

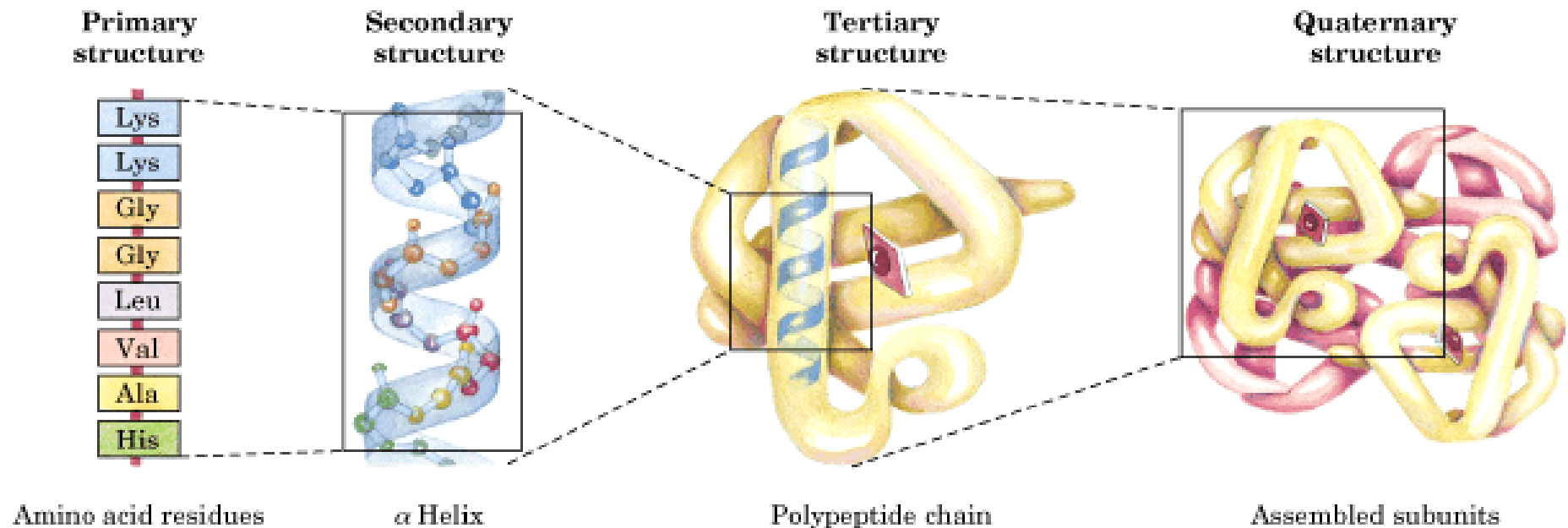
Nivoi strukture proteina
Primarna struktura proteina
Primeri post-translacionih modifikacija
proteina

Literatura:

PSF: pogl. 3: Voet: pogl. 6

Lehninger: pogl. 3

Nivoi strukture proteina (strukturna hijerarhija)



Kovalentna struktura proteina

Aminokiselinska sekvenca (primarna struktura)

- Određivanje aminokiselinske sekvence
- Molekulske bolesti

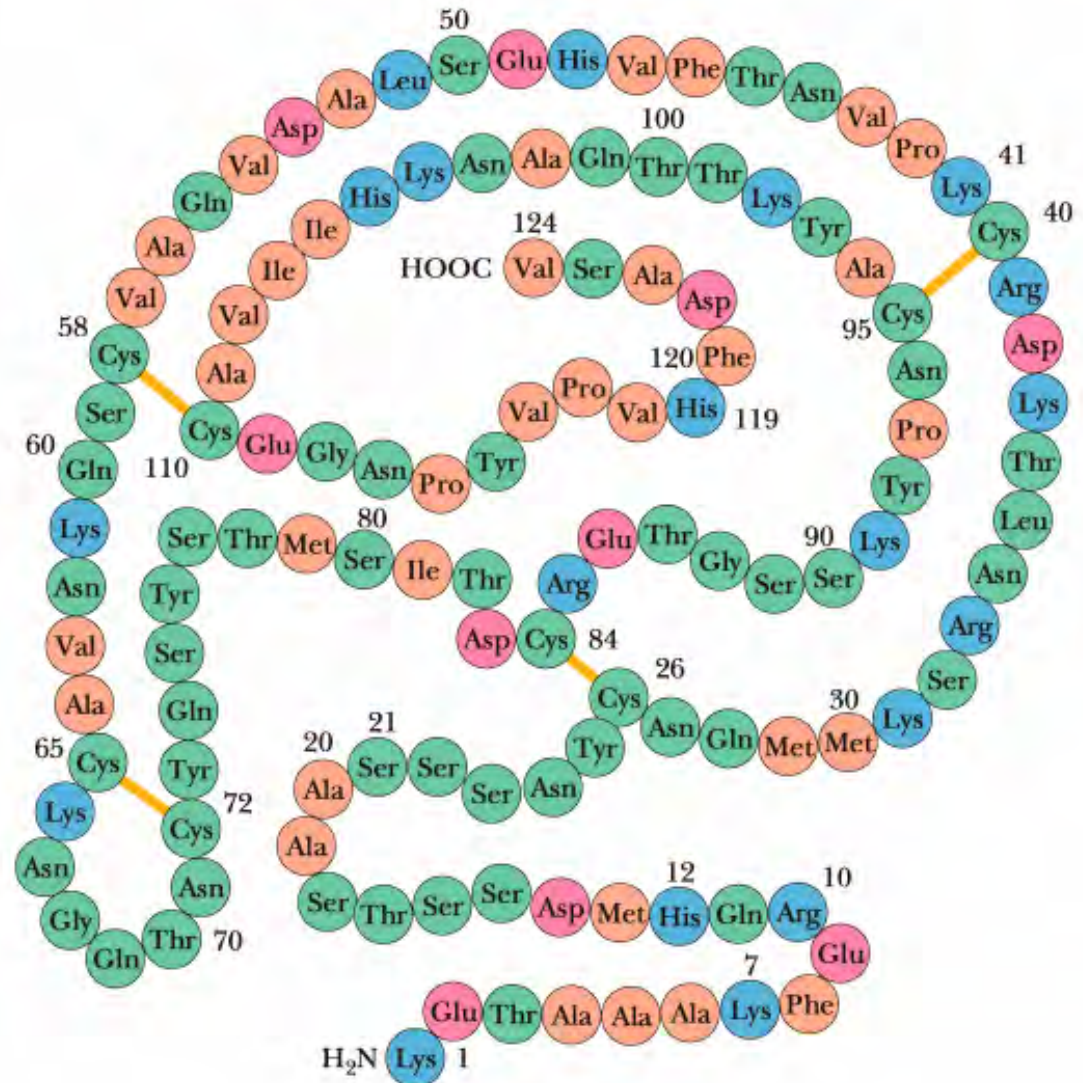
Post-translacione modifikacije proteina

- Glikoproteini

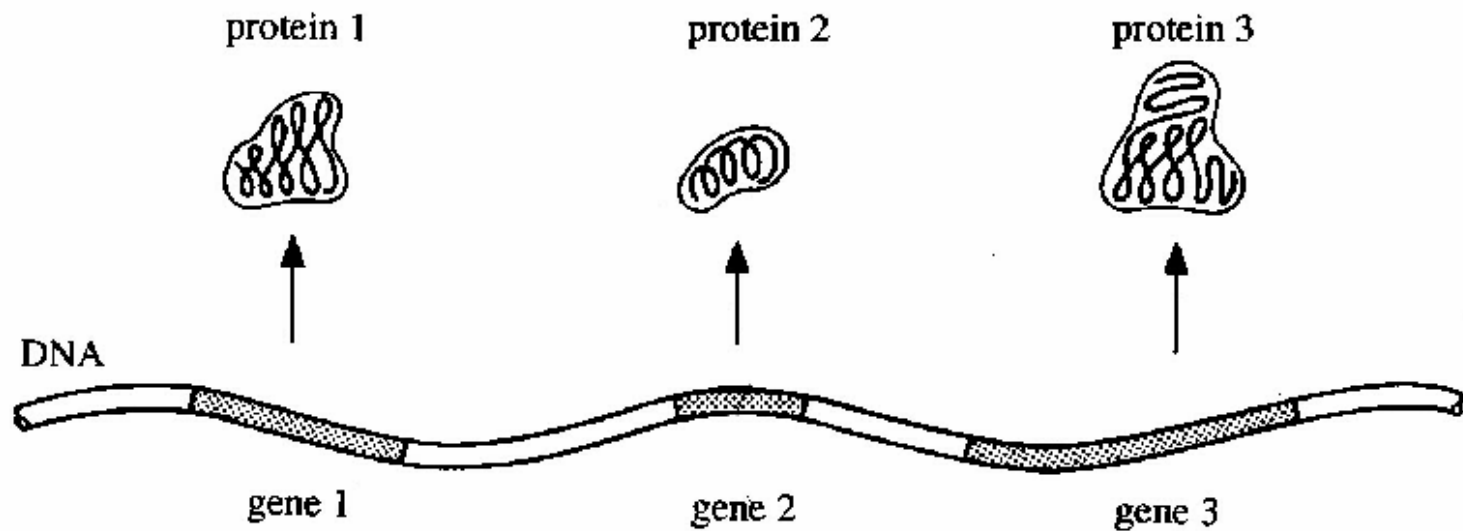
Aminokiselinska sekvenca (primarna struktura)

Redosled aminokiselina

Položaj disulfidnih mostova



Informacija za aminokiselinsku sekvencu proteina se nalazi u sekvenci nukleotida u određenom segmentu DNK (gen)



Sekvenca
DNK

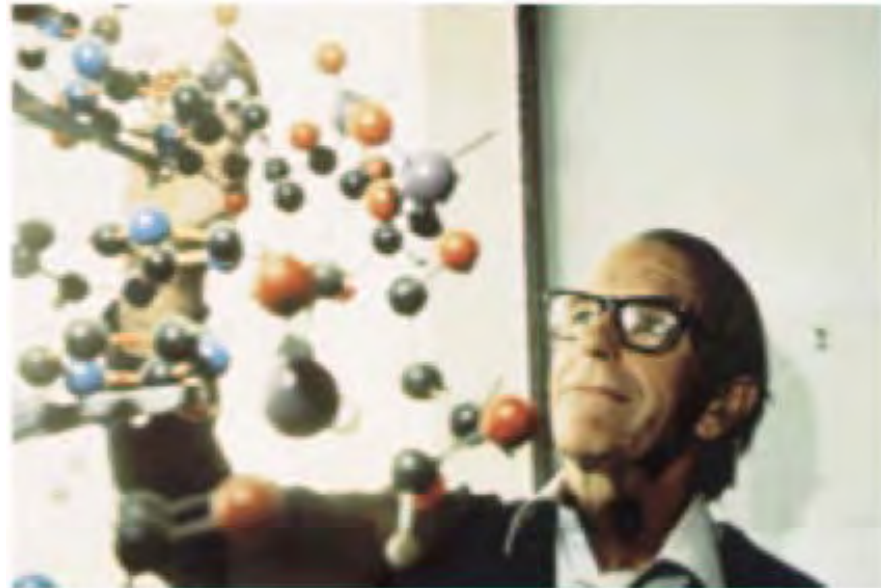
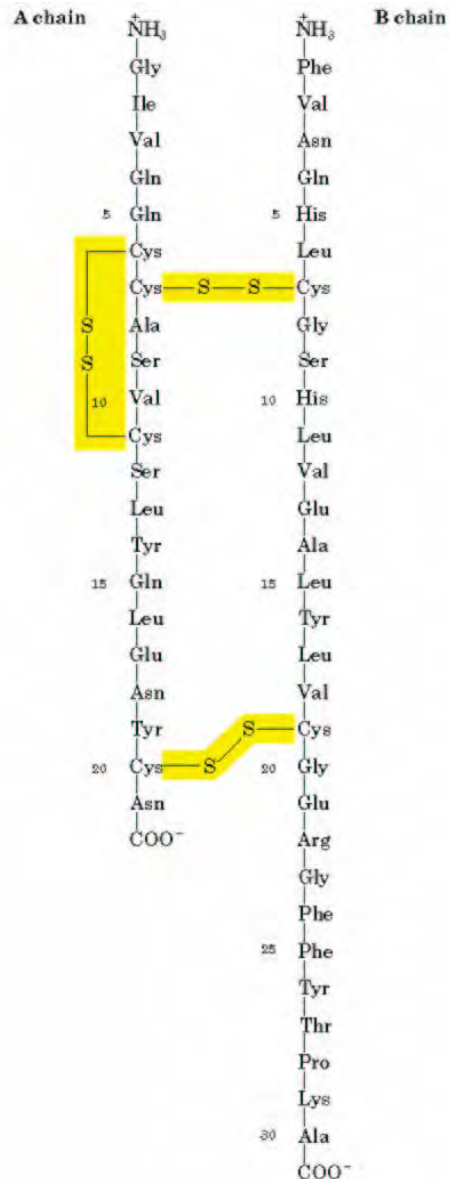
GGG TTC TTG GGA GCA GCA AGG AAG CAC TAT GGG GCA

Sekvenca
aminokiselina

Gly Phe Leu Gly Ala Ala Gly Ser Thr Met Gly Ala

- Aminokiselinska sekvenca proteina može da se odredi:
 - sekvenciranjem proteina
 - sekvenciranjem gena

Insulin: prvi protein čija je aminokiselinska sekvenca određena 1953.g.



