицирани белтъци по отношение на биологичната им функция позволява да се правят изводи за ролята на конкретни лизинови остатъци в цитохром *c* като електронен преносител в дихателната верига (вж гл.5).



Фиг. 2-22. Йонообменна хроматография на белтъци. Модифицирани с пиридоксалфосфат цитохроми *c* по един, два или три лизинови остатъци, са разделени върху колона с йонообменна смола Amberlite CG-50, предварително стабилизирана с 0,01 M фосфатен буфер с рН 8.0. С пунктир е даден стъпаловидният градиент на NaCl в същия буфер за извличане на белтъците.

Елуационната крива е измерена при 530 nm. Фракциите се разделят както е означено с пунктира.

N - немодифициран цитохром *c*;

Ia, Ib, Ic - три различни монозаместени производни;

IIa, IIb, IIc - три различни дизаместени производни;

III - тризаместенопроизводно на цитохром *c*.

2.4.3.3. Афинитетна хроматография

Този метод се основава на специфично нековалентно свързване на белтъци към различни лиганди, вкл. и антитела, прикрепени към хроматографска колона. При пропускане на смес от белтъци в такава колона, този, който има афинитет към специфично избраните лиганди, се свързва, а другите преминават през колоната. След отмиване на техните следи, свързаният белтък се елуира с по-висока концентрация на чист лиганд, който се конкурира за белтъка със свързания в колоната лиганд.

2.5. Примери за приложение на познанията върху белтъци в клиничната практика

Примери за приложение на познанията върху белтъци в клиничната практика

2.5.1 Резюме

Познанията за белтъци, както и методите за пречистване на аминокиселини и белтъци, намират приложение в клиничната практика. Разделянето на серумни белтъци чрез електрофореза се използва за диагностика на различни заболявания, тъй като електрофореграмата и денситограмата при заболяване се различават в качествено и количествено отношение от тези за здрав човек. Доказването на фенилкетонурия или друга аминокиселинна ацидурия в новородени е възможно благодарение на чувствителни HPLC-техники за определяне на аминокиселини в плазма.

Познаването на първичната структура на инсулина от различни видове показва, че свинският инсулин се различава от човешкия само по един аминокиселинен остатък. Поради това този инсулин беше използван дълго време до получаване на човешки инсулин чрез генно инженерство, а и досега се ползва за лечение на диабет.

Определянето на гликозилиран хемоглобин дава информация за нивата на кръвна глюкоза за предшестващите два-три месеца и е полезно за контролиране кръвните нива на глюкоза при диабетици.

Познанията върху структура и зреене на колагенови влакна обясняват причината за възникване на скорбут - при липса на витамин С не се хидроксилират пептидно-включени пролин и лизин в тройната спирала на колаген.

