

Chapter IV - The 3D Structure of Proteins

本章主要内容

- 蛋白质结构概述
- 蛋白质的二级结构
- 蛋白质的三级和四级结构
- 蛋白质的变性与折叠

学习目标

- 肽键的结构和性质
- 蛋白质的结构层次
- 纤维状蛋白质的结构和功能
- 球状蛋白质的结构分析
- 蛋白质的折叠与变性

蛋白质的结构

- 不像大多数有机聚合物，蛋白质分子采用一种特定的三维构象 (conformation)，这种结构叫做天然折叠 (native fold)。
- 天然折叠结构内部存在大量有利的相互作用。将蛋白质折叠成一个特定的天然构象需要在熵上付出代价。

蛋白质的四个结构层次

1. **一级结构 (Primary structure)**: 氨基酸残基的序列。
2. **二级结构 (Secondary structure)**: 如 α -螺旋等局部规整的结构。
3. **三级结构 (Tertiary structure)**: 一条多肽链的三维空间构象。
4. **四级结构 (Quaternary structure)**: 由多个亚基组装而成的复合体。

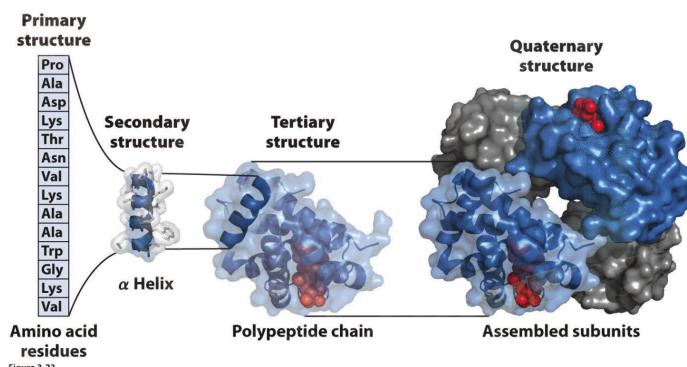


Figure 3-23
Lehninger Principles of Biochemistry, Seventh Edition
© 2017 W. H. Freeman and Company

一级结构：肽键

蛋白质的结构部分取决于肽键的性质。

- 肽键是两种经典结构的**共振杂化体 (resonance hybrid)**。
- 共振使得肽键：
 - 与酯类相比反应活性较低。
 - 相当刚性且近乎平面。
 - 在有利的反式构型中表现出较大的偶极矩。

肽键的刚性平面和部分自由的旋转

- 由于共振结构，围绕肽键 (C-N) 的旋转是不允许的。
- 围绕 α -碳的键的旋转是允许的：
 - Φ (phi): 围绕 α -碳与**酰胺氮 (amide nitrogen)**之间键的旋转角。
 - Ψ (psi): 围绕 α -碳与**羰基碳 (carbonyl carbon)**之间键的旋转角。
- 在完全伸展的多肽链中， Φ 和 Ψ 角均为 180° 。

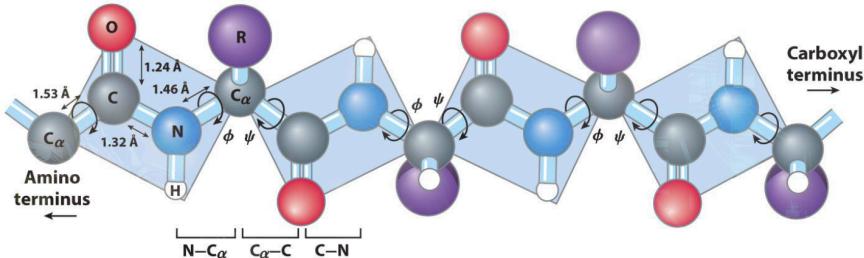


Figure 4-2b
Lehninger Principles of Biochemistry, Seventh Edition
© 2017 W. H. Freeman and Company

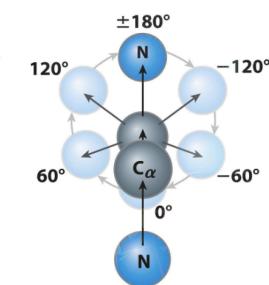
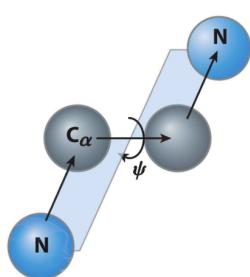


Figure 4-2d
Lehninger Principles of Biochemistry, Seventh Edition
© 2017 W. H. Freeman and Company

