

Chapter V Protein Function

学习目标

- 配体与蛋白质的结合方法
- 蛋白质-配体相互作用的定量和图形化建模
- 珠蛋白与氧及非氧配体的相互作用
- 氧结合的生理学调控
- 抗体-抗原相互作用的机制与控制
- 肌肉收缩的机制
- 肌肉收缩的调控

蛋白质功能的关键主题

- 配体 (**ligands**) 的可逆结合至关重要。
- 配体和结合位点的**特异性**。
- **诱导契合, induced fit**: 配体结合常常伴随着构象变化，有时变化剧烈。
- **协同性, cooperativity**: 在多亚基蛋白质中，一个亚基的构象变化会影响其他亚基。
- 相互作用可以被**调控**。

球状蛋白功能总结

- 储存离子和分子
 - 肌红蛋白、**铁蛋白 (ferritin)**
- 运输离子和分子
 - 血红蛋白、**血清素 (serotonin)** 转运体
- 抵御病原体
 - 抗体 (**antibodies**)、细胞因子 (**cytokines**)
- 肌肉收缩
 - 肌动蛋白、肌球蛋白
- 生物催化
 - 胰凝乳蛋白酶、**溶菌酶 (lysozyme)**

蛋白与其他分子的相互作用

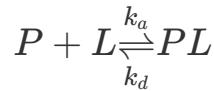
蛋白质与配体的相互作用是一个可逆的、瞬时的化学平衡过程：



- 蛋白质可逆结合的分子称为**配体 (ligand)**，通常是小分子。
- 蛋白质上配体结合的区域称为**结合位点 (binding site)**。
- 配体通过决定蛋白质结构的非共价相互作用进行结合，这使得相互作用是**瞬时的**。

蛋白与配体结合的定量描述

配体(L)与蛋白质(P)的可逆结合过程，可以用**缔合速率常数 (association rate constant, k_a)** 或**解离速率常数 (dissociation rate constant, k_d)** 来定量描述。



平衡状态时，缔合与解离速率相等：

$$k_a[P] \cdot [L] = k_d[PL]$$

平衡组分由**缔合平衡常数 (K_a)** 或**解离平衡常数 (K_d)** 表征：

$$K_a = \frac{[PL]}{[P] \cdot [L]} = \frac{1}{K_d}$$

结合率 (Bound Fraction)

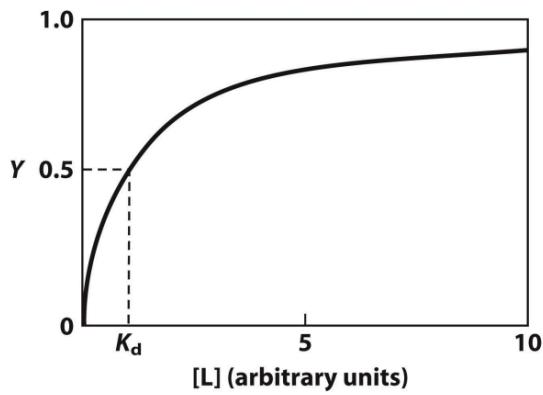
在实践中，我们通常测定已占据的结合位点的分数 (θ)：

$$\theta = \frac{\text{结合位点数}}{\text{总位点数}} = \frac{[PL]}{[PL] + [P]}$$

通过代入 K_d 或 K_a 的关系式，可以得到：

$$\theta = \frac{[L]}{[L] + K_d}$$

这个公式描述了结合分数与游离配体浓度 $[L]$ 和解离常数 K_d 之间的关系，其图形为双曲线。当 $[L] = K_d$ 时， $\theta = 0.5$ 。