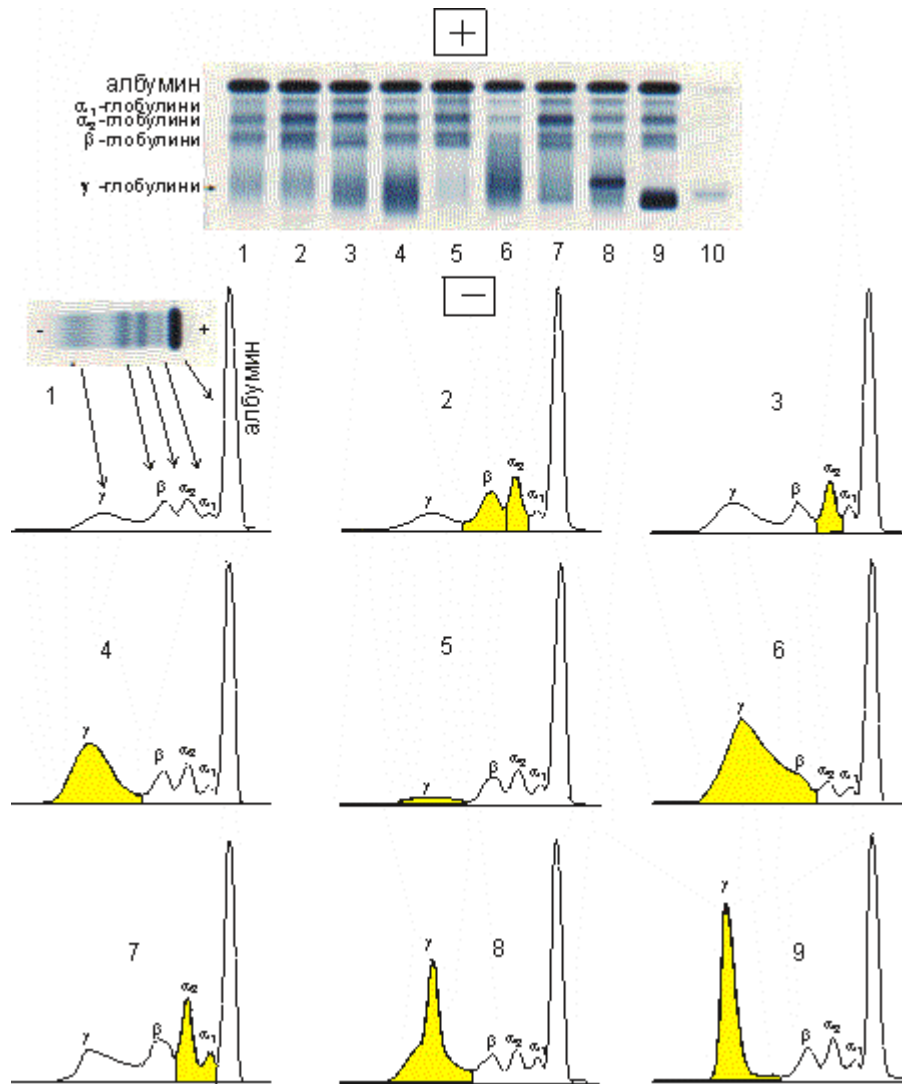
Познаване структурата на нормален хемоглобин (HbA) и на други патологични хемоглобини позволява да се разберат причините за различни хемоглобинпатии, напр. сърповидно-клетъчна анемия, при която само един остатък (Глу) в β -веригите на Hb е заместен с Вал.

По съвсем нов, неизвестен до скоро механизъм, възникват заразните прионовите болести ("луда крава" по говедата, болест на Creutzfeldt-Jacob по човека и др.). В прионовите белтъци, които са открити в болни индивиди или животни, не участват нуклеинови киселини. Тези белтъци са с еднаква първична структура като някои нормално срещащи се белтъци в мозъчна тъкан, но с променена вторична и третична структура. Превръщането на нормалния белтък (с α -спирални участъци) в патологичен (с β -листове) става вероятно под въздействие на друг белтък. Патологичният белтък служи като матрица за пренагъване на нормалния белтък. Това налага преосмисляне (допълване) на идеята за определящата роля на първичната структура спрямо по-висшите структури на белтъка. Очевидно за нагъването на белтъците, значение имат и други, макар и неизвестни засега, фактори.

2.5.2. Електрофореза на серумни белтъци за диагностика на различни заболявания

При различни заболявания се установяват количествени и качествени изменения в електрофоретичния профил (фиг. 2-23 - проби 2-9), в сравнение с нормалния профил 1.

Фиг. 2-23.
Електрофоретични
профили на серумни
белтъци от здрав
човек (проба 1) и



пациенти с различни заболявания (проби 2-10), описани в текста, върху агарозен гел, трис-вероналов буфер, рН 9.2.

Електрофореграмата и денситограмите са любезно предоставени от доц. Н. Койчева от Катедра по клинична лаборатория и имунология, Медицински Университет-София.

При профил 2 са увеличени α_2 и β -глобулините, а при профил 3 са увеличени α_2 -глобулините, което е характерно за остро протичащи възпаления, предизвикани от инфекции, нараняване, хирургически травми и др.

При профил 4 са силно увеличени γ -глобулините (поликлонална гамапатия). Тези имуноглобулини се увеличават неспецифично при голям брой различни инфекции и аутоимунни болести. Увеличението се дължи на увеличена синтеза в различни клетъчни линии, затова имунният отговор се нарича поликлонален.

При профил 5 обратно, те са силно понижени (хипогамаглобулинемия), характерно за имунодефицитни състояния (намален хуморален имунитет), вкл. и СПИН.

При профил 6 се наблюдава β - γ -сливане, характерно за чернодробна цироза.

При профил 7 се наблюдава повишение на α_1 - и α_2 -глобулините, характерно за възпалителни процеси и злокачествени остро протичащи болести.

При профили 8 и 9, обратно на профил 4, се вижда моноклонална гамапатия (парапротеин). Клетките от една клонова линия, размножавайки се, произвеждат идентични антитела,

представени с характерен тесен единичен пик. Този моноклонал ензимоглобулин, интактен или фрагмент от него, се означава като парапротеин.