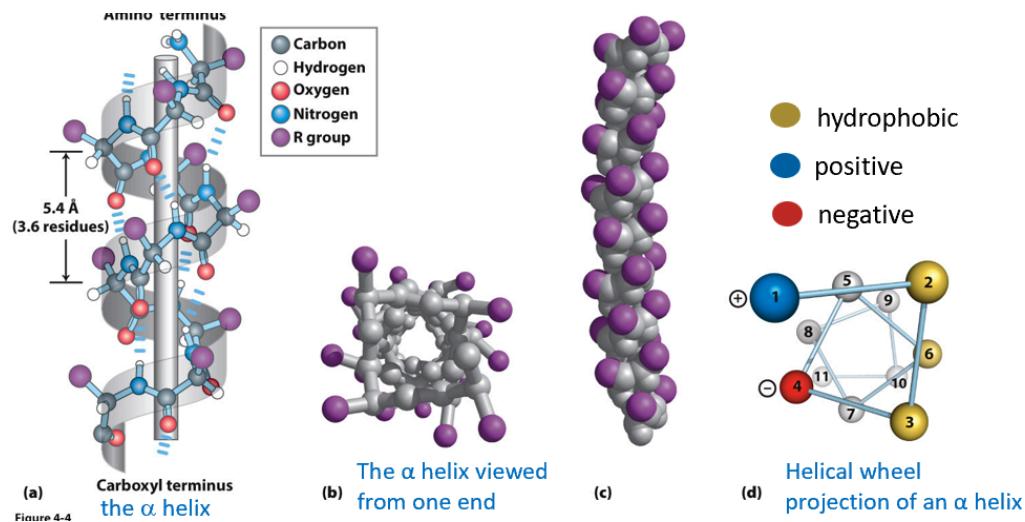
二级结构：多肽骨架的局部空间排列

- 常见的：
 - α -螺旋 (α -helix): 由两个相邻残基的氢键稳定
 - β -折叠 (β -sheet): 由可能不相邻的两条链之间的氢键稳定
 - β 转角
- 不规则排列：随机螺旋（只是叫这个名字，其实一点都不随机）
- 二级结构的测定方法：圆二色性光谱分析， α 螺旋和 β 折叠有不同的吸收谱线

α -螺旋

结构特点

- 由第n个氨基酸的O和n+4个氨基酸的N上的H形成氢键来稳定
- 每圈有**3.6个残基**, 螺距为5.4 Å。
- 氢键和肽键(平面结构)**, 并大致平行于螺旋轴排列
- 侧链指向外侧, 并大致**垂直于螺旋轴**
 - 两亲螺旋: 疏水基团全部在一侧, 亲水基团全部在另一侧
- 一般都是**右手螺旋**
- 俯视图上看, 第一个氨基酸和第八个氨基酸是**重合的**



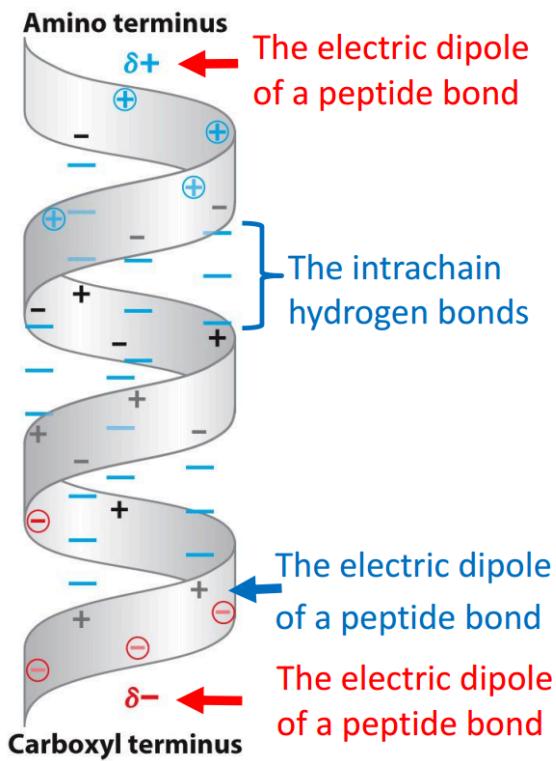
氨基酸序列对螺旋稳定性的影响

并非所有多肽序列都能形成 α -螺旋结构。

- 具有小的疏水侧链的丙氨酸和亮氨酸是**strong helix former**
- 脯氨酸**是helix breaker, 因为其环状结构限制了N-Cα键(ϕ -angle)的旋转
- 甘氨酸**也是helix breaker, 它的R基团支持形成其他的构象
- 相隔3到4个氨基酸的侧链之间的吸引或排斥作用会影响螺旋的形成

α -螺旋的偶极矩

- α -螺旋中所有的肽键都具有相似的取向, 导致整个螺旋具有一个宏观的偶极矩。
- N端积累部分正电荷, C端积累部分负电荷
- 这样的偶极矩不利于氨基酸的稳定, 因此常在螺旋的N端分布一些带负电的酸性氨基酸或在C端分布一些带正电的碱性氨基酸