当配体是气体时，结合通常用**分压 (partial pressures)** 来表示。对于肌红蛋白结合氧气：

$$\theta = \frac{pO_2}{P_{50} + pO_2}$$

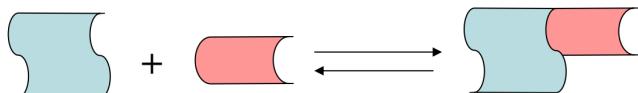
其中， P_{50} 是氧饱和度为50%时的氧分压，相当于气体配体的 K_d

- 强结合： $K_d < 10nM$,
- 弱结合 $K_d > 10nM$

蛋白结合配体的特异性

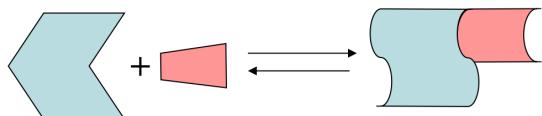
锁钥模型 Lock-and-Key

- 该模型认为蛋白质只能结合某种特定的配体
- 蛋白质与配体在大小、形状、电荷、亲水性上互补



诱导契合模型 Induced-fit

- 该模型认为配体结合后，蛋白质可能会发生构象变化。这种适应性变化称为**诱导契合**
- 能够结合得更**紧密**
- 对不同配体有着**高亲和力**
- 配体和蛋白质的构象都可能发生改变



Case I: Globins (珠蛋白)

- Problems:

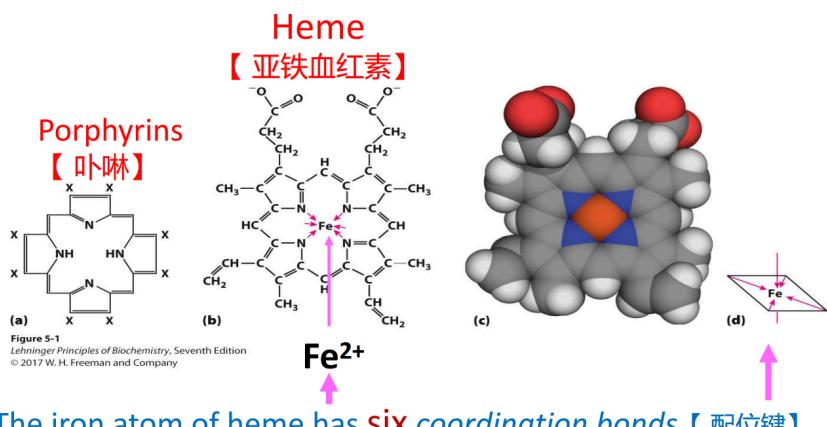
- 蛋白质侧链对 O_2 缺乏亲和力。
- 一些过渡金属能很好地结合 O_2 ，但若游离在溶液中会产生活性氧自由基。
- 像血红素这样的有机金属化合物更合适，但游离血红素中的 Fe^{2+} 容易被氧化成 Fe^{3+} 。

- Solutions: 用蛋白质包裹血红素来捕获氧气

- 肌红蛋白 (Myoglobin) 用于储存氧气，血红蛋白 (Hemoglobin) 用于运输氧气，它们都通过蛋白质结合的血红素来结合氧气

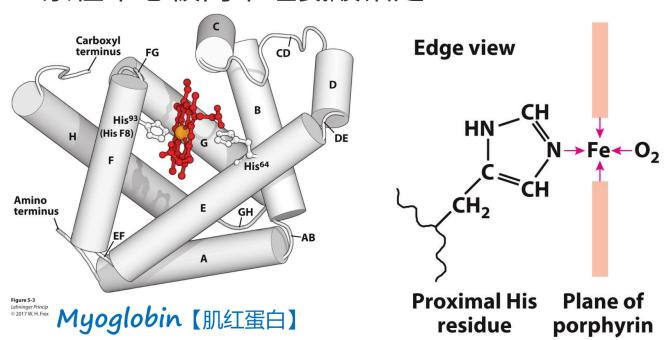
血红素 Heme

一类中心含有二价铁离子的卟啉化合物，除了在血红蛋白中负责结合氧气外，还是肌红蛋白、细胞色素、细胞色素P450、过氧化氢酶、过氧化物酶等多种蛋白的辅因子，并参与调控基因表达、miRNA加工、昼夜节律等过程。