Парапротеини се откриват при миелома с характерни костни метастази и при заболявания, свързани с дефекти в тежките вериги на имуноглобулините. Парапротеини могат да се получат от всеки имуноглобулинов клас. При миелома е увеличено производството на моноклонални леки вериги. Те са достатъчно малки, за да преминават в урината, където са известни като белтъци на Bence-Jones (фиг. 2-5, проба 10 от електрофорограмата). В някои пациенти могат да се открият парапротеини без видима патология (мека парапротеинемия). В тези случаи трябва да се провери и изключи със сигурност възможността за миелома.

2.5.3. Установяване на фенилкетонурия и други аминокиселини чрез HPLC-техники

Описаните в т. 2-4 техники са полезни не само за теоретичната биохимия, но и в клиничната практика за установяване на промени в нивата на аминокиселини в кръвната плазма или урина при различни наследствени дефекти в обмяната и екскрецията на аминокиселини.

Установяването на фенилаланин в урина или повишена концентрация на фенилаланин в кръвта на новородени е в основата на масовия скрининг за откриване на фенилкетонурия сред новородени бебета. Обикновено това става с по-евтина микробиологична проба, а потвърждаването - чрез йонообменна хроматография, вариант HPLC (фиг. 2-21). Фенилкетонурията (вид маломумие, наричан олигофрения фенилпирувика) е най-често срещаната аминокиселинна патология. Дължи се на дефект в обмяната на фенилаланин. Опростена схема за разграждането на фенилаланин е дадена на фиг. 2-24.



Фиг. 2-24. Опростена схема за възникване и проявления на фенилкетонурия, откривана в новородени по увеличената концентрация на фенилаланин в кръвта или по наличието му в урина. Ранното откриване е важно за предотвратяване увреждането на централната нервна система. Ензимният блок при недостатъчност на фенилаланин хидроксилазата е представен с дебела червена линия.

Нормално фенилаланин се превръща в тирозин под действие на ензима фенилаланин хидроксилаза, а от тирозин се получават важни продукти (хормони на щитовидната жлеза, хормоните на надбъбрека норадреналин и адреналин и кожните пигменти меланини). При недостатъчност на ензима фенилаланин хидроксилаза се натрупва фенилаланин, който в страничен път се разгражда до фенилпируват и фениллактат - вещества, токсични за централната нервна система. Тези и други продукти се откриват в урината. Освен това, не се образуват продуктите на тирозин. Ако не се вземат мерки, детето израства маломумно. За да се спаси такова бебе, веднага се спира кърменето. Всяко забавяне снижава сериозно коефициента на интелигентност. Детето се храни поне до седем години, а по-добре цял живот с изкуствени белтъчни смеси, не съдържащи фенилаланин (или само в минимални количества за белтъчна биосинтеза), но съдържащи тирозин. За такъв индивид тирозинът става незаменима аминокиселина.

Освен фенилкетонурията, известни са и други аминокиселини като цистин-лизурия, болест на Хартнуп (дефект в транспорта на неутралните аминокиселини), синдром на Fanconi (обща аминокиселини) и др., които също се установяват чрез HPLC-техники.

2.5.4. Приложение на животински инсулини за лечение на захарен диабет

Първичната структура на хормона инсулин и неговия прекурсор проинсулин бе разгледана в т. 2.2.2. (фиг. 2-6 и фиг. 2-7). Сравняването на първичната структура на инсулин от различни видове показва идентичност на аминокиселините остатъци с изключение на остатъци 8, 9 и 10 във верига А и остатък 30 във верига В. Тези остатъци вероятно не са съществени за биологичната роля на инсулин (табл. 2-6).

Вид	A8	A9	A10	B30	Брой замени
човек	Тре	Сер	Иле	Тре	
свиня	Тре	Сер	Иле	Ала	1
куче	Тре	Сер	Иле	Ала	1
кон	Тре	Гли	Иле	Ала	2
бик	Ала	Ала	Сер	Вал	3
овца	Ала	Гли	Вал	Ала	4

Табл. 2-6. Сравняване на част от първичната структура на инсулин в различни видове спрямо човек (по данни на [16]).

За лечение на диабетици са използвани масово както свински, така и говежди инсулин. При малък брой диабетици е установена начална алергична реакция спрямо инжектирания инсулин, тъй като тяхната имунна система разпознава чуждия инсулин. Голямата част от диабетиците обаче може да ползва свински или говежди инсулин без имунологични усложнения, тъй като променените остатъци са малко на брой и промените имат консервативен характер. (Консервативна е замяната на една аминокиселина с друга с близка полярност, напр. вал с иле).