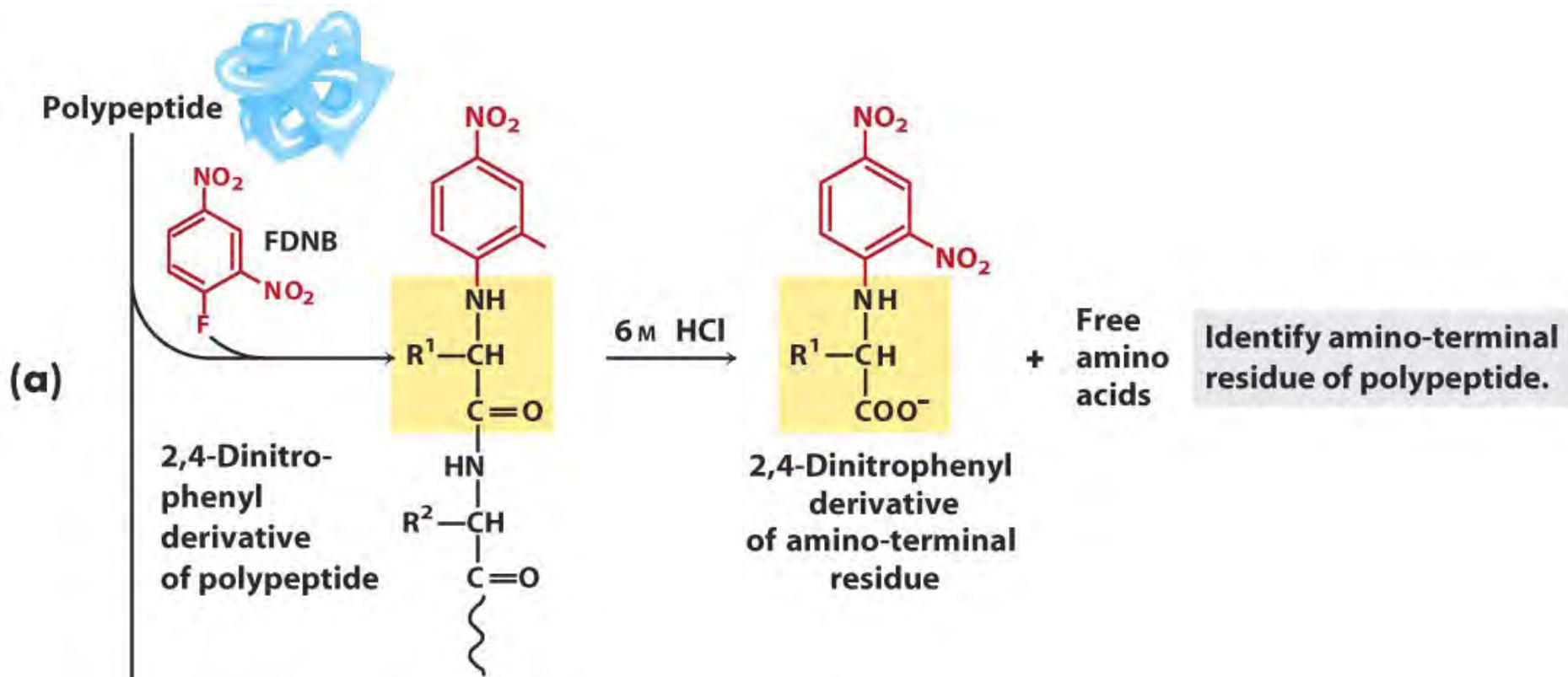
Frederick Sanger

- * Izolovano i potrošeno 100 g insulina
- * 10 godina rada
- * desetak doktora nauka
-a sada?

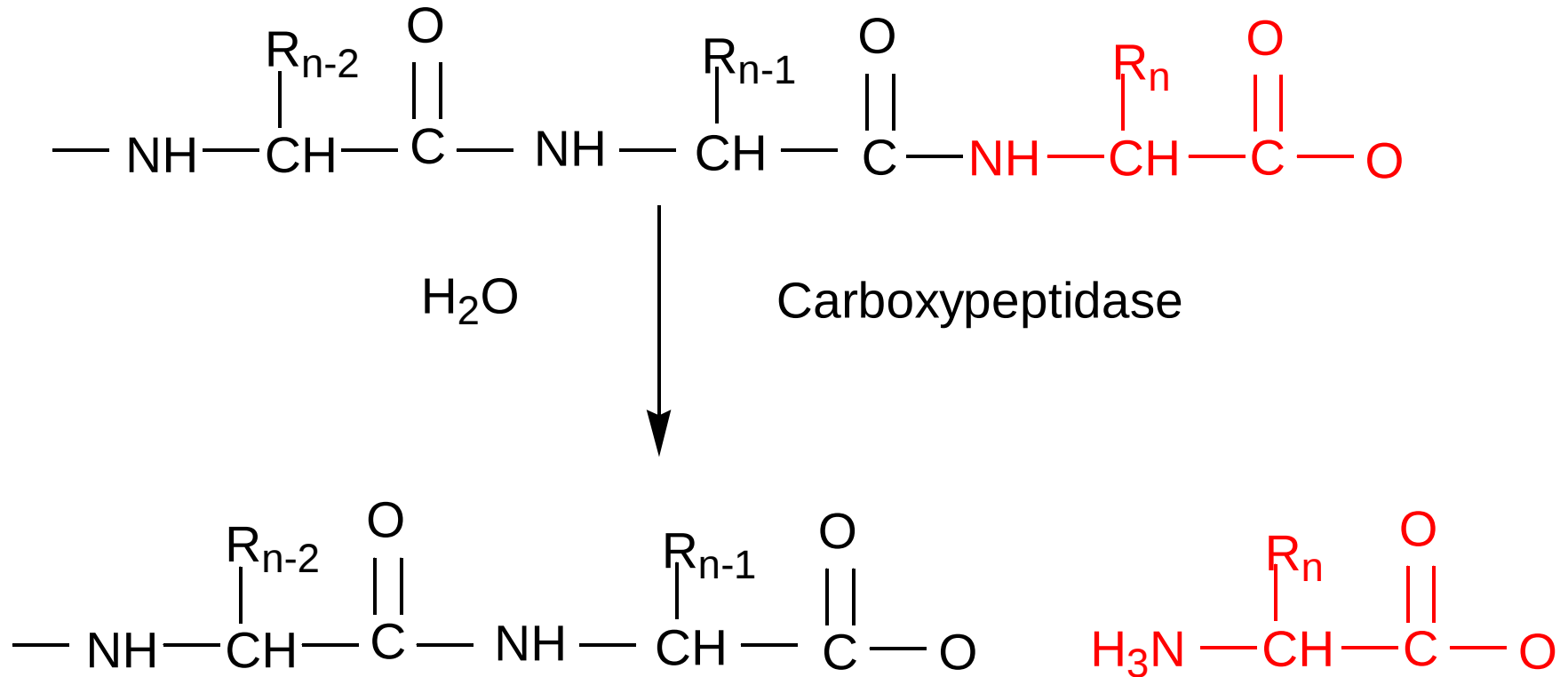
Određivanje aminokiselinske sekvence: postupak u 8 koraka

- Odredi/identifikuj N- i C- terminalne aminokiseline,
- ✓ Ako protein ima više nizova razdvoj ih,
- Redukuj disulfidne mostove i zaštiti SH grupe,
- ✓ Odredi aminokiselinski sastav svakog niza,
- Sekvenciraj niz sa N-kraja,
- Fragmentiši niz enzimatski i/ili hemijski i sekvenciraj svaki od fragmenata,
- Rekonstituiši fragmente,
- Odredi položaj disulfidnih mostova.

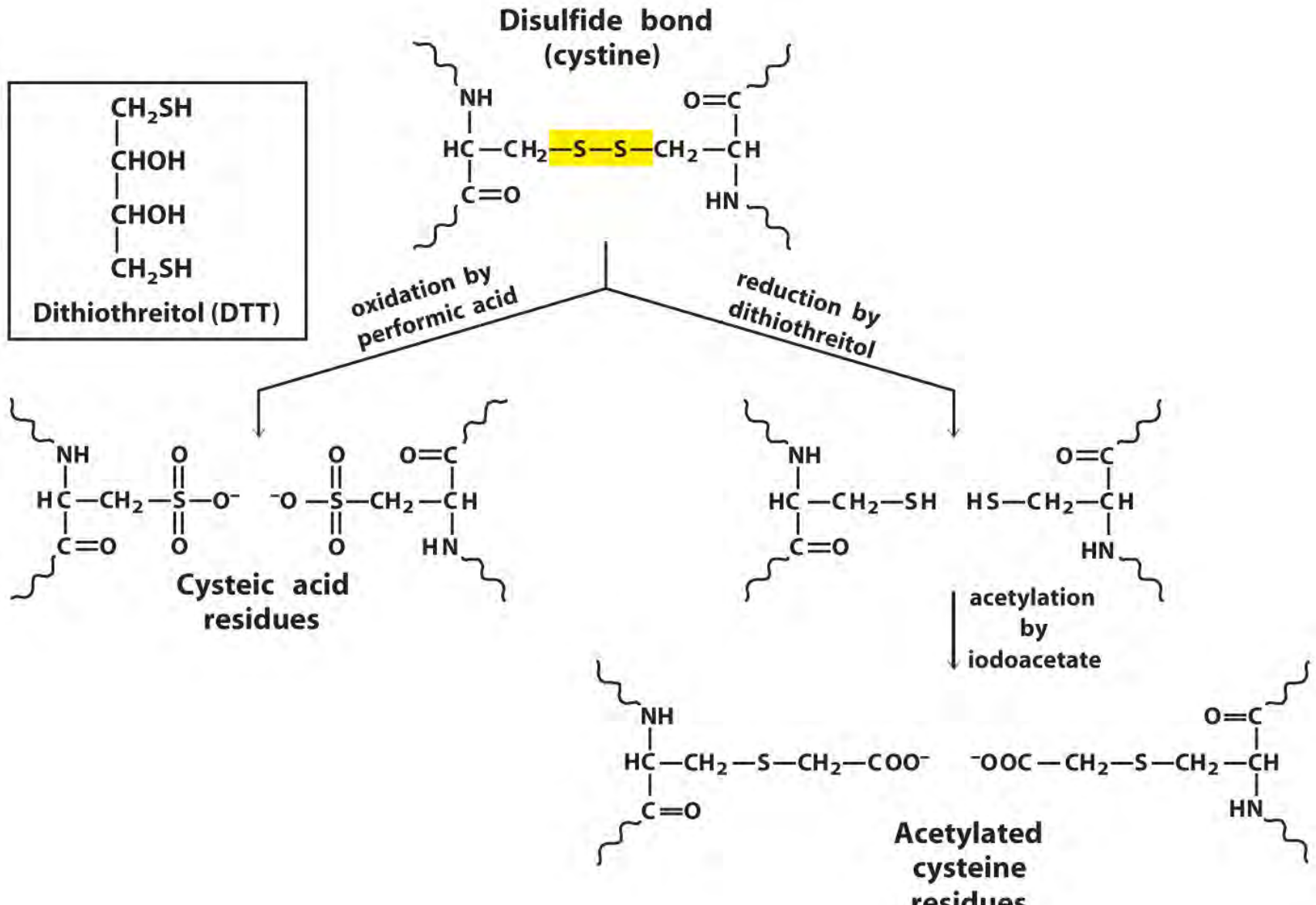
Identifikacija N-terminalnih aminokiselina