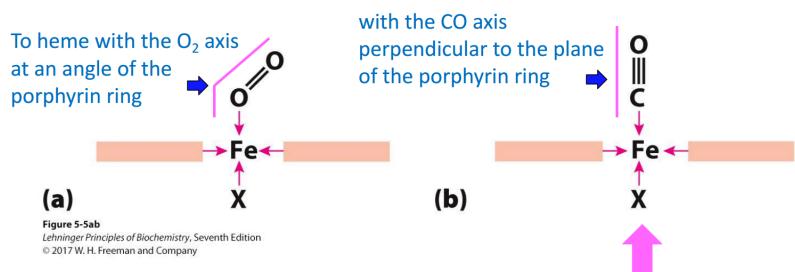


肌红蛋白 myoglobin

- 血红素在中心被两个组氨酸锚定



- CO通过与氧气竞争，阻断肌红蛋白、血红蛋白和线粒体细胞色素 (cytochromes) 的功能，因而具有剧毒
- 一氧化碳与血红素的结合强度比氧气强20000倍，因为CO与铁是直线连接，氧气则有一个夹角 -> 一氧化碳中毒



- 检测：空载的血红素有429nm紫外吸收峰，结合氧气之后吸收峰移动到414nm（这可以解释静脉血和动脉血的颜色差异原因）

血红蛋白 hemoglobin

为什么肌红蛋白不能运输氧气？

- 肌红蛋白对氧气有非常高的亲和力 (P_{50} 仅为 0.26 kPa)。
- 这意味着它在肺部 ($pO_2 \approx 13$ kPa) 能很好地结合氧气，但在组织中 ($pO_2 \approx 4$ kPa) 却不能有效释放氧气。因此，肌红蛋白只适合作为氧气的储存蛋白，不适合作为运输蛋白。

协同效应 (Cooperativity)

为了有效地运输氧气，蛋白质对氧的亲和力必须随 pO_2 的变化而变化：在肺部高亲和力结合，在组织中低亲和力释放。

- 协同效应 (cooperativity)**：结合位点可以相互作用
- 通常发生在具有多个结合位点的蛋白质中。
- 正协同：第一个结合的配体促进之后的配体结合，通过S形结合曲线识别
- 负协同反之，图像为直线

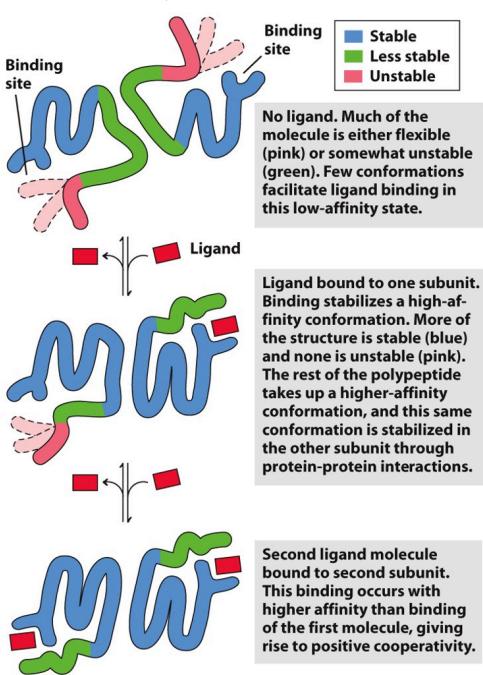


Figure 5-13
Lehninger Principles of Biochemistry, Seventh Edition
© 2017 W. H. Freeman and Company