β-折叠

结构特点

- β股 (β-strand) 之间通过主链之间的氢键相互联系，成锯齿状展开

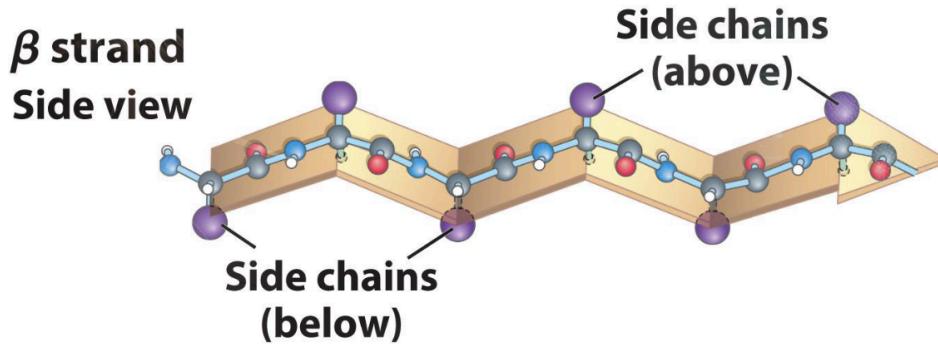


Figure 4-6a
Lehninger Principles of Biochemistry, Seventh Edition
© 2017 W. H. Freeman and Company

- 至少2条β-strand才能形成β折叠
- 这种片状排列由不同肽链主链酰胺基之间的氢键维持。
- R基团在主链上上下交替排列，约与折叠的平面垂直
- β-折叠的两种主要朝向：
 - 平行β-折叠：肽链走向相同。链间的氢键是弯曲的（较弱）。
 - 反平行β-折叠：肽链走向相反。链间的氢键是线性的（较强）。
- 脯氨酸永远不可能出现在β折叠中

Antiparallel β sheet

Top view

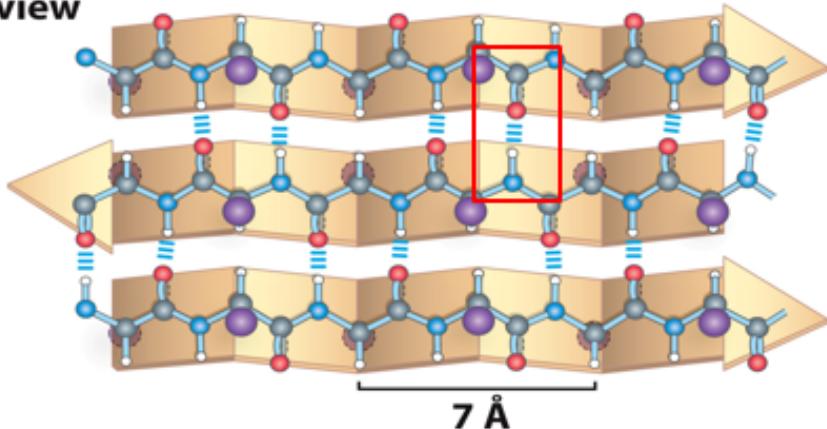


Figure 4-6b

β 转角

当 β -折叠中的肽链改变方向时，经常会出现 β -转角

结构特点

- 由4个氨基酸残基组成，可以导致肽链发生180°转向
- 由第n个氨基酸的C=O和n+3个氨基酸的N-H形成氢键来稳定
- 在 β -转角中，第2位通常是**脯氨酸 (Pro)**，第3位通常是**甘氨酸 (Gly)**