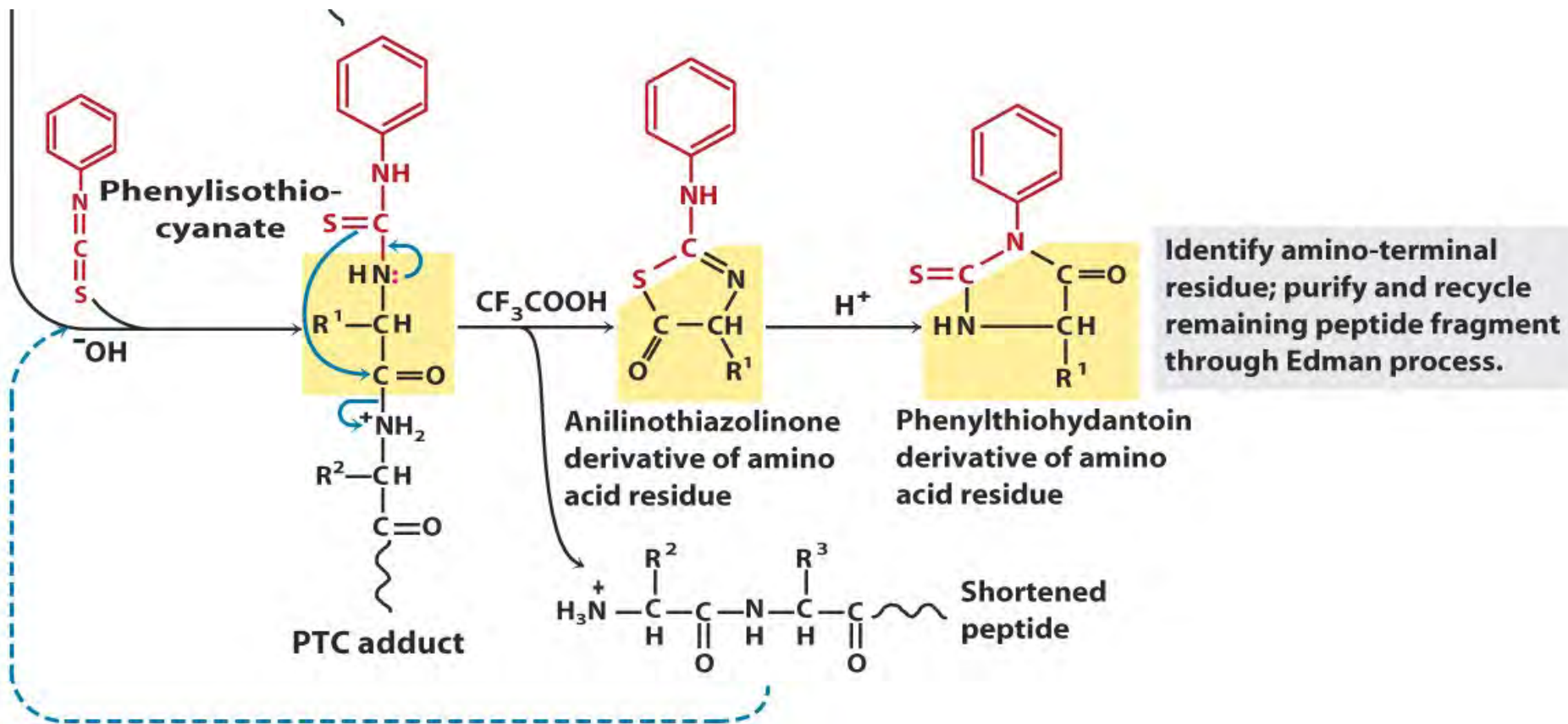
Identifikacija C-terminalnih aminokiselina