协同效应的定量描述

- 平衡方程修正为：

$$K_a = \frac{[PL_n]}{[P][L]^n}$$

- 结合率修正为：

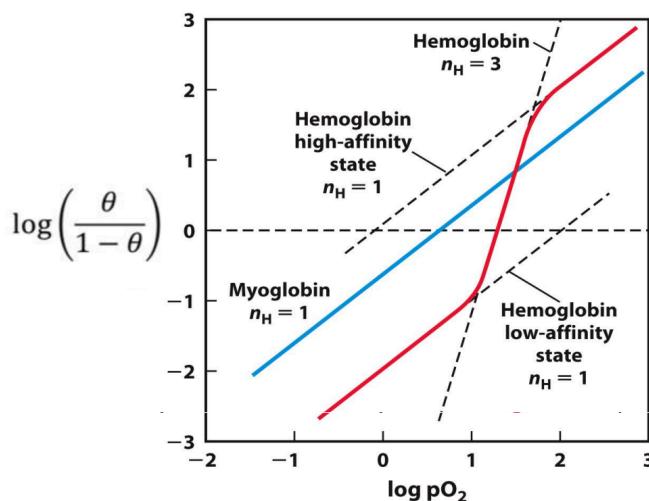
$$\theta = \frac{[L]^n}{[L]^n + K_d}$$

- 两边取对数得到希尔方程：

$$\log\left(\frac{\theta}{1-\theta}\right) = n \log[L] - \log K_d$$

- n (Hill系数)** 表示协同程度：

- $n = 1$: 无协同作用 (如肌红蛋白)
- $n > 1$: 正协同作用 (如血红蛋白, $n \approx 3$)
- $n < 1$: 负协同作用



协同效应模型

- 齐变模型 (Concerted model)**: 所有亚基同时从低亲和力状态转变为高亲和力状态。
- 序变模型 (Sequential model)**: 配体结合逐个诱导亚基发生构象变化。

别构调控 (Allosteric Regulation)

协同效应是别构调控的一个特例。

- 别构蛋白 (Allosteric protein)**:

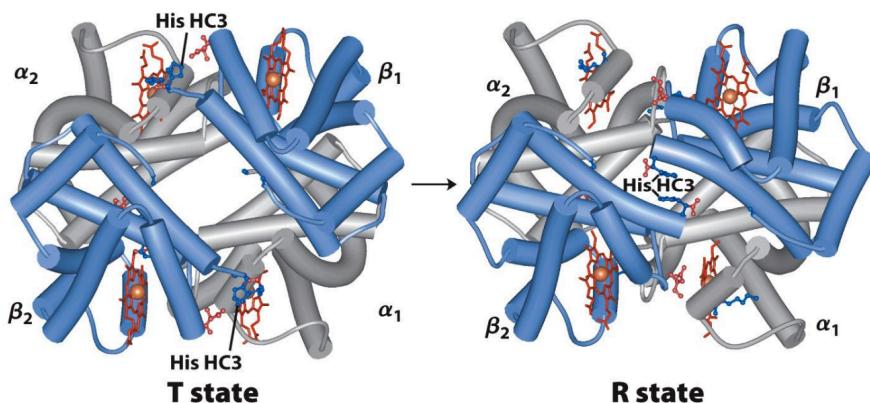
- 配体在一个位点（非催化位点）的结合影响了同一蛋白质上另一个不同位点的结合特性，此时该配体为别构调节剂

- 分为积极影响和消极影响
- 同促效应 (Homotropic effect)**: 蛋白质的正常配体本身就是别构调节剂 (如氧气对血红蛋白的调节)。
- 异促效应 (Heterotropic effect)**: 不同于正常配体的分子影响正常配体的结合。
- 协同性=正同向调节

Cooperativity = Positive Homotropic Regulation

血红蛋白的结构:

- 血红蛋白 (**Hb**) 是一个 $\alpha_2\beta_2$ 四聚体，每个亚基都与肌红蛋白相似
- 当第一个氧气结合时， $\alpha_1 \beta_2$ 链之间的构象会改变，多个离子键断裂
- Tense state: 更多的相互作用，更稳定，对氧气的亲和力低
- Relaxed state: 更少的相互作用，更自由，对氧气的亲和力高
- 氧气的结合促使从 T \rightarrow R 的转变



pH值对血红蛋白运输氧气的影响

- 活跃代谢的组织产生 H^+ ,使得肌肉组织的pH值比肺部低,
- H^+ 可以稳定T构象，原理是可以质子化 His^{146} ，然后和 Asp^{94} 之间形成盐桥，促进氧气的释放
- 肺部和代谢组织之间的pH差异提高了氧气运输的效率，这种效应称为玻尔效应 (Bohr Effect)