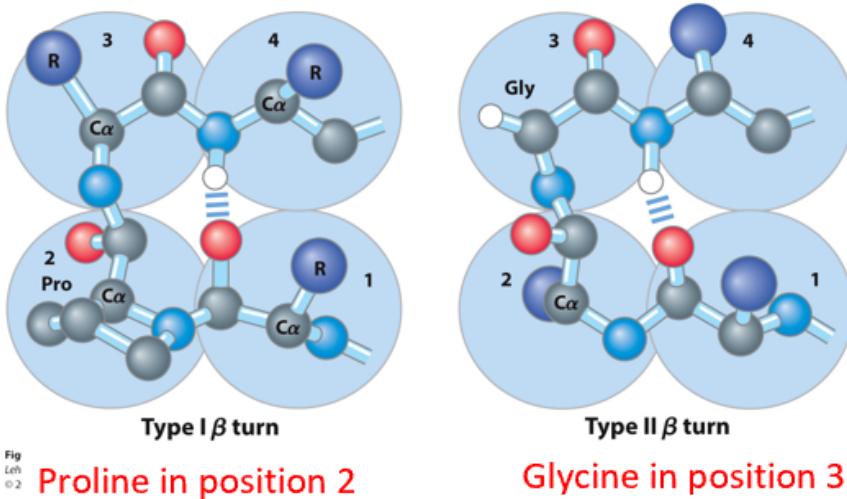


Fig
Left
②

三级结构

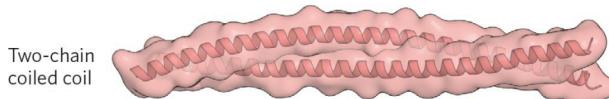
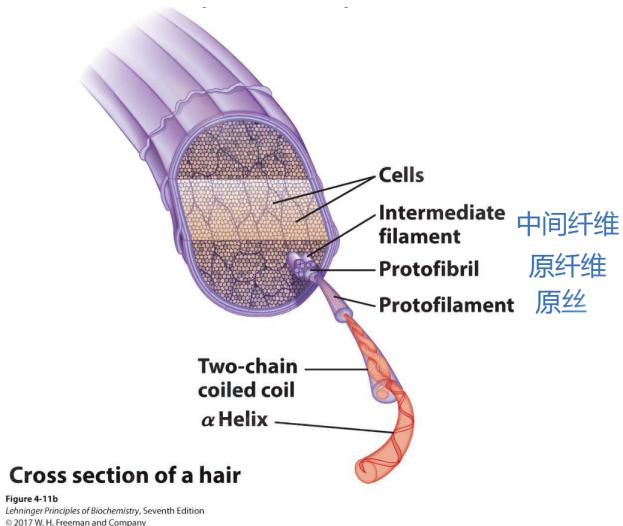
- 三级结构是指蛋白质中所有原子的整体空间排列
- 由氨基酸侧链之间的多种弱相互作用稳定
 - 主要是疏水和极性相互作用
 - 也可由二硫键稳定
- 相互作用的氨基酸在一级序列中不一定彼此相邻

- 两大类：纤维状蛋白和球状蛋白

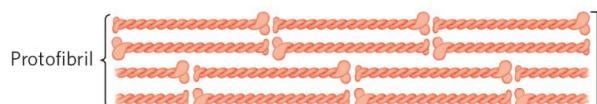
纤维状蛋白

- **α -角蛋白 (α -Keratin)** : 一种细长的 α 螺旋

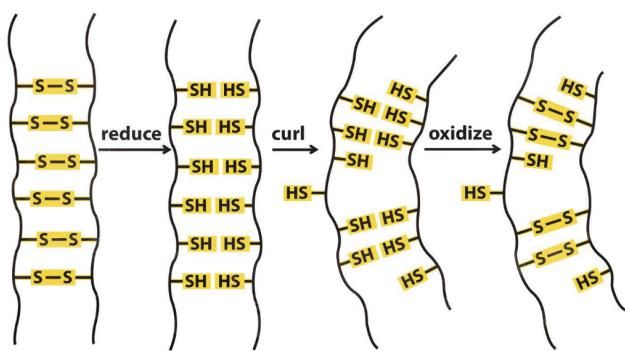
- 两条 α 螺旋通过左手螺旋的方式形成一种双股螺旋卷曲 (coiled coils), 即原丝 (protofilaments)
- 原丝形成原纤维(protofibrils), 再形成中间纤维



Protein filament { [α Helix] 20-30 Å }



- 烫发的化学原理是通过还原剂打开二硫键，定型后再用氧化剂重新形成二硫键

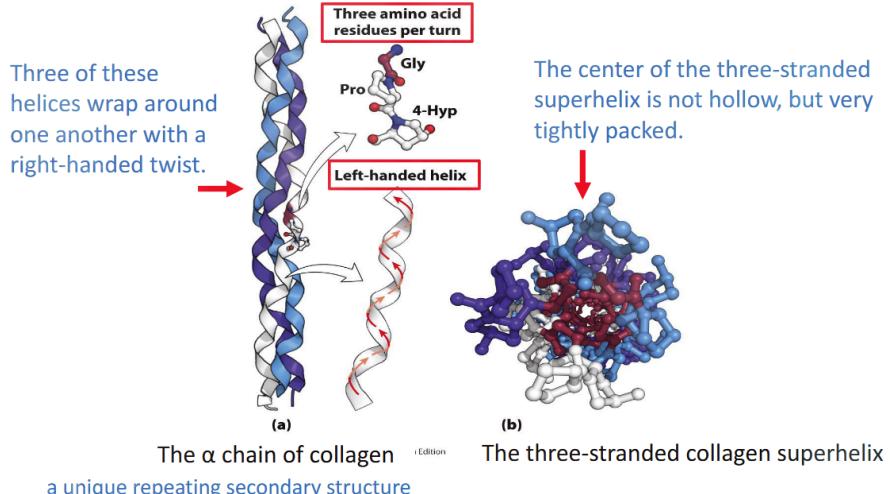


Box 4-2
Lehninger Principles of Biochemistry, Seventh Edition
© 2017 W. H. Freeman and Company

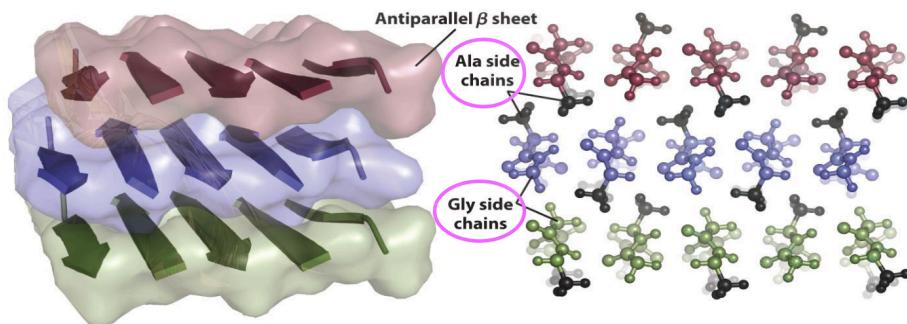
• 胶原蛋白 (collagen)