Cepanje disulfidnih veza (mostova): redukcija i zaštita SH grupa

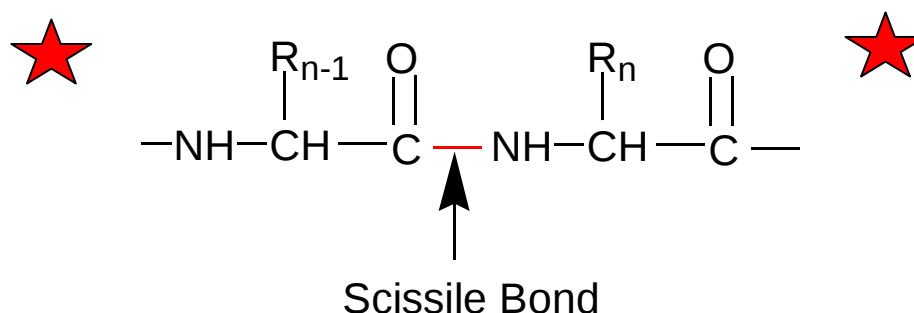


Sekvenciranje niza sa N kraja: Edmanova degradacija



Fragmentacija dugih polipeptidnih nizova

Endopeptidaze cepaju proteine na specifičnim mestima u peptidnom nizu

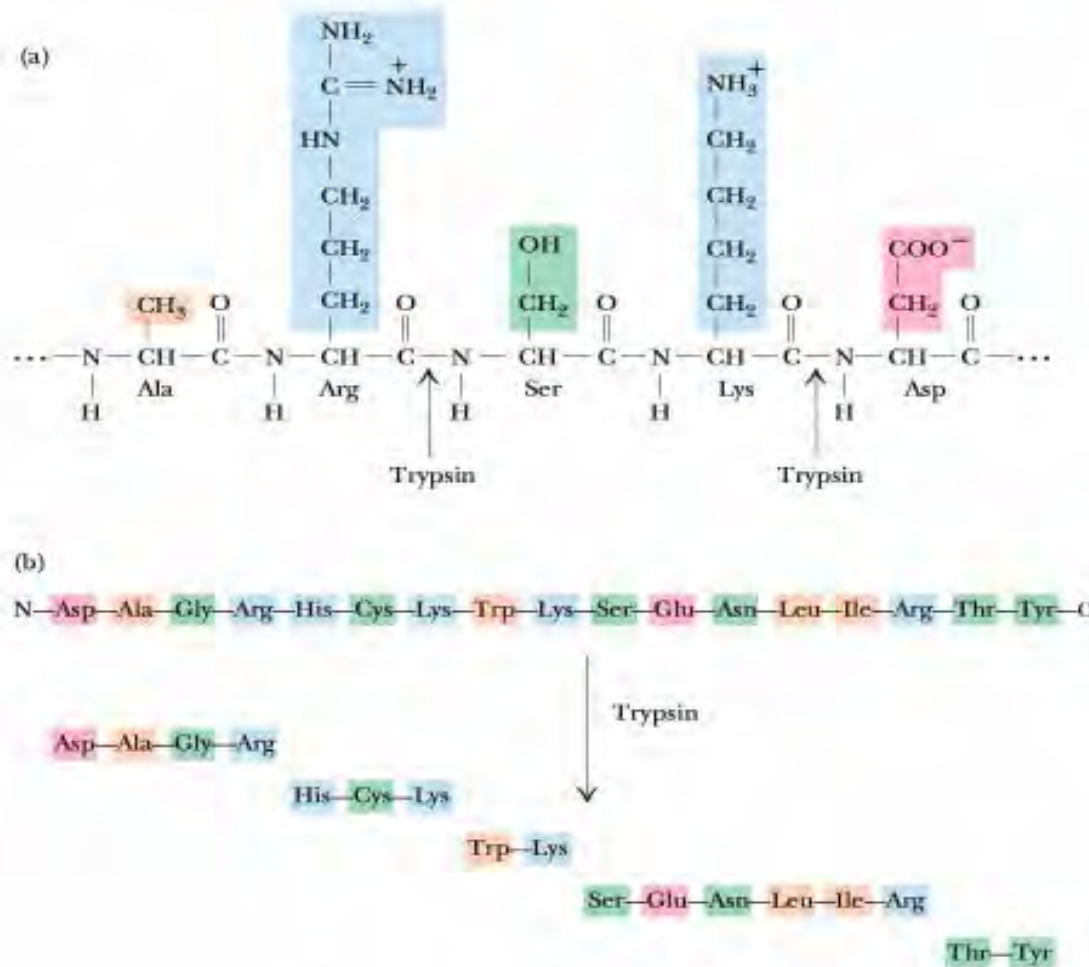


Trypsin R_{n-1} = pozitivno naelektrisani ostaci R, K; $R_n \neq P$

Chymotrypsin R_{n-1} = volumnozni hidrofobni ostaci F, W, T; $R_n \neq P$

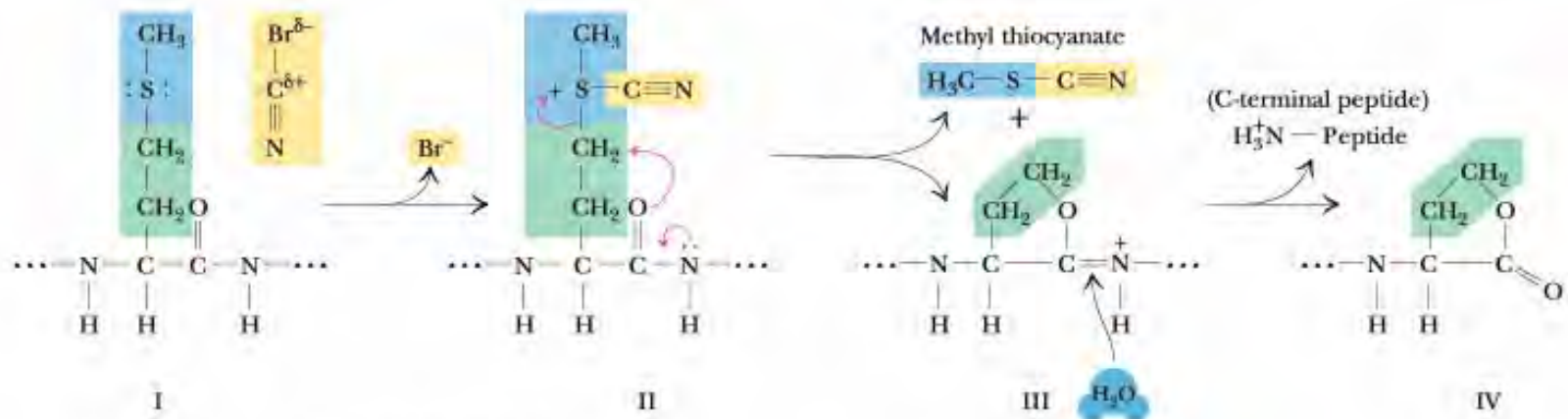
Cepanje niza tripsinom

Garrett & Grisham: Biochemistry, 2/e
Figure 5.20

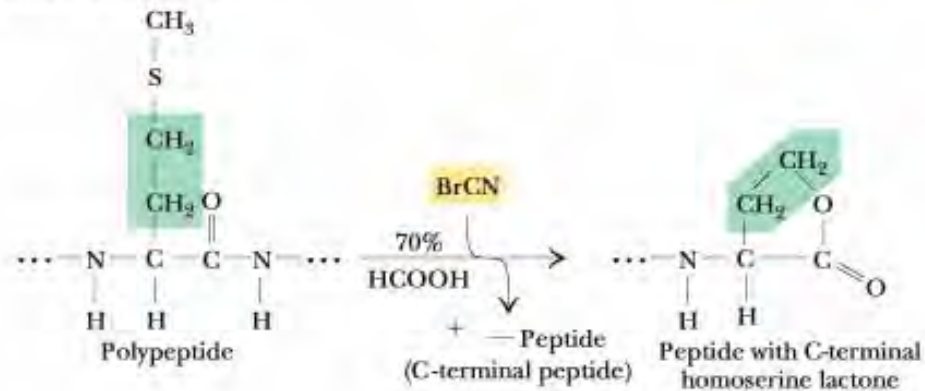


Cepanje niza: cijanogen bromid

Garrett & Grisham: Biochemistry, 2/e
Figure 5.21

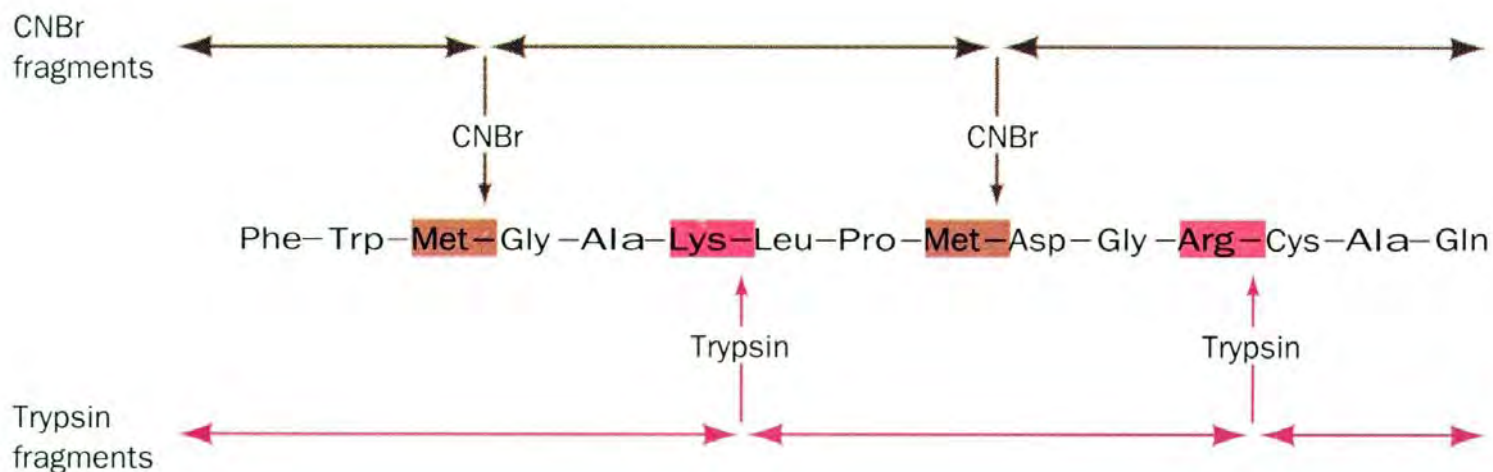


OVERALL REACTION:



Rekonstrukcija fragmenata

- Izvrši cepanje tripsinom i sekvenciraj sve fragmente (ne znamo redosled fragmenata!!!)
- Izvrši cepanje sa nekim drugim agensom, na primer cijanogen bromidom, razdvoj fragmene i sekvenciraj svaki od njih. Preklopi fragmente i nađi celokupnu sekvencu!!!



14



K

F - A - M - K

K - F - A - M

Q - M - K

D - I - K - Q - M

G - M - D - I - K

Y - R - G - M

Y - R

Cijanogen bromid (CN-Br) cepa na M - X

D - I - K - Q - M

K

K - F - A - M

Y - R - G - M

Trypsin cepa posle K ili R
(pozitivno naelektrisane
aminokiseline)

Q - M - K

G - M - D - I - K

F - A - M - K

Y - R

Informacije sadržane u primarnoj strukturi:

Biohemijska evolucija (istorija proteina)

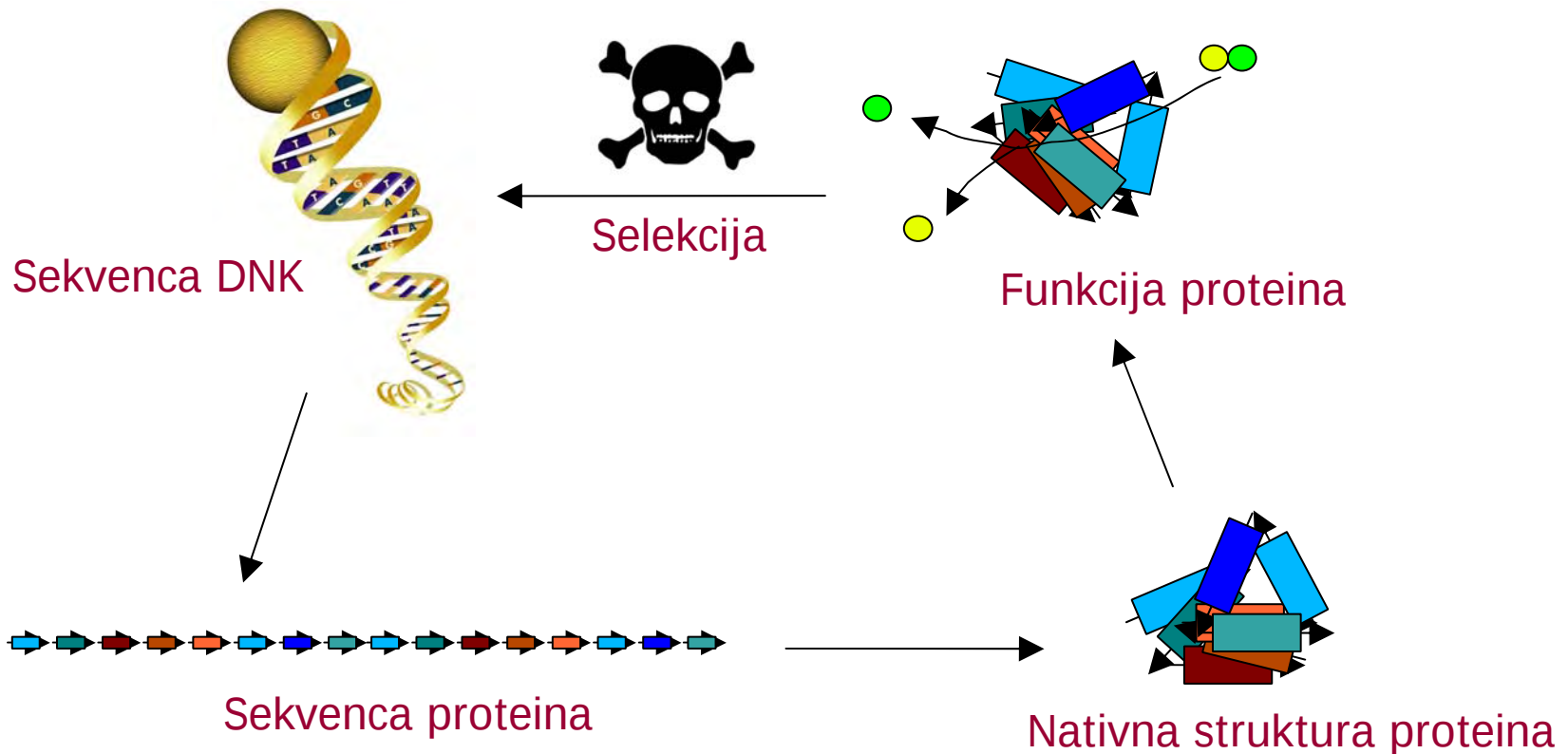
Genetske bolesti: primer mutacije hemoglobina u srpastoj anemiji

Primarna struktura određuje više nivooe strukture

Predviđanje strukture proteina

Evolucija proteina:

Sekvenca – Struktura - Funkcija



Biohemijska evolucija (istorija proteina)

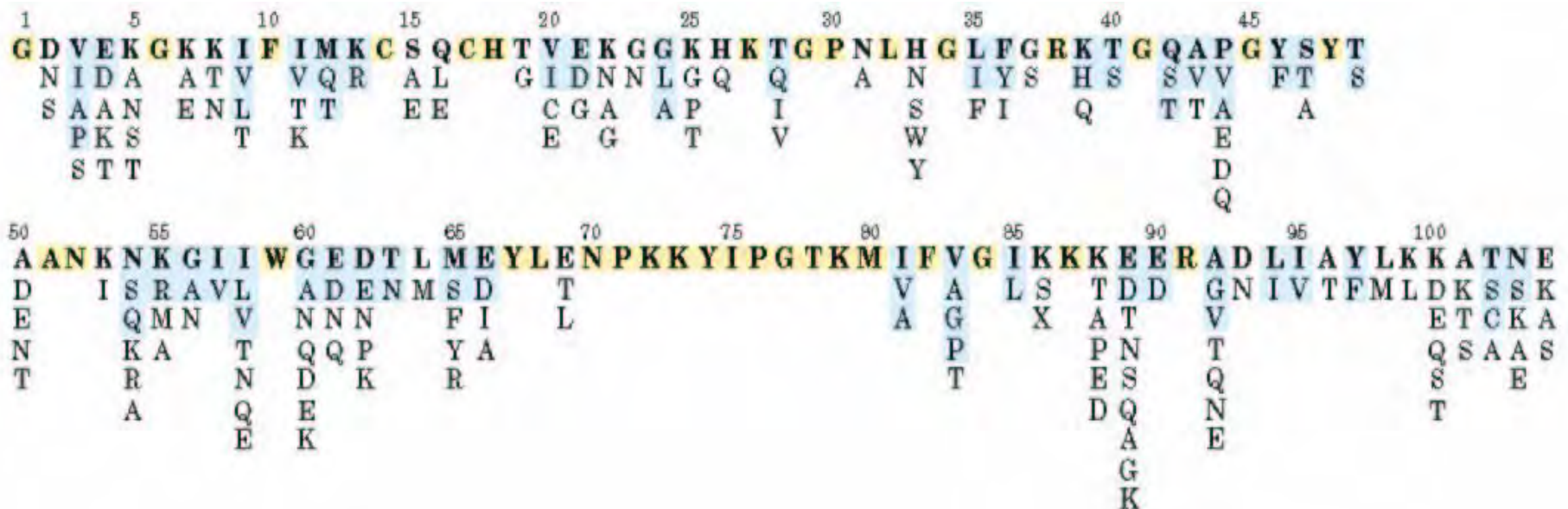
Homologi proteini:

- *u različitim organizmima vrše istu funkciju
- *imaju zajedničko poreklo
- * međusobno se razlikuju u sekvenci do 30%

Izmene u sekvenci citohroma c u raznim vrstama

■ invajirantni ostaci

■ konzervativne izmene



Homologi proteini

Uporedi proteinske sekvence:

Invarijantni ostaci: reflektuju hemijske neophodnosti!

Konzervativne izmene: supstitucija sa sličnim hemijskim osobinama, npr Asp sa Glu, Lys sa Arg, Ile sa Val.

Varijabilne oblasti: nema posebnih zahteva, npr za hemijske reakcije itd.

Filogenetsko stablo

Predstavlja odnos među organizmima koji proizvode protein.

Svaka tačka granjanja ukazuje na zajedničkog pretka.