Свинският инсулин се различава само по 30-ия остатък във верига В (вместо треонин има аланин) и затова към него има по-голяма поносимост, отколкото към говеждия инсулин. Последният се различава по два остатъка А8 и В30, като и на двете места вместо треонин има аланин. Въпреки че треонин има хидроксилна група, той има и метилова група, поради което относителната хидрофобност на треонин и аланин са близки. Затова се смята, че замяната на треонин с аланин е консервативна. Посочените промени в свински и говежди инсулини не променят значително пространствената организация на инсулина.

Понастоящем човешки инсулин може да се получи в бактерии чрез рекомбинантна ДНК технология или чрез химическа модификация на свински инсулин.

2.5.5. Роля на гликозилиран хемоглобин HbA_{1c} за контролиране на захарен диабет

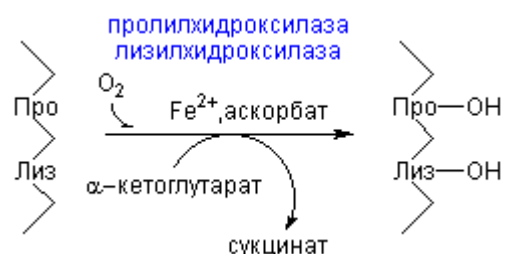
При високи концентрации на кръвна глюкоза хемоглобинът се гликозилира неензимно в крайни и лизинови аминокиселини. Чрез йонообменна хроматография фракцията на гликозилирания хемоглобин, означавана като HbA_{1c}, се определя на около 5 % в здрав човек. Тя нараства пропорционално с повишение на кръвната глюкоза. Тъй като животът на еритроцитите е около 120 дни, концентрацията на HbA_{1c} дава информация за средната

концентрация на кръвната глюкоза през предшестващите 2-3 месеца. Това позволява да се контролира състоянието на диабетно болни пациенти чрез диета и лечение с подходящи дози инсулин до нормализиране на кръвната глюкоза.

2.5.6. Неправилно зреене на колаген при недостиг на витамин С причинява скорбут

Колагенът е най-застъпеният белтък в тялото (вж т. 2.3.4.).

Дефекти в синтеза на колаген могат да доведат до неправилна функция на сърдечно-съдовата система, на костите (крехкост и лесна чупливост), на кожата (трудно заздравяване на рани и прекалена разтегливост), на ставите (свръхподвижност или артрити) и на очите (дислокация на лещите). Заболявания възникват поради дефекти в гените за колаген, при неправилна посттранслационна модификация на колагена или при недостиг на кофакторите за ензимите, които осъществяват тази посттранслационна модификация на колагена. По-долу е разгледано заболяването скорбут.



Фиг. 2-25. Участие на аскорбат (витамин С) при хидроксилирането на пролин и лизин в процеса на зреене на колаген.

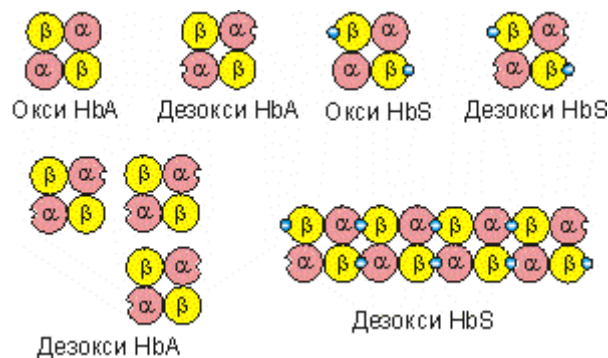
Скорбутът не е генетично заболяване. Характеризира се с кървящи венци, подкожни кръвоизливи, трудно зарастване на рани. Скорбут се развива при недостиг в храната на витамин С (аскорбинова киселина), който е необходим кофактор за ензимите пролилхидроксилаза и лизил хидроксилаза. Както самото име подсказва, тези ензими от ендоплазмения ретикулум катализират ковалентно модифициране на пептидно-включени пролин и лизин - хидроксилират ги до хидроксипролин и хидроксилизин, съответно (фиг.2-25). Приетите с храната хидроксипролин и хидроксилизин не се използват за биосинтеза на колаген поради липса на съответни тРНК. Тези ензими не хидроксилират свободни аминокиселини, а само вече включените в полипептидна верига.