- 结缔组织的重要成分
- 含有三条缠绕在一起的多肽链，每一条都是富含甘氨酸和脯氨酸的左手螺旋 (不是 α 螺旋)

- 富含35% Gly、11% Ala和21% Pro及**4-羟脯氨酸 (4-Hyp)**
- 4-羟脯氨酸** 对稳定胶原蛋白至关重要。它的形成需要脯氨酰羟化酶，该酶需要**维生素C (抗坏血酸)** 作为辅因子来维持其活性中心的铁离子处于 Fe^{2+} 状态。缺乏维生素C会导致**坏血病 (Scurvy)**
- 三条链缠绕成右手超螺旋**三螺旋结构**，且超螺旋的中心不是空心的，而是非常紧密地堆积



- 一级结构是重复三元体序列 $(\text{Gly-X-Y})_n$ ，XY通常是脯氨酸或羟脯氨酸，还有丙氨酸和赖氨酸或羟赖氨酸，引入羟基化氨基酸能够获得新的氢键供体，加强螺旋结构
- 胶原蛋白之间会产生共价交联，弹性和柔韧性减弱，这是组织衰老的表现
- 丝心蛋白 (Silk Fibroin):** 是蚕丝和蜘蛛丝的主要蛋白。
 - 其结构为**反平行 β -折叠**
 - 富含小的Ala和Gly侧链，允许折叠片紧密堆积。



球状蛋白

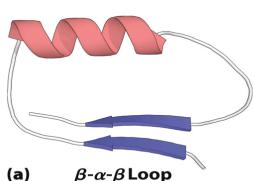
通常结构紧凑，种类繁多，可溶于水或脂质

- 抹香鲸的肌红蛋白。
- 人血清白蛋白的单链中有585个残基，呈扩展 β 形态或呈 α 螺旋

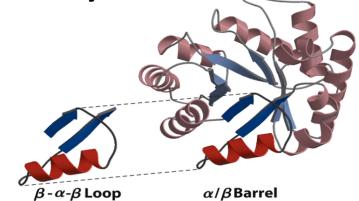
模体 Motifs/folds

- 几种二级结构的特定组合

A simple motif



a very elaborate structure



- 是一种重复出现的结构，可以在大量蛋白中被找到

- 常见的模体有 β - α - β 环 和 β -桶

• 单独存在不一定稳定

• 模体是蛋白结构分类的基础

- 在进化的过程中，蛋白质的三级结构比氨基酸序列更加可靠保守，大约只存在1200种模体

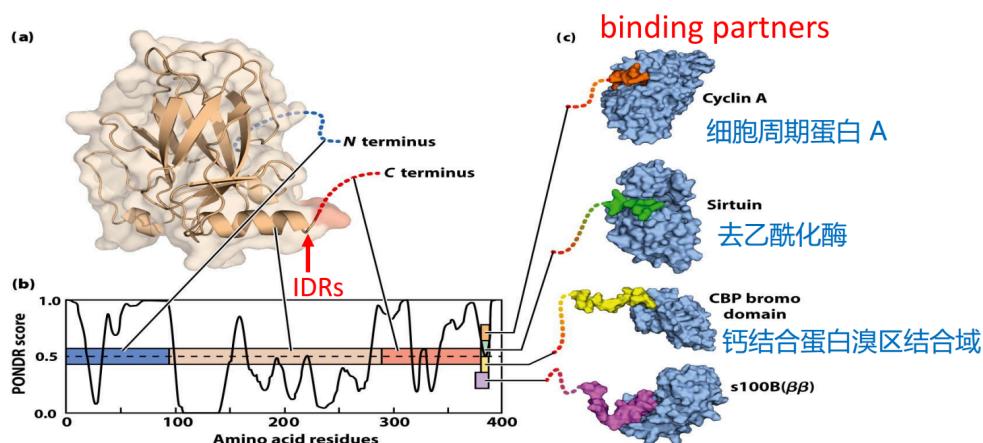
◦ 蛋白质家族 (Protein family): 一级结构/三级结构/功能相似的蛋白质