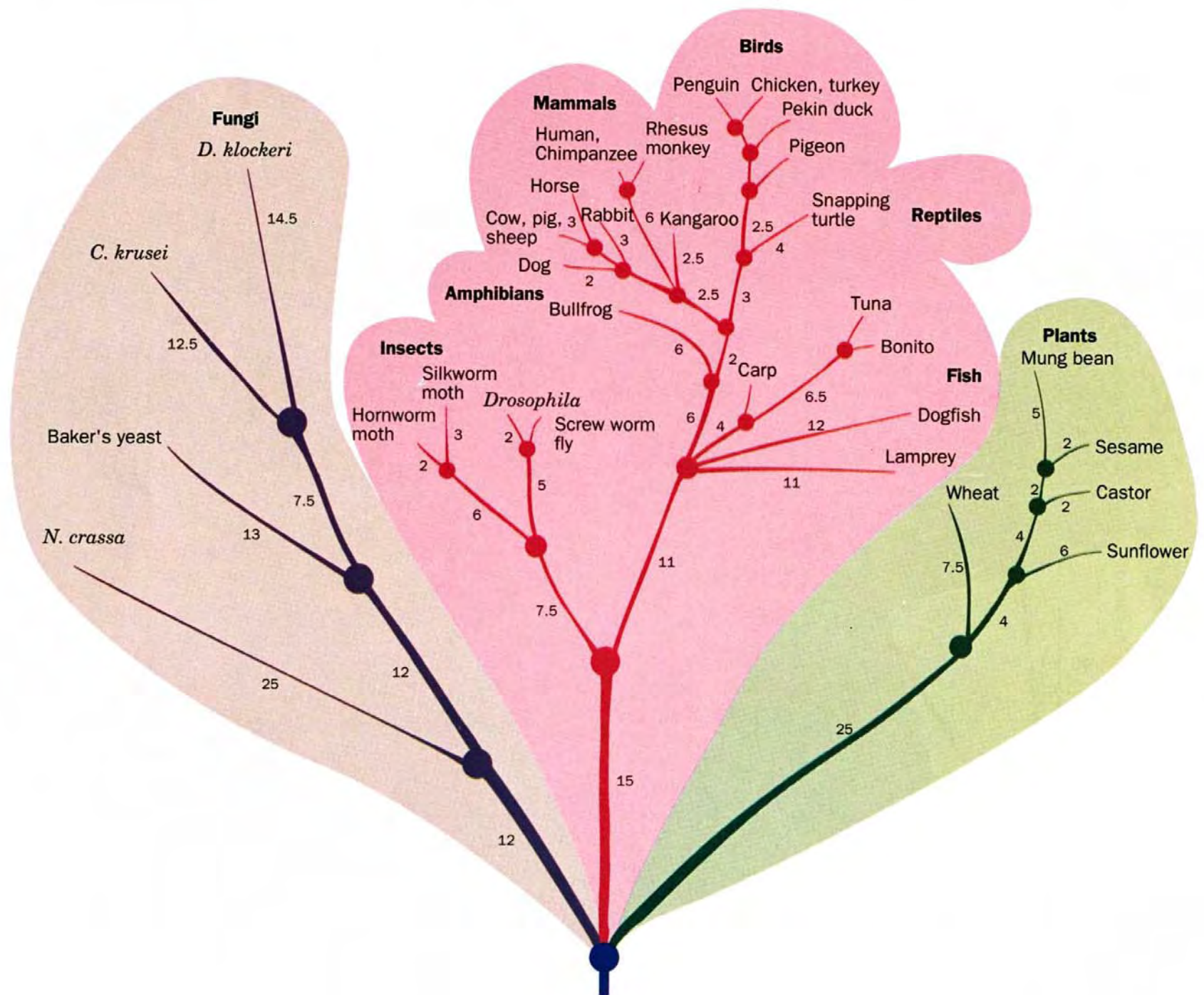
Relativno evoluciono rastojanje među tačkama granjanja se izražava u broju izmena na 100 aminokiselinskih ostataka u proteinu.

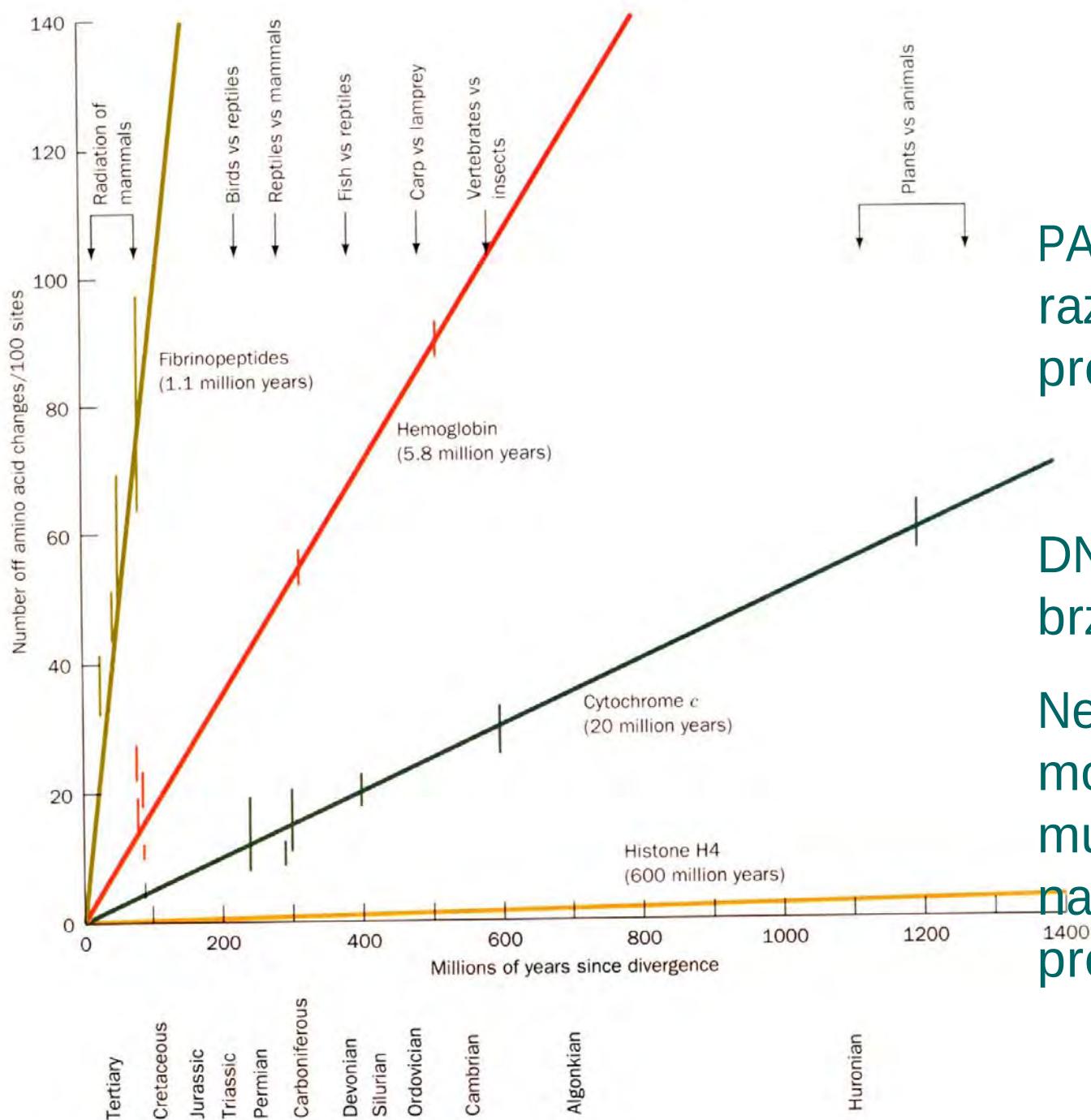
PAM jedinice: “Percentage of Accepted Mutations”

Razlike u aminokiselinskoj sekvenci za citohrom c u 26 vrsti

Man, chimp	0																					
Rh. monkey	1	0	Prosečne razlike																			
Horse	12	11	0																			
Donkey	11	10	1	0	10.0																	
cow, sheep	10	9	3	2	0																	
dog	11	10	6	5	3	0																
gray whale	10	9	5	4	2	3	0	5.1														
rabbit	9	8	6	5	4	5	2	0														
kangaroo	10	11	7	8	6	7	6	6	0													
Chicken	13	12	11	10	9	10	9	8	12	0												
penguin	13	12	12	11	10	10	9	8	10	2	0	9.9										
Duck	11	10	10	9	8	8	7	6	10	3	3	0	14.3									
Rattlesnake	14	15	22	21	20	21	19	18	21	19	20	17	0	12.6								
turtle	15	14	11	10	9	9	8	9	11	8	8	7	22	0								
Bullfrog	18	17	14	13	11	12	11	11	13	11	12	11	24	10	0							
Tuna fish	21	21	19	18	17	18	17	17	18	17	18	17	26	18	15	0	18.5					
worm fly	27	26	22	22	22	21	22	21	24	23	24	22	29	24	22	24	0					
silk moth	31	30	29	28	27	25	27	26	28	28	27	27	31	28	29	32	14	0	25.9			
Wheat	43	43	46	45	45	44	44	44	47	46	46	46	46	46	48	49	45	45	0			
Bread mold	48	47	46	46	46	46	46	46	49	47	48	46	47	49	49	48	41	47	54	0	47.0	
Yeast	45	45	46	45	45	45	45	45	46	46	45	46	47	49	47	47	45	47	47	41	0	
Candida k.	51	51	51	50	50	49	50	50	51	51	50	51	51	53	51	48	47	47	50	42	27	0

Man, chimp	monkey	Horse	Donkey	cow, sheep	dog	gray whale	rabbit	kangaroo	Chicken,	penguin	Duck	Rattlesnake	turtle	Bullfrog	Tuna fish	worm fly	silkworm	Wheat	Bread mold	Yeast	Candida
------------	--------	-------	--------	------------	-----	------------	--------	----------	----------	---------	------	-------------	--------	----------	-----------	----------	----------	-------	------------	-------	---------





PAM vrednosti se razlikuju za razne proteine.

DNK mutira istom brzinom.

Neki proteini ne mogu da prihvate mutacije jer one narušavaju funkciju proteina!!!

Evolucija udvostručavanjem gena

Mnogi proteini u istom organizmu pokazuju međusobne sličnosti u sekvenci.

- Oni pripadaju genskim ili proteinskim familijama.
- Srodnost među članovima familije može veoma da varira.
- Ove familije nastaju duplikacijom gena.
- Jednom udvostručeni pojedinačni geni mogu da mutiraju u posebne gene.
- Ovi udvostručeni geni daju proizvode (proteine) sa različitim svojstvima.
- Primer: globinska familija.

Hemoglobin:

Protein koji transportuje kiseonik.

Mora da vezuje i otpušta kiseonik prema zahtevu ćelija.