Липсата на хидроксипролин и хидроксилизин не позволява стабилизирането на тройната колагенова суперспирала чрез напречни ковалентни връзки между трите вериги.

2.5.7. Сърповидноклетъчна анемия - доказателство за детерминиращата роля на първичната структура спрямо по-висшите структури

Както бе многократно изтъкнато, първичната структура детерминира по-висшите структури на белтъчната молекула и нейните свойства и функции. За нейното първостепенно значение говори примерът с HbS, който се отличава от нормалния HbA само по един аминокиселинен остатък в β -веригите.

Структурата на тетрамерния хемоглобин А ($\alpha_2\beta_2$) е разгледана в т. 2.2.6 и 2.3.2 и 2.3.3). Вместо глутамат (полярен) на 6 място в β -веригите на HbS има валин (хидрофобен). Тази замяна води до образуване на "лепкав изпъкнал участък" на повърхността на β -веригата, както в окси-, така и в дезокси-HbS. Такъв "лепкав участък" няма в HbA, тъй като на 6 позиция там има полярен глутамат и при среща молекулите не се слепват, а остават в разтвор. На повърхността на дезокси-HbS има и друг, комплементарен на "лепкавия участък" - "вдлъбване". Когато HbS е в дезокси-състояние "лепкавият изпъкнал участък" от една молекула се свързва с "вдлъбнатината" от друга молекула. И тъй като има две β -вериги във всяка молекула, образуват се дълги линейни полимери от HbS (фиг. 2-26). Така, като следствие от промяната в първичната структура, разтворимостта на дезокси-HbS е 25 пъти по-ниска от тази на дезокси-HbA. При снижено налягане на кислород, дезокси- HbS се утаява. Промененият сумарен заряд на HbS (един минус по-малко) променя и електрофоретичната му подвижност спрямо HbA (фиг. 2-27).



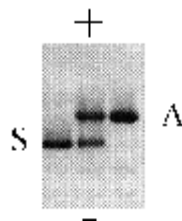
Фиг. 2-26. Полимеризиране на HbS във фиброзни структури. Замяната на полярния глутамат в HbA с хидрофобен валин в HbS променя конформацията и физикохимичните свойства на белтъчната молекула, улеснява полимеризирането и утаяването на HbS и води до лизис на еритроцита.

о - "лепкав изпъкнал участък" в дезокси HbS;

Комплементарно на "лепкавия" участък е "вдлъбването" в HbS и HbA. Молекулите на дезокси-HbA не се слепват и остават в разтвор, а тези на HbS се слепват и утаяват.

Образуващата се фиброзна утайка от HbS уврежда клетъчните мембрани на еритроцити, съдържащи HbS. Разрушените клетки лизират и се развива хемолитична анемия. Особената сърповидна форма на еритроцитите допълнително допринася за развитието на кризата, тъй като се запушват малките кръвоносни съдове.

Мутацията в хемоглобин S е неконсервативна, тъй като полярният глутамат е заменен с хидрофобен валин.

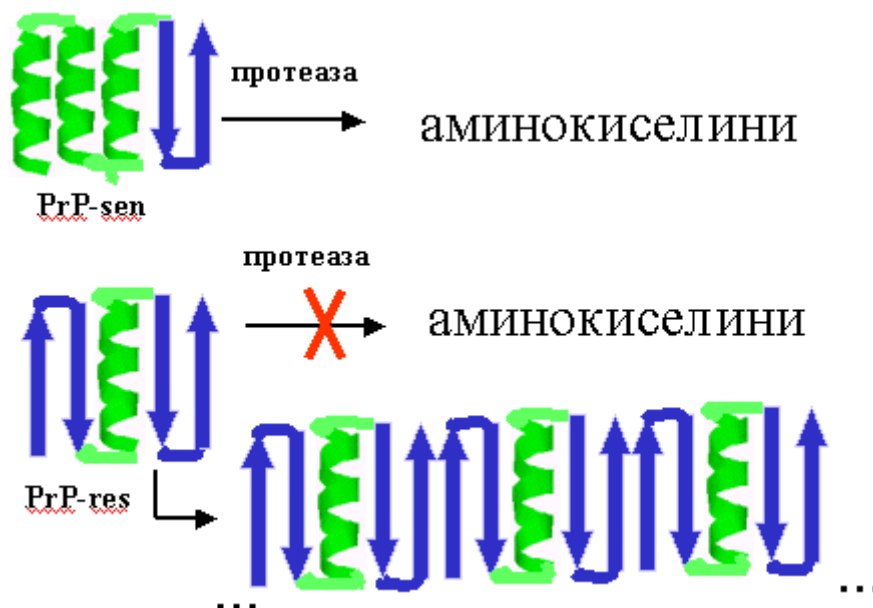


Фиг. 2-27. Различна електрофоретична подвижност на хемоглобин S спрямо хемоглобин A.