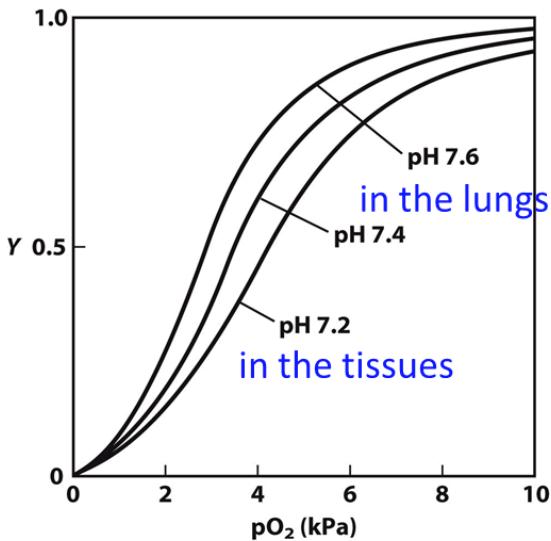
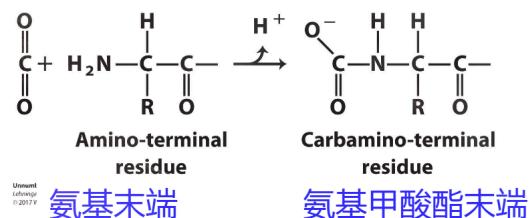


Figure 5-16
Lehninger Principles of Biochemistry, Seventh Edition
© 2017 W. H. Freeman and Company

血红蛋白运输二氧化碳

- 二氧化碳和肽链的氨基末端结合形成氨基甲酸酯末端
- 过程产生质子，进一步加强Bohr效应
- 会形成额外的盐桥，稳定T构象，促进氧气释放



2,3-二磷酸甘油酸（2,3-BPG）对氧气运输的调节

- 2,3-BPG是血红蛋白功能的**负向异促调节剂**
- 这是糖酵解中产生的小型负电分子
- 可以和血红蛋白中心的正电空腔相结合，**稳定T态**，促进氧气释放
- 可以让组织适应不同的海拔高度，高海拔地区提高该物质浓度，增加氧气运输效率

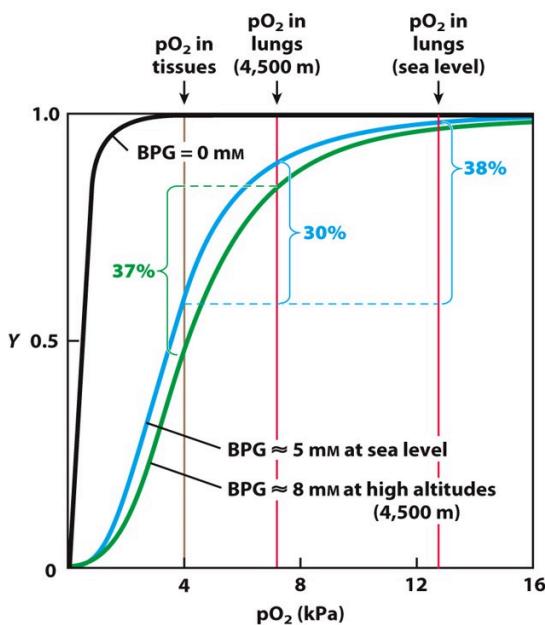


Figure 5-17
Lehninger Principles of Biochemistry, Seventh Edition
© 2017 W. H. Freeman and Company

镰状细胞性贫血症 Sickle-Cell Anemia

- 血红蛋白β链第六位谷氨酸Glu突变为缬氨酸Val ($\beta 6:\text{Glu} \rightarrow \beta 6:\text{Val}$)
- 突变后的β链可以结合其他的血红蛋白分子，最终大量分子聚集形成不溶性纤维，使红细胞变成镰刀状
- 基因突变导致，纯合子个体幼年死亡
- 杂合子 (Heterozygous) 个体对疟疾 (malaria) 表现出抵抗力

Case II : Antibody/Antigen Interaction(抗体抗原结合)