Mioglobin:

Čuva (skladišti) kiseonik

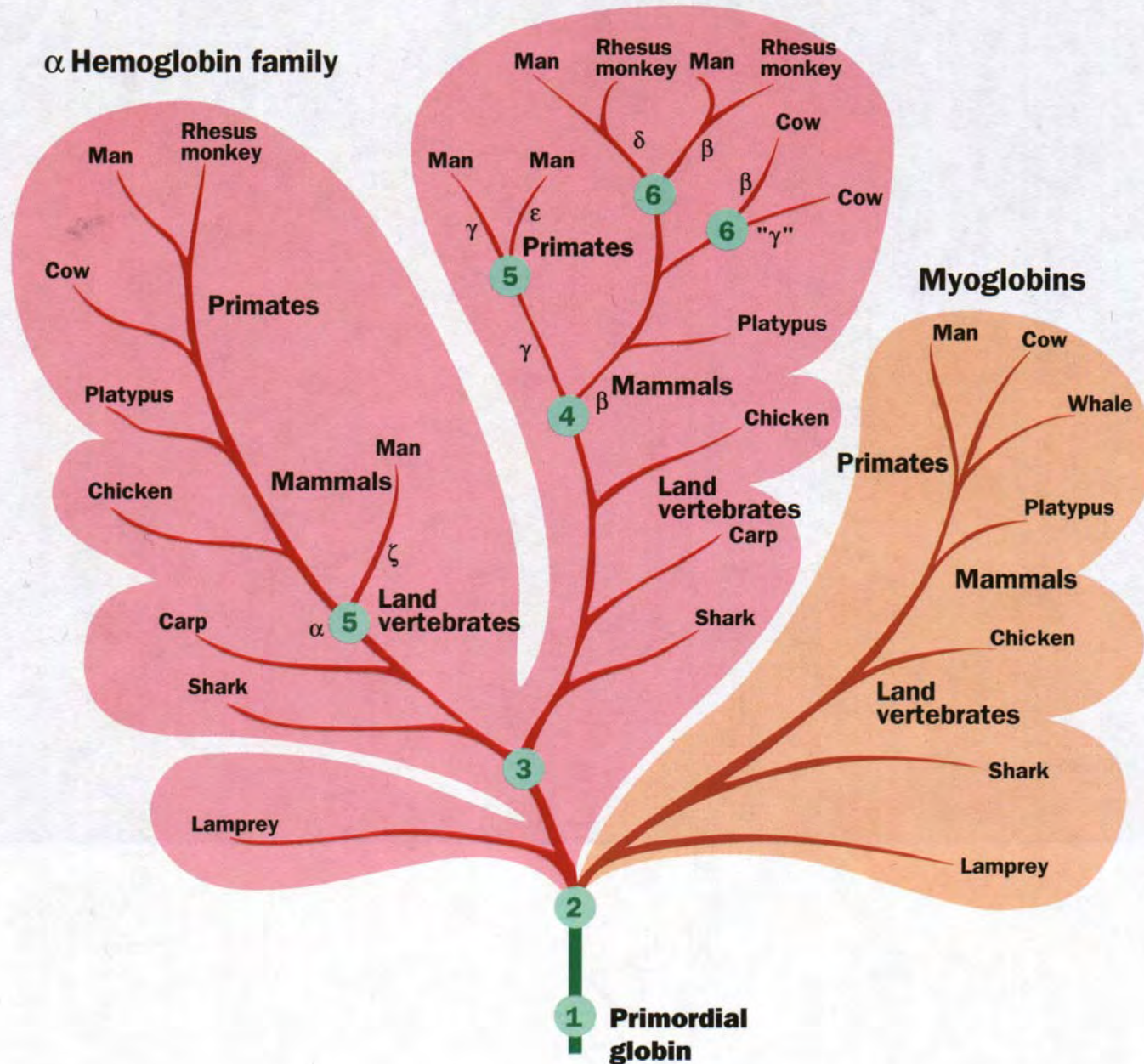
Vezuje čvrsto kiseonik i oslobađa ga kada je koncentracija kiseonika niska!

Istorija globinske familije: duplikacija gena

1. Primordijalni gen globina: protein za čuvanje kiseonika.
2. Duplikacija gena nastala pre 1.1 milijardi godina.
3. Daljim tačkastim mutacijama razvili se α i β nizovi hemoglobina:
 - povećanje kapaciteta vezivanja O_2
 - regulacija aktivnosti hemoglobina

β Hemoglobin family

α Hemoglobin family



Evolucija proteina nije evolucija organizama

Proteini šimpanze i čoveka imaju oko 99% identičnu aminokiselinsku sekvencu!!!! iako se čovek i šimpanza toliko razlikuju da su stavljeni u različite vrste!!!

- Velika brzina divergencije sa malo mutacija ukazuje na promene u kontroli ekspresije gena.
- Kontroliše se količina, gde, i kada će protein nastati!

Genetske bolesti: primer mutacije hemoglobina u srpastoj anemiji

1904

Dr James Herrick iz Čikaga otkrio srpaste eritrocite kod mladog crnca koji je patio od jake anemije.

Srpasta anemija je prva otkrivena genetska (molekulska) bolest.

Normalni i srpasti eritrociti



(a)

2 μm



(b)

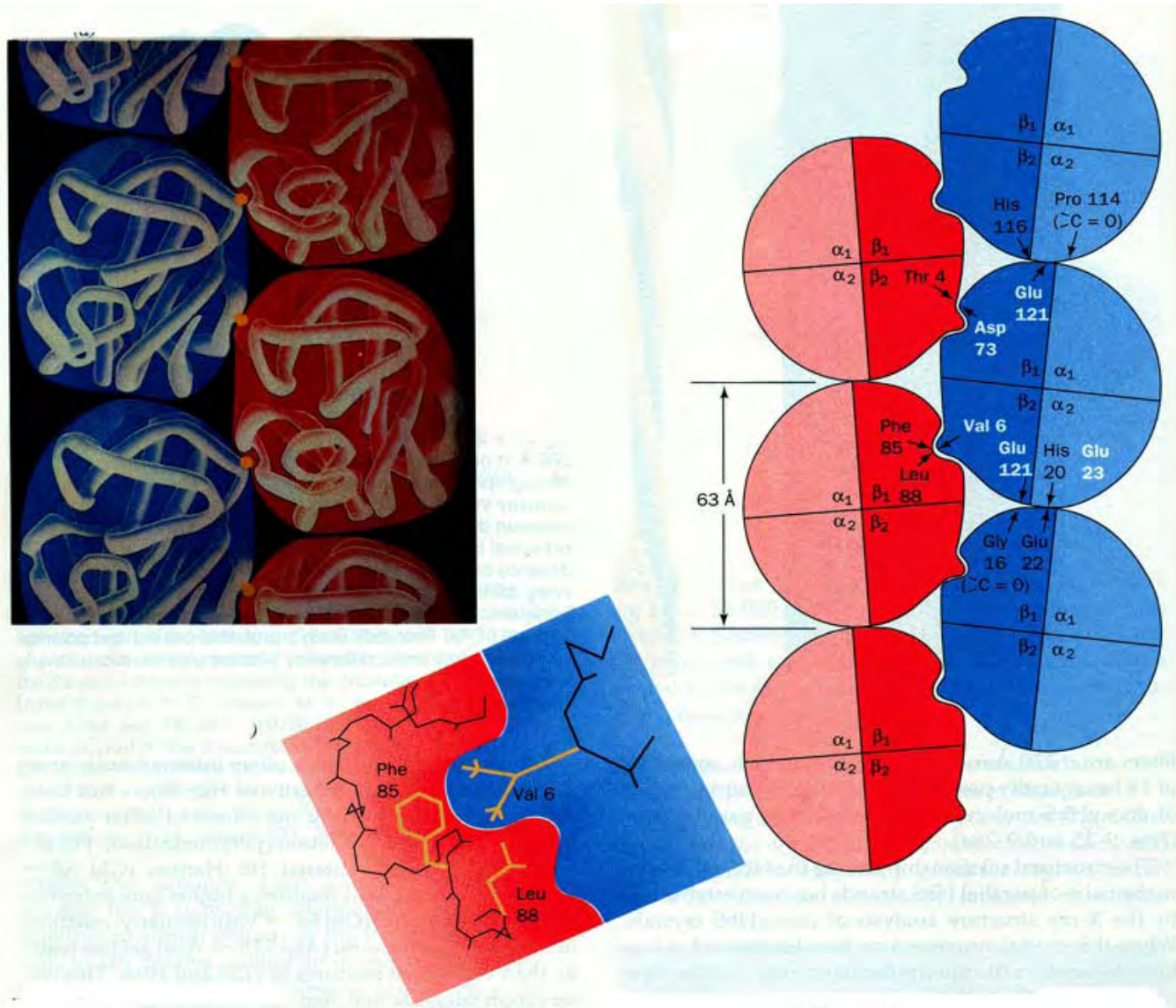
Razlika u aminokiselinskoj sekvenci

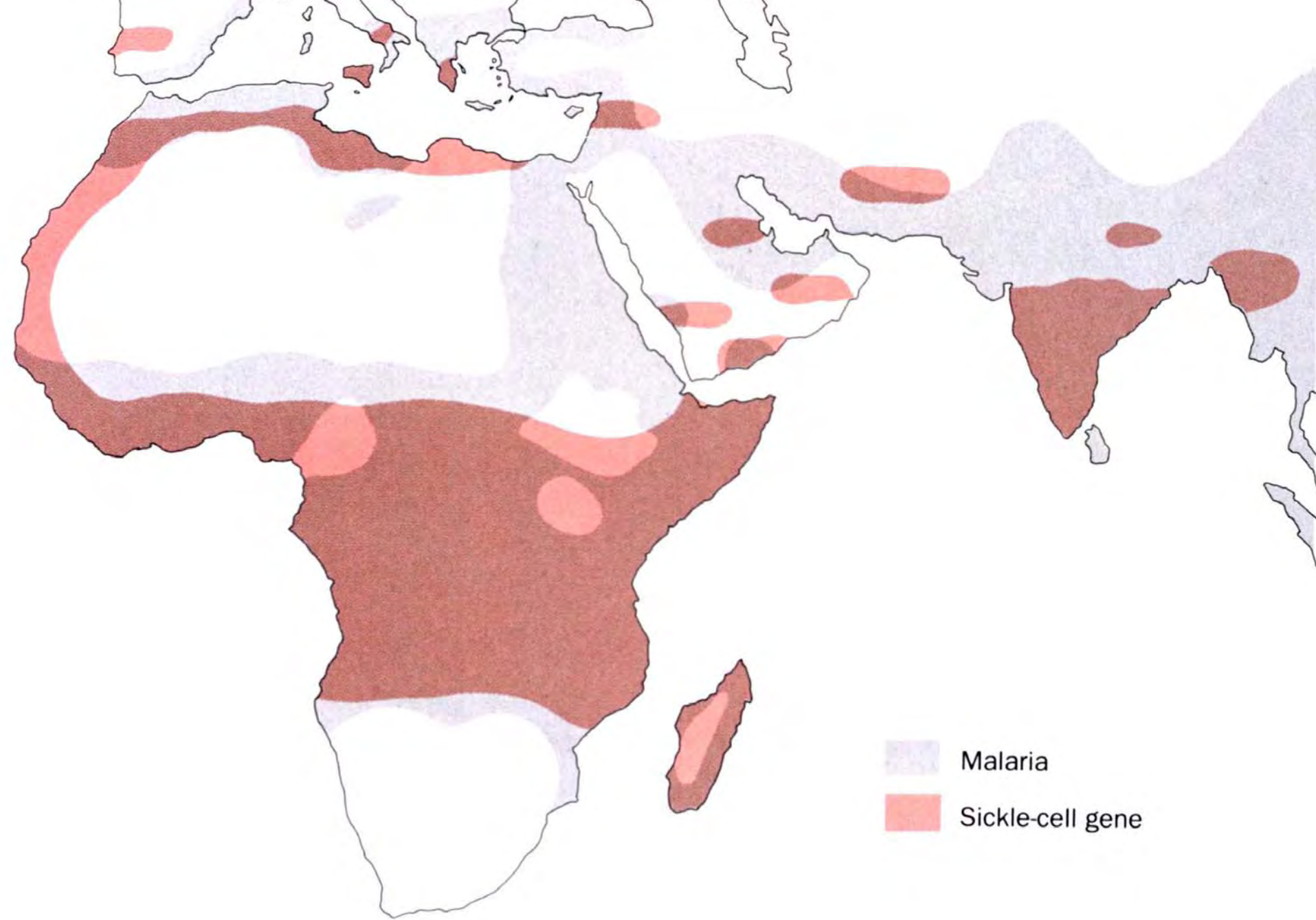
Hb: Val-His-Leu-Thr-Pro-Glu-Glu-Lys

HbS: Val-His-Leu-Thr-Pro-Val-Glu-Lys

β 1 2 3 4 5 6 7 8

HbS se agrega





Zašto je problem još uvek aktuelan?

