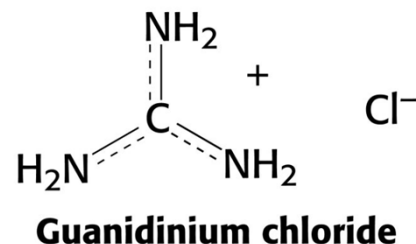
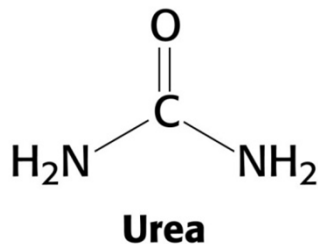


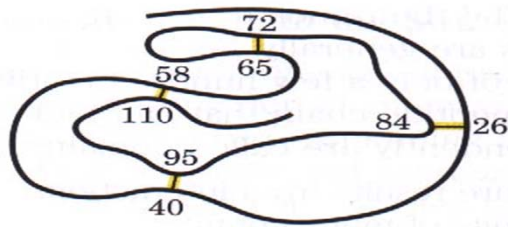
Denaturacija in renaturacija (samosestavljanje) proteinov

- Denaturacija: porušenje 3D native strukture (terciarne, kvartarne) proteina, s tem tudi izguba njegove funkcije
- Vzroki za denaturacijo:
 - **povišana temperatura** (poruši šibke interakcije, predvsem H-vezi)
 - **sprememba pH** (spremenijo se elektrostatske interakcije med nabitimi –R in H-vezi)
 - **organska topila** kot etanol in aceton (porušijo se predvsem hidrofobne interakcije)
 - spojine kot je **urea in gvanidin-hidroklorid, detergenti** (porušijo se predvsem hidrofobne interakcije)



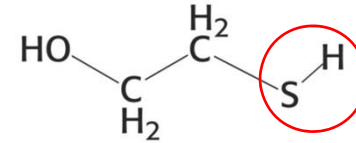
- Renaturacija: od vzamemo vzrok za denaturacijo

Denaturacija in renaturacija

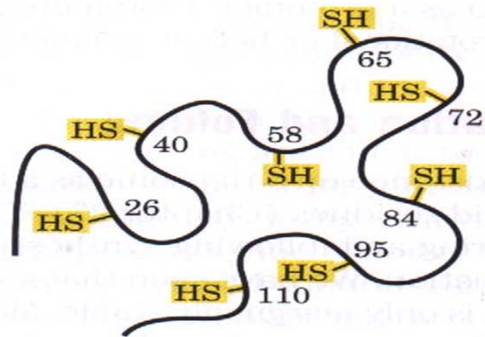


nativno stanje RNAze,
katalitično aktivno

dodatek uree in reducenta

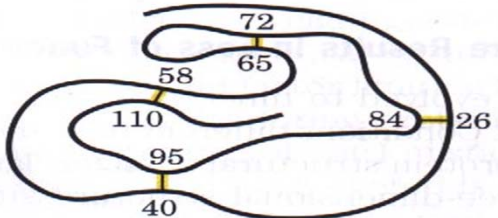


reducent poruši
disulfidne vezi



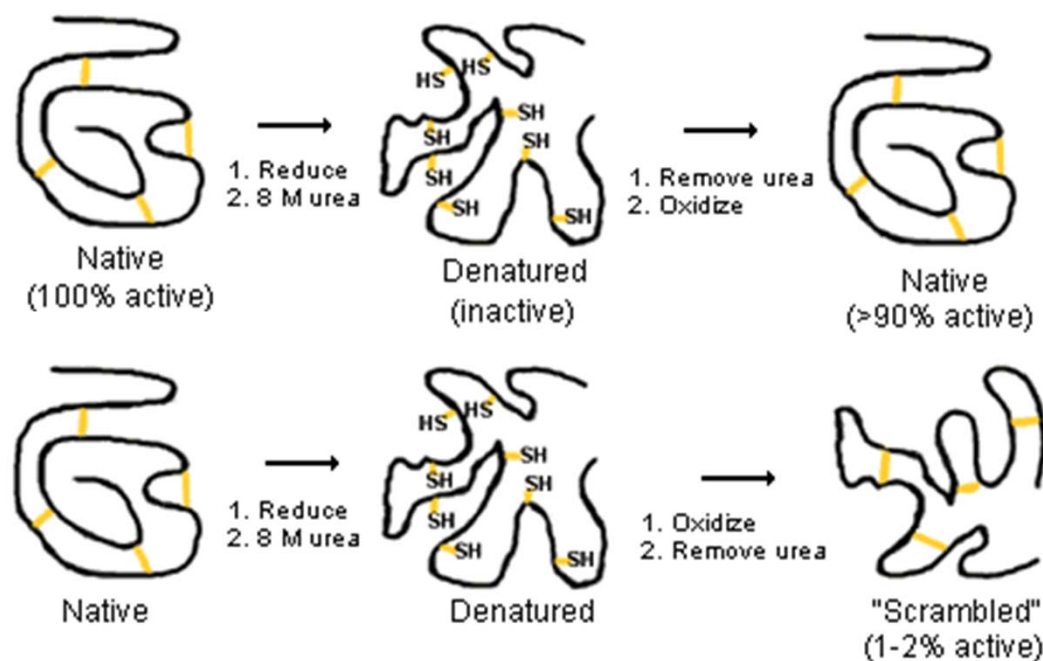
razvito stanje, neaktivno;
disulfidni mostički reducirani v Cys
(-SH)

odstranitev uree in reducenta



nativno, katalitično aktivno stanje

Denaturacija in renaturacija – Afinsenov poskus

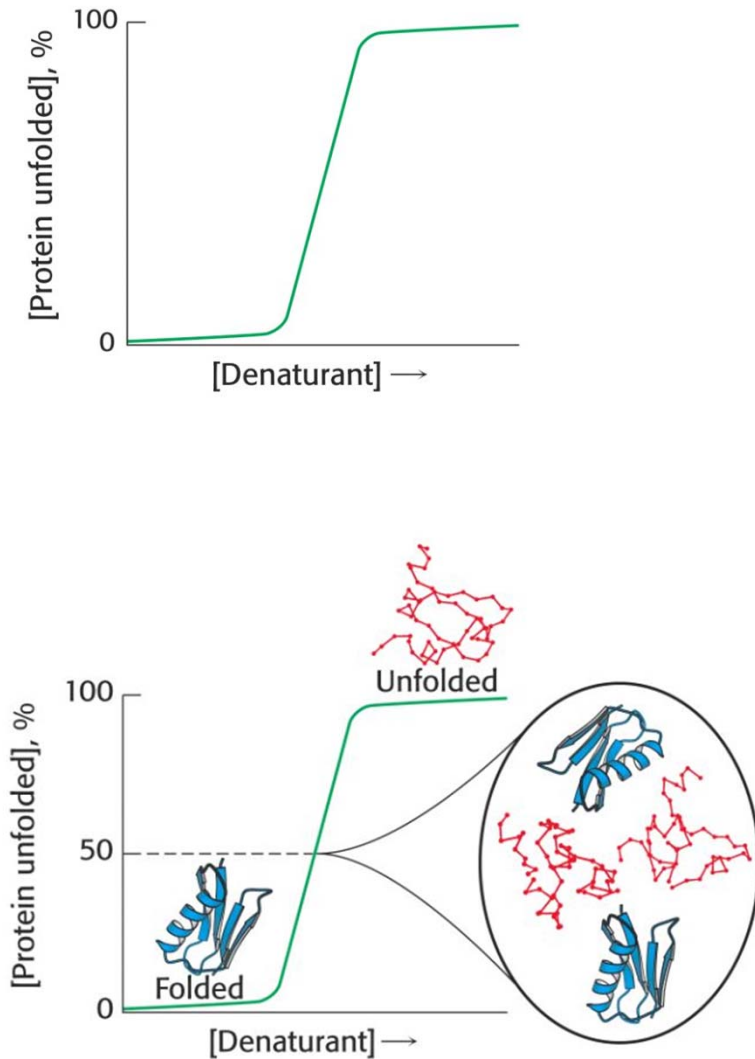


8 skupin SH se teoretično lahko poveže na $7 \times 5 \times 3 \times 1 = 105$ načinov!

Če po denaturaciji ribonukleaze odstranimo le denaturant (ureo), protein pa prepahavamo s kisikom, bo prišlo do naključne tvorbe S-S mostičkov.

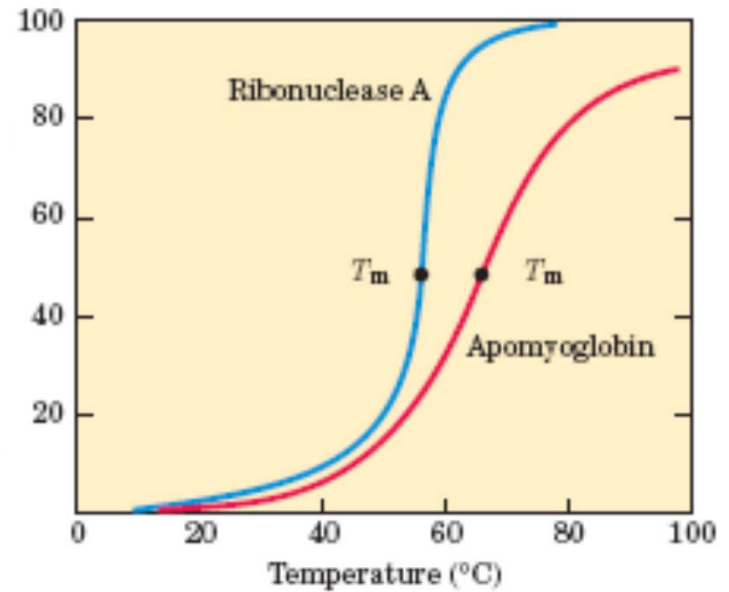
Afinsen je prvi dokazal, da je vsa informacija za zvitje proteina (3D strukturo) zapisana v primarni strukturi proteina.

Denaturacija proteina je odvisna od pogojev v okolju



Določitev temperature tališča proteina T_m

% denat. prot.

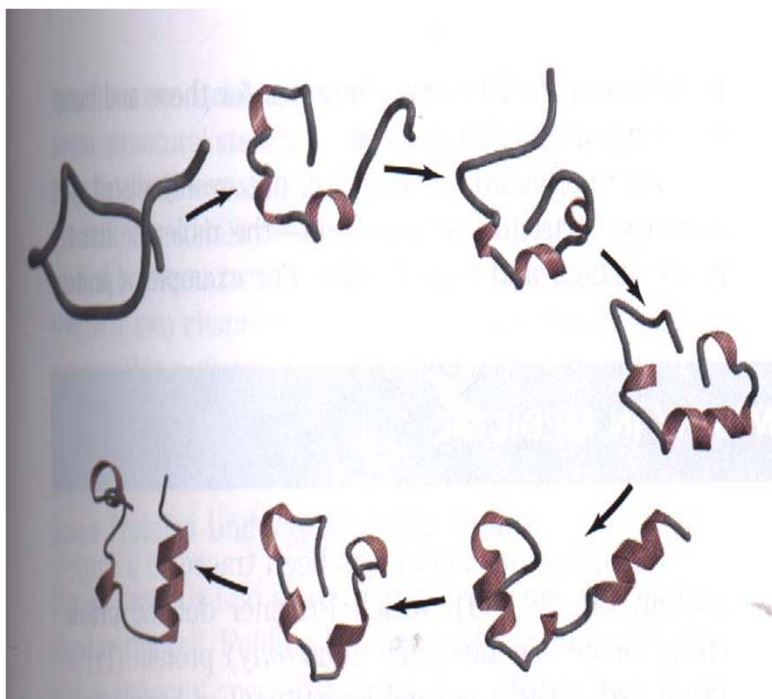


Kako poteka zvitje polipeptida?

- **Hipoteza I** : postopno zvitje polipeptida; lokalno se ustvarijo sekundarne strukture → supersekundarna struktura → domene → nativni protein (kooperativni proces)
- **Hipoteza II**: zvitje se prične s spontanim kolapsom polipeptida v kompaktno stanje – “molten globule”/razrahljani klobčič - hidrofobni kolaps
- **Hipoteza III**: Polipeptidi se zvijejo s pomočjo drugih molekul, šaperonov, ki usmerjajo in pospešujejo proces zvižajna. Šaperoni so v vseh kraljestvih (bacteria, archaea in eukariontih)

Zvižanje proteina je zelo hiter proces; *E. coli* naredi aktivno molekulo proteina iz 100 ak v 5 sek; ni naključen proces, gre za vodeno zvižanje polipeptidne verige. (Če bi bil proces povsem slučajen, 10^{77} let)

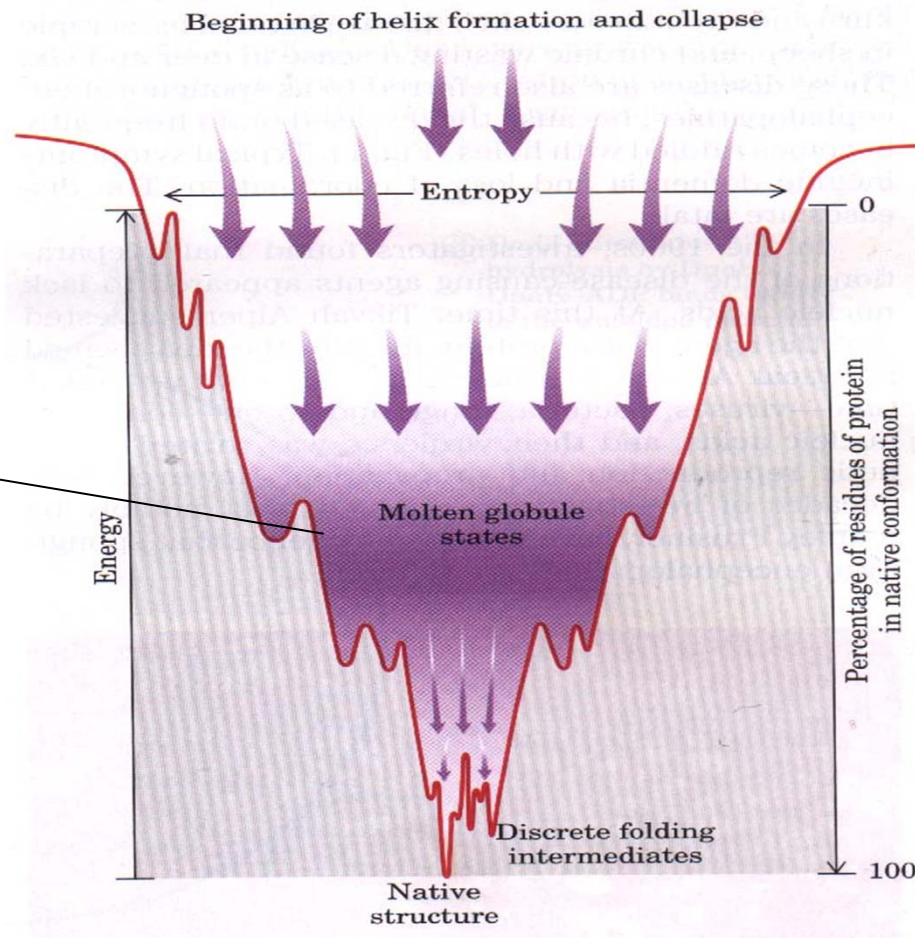
Hipoteza I: postopno zvitje polipeptida



Nastanek posameznih
supersekundarnih struktur

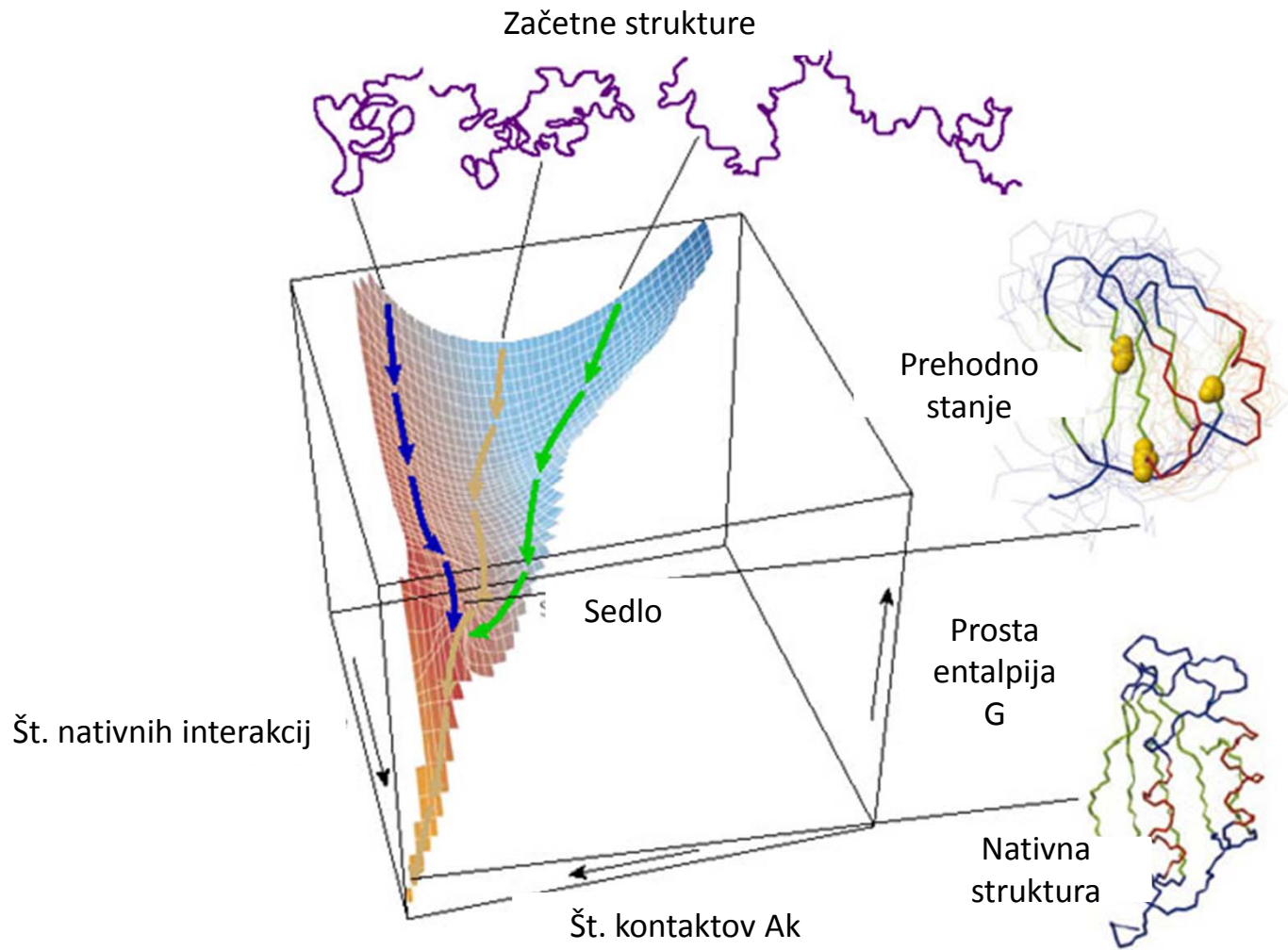
Kako poteka zvitje polipeptida? Hipoteza II: zvitje polipeptida poteka po "lijaku proste energije" (termodinamski vidik)

Stanje razrahljanega klobčiča

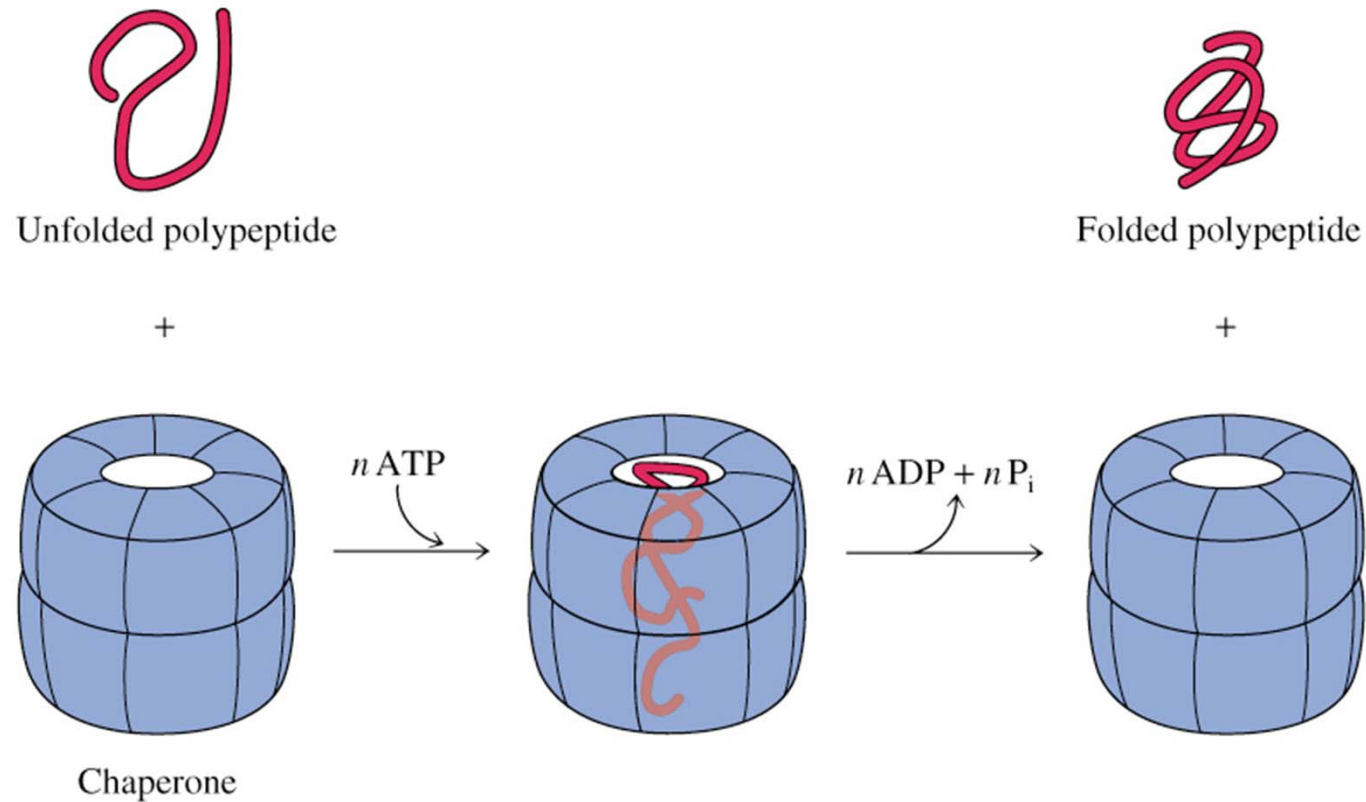


Cilj zvitja proteina je nastanek maksimalnega števila šibkih interakcij (vodikovih, hidrofobnih, Van der Waalsovih, ionskih) - stabilna konformacija, najnižja energija

“Energijski lijak” zvijanja proteinov



Hipoteza III: šaperoni pomagajo pri zvijanju polipeptida



V nekaterih primerih je za zvijanje proteina s pomočjo šaperoninov potrebna energija (hidroliza ATP)

Napake v zvitju polipeptida vodijo do nekaterih bolezni

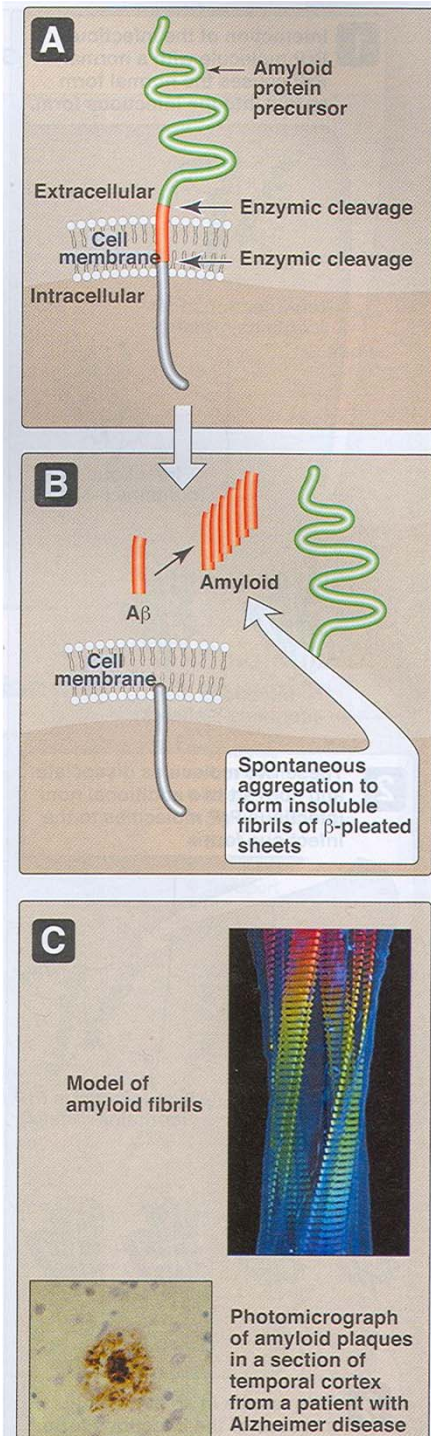
- **Cistična fibroza** – okvarjen je membranski protein, ki je odgovoren za prenos Cl^-
- **Bolezni vezivnega tkiva** – okvarjen strukturni protein kolagen
- **Prionske bolezni**, TSE (Transmissible Spongiform Encephalopathies) spremenjena konformacija proteina **priona** (protein infectious only), $M_r = 28\ 000$.



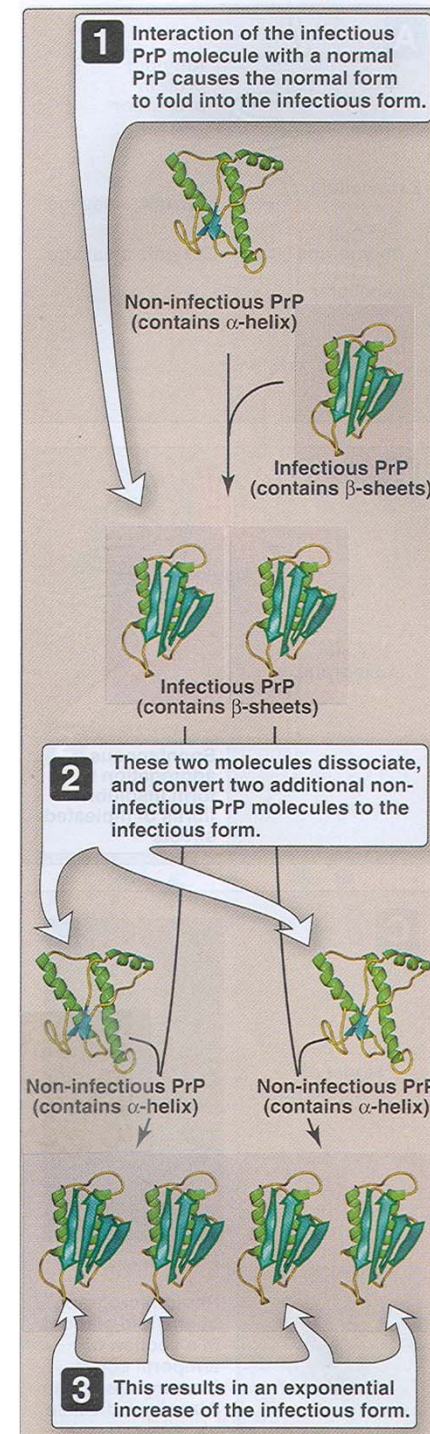
“nore” krave



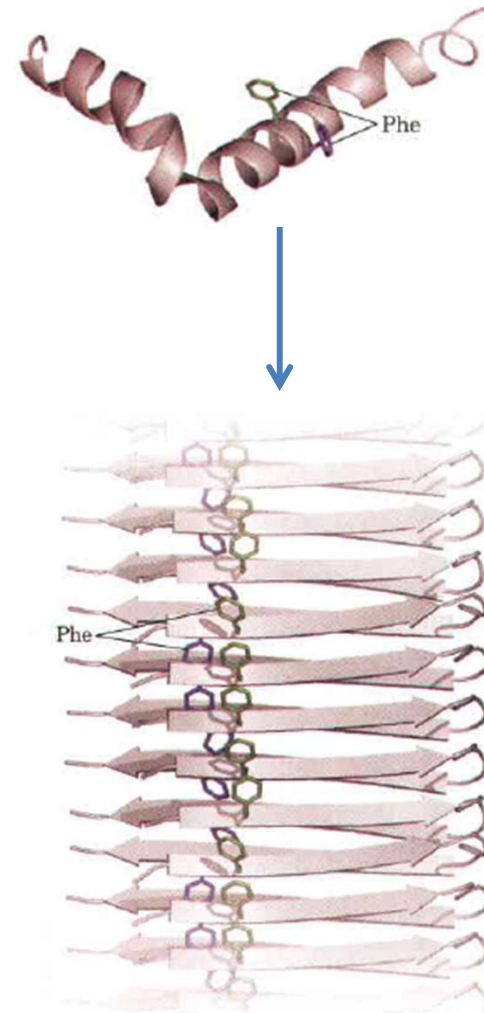
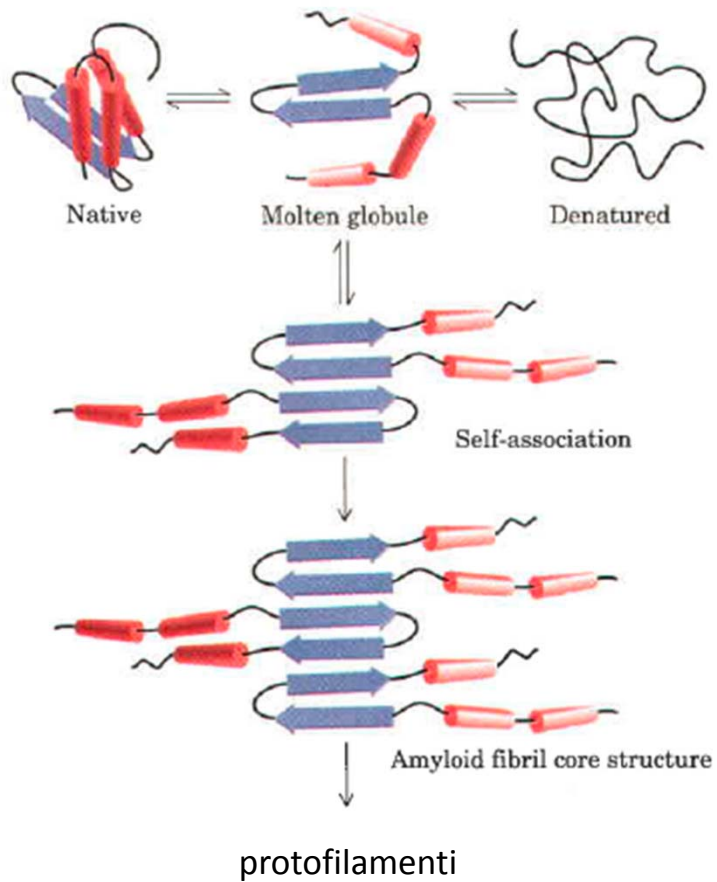
kuru



Alzheimerjeva bolezen in prionska bolezen nastaneta zaradi napačnega zvitja proteinov



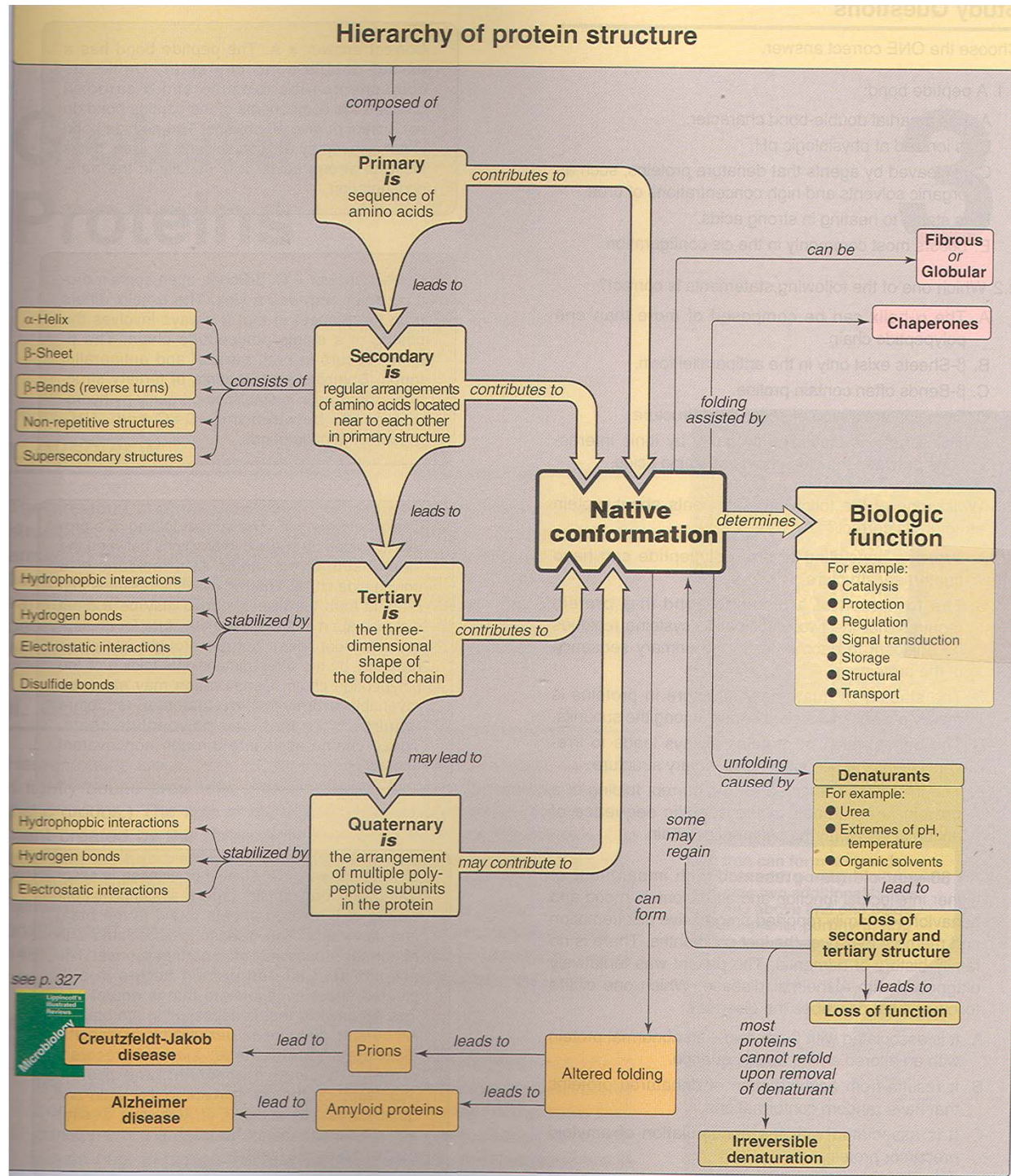
Tvorba amiloidnih plakov iz beta-amiloidnega paptida



Prioni – povzročitelji degenerativnih sprememb možganov

izvor	bolezen	mehanizem prenosa
človek	kuru	Infekcijski ritualni kanibalizem
	CJD (Creutzfeldt-Jakobova bolezen)	Infekcija z BSE, genska okvara, somatska mutacija
	GSS (Gerstmann-Straussler-Scheineker bol.)	Mutacija gena za prion
	FFI (Fatal Familial Insomnia)	Infekcija od ovc ali goveda
ovca	praskavica (scarpie)	Kanibalizem, infekcija s PrP ^{Sc}
govedo	BSE (Bovine Spongiform Encephalophathia)	Kanibalizem, infekcija s PrP ^{Sc}

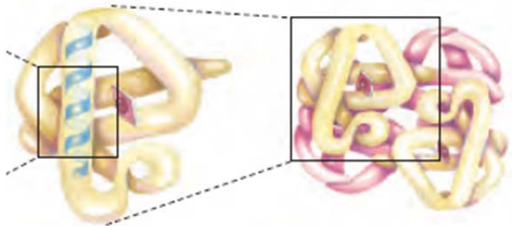
POVZETEK



Strukturne značilnosti proteinov

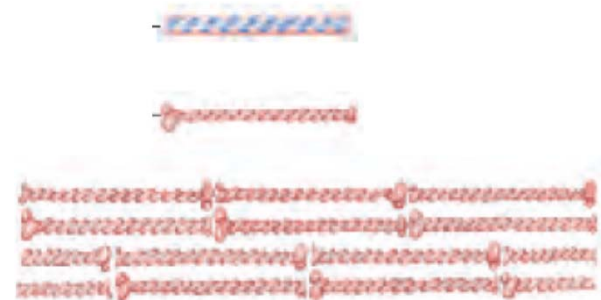
Globularni proteini

- Terciarna struktura - več vrst sekundarne strukture
- Hidrofobni ak ostanki v notranjosti, hidrofilni na zunanosti
- Povezovanje v kvartarno strukturo in supramolekulske komplekse (vodikove vezi, ionske interakcije, -S-S- vezi)
- Kvartarna struktura je dinamična struktura, topna v vodi



Fibrilarni proteini

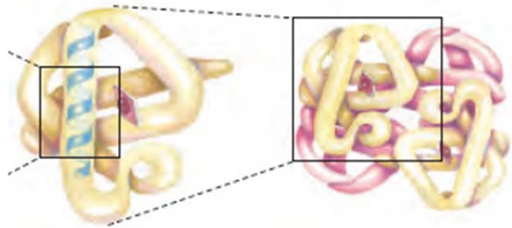
- Terciarna struktura iz ene vrste sekundarne strukture
- Hidrofobni ak ostanki v notranjosti in na zunanosti
- Povezovanje v kvartarno strukturo in supramolekulske komplekse (hidrofobne interakcije, vodikove vezi, kovalentne vezi)
- Kvartarna struktura je trdna struktura, netopna v vodi



Struktura proteinov pogojuje njihovo funkcijo

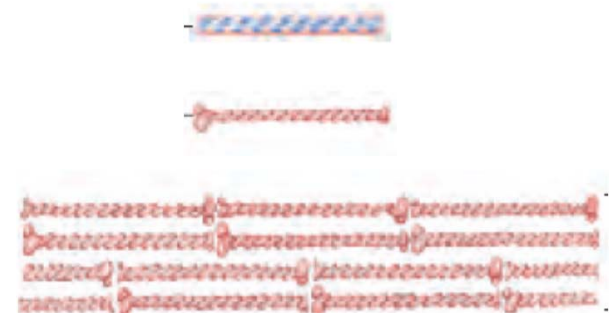
Globularni proteini

- prenašalna - transportni proteini (Mb, Hb)
- regulatorna (DNA vezavni proteini)
- signalna – hormoni
- katalitska – encimi
- obrambna – protitelesa
- skladiščna – proteini v mleku (kazein), proteini jajčnega beljaka (ovalbumin)



Fibrilarni proteini

- oporna - strukturni proteini (lasje, koža, vezivno tkivo, znotrajcelični filamenti, zunajcelični matriks)



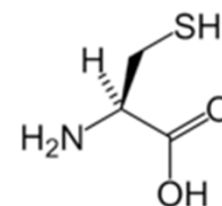
Vrste sekundarne strukture in lastnosti fibrilarnih proteinov

sekundarna struktura	značilnosti	primer
α -vijačnica (H vezi) peptidne verige povezane s hidrofobnimi interakcijami, -S-S- mostički	čvrsta netopna struktura	KERATINI •Intermediarni filamenti citoskeleta •lasje, nohti, •povrhnjica kože SPEKTRIN DISTROFIN
β -konformacija peptidne verige povezane s H-vezmi	mehka, upogljiva vlakna	FIBROIN svila
kolagenska vijačnica peptidne verige povezane s kovalentnimi vezmi, hidrofobnimi in H-vezmi	čvrsta netopna struktura, visoka natezna moč, ni raztegljiv	KOLAGEN kite, hrustanec, organski matriks kosti, koža, roženica

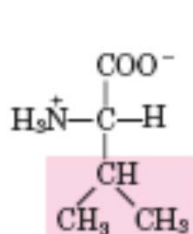
Keratini - družina živalskih proteinov

povrhnjica kože
lasje
dlaka
nohti
kremplji
perje

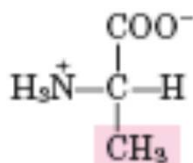
- sestavljeni predvsem iz desnosučne α -vijačnice s hidrofobnimi AK
- α -vijačnice so med seboj povezane s hidrofobnimi interakcijami in disulfidnimi mostički v ovito vijačnico (colied coil)
- najtrši α -keratin (nosorogov rog) vsebuje 18% cys
- podobno strukturo kot keratini imata tudi spektrin in distrofin



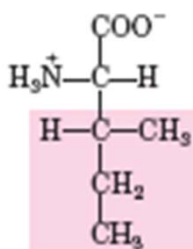
cistein



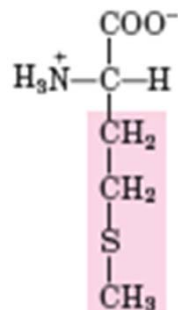
Valine



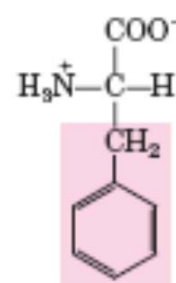
Alanine



Isoleucine

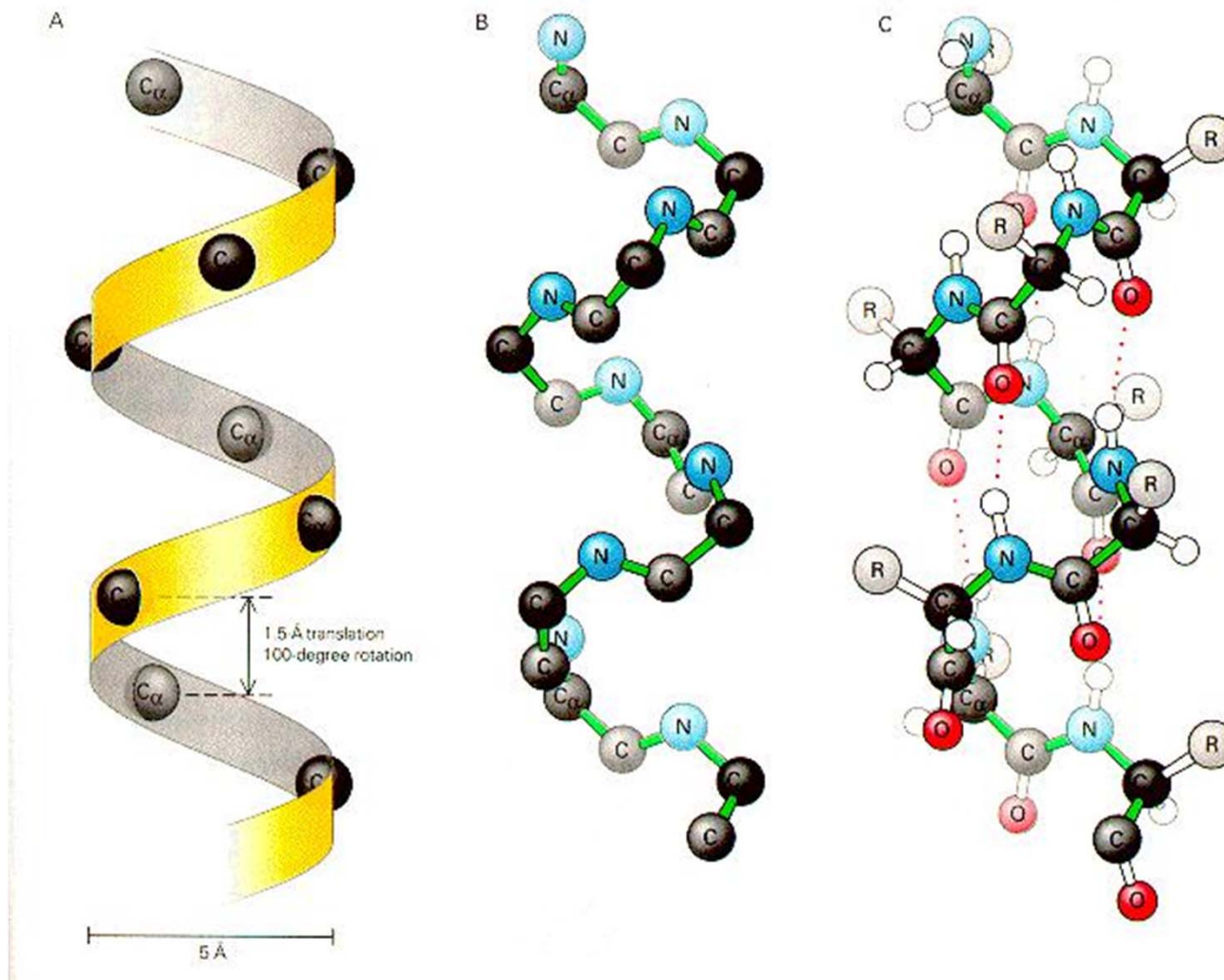


Methionine

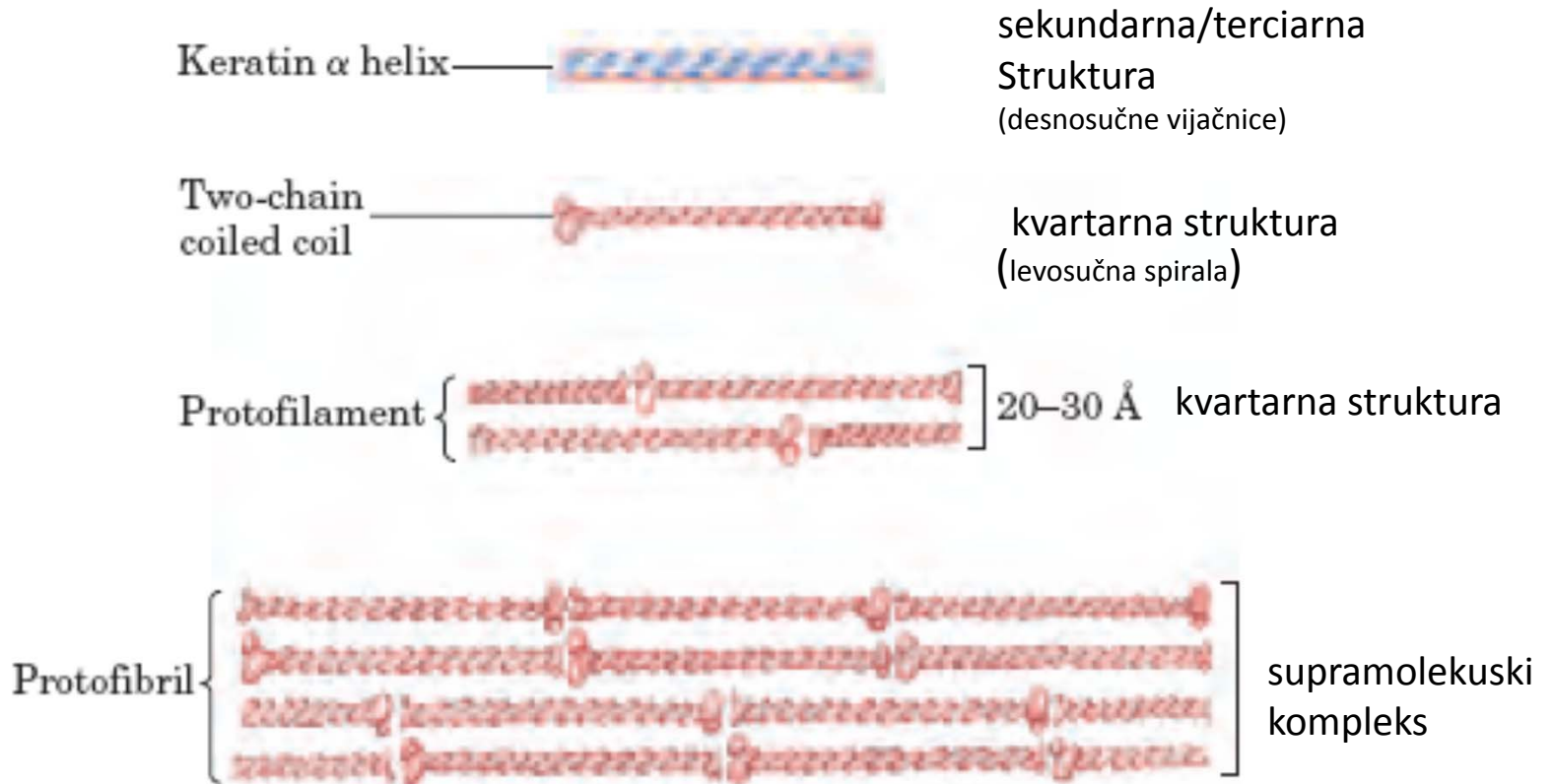


Phenylalanine

Osnovna strukturna enota keratinov je desnosučna α vijačnica

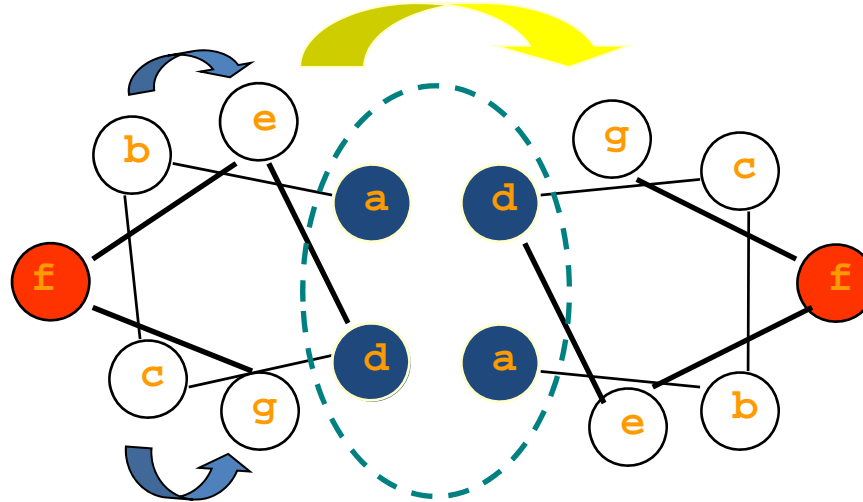


Struktura lasu: α -keratin



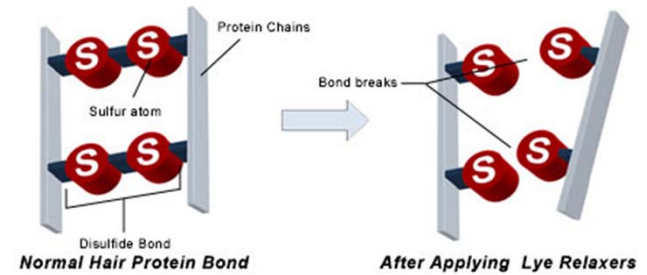
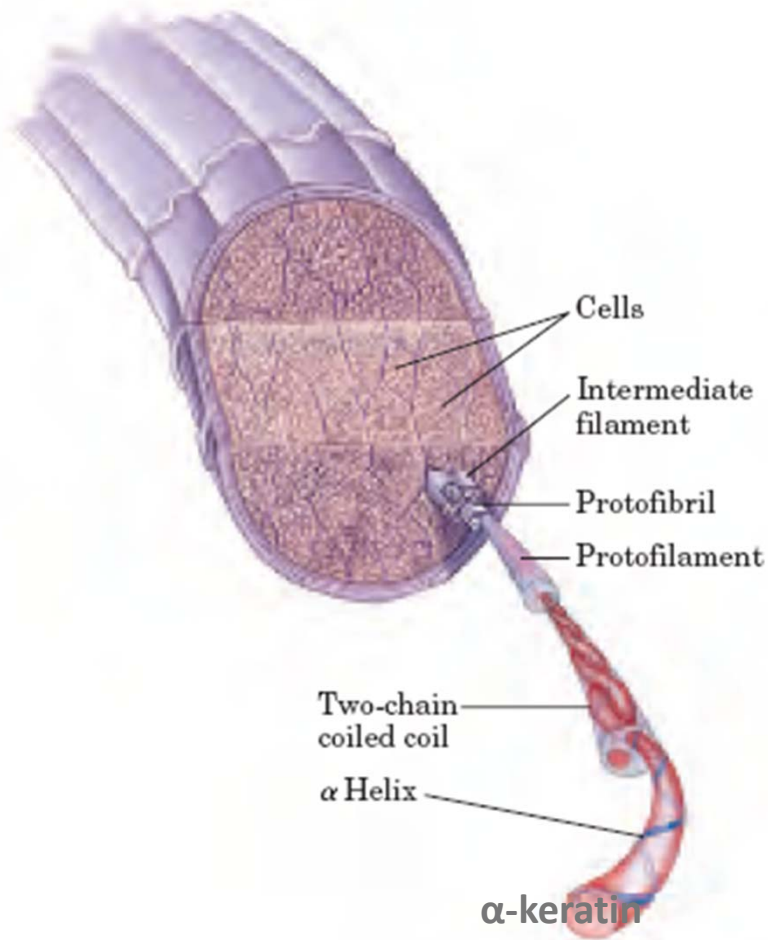
- osnovna polipeptidna veriga: desnosučna α -vijačnica, veliko hidrofobnih ak (Ala, Val, Ile, Met, Phe)
- kvartarna struktura: levosučna spirala iz 2 desnosučnih α -vijačnic (**protofilament**)
- **protofibrila** – vlakence (supermolekulski kompleks)

Heptadna ponovitev aminokislin v keratinu – ovita vijačnica



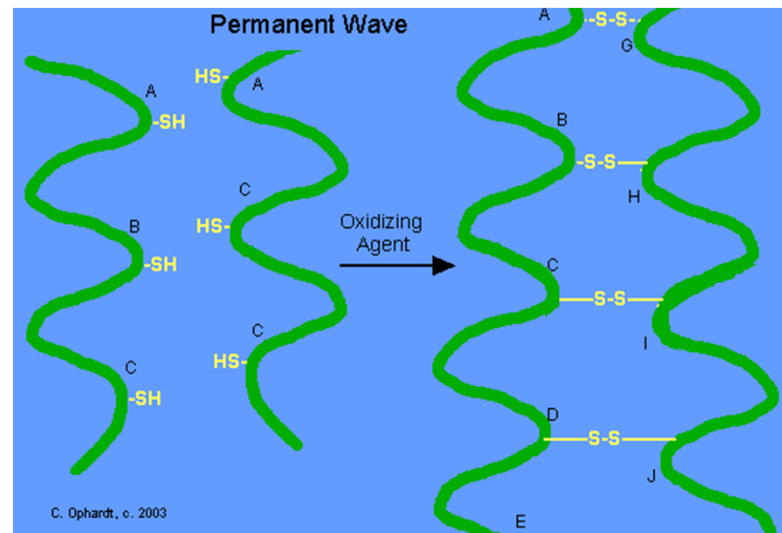
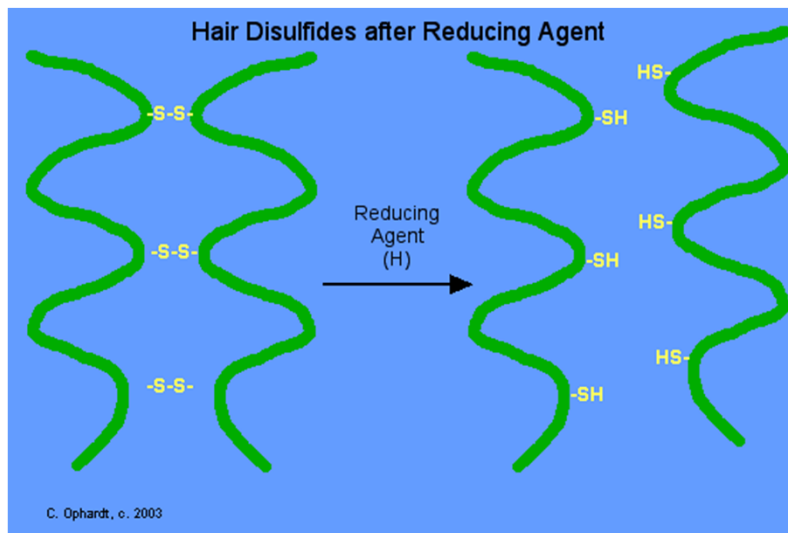
- Zaporedje 7 kislin, vsaka prva (**a**) in četrta (**d**) sta hidrofobni (npr. Ala, Val, Ile, Phe, Trp), medtem ko so na pozicijah (**e**) in (**g**) pogosto negativno nabite (Asp, Glu) ali pozitivno nabite (Lys, Arg, Asp, Glu) aminokislinae.
- S puščicami so označene morebitne ionske interakcije (vezi) znotraj posamezne vijačnice ali pa med dvema vijačnicama v dimeru.
- S prekinjeno linijo so označene hidrofobne vezi med vijačnicama

Prečni prerez lasu



Da las zraste cca 15 cm v enem letu, se mora tvoriti 9.5 zavojev vijačnice na sekundo..... 😊

Keratini v laseh imajo razteznost – kodranje las



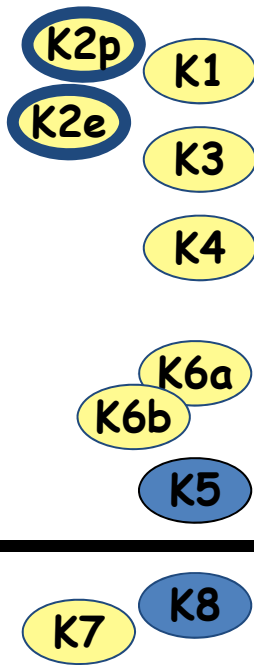
-Alfa vijačnice keratina se ob segrevanju lahko raztegnejo, dokler ne dosežejo polno raztegnjene beta strukture. Ob ohlajanju se spet spontano zvijejo v vijačnico.

-Raztezanje tudi v vlažnem - mokri lasje so bolj ravni.

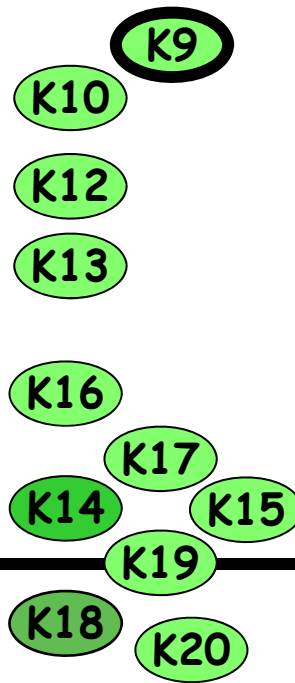
-Trajna – z reducentom razbijemo disulfidne mostičke med keratinskimi vijačnicami. Ko reducent odstranimo, se naključno vzpostavljajo novi disulfidni mostički – las se skodra (Spomnite se na Asfinsenov poskus!).

Keratini

Tip II (bazični)

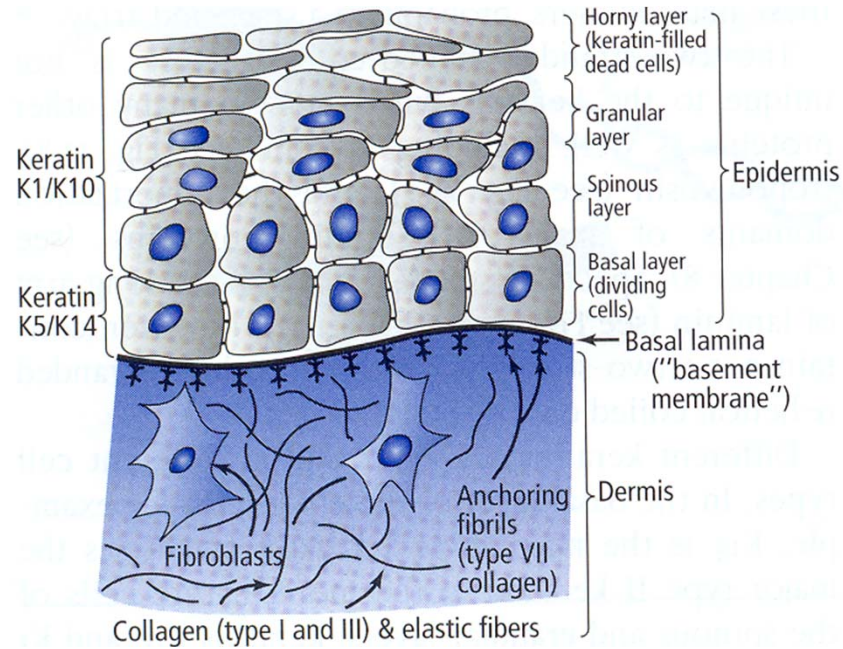


Tip I (kisli)

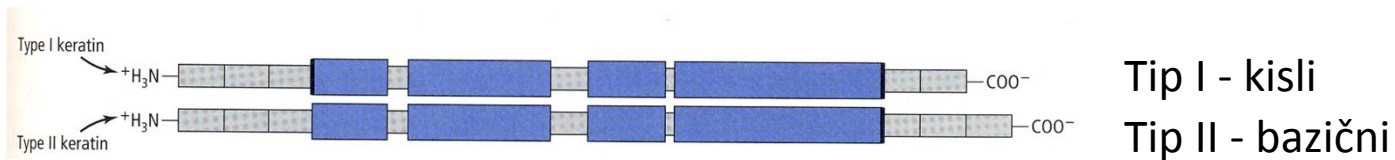


- epidermis, višji sloji
- oko
- mukoza ust
- v koži in pri zaraščanju ran
- bazalne celice epidermisa
- “enostaven” epitelij (črevesje, ledvica, jetra, trebušna slinavka)

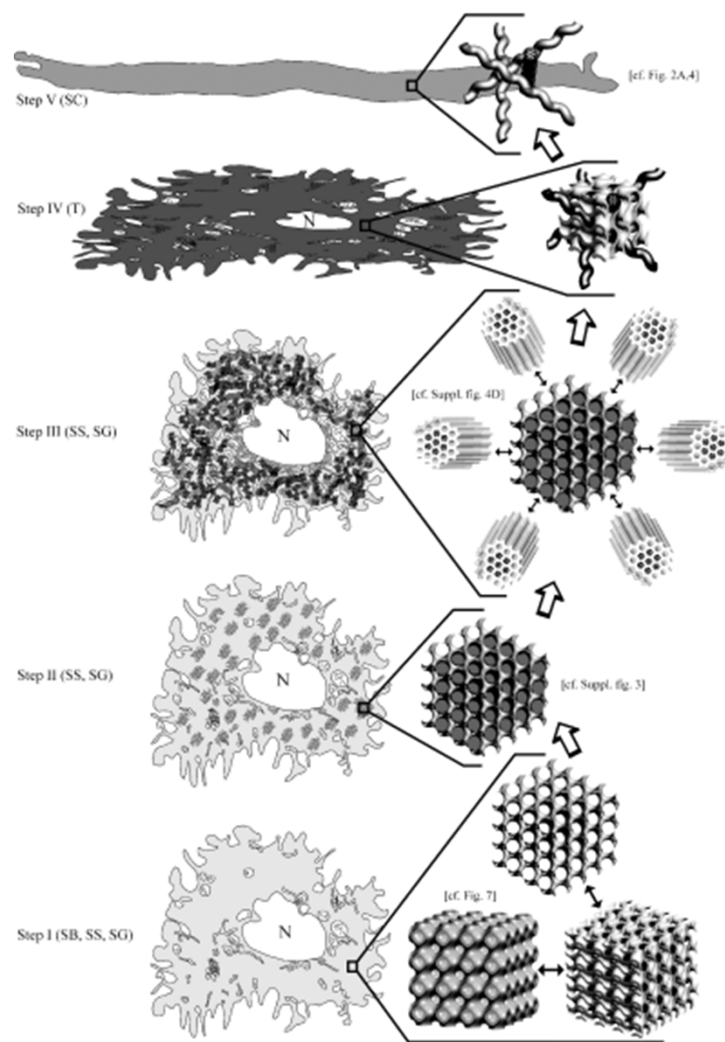
Keratini v epiteljskih celicah kože



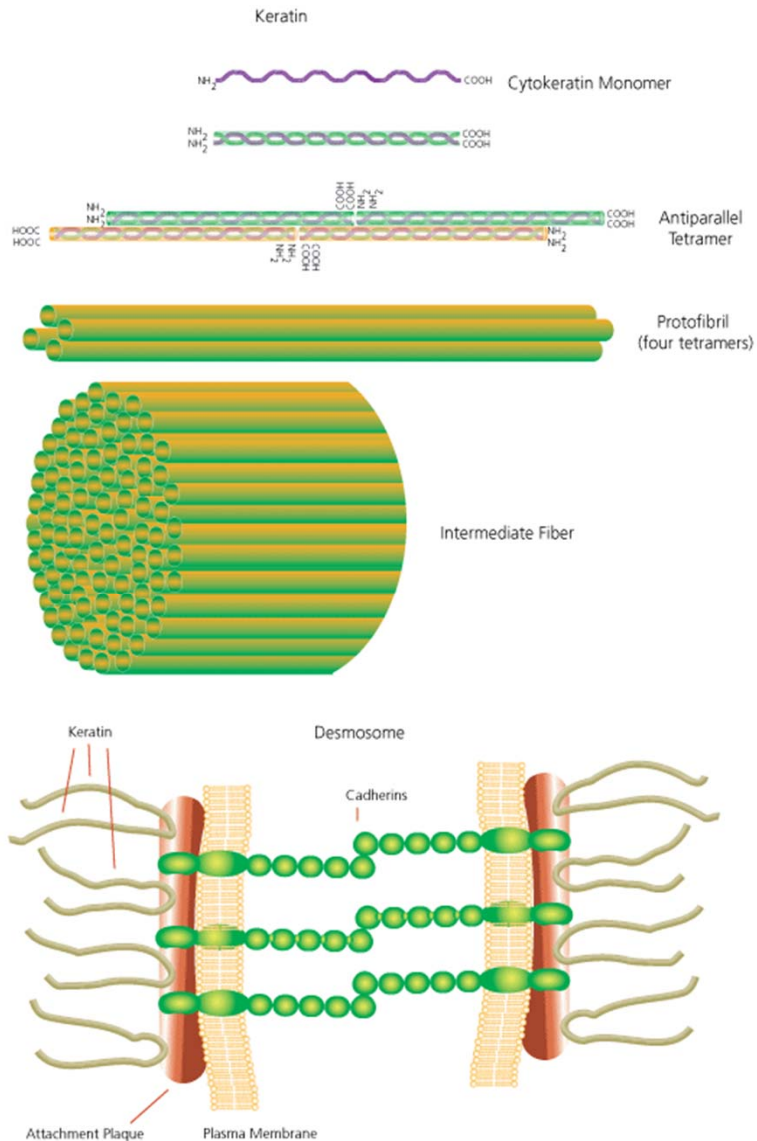
Paralelni heterodimer iz Tipa I in Tipa II keratinskih polipeptidov



Pakiranje keratina v roženici v supramolekularne strukture



Keratini v intermediarnih vlaknih



Intermediarni filamenti – družina sorodnih proteinov, ki imajo podobne strukturne lastnosti in tudi ak zaporedje.

Ime izhaja iz njihove velikosti (premer cca 10 nm), kar je med aktinskimi in miozinskimi filamentmi.

Večina je citoplazemskih, so tudi jedrni (lamin).

Intermediarni filamenti tipa I in II so kisli in bazični keratini.

Bolezni, povezane s keratini – preko 700 odkritih mutacij

- **Epidermolysis bullosa simplex** K5 K14
- **Bullous congenital ichthyosiform erythroderma** K1 K10
- **Epidermolytic palmoplantar keratoderma** K9
- **Non-epidermolytic palmoplantar keratoderma** K1 K16
- **Ichthyosis bullosa of Siemens** K2e
- **Pachyonychia congenita type 1** K6a K16
- **Pachyonychia congenita type 2** K6b K17
- **Steatocystoma multiplex** K17
- **White sponge naevus** K4 K13
- **Meesman's corneal dystrophy** K3 K12
- **Cryptogenic liver disease** K8 K18
- **Pancreatitis** K8 K18
- **Inflammatory Bowel Disorder** K8 K19
- **Monilethrix** hHb1 (K81)
hHb6 (K86)
- **Pseudofolliculitis barbae** K6hf (K75)

Genske bolezni zaradi napak v keratinskih genih

Epidermolysis bulosa simplex

(1/30 000 – 50 000) – avtosomna dominantna

vzrok: točkovna mutacija

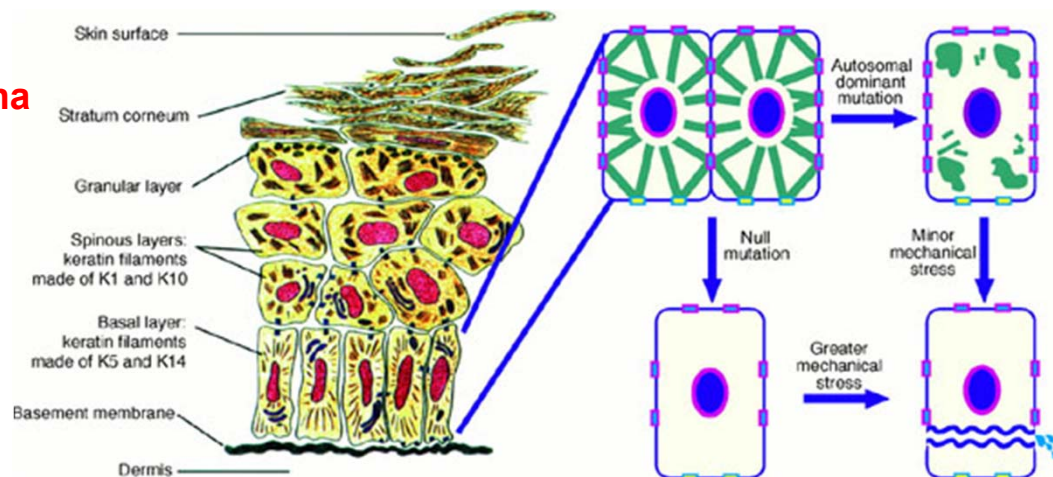
v genu za K5 ali K14

posledica: strižne napetosti

ob mehanskem pritisku

→ celice niso čvrste

→ mehurji na koži



Genske bolezni zaradi napak v keratinskih genih

Epidermolitična hiperkeratoza (1 in 250,000)

(Bullous congenital ichthyosiform erythroderma)

vzrok: točkovna mutacija

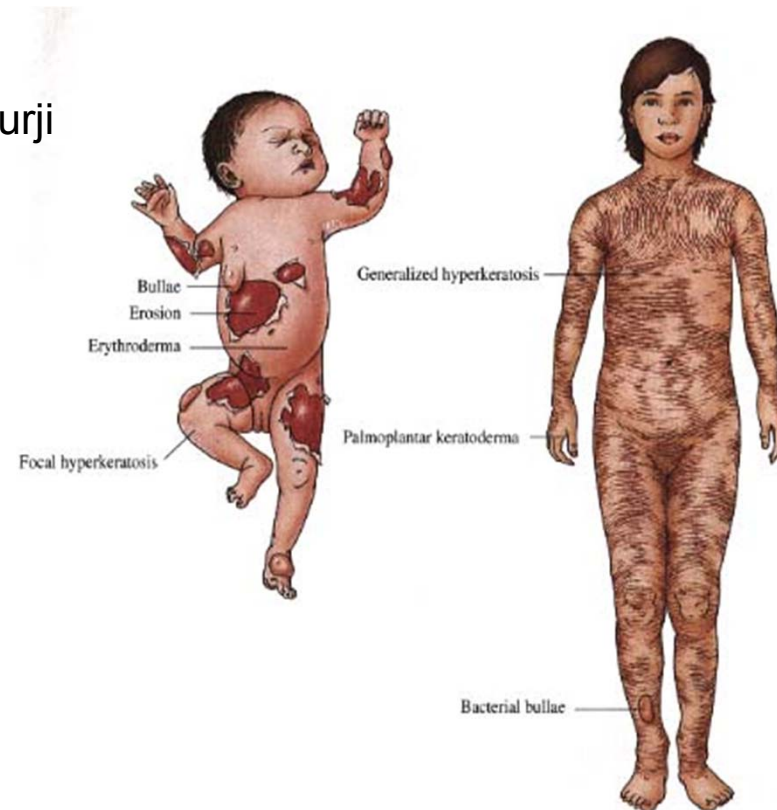
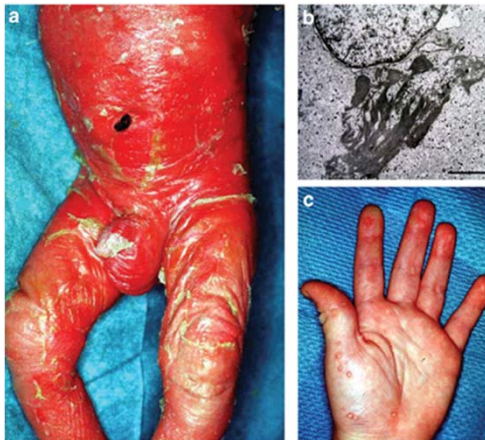
v genu za K1 in K10

Ob rojstvu rdeča in občutljiva koža, mehurji

Simptomi se s časom izboljšajo,

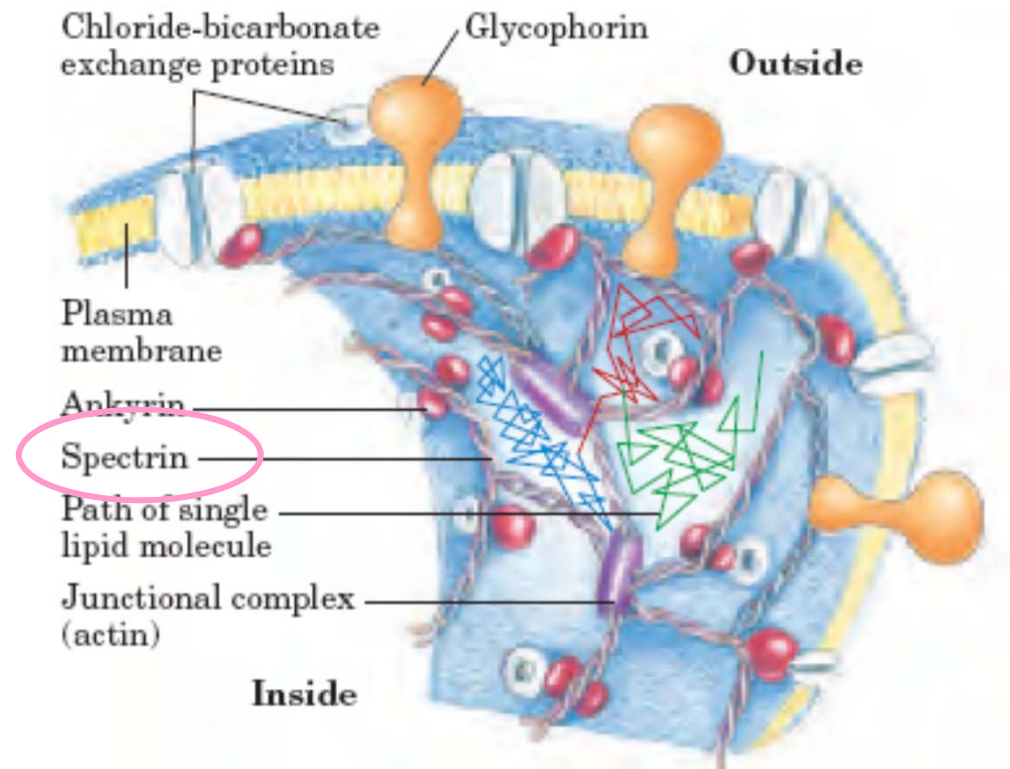
pojavi pa se pretirano deljenje

keratinocitov



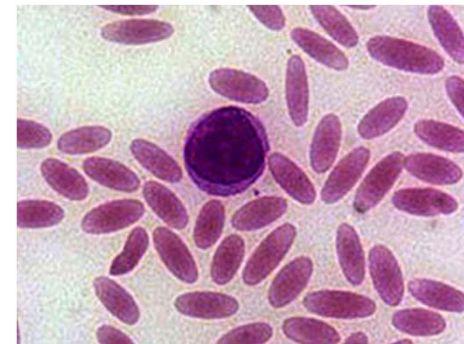
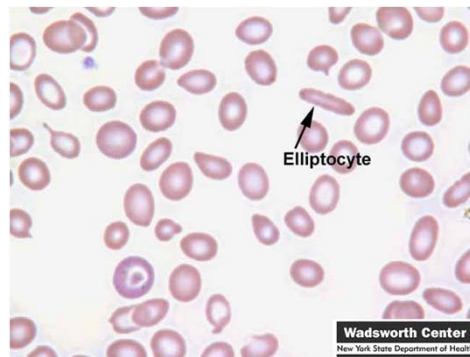
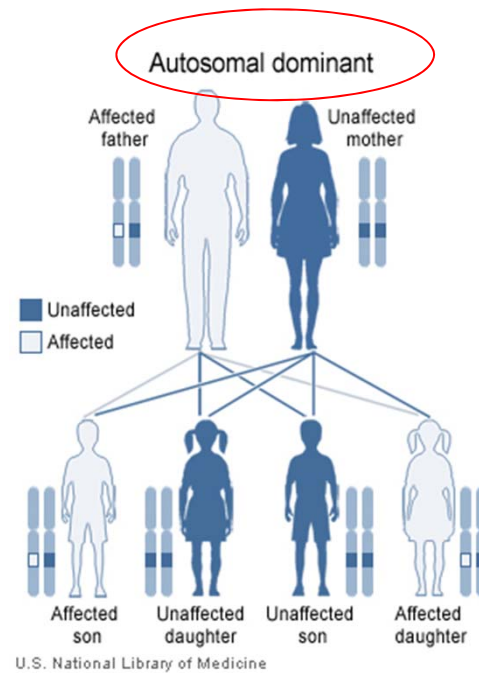
Spektrin

- Spektrin je protein citoskeleta ob znotrajcelični strani plazemske membrane mnogih celic.
- Je dimerni fibrilarni protein, dimeri se združujejo v tetramere in skupaj z aktinom tvorijo heksagonalne komplekse
- Stik z notranjim delom plazemske membrane imajo preko proteina ankirina.
- V eritrocitih spektrin tvori mrežo intermediarnih filamentov, ki daje eritrocitu značilno obliko.
- Mutacije v spektrinu vodijo v dedne bolezni.



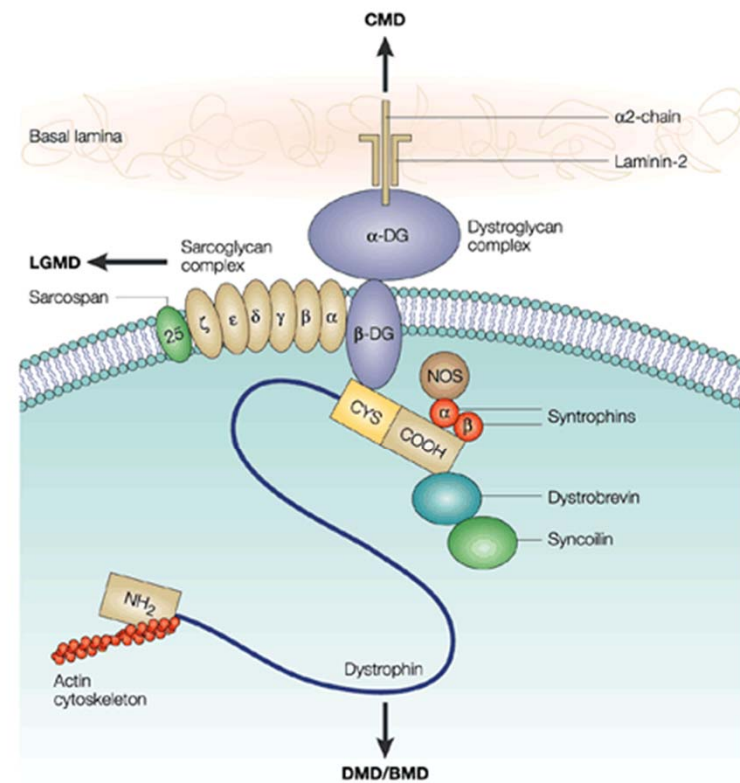
Eritrocit:
življenjska doba
2-3 mesece,
prepotuje ~400 km

Eliptocitoza – oblika hemolitične anemije zaradi genetske okvare spektrina



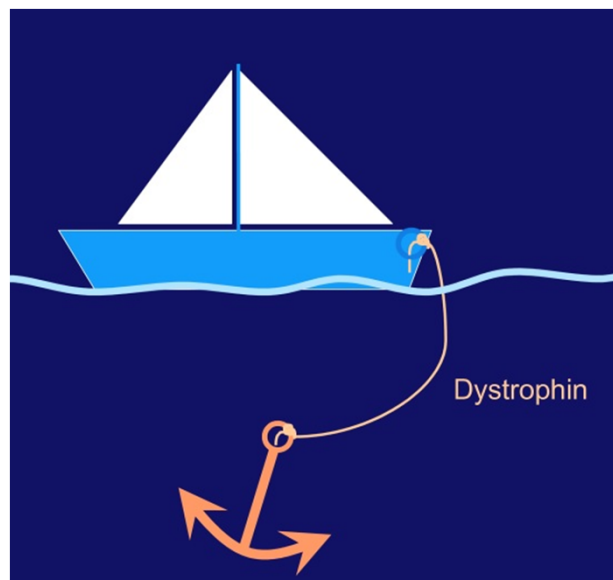
Distrofin

- soroden spektrinu; povezuje citoskelet mišičnih vlaken z membrano
- 3684 ak – največji človeški strukturalni gen: 79 eksonov, 2,4 Mb dolg gen
- 2 antiparalelni verigi
- v vseh vrstah mišic (skeletni, srčni, gladki)
- v skeletni mišici 0,002%,
- če ni distrofina → **Duchenne-ova mišična distrofija** (pospešeno slabenje mišic, izguba mišične mase)



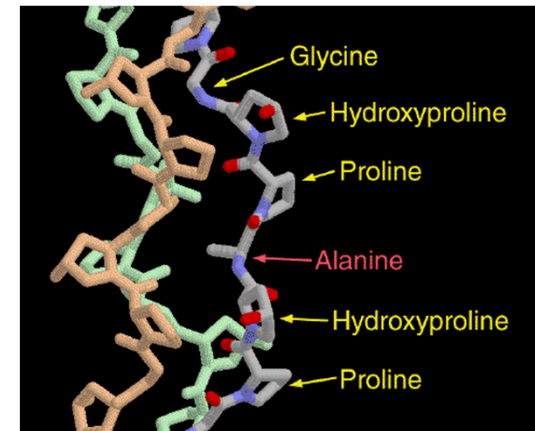
Duchennova mišična distrofija

- Nastane zaradi odsotnosti distrofina (delecija dela gena), ki povezuje proteine ogrodja mišičnih vlaken z veznim tkivom, ki obdaja mišična vlakna.
- Distrofin ščiti mišice pred poškodbami med gibanjem (krčenje in relaksacija) – je kot neke vrste amortizer.
- Distrofin si lahko predstavljamo kot vrv, ki povezuje čoln s sidrom. Sidro lahko igra vlogo le, kadar vrv ni pretrgana.
- Bolezen se prične po 1. letu, bolniki umrejo stari ~20 let (odpoved srca, oslABLjenje dihalnih mišic)



Kolagen – protein ekstracelularnega matriksa (EM)

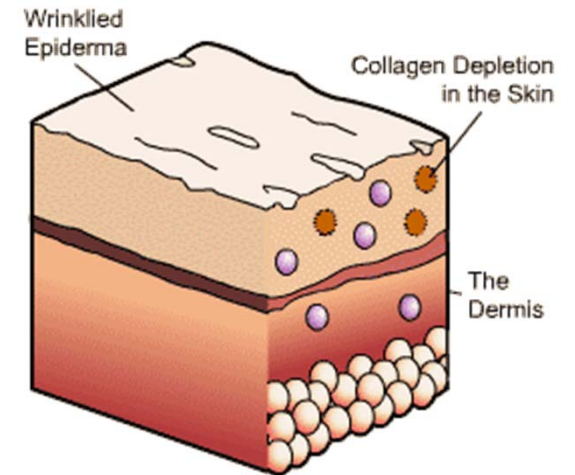
organ/tkivo	delež kolagena (%)
jetra	4
pljuča	10
aorta	12-24
hrustanec, kite	50 – 90
roženica	64
demineralizirane kosti	90
koža	50-70



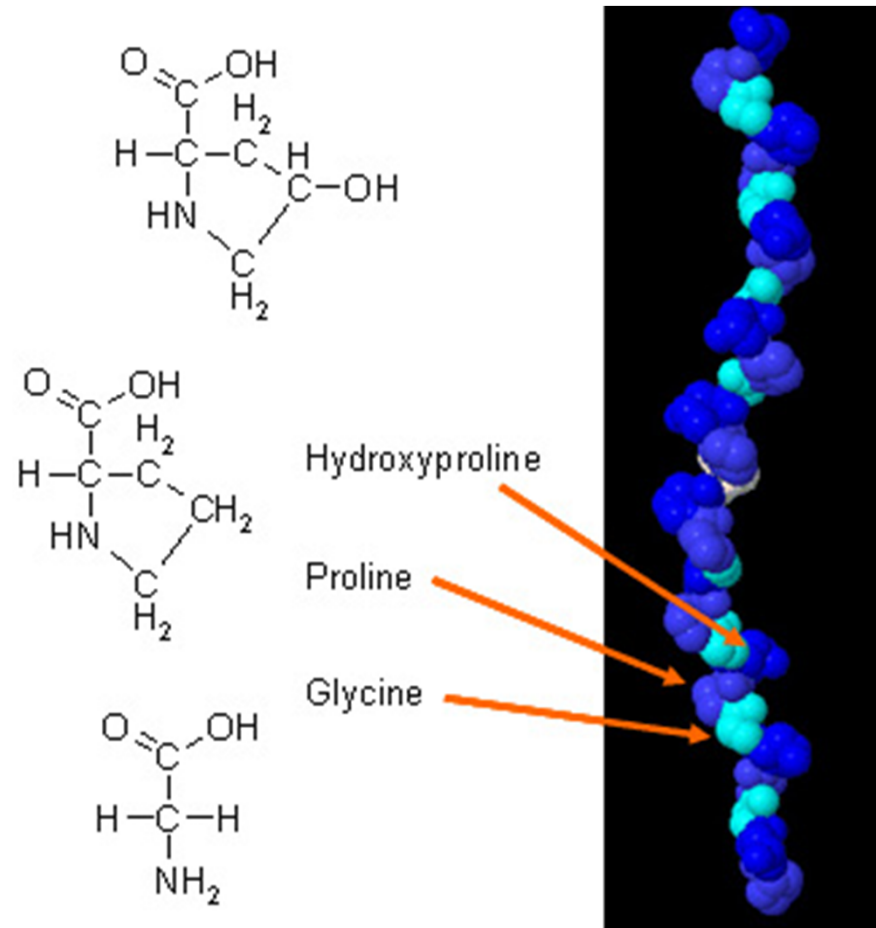
- kolagen se nahaja v vseh tkivih/organih, celicam daje oporo/trdnost
- **25% proteinov odraslega človeka, 14-20% otroka**
- dolga življenjska doba: nekaj tednov (žile, brazgotine) do nekaj let (kosti)
- denaturirani kolagen – želatina, nima hranljive vrednosti

Kolagen

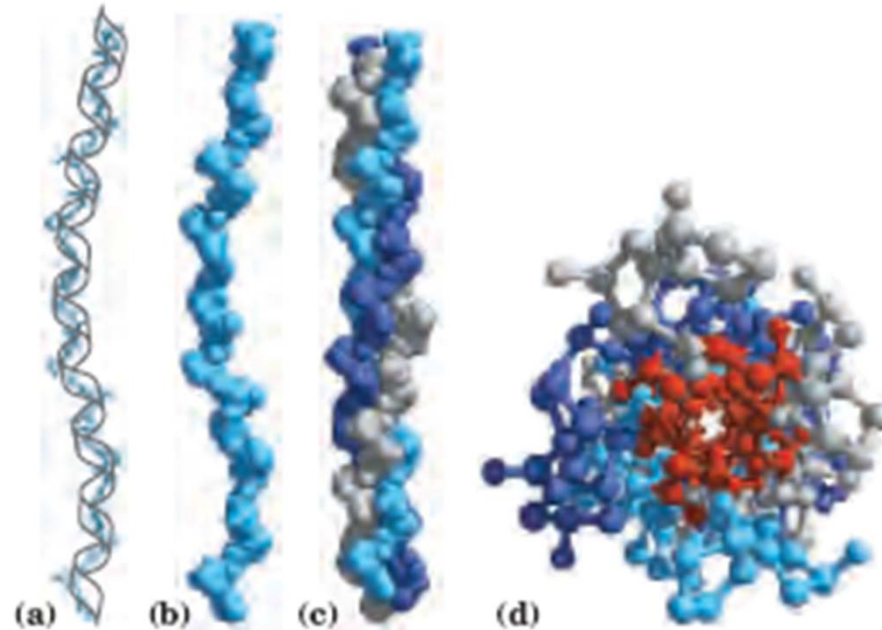
- sekundarna struktura: levosučna kolagenska vijačnica, α -veriga, 3 ak/zavoj
- ak sestava: 35% Gly, 11% Ala, 21% Pro in 4-Hyp
- ak zaporedje (nekaj 100 ponovitev) ponavljajoči se triplet Gly-Pro-X in Gly-X-Hyp (hidrofobne interakcije)
- kvartarna struktura: desnosučna trojna vijačnica iz α -verig (tropokolagen), povezava med polipeptidnimi verigami preko OH-Pro, OH-Lys in H-vezi
- Hidroksilacija ak – po-translacijsko, potreben vitamin C
- supermolekulski kompleks – kolagenska fibrila
 - 100 do 1000 molekul tropokolagena, debelina od 10 do 300 nm
 - paralelno organizirane fibrile (kite) prereza 1mm nosijo težo 10 kg
- 20 različnih molekul kolagena (I – XX); I, II, III, IV, VI, XI – fibrilarni



Aminokisline kolagena



Kolagensko vlakno

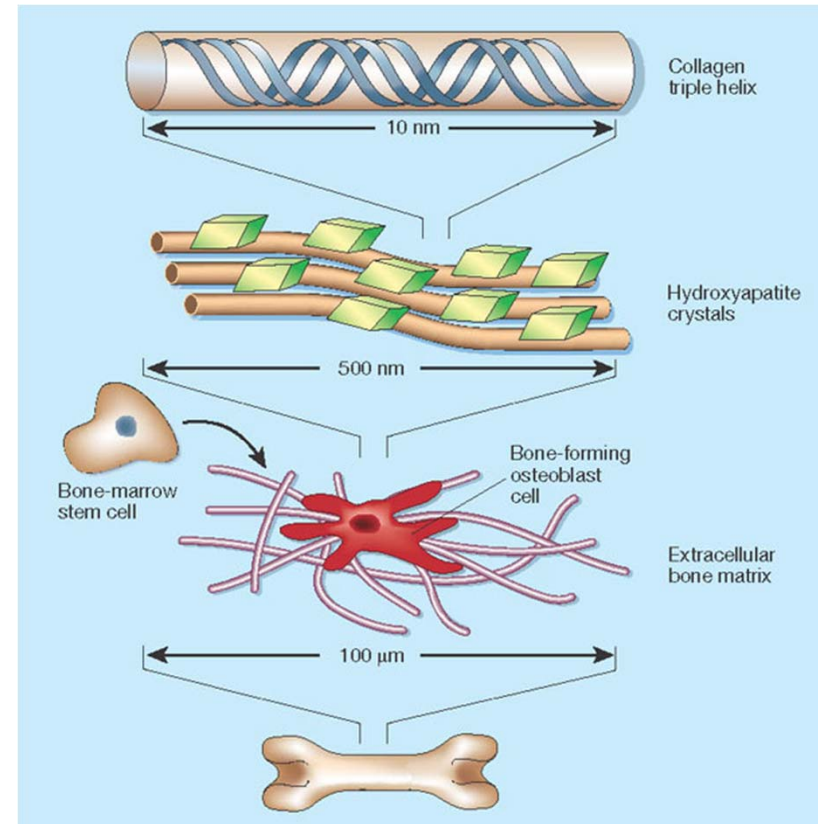
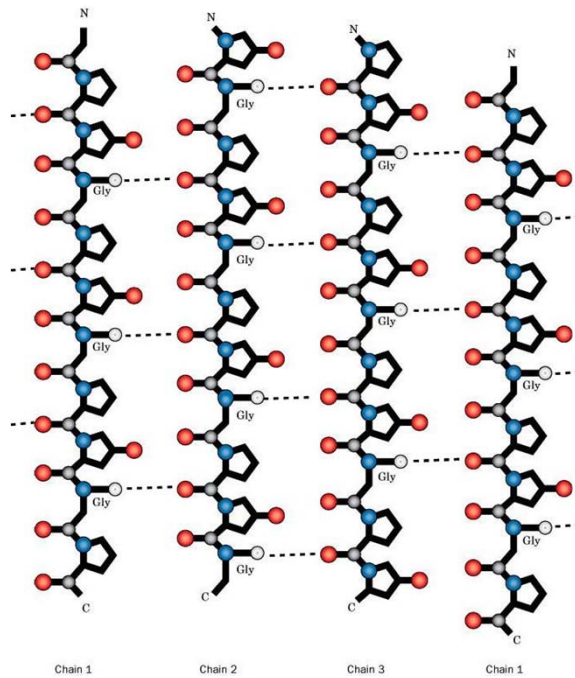


- (a) α veriga kolagena – ponavljajoči se triplet Gly-X-Pro ali Gly-X-Hyp; **levosučna vijačnica**
- (b) Prostorsko zapolnjen model iste α verige
- (c) Tri polipeptidne verige zvite v desnосуčno vijačnico – superheliks (tropokolagen)
- (d) Prečni prerez superheliksa pod (c): v notranjosti ostanki Gly (rdeče kroglice)

Organizacija kolagenskega vlakna

Tropokolagen , sestavljen iz 3 α -verig

Organizacija tropokolagena v kolagenske fibrile – strukturo stabilizirajo kovalentne vezi preko hidrosiliranih ak



Kolagen je v zunajceličnem matriksu vseh celic, tudi kosti.

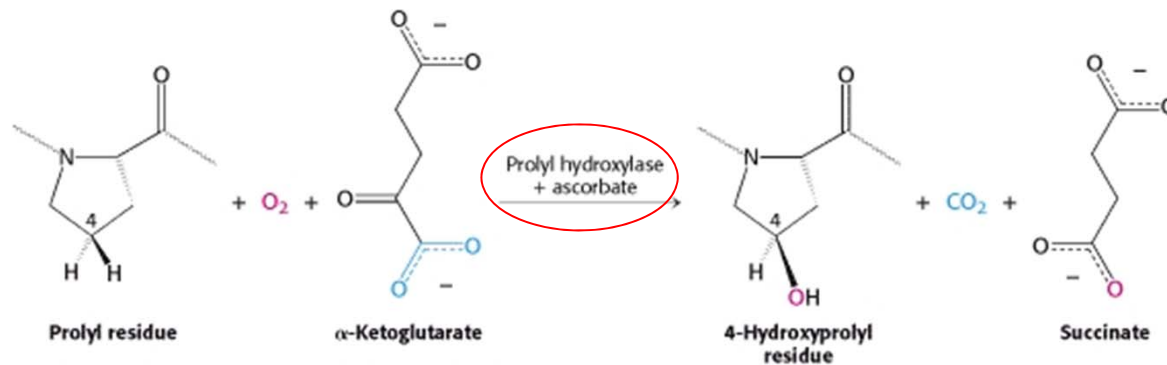
Kolagen in bolezni

-Do sedaj je poznanih 29 tipov kolagenov v telesu.

-Več kot 90% predstavljajo kolageni tipov I, II, III, in IV.

-Bolezni, povezane z nepravilnostmi kolagena so dedne, lahko pa nastanejo tudi zaradi neustrezne prehrane, ki vpliva na po-translacijske spremembe ali druge procese, pomembne v izgradnji kolagena.

-Skorbut – pomanjkanje vitamina C (askorbinske kisline) prepreči hidrosilacijo prolina. To poruši strukturo kolagena.

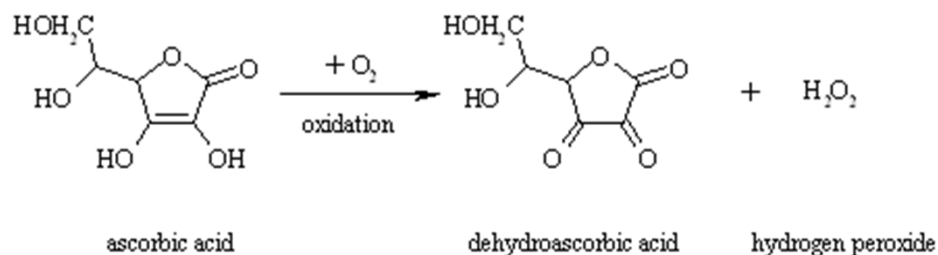


Presnova kolagena se spreminja s staranjem in boleznimi

- **staranje:** zmanjšanje količina kolagena, nastane več prečnih povezav med molekulami tropokolagena – krhkost vezivnega tkiva
- sinteza kolagena poraste **po poškodbi** – brazgotine vsebujejo veliko kolagena
- v jetrih se ob **boleznih parenhimske celice** nadomestijo s **fibroznim vezivnim tkivom** (ciroza jeter)
- nekatere **patogene anaerobne bakterije** (*Clostridium histolyticum*) vsebujejo **kolagenaze** → gas gangrena (plinska gangrena) → nekroza tkiva

Primeri bolezni, ki izvirajo iz nenormalne sinteze kolagena

bolezen	vzrok	simptomi
skorbut	pomanjkanje vitamina C	krvavenje dlesni, izpadanje zob, degeneracija kosti slabo celjenje ran
osteogenesis imperfecta	nenormalni gen za kolagen mutacija Gly → Ser ali Cys	nenormalen nastanek kosti pri dojenčkih, krhke kosti, deformacija skeleta/smrt
Ehlers-Danlos-ov sindrom	nenormalni gen za kolagen mutacija Gly → Ser ali Cys	preobčutljiva lomljiva koža, hipermobilni sklepi, slabo celjenje ran



Vitamin C je antioksidant

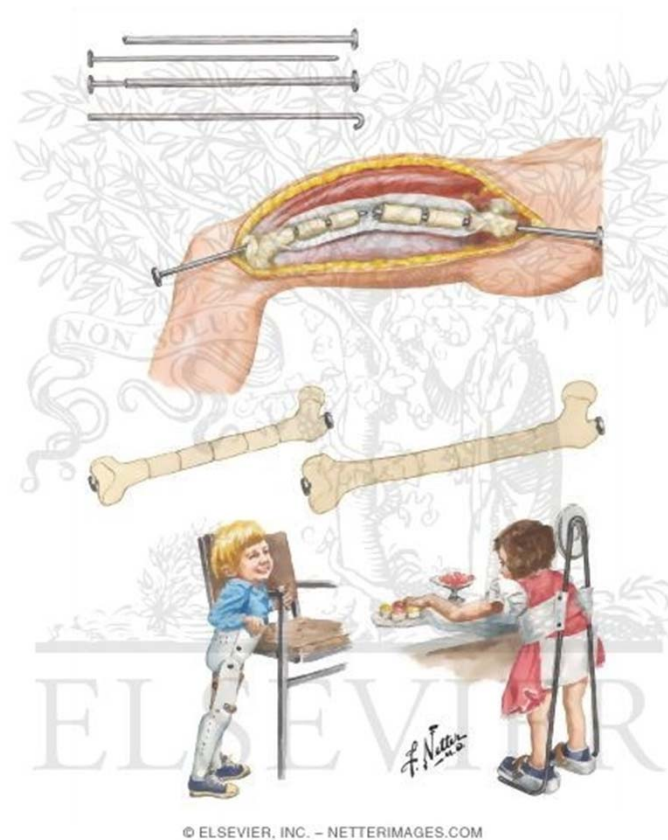
Osteogenesis imperfecta



Zlomi kosti med fetalnim razvojem



Deformacije skeleta



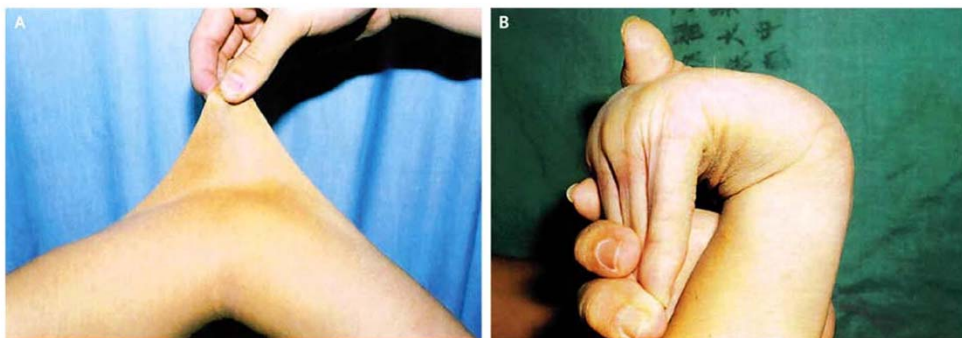
Ortopedski tretma

Ehlers-Danlos-ov sindrom (hiperelastičnost)

Prizadeti so koža, mišice, ligamenti, krvne žile, kjer kolagen igra pomembno vlogo.

V odvisnosti od vrste mutacije so oblike od blage do smrtnih.

Zdravil ni, obstaja le podporna terapija.



scicmulib09.wordpress.com



commons.wikimedia.org

Primerjava fibrilarnih proteinov keratina in kolagena

keratin	kolagen
desnosučna α -vijačnica	levosučna prolinska vijačnica
kvartarna struktura - levosučni dvojni heliks stabilizirajo hidrofobne in -S-S- interakcije	kvartarna struktura - desnosučni trojni heliks stabilizirano Pro/Pro in OH-Pro povezave
Supramolekulske komplekse stabilizirajo hidrofobne interakcije	Supramolekulske komplekse stabilizirajo povezeve preko OH-ak
Strukturna funkcija: citoskelet (intermediarni filamenti), lasje, nohti, keratini v koži	Strukturna funkcija ekstracelularnega matriksa