Вдясно - HbA от здрав човек; вляво - HbS от болен от сърповидноклетъчна анемия; в средата - HbA и HbS от носител на сърповидноклетъчна анемия.

2.5.8. Прионовите болести

По съвсем нов, неизвестен доскоро механизъм възникват заразните прионовите болести, предизвикващи спонгиформени енцефалопатии ("луда крава" по говедата, болест на Creutzfeldt-Jacob по човека и др.) [20-22]. Част от невроните дегенерират, тъй като в тях се отлагат неразтворими амилоидни фибрили, съдържащи патологични прионовите белтъци (фиг. 2-28). Прионовите белтъци, които са открити в болни индивиди или животни, не са свързани с нуклеинови киселини, нито съдържат нуклеинови киселини.



Фиг. 2-28. Сравнение на физиологичен белтък PrP-sen (PrP_s), чувствителен към действието на протеази и патологичен белтък PrP-res (PrP_{Sc}), нечувствителен към действието на протеази.

Физиологичният белтък се означава като PrP_s или като PrP-sen, тъй като е чувствителен (sensitive) към протеази. Патологичният белтък се означава като PrP_{Sc} или като PrP-res, тъй като не се разгражда от протеази (резистентен към протеази). Считаше се, че прионовите белтъци са с еднаква първична структура като някои нормално срещащи се белтъци в мозъчна тъкан, но с променена вторична и третична структура. Stahl и Prusiner (1991) установиха, че промяната е резултат от пост-транслационна модификация, включваща отстраняване на секвенция от amino-края, използване на алтернативен карбоксилен край, и модификация на две N-свързани въглехидратни съставки.

Превръщането на нормалния белтък (с α -спирални участъци) в патологичен (с β -листовете) става вероятно спорадично или под въздействие на друг белтък. Но полученият патологичен белтък катализира пренагъване на нормалния белтък и последващото му агрегиране.

2.6. Материали за самостоятелна работа

2.6.1. Примерни писмени задачи:

1. Напишете с формули част от полипептидна верига, съдържаща в посока от аминок- към карбоксилния край двадесетте аминокиселини.

С помощта на фиг. 2-5 проверете дали правилно сте написали скелета на полипептидната верига. Проверете и формулите на радикалите, които са дадени в т. 2.1.3.

2. Напишете заредените форми на свободните (в разтвор) аминокиселини глицин, лизин, хистидин, аргинин, глутамат, аспарат и цистеин при рН 7. Напишете пептида, образуван от същите аминокиселини, и изчислете сумарния му заряд Z при рН 1, рН 7 и рН 12.

Отговори:

$Z = +4$ при рН 1;

$Z = +4 - 3 = 1$ при рН 7;

$Z = -3$ при рН 12

2.6.2. Изберете

[главната страница на Интерактивни тестове](#). От нея изберете теста :

"Състав, структура и функции на белтъци" в желан от Вас режим.

2.6.3. Изберете [Симулации на клинични случаи](#) и от там - реален случай "Сандра".

2.6.4. Разгледайте анимациите на хемоглобин-мономер и хемоглобин-тетрамер, създадени от Prof. Andrew Booth, University of Leeds и любезно предоставени за ползване в катедра Биохимия на Медицински Университет-София.

Щом се появи картината, щракнете веднъж върху нея, за да задвижите анимацията.

[Oxydeoxy.avi](#) (Хемоглобин-мономер - преход от окси- в дезокси-състояние)