Homozigoti
normalni

dobijaju
malaria



umiru

Heterozigoti
sa srpastim
genom

rezistentni
na malaria

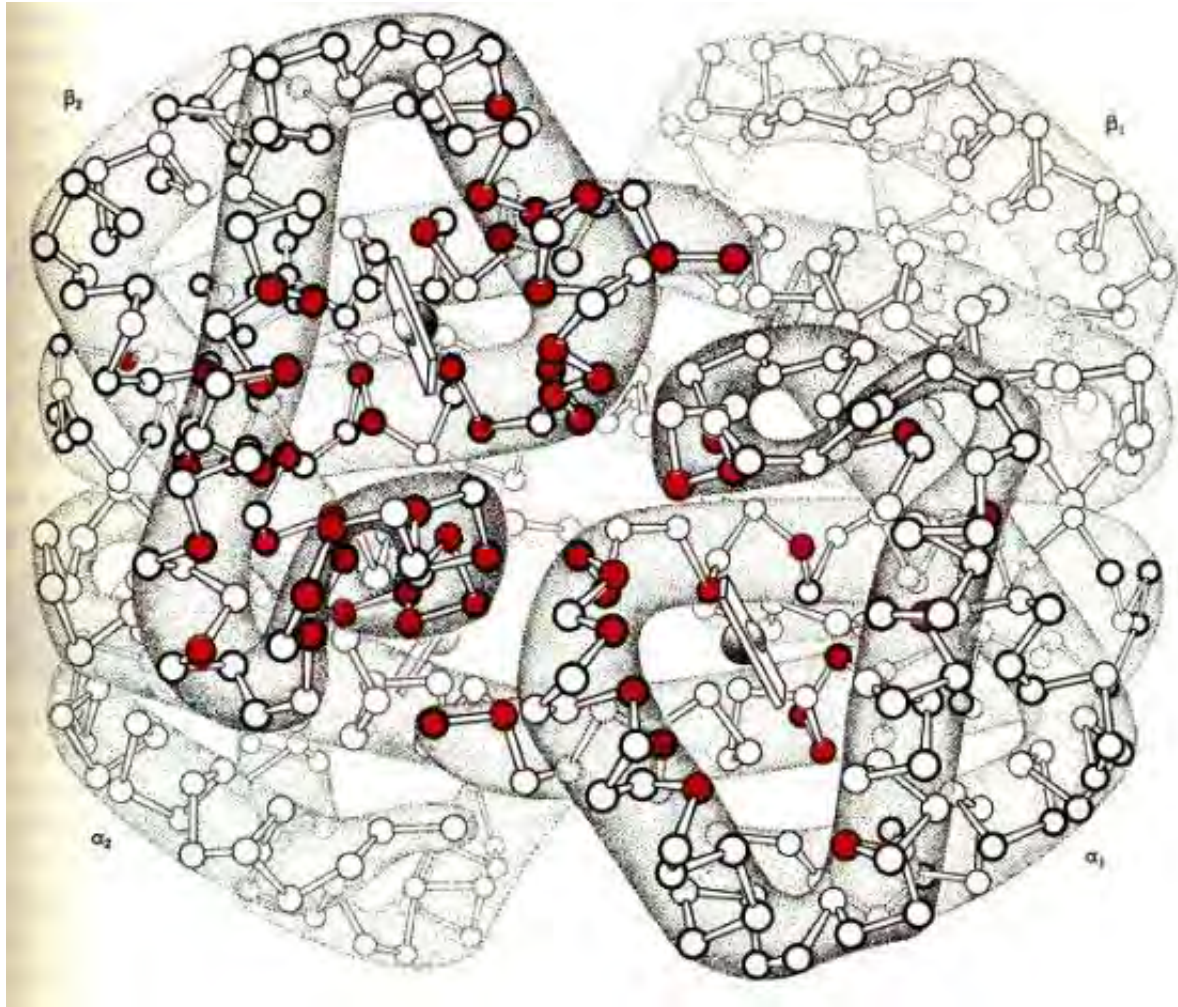
Homozigoti
srpasti gen

dobijaju
anemiju



umiru

U molekulu Hb detektovano preko 150 mutacija, ali većina nije fatalna!



Baze podataka

- Proteinske baze podataka

www.uniprot.org

<http://www.expasy.org/sprot/>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein>

UNIPROT (Swiss-Prot + TrEMBL)

Swiss-Prot – proteini detektovani na nivou proteina ili mRNA

TrEMBL – hipotetički proteini, sekvenca dobijena prepisivanjem i prevođenjem sekvenci gena iz genomskih baza podataka

Post-translacione kovalentne modifikacije

na N-terminusu (kraju)

na C-terminusu

na bočnim ostacima
određenih amino ostataka u sekvenci

Post-translacione kovalentne modifikacije

Acilovanje

Glikozilovanje

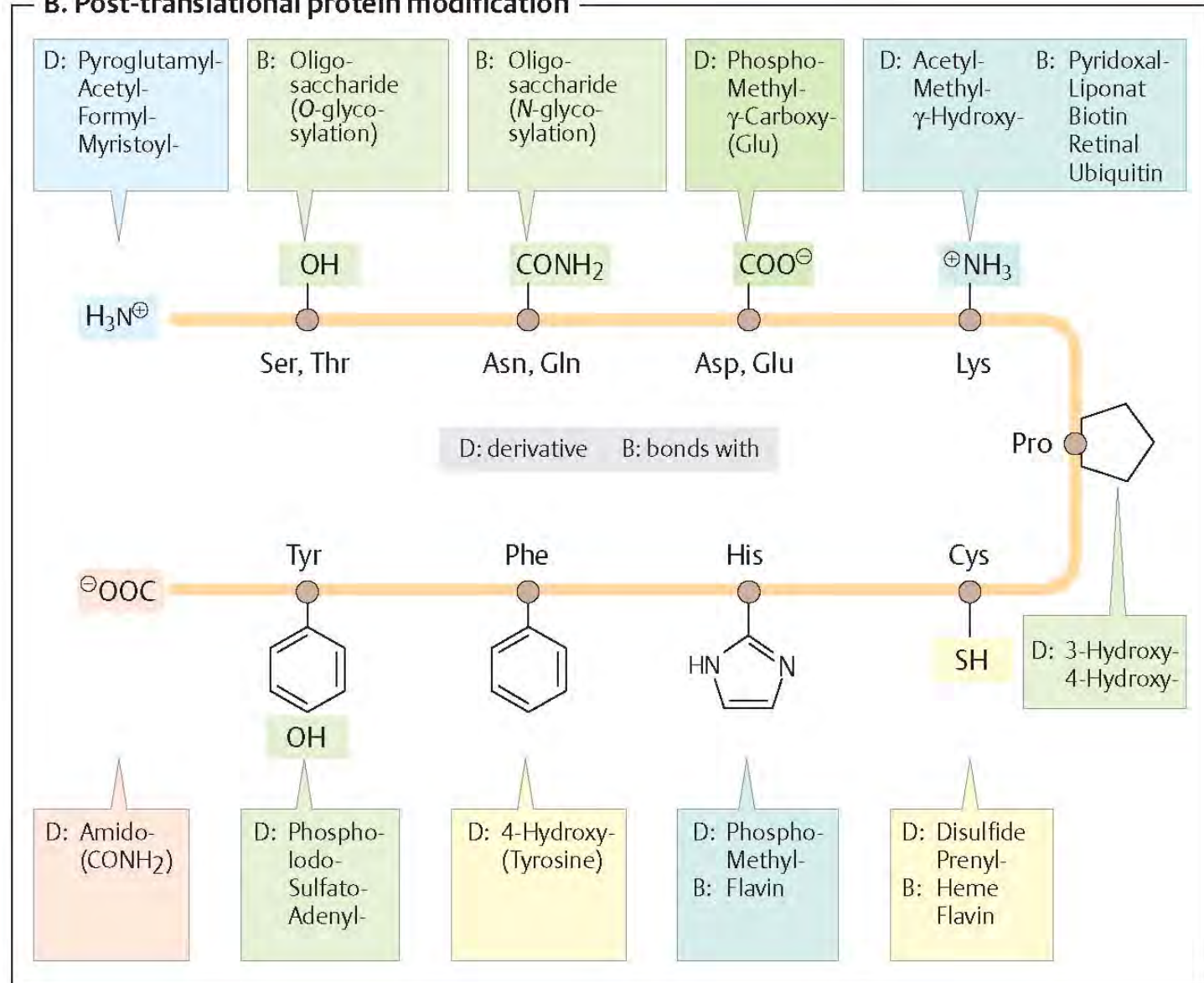
Hidroksilacija

Metilovanje

Fosforilacija

Post-translacione modifikacije

B. Post-translational protein modification

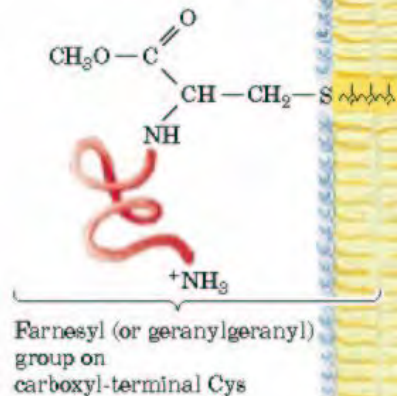
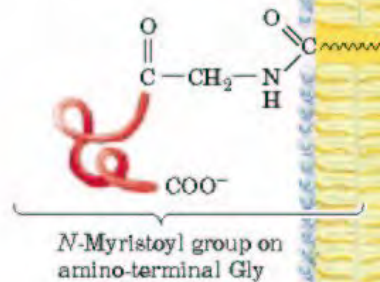
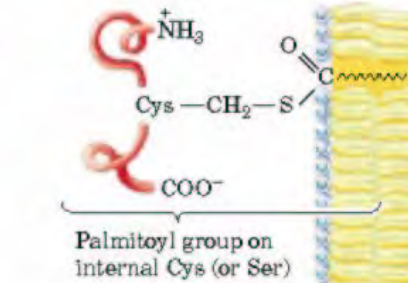


Acilovanje na N-terminusu

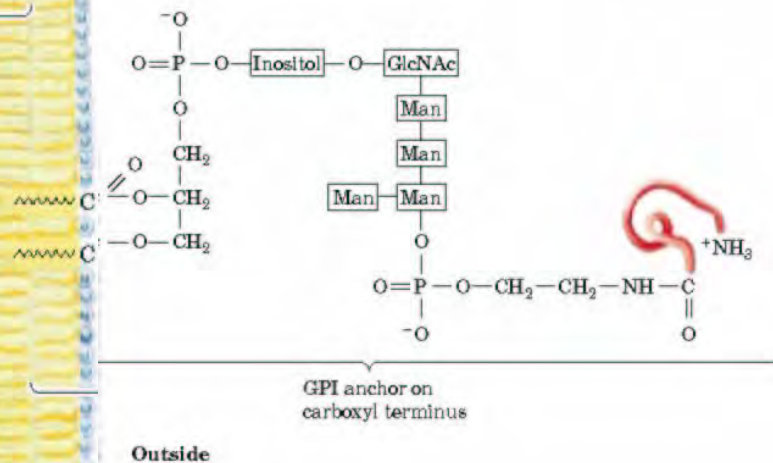
Acetil	$\text{CH}_3 - \text{CO} - \text{NH} \text{ ---}$
--------	---

Formil	$\text{HCO} \text{ -----}$
--------	----------------------------

Masne kiseline	$\text{R-CO} \text{ -----}$
----------------	-----------------------------