两种免疫系统

细胞免疫

- 攻击已被感染的自身细胞。
- 主要参与者：巨噬细胞、杀伤性T细胞。

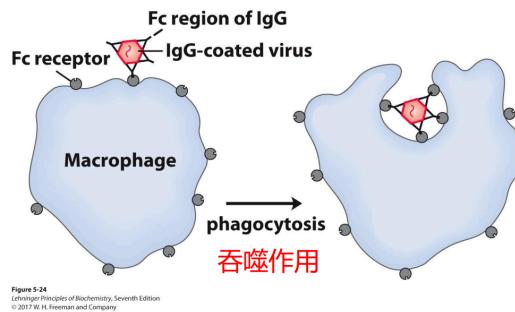


Figure 5-24
Lehninger Principles of Biochemistry, Seventh Edition
© 2017 W. H. Freeman and Company

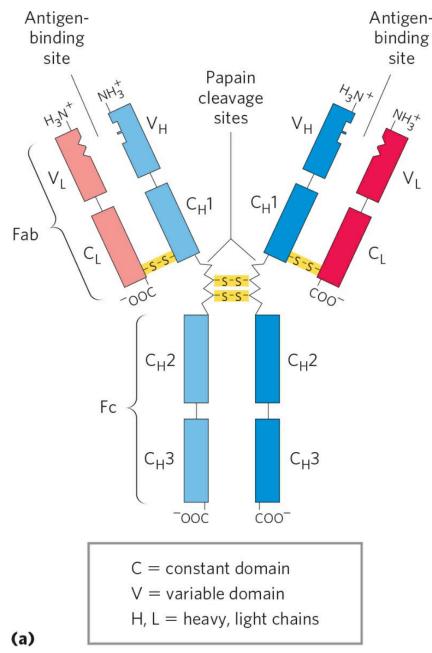
体液免疫

- **抗原 (Antigen)**: 刺激抗体产生的物质，通常是免疫系统识别为“外来”的**大分子**（如病毒的包膜蛋白、细胞或病毒的表面碳水化合物）
- **抗体 (Antibody)**: 由B细胞产生，特异性结合抗原的蛋白质
 - 结合将标记抗原以破坏或干扰其功能
 - 一个抗原可以有**多个表位(epitope)**，但一种抗体只能结合一个表位

抗体

免疫球蛋白 G (IgG)

- 是主要的抗体类型，呈Y形。
- 由两条相同的**重链 (heavy chains)** 和两条相同的**轻链 (light chains)** 组成。
- 链由**恒定区 (constant domain)** 和**可变区 (variable domain)** 组成。
- 可变区构成了**抗原结合位点**，其序列高度可变，赋予了抗体的特异性。
- 经木瓜蛋白酶切割可分为两个**Fab** (抗原结合片段) 和一个**Fc** (可结晶片段) 区域。
- **巨噬细胞 (Macrophages)** 表面的Fc受体可以识别并结合包被了IgG的病原体，通过**吞噬作用 (phagocytosis)** 将其清除。
- 与抗原诱导契合结合，一个IgG可以结合两个抗原



抗体类别

- **IgG**: 次级免疫应答中的主要抗体，血液中最丰富。
- **IgA**: 主要存在于分泌物中（唾液、眼泪、乳汁）。
- **IgE**: 在过敏反应中起重要作用。
- **IgM**: 初级免疫应答早期产生的主要抗体，以**五聚体形式**分泌。
- **IgD**: 功能尚不完全清楚。

免疫交联技术

- 底物、一抗与底物结合、被改造过的二抗（能和化学荧光物质结合或能催化颜色反应）与一抗结合、荧光物质能与二抗结合并被检测到或产生颜色反应
- 应用实例：**ELISA（酶联免疫吸附测定）技术检测人单纯疱疹病毒HSV**，一抗是抗HSV抗体，二抗是连接有辣过氧化物酶的人IgG，HSV载量最后反应为黄色的深浅