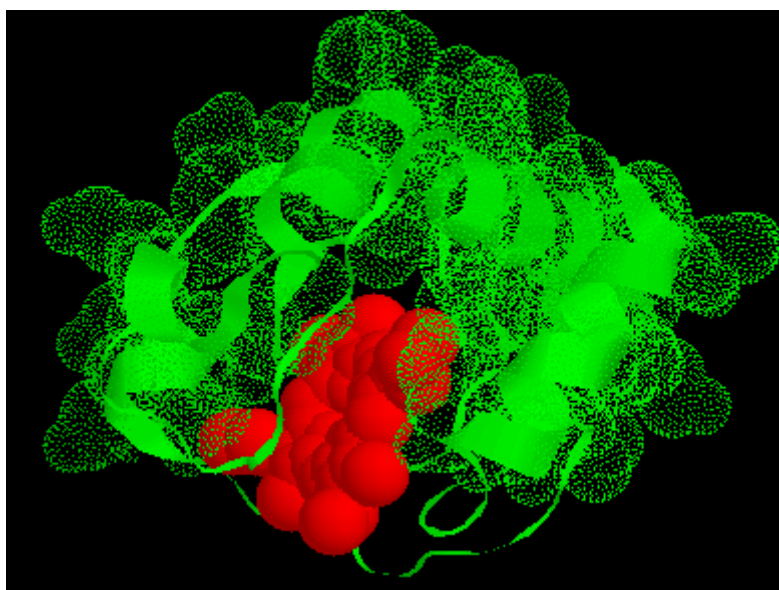
[Tetramer.avi](#) (Хемоглобин-тетрамер - преход от окси- в дезокси-състояние)

2.6.5. Молекулна графика с компютърната програма RASMOL (RASWIN)

1. Свалете файла [rasmol2.zip](#) и го разархивирайте в отделна папка. Отворете програмата Rasmol, любезно предоставена за нашия сайт от нейния автор Roger Sayle, Bioinformatics group, Metaphorics, Santa Fe, New Mexico , и я разучете.

В папката има и примерни файлове.

След разархивиране на zip-файла отворете програмата като щракнете два пъти върху файла Rw32b2a.exe. Ползвайки главното меню и допълнително отварящия се прозорец "RasMol Command Line", отворете файла 1hrc.pdb, съдържащ атомните координати на цитохром *c* и се опитайте да получите сами дадения на фиг. 2-29 молекулен образ на цитохром *c*.



Фиг. 2-29. Молекулно изображение на цитохром *c*, получено чрез програмата RasMol на Roger Sayle, ползвайки данните за атомните координати на цитохром *c* от Protein Data Bank [10].

Отговор

Ето какви са необходимите действия:

1. Отворете файла `Rw32b2a.exe` чрез двукратно щракване върху него. Отваря се главният прозорец на програмата с черен фон, а най-долу на екрана в лентата с отворени прозорци ще видите още един прозорец "RasMol Command Line", в който може да се задават допълнителни команди. Нагласете големината на двата прозореца така, че да ги виждате и двата на екрана едновременно.
2. В главния прозорец от **File** Open отворете файла `1hrc.pdb`
Появява се молекулното изображение на цитохром *c*, тип Wireframe.
3. В главния прозорец от **Display** изберете Ribbons. Изображението се променя.
4. За да оцветите веригата в зелено, в прозореца "RasMol Command Line" напишете `color green` и натиснете бутона Enter.
5. За да визуализирате невидимия засега лиганд (хем), в прозореца "RasMol Command Line" напишете `select ligand`, натиснете бутона Enter и след това в главния прозорец от **Display** изберете Spacefill. Хемът се появява в зелен цвят.
6. За да оцветите хема в червен цвят, в прозореца "RasMol Command Line" напишете `color red` и натиснете бутона Enter.
7. За визуализиране електронната плътност около α -спиралните участъци в прозореца "RasMol Command Line" напишете `select helix`, натиснете бутона Enter, след това напишете `dots on` и натиснете бутона Enter.

По подобен начин чрез RASMOL може да отворите един по един файловете и да получите посочените по-долу или други изображения:

- 1) a-helix.ent, съдържащ атомните координати на α -спирала - виж фиг. 2-10 в т. 2.2.4.;
- 2) B-sheet.ent, съдържащ атомните координати на β -структура - виж фиг. 2-11 в т. 2.2.4.;
- 3) 1hrc.pdb, съдържащ атомните координати на белтъка цитохром *c* - виж фиг. 5-18 в т. 5.4.3.

След появата на молекулния образ на черен фон запишете последователно следните примерни команди в отворения команден прозорец. След всяка команда натискайте клавиша "Enter".

background white (черният фон ще стане бял)

select helix (маркират се α -спиралните участъци)

color red (α -спиралните участъци се оцветяват в червено)

select all (маркира се цялата молекула)

hbonds on (показва водородните връзки)

hbonds off (скрива водородните връзки)

select ligand (маркира се хемът)

color green (оцветява се хемът в зелено).