◦ 超家族 (Superfamilies): 氨基酸序列相似性很低，但使用相同的主要结构模体并具有功能相似性的家族

固有无序蛋白

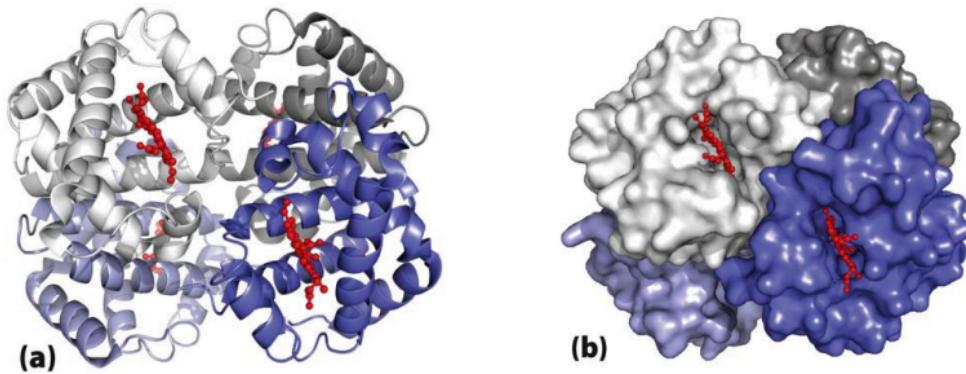
- 包含没有明确定义结构的蛋白质片段
- 由高浓度的Lys, Arg, Glu, and Pro组成，使得结构并不明确
- 固有无序区域 (IDRs) 可以适应许多不同的蛋白质，从而促进与众多不同伙伴蛋白质的相互作用
- 受不同环境影响，可以和不同的binding partners结合

例如p53蛋白的IDRs不同的序列可以结合不同的伙伴蛋白，如细胞周期蛋白A，去乙酰化酶等



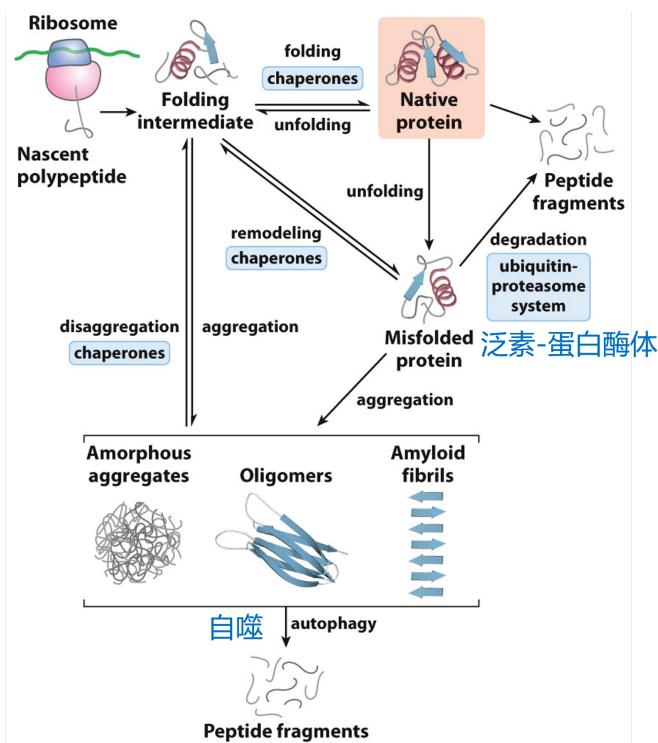
四级结构

- 四级结构是由单个多肽（亚基）组装成更大的功能性簇（寡聚体或多聚体）而形成的
- 一个经典的例子是去氧血红蛋白 (Deoxyhemoglobin)，它由四个亚基组成



蛋白质稳态

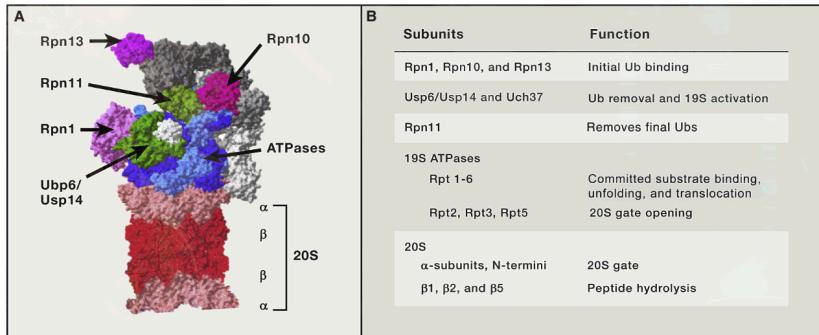
- 指在特定条件下，通过协调多种途径，持续维持细胞内活性蛋白质集合的过程
- 包括合成、组装、降解



▲ Pathways that contribute to proteostasis.

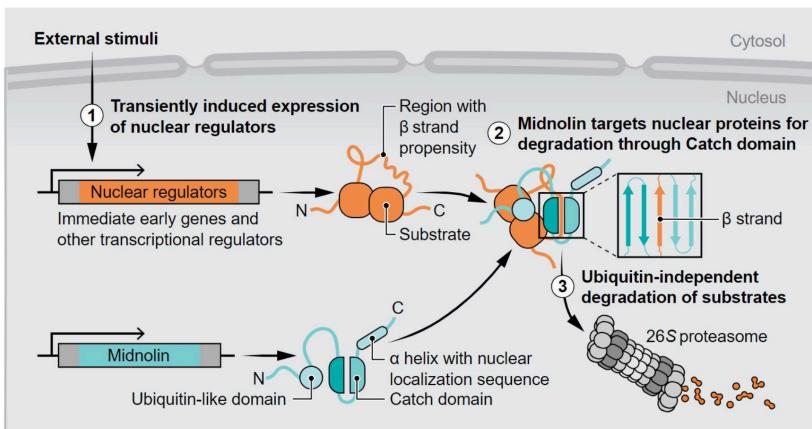
泛素-蛋白酶体

- 泛素-蛋白酶体是一个由大约50种不同蛋白质组成的**桶状多酶复合体**，本质上是细胞的垃圾箱。细胞不再需要的蛋白质进入该复合体，并在其中央腔内被称为“细胞剪刀”的蛋白水解酶分解。
- 26S泛素蛋白酶体是负责催化大多数（至少80%）生长中的哺乳动物细胞中蛋白质降解的复合体，包括错误折叠和调节性蛋白质的快速降解，以及细胞内大多数蛋白质较慢的分解过程。