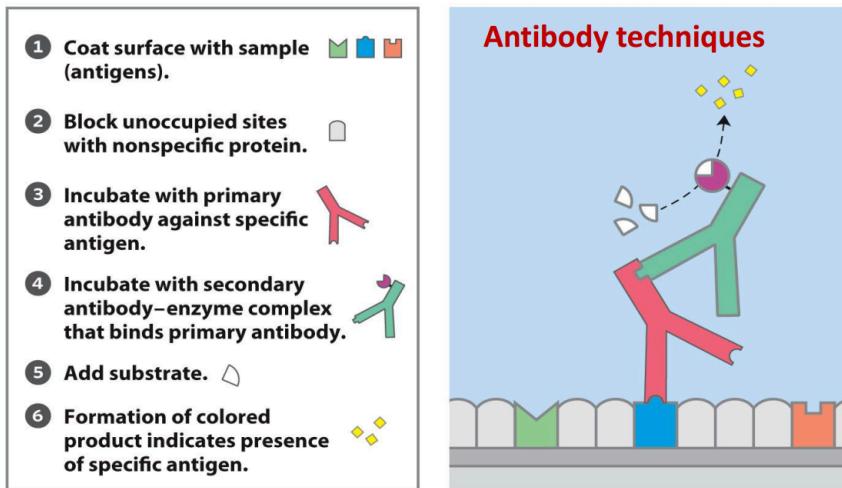


Figure 5-26a
Lehninger Principles of Biochemistry, Seventh Edition
© 2017 W.H. Freeman and Company

Case III: Muscle Proteins (肌蛋白)

肌肉的结构

- 肌球蛋白Myosin 和 肌动蛋白Actin -> 肌原纤维 -> 肌纤维 (muscle fibers) -> 肌肉

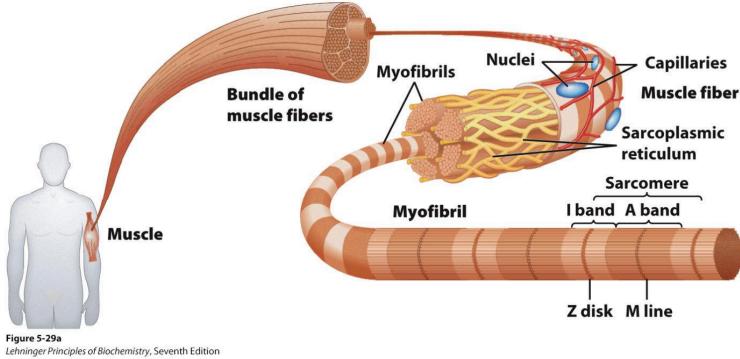


Figure 5-29a
Lehninger Principles of Biochemistry, Seventh Edition
© 2017 W. H. Freeman and Company

• 肌球蛋白:

- 组成粗的丝状物
- 头部氨基端纺锤状，有ATP酶活性
- 尾部是两股 α 螺旋
- 头部沿着肌动蛋白滑动，使肌小节缩短

• 肌动蛋白:

- 组成细的丝状物
- F-肌动蛋白是两个G-肌动蛋白单体以右手的方式相互螺旋的一种丝状集合体

肌肉的运动需要化学能

- 肌动球蛋白循环：每消耗一个ATP，肌球的头往前跨两节

肌肉收缩的调节

- 神经冲动导致钙离子的释放
 - 引起整个复合体 (tropomyosin-troponin complex) 构象改变，暴露肌动蛋白结合位点
- 原肌球蛋白 (Tropomyosin) 和肌钙蛋白 (Troponin)** 可调节肌动蛋白上的肌球蛋白结合位点的可用性
 - 防止肌肉持续收缩

Case IV: 胰高血糖素样肽-1 (GLP-1)

- GLP-1和胰高血糖素, GLP-2由同一个基因编码，先生成前胰高糖素原，切除信号肽后形成胰高糖素原，在不同组织中经不同*激素原转化酶 (PSCK) *选择性切割为若干胰高糖素原衍生肽**

The effects of GLP-1 and GLP-1RA

- 降血糖
- 控肥胖
- 护心脏
- 与很多生命过程相关

第五章 总结

本章中，我们学习了：

- 配体结合如何影响蛋白质功能。
- 如何定量分析结合数据。
- 肌红蛋白如何储存氧气。
- 血红蛋白如何运输 O_2 、质子和 CO_2 。
- 抗体如何识别外来结构。
- 肌肉如何工作。