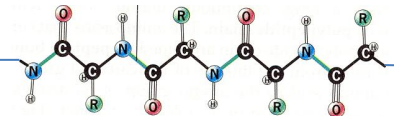


Biokemija I, 25. predavanje – 1. del, 16. 4. 2012, A. Videtič Paska

Proteini - splošno

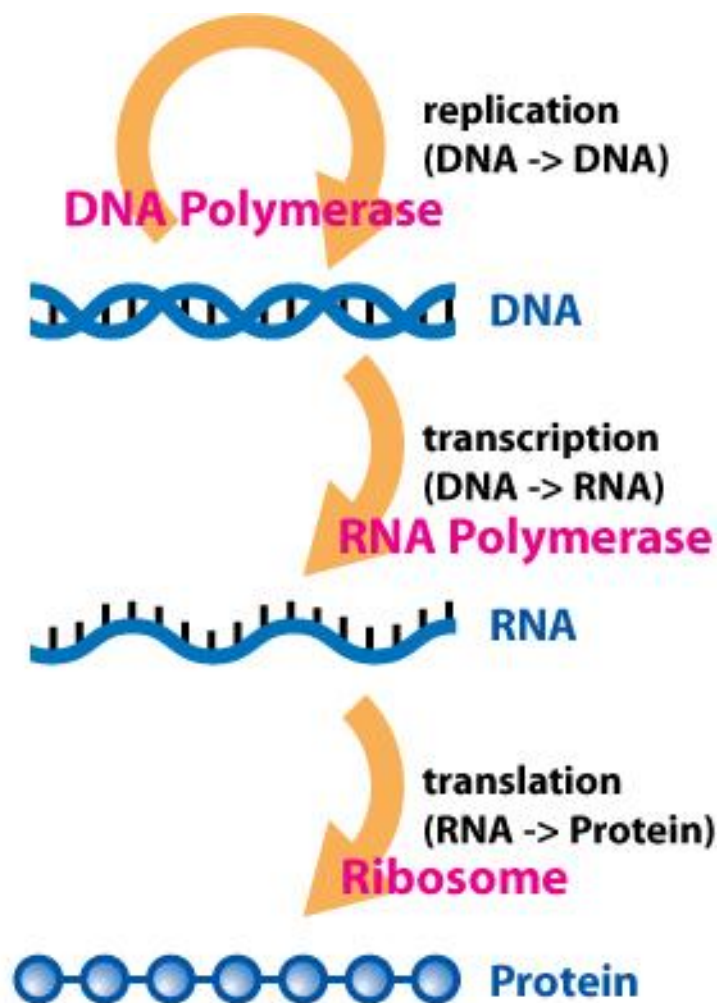
- Razdelitev po strukturi in funkciji.
- Ravni proteinske strukture:
 - primarna in
 - sekundarna struktura



Sinteza proteinov – prevajanje (translacija)

- DNA → primarni transkript (mRNA)
- mRNA se procesira

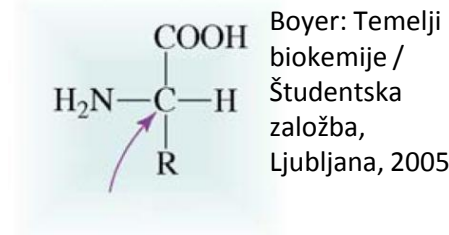
- mRNA se **prevede v proteine**
- nekatere AK se modificirajo



gr. *proteios* – glavni
oz. prvi v vrsti

Proteini - splošno

- So polimeri **aminokislin** (AK)
- Večinoma sestavljeni iz **20 L-AK**
ki se med seboj povezujejo s **peptidno vezjo**
- So najpogostejša makromolekula v celici ali delih celice
- Preko proteinov se **izraža genetska informacija**
- So zelo raznoliki (po velikosti, strukturi,...) zato lahko opravljajo številne različne vloge

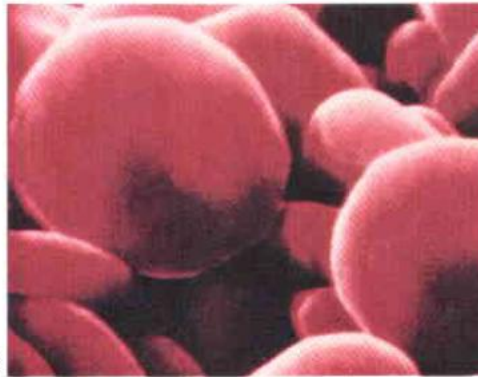


α -ogljik



(a)

• a) luciferin



(b)

• b) hemoglobin



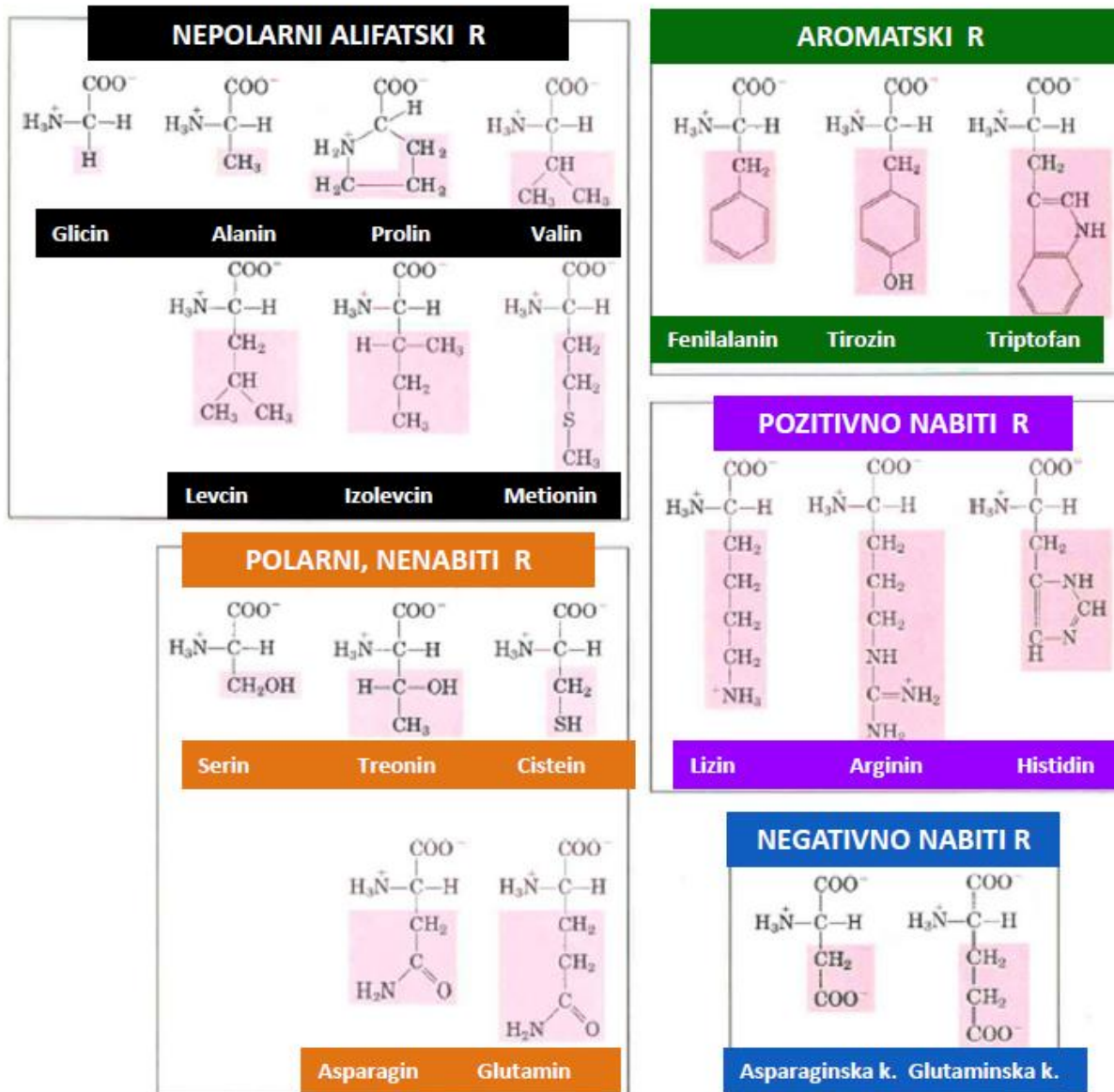
(c)

• c) keratin

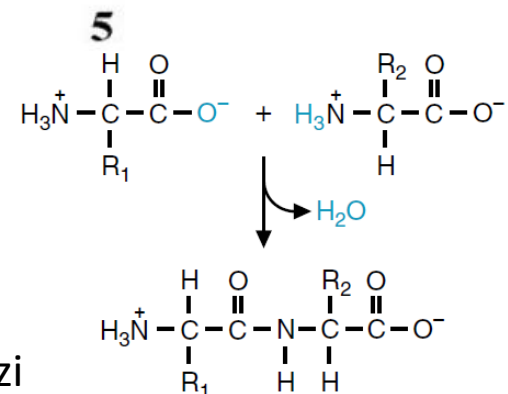
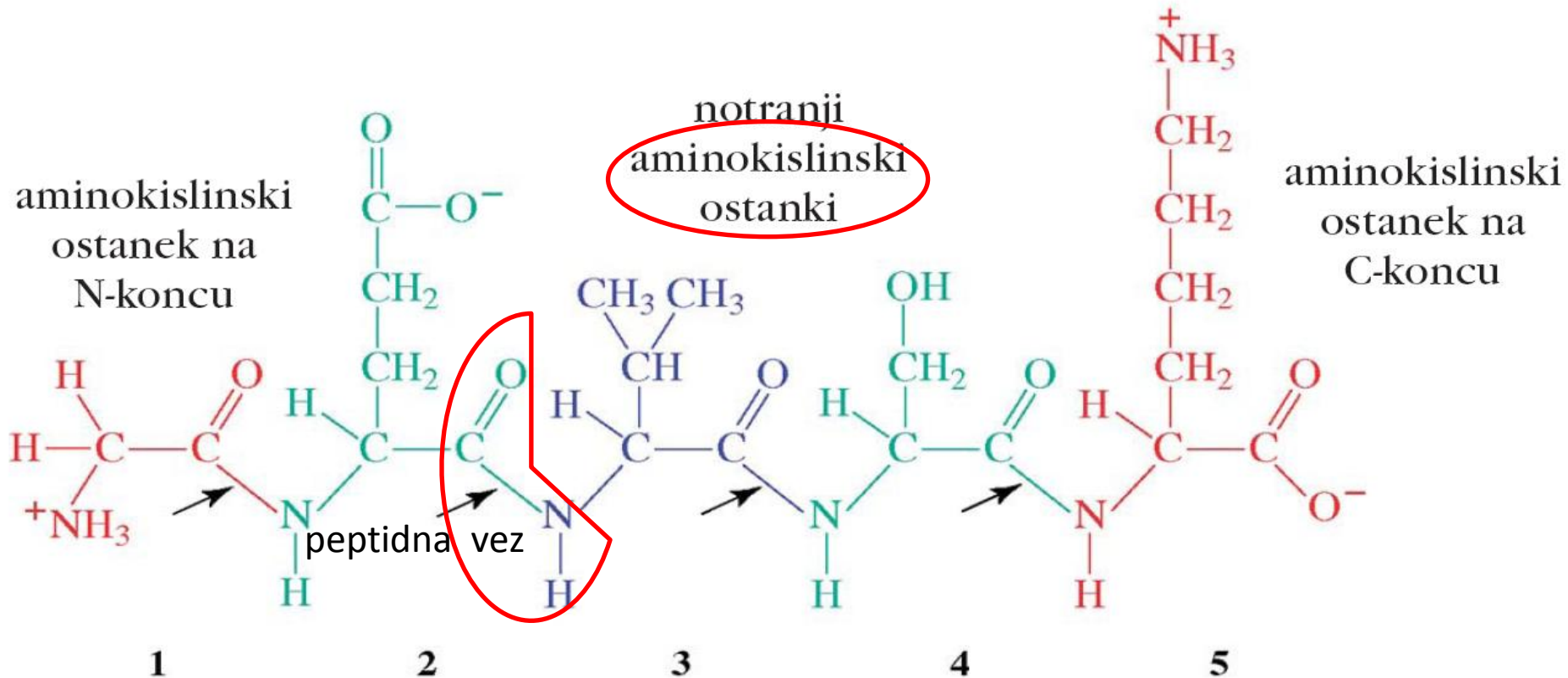
Lehninger:
Principles of
Biochemistry /
W. H. Freeman
and Company,
New York, 2008

- Vsi proteini, ki so kodirani v DNA določenega organizma – **proteom**
- Poznavanje vloge vseh proteinov kodiranih v genomu – **proteomika**

20 POGOSTIH AMINOKISLIN

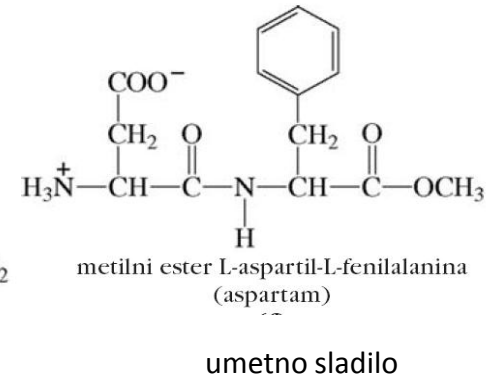
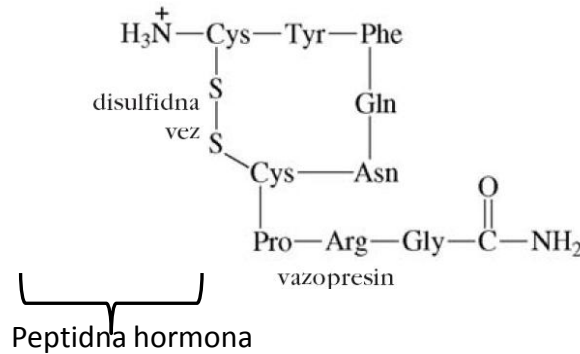
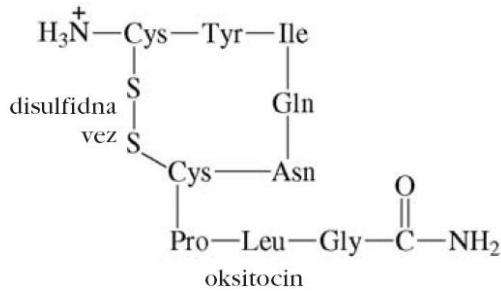


AK se med seboj povezujejo s peptidno vezjo




Peptidi in proteini

- **Peptidi** so krajše molekule, navadno od 2 do približno 100 AK.
- Tudi najmanjši peptidi imajo pomembno biološko vlogo:



- **Polipeptidi** so sestavljeni z 10 do 100 AK ($M_r < 10.000$ Da ali 10 kDa).
- **Proteini** so velike molekule, ki imajo od 100 do nekaj 1000 AK (večina ~ 2000 AK; $M_r > 10.000$ Da ali 10 kDa).
- Proteini so lahko sestavljeni iz **več polipeptidnih verig** (podenot).
- Glede na **kemijsko sestavo** so proteini lahko **enostavni** ali **sestavljani** (= **konjugirani** – vsebujejo neproteinske elemente, ki jih imenujemo **prostetične skupine**).
- Glede na **obliko molekule** ločimo **globulane** in **fibrilarne** proteine.

Latnosti peptidov in proteinov: molekulska masa

- Enota za molekulsko maso proteinov je **dalton** (Da), ki ustreza masi enega vodikovega atoma
 - Iz števila AK lahko določimo M_r proteina in obratno:
 - Povprečna M_r vseh 20 AK je 138
 - **Povprečna M_r AK v proteinih je 128**
 - Ob formaciji peptidne vezi se odcepi voda ($M_r \text{H}_2\text{O} = 18$)
- $128 - 18 = 110$ 

- M_r proteina = št. AK ostankov * 110 in
- Št. AK ostankov = M_r proteina / 110

Lastnosti proteinov: **kemijska sestava**

- Glede na **kemijsko sestavo** so proteini lahko
 - **enostavni** ali
 - **sestavljani** (= **konjugirani** – vsebujejo molekule, ki niso AK in jih imenujemo **prostetične skupine**).

Vrsta proteina	Prosteična skupina	Primer
Lipoproteini	Lipidi	β_1 -lipoprotein v krvi
Glikoproteini	Ogljikovi hidrati	Imunoglobulin G
Fosfoproteini	Fosfatna skupina	Kazein v mleku
Hemoproteini	Hem (železo in protoporfirin)	Hemoglobin
Flavoproteini	Flavinski nukleotidi	Sukcinatna dehidrogenaza
Metaloproteini	Železo Cink Kalcij	Feritin Alkoholna dehidrogenaza Kalmodulin

Lastnosti proteinov: **oblika** in **topnost**

- **Globularni proteini**

- Topni v H₂O
- Urejeni ter dinamični in fleksibilni
- Dinamična vloga

Vrsta proteina	Vloga
Hemoglobin	Transport kisika
Mioglobin	Skladiščenje kisika
Ribonukleaza	Hidroliza RNA
Lizocim	Hidroliza bakterijske stene
Citokrom c	Transport elektronov
Imunoglobulin	Obramba (protitelesa)
Aktin	Gibanje (mišični proteini)

- **Fibrilarni proteini**

- Netopni v H₂O
- Urejena in toga konformacija
- Velika natezna čvrstost

Vrsta proteina	Vloga
Kolagen	Strukturni protein
Keratin	Strukturni protein
Miozin	Gibanje (mišični protein)
Elastin	Prožnost

Primerjava nekaterih lastnosti proteinov

Protein	Molekulska masa (Da)	Št. AK ostankov	Št. polipeptidnih verig
Citokrom C (človeški)	12.400	104	1
Hemoglobin (človeški)	64.500	574	4
Serumski albumin (človeški)	66.000	609	1
Imunoglobulin G (človeški)	145.000	1320	4
Feritrin	450.000	4.100	24
RNA polimeraza (<i>E. coli</i>)	450.000	4.158	5
Apolipoprotein B (človeški)	513.000	4.536	1
Glutamin sintetaza (<i>E. coli</i>)	619.000	5.628	12
Titin (človeški)	2.993.000	26.926	1

Proteini se med seboj razlikujejo po aminokislinski sestavi

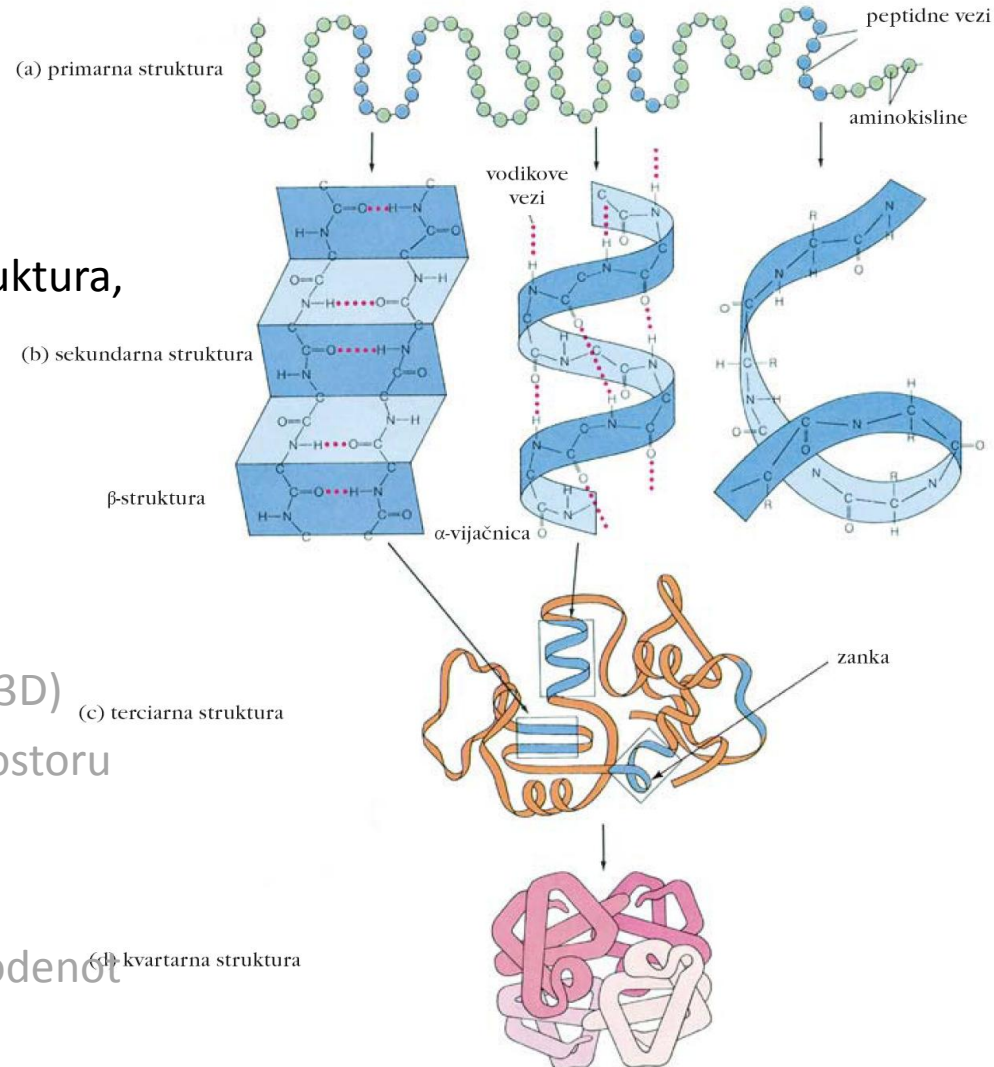
Aminokislina	Goveji citokrom c	Goveji kimotripsinogen
Ala	6	22
Arg	2	4
Asn	5	14
Asp	3	9
Cys	2	10
Gln	3	10
Glu	9	5
Gly	14	23
His	3	2
Ile	6	10
Leu	6	19
Lys	18	14
Met	2	2
Phe	4	6
Pro	4	9
Ser	1	28
Thr	8	23
Trp	1	8
Tyr	4	4
Val	3	23
Skupaj	104	245

Razvrstitev proteinov glede na njihove biološke vloge

- **Katalitska** (encimi)
- **Oporna** (strukturni proteini; npr. lasje, nohti, vezivno tkivo, perje,...)
- **Obrambna** (protitelesa, antibiotiki)
- **Prenašalna** (transportni proteini)
- **Skladiščna** (proteini v mleku, v jajčnem beljaku)
- **Signalna** (peptidni hormoni)
- **Gibalna** (krčenje mišic)
- **Druge vloge** (lučka pri kresnički)

Ravni proteinske strukture

- **Primarna** struktura – AK zaporedje
- **Sekundarna** struktura – α -vijačnica, β -struktura, β -zavoj
- **Terciarna** struktura – trodimenzionalna (3D) struktura predstavlja zvitje proteina v prostoru
- **Kvartarna** struktura – združevanje več podenot proteina



Primarna struktura proteinov

- Primarna struktura proteinov = **zaporedje AK ostankov v polipeptidu.**
- Določene AK in njihova zaporedja favorizirajo nastanek specifičnih sekundarnih struktur.
- Primarna struktura (značilna sestava in zaporedje AK ostankov) **določa tridimenzionalno strukturo.**



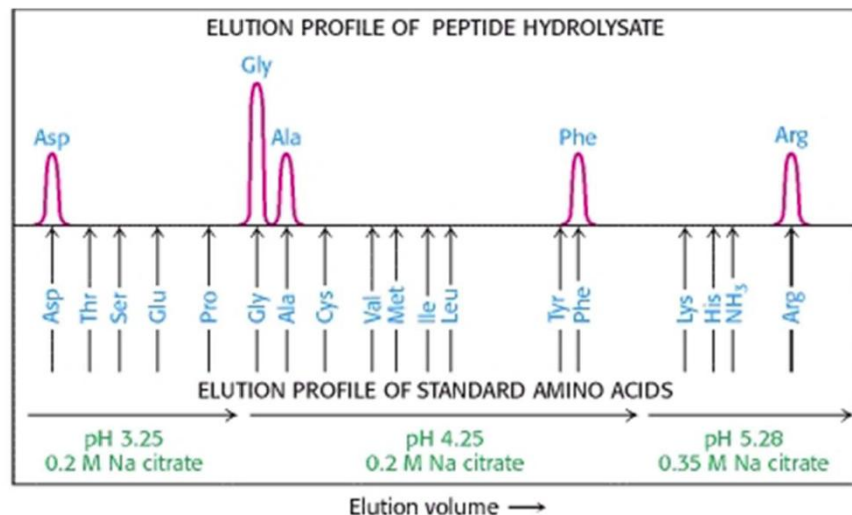
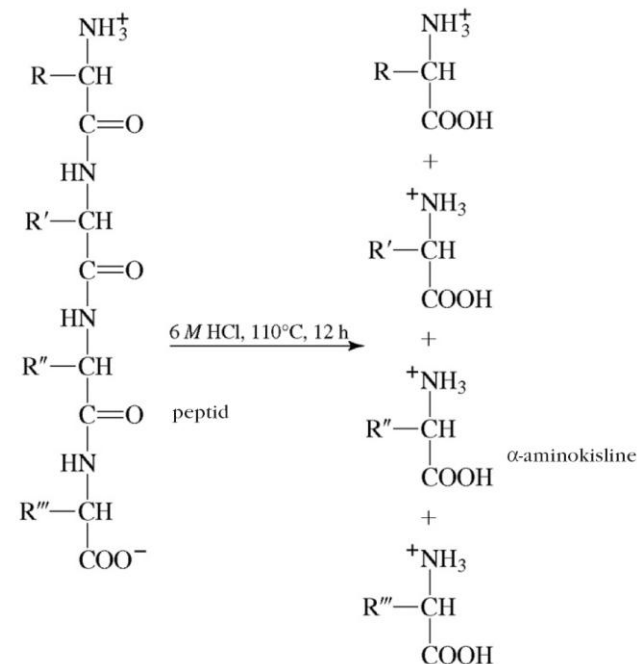
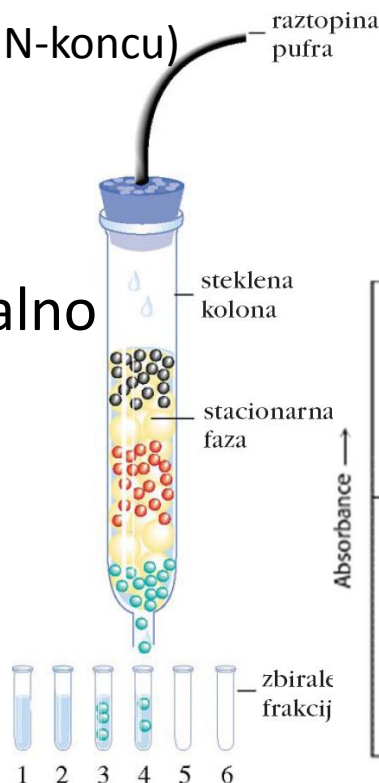
- Primarna struktura proteina določa njegovo funkcijo.

Primarna struktura proteinov

- Določanje **AK sestave**:

- 6 M HCl, 12h, 110 °C
- Barvanje z ninhidrinom
- 1-fluoro-2,4-dinitrobenzen (FDNB; določanje AK na N-koncu)

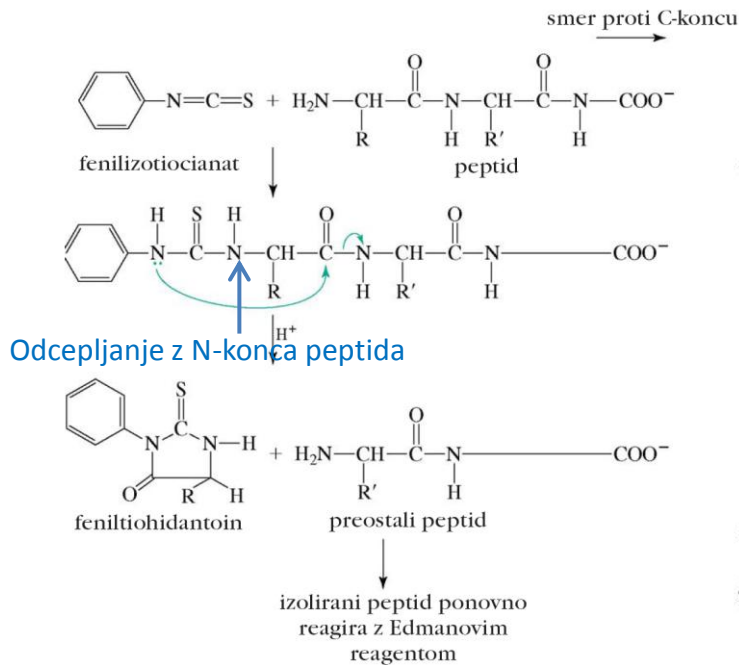
→ ločevanje AK
z ionsko izmenjevalno
kromatografijo
ali s HPLC



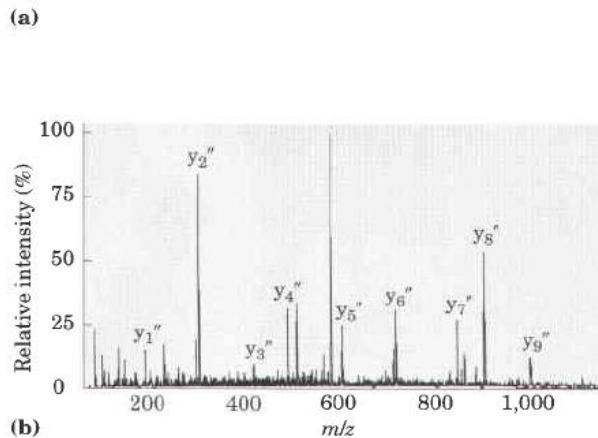
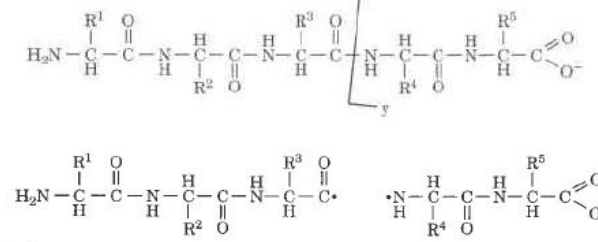
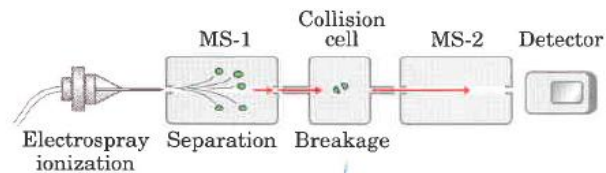
Primarna struktura proteinov

- Določanje **AK zaporedja**: **Direktni** (a, b) in **indirektni** (c) način določanja

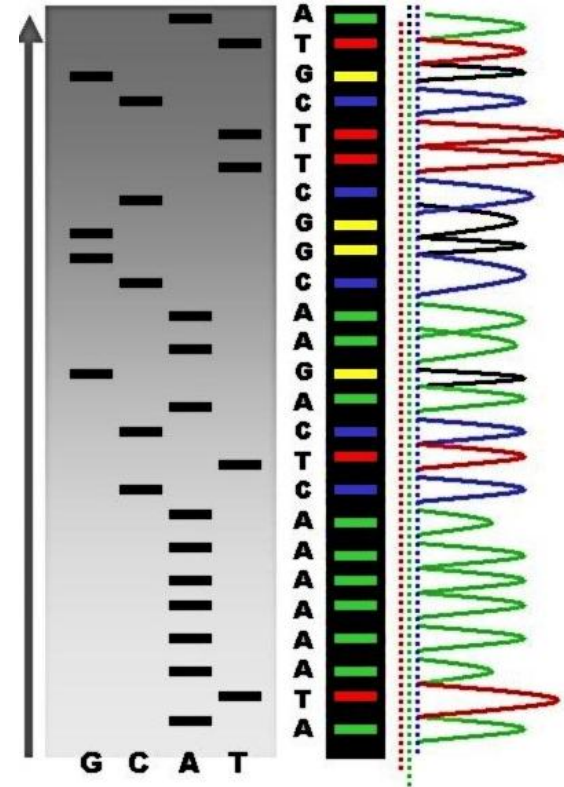
a) Edmanova degradacija



b) Masna spektrometrija



c) Sekvenciranje gena



Pomen poznavanja aminokislinskih zaporedij

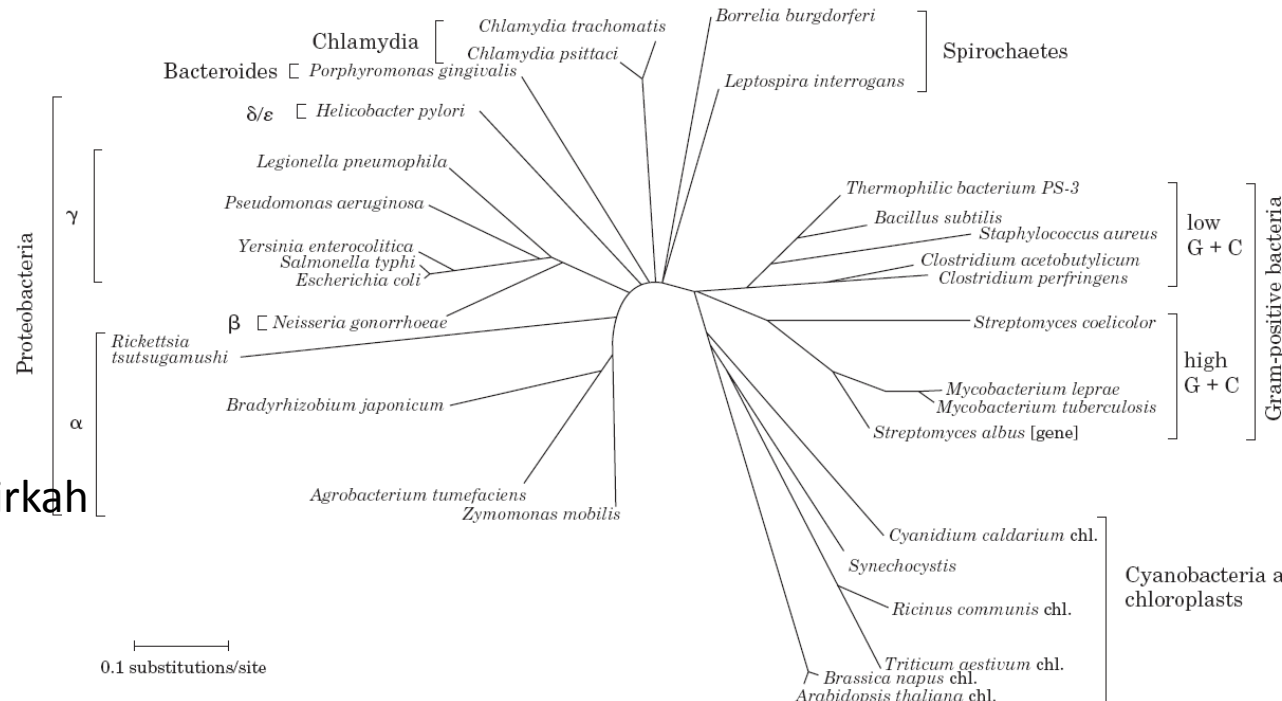
- Ugotavljanje razmerij med proteini in njihovo razvrščanje po podobnosti v
 - **družine** (vsaj 25% podobnost v zaporedju AK ostankov in/ali v strukturnih in funkcijskih lastnostih; npr. globinska družina) in
 - **naddružine** (dve ali več družin z malo podobnosti v AK zaporedju in/ali s podobnim strukturnim motivom in/ali funkcijskimi podobnostmi)
- Sledenje **molekularni evoluciji** in ugotavljanje sorodnosti dveh organizmov
- Proučevanje z vidika sprememb (zamenjav AK), ki vodijo do nepravilnega delovanja proteinov → **bolezni**

- **Sklepanje o morebitni trodimenzionalni strukturi** in s tem funkciji proteina

- Informacije o vseh znanih proteinih v podatkovnih zbirkah

www.rcsb.org/

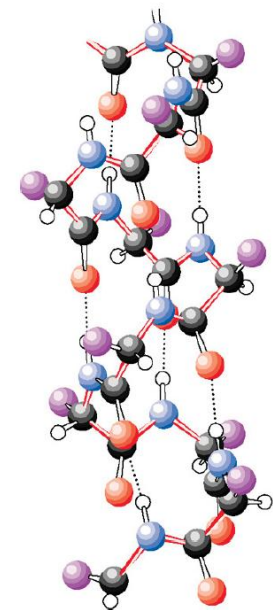
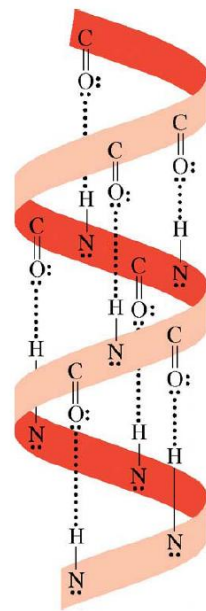
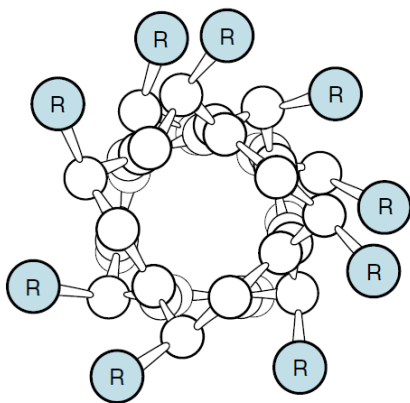
<http://web.expasy.org/>



Evolucijsko drevo bakterij na osnovi sekvence GroEL

Elementi (urejene) sekundarne strukture: desnosučna α -vijačnica

- Med N-H in C=O oddaljenima štiri AK ostanke v verigi se tvori maksimalno število vodikovih vezi, ki strukturo stabilizirajo
- Na vsak obrat vijačnice je 3,6 AK-ostankov
- Stranske verige štrlijo iz vijačnice
- Koti: ϕ med -120° in -60° ; $\psi = -60^\circ$



v enem obratu,
ki vključuje 3,6
aminokislinskih
enot, se vijačnica
dvigne za
0,54 nm

● ogljik
● kisik
● dušik
● stranska veriga
○ vodik

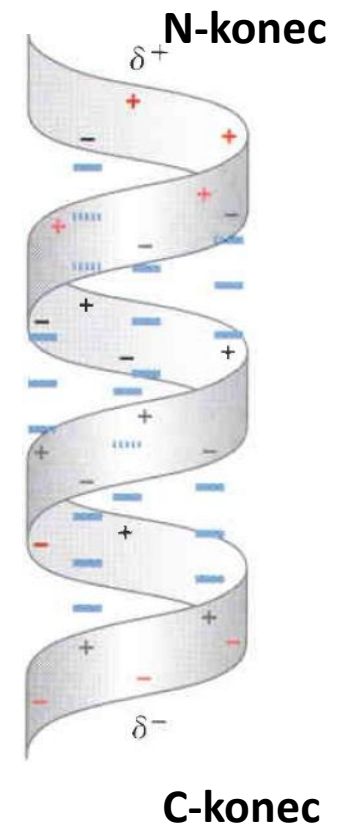
Pogled v smeri osi vijačnice

Pogled s strani vijačnice

Vodikove vezi v vijačnici

Dejavniki, ki vplivajo na **stabilnost α -vijačnice**

- **Nagnjenje AK ostanka k tvorbi α -vijačnice**
- **AK ostanki z nabojem/aromatski** pogosto 3-4 AK narazen \rightarrow vzpostavitev elektrostatskih ali hidrofobnih interakcij
- **Sterično oviranje** med **velikimi stranskimi skupinami** AK ostankov v polipeptidu
- **Pro** in **Gly** redko v α -vijačnici
- **Dipolni moment** na koncih α -vijačnice:
 - N-konec več negativno nabitih AK ostankov
 - C-konec več pozitivno nabitih AK ostankov



Elementi (urejene) sekundarne strukture: β -struktura

- Je lahko

a) **paralelna** (koti $\phi = -119^\circ$ in $\psi = 113^\circ$)

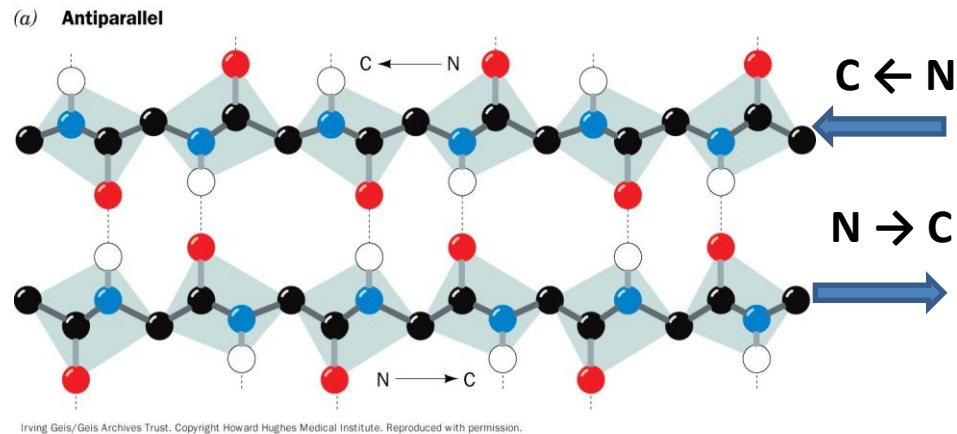
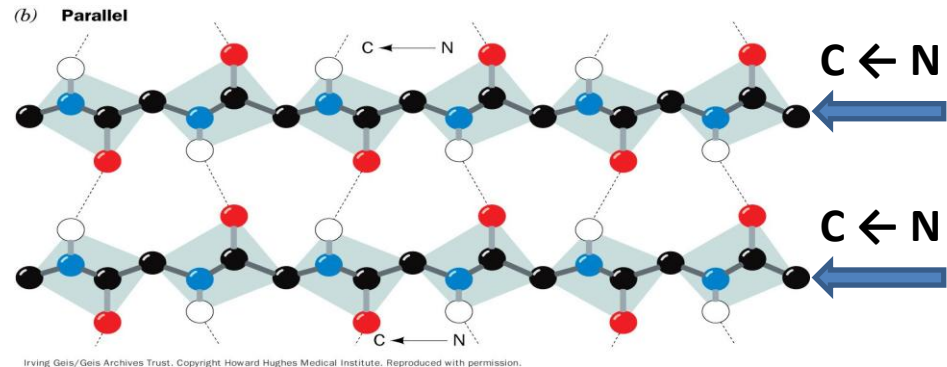
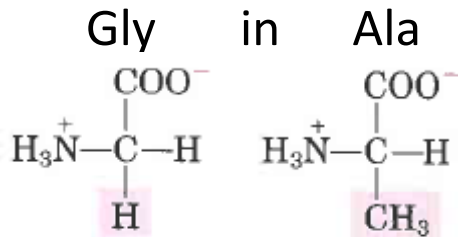
ali

b) **antiparalelna** (koti $\phi = -139^\circ$ in $\psi = 135^\circ$)

-**Stabilizirana je s H-vezmi**

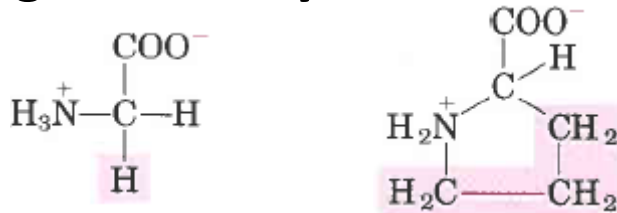
- Stranske skupine izmenično štrlijo nad oz. pod strukturo

-V β -strukturi keratinov sta pogosti AK

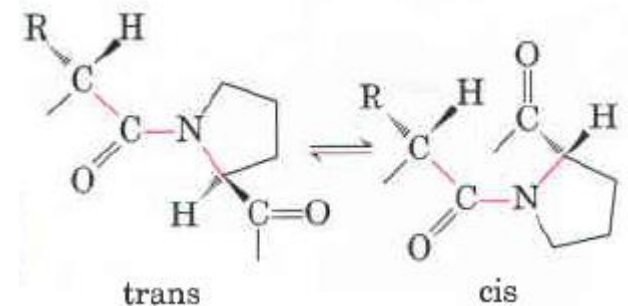
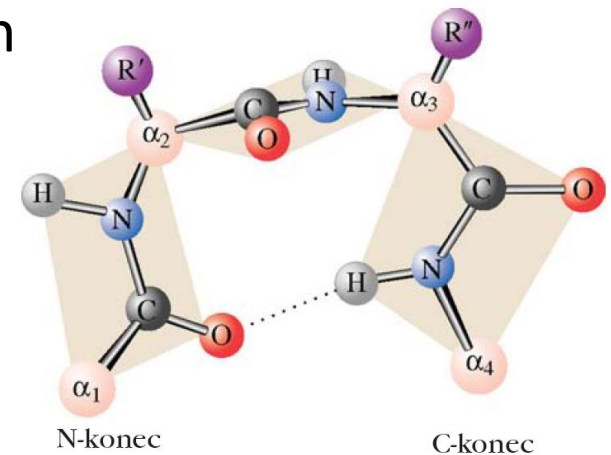


Elementi (neurejene) sekundarne strukture: **β -zavoj**

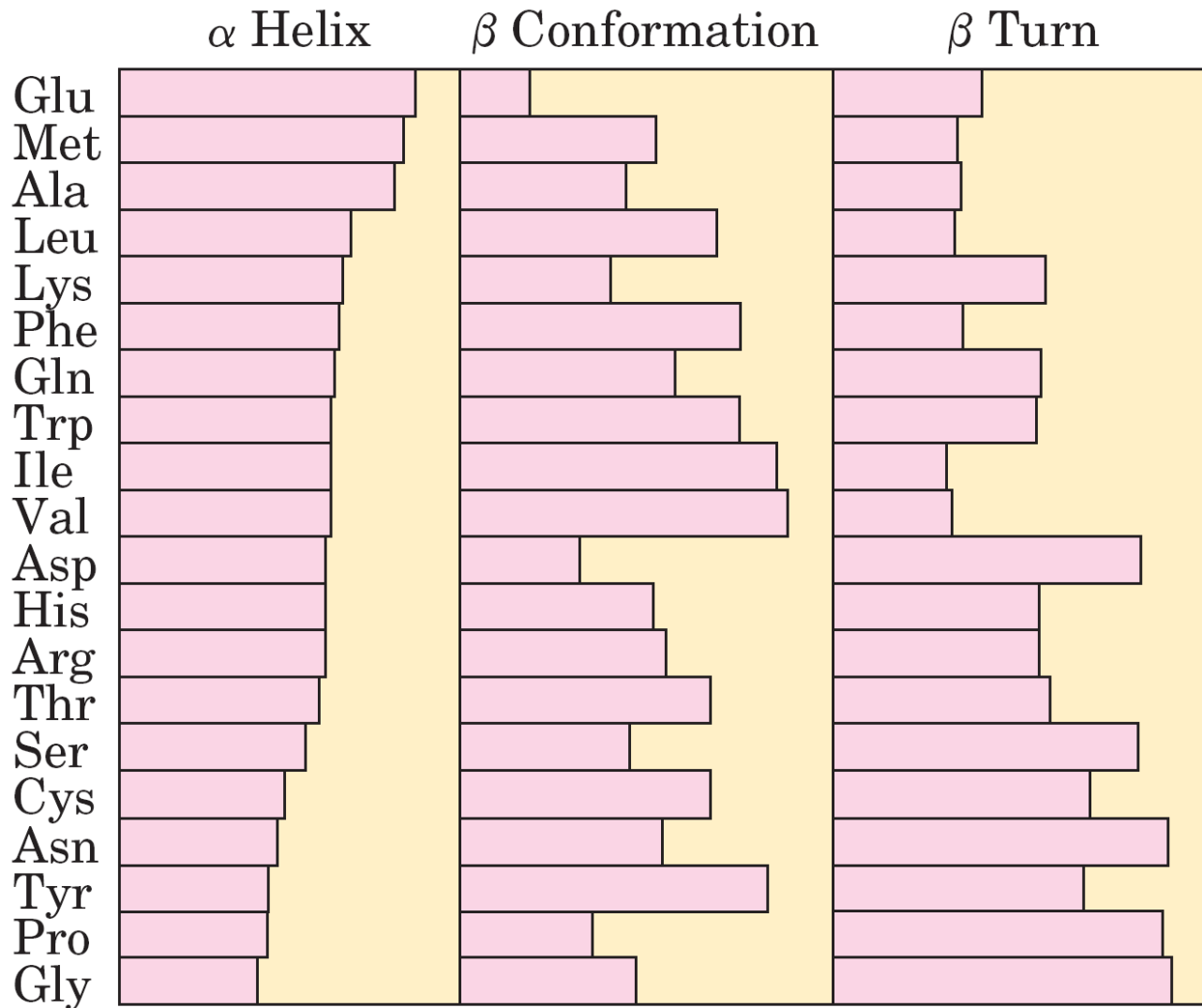
- Spremenijo smer polipetidni verigi
- Povezujejo predele urejenih sekundarnih struktur (α -vijačnice in β -strukture)
- Sestavljajo ga 4 AK; med **1. in 4. AK** ostankom je **vodikova vez**
- Pogosti AK **Gly** in **Pro**



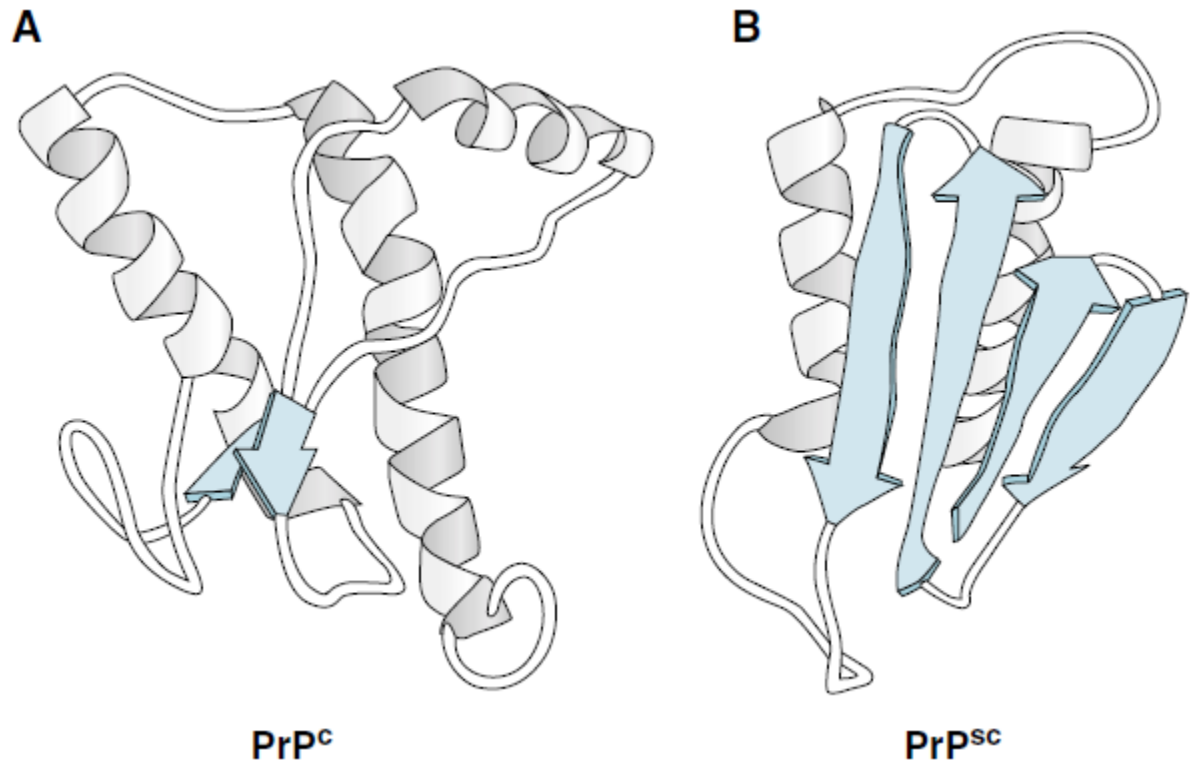
- ~ 6 % peptidnih vezi s Pro je v **cis konfiguraciji**
(najpogosteje v β -zavoju)



Relativna verjetnost za pojavljanje določenega AK ostanka v katerem izmed treh elementov sekundarne strukture



Sekundarne strukture v proteinu



- Zastopanost elementov sekundarne strukture v prionih je povezana z nastankom bolezni.

Povzetek

- Proteine razdelimo po strukturi na:
 - Globularni in fibrilarni
- Proteine razdelimo po kemijski sestavi na:
 - Enostavni in sestavljeni
- Funkcije proteinov: katalitska, transportna, gibalna, oporna, obrambna, skladiščna, signalna
- Ravni proteinske strukture:
 - primarna:
 - določa 3D strukturo proteina
 - ugotavljanje evolucijske podonosti organizmov
 - razvrščanje proteinov v družine in naddružine
 - povezovanje boleznimi
 - sekundarna:
 - elementi: α -vijačnica, β -struktura, β -zavoj
 - določene AK imajo preferenco za določen element
 - določimo jo lahko z definiranjem kotov ϕ in ψ

Ravni strukture proteinov

- Primarna struktura: zaporedje aminokislinskih (ak) ostankov v polipeptidni verigi
- Sekundarna struktura – nanaša se na lokalno konformacijo (bližnji ak ostanki) nekaterih delov polipeptida; primeri:
 - α -desnosučna vijačnica
 - β -struktura (paralelna, antiparalelna, mešana)
 - β -zavoj
- Terciarna struktura – trodimenzionalna (3D) struktura polipeptidne verige v prostoru
- Kvartarna struktura – 3D struktura več polipeptidnih verig (podenot), ki sestavljajo molekulo proteina (oligomerni proteini)

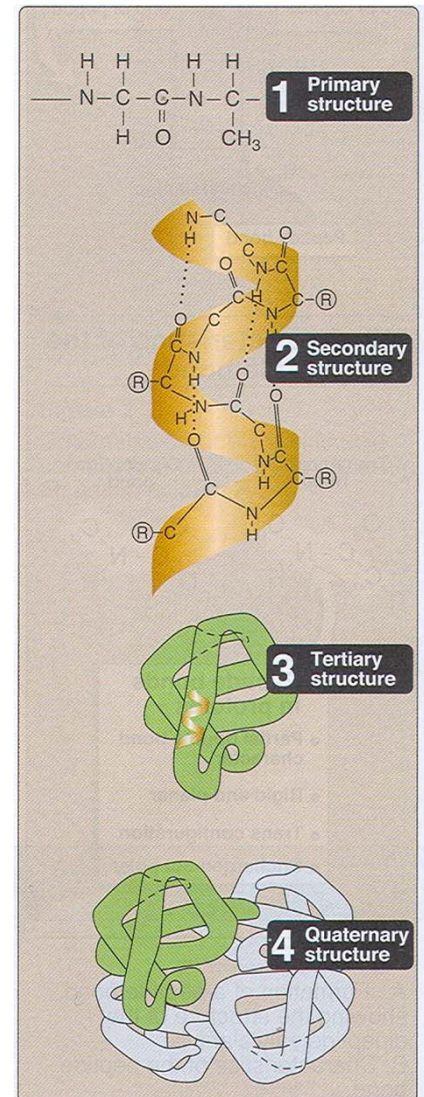
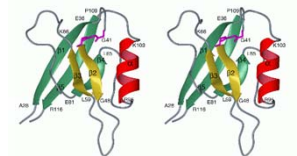


Figure 2.1
Four hierarchies of protein structure.

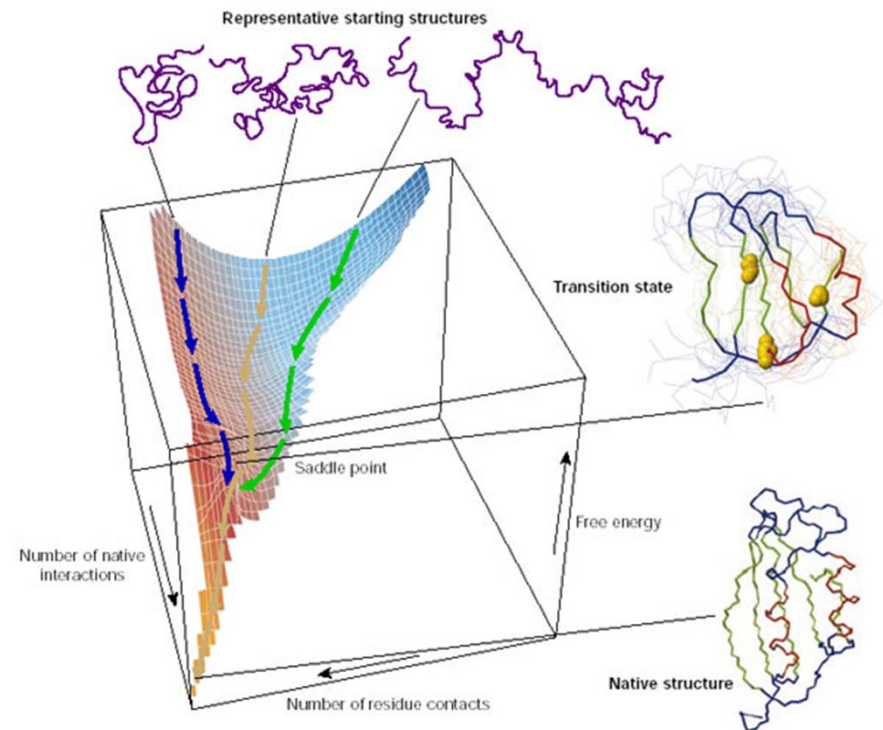
Terciarna (tridimenzionalna; 3D) struktura proteinov

- Protein zavzame določeno konformacijo - razporeditev vseh atomov v prostoru. Prehod iz ene konformacije v drugo poteka BREZ prekinitve kovalentnih vezi (rotacije okoli vezi, itd.)
- 3D struktura je določena z ak zaporedjem polipeptida
- Izolirani protein običajno obstaja v eni ali le nekaj stabilnih oblikah (nativna konformacija, ki odraža funkcijo proteina; je na najnižjem energijskem nivoju, G min.)
- Za stabilizacijo strukture so najpomembnejše šibke interakcije in v nekaterih primerih kovalentne disulfidne vezi (-S-S- mostički, npr inzulin)
- Le nekaj različnih osnovnih strukturnih vzorcev najdemo v tisočih naravnih proteinih
- Funkcija proteina je odvisna od njegove strukture

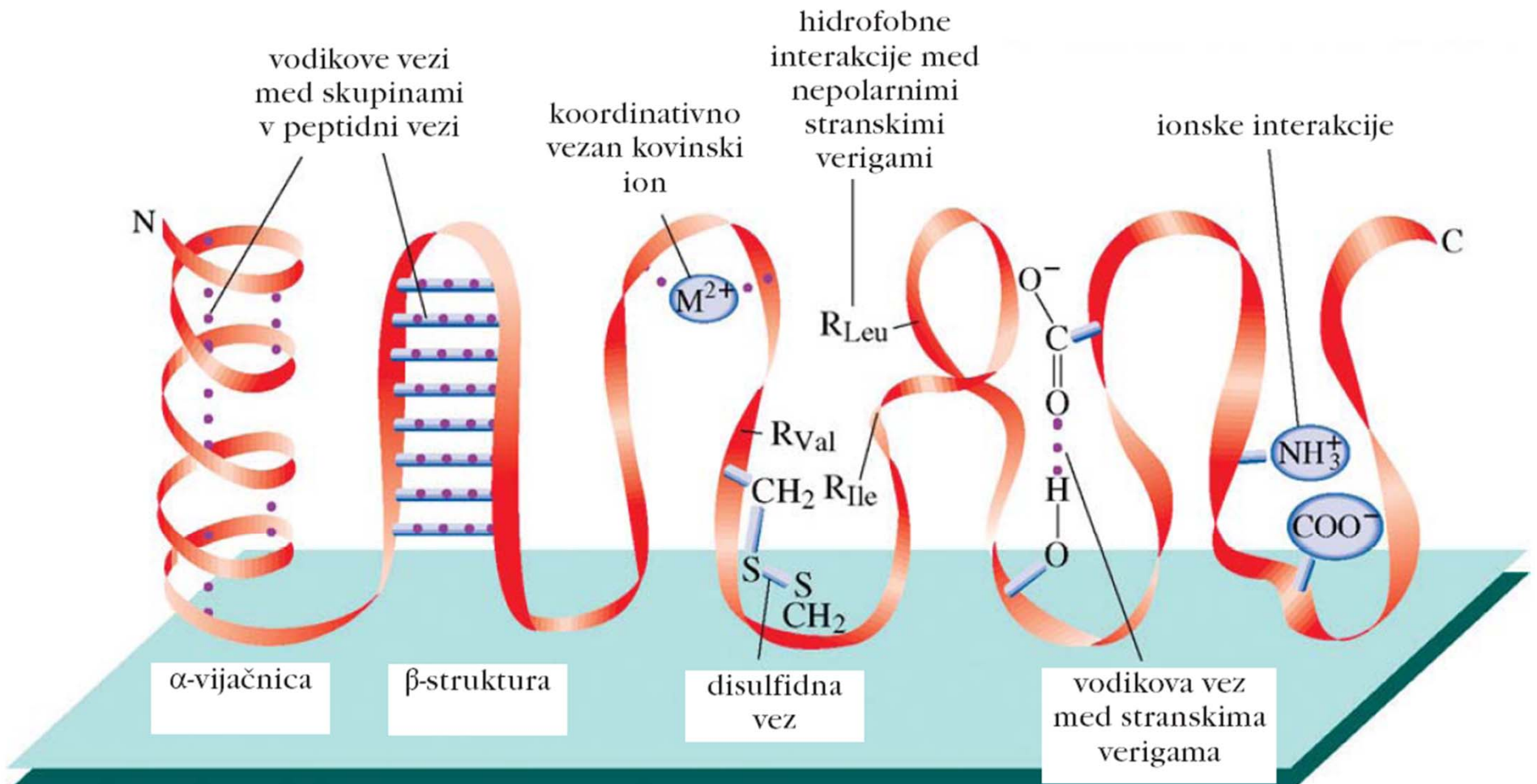


Stabilnost proteina definiramo kot težnjo po vzdrževanju nativne 3D konformacije

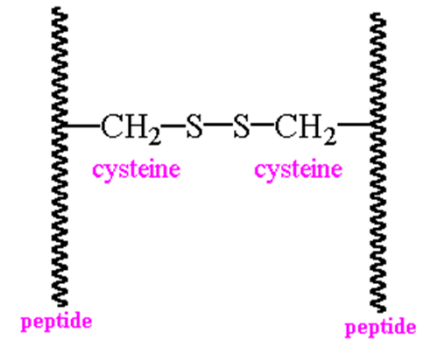
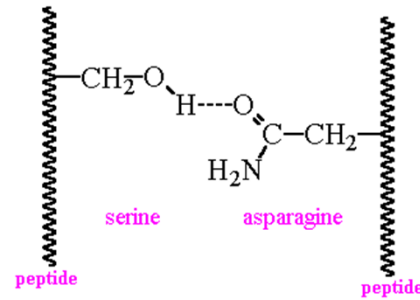
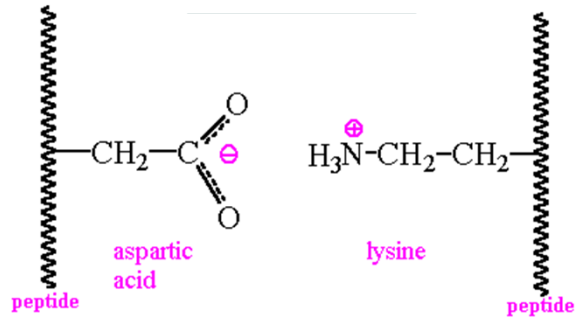
- Proteini so v nativni konformaciji delno stabilni, ΔG za prehod iz zvitega v nezvito stanje je le 20 – 65 kJ/mol.
- Nezvit protein ima veliko konformacijsko entropijo (lahko zavzame veliko število različnih konformacij). Ta entropija, skupaj s vodikovimi vezmi nekaterih aminokislinskih radikalov z vodo, vzdržuje nezvito stanje.
- Kemijske interakcije, ki delujejo “proti” nezvitemu stanju in stabilizirajo nativno, pravilno zvito konformacijo, so disulfidne vezi in šibke interakcije (vodikove vezi, hidrofobne in elektrostatske interakcije). Največ prispevajo hidrofobne interakcije.



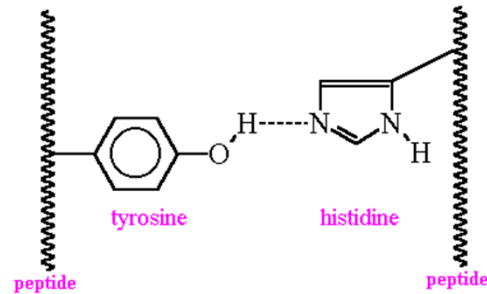
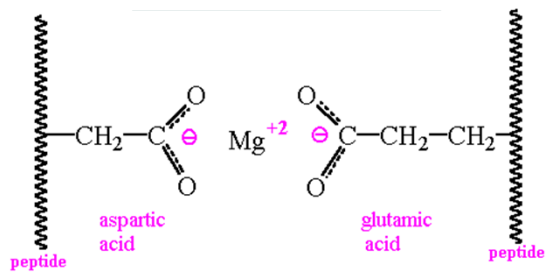
Nativna konformacija hipotetičnega proteina, kjer je prikazan pomen nekovalentnih interakcij v 3D strukturi proteina



Interakcije, ki vzdržujejo konformacijo proteinov



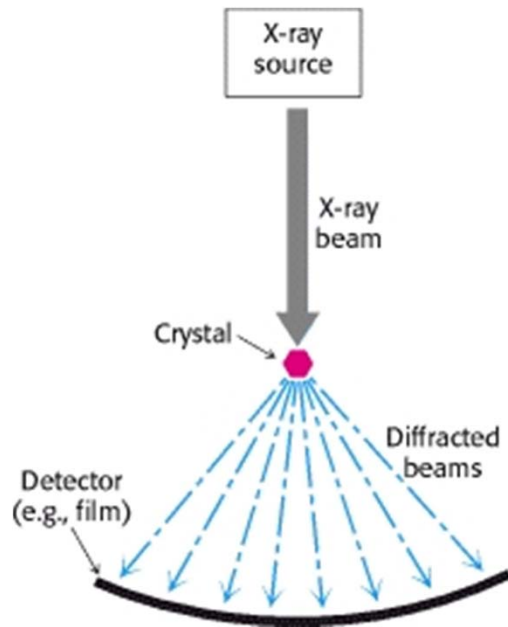
Disulfidni mostiček



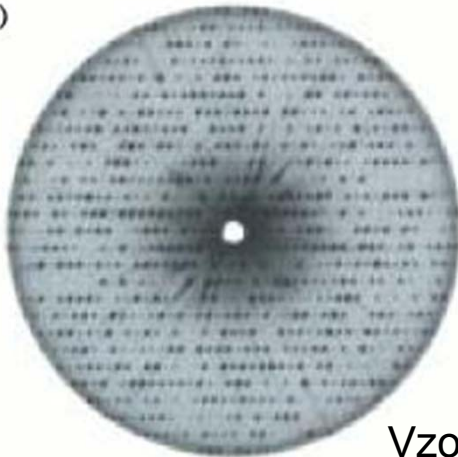
Vodikove vezi

Elektrostatske interakcije

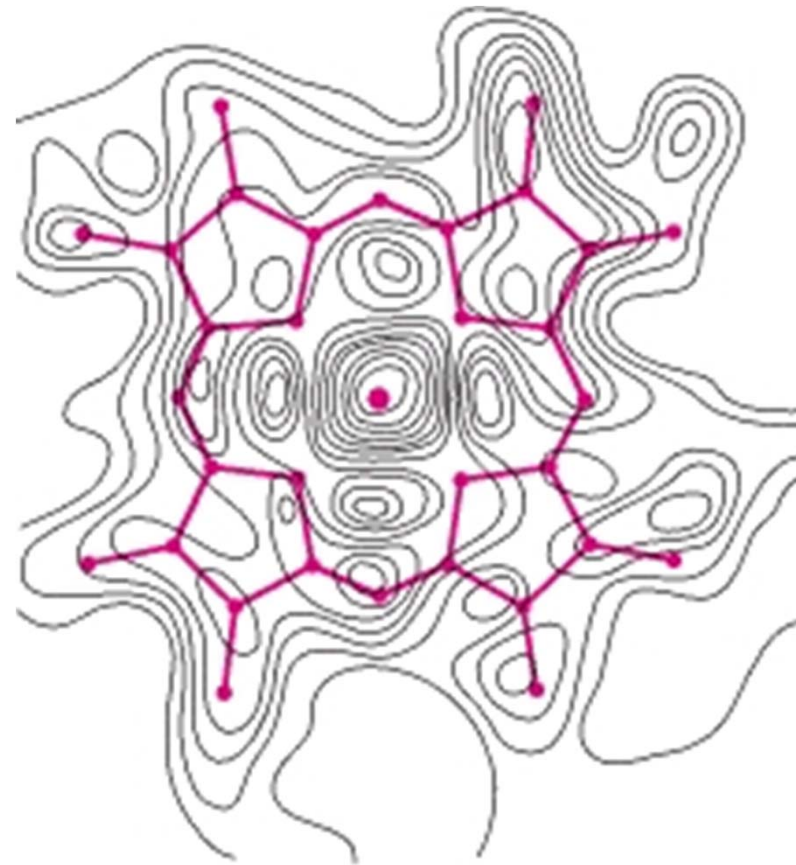
Določanje tridimenzionalne strukture proteinov z X-žarkovno kristalografijo



(B)



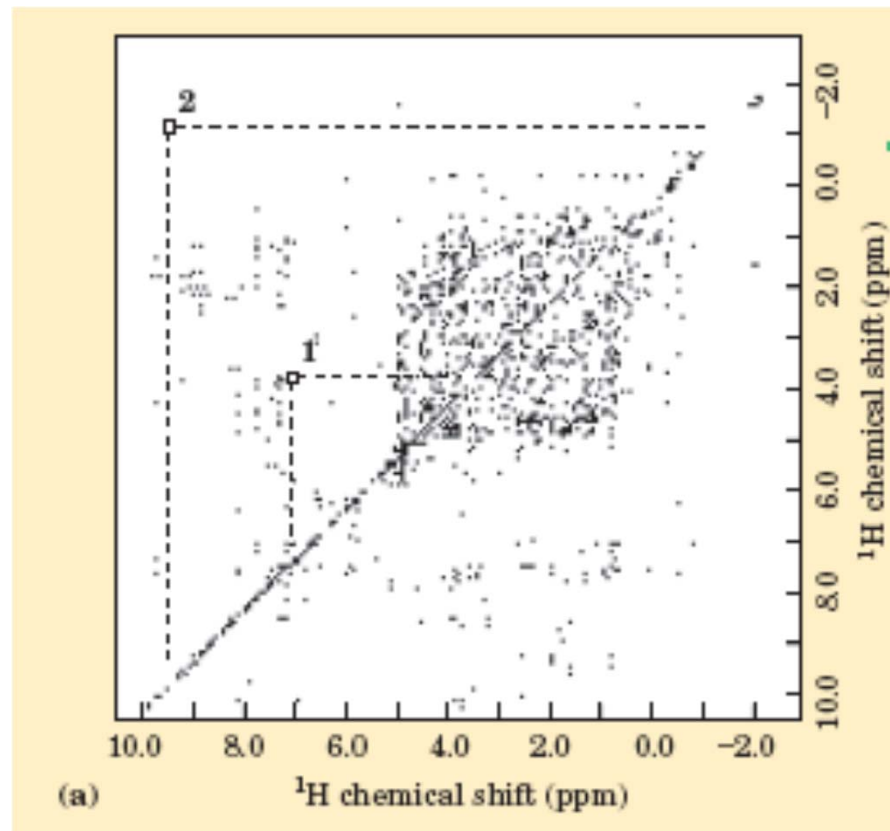
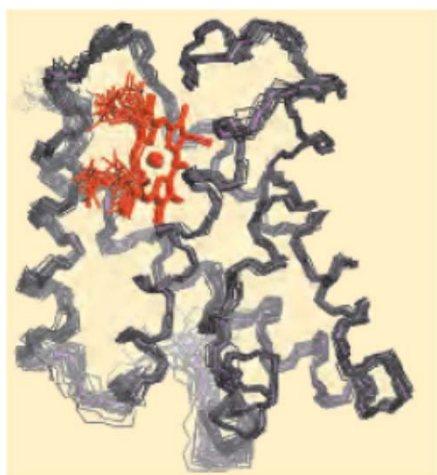
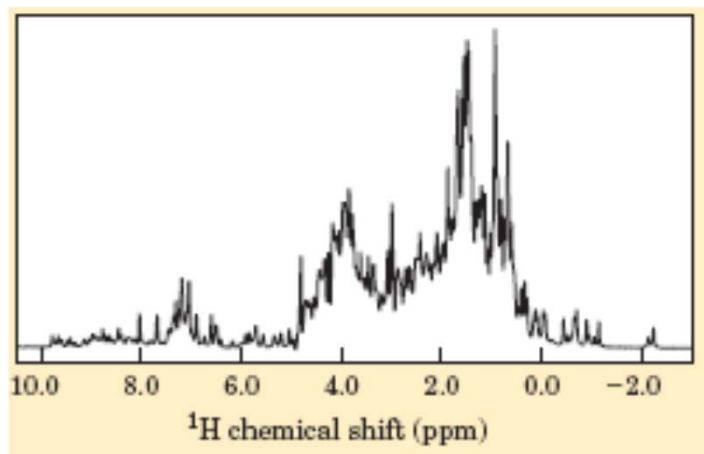
Vzorec difrakcije na filmu



Prikaz elektronske gostote dela mioglobina

Določanje tridimenzionalne strukture proteinov z NMR

Jedrska magnetna resonanca (NMR), protein v raztopini → metoda omogoča identifikacijo različnih konformacij proteina (merjenje jedrnega spinskega kotnega momenta – kvantnomehanska funkcija, ki jo vsebujejo nekatera jedra: ^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{19}F , ^{31}P)



JEDRSKA MAGNETNA REZONANCA (NMR)

NMR uporablja lastnost atomskih jeder, da imajo magnetni moment, zaradi česar se v magnetnem polju obnašajo podobno kot magnetna igla.

Magnetna igla se v zemeljskem magnetnem polju obrne vedno proti severu, jedrski magnetni moment s spinom $1/2$ (^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{31}P , ^{19}F ...) pa se v močnem magnetnem polju lahko postavijo samo v smeri magnetnega polja ali pa v nasprotni smeri. Ti dve stanji imata različno energijo.

"Od zunaj" lahko povzročimo prehajanje jeder iz enega stanja v drugo z uporabo šibkega radiofrekvenčnega magnetnega polja (10 MHz - 300 MHz). Kvanti energije, ki jih radiofrekvenčno polje dovaja vzorcu, morajo biti točno enaki energijski razliki med obema jedrskima stanjema. Kadar je ta pogoj izpolnjen - pravimo, da smo v resonanci - jedra absorbirajo energijo radiofrekvenčnega polja, kar zaznamo kot signal (kemijski premik).

Pojav sta leta 1946 neodvisno odkrila Felix Bloch in Edward Mill Purcell in za njegovo okritje leta 1952 skupaj prejela Nobelovo nagrado za fiziko.

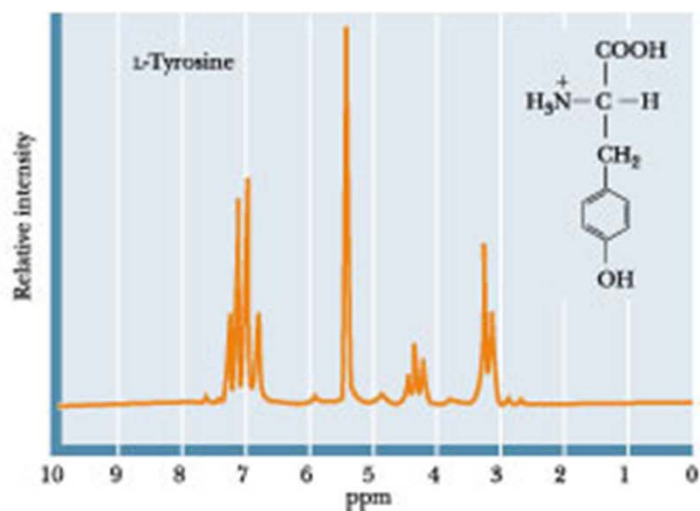
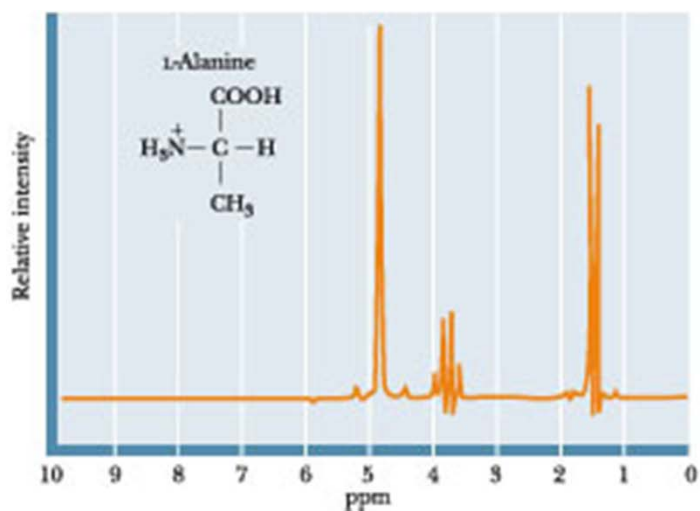


Kako deluje jedrska magnetna resonanca?

Resonančna frekvenca je za vsako vrsto jeder drugačna (npr. za ^1H je 90 MHz, za ^{13}C pa 22.5 MHz).

Resonančne frekvence enakih jeder, ki čutijo različna lokalna magnetna polja, so različne.

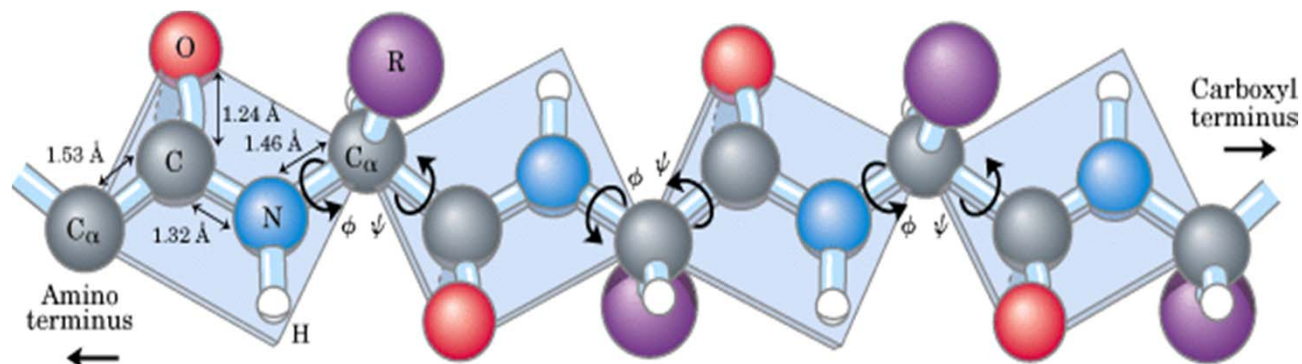
Prav zato se jedrska magnetna resonanca uspešno uporablja v področjih kemije, biologije in farmakologije, kot nedestruktivna metoda pri rutinskih analizah in za študij strukture in dinamike molekul.



Protonski NMR spekter aminokislin. (Povzeto po Aldrich knjižnici NMR spektrov.)

Zvijanje polipeptidne verige je omejeno z naslednjimi zahtevami:

- dolžine vezi med atomi in koti med vezmi naj bodo čim manj deformirani
- atomi se ne morejo približati bolj, kot je vsota njihovih van der Waals-ovih radijev
- zvitje proteinov je stabilizirano s šibkimi interakcijami (vodikove, hidrofobne, van der Waalsove, ionske interakcije)
- zaradi omejitev, ki jo predstavlja toga peptidna vez (ni možna rotacija okrog CO-NH vezi!!!), je dovoljena samo rotacija okrog enojnih vezi N-C_α in C_α-CO



Konformacijo peptida definirajo trije torzijski koti: Φ , Ψ , ω , kjer vsak kot definira rotacijo okoli ene od treh ponavljajočih vezi.

Torzijski kot (*dihedral angle*) je kot na stiku dveh ravnin. V primeru peptidov so ravnine definirane z dvema zaporednima vektorjema vezi. Trije vektorji vezi lahko definirajo dve ravnini, kjer je centralni vektor skupen obema ravninama.

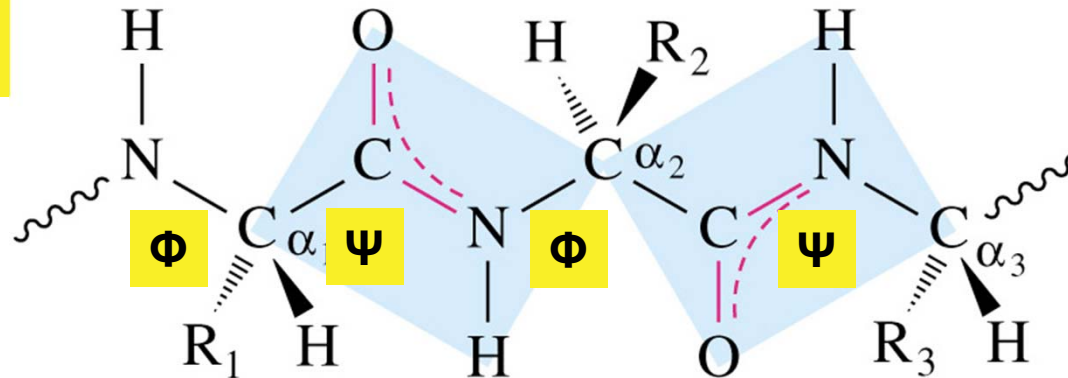
**Peptidna vez ima delni značaj dvojne vezi.
V polipeptidni verigi rotacija okoli peptidne vezi ni možna.**

Možne so le nekatere rotacije okoli Φ in Ψ .



Ravnotežje med resonančnimi oblikami

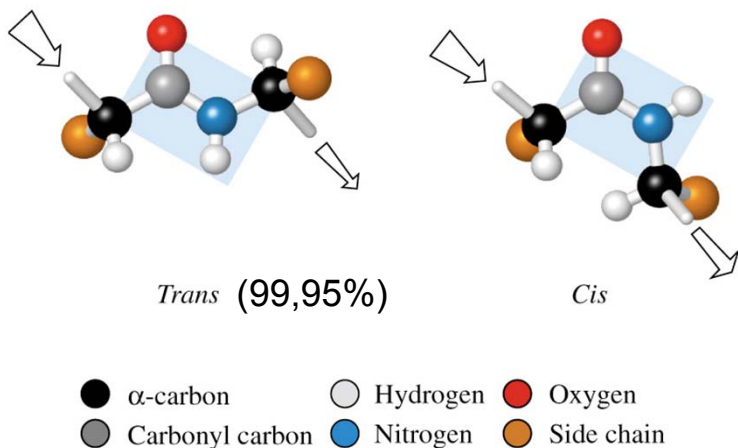
Φ : (C) - N - C α - C
 Ψ : (N) - C α - C - N



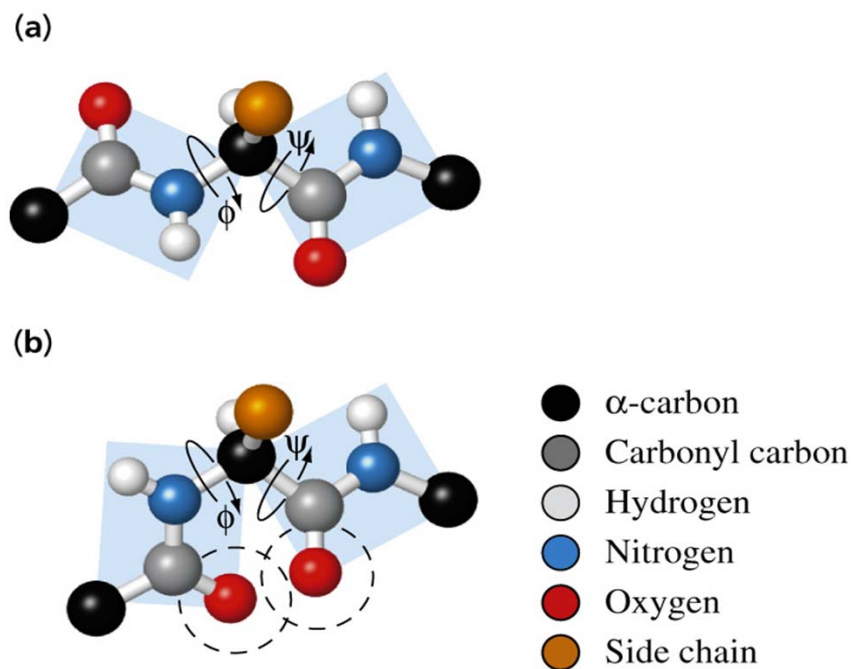
Del polipeptidne verige s poudarjenimi ravninami (modro), v katerih ležijo atomi peptidnih vezi

Prostorska orientacija atomov peptidne vezi in relativna orientacija ravnin, v katerih ležijo peptidne vezi

Cis-trans izomerija peptidne vezi



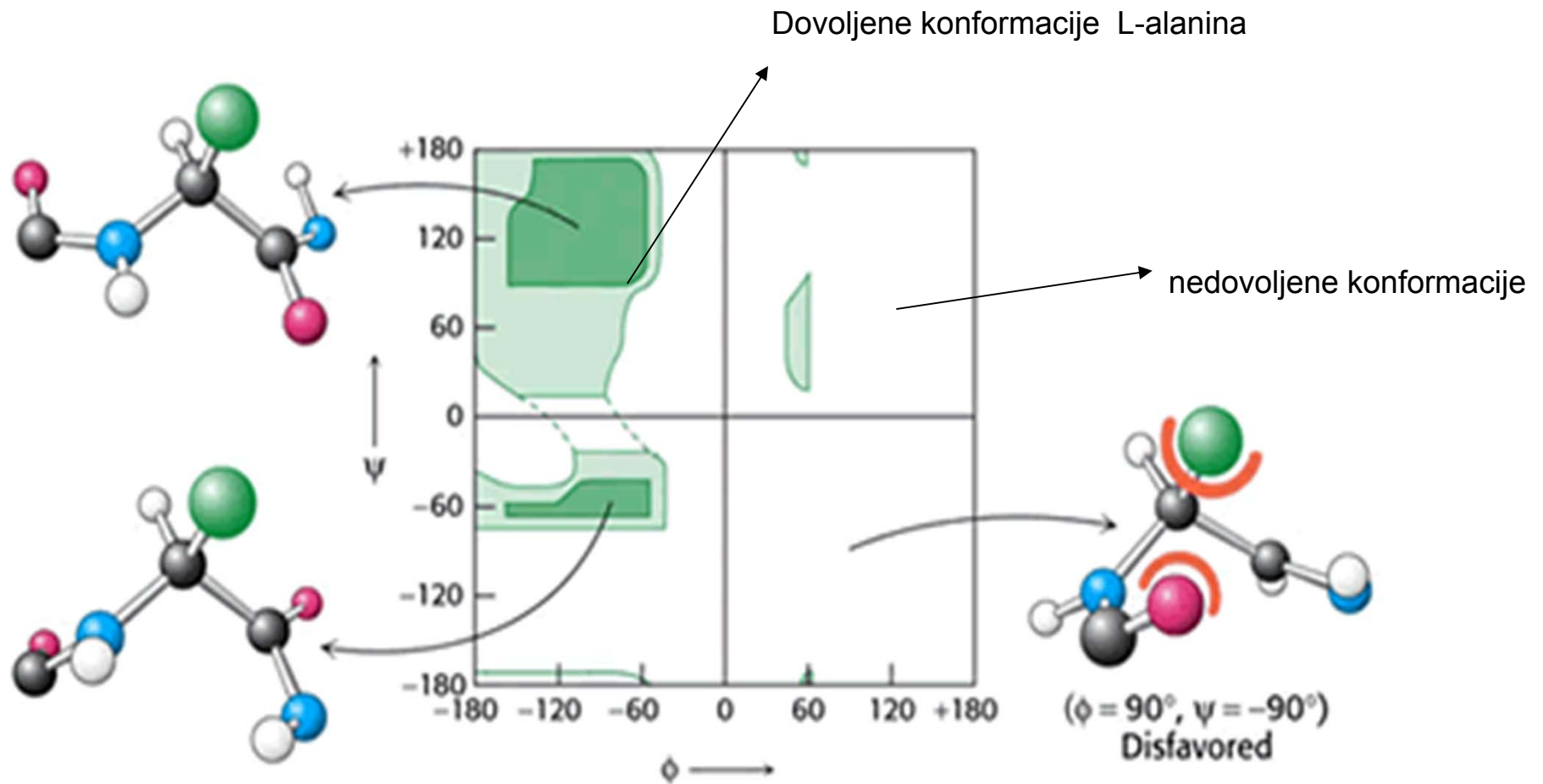
Rotacija okrog enojnih vezi



(a) Možne rotacije kotov Φ in Ψ za $+180^\circ$ in -180°

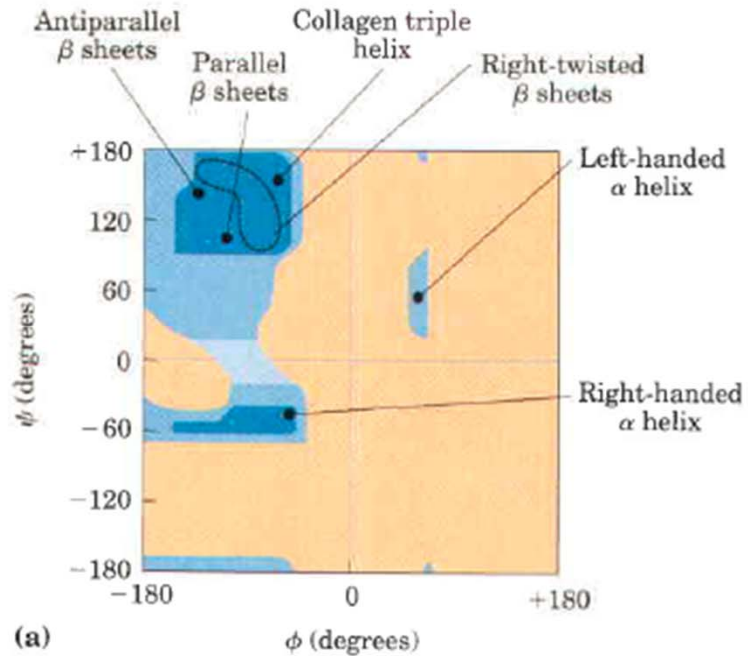
(b) "prepovedana" vrednost kotov Φ in Ψ zaradi prostorskih (steričnih) ovir

Ramachandranov diagram – soodvisnost vrednosti kotov Φ in Ψ

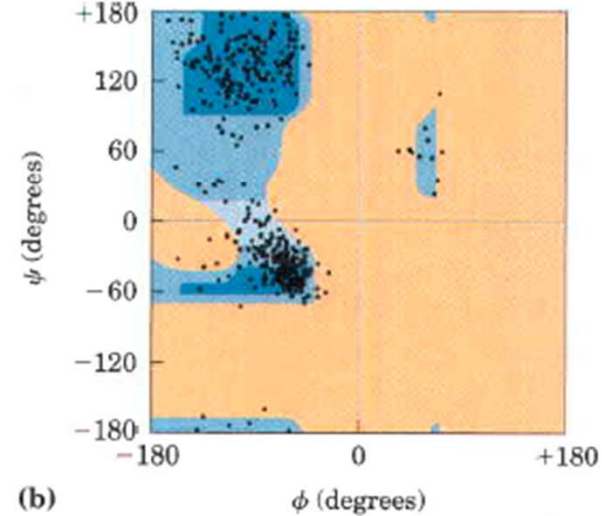


Ramachandranov diagram dovoljenih sekundarnih struktur

Encim piruvat kinaza



Teoretično dovoljene konformacije



Realno stanje – vsaka točka predstavlja aminokislino. Zajete so vse aminokislino, razen glicina.

Terciarna struktura - zvitje proteinov je osnova za strukturno klasifikacijo globularnih proteinov

- Do danes znanih ~1000 različnih zvitij. Terciarna struktura je bolj ohranjena kot primarna struktura (znana 3D struktura več kot 10 000 proteinov)
- Primerjava terciarne strukture proteinov → podatki o evolucijski oddaljenosti organizmov
- Strukturni motivi (zvitja – supersekundarna struktura) v različnih proteinih opravljajo podobno funkcijo, npr. vezava ligandov, vezava drugih proteinov...

Primeri zvitja proteinov – supersekundarna struktura:



β - α - β zanka

α - α kot



povezava β
struktur



križna povezava
 β struktur



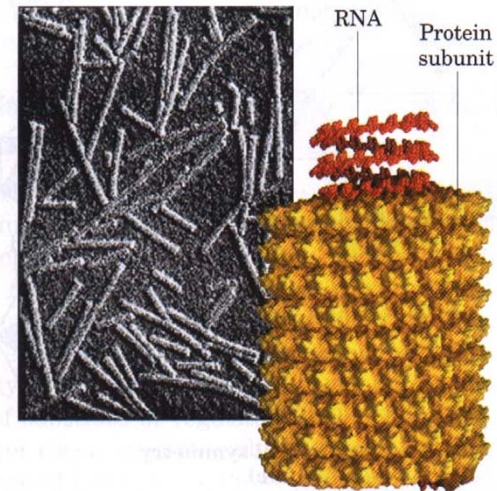
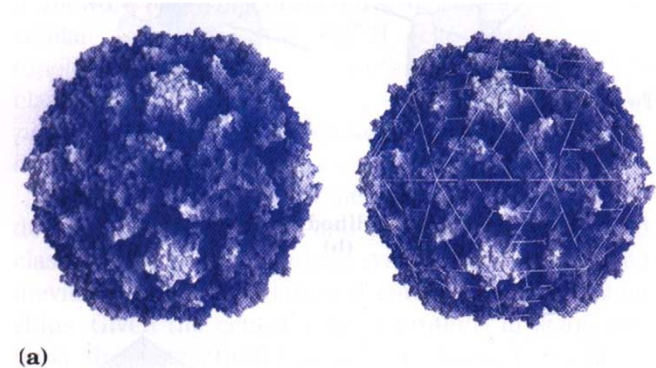
β -sodček

Kvartarna struktura

Oligomerni proteini (več polipeptidnih verig – podenot/protomerov, povezanih s šibkimi interakcijami)

- dimer - 2 podenoti
- oligomer 4-8 podenot (npr. tetramer)
- multimer večje št. podenot
 - različne podenote, asimetrična struktura
 - enake podenote ali skupki podenot, simetrična struktura;

Poliovirus -rotacijska simetrija

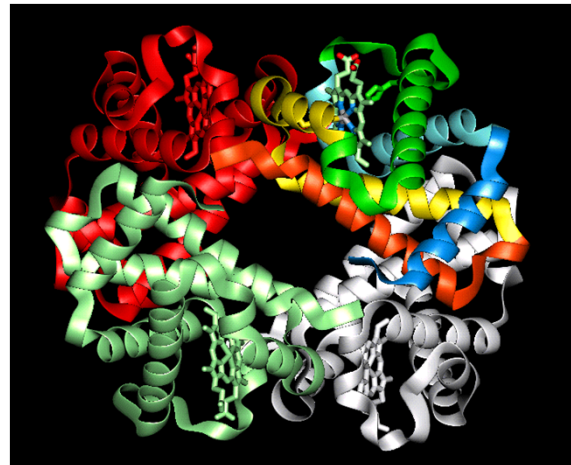


Virus tobačnega mozaika -
vijačna simetrija: podenote
se dodajajo na način vijačnice

Vloga kvartarne strukture

- Regulatorna vloga: vezava liganda sproži interakcije med podenotami → velika sprememba v aktivnosti proteina kot odraz na majhne spremembe konc. regulatornih molekul. (Primer: hemoglobin)
- Strukturna vloga: asociacija fibrilarnih proteinov v višjo strukturo. (Primer: kolagen)
- Kataliza večstopenjskih reakcij. (Primer: ribosom)

hemoglobin



POVZETEK