Тези и много други команди могат да бъдат зададени и в друга последователност. Опитайте сами. При необходимост ползвайте вградената в програмата помощ (Help).

Разгледайте под различен ъгъл различните модели (wireframe, backbone, sticks, balls and sticks, spacefill, ribbons, strands). Оцветете в различен цвят отделни аминокиселини, α -спирални и β -структурни участъци и водородни връзки.

2. Посетете домашната страница на програмата RASMOL
(<http://www.inpharmatica.co.uk/rasmol/>)

3. Координати на други белтъци може да изтеглите от

PubMed - The National Library of Medicine's Search Service
(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed/>). Ако Ви е трудно да изписвате този URL, може да ползвате търсещата машина Google (<http://www.google.com>) и да ѝ зададете да открие pubmed. Тя ще го открие за секунди.

4. Посетете The Online Macromolecular Museum

и от **Exhibits (експонати)** разгледайте представените белтъчни структури.

2.7. Литература

1. Murray, R., Granner, D., Mayes, P., Rodwell, V. (2000) Harper's Biochemistry, Prentice-Hall International, Inc., Twenty-Fifth Edition.
2. Kyte, J., and Doolittle, R. F. J. Mol. Biol. 157, 1982, 105-132. A simple method for displaying the hydrophobic character of protein.
3. Николов, Т. Обща биохимия за биолози и биохимици, 1991, Наука и изкуство, София.
4. Brogdon, R. N. and Heel, R. C. Human insulin: a review of its biological activity, pharmacokinetics, and therapeutic use. Drugs 34: 350, 1987.
5. Bell, G.I., Swain, W.F., Pictet, R., Cordell, B., Goodman, H. M. and Rutter, W. J. (1979) Nature 282, 525.
6. PubMed - The National Library of Medicine's Search Service:
<http://www.ncbi.nlm.gov/Entrez/Medline.html>
7. Sayle, R. <http://www.metaphorics.com>
8. The Online Macromolecular Museum:
<http://www.clunet.edu/BioDev/omm/gallery.htm>
9. Kavanaugh, J. S., Rogers, P. H., Case, D. A., Arnone, A. High-resolution X-ray study of deoxy hemoglobin Rothshield 37Beta Trp- -> Arg: A mutation that creates an intersubunit chloride binding site; PDB1hba.ent
10. Bernstein, F. C., Koetzle, T. F., Williams, G. J. B., Meyer, E. F. Jr., Brice, M. D., Rodgers, J. R., Kennard, O., Shimanouchi, T. & Tasumi, M (1977). J. Biol. Chem. 112, 535, Protein Data Bank. A computer-based archival file for the macromolecular structures, file Br568.
11. Henderson, R., Baldwin, J. M., Ceska, T. A., Zemlin, F., Beckamn, E., Downing, K. H. (1990) J. Mol. Biol. 213, 899-929. Model for the structure of bacteriorhodopsin based on high resolution electron cryomicroscopy.
12. <http://www.clunet.edu/BioDev/omm/ig/molmast.htm>
13. Birktoft, J. J., Blow, D. M. J. Mol. Biol. 68, 1972, 187. The structure of crystalline alpha-chymotrypsin.
14. Gamblin, S., Cooper, B., Millar, J., Davies, G., Littlechild, J., Watson, H. (1990) FEBS Lett 262: 282 -296. The crystal structure of human muscle aldolase at 3 A resolution.
15. Wang, D., Bode, W., Huber, R. J. Mol. Biol. 185, 1985, 595. Bovine chymotrypsinogen A. X-Ray Crystal Structure
16. Devlin, T. M. (ed.) (1997) Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations, Wiley-Liss, New York, Fourth Edition.
17. Prockop, D. J. and K. I. Kivrikko (1995) Ann. Rev. Biochem. 64, 403. Collagens: Molecular Biology, diseases, and potentials for therapy.
18. Davidson, V. L. and Sittman, D. B. (1999) Biochemistry, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, Fourth edition.
19. Roskoski, R. (1996) Biochemistry, W. B. Saunders Company, First Edition.
20. Prusiner, S. B. Science, 278, 1997, 245. Prion diseases and the BSE crisis.
21. Serpell, L. C., Sunde, M., Blake, C. C. P. Cell Mol. Life Sci 53, 1997, 871. The molecular basis of amiloidosis.
22. Weber, T., Aguzzi, A. Intervirology, 40, 1997, 198. The spectrum of transmissible spongiform encephalopathies.