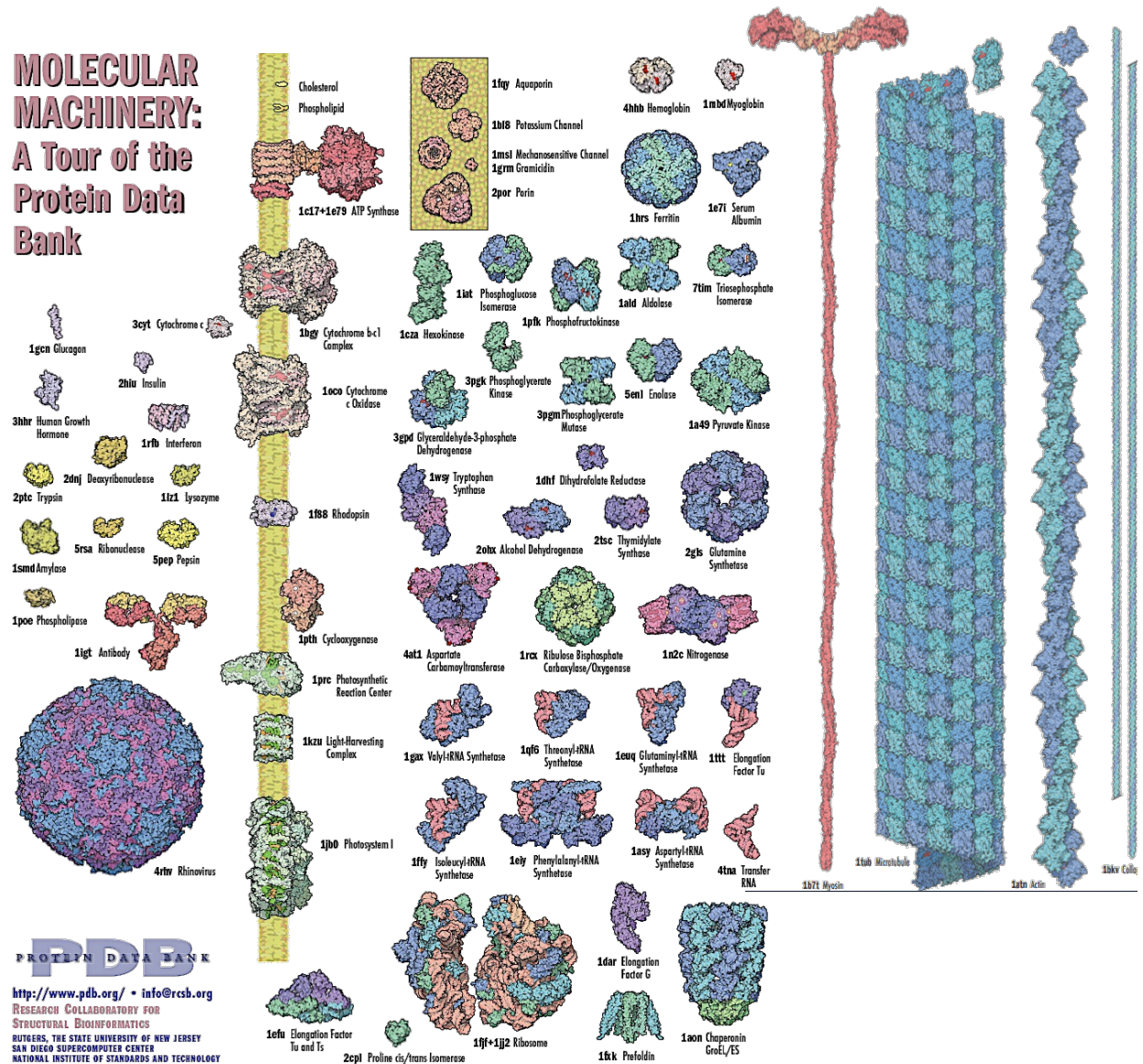


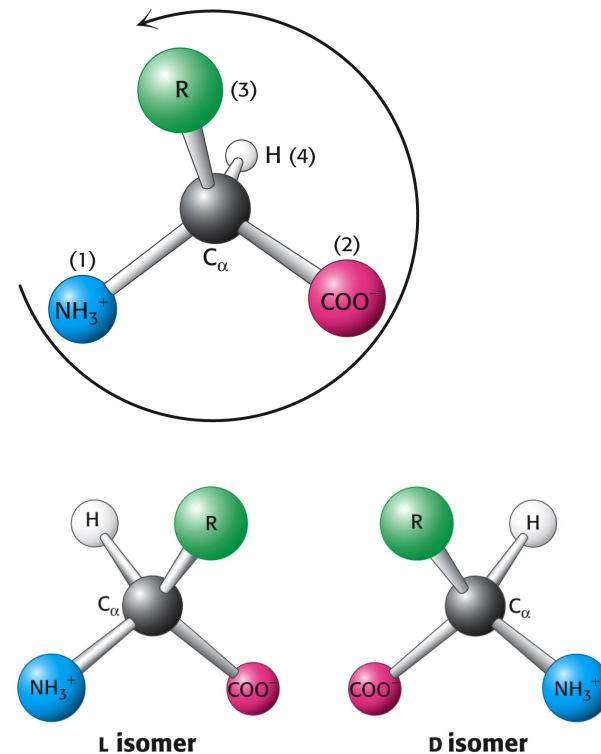
# PROTEINI:

- proteini raznovrstne in vsestranske molekule
- proteini / beljakovine
  - Mulder 1838
- ključna vloga v vseh bioloških procesih
- značilnosti proteinov:
  - značilno ak zaporedje
  - natančna 3D struktura
  - medsebojna interakcija
  - določena biokemijska vloga
- proteini so polimeri ak



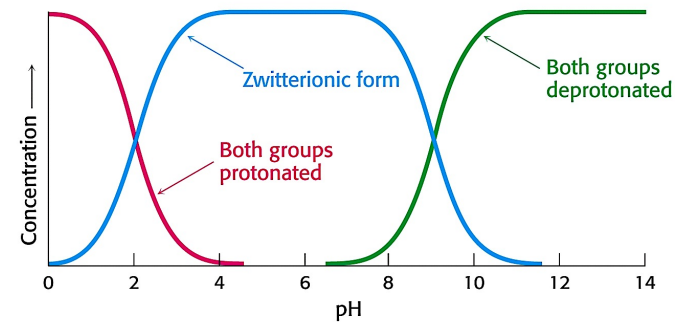
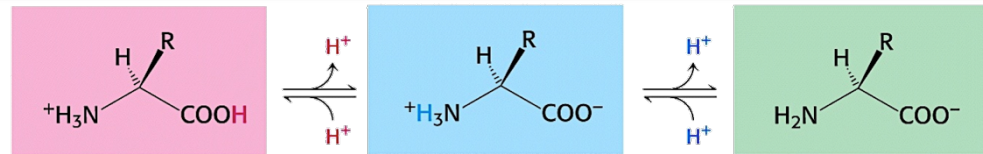
# AK in PEPTIDI: aminokisljine - lastnosti

- definicija ak:
  - vsaka org. molekula, ki ima vsaj eno amsko sk. in eno karboksilno sk.
- več 100 ak
- 20 ak je genetsko kodiranih za vgradnjo v proteine
- značilna zgradba
  - centralni ogljikov atom ( $C_{\alpha}$ )
    - vodikov atom, karboksilna in amska skupina
    - stranska veriga (R) – različna pri vseh ak
  - tetraedrična ureditev
  - kiralni center (izjema glicin)
    - stereoizomera (enantiomera)
    - D- in L- ak
    - v proteine se vgrajujejo L-ak
    - D-ak pogoste v bakterijah
    - D-ak tudi v starih proteinih očesnih leč, zob, tumorjev...
    - D-Ser prenašalec živčnega signala
  - bele kristalinične snovi
  - topne v vodi, netopne v org. topilih
  - vodne raztopine prevajajo električni tok



# AK in PEPTIDI: aminokisljine - ionizacija

- fiziološki pH 7,4
- ak v dipolarni ionski obliki
  - istočasno pozitivno in negativno nabite
  - ion dvojček
  - zwitterion
- možnost oddajanja protonov:
  - karboksilna skupina
  - aminska skupina
  - stranska veriga R (skupine, ki ionizirajo)

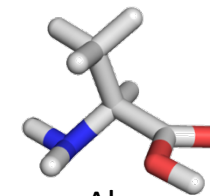


| Group                             | Acid | $\rightleftharpoons$ | Base | Typical $pK_a^*$ |
|-----------------------------------|------|----------------------|------|------------------|
| Terminal $\alpha$ -carboxyl group |      | $\rightleftharpoons$ |      | 3.1              |
| Aspartic acid<br>Glutamic acid    |      | $\rightleftharpoons$ |      | 4.1              |
| Histidine                         |      | $\rightleftharpoons$ |      | 6.0              |
| Terminal $\alpha$ -amino group    |      | $\rightleftharpoons$ |      | 8.0              |
| Cysteine                          |      | $\rightleftharpoons$ |      | 8.3              |
| Tyrosine                          |      | $\rightleftharpoons$ |      | 10.9             |
| Lysine                            |      | $\rightleftharpoons$ |      | 10.8             |
| Arginine                          |      | $\rightleftharpoons$ |      | 12.5             |

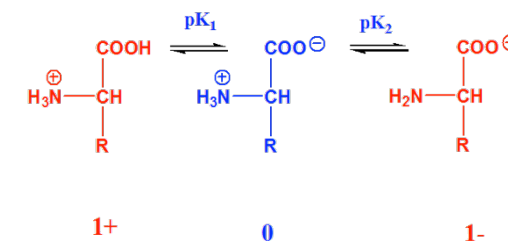
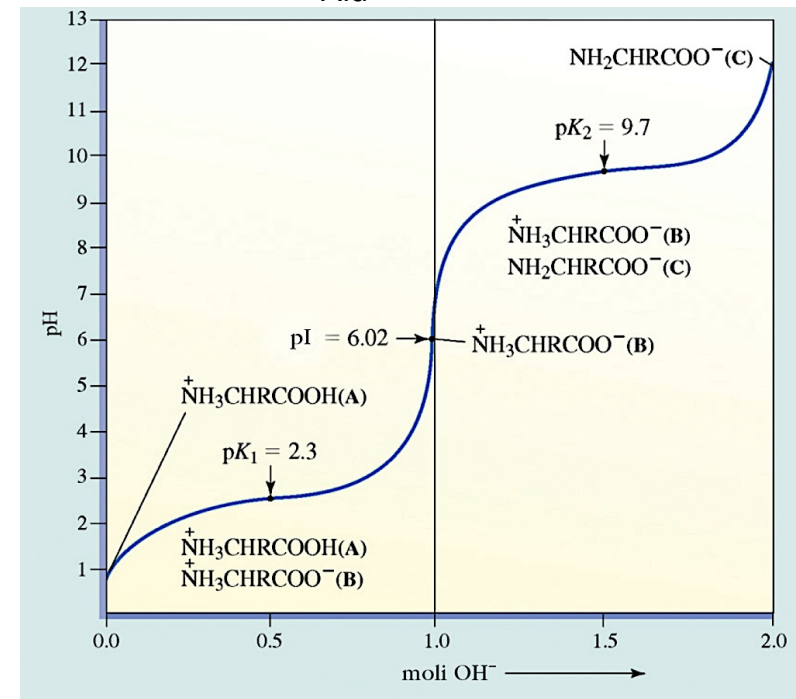
\* $pK_a$  values depend on temperature, ionic strength, and the microenvironment of the ionizable group.

# AK in PEPTIDI: aminokisljine - titracija

- poznavanje električnega naboja ak ima pomen pri obravnavi strukture in funkcije celotnega proteina
- izoelektrična točka (pI/IEP)
  - tista vrednost pH, ko je molekula brez neto naboja
- titracijska krivulja za **alanin**
  - dve prevojni točki, kjer je pH enak vsaki od vrednosti  $pK_a$  alanina.
    - disociacija protona iz karboksilne skupine ( $pK_a=2,3$ )
    - disociacija protona iz aminske skupine ( $pK_a= 9,7$ )
  - **oblika A** prevladujoča oblika alanina v kislem območju pH
  - z dodano bazo reagira najprej –  $\text{COOH} \rightarrow$  nastane ion dvojček (**oblika B**).
    - pri pH 2,3 je 50 % molekul alanina v obliki A in 50 % v obliki B
  - nadaljnje dodajanje baze povzroči disociacijo protona iz  $-\text{NH}_3^+$  in nastane **oblika C**
    - pri pH 9,7 je približno 50 % molekul alanina v obliki B, preostalih 50 % pa v obliki C.



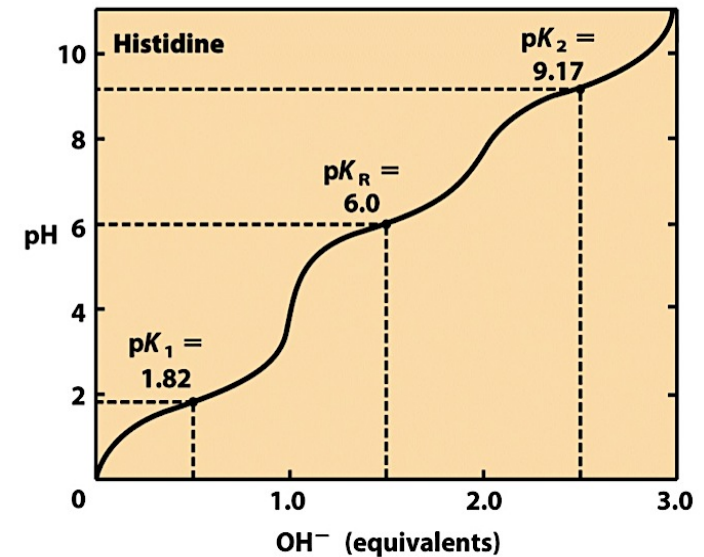
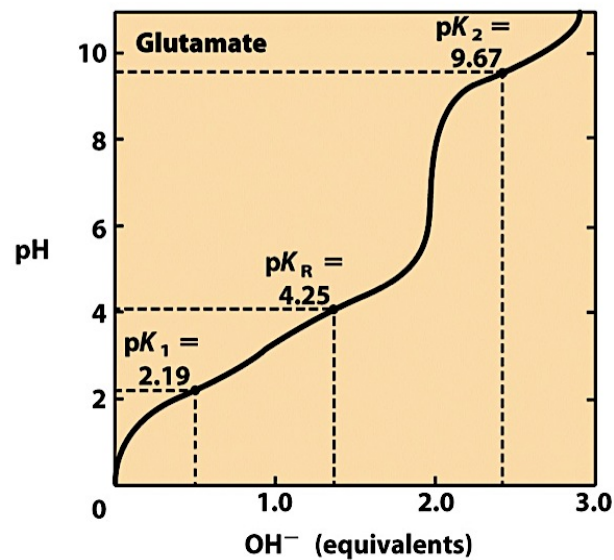
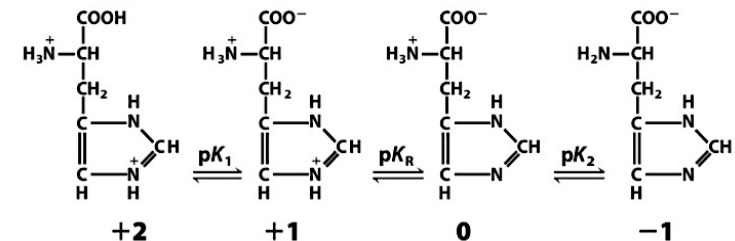
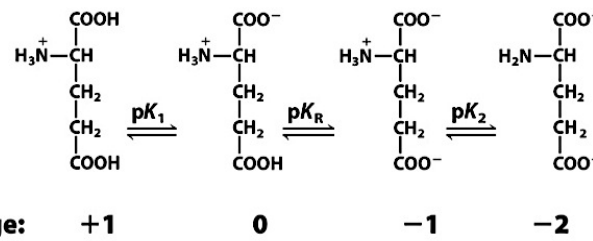
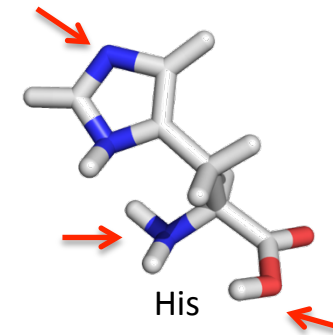
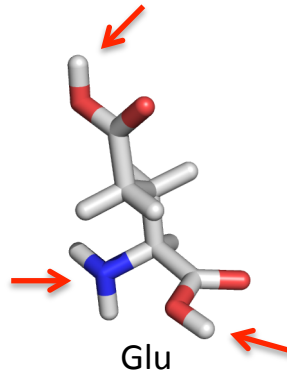
Ala



$$pI = (pK_1 + pK_2)/2$$

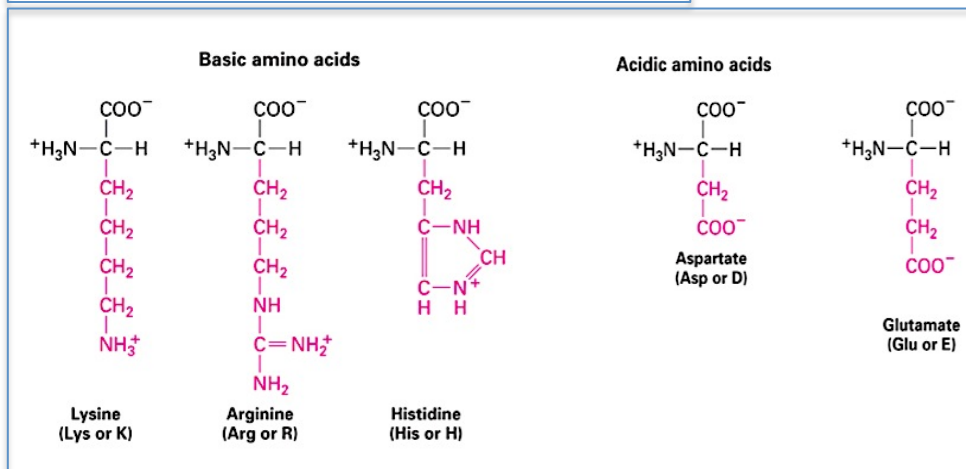
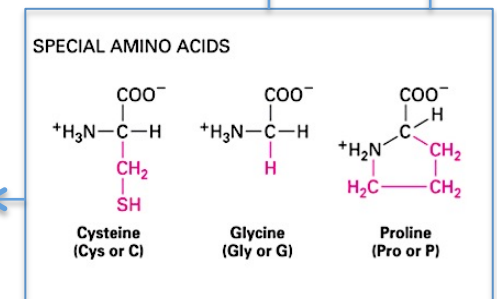
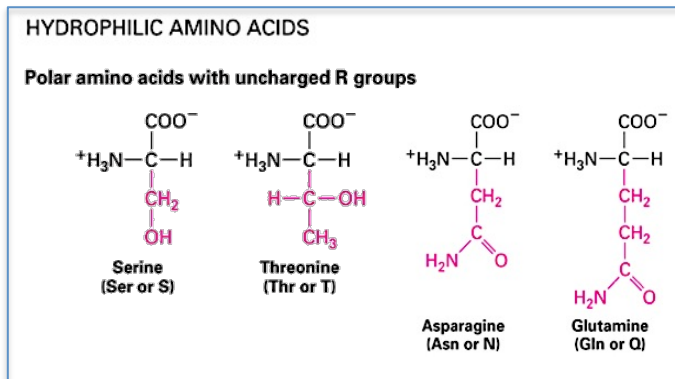
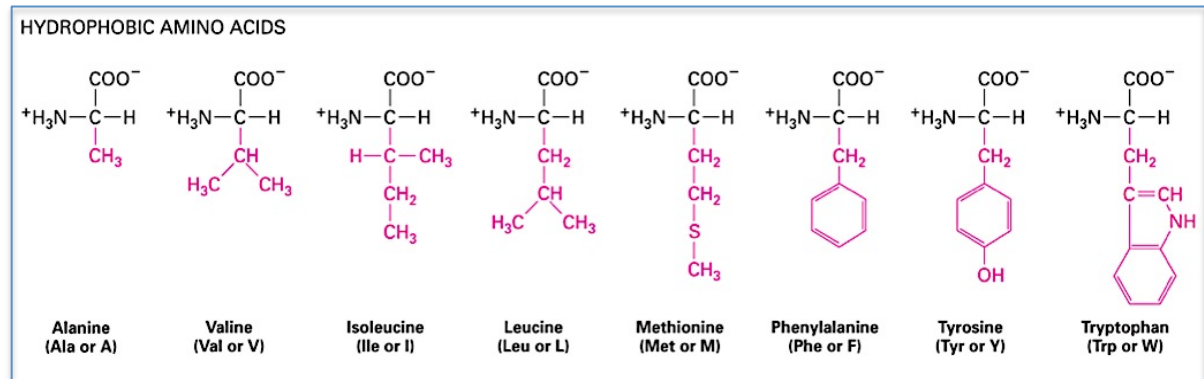
# AK in PEPTIDI: aminokisline - titracija

- titracijska krivulja za **glutamat**
  - tri skupine, ki disocirajo
- titracijska krivulja za **histidin**



# AK in PEPTIDI: aminokisljine - razvrstitev

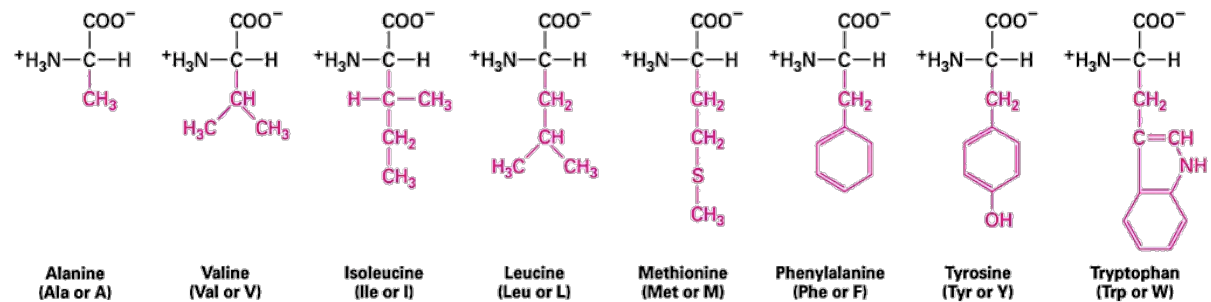
- razvrstitev ak temelji na naravi stranske skupine R
- R skupine razdelimo po:
  - velikosti
  - polarnosti
  - naboju
  - kemijski reaktivnosti
- razdelitev po polarnosti:
  - hidrofobne ak
  - hidrofilne ak
    - nenabite ak
    - nabite ak
  - posebne ak



# AK in PEPTIDI: aminokisljine - hidrofobne

- hidrofoben značaj
- vse imajo alifatske ali aromatske str. verige
- enostavni ogljikovodiki
- kemijsko nereaktivni
- najpogosteje v notranjosti proteina

HYDROPHOBIC AMINO ACIDS



## Gly, Ala

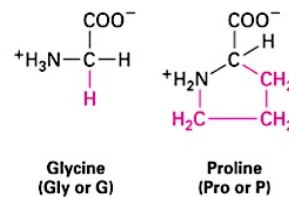
- Gly: edina ak, ki ni kiralna
- Ala: metilna skupina

## Val, Leu, Ile

- večje stranske verige
- averzija do vode

## Pro

- ciklična struktura
- pomembno vpliva na arhitekturo proteina
- alifatska veriga se poveže z N na C<sub>α</sub>



## Met

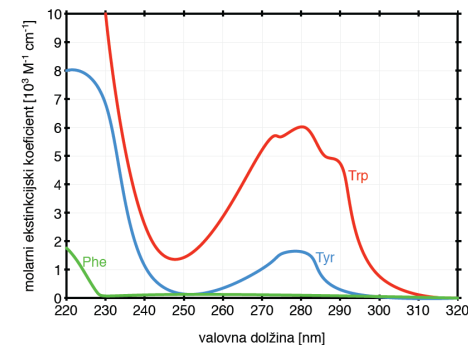
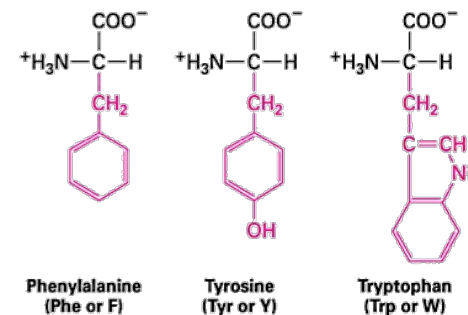
- alifatska veriga s S atomom
- tioeterska oblika (-S-CH<sub>3</sub>)

## Phe, Trp, Tyr

- Phe:
  - aromatski obroč vezan na metilensko sk. (-CH<sub>2</sub>-)
  - zelo hidrofobna ak.
- Trp:
  - indolni obroč vezan na metilensko sk.
  - N-atom, manj hidrofoben
- Tyr:
  - OH skupina na aromatskem obroču
  - manj hidrofoben

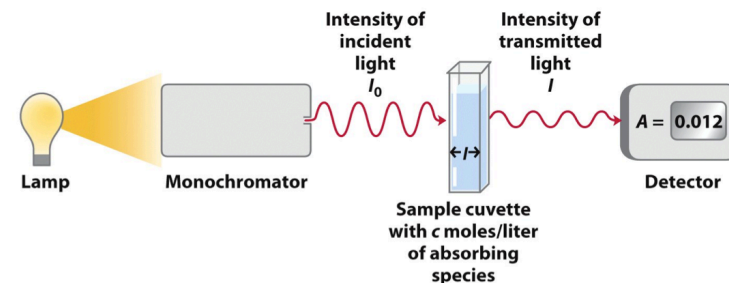
# AK in PEPTIDI: aminokisljine - aromatske

- vse tri ak tvorijo skupino aromatskih ak
  - imajo  $\pi$ -elektrone
  - lahko interagirajo z drugimi  $\pi$ -elektroni
  - $\pi$ -elektroni absorbirajo svetlobo
- spekter pri različnih valovnih dolžinah
- ekstinkcijski koeficient ( $\epsilon$ ) pove koliko svetlobe neka spojina absorbira



- Trp      max 280       $3400 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$
- Tyr      max 276       $1400 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

- Beerov zakon



Beerov zakon:

- $A$       absorbanca
- $\epsilon$       ekstinkcijski koeficient [ $\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ]
- $c$       koncentracija spojine [ $\text{M}$ ]
- $l$       dolžina kivete skozi katero gre svetloba [ $\text{cm}$ ]

$$A = \epsilon \cdot c \cdot l$$



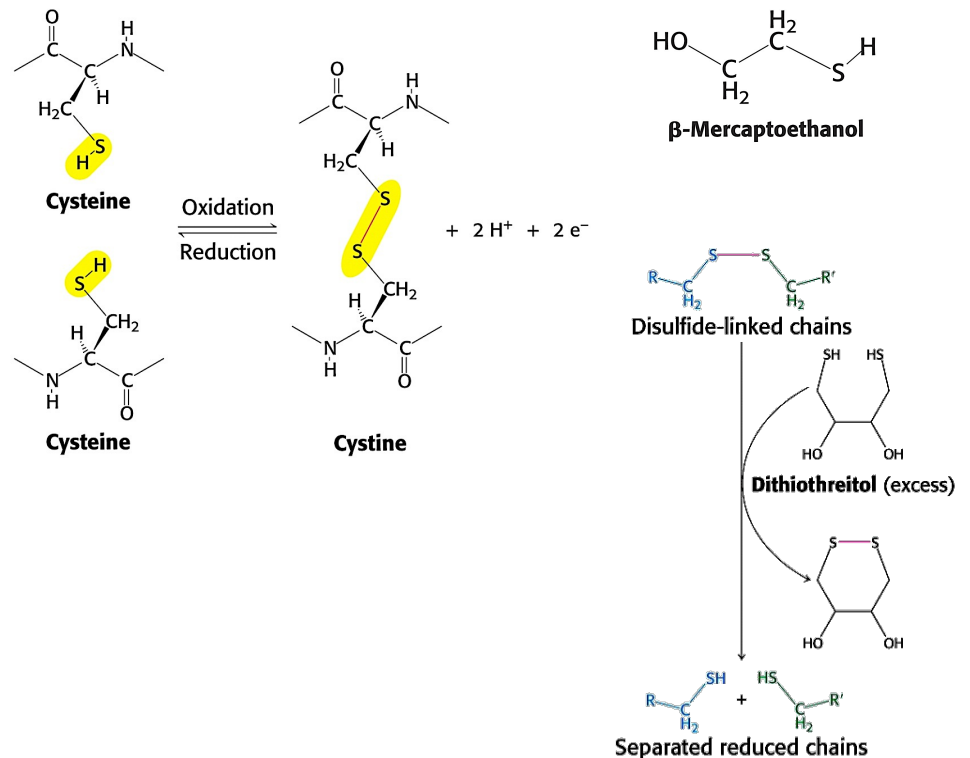
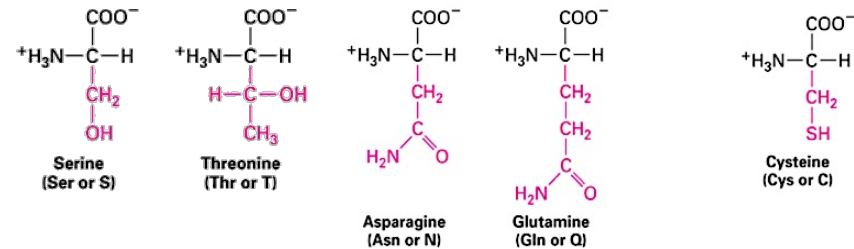
# AK in PEPTIDI: aminokislina – polarne, nenabite

- hidrofилni značaj
- prisotnost heteroatomov (N, O, S)
- širok spekter funkcionalnih skupin
- z elektronskim parom omogočajo tvorbo H-vezi

- **Ser:**
  - hidroksilirana alifatska veriga (-OH na Ala)
  - ak bolj hidrofилna in reaktivna kot Ala
- **Thr:**
  - 2 centra asimetrije
  - OH skupina
- **Asn, Gln:**
  - karboksiamidni konec
- **Cys:**
  - tiolna skupina (-SH)
  - oksidira do disulfida – kovalentna vez
  - cistein → cistin
  - z redukcijo nazaj do tiolne skupine
  - pomembna pri stabilizaciji 3D strukture proteina

## HYDROPHILIC AMINO ACIDS

### Polar amino acids with uncharged R groups

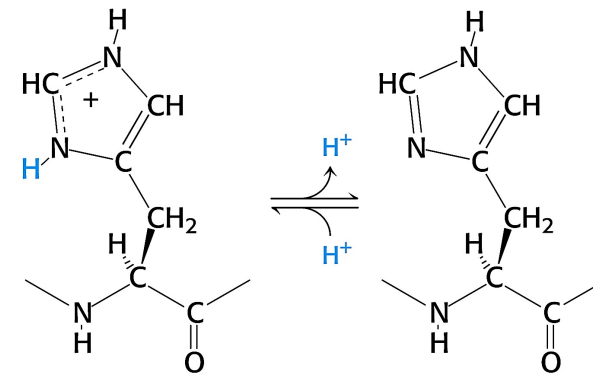
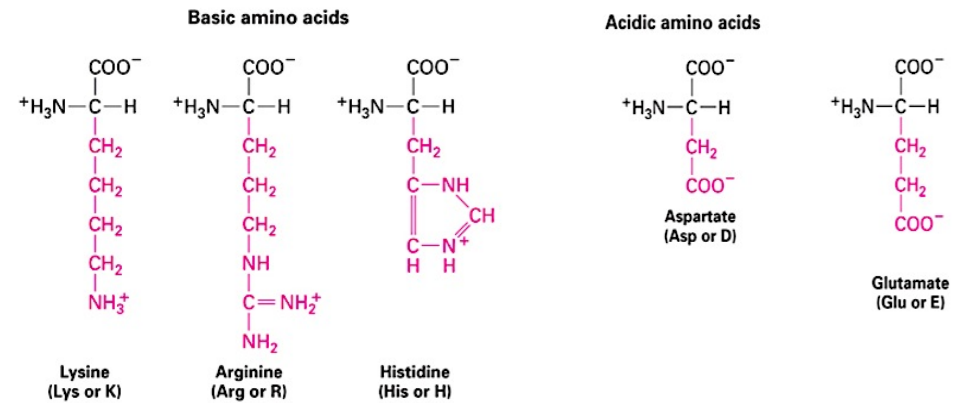


- reducenti v biokemiji
  - β-merkaptoetanol
  - ditiotreitol
  - cistein

# AK in PEPTIDI: aminokisliline – polarne, nabite

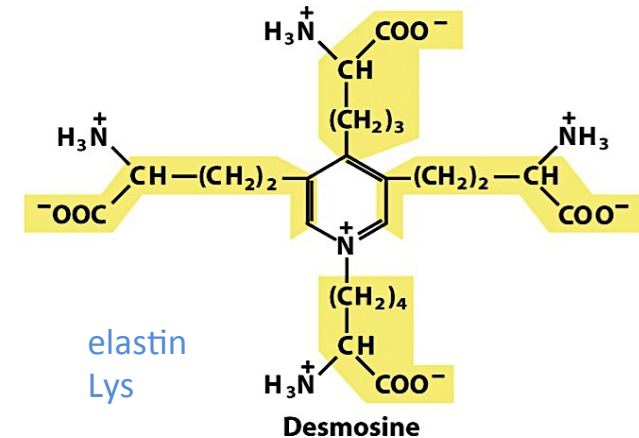
- stranske skupine z bazičnimi in kislimi lastnostmi
- hidrofилne ak – pretežno na površini proteinov
- **Lys, Arg:**
  - pripeta aminska oz. gvanidinska skupina
  - dolgi verigi
  - pri fiziološkem pH ionsko stanje +1
- **His :**
  - vezan imidazol
  - $pK_a$  blizu fiziološkega pH
  - v razmerah *in vivo* nahaja v dveh ionskih oblikah
- **Asp, Glu:**
  - aspartat/asparaginska kislina
  - glutamat/glutaminska kislina
  - pri fiziološkem pH ionsko stanje -1

## HYDROPHILIC AMINO ACIDS

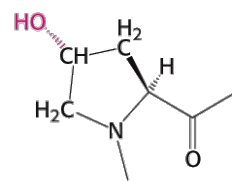


# AK in PEPTIDI: aminokisline – reaktivnost

- kislinsko – bazične reakcije (titracije)
- karboksilne skupine (-COOH)
  - estri
  - amidi
- aminske skupine (-NH<sub>2</sub>)
  - amidi
- hidroksilna skupina (-OH)
  - estri

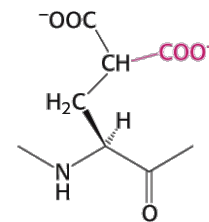


- posttranslacijske modifikacije
  - hidroksilacija
  - karboksilacija
  - glikozilacija
  - fosforilacija



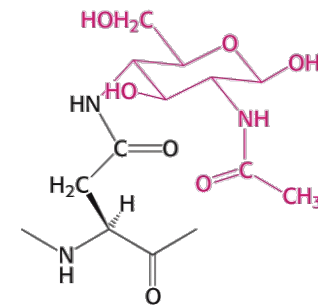
Hydroxyproline

kolagen



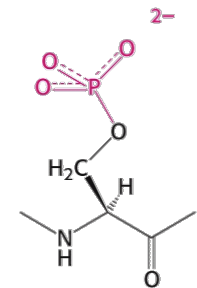
$\gamma$ -Carboxyglutamate

protrombin



Carbohydrate-asparagine adduct

poveča hidrofilitnost proteina



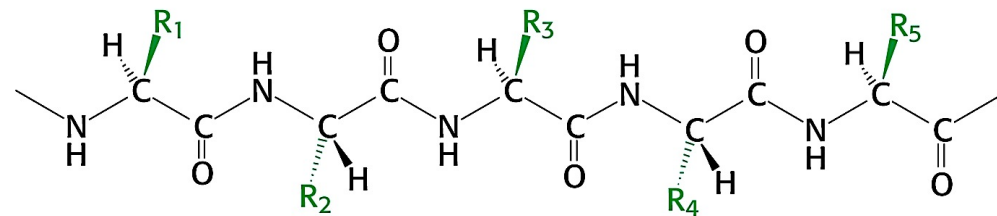
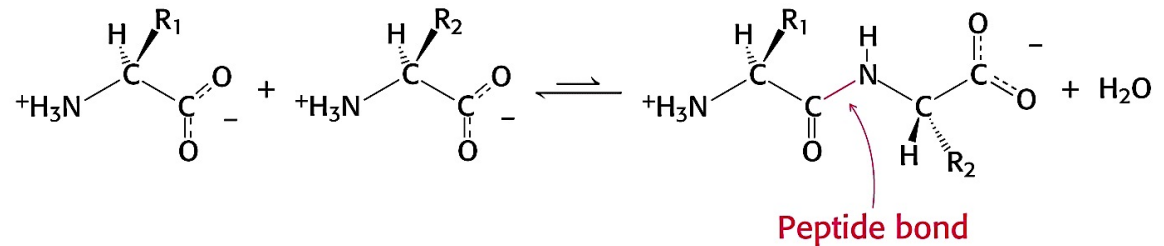
Phosphoserine

regulacijska vloga

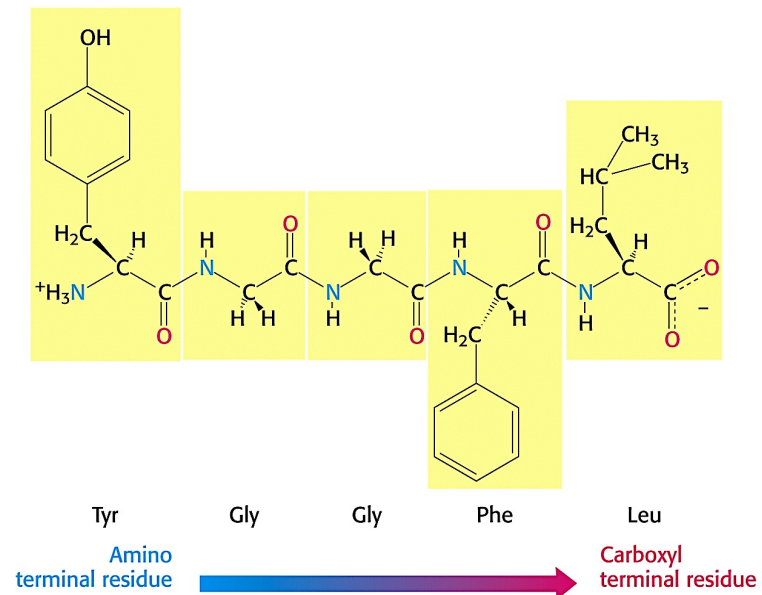
- peptidna vez (povezava dveh ak -NH<sub>2</sub> + -OH)

# AK in PEPTIDI: polipeptid – lastnosti

- dve ak se med seboj povežeta z amidno oz. peptidno vezjo
- spojitev aminske in karboksilne preko reakcije kondenzacija (izstop molekule vode)
- dipeptid, tri-, tetra- pentapeptid...
- polipeptid (10-50 ak)
- protein (več kot 100 ak)
- *in vivo* 2 – 2000 ak
- velikost proteinov
  - izražamo :
    - v enotah Dalton (Da). Da je enota mase skoraj enaka masi H atoma
    - kot relativna molekulska masa (brez enot)
    - molska masa (g/mol)
  - ak ~110 Da
  - peptid 50 ak → 5500 Da
  - protein npr. 2000 ak 220 000 Da = 220 kDa

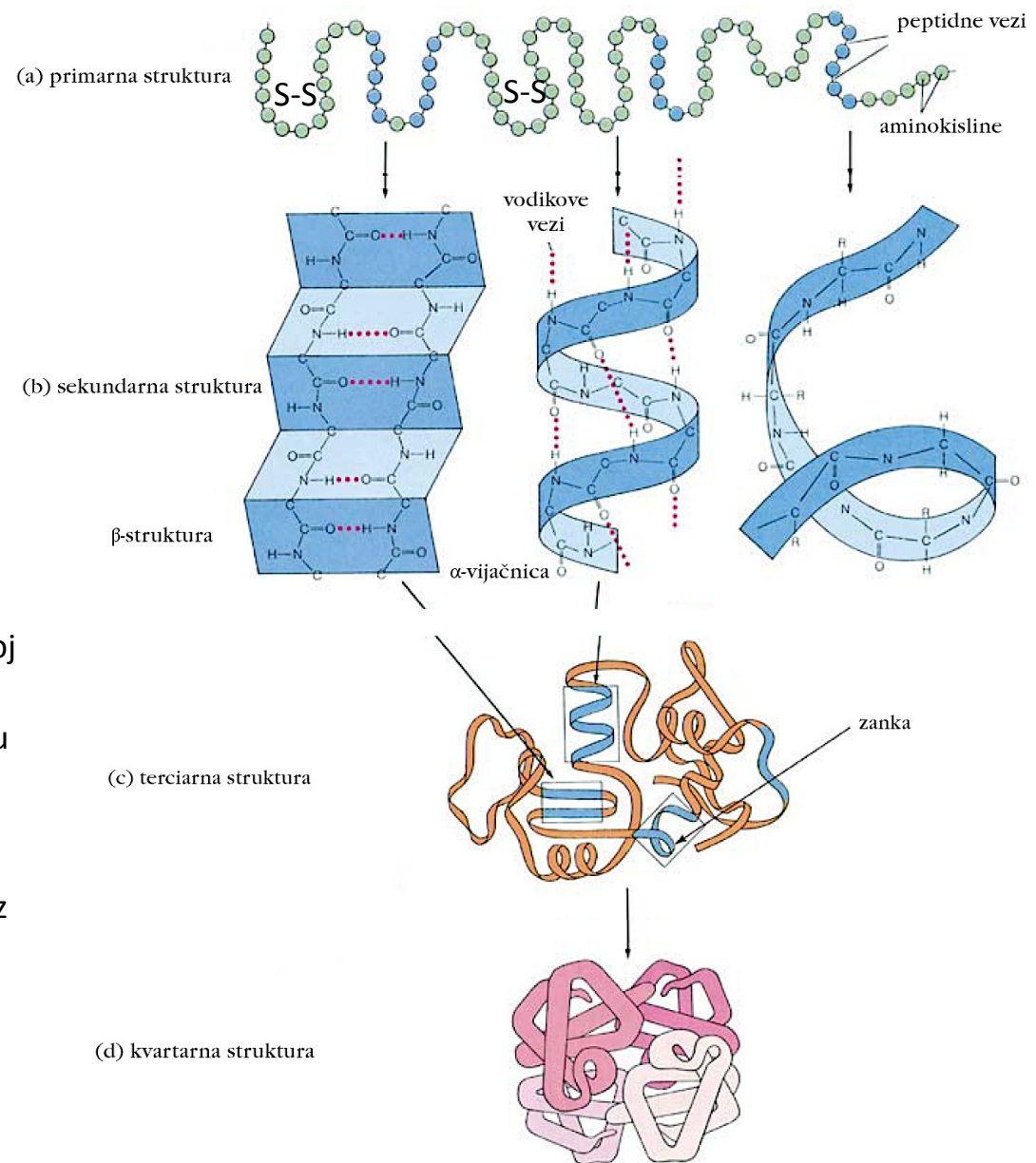


- značilnosti polipeptidne verige
  - aaminski (N-konec)
  - karboksilni (C-konec)
  - zapis peptida od N-konca → C-koncu
  - lastnosti R ostanejo nespremenjene
  - glavna veriga
    - ponavljajoče enote
    - velik potencial H-vezi
  - stranska veriga v trans položaju



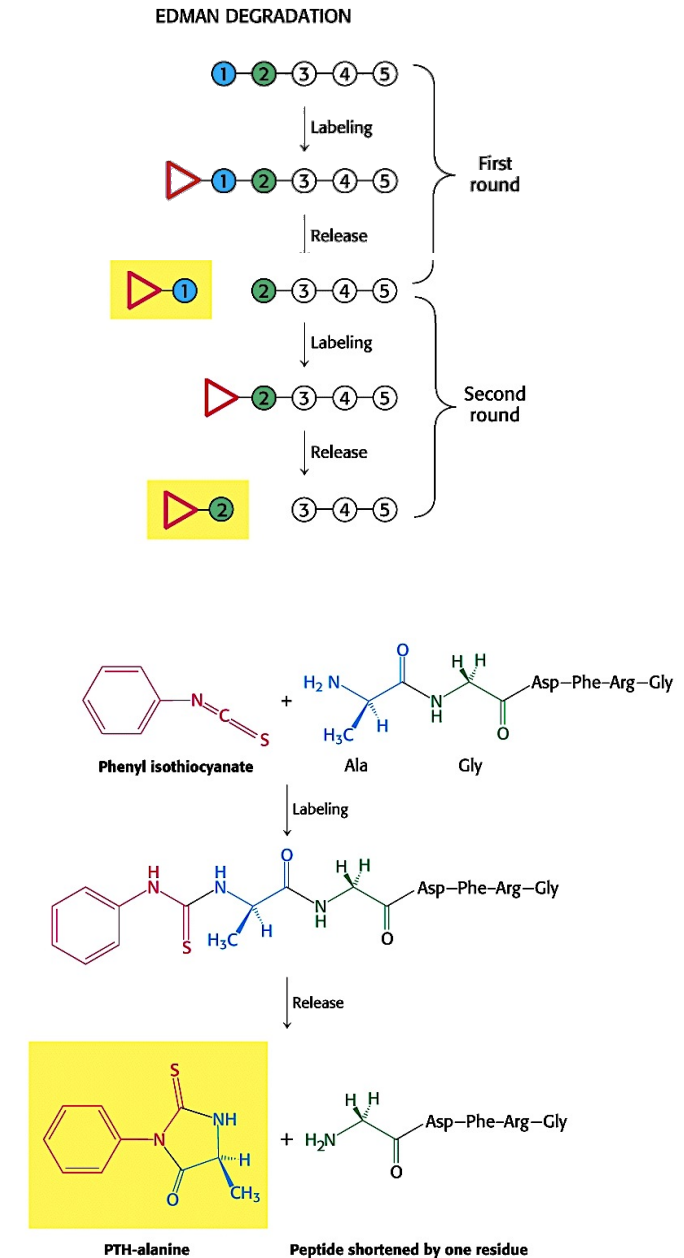
# PROTEINI: ravni proteinske strukture

- aktivnost proteina je odvisna od 3D strukture, ki jo zavzame
- nativna konformacija
- TD najbolj ugodna
- štiri ravni proteinske strukture
  - primarna struktura
    - zaporedje ak ostankov
    - zaporedje zapisano v DNA
    - položaj disulfidnih vezi
  - sekundarna struktura
    - predeli zaporedja se zvijejo v urejene strukture
    - $\alpha$ -vijačnica in  $\beta$ -struktura,  $\beta$ -zavoj
  - terciarna struktura
    - položaj celotne verige v prostoru
      - neurejena  $\neq$  naključna
    - položaj vseh atomov v prostoru
  - kvartarna struktura
    - funkcionalni protein sestavljen iz več verig (podenot)
- napovedovanje strukture
- rentgenska kristalografija
- NMR



# PROTEINI: določanje primarne strukture

- dva načina za določanje ak zaporedja
  - neposredno preko izoliranega proteina
  - izpeljano zaporedje iz določenega nukleotidnega zaporedja (enostavneje)
- metoda **Edmanove razgradnje**
  - reagent feniltioizocianat sprosti en ak ostanek
  - identifikacija nastalega feniltiohidantoinkega derivata
  - preostanek proteina gre v nov cikel
  - identifikacija ak 2
- avtomatski analizator – sekvenator
- omejitev metode
  - določitev zaporedja 50 ak
  - potrebna predhodna fragmentacija proteina

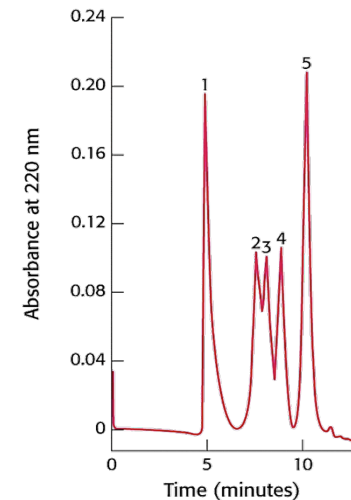


# PROTEINI: določanje primarne strukture

- fragmentacija proteinov na točno določenih mestih
- kemijske cepitve
  - CNBr za Met
- encimske cepitve
  - na karboksilni strani ak
  - na aminski strani ak
- separacija fragmentov
  - HPLC  
High Performance Liquid Chromatography  
tekočinska kromatografija visoke ločljivosti
- določitev zaporedja posameznih fragmentov

**TABLE 4.3** Specific cleavage of polypeptides

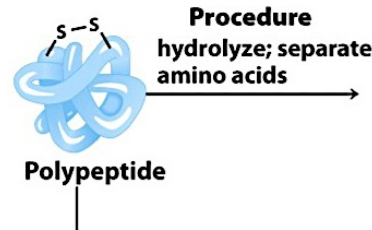
| Reagent                     | Cleavage site   |
|-----------------------------|---|
| <b>Chemical cleavage</b>    |   |
| Cyanogen bromide            | Carboxyl side of methionine residues  |
| <i>O</i> -Iodosobenzoate    | Carboxyl side of tryptophan residues  |
| Hydroxylamine               | Asparagine–glycine bonds  |
| 2-Nitro-5-thiocyanobenzoate | Amino side of cysteine residues   |
| <b>Enzymatic cleavage</b>   |   |
| Trypsin                     | Carboxyl side of lysine and arginine residues   |
| Clostripain                 | Carboxyl side of arginine residues  |
| Staphylococcal protease     | Carboxyl side of aspartate and glutamate residues (glutamate only under certain conditions) |
| Thrombin                    | Carboxyl side of arginine   |
| Chymotrypsin                | Carboxyl side of tyrosine, tryptophan, phenylalanine, leucine, and methionine               |
| Carboxypeptidase A          | Amino side of C-terminal amino acid (not arginine, lysine, or proline)                      |



HPLC kromatografija

# PROTEINI: določanje primarne strukture

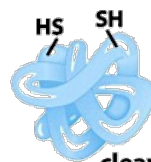
- strategija dela :
  - določitev ak sestave
  - redukcija vzorca
  - razgradnja z E1
  - razgradnja z E2
  - ...



| Result |     |     |
|--------|-----|-----|
| A 5    | H 2 | R 1 |
| C 2    | I 3 | S 2 |
| D 4    | K 2 | T 1 |
| E 2    | L 2 | V 1 |
| F 1    | M 2 | Y 2 |
| G 3    | P 3 |     |

**Conclusion**  
Polypeptide has 38 amino acid residues. Trypsin will cleave three times (at one R (Arg) and two K (Lys)) to give four fragments. Cyanogen bromide will cleave at two M (Met) to give three fragments.

- izpeljava zaporedja iz DNA da informacijo kako se je protein sintetiziral
- pretvorba v biološko aktivno obliko
  - odstranitev krajših peptidov
  - kemijske spremembe na ak
- pomen poznavanja ak zaporedja
  - s primerjanjem ak zaporedij ugotovljamo sorodnost proteinov (sekvenčna homologija) → družine proteinov
  - sklepamo o evolucijskem razvoju proteina (filogenetska drevesa)
  - mutirani proteini imajo drugačno zaporedje (patološki vidik)
  - sklepamo lahko o 3D strukturi proteina



cleave with **trypsin**; separate fragments; sequence by Edman degradation

- T-1 GASMALIK
- T-2 EGAAYHDFEPIDPR
- T-3 DCVHSD
- T-4 YLIACGPMTK

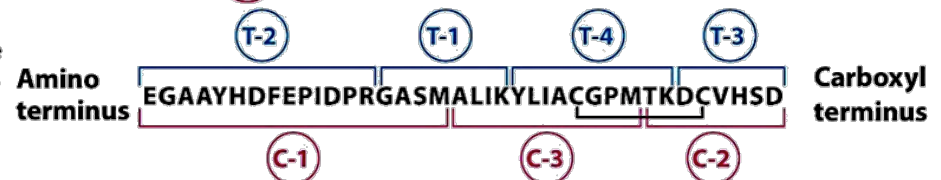
T-2 placed at amino terminus because it begins with E (Glu).  
T-3 placed at carboxyl terminus because it does not end with R (Arg) or K (Lys).

cleave with **cyanogen bromide**; separate fragments; sequence by Edman degradation

- C-1 EGAAYHDFEPIDPRGASM
- C-2 TKDCVHSD
- C-3 ALIKYLIACGPM

C-3 overlaps with T-1 and T-4, allowing them to be ordered.

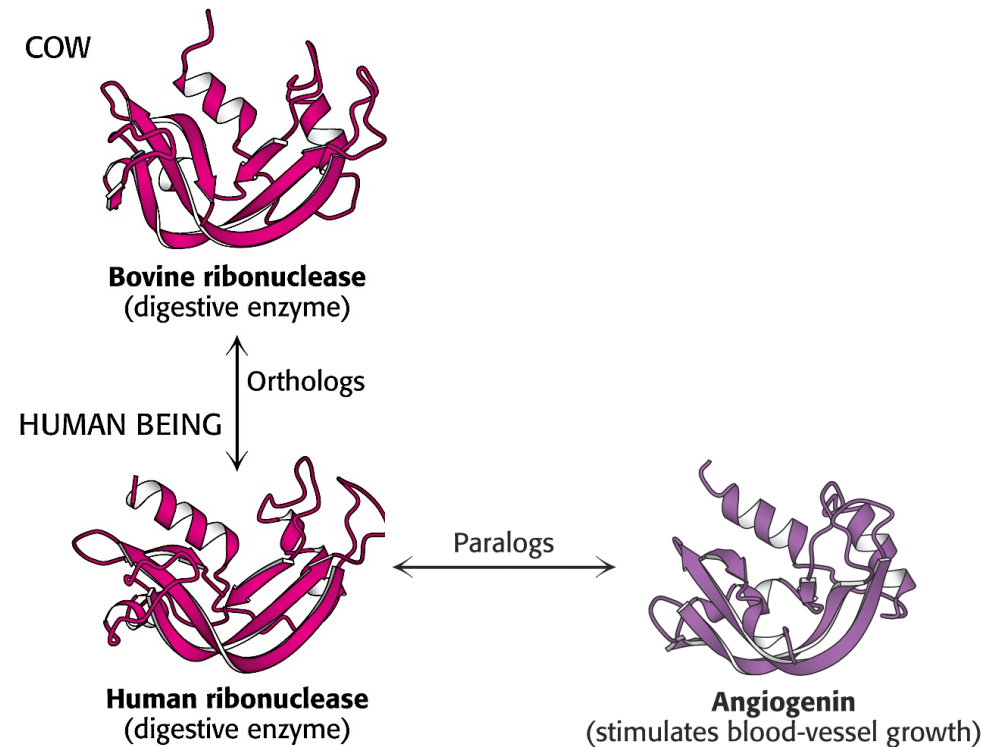
establish sequence





# PROTEINI: zgradba proteinov – sekvenčna homologija

- proteini tvorijo družine, ki izkazujejo podobnosti
- primerjava 3D strukture najboljši indikator
- primerjava ak zaporedij
  - sekvenčna homologija
  - baze podatkov dostopne
- homologi se delijo v:
  - ortologe
    - homologi, prisotni v različnih speciesih
    - podobne ali identične funkcije
  - paraloge:
    - homologi, prisotni znotraj enega speciesa
    - nastali z podvojitvijo gena
- Kdaj sta dva proteina homologa?
  - podobnost v ak /nukleotidnem zaporedju
  - skoraj vedno v 3D strukturi



# PROTEINI: zgradba proteinov – statistična analiza zaporedij

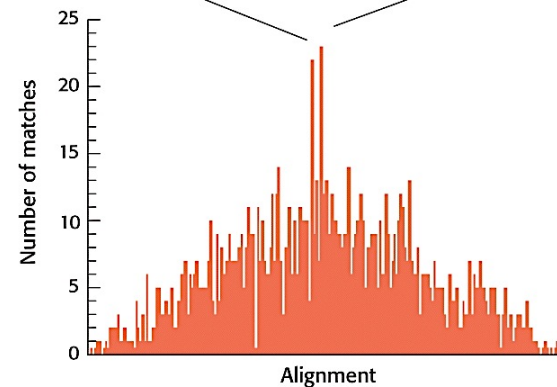
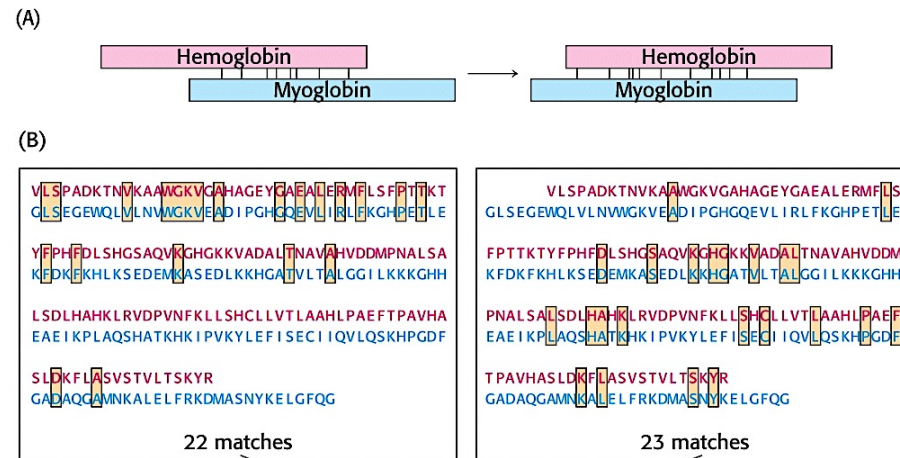
- primerjava ak zaporedij
- mioglobin Mb
  - veže O<sub>2</sub> v mišicah
- hemoglobin
  - veže O<sub>2</sub> v pljučih
  - štirih polipeptidnih verig, 2 $\alpha$  in 2 $\beta$
- drsenje zaporedij
  - 22 ali 23?

## 141 ak Human hemoglobin ( $\alpha$ chain)

VLSPADKTNVKAANGKVGAGHAGEYGAELERMFLSFPPTTKTYFPHFDLSHG  
SAQVKGHGKKVADAL TNAVAHVDDMPNALSALSDLHAHKL RVPVNFKLLS  
HCLLVTLAAHLPAEFTPAVHASLDKFLASVSTVLT SKYR

## 153 ak Human myoglobin

GLSDGEWQLV LNWWGKVEAD I PGHGQEV L I RLFKGH PETLEKFDKFKHLKS  
EDEMKA SEDLKKHGATVLTALGG I LKKKGHHEAE I KPLAQSHATKHK I PVK  
YLEF I SECI I QVLQSKHPGDFGADAQ GAMNKALELFRKDMASNYKELGFQG







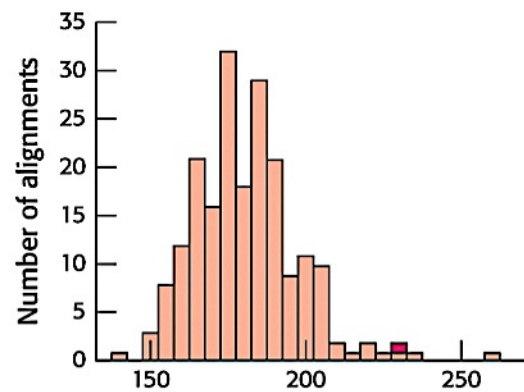
# PROTEINI: zgradba proteinov – statistična analiza zaporedij

- primerjava manj podobnih zaporedij
- rastlinski Hb in Mb
  - 15% identičnost

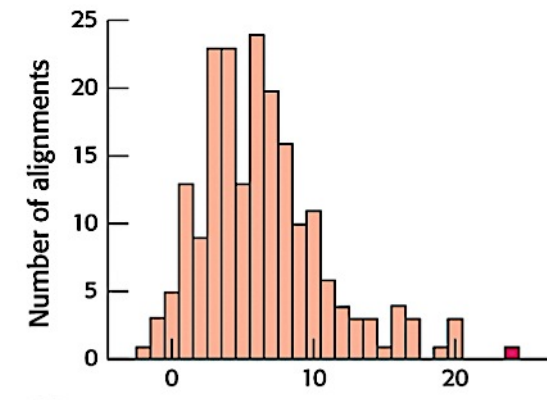
**Myoglobin**

**Leghemoglobin**

```
GLSEGEWQLVNLNMGKVEADIPGHGQEVLIIRLFKGHPEPLEKFDKFKHLKSEDEM  
GALTESQAALVKSSMWWFNANIPKHTHRFFILVLEIAPAAK---DLFSFLKGTSEV  
  
KASE-DLKKHGATVLTALGGI---LKKKGH--HEAEIKPLAQSHATKHKIPVKYLE  
PQNPPELQAHAGKVFVKLVYEAAIQLEVTGVVVTDATLKNLGSVHVS KG-VADAHFP  
  
FI SECTIQVLQSKHPGDFGADAQGAMNKALELFRKDMASNYK-ELGFQG  
VKEAII LKTIKEV----VGAKWSEELNSAMT IATDELAIVIKKEMDDAA
```



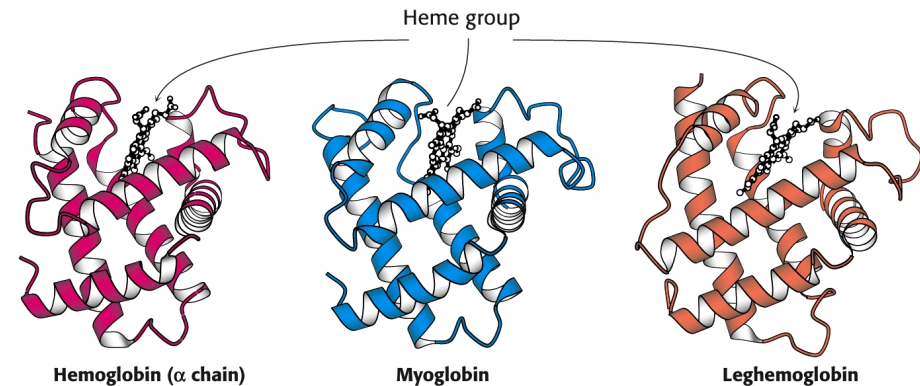
(A) Alignment score (identities only)



(B) Alignment score (Blosum 62)

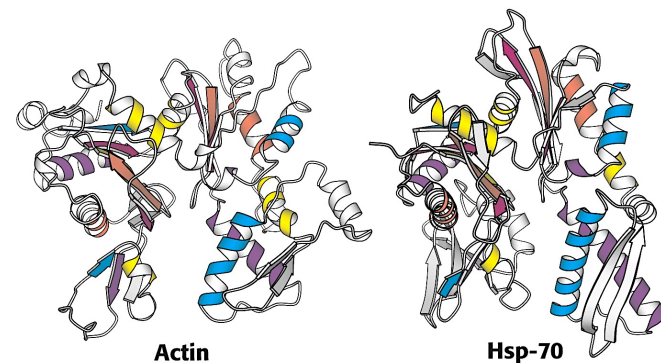
# PROTEINI: zgradba proteinov – statistična analiza zaporedij

- Zaključek:
- za zaporedja daljša kot 100 ak velja:
  - > 25% → ne gre za naključje, proteina sta homologna
  - 15-25% → dodatne analize, da se potrdi statistična signifikantnost
  - < 15% → ne gre za signifikantno podobnost



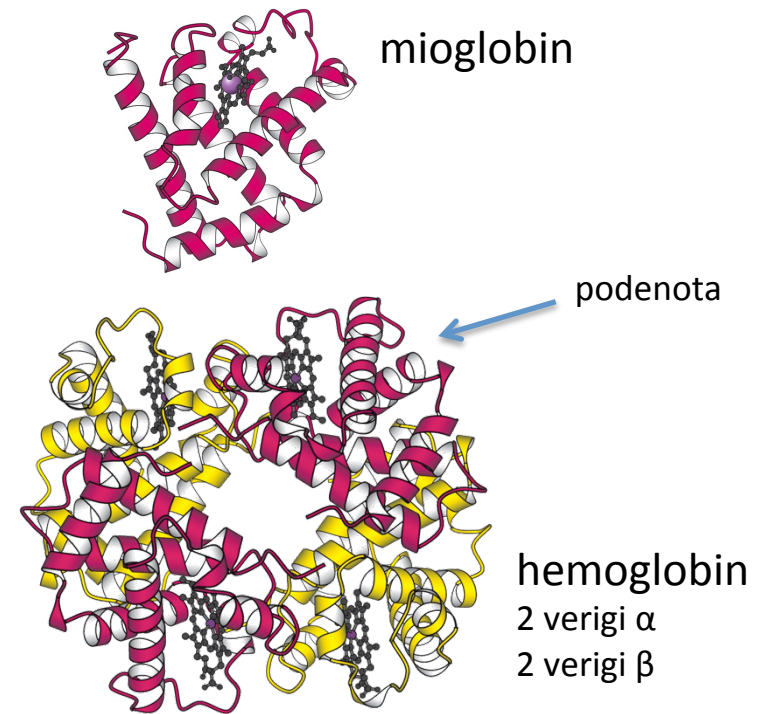
- 3D strukture so veliko bolj ohranjene
- včasih so 3D strukture podobne, ak zaporedje pa ne

- aktin / Hsp-70
  - 15 % identičnost
  - paraloga
  - različna funkcija



# PROTEINI: lastnosti

- monomerni proteini
  - iz ene same polipeptidne verige
- oligomerni proteini
  - so iz več polipeptidnih verig
  - posamezna veriga je podenota
  - podenote so lahko enake ali različne
  - povezane so z nekovalentnimi vezmi
- enostavni proteini
  - sestavljeni samo iz ak
- konjugirani proteini
  - holoprotein/apoprotein
  - kofaktor
- globularni proteini
- fibrilarni proteini (netopni)



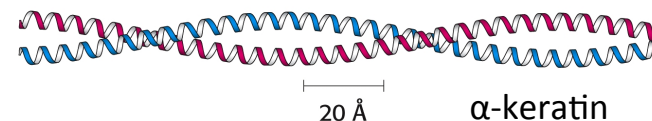
holoprotein = apoprotein + kofaktor  
aktiven                      neaktiven

kovinski ion

organska molekula

- stalno vezana = prostetska skupina

- začasno vezana = kosubstrat



# PROTEINI: delovanje proteinov

Različna zaporedja ak se pri proteinih odražajo v različni velikosti, obliki in aktivnosti.

- **encimska kataliza**

- encimi
- reakcija pospešena do  $10^{14}x$
- več tisoč encimov

- **mehanska opora**

- čvrstost kože, kit, hrustanca (kolagen)
- perje, laje, nohti (keratin)
- citoskelet (aktinski filamenti, mikrotubuli, intermediarni filamenti)

- **imunski odgovor**

- protitelesa (Ab)
- prepoznajo in vežejo tuje substance
- virusi, bakterije, proteini, sladkorji
- avtoimune bolezni

- **transport in skladiščenje**

- majhne molekule se po telesu prenašajo preko proteinov
- lipoproteini (netopne molekule, holesterol)
- albumin (maščobne kisline)
- transferin, feritin (transport, skladiščenje Fe)
- hemoglobin, mioglobin (kisik)

- **koordinirano gibanje**

- gibalni proteini omogočajo gibanje mišic
- aktin, miozin

- **transmisija signalov**

- živčna celica odgovori na dražljaj preko receptorja
- rodopsin občutljiv na svetlobo

- **kontrola rasti in diferenciacije**

- izražanje genetske informacije in kontrola so pogoj za diferenciacijo celic
- bakterije, kontrola preko represorjev
- višji organizmi, rastni faktorji in hormoni