新发现的midnolin-proteasome pathway

- 过程不涉及泛素标记，而是通过midnolin的 α 螺旋结构域与蛋白酶体相互作用，利用其Catch结构域识别并结合底物中的特定区域，这些区域能够形成 β 链结构，并通过midnolin的泛素样结构域(Ubiquitous-like domain)促进底物的降解

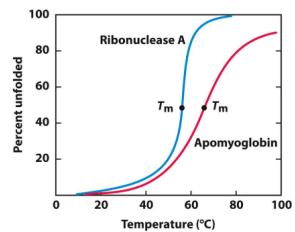


变性 Denaturation 与折叠 Folding

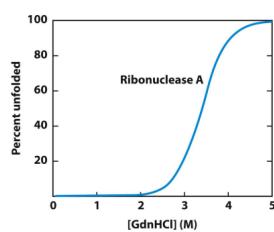
蛋白质的功能依赖于其三维结构。结构完整性的丧失伴随着活性的丧失，这一过程称为**变性 (denaturation)**

- 蛋白质可被以下因素变性：
 - 高温或低温
 - 极端pH
 - 有机溶剂（如酒精）
 - 离液剂 (chaotropic agents)和洗涤剂
 - 某些溶质，如**尿素**和**盐酸胍 (Guanidinium Hydrochloride)**。
- 变性过程通常是**协同的**，即在很窄的条件范围内发生突变

(a) Thermal denaturation



(b) Denaturation by guanidine hydrochloride



- 变形通常会导致蛋白质沉淀
- The Anfinsen Experiment:

- 核糖核酸酶A有四个二硫键，加入尿素和巯基乙醇使其完全变性，移除变性剂，蛋白质开始重新折叠，二硫键重新形成
- 实验证明，小的水溶性蛋白质在生理环境条件下的天然结构仅取决于其氨基酸序列
- 安芬森法则 (Anfinsen's dogma):** 该实验证明了蛋白质的一级序列决定了其三维结构

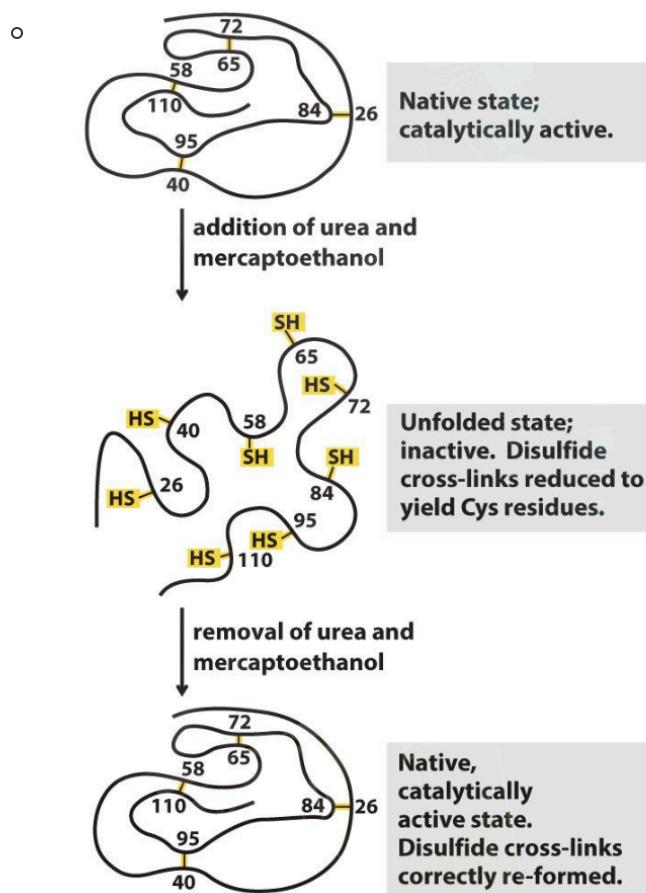
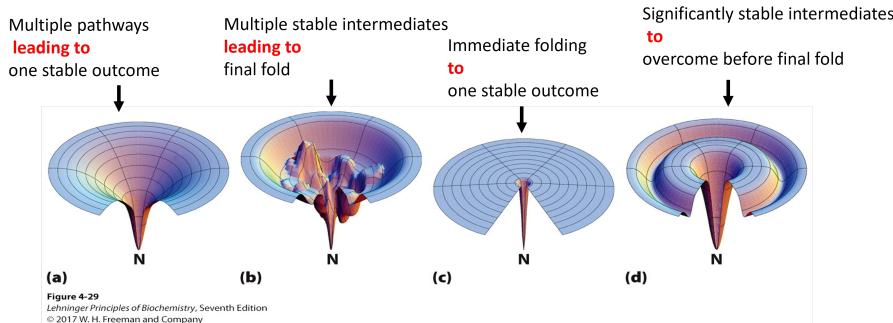


Figure 4-27
Lehninger Principles of Biochemistry, Seventh Edition
© 2017 W. H. Freeman and Company

- 蛋白质折叠：蛋白质从伸展的多肽链转变为具有特定三维结构的过程，这是一个层级过程，小的二级结构先折叠，再折叠出大的结构
- 为什么蛋白质折叠得如此之快？**
 - 自由能漏斗 (free-energy funnels):** 蛋白质的折叠在热力学上是一个有利的过程，伴随着自由能的降低，漏斗的底部代表蛋白质的原生状态 (native state)，而漏斗的宽阔部分则代表多种可能的未折叠或部分折叠的中间状态



- Foldase(折叠酶) + ATP:

- 许多蛋白质需要辅助才能正确折叠
- **分子伴侣Chaperones:** 阻止未折叠肽链的聚集或错误折叠，但并不会极大地促进肽链折叠，常见的有热休克蛋白Hsp60和Hsp70，作用过后的中间产物传递给伴侣蛋白
- **伴侣蛋白Chaperonins:** GroEL/GroES蛋白复合体能够促进折叠（上下两端都可以工作，极大提高了效率）

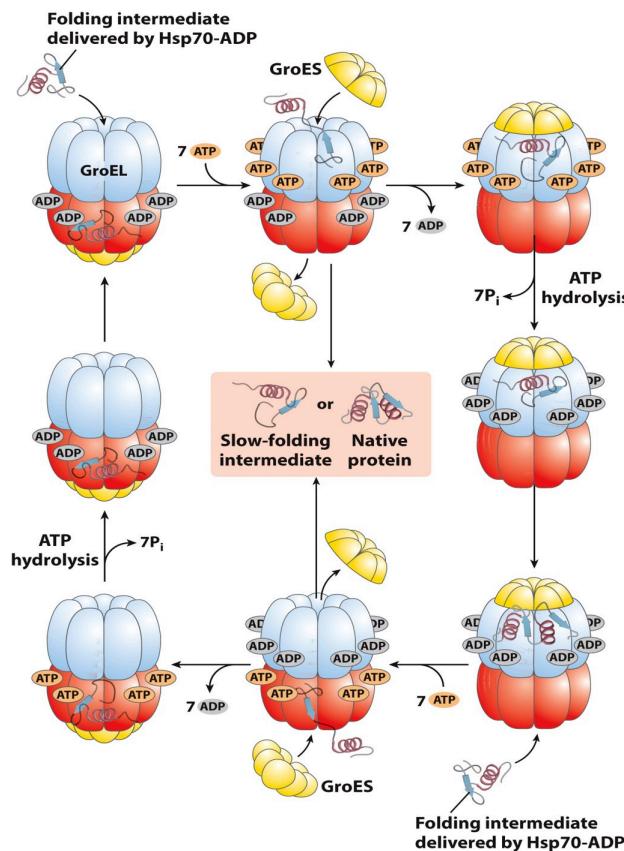
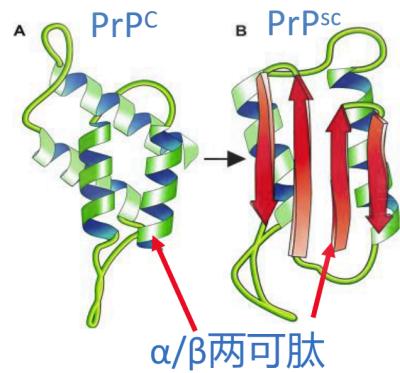


Figure 4-31a
Lehninger Principles of Biochemistry, Seventh Edition
© 2017 W. H. Freeman and Company

- 错误折叠的蛋白质会引起疾病

- 许多人类疾病的基础是蛋白质的错误折叠，错误折叠的蛋白质会聚集形成淀粉样纤维(**amyloid fibrils**)。
- **阿尔茨海默病:** 由β-淀粉样蛋白(A_β)和Tau蛋白的错误折叠和聚集引起。
- **朊病毒病(Prion Diseases):**
 - 由朊蛋白(**Prion Protein, PrP**)的构象改变引起。正常的PrP^c富含α-螺旋，而致病形式PrP^{Sc}富含β-折叠。因为能抵抗消化道水解酶且能被吸收，所以具有传染性，故又称传染性

蛋白颗粒。到达脑部后导致脑炎和脑组织出现海绵状空洞



- 正常蛋白 PrP^{C} 和错误蛋白 PrP^{Sc} 相接触，诱导转变，引发**多米诺骨牌效应**。
- 例子包括克雅氏病 (CJD)、疯牛病 (BSE)、致死性家族失眠症 (FFI) 等。