Kovalentno vezivanje lipida za molekule (membranskih) proteina



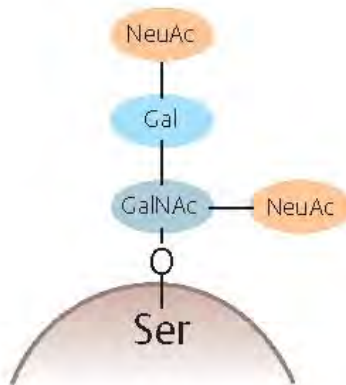
Inside

Outside

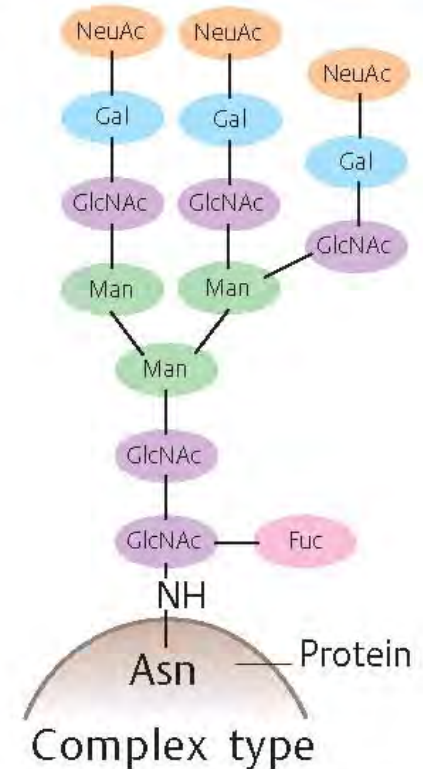
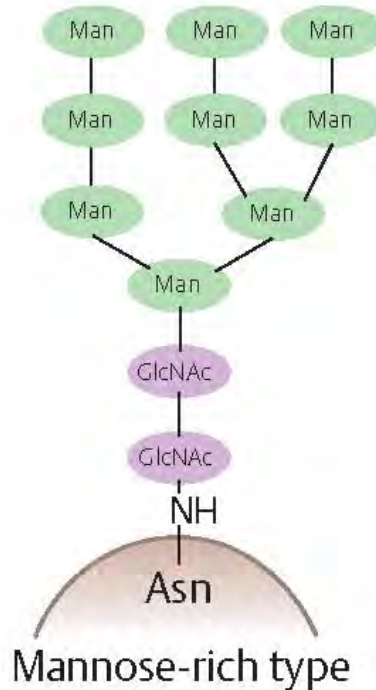
Glikoproteini

C. Glycoproteins: forms

O-linked

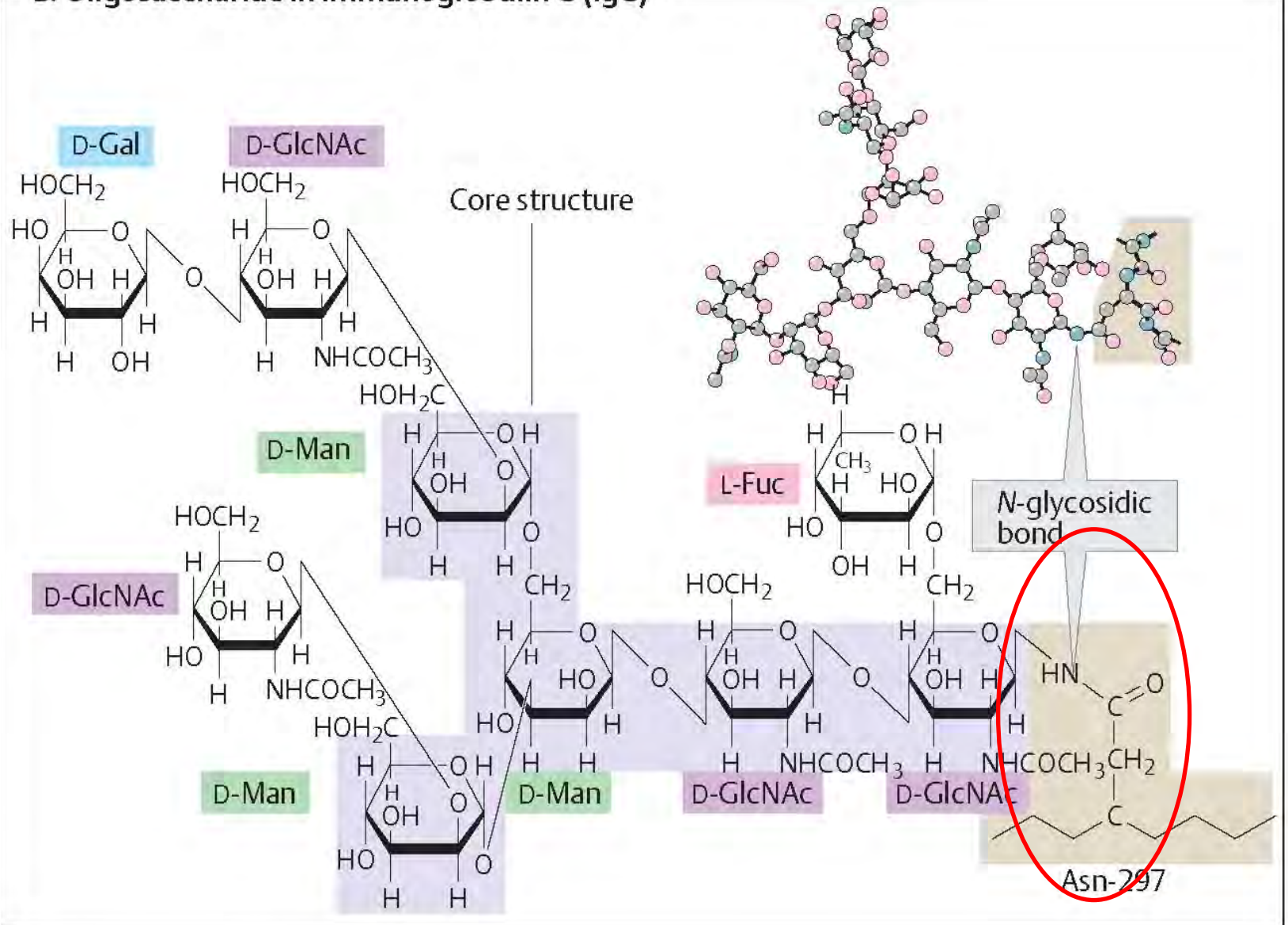


N-linked

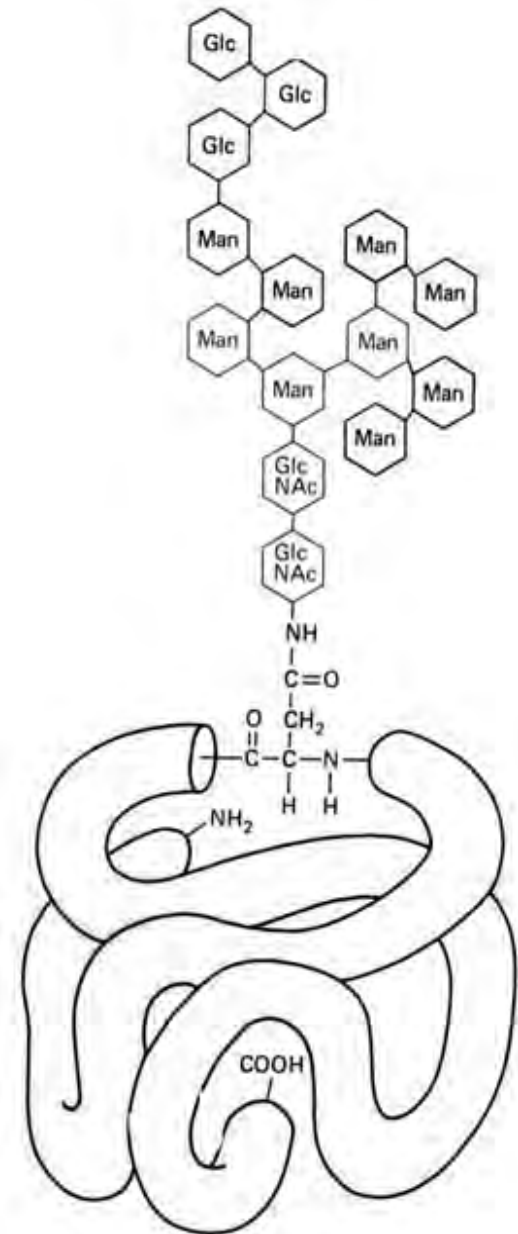
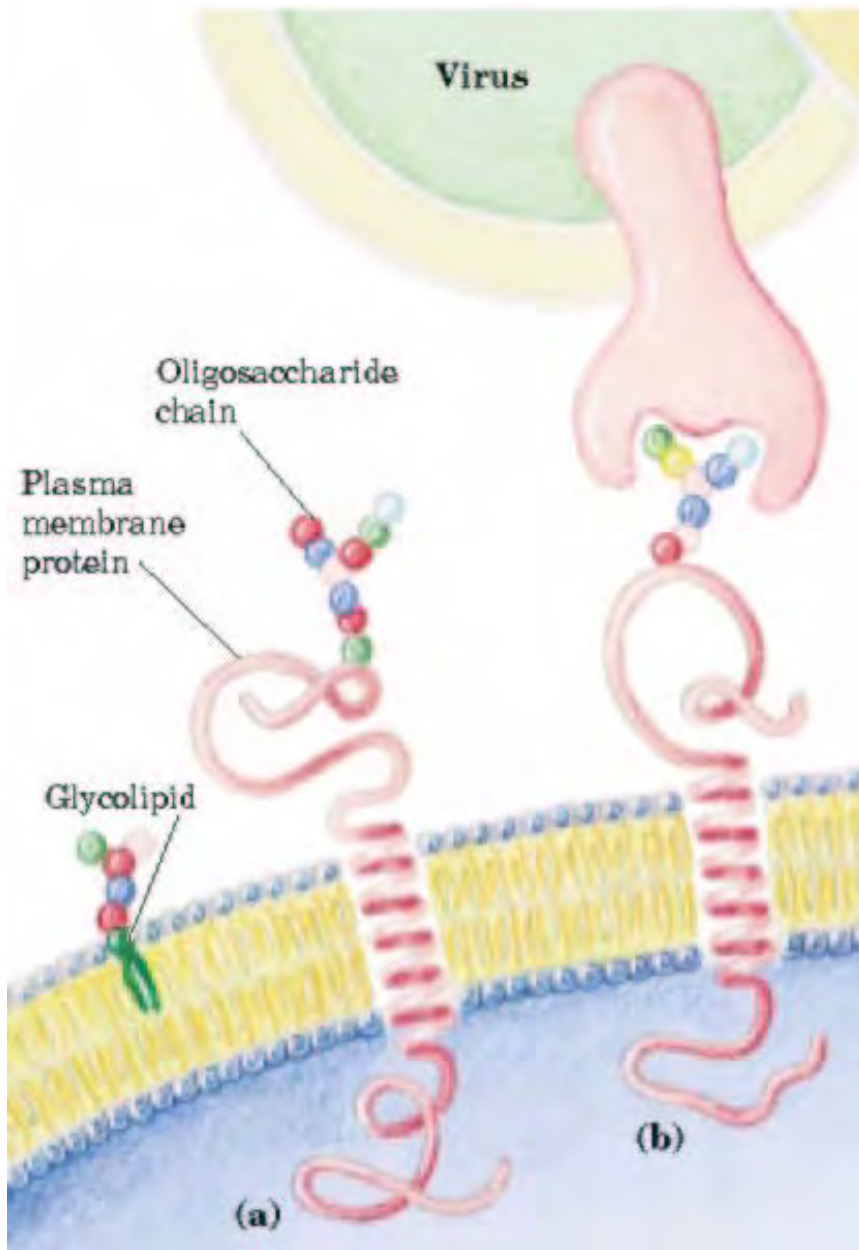


Glikoproteini: imunoglobulin G (IgG)

B. Oligosaccharide in immunoglobulin G (IgG)



Glikoproteini



Važna svojstva glikozil grupa

- Raznolikost struktura
- Hidrofilni karakter
- Voluminoznost