

ZGRADBA IN FUNKCIJA PROTEINOV

SILE, KI STABILIZIRAJO 3D ZGRADBO PROTEINOV

PEPTIDNA VEZ

α -HELIKS

β -NAGUBANA RAVNINA

β -OBRAT

KVARTARNA ZGRADBA

ZVIJANJE PROTEINOV spontano, šaperoni

"KONFORMACIJSKE" BOLEZNI

FUNKCIJA PROTEINOV

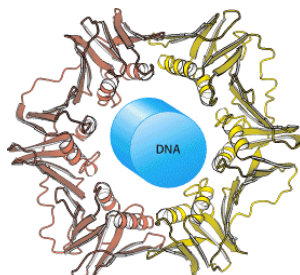
GLIKOPROTEINI vezava sladkorjev na proteine, proteoglikani,
agrekani, biološki pomen glikozilacije

FIBRILARNI PROTEINI keratin, kolagen, fibroin, spidroin

MIOGLOBIN, HEMOGLOBIN vezava kisika, zgradba,
konformacijske spremembe ob vezavi kisika, Bohrov
efekt, vpliv bifosfoglicerata, različne variante
hemoglobinov in njihova aktivnost

1. PRIMARNA ZGRADBA DOLOČA STRUKTURO PROTEINA!

- 3D struktura opisuje položaj vseh atomov proteina v prostoru
- Proteini se med seboj razlikujejo v primarni zgradbi. Imajo isto kovalentno ogrodje, razlikujejo se glede na stranske skupine.
- Primarna zgradba določa način zvitja in vse višje zgradbe in tako tudi funkcijo proteina !
- Stranske skupine so spakirane tako, da so hidrofobne (skupina 1) v notranjosti, polarne in nabite (skupini 2 in 3) pa na površini proteina.

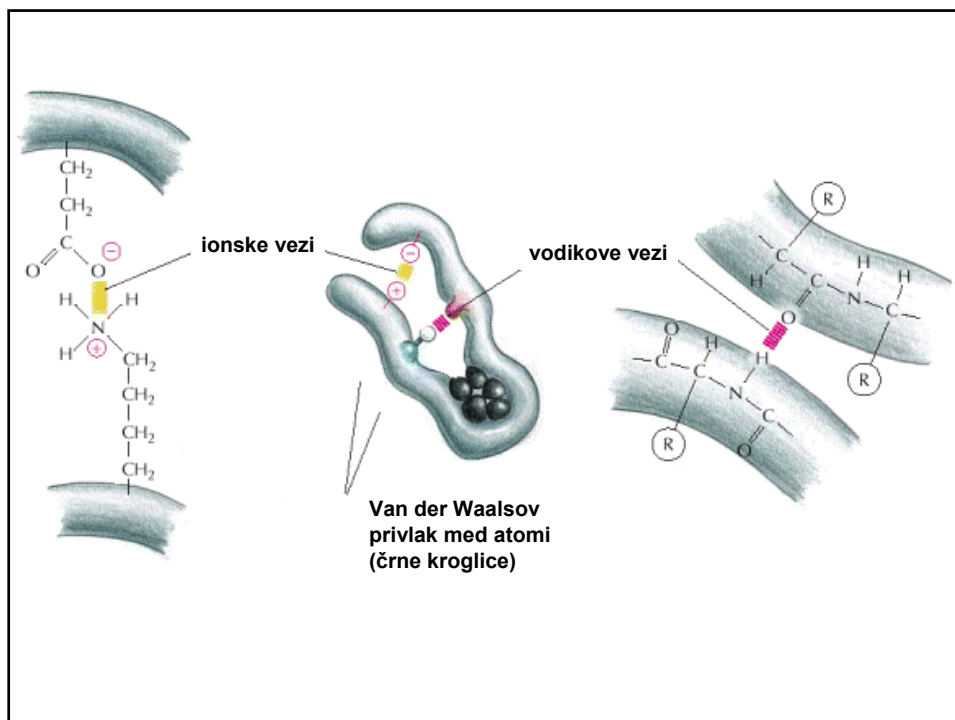


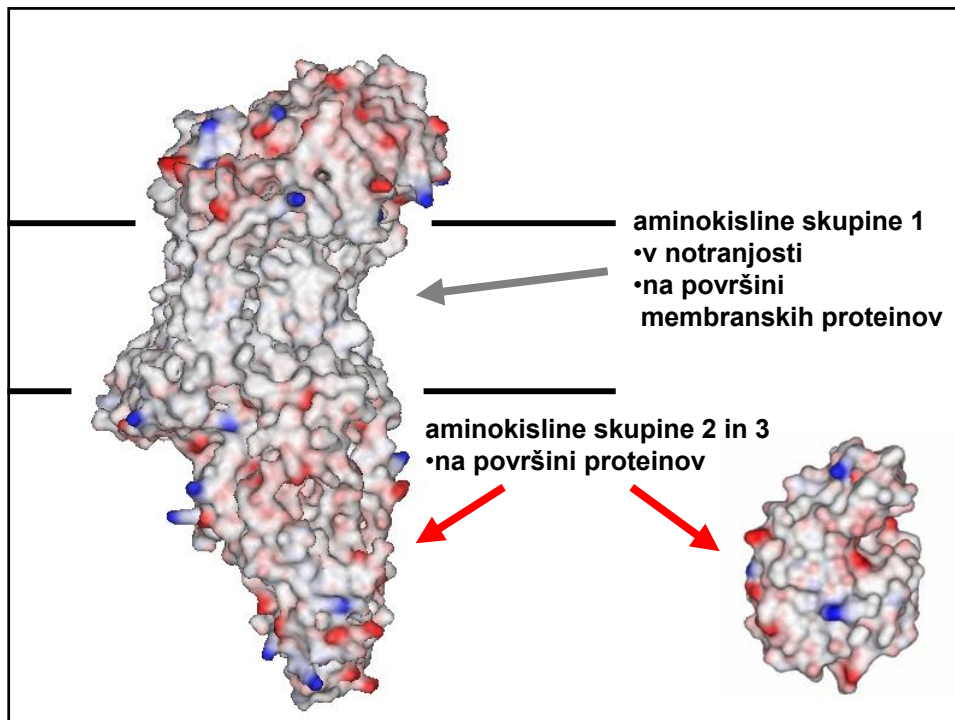
Proteini, ki sodelujejo pri
replikaciji DNA (modro)

2. NAJBOLJ POMEMBNE ZA STABILIZACIJO STRUKTURE SO ŠIBKE NEKOVALENTNE INTERAKCIJE!

Kemijske vezi, ki stabilizirajo zgradbo proteinov

- Primarna struktura - kovalentna vez (peptidna)
- Sekundarna, Terciarna, Kvartarna struktura –
 - disulfidna vez (kovalentna)
 - šibke vezi
 - H-vezi 12-30 kJ/mol
 - ionske interakcije 20 kJ/mol
 - van der Waalsove interakcije 0.4 - 4 kJ/mol
 - hidrofobne interakcije <40 kJ/mol

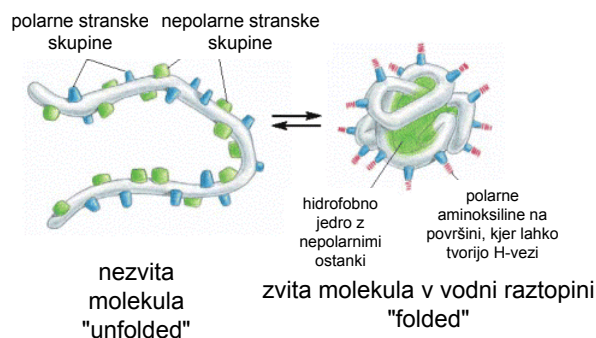
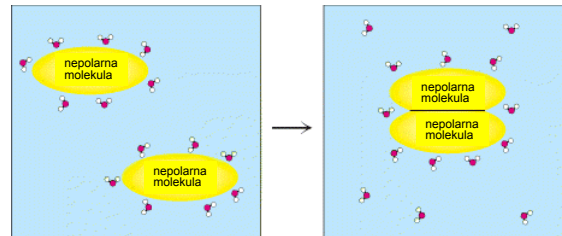




TRODIMENZIONALNA STRUKTURA

- Glavne sile, ki stabilizirajo 3D strukturo so hidrofobne interakcije med stranskimi skupinami nepolarnih aminokislin.
- V nezvitem ("**unfolded**") proteinu hidrofobne aminokislone ne morejo tvoriti H-vezi z vodo, nastane urejena struktura vode okoli polipeptidne verige, ki je termodinamsko neugodna:
 - ni stabilizirajočih interakcij med vodo in stranskimi skupinami polipeptidne verige
 - entropija vodnih molekul je zmanjšana
- Zato se proteinska veriga zvije ("**fold**ing") tako, da skrrije nepolarne stranske skupine v notranjost proteina.
 - Voda tvori H-vezi s stranskimi skupinami na površini proteina.
 - Voda se iztisne iz hidrofobne sredice in je navadno v globularnih proteinih v sredini ni!
 - Disulfidne vezi dodatno stabilizirajo 3D zvitje proteina.

HIDROFOBNI EFEKT



Navadno je prisotna samo ena "**nativna**" konformacija, ki je najbolj stabilna. Vseeno ohranjena tudi fleksibilnost, ki je včasih nujno potrebna.
100 aminokislin 5×10^{47} različnih **konformacij**

Zvijanje proteina je postopno. Prične se s tvorbo lokalne sekundarne strukture in strukturnih motivov (iniciacijska jedra). Preostala veriga se zvije okoli teh jeder. Zvijanje je kooperativno (vsak korak olajša tvorbo ugodnih interakcij).

In vivo zvitje proteinov:

- spontano- samo na osnovi primarne zgradbe
- pomoč drugih molekul- **molekularni šaperoni**. Vežejo nezvito ali delno zvito polipeptidno verigo in preprečijo neugodne hidrofobne interakcije med izpostavljenimi deli. Imajo nizko specifičnost. V vseh organizmih, v normalnih ali stresnih (vročina) razmerah.

Razvijanje proteinov ("**protein unfolding**")

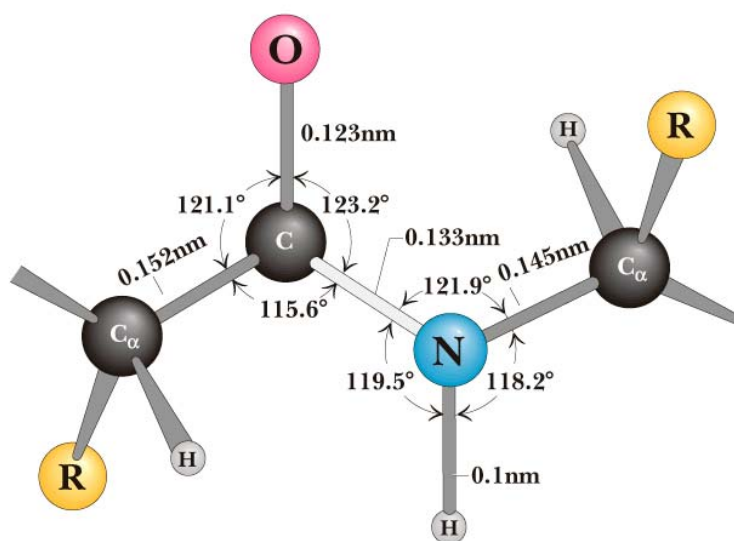
denaturacija kompletna izguba organizirane strukture (kuhanje jajc!). Poruši se sekundarna in terciarna zgradba, primarna zgradba ostane nespremenjena. **Izguba funkcionalnosti!!**

- **ireverzibilna**
- **reverzibilna** (organska topila, urea, gvanidinijev hidroklorid, natrijev dodecil sulfat).

PEPTIDNA VEZ

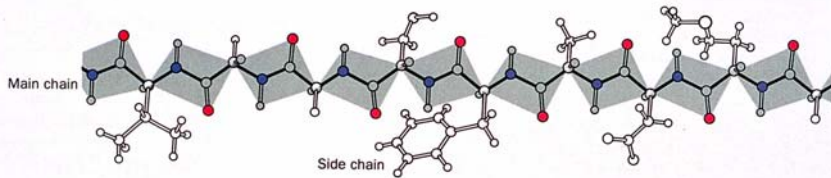
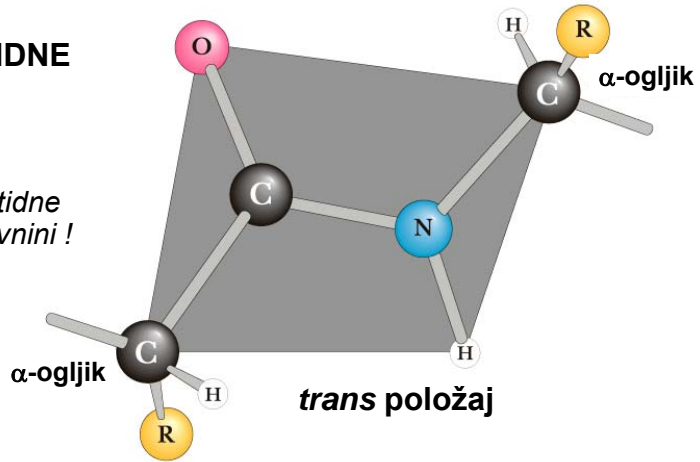
- Običajno v *trans* konformaciji
- Ima 40%-ten značaj dvojne vezi
- dolžina 0.133 nm – krajša od enojne in daljša od dvojne vezi
- Dvojna vez – zato je 6 atomov peptidne vezi ko-planarnih!
- *trans* položaj C_{α}
- N-atom delno elektropozitiven;
O-atom elektronegativen

DIMENZIJE PEPTIDNE VEZI

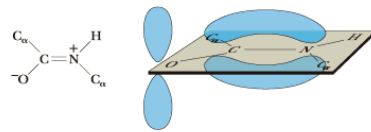
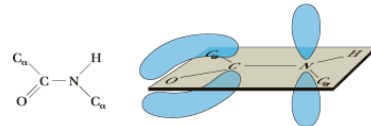


**KOPLANARNA
NARAVA PEPTIDNE
VEZI**

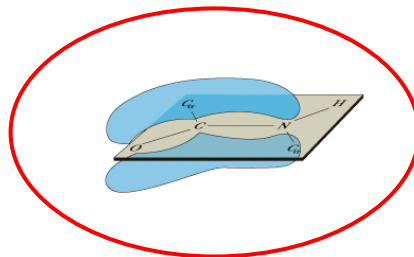
6 atomov peptidne
vezi leži v ravnini !



Razporeditev
elektronov
v peptidni
vezi

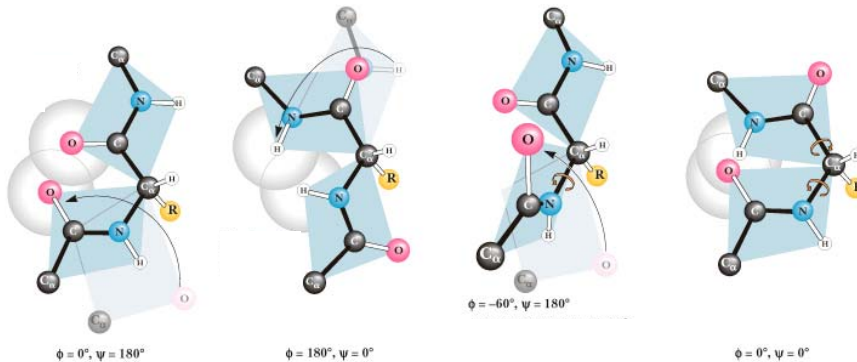
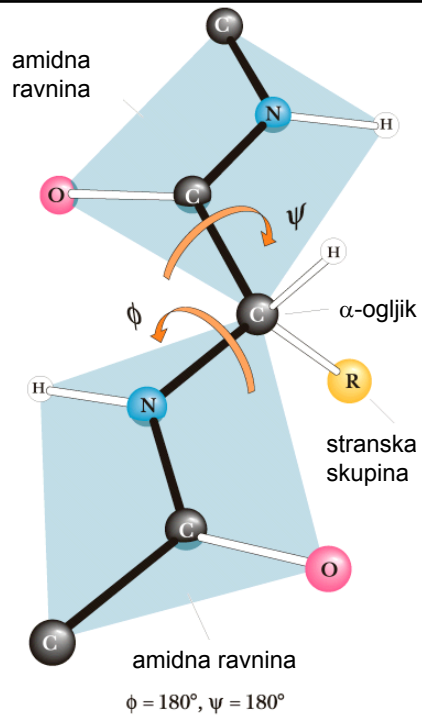


resonančni hibrid



Koplanarna konfiguracija peptidne vezi

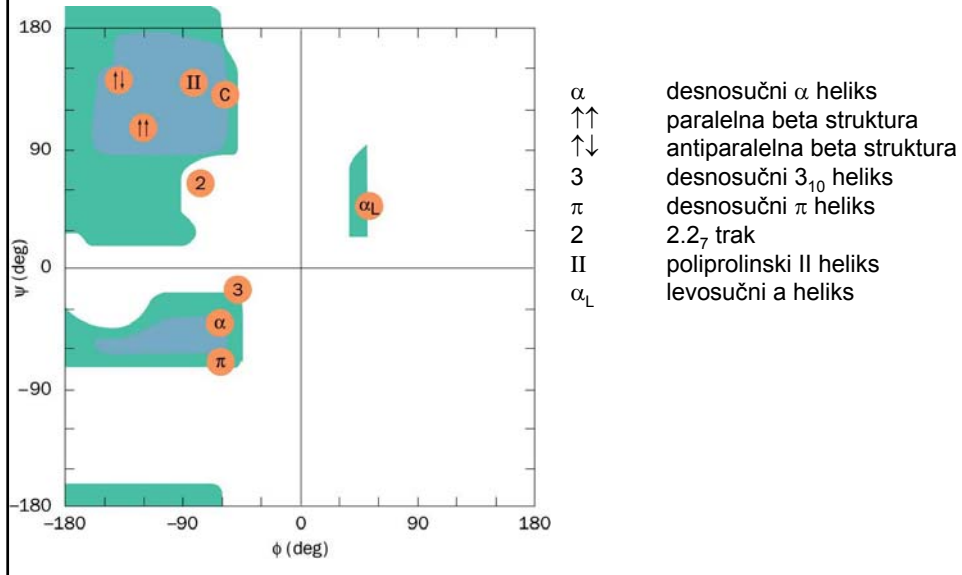
- Resonančna stabilizacija planarne strukture (energija stabilizacije cca 88 kJ/mol), vez ni vrtljiva v fizioloških razmerah
- Vrtljivost vezi med α -ogljikom in atomi iz peptidne vezi
 α -C – CO- ψ (psi)
 α -C – NH- ϕ (fi)
- Celoten potek polipeptidne verige določen s koti ϕ in ψ . Nekateri bolj verjetni.



Nekatere kombinacije kotov se zaradi prekrivanja izključujejo !

- $\phi = 0, \psi = 180$ malo verjetna
- $\phi = 180, \psi = 0$ malo verjetna
- $\phi = 0, \psi = 0$ malo verjetna

RAMACHANDRANOV DIAGRAM prikazuje kombinacije kotov ψ in ϕ



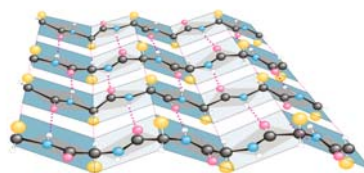
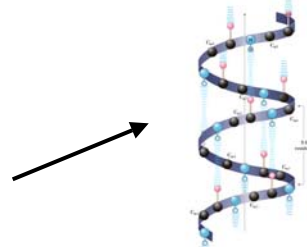
LOKALNE STRUKTURE STABILIZIRANE Z H-VEZMI

α -heliks (α -vijačnica, " α -helix")
in druge vrste vijačnic-
periodična

β -struktura (nagubana ravnina,
 β -ploščica, " β -sheet")-
sestavljena iz " β -trakov",
periodična

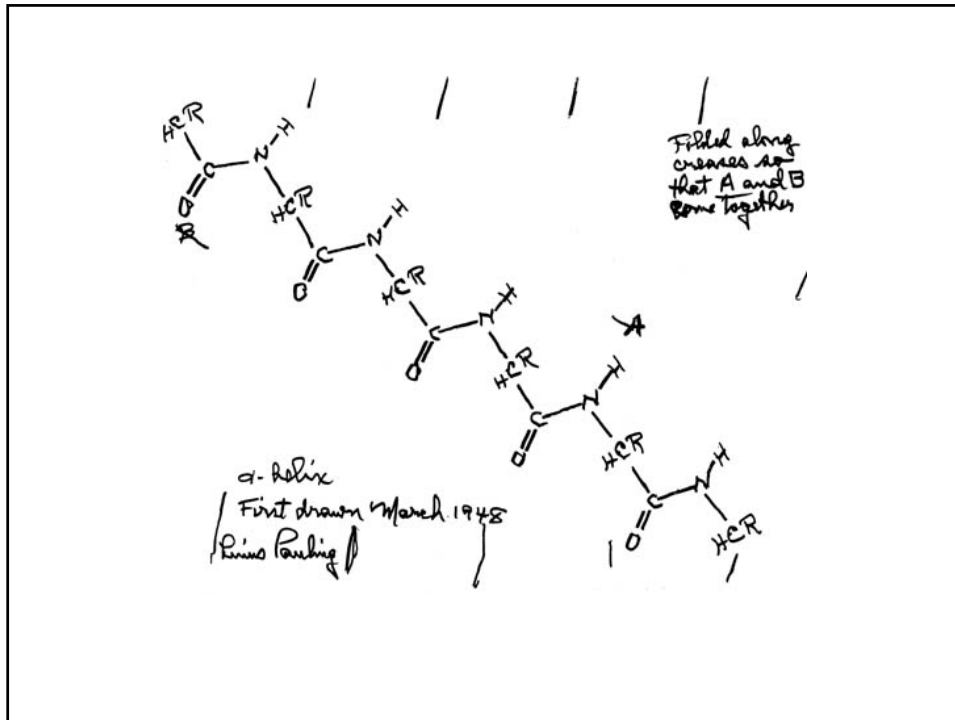
zanke (β -obrati, "turn")-
neperiodična, omega zanke

"naključna" struktura-
neperiodična, "random coil"



Struktura α -heliksa in β -ploskev

Pauling and Corey (1951) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 27, 205-211; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 37, 729-740



α HELIKS

<p>desnosučni</p> <p>število aminokislin na obrat</p> <p>višina dviga na ostanek</p> <p>višina zavoja</p> <p>$\phi = -60^\circ, \psi = -45^\circ$</p> <p>vodikove vezi med n in n+3 ostanekom</p>	<p>3.6</p> <p>1.5 Å</p> <p>$3.6 \times 1.5 \text{ Å} = 5.4 \text{ Å}$</p>
--	--

vodikove vezi
v α -heliksu

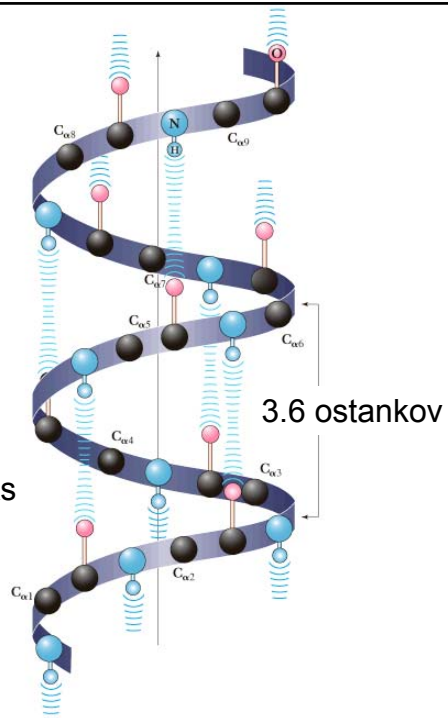
=CO : H-N-

n : n+3

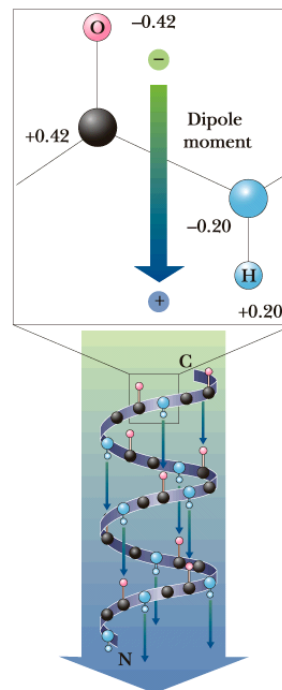
ni H-vezi med stranskimi skupinami

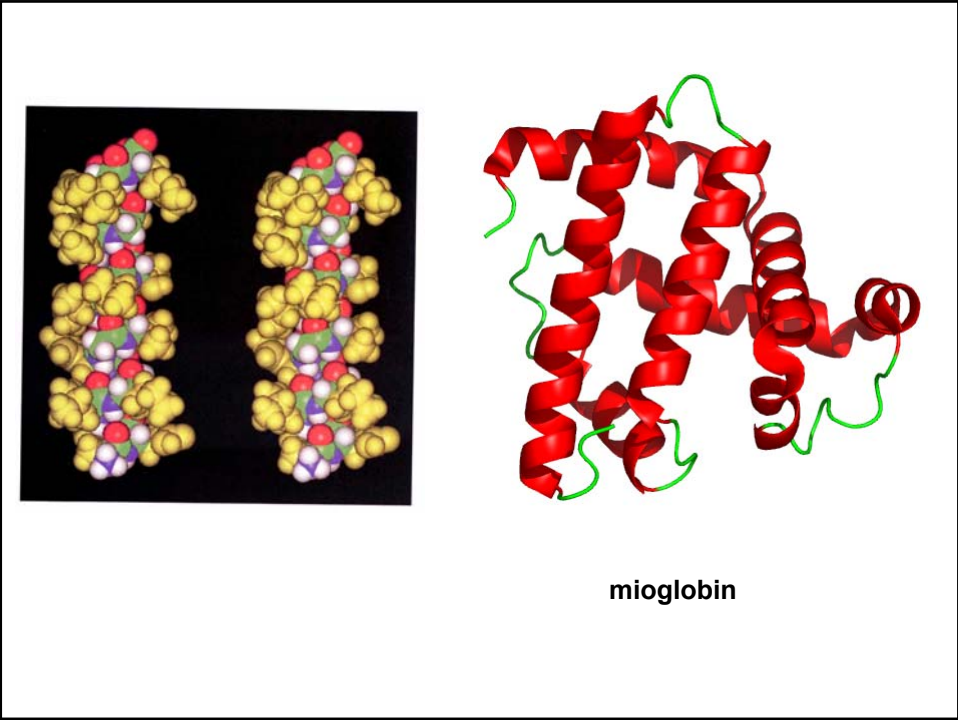
preveč polarnih ali nabitih ostankov destabilizira heliks

prolin destabilizira heliks

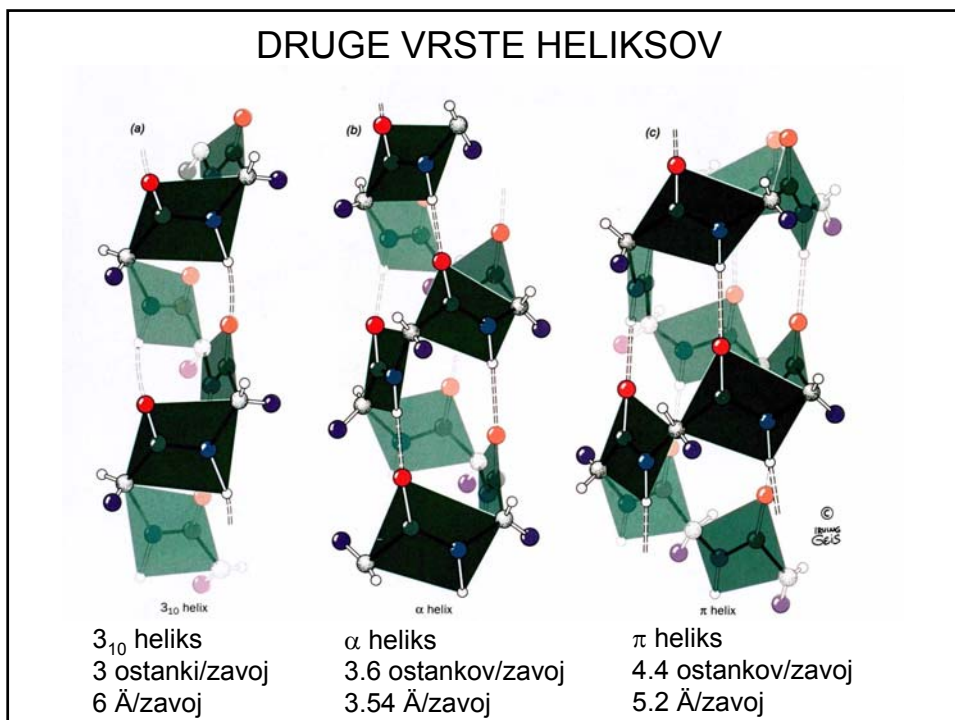
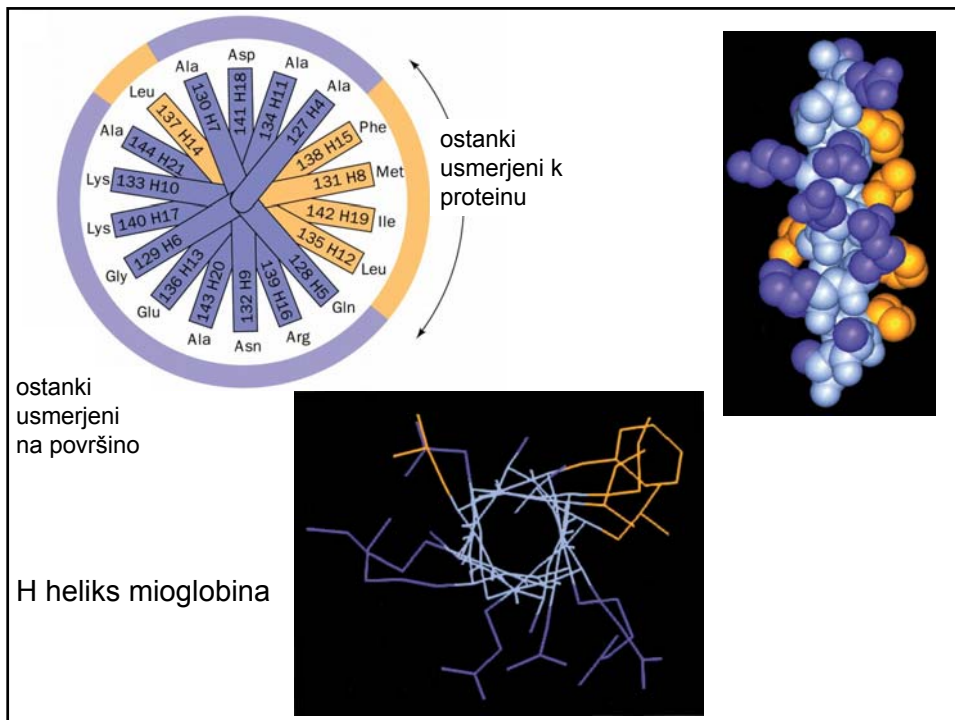


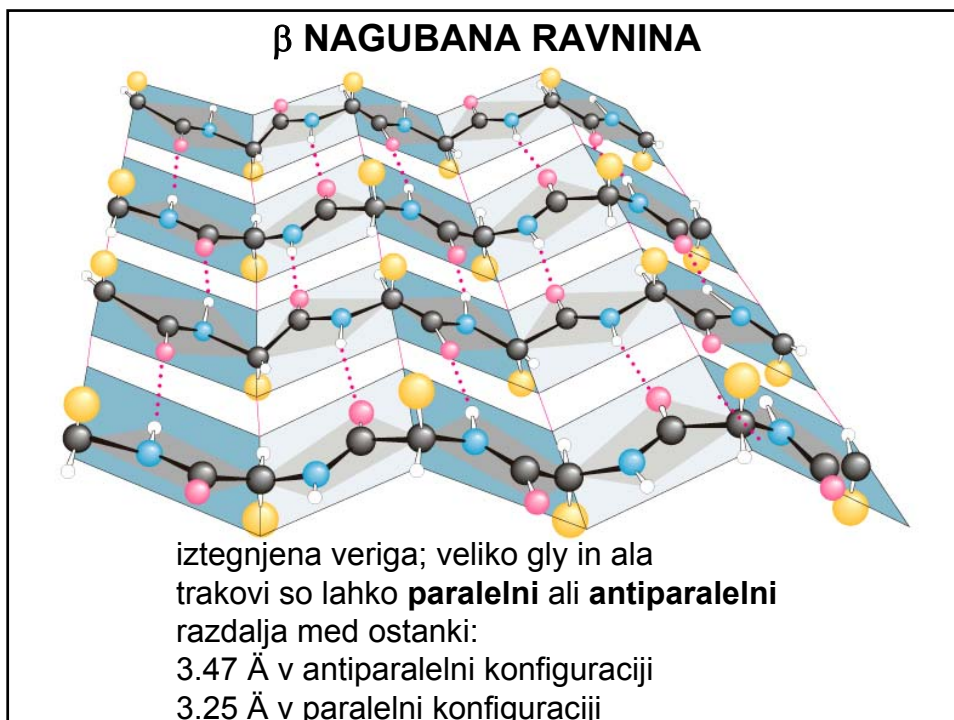
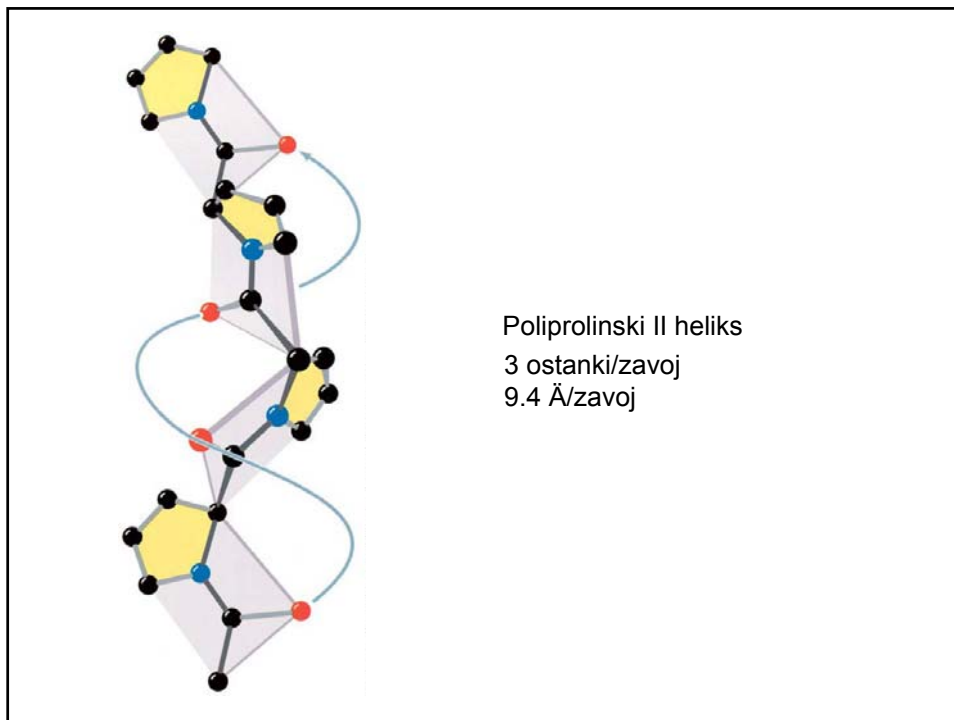
dipolni moment
v α -heliksu

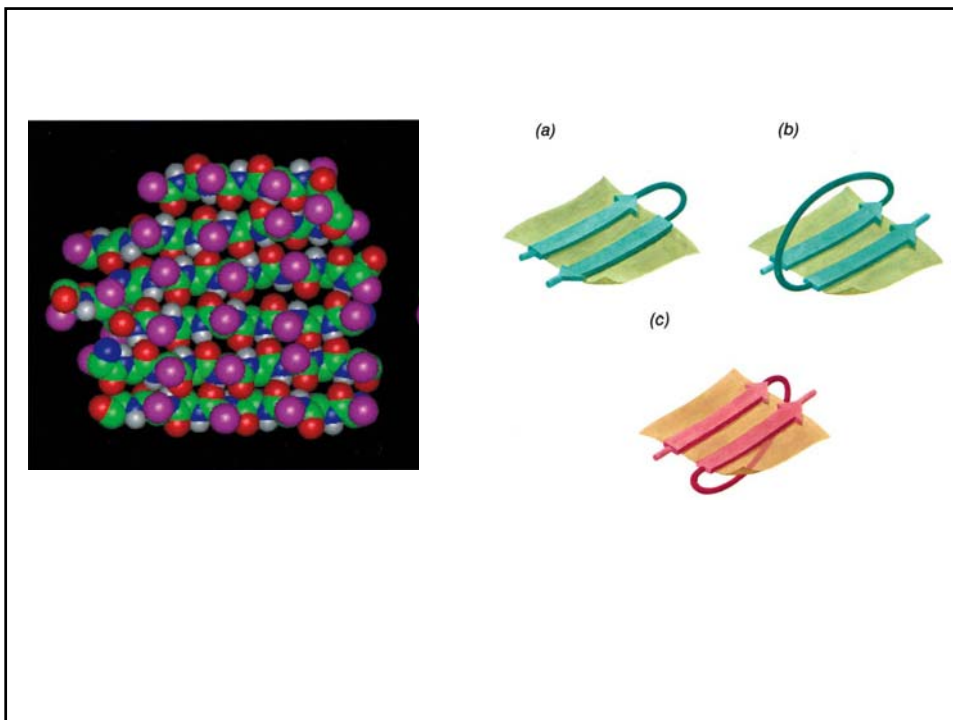
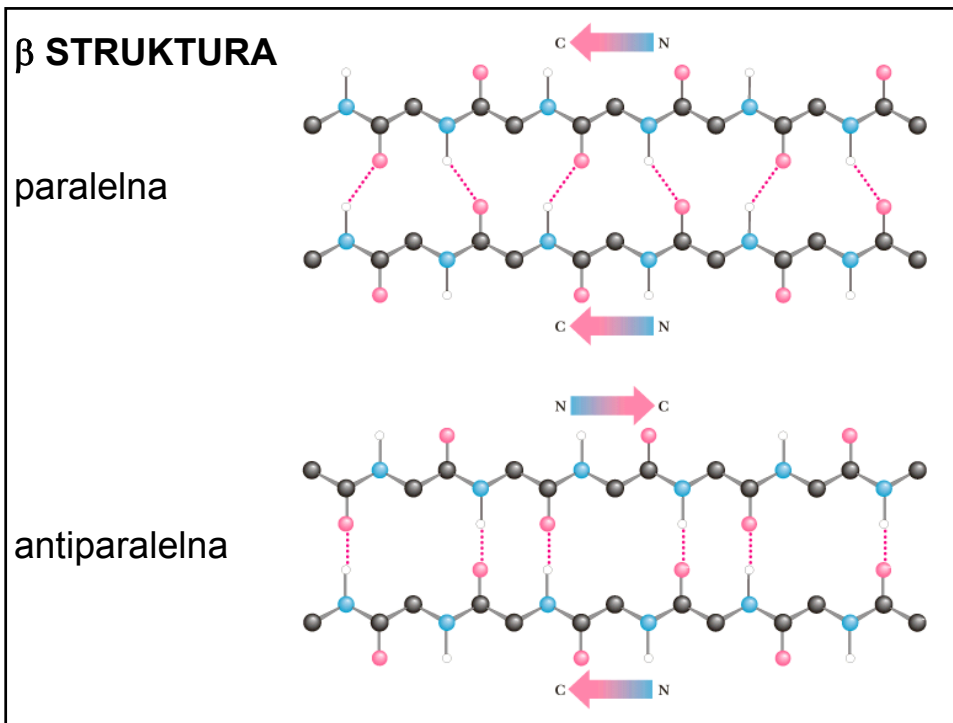


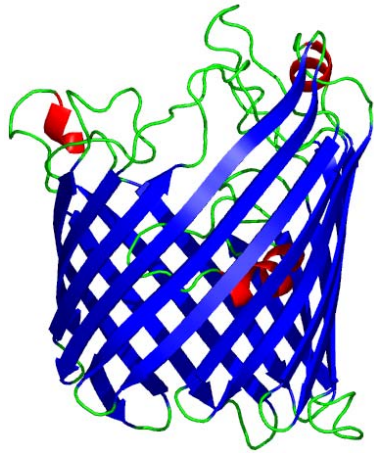


<p>HELIKSI imajo lahko različne lastnosti, ki so odvisne od aminokislinske sestave:</p> <p>amfipatični (flavodoksin)</p> <p>hidrofobni (v notranjosti; citratna sintaza)</p> <p>polarni (na zunanosti; kalmodulin)</p> <p>Predstavitev heliksa kot helikalno kolo</p>		

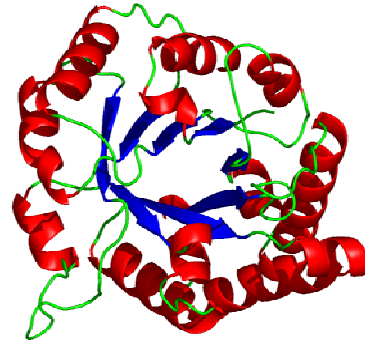






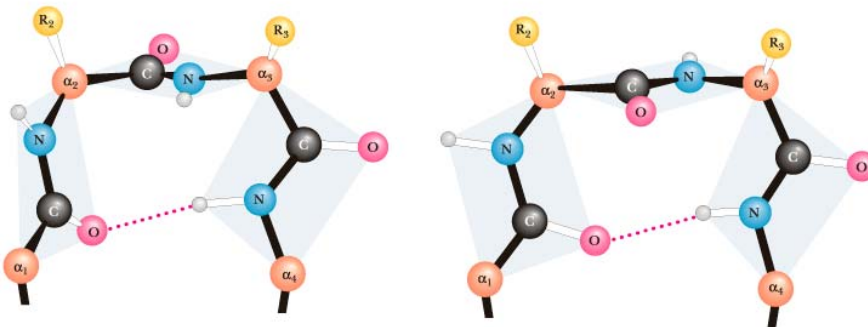


porin zunanje
bakterijske membrane

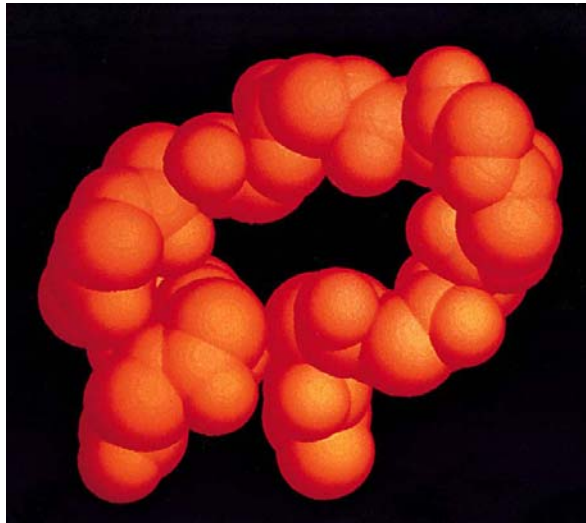


trioza-fosfat
izomeraza

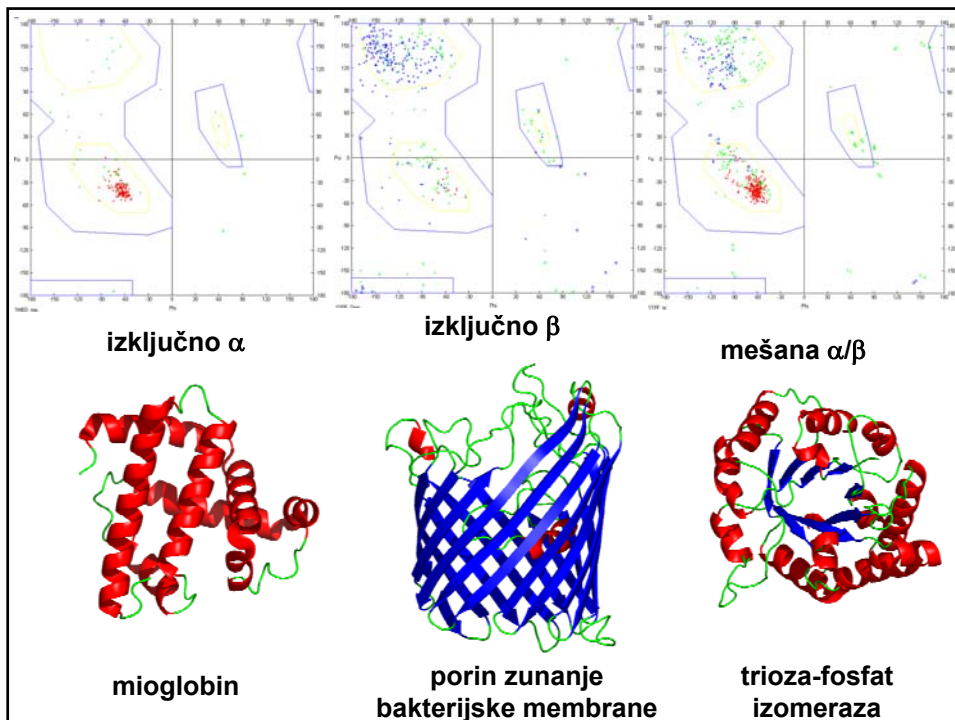
β OBRAT

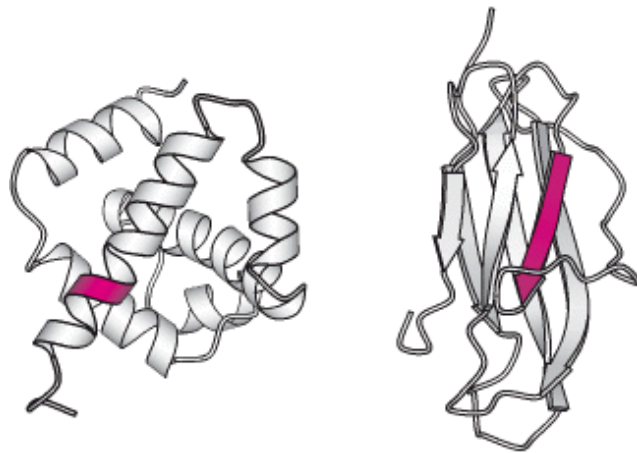


- povezuje periodični strukturi (α -heliks, β -trak)
- omogoča spremembo smeri polipeptidne verige
- karbonylni C enega ostanka je s H-vezjo povezan z amidnim vodikom
- glicin (ker je fleksibilen) in prolin (ker obroč omogoča obrat) prevladujeta



omega zanke- daljši neperiodični deli strukture, 6-16 aminokislin, stranske skupine aminokislin zapolnijo notranjost zanke

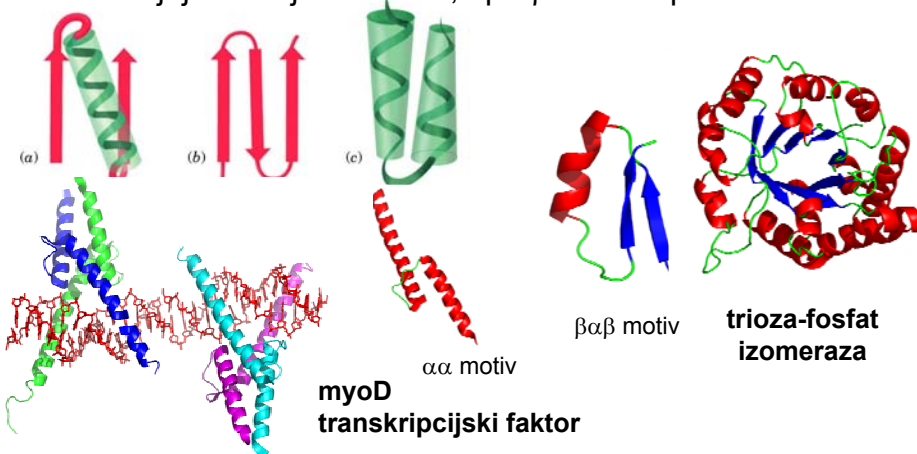


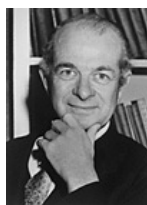
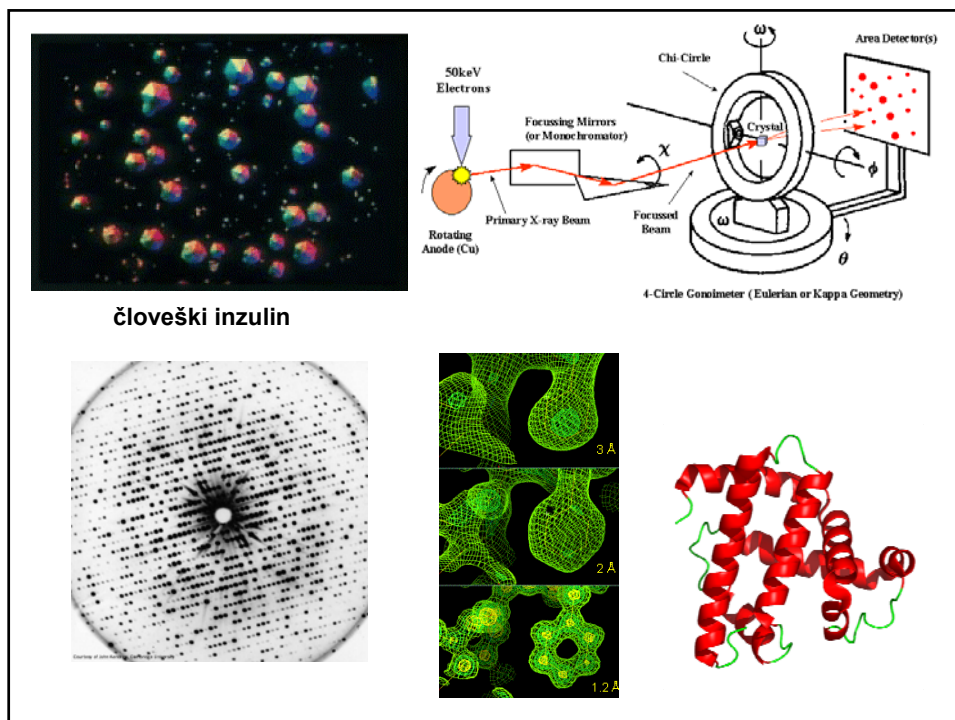


**Struktura je odvisna od konteksta v katerem se določena aminokislina nahaja
VDLLKN peptid**

STRUKTURNI MOTIVI

- posamezni elementi sekundarne strukture se lahko povezujejo v stabilne strukturne vzorce- MOTIVI.
npr. helix-loop helix $\alpha\alpha$ motiv transkripcijski faktorji
 $\beta\alpha\beta$ motiv triozafosfat izomeraza (TI)
- se združujejo v večje strukture, npr. β -sodček pri TI





The Nobel Prize in Chemistry 1954

Linus Carl Pauling

"for his research into the nature of the chemical bond and its application to the elucidation of the structure of complex substances "

Pauling has tried this method in his studies of the structure of proteins with which he has been occupied during recent years. **To make a direct determination of the structure of a protein by X-ray methods is out of the question for the present**, owing to the enormous number of atoms in the molecule. A molecule of the coloured blood constituent hemoglobin, which is a protein, contains for example more than 8,000 atoms.

On this basis Pauling deduced some possible structures of the fundamental units in proteins, and the problem was then to examine whether these could explain the X-ray data obtained. It has thus become apparent that one of these structures, the so-called alpha-helix, probably exists in several proteins.



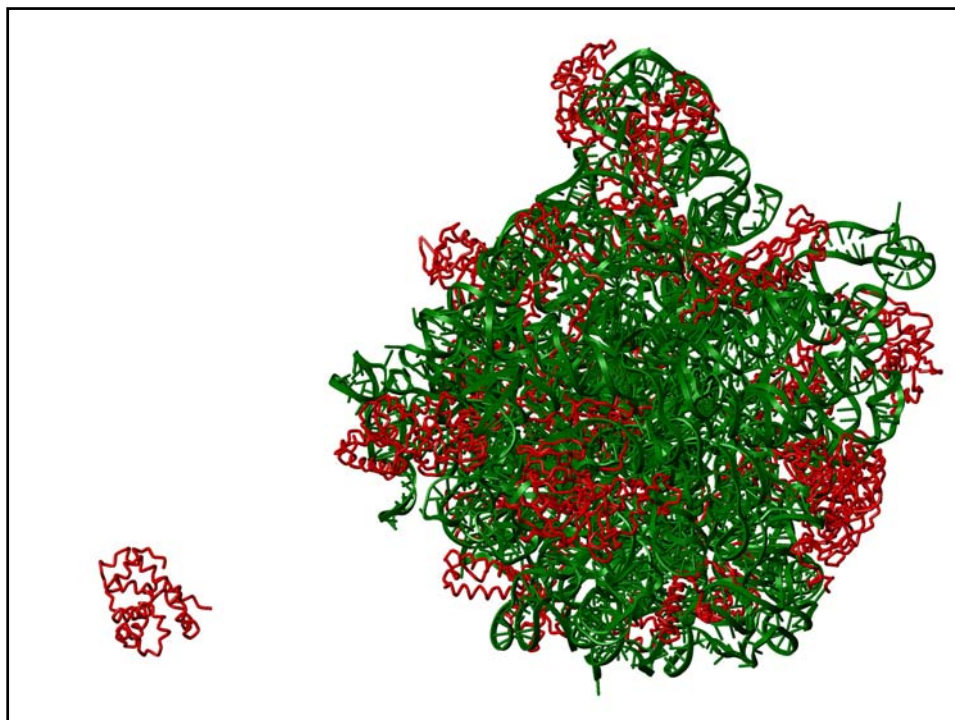
The Nobel Prize in Chemistry 1962

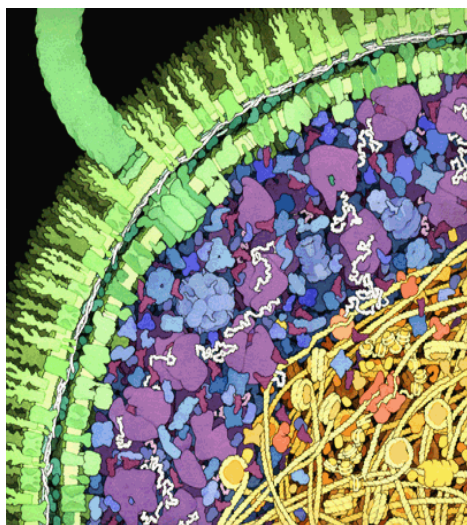
Max Ferdinand Perutz

John Cowdery Kendrew

"for their studies of the structures of globular proteins"

But even if the path was now open for a direct structure determination of haemoglobin and myoglobin, there was still an enormous amount of data to be processed. Myoglobin, the smaller of the two molecules, contains about 2,600 atoms, and the positions of most of these are now known. But for this purpose, **Kendrew had to examine 110 crystals and measure the intensities of about 250,000 X-ray reflections.** The calculations would not have been practicable if he had not had access to a very large electronic computer. The haemoglobin molecule is four times as large, and its structure is known less thoroughly. In both cases, however, Kendrew and Perutz are currently collecting and processing an even greater number of reflections in order to obtain a more detailed picture.





Escherichia coli

This illustration shows a cross-section of a small portion of an Escherichia coli cell. The cell wall, with two concentric membranes studded with transmembrane proteins, is shown in green. A large flagellar motor crosses the entire wall, turning the flagellum that extends upwards from the surface. The cytoplasmic area is colored blue and purple. The large purple molecules are ribosomes and the small, L-shaped maroon molecules are tRNA, and the white strands are mRNA. Enzymes are shown in blue. The nucleoid region is shown in yellow and orange, with the long DNA circle shown in yellow, wrapped around HU protein (bacterial nucleosomes). In the center of the nucleoid region shown here, you might find a replication fork, with DNA polymerase (in red-orange) replicating new DNA.

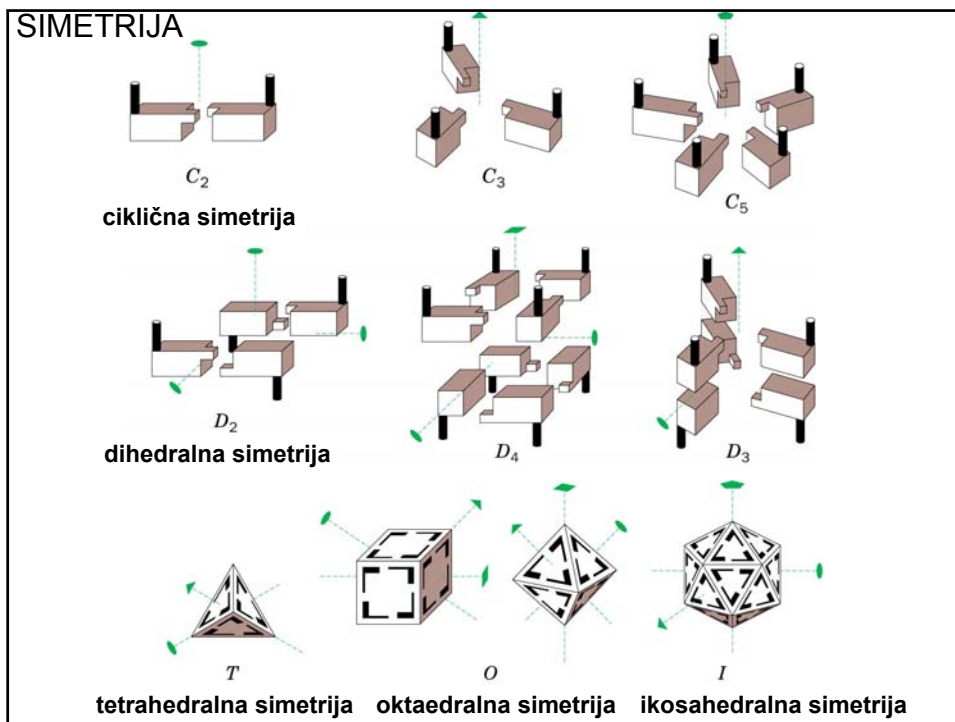
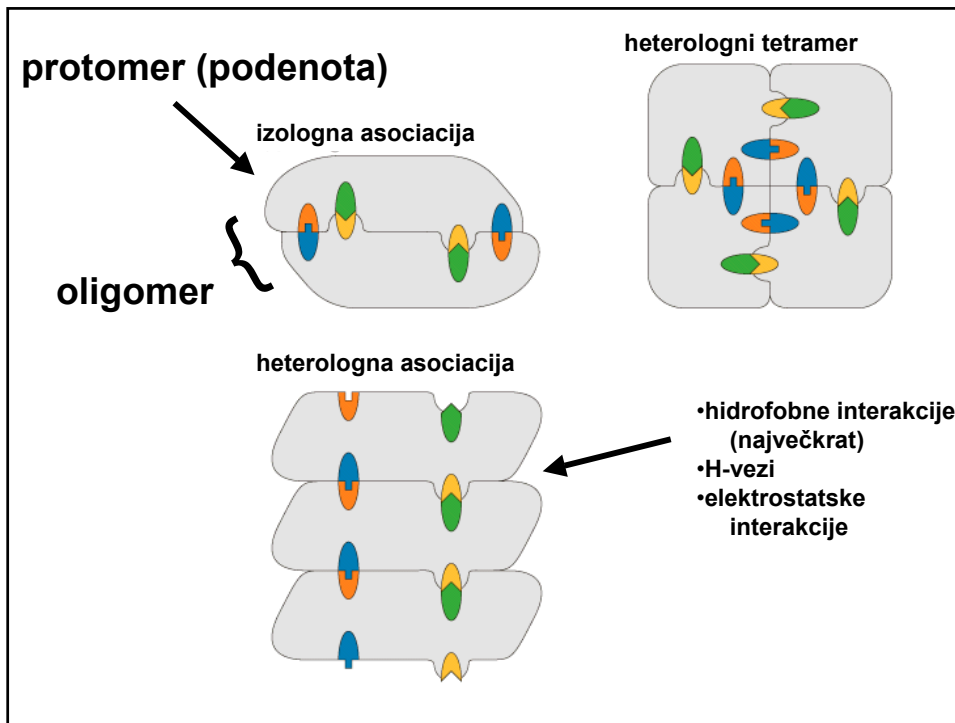
<http://www.scripps.edu/pub/goodsell/>

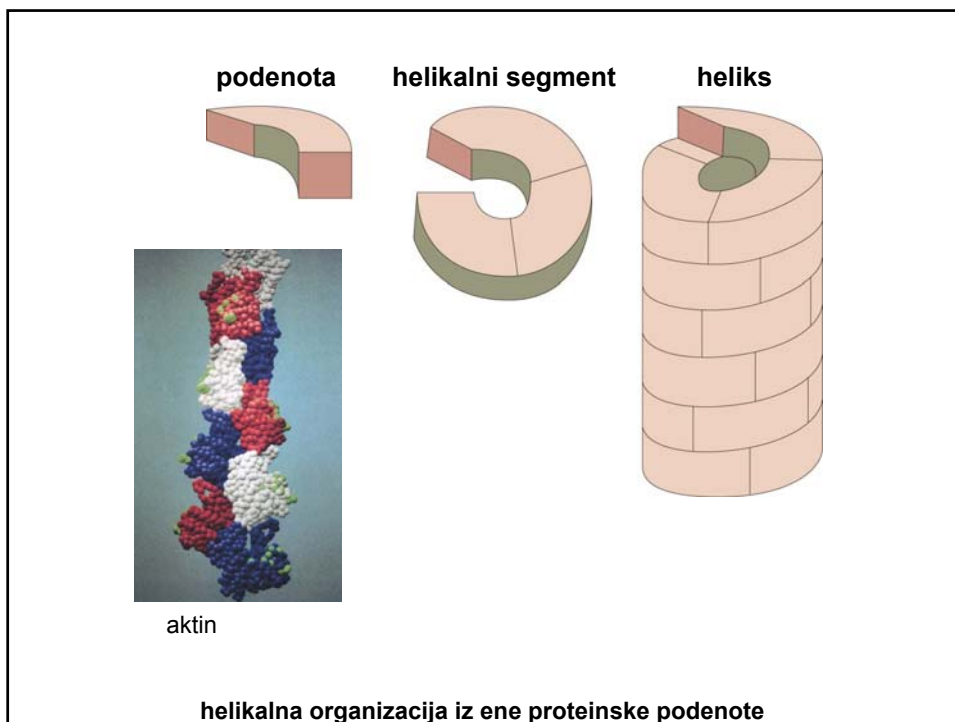
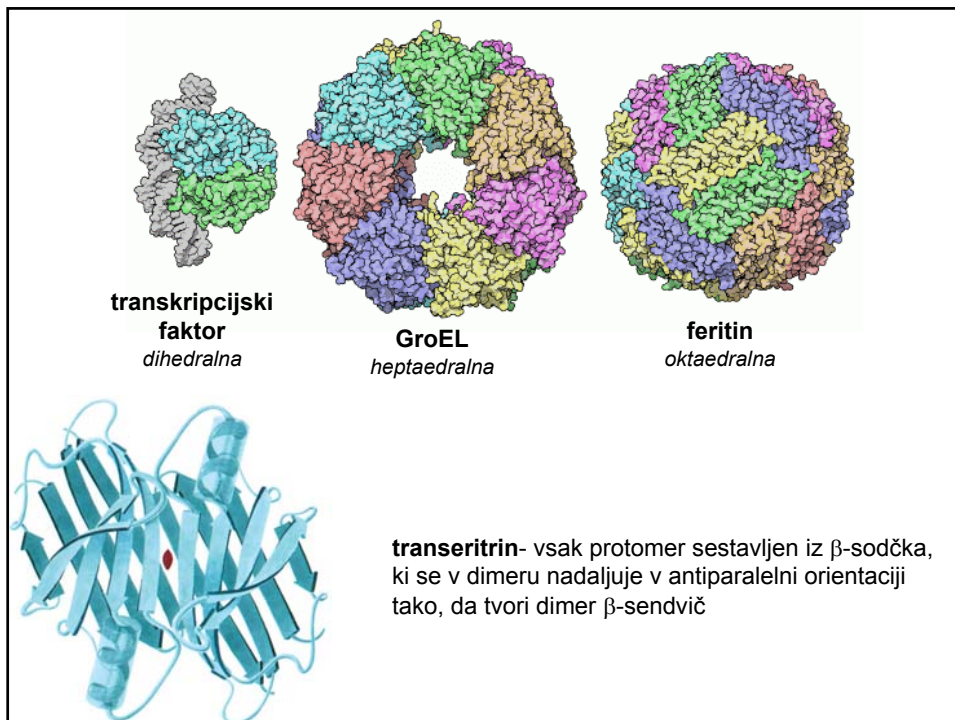
© David S. Goodsell 1999.

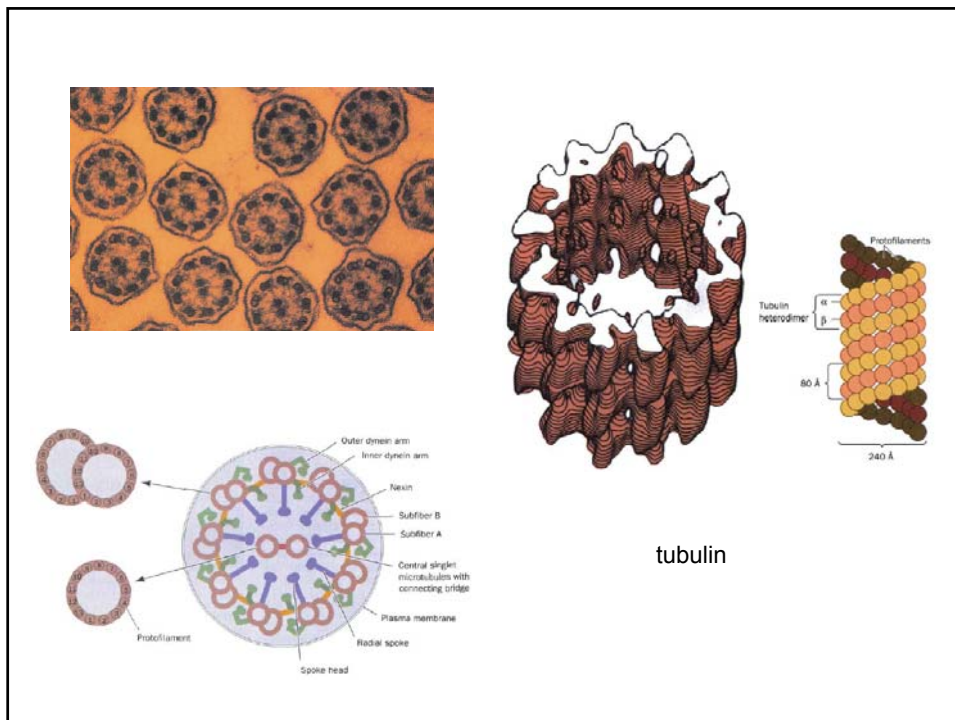
V osnovi so proteini narejeni tako, da je čimmanj nespecifičnih interakcij z ostalimi celičnimi komponentami

STRUKTURNE IN FUNKCIONALNE PREDNOSTI KVARTARNE ZGRADBE

- Stabilnost: zmanjšanje razmerja površina/volumen molekule
- Genetična ekonomičnost in učinkovitost- ne rabiš izdelati dolgega polimera, mesto sinteze in polimerizacije sta lahko različna
- Kopičenje več katalitičnih mest (npr. multi-encimski kompleksi), katalitska mesta na vmesnih površinah
- Popravljanje defektov enostavno- zamenjaš podenoto
- Kooperativnost
 - Pozitivna
 - Negativna







ALOSTERIČNA REGULACIJA, KOOPERATIVNOST

Vezava liganda na protein je regulirana z vezavo drugega liganda (**EFEKTOR ali MODULATOR**) na drugem mestu

Oba enaka

HOMOTROPIČNI efekti

Različna

HETEROTROPIČNI efekti

Pozitivna kooperativnost

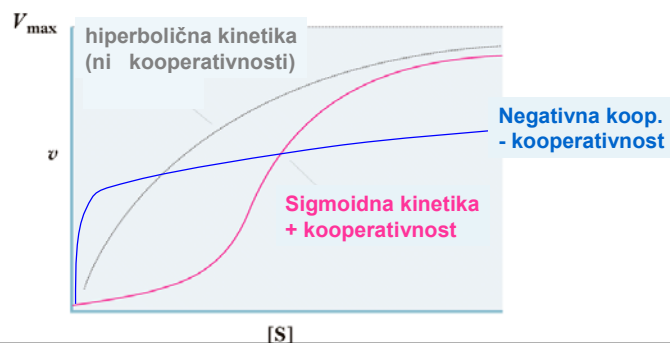
zvišana afiniteta do liganda

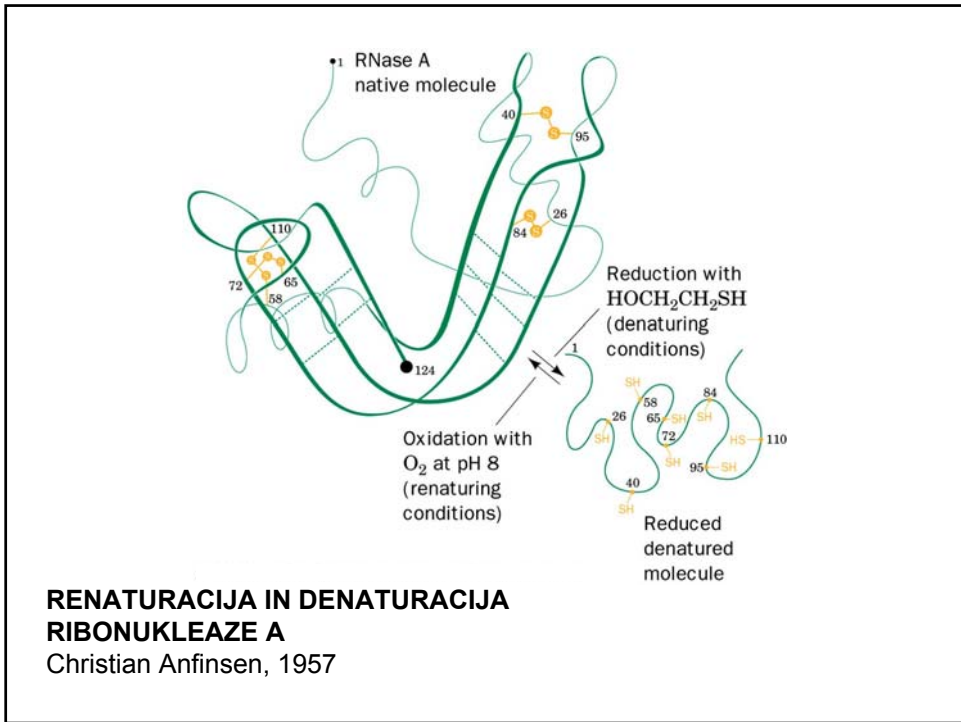
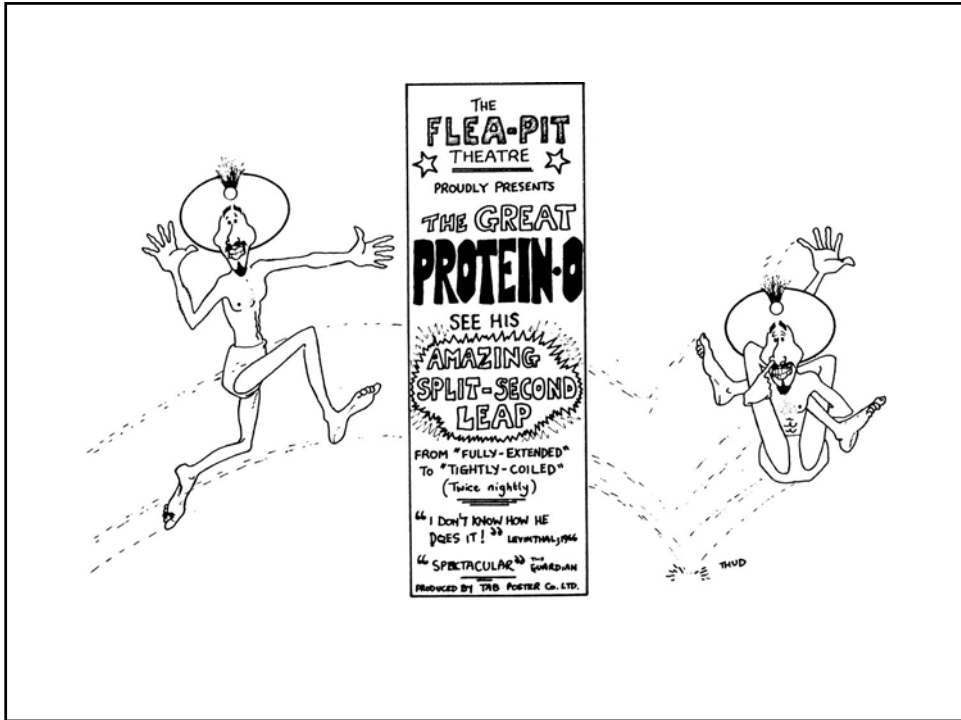
Negativna kooperativnost

znižana afiniteta do liganda

Hemoglobin- homotropični efekti (kisik), heterotropični efekti (npr. H^+ , BPG)

Pomemben regulatorni mehanizem za vrsto proteinov, predvsem encimov





ZVIJANJE PROTEINOV

“burst phase”- hitra faza (milisekunde) v kateri se tvori večina elementov sekundarne strukture

hidrofobni kolaps- hidrofobni deli se združijo, odstrani se voda. To stanje se imenuje STANJE ODTAJANE KROGLICE (“molten globule”)- sekundarna struktura je tvorjena, 3D pa še ne.

pojav strukture podobne nativni. Elementi sekundarne strukture so stabilizirani, ampak ne še pravilno vsidrani en v drugega. Stranske skupine še fleksibilne.

končni dogodki, ki privedejo do pakiranja v rigidno hidrofobno sredico (sekunde)

Dobson CM Phil.Trans. R. Soc. Lond. B (2001) 356, 133-145

ZVIJANJE PROTEINOV

Zvitje v nativno obliko brez intermediatov, dvostopenjski mehanizem, citokrom c
 $U \rightarrow N$

Zvitje preko dobro določenih intermediatov, goveji pankreasni tripsinski inhibitor
 $U \rightarrow I_1 \rightarrow I_2 \rightarrow I_3 \rightarrow N$

Fully reduced (random coil)

One-disulfide intermediates

Two-disulfide intermediates

Native (three disulfides)

[30-51]

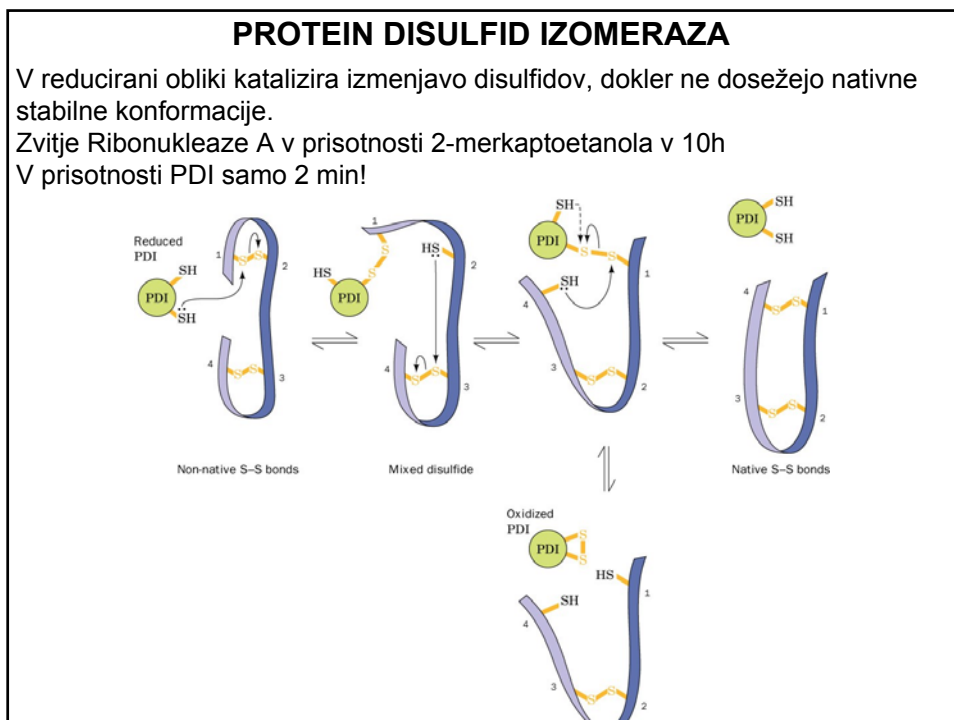
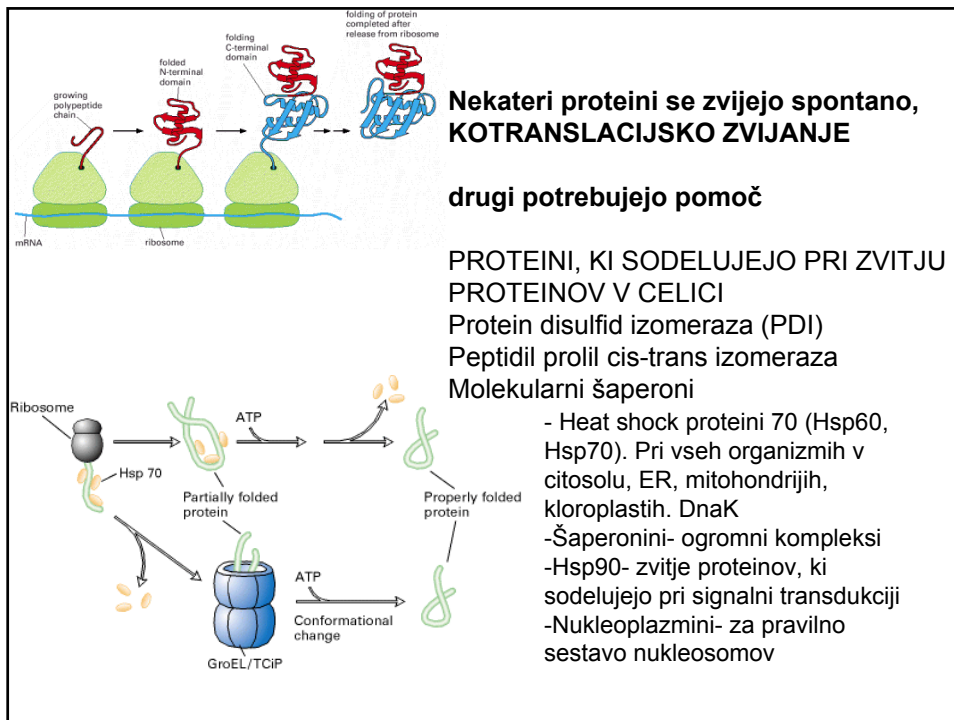
[5-30]

[30-51;14-38]

[30-51;5-55]

[30-51;5-55;14-38]

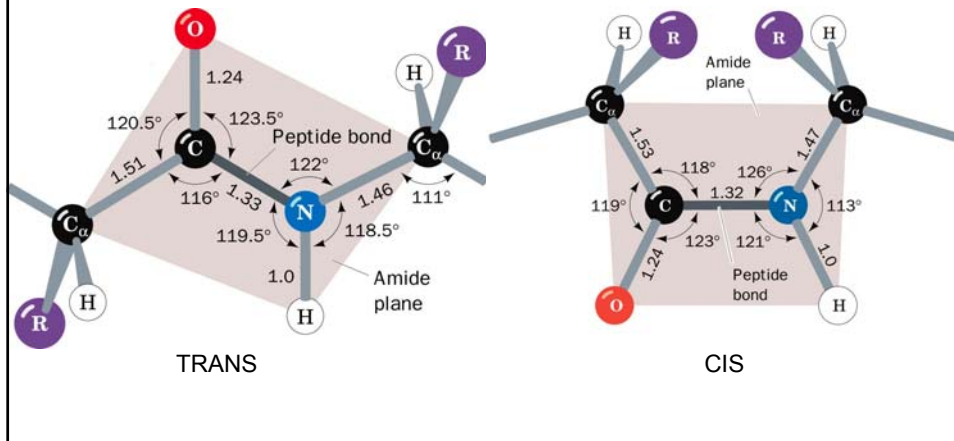
Others



PEPTIDIL PROLIL CIS-TRANS IZOMERAZA

Xaa-Pro peptidne vezi lahko v 10% v cis konformaciji

Peptidil prolil cis-trans izomeraza katalizira spremembo cis v trans konformacijo, ki je drugače počasen proces.

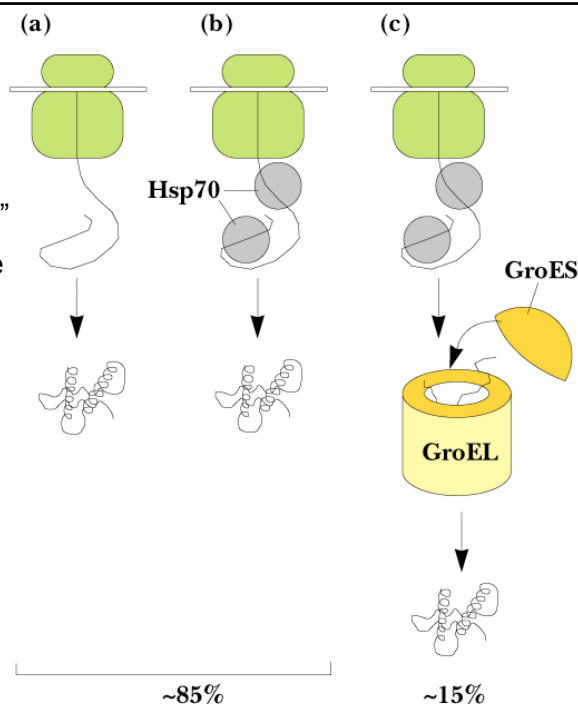


Vloga Hsp 70

Hsp = "heat shock protein"

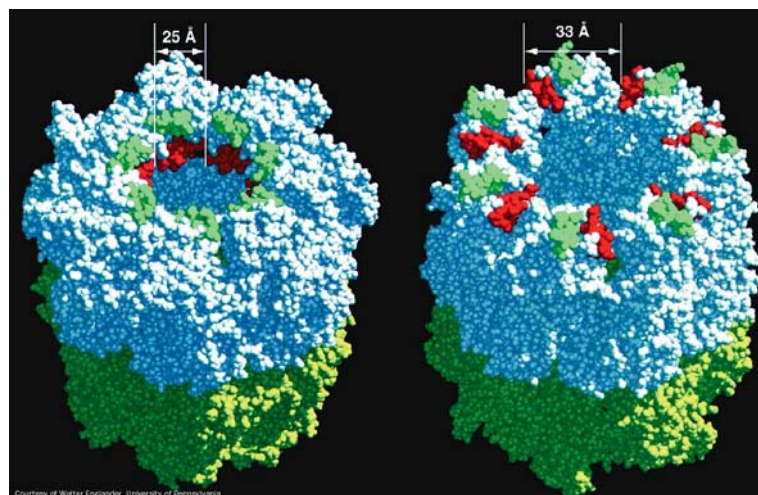
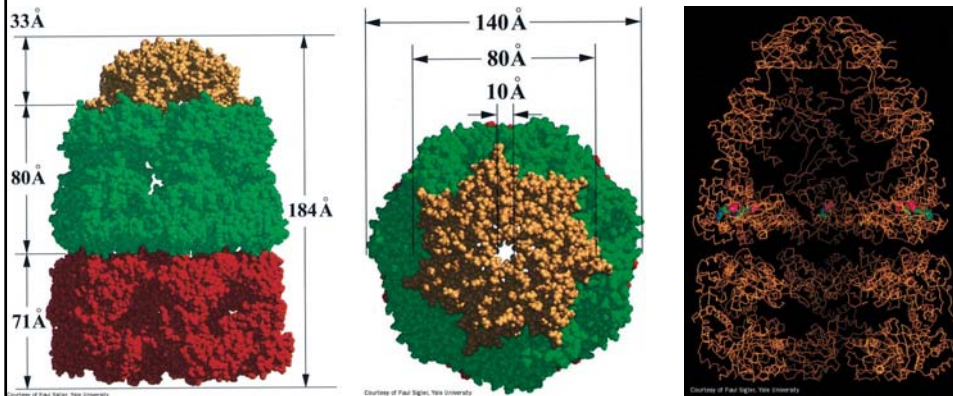
Hsp70 prepoznava nezvite regije novih proteinskih verig - posebno hidrofobne regije

Veže se na regije in jih zaščiti pred nepravilnimi asociacijami, modifikacijami

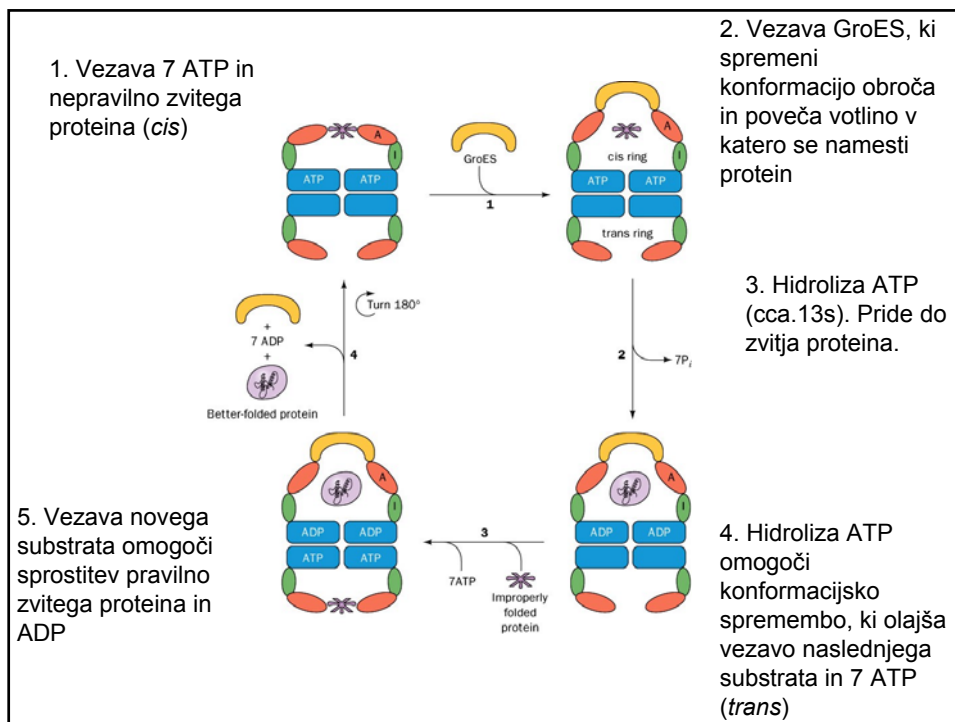


MOLEKULARNI ŠAPERONI GroEL/GroES sistem

GroEL 14 identičnih 60 kDa podenot; tvorijo dva obroča 7 podenot
GroES heptamer 10 kDa proteinov



Vezava in hidroliza ATP
Desno GroEL
Levo GroEL-GroES-(ADP)₇



7 ATP na cikel

Če protein še ni pravilno zvit lahko vstopi v nov cikel

Zakaj se sploh zvije?

1. Anfinsenova kletka- GroEL/GroES skrije protein v mikrookolju pred ostalimi komponentami v citoplazmi s katerimi bi lahko nespecifično agregiral
2. Iterativno izboljševanje zvitja- z ATPjem omogočeno razvitje proteina, ki je nepravilno zvit in ujet v nepravilni konformaciji. Protein se veže na hidrofobne dele GroEL. Po hidrolizi ATP so hidrofobni deli bolj narazen- pride do razvitja, sedaj se protein lahko ponovno zvije do najbolj stabilne oblike.

In vivo GroEL/GroES kompleks reagira s 300 proteini *E. coli* (od 2500 citoplazemskih): skoraj vsi identificirani so encimi, ki sodelujejo pri metabolnih procesih in transkripciji ali translaciji. M 20-60 kDa, večinoma proste β trakove. Takšni proteini se zvijajo počasneje, ker potrebujejo za tvorbo β ravnine več oddaljenih interakcij v pravilni orientaciji.

OMIM - PRION PROTEIN; PRNP - Mozilla Firefox

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=176640

NCBI Online Mendelian Inheritance in Man Johns Hopkins University

All Databases: PubMed Nucleotide Protein Genome Structure PMC Taxonomy OMIM

Search: OMIM For [Go] [Clear]

Limits Preview/Index History Clipboard Details

Display: Detailed Show: 20 Send to: [Send to]

All: 1

***176640** GeneTests, Links

PRION PROTEIN; PRNP

Alternative titles; symbols

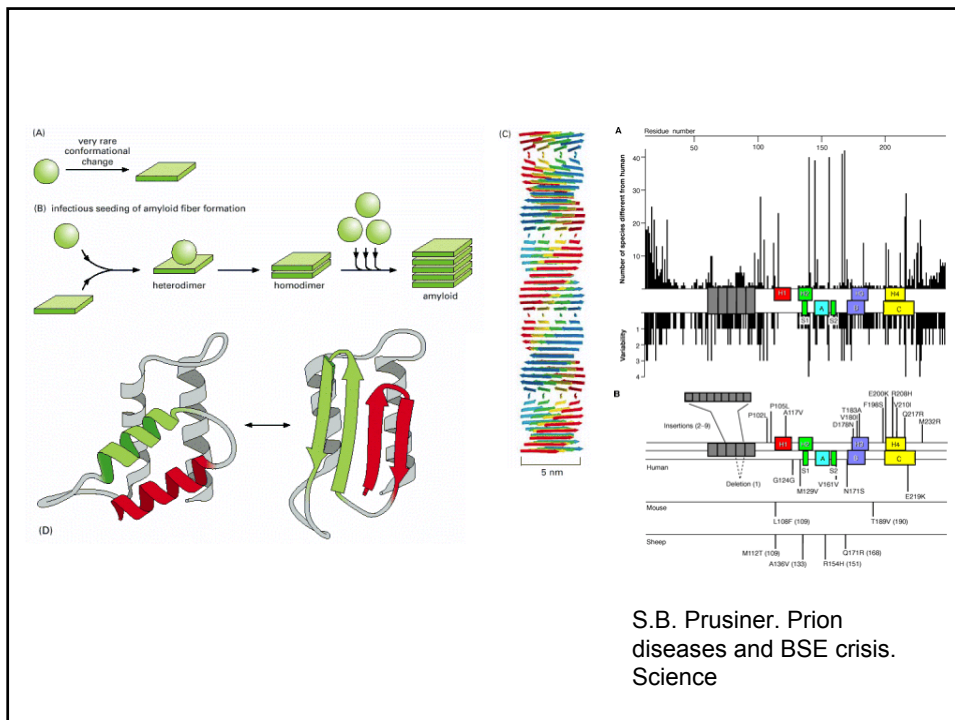
PRP
PRION-RELATED PROTEIN; PRIP

Gene map locus [20pter-p12](#)

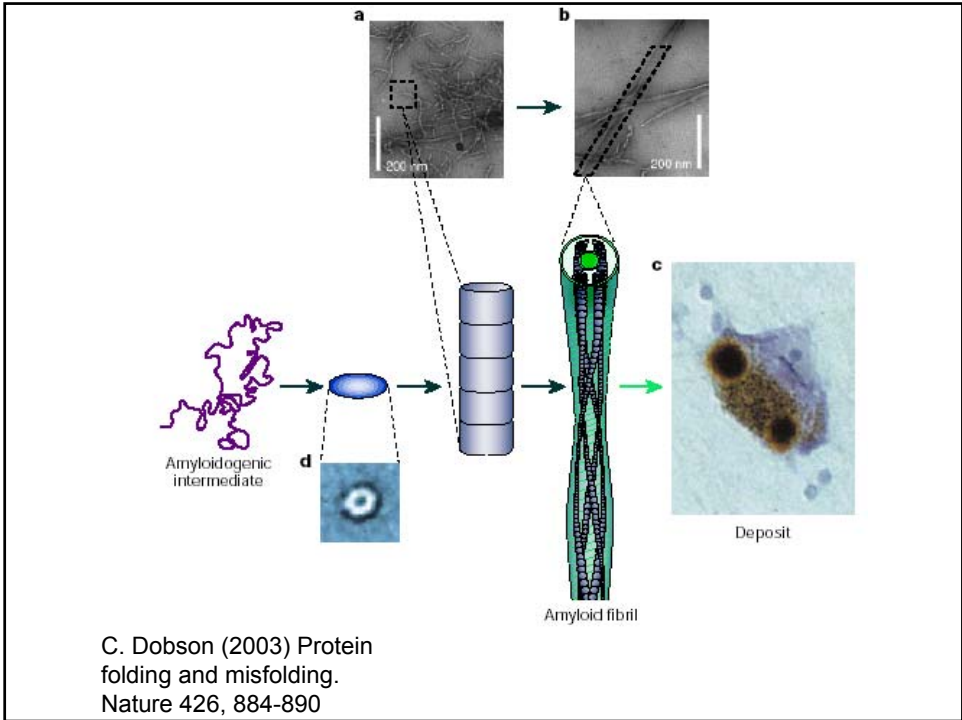
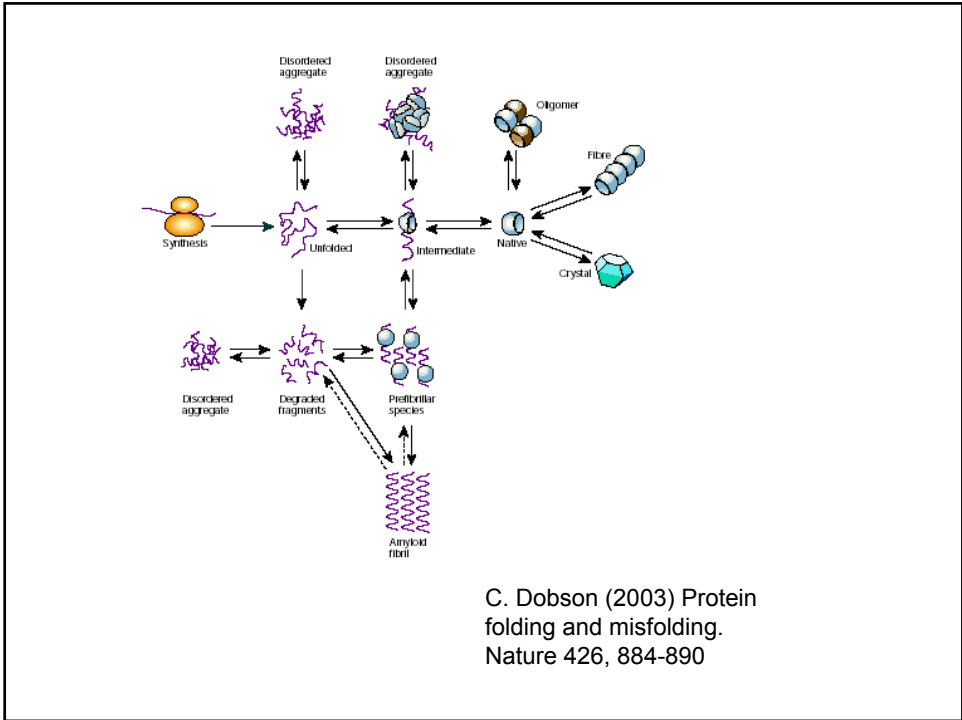
TEXT

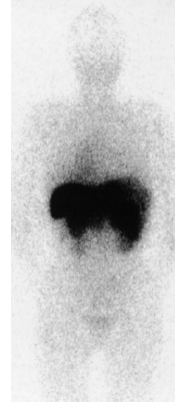
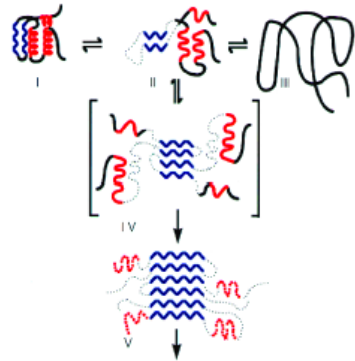
Mutations in the prion protein gene are associated with Gerstmann-Strausler disease (GSD; [137440](#)), Creutzfeldt-Jakob disease (CJD; [123400](#)), and familial fatal insomnia ([600072](#)), and aberrant isoforms of the prion protein can act as an infectious agent in these disorders as well as in kuru ([245300](#)) and in scrapie in sheep.

Prusiner ([1982](#), [1987](#)) suggested that prions represent a new class of infectious agent that lacks nucleic acid. (The term prion, which was coined by Prusiner ([1982](#)), comes from 'protein infectious agent'.) The prion diseases are neurodegenerative conditions transmissible by



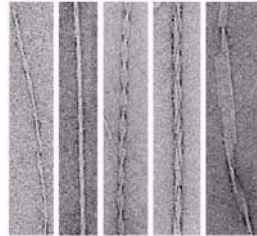
S.B. Prusiner. Prion diseases and BSE crisis. Science





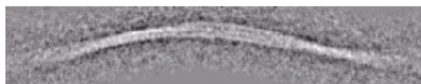
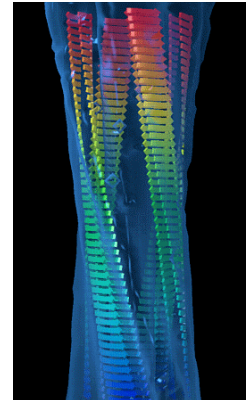
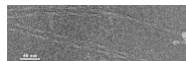
Dobson CM Phil.Trans. R. Soc. Lond. B
(2001) 356, 133-145

Dedna renalna amiloidoza
Gillmore JD et al (1999)
Nephrology Dialysis
Transplantation 14, 2639-
2644.

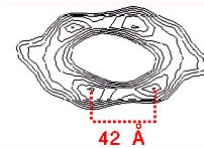


inzulin

SH3 domena



lizocim

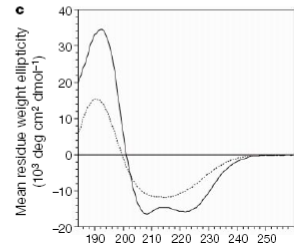
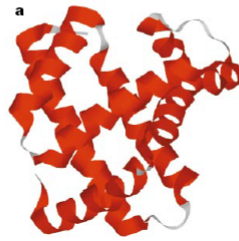
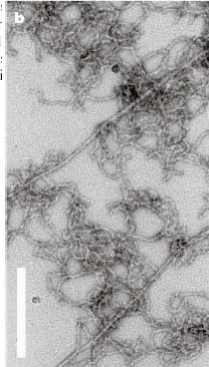


Helen Saibil, Birckbeck College, UK

Amyloid fibrils from muscle myoglobin

Even an ordinary globular protein can assume a rogue guise if conditions are right.

The sequence of amino acids in a natural protein determines the way in which it folds up into its unique biologically active 'native' conformation¹. But we show here that myoglobin, the archetypal globular protein², can convert into an alternative and radically different structure that closely resembles the amyloid and prion aggregates seen in pathological conditions such as Alzheimer's and Creutzfeldt-Jakob disease: a structure that is much like a strand of spaghetti.



Fandrich M et al. (2001) Amyloid fibrils from muscle myoglobin. *Nature* 410, 165-166

Table 3 Some human brain diseases characterized by progressive misfolding and aggregation of proteins

Disease	Protein	Locus	
Alzheimer's disease	Amyloid β -protein Tau	Extracellular plaques Tangles in neuronal cytoplasm	
Frontotemporal dementia with parkinsonism	Tau	Tangles in neuronal cytoplasm	
Parkinson's disease; dementia with Lewy bodies	α -Synuclein	Neuronal cytoplasm	
Creutzfeldt-Jakob disease; mad cow disease*	Prion protein (PrP^Sc)	Extracellular plaques Oligomers, inside and outside neurons	
Polyglutamine expansion diseases (Huntington's disease, spinocerebellar ataxias, and so on)*	Long glutamine stretches within certain proteins	Neuronal nuclei and cytoplasm	
Amiotrophic lateral sclerosis*	Superoxide dismutase	Neuronal cytoplasm	

*Figures reproduced from *Guanabata's Neuropathology* (copyright Hodder Arnold)

D.J. Selkoe (2003) Folding proteins in fatal ways
Nature 426, 900-904

FUNKCIJA PROTEINOV

POVEZANA S TERCIARNO, KVARTARNO ZGRADBO

Število podenot monomerni, dimerni, tetramerni, oligomerni
homo-oligomerni (homotipični) enake podenote
hetero-oligomerni (heterotipični) različne podenote
ALOSTERIČNE INTERAKCIJE
KOOPERATIVNOST

Nekateri primeri

glikoproteini

fibrilarni

KERATIN, KOLAGEN, FIBROIN, SPIDROIN

globularni

MIOGLOBIN monomer

HEMOGLOBIN tetramer, hetero-oligomer

GLIKOPROTEINI

- večina evkariontskih proteinov je glikoziliranih.
- sladkorji lahko predstavljajo od <1% do >90% teže
- na proteine so pripeti po translaciji. Navadno niso uniformni produkti- imajo različna sestavo, mikroheterogenost.
- sladkorji so vezani na površino, štrlijo stran od proteinov. Malo znanih struktur (imunoglobulin G, hemaglutinin virusa influence)

sladkorji se povežejo na proteine preko

N-glikozidnih vezi

O-glikozidnih vezi

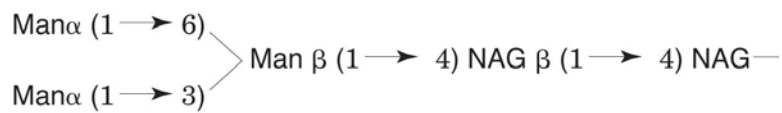
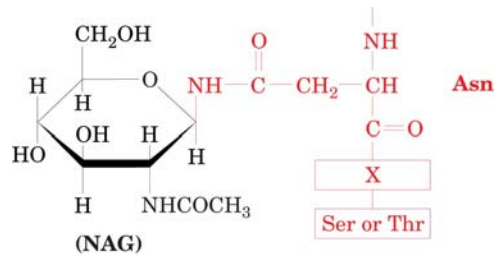
PROTEOGLIKANI V BASALNI LAMINI

BAKTERIJSKA CELIČNA STENA (mikrobiologija)

TOPNI GLIKOPROTEINI

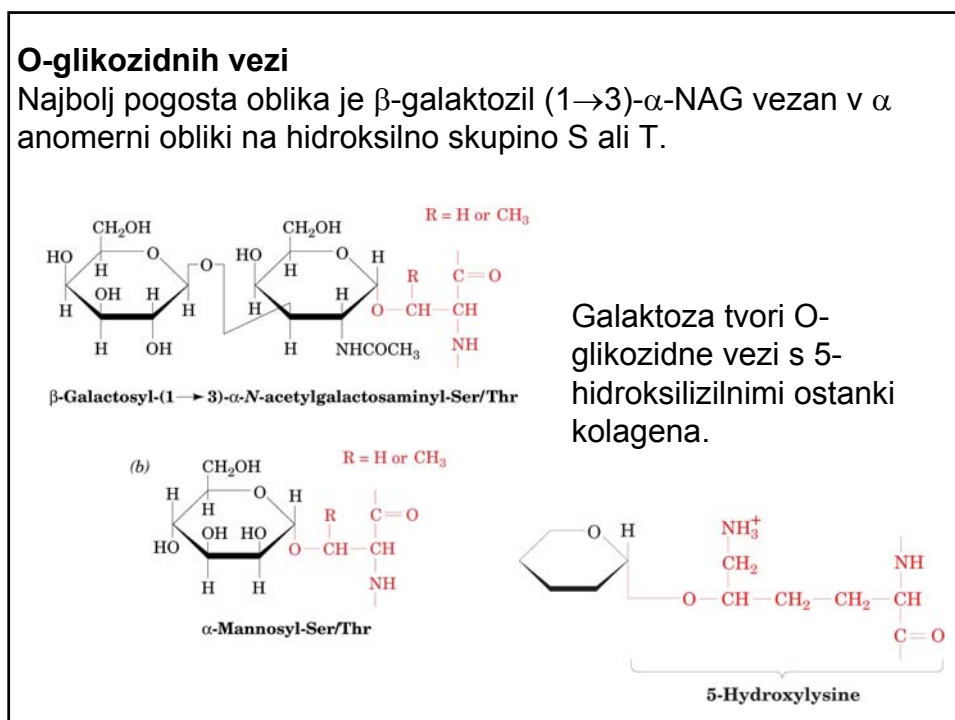
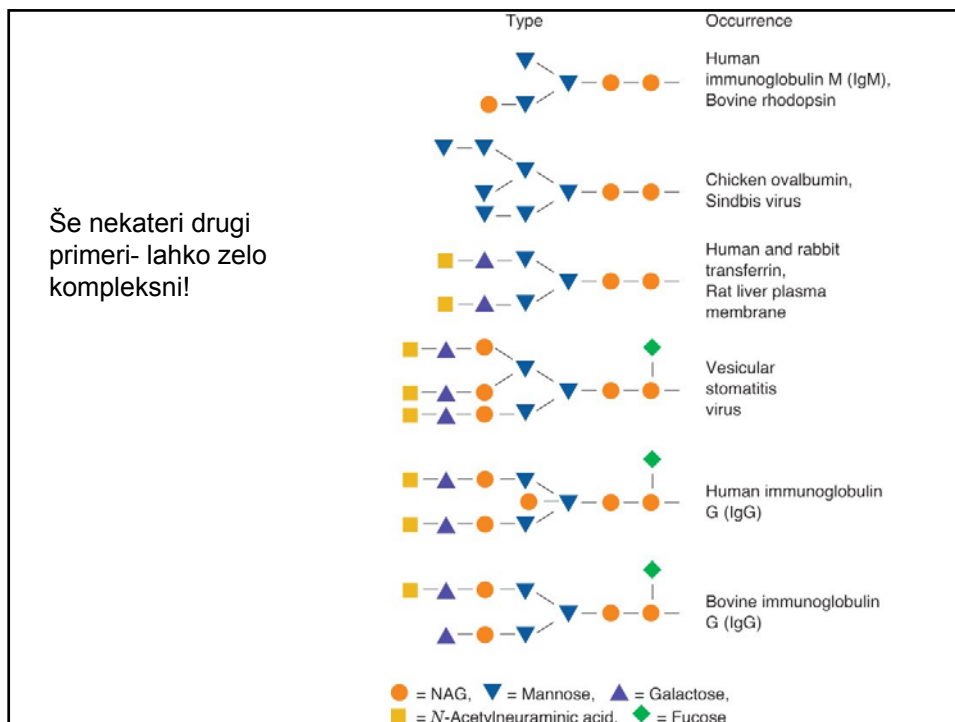
N-glikozidne vezi

N-acetilglukozaamin (NAG) je vezan v β anomerni obliki na amidni dušik Asn v zaporedjih N-X-S ali N-X-T (X je katerakoli aminokislina razen P, D, E, L ali W)



● = NAG, ▼ = Mannose

N-vezani oligosaharidi imajo pogosto Man_3NAG_2 vezan oligosaharid



PROTEOGLIKANI

V bazalni lamini, ki ločuje epitelne celice od spodnjih slojev celic

Protein na katerega je vezana vsaj ena glikozaminoglikanska veriga (karatan sulfat ali hondroitin sulfat)

Vloga:

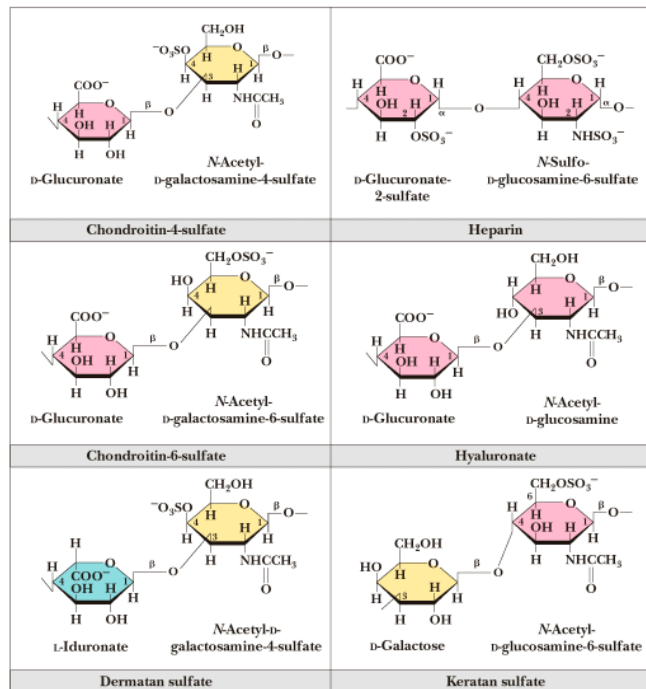
- organizacija morfologije tkiva
- filtri, ki omejujejo potovanje molekul glede na velikost in naboj
- regulacija aktivnosti proteinov, ki sodelujejo pri signaliziranju

Proteoglycan	Approximate Core Protein Molecular Mass (kD)	Glycosaminoglycan Type (Number) ^a
Proteoglycans interacting with hyaluronic acid		
Aggrecan	220	CS (~100), KS (~30)
Versican	265–370	CS/DS (10–30)
Neurocan	136	CS (3–7)
Proteoglycans of the basal laminae		
Perlecan	400–467	Heparan sulfate/CS (3)
Agrin	250	Heparan sulfate (3)
Bamacan	138	CS (3)
Small leucine-rich proteoglycans		
Decorin	40	DS/CS (1)
Fibromodulin	42	KS (2–3)
Osteoglycin	35	KS (2–3)

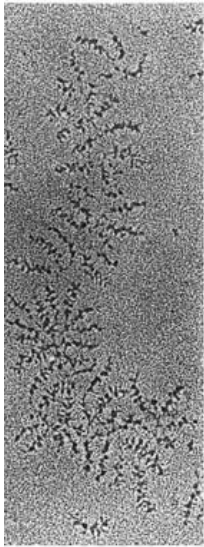
^aAbbreviations: CS, chondroitin sulfate; DS, dermatan sulfate; KS, keratan sulfate.

Source: Iozzo, R.V. *Annu. Rev. Biochem.* **67**, 611, 626, and 624 (1998).

Nekateri glikozaminoglikani



model AGREKANA sestavina hrustanca



- Centralna veriga hialuronske kisline
- Veže nekovalentno okoli 100 verig agrekanov
- Vsak agrekan veže okoli 30 verig keratan sulfata in 100 verig hondoritin sulfata

M >200.000 kDa, polidisperznost

Hrustanec

kolagen

natezna trdnost

proteoglikan

prožnost

Razvejana struktura in polianionski karakter sladkorjev omogočata visoko hidracijo. Ob pritisku se voda iztisne iz hrustanca, dokler odboj zaradi istih nabojev ne prepreči nadaljnega stiskanja. Ko pritisk popusti gre voda nazaj.

**N term domena
(60-70 kDa) in
povezovalni protein
(40-60 kDa)**

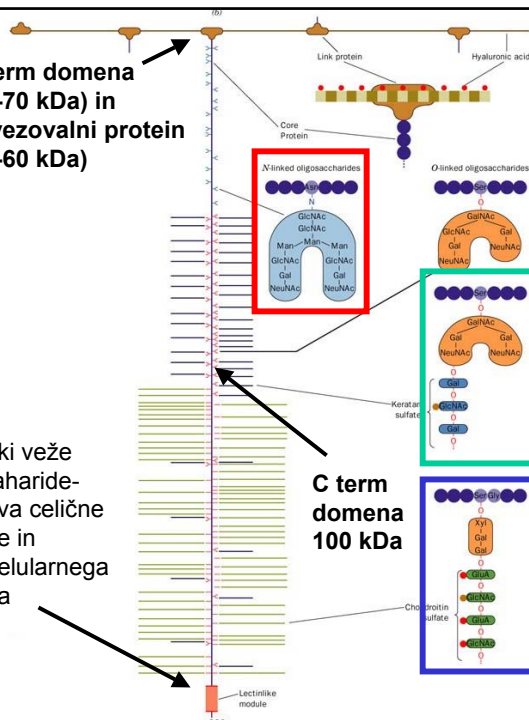
Lektin, ki veže
monosaharide-
povezava celične
površine in
ekstracelularnega
matriksa

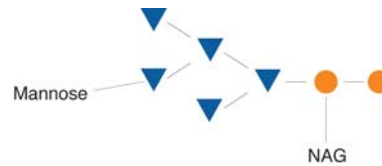
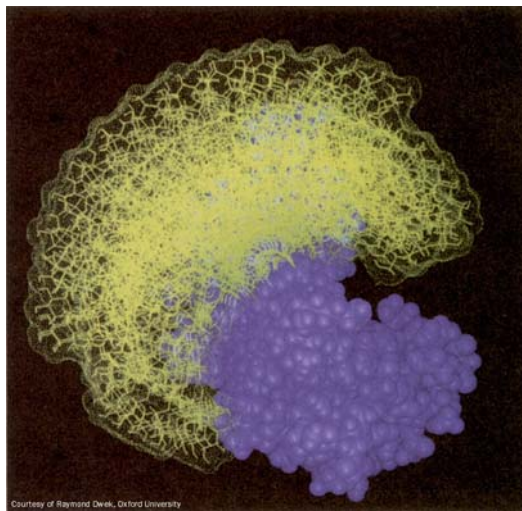
**C term
domena
100 kDa**

Na N-koncu
oligosaharidi, malo

V sredini keratan
sulfat vezan z O-
glikozidnimi vezmi

Na C-koncu regija
bogata s hondroitin
sulfatnimi verigami
vezanimi z O-
glikozidnimi vezmi in
Gal-Gal-Xyl
mostičkom





Mikroheterogenost- šesta manosa lahko vezana na različne pozicije

Model dinamike oligosaharida goveje pankreasne ribonukleaze B (RNaze B)

BIOLOŠKA VLOGA OLIGOSAHARIDOV

MUCINI- komponente mukuze. **Zaščita**. Sladkorne verige s sulfatnimi skupinami- odboj, rigidna struktura. Tvorijo omrežje, ki tvori gel, ki ščiti membrane, ki ga proizvajajo. Zaščita celic- GLIKOKALIKS. Gosto omrežje na površini celice sestavljeno iz glikoproteinov in glikolipidov.

Zaščita pred **proteolitsko razgradnjo**. Razpolovni čas v plazmi (ali celici) odvisen od sladkornega dela.

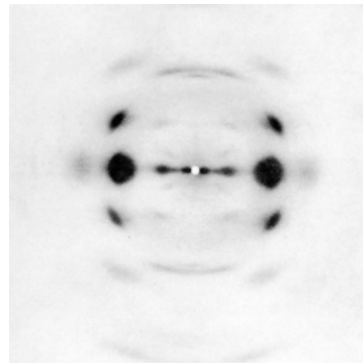
Ogljiko-hidratne skupine membransko vezanih glikoproteinov so izpostavljene zunanosti. **Mediatorji celičnih kontaktov**. Adhezija bakterij na glikoproteine na površini celice z adhezini.

Vpliv na **zvitje proteinov, fizikalno stabilnost, modulacija encimske aktivnosti**.

FIBRILARNI PROTEINI

- Večina polipeptidnih verig v smeri ene osi
- Prevladuje en tip sekundarne zgradbe
- Fibrilarne beljakovine mehansko odporne
- Običajno netopni v vodi
- Običajno imajo v celicah in ekstracelularno strukturno-mehansko vlogo

α keratin	v laseh, nohtih, parkljih, rogovih, perju
kolagen	poglavitna sestavina vezivnih tkiv (hrustanec, kite, medceličnina)
fibroin	sestavina svile
spidroin	pajčevina



svila

α KERATIN

Iz α -heliksov (vsak 311-314 aminokislinskih ostankov), na N- in C- koncih nehelične strukture

Aminokislinska sestava:

12% Glu, 11% Cys, 10% Ser, 8% Gly, 7% Arg, 7% Leu, 6% Asp, 5% Val, 5% Ala, 29% ostale

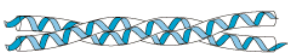
Primarna struktura heliksov iz ponavljajočih se 7-ostankov dolgih zaporedij (a-b-c-d-e-f-g)_n, kjer sta a in d nepolarni aminokislini

Težnja k tvorbi vijačnice

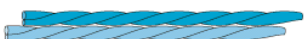
Protofilamenti in filamenti stabilizirani s H-vezmi in intermolekularnimi disulfidnimi vezmi



α heliks



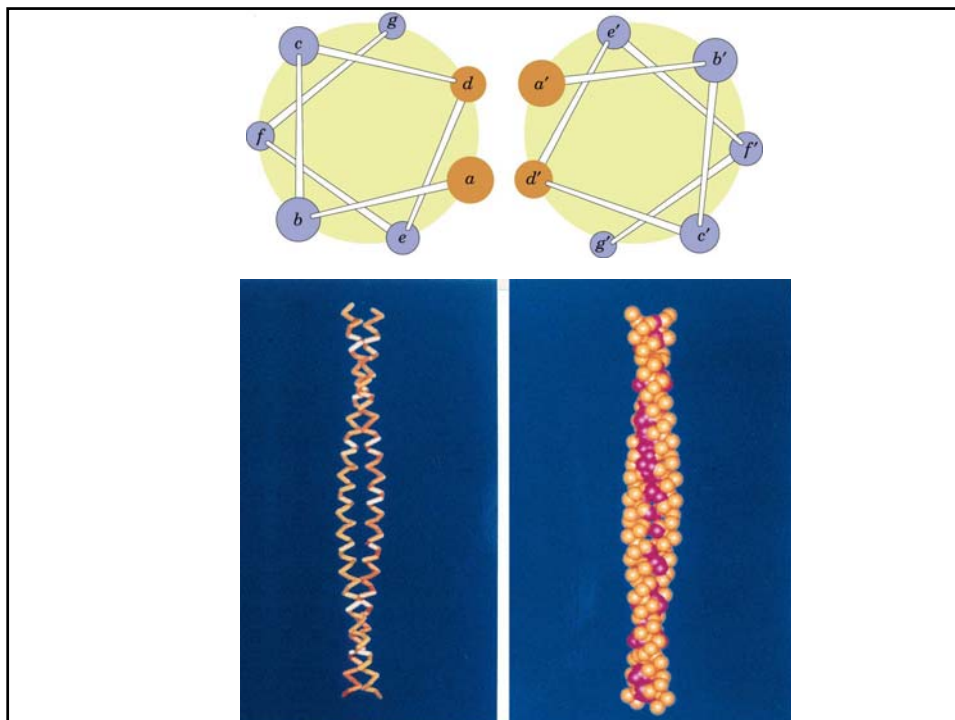
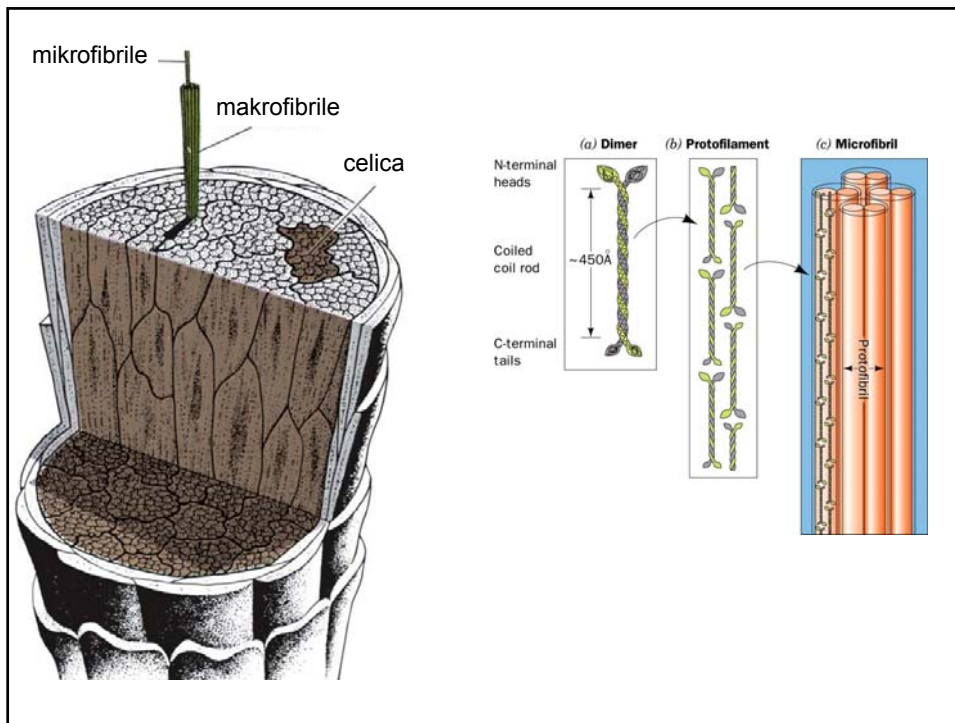
ovita vijačnica ("coiled coil")- 2 heliksa



protofilamenti- 2 oviti vijačnici



mikrofibrile- 4 desno zasukani protofilamenti



KOLAGEN

Najbolj zastopan protein pri vretenčarjih.

Glavna komponenta odporna na stres (kosti, zobje, hrustanec, ligamenti, komponenta kože, sten žil).

Sesalci >30 različnih polipeptidnih verig, ki tvorijo vsaj 20 različnih kolagenskih tipov.

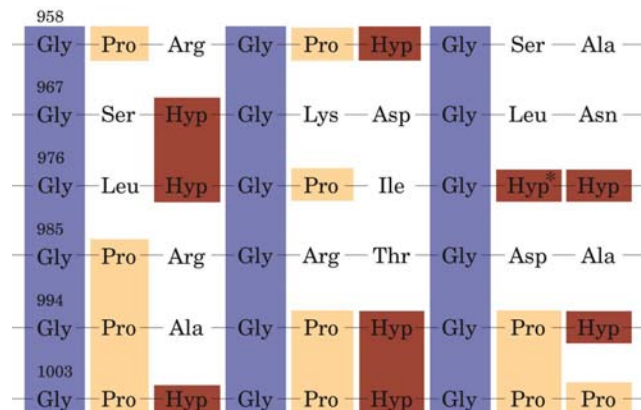
Ena molekula kolagena tipa I: M=285 kDa, dolžina preko 3000 Å, premer 14 Å

Neobičajna aminokislinska sestava:

33% Gly, 22% Pro, 12% Ala, 5% Glu, 5% Arg, 23% ostale.

Vsebuje 4-hidroksi prolin (Hyp) in 5-hidroksi lizin (Hyl). Posttranslacijske kemijske spremembe. Katalizira encim protil hidroksilaza, ki potrebuje C-vitamin (pomanjkanje C-vitamina ne omogoča tvorbo fibril- lezije kože, slabo celjenje ran). Omogoča stabilnost kolagena, tvorba več H-vezi z vodo.

Kovalentno pripeti ogljikovi hidrati (0.4-12% m:m). Glu, Gal in njuni disaharidi pripeti na Hyl.



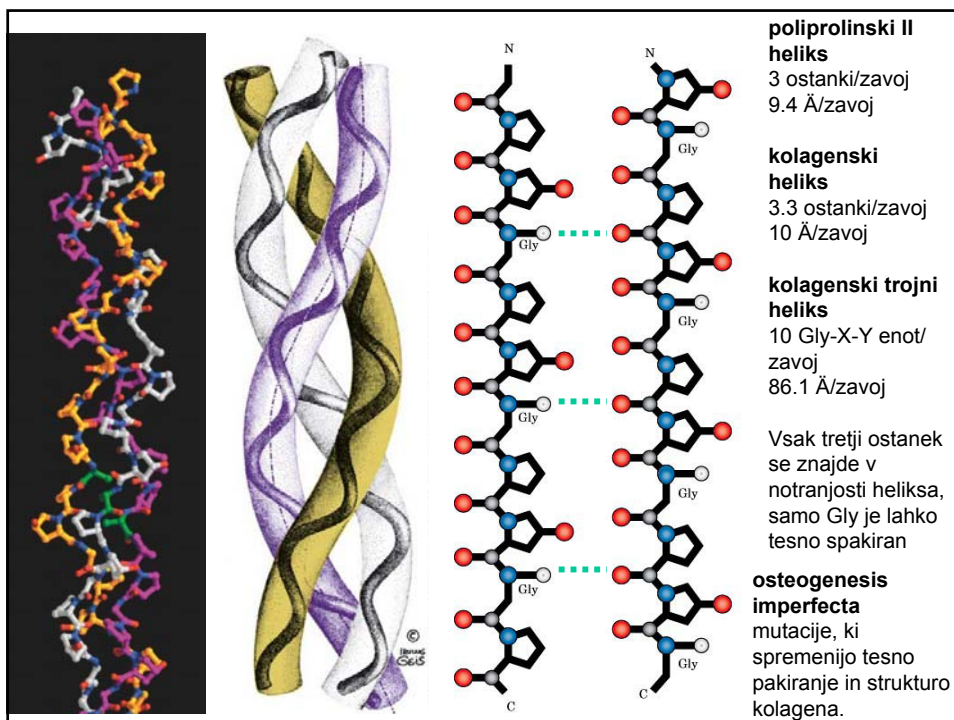
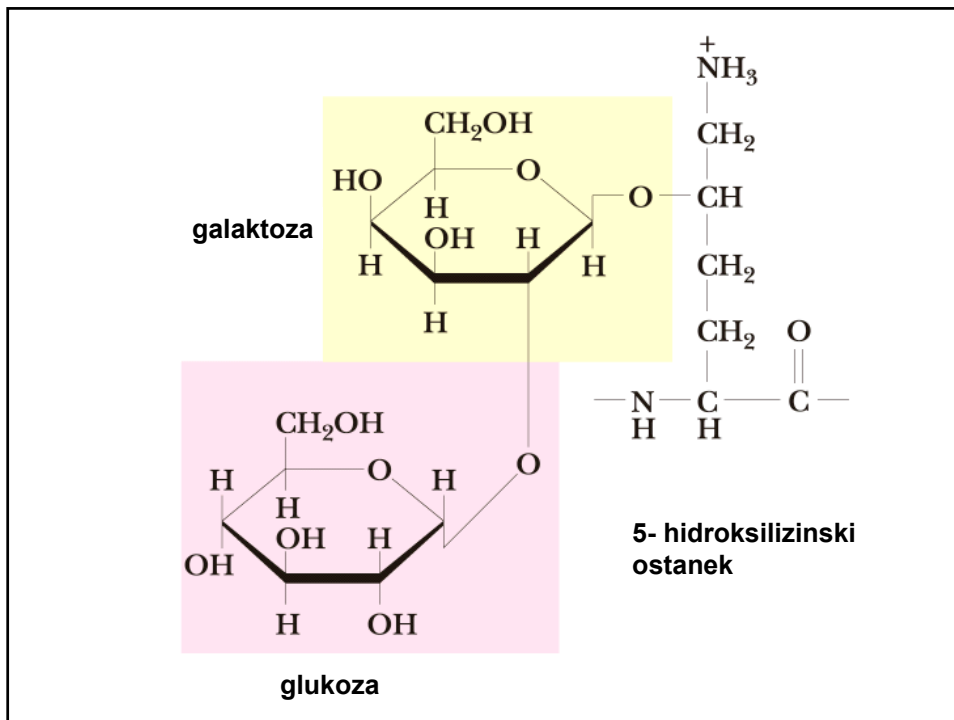
Ponavljajočo zaporedje

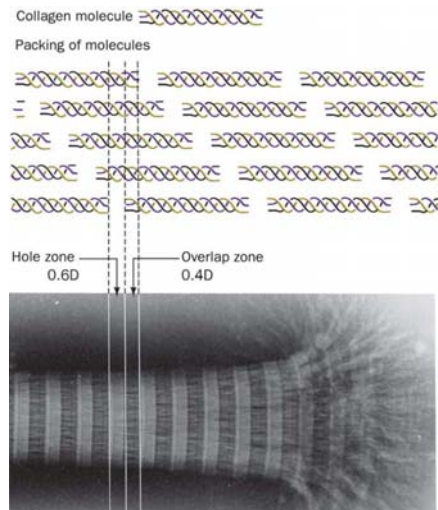
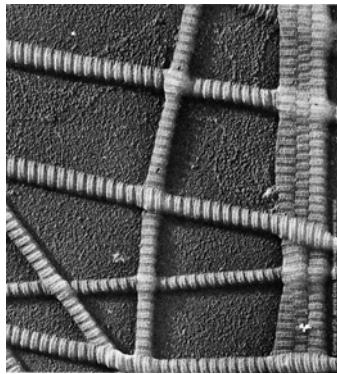
Gly- X- Y

(npr. pri govejem $\alpha 1(I)$ kolagenu 1011 od 1042 ostankov)

X dostikrat Pro

Y dostikrat Hyp





Arhitektura fibril odvisna od tkiva:
kite paralelna
koža plasti fibril v različnih smereh
hrustanec ni točno določene namestitve
roženica planarne plasti nameščene navzkrižno (nizko sipanje)

Tekom let se zvišuje navzkrižna povezanost verig

680 Å
premer 100-2000 Å

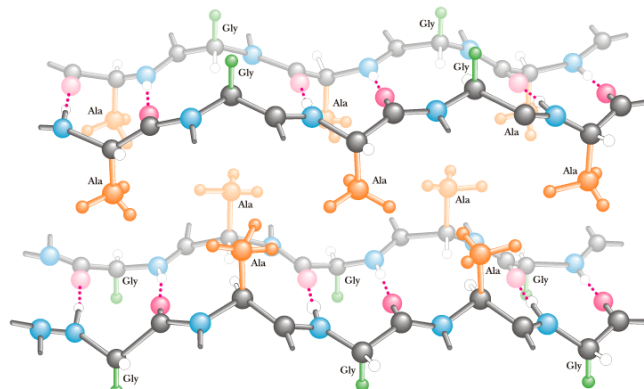
FIBROIN

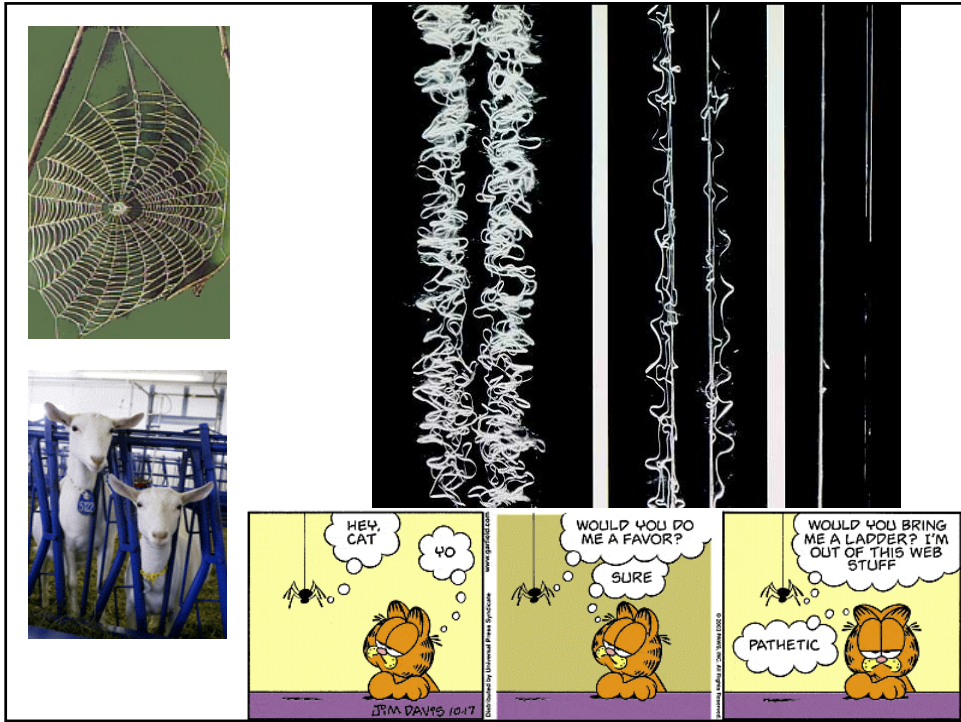
Iz β -nagubane ravnine

Ponavljaja se zaporedje Gly-Ala/Ser-Gly-Ala/Ser....

V β -nagubani ravnini alternirata Gly na eni strani ter Ser in Ala na drugi strani ravnine

To omogoča tesno pakiranje ostankov iste vrste iz ene in druge β -plošče





SPIDROIN

```

-----QGAGAAAAA--GGAGGGYGGGGLGGQG
-----AGQGGAAAAAAGGAGGGYGGGGLGSQG
AGR---GGQAGAAAAA--GGAGGGYGGGGLGSQG
AGRGGGGGAGAAAAAAGGAGGGYGGGGLGNQG
AGR---GGQ--GAAAAA--GGAGGGYGGGGLGSQG
AGRGGGGGQ--AGAAAAA--GGAGGGYGGGGLGGQG
-----AGGGYGGGGLGSQG
AGRGGGGGAGAAAAAAGGAG--GGLGGQG
-----AGQAGASAAA--CGAGGGYGGGGLGSQG
AGR---GGEGAGAAAAA--GGAGGGYGGGGLGGQG
-----AGGGYGGGGLGSQG
AGRGGGGGAGAAAA--GGAGQ--GGLGGQG
-----AGQAGAAAAA--GGAGGGYGGGGLGSQG
AGRGGGGGAGAVAAAAAGGAGGGYGGGGLGSQG
AGR---GGQAGAAAAA--GGAGQRYGGGGLGNQG
AGRGGGGGAGAAAAAAGGAGGGYGGGGLGNQG
AGR---GGQ--GAAAAA--GGAGGGYGGGGLGSQG
AGR---GGQAGAAAAA--VGAGQEGIR---GQG
-----AGGGYGGGGLGSQG
SRRGGGGGAGAAAAA--CGAGQ--GGLGGQG
-----AGQAGAAAAA--GGVGGYGGGGLGSQG
AGR---GGQAGAAAAA--CGAGGGYGGGGLGGQG
VRRGGGGGAGAAAA--GGAGGGYGGV--GSG
-----ASAASAAAARLSS
  
```

a. poly-Ala

fiber axis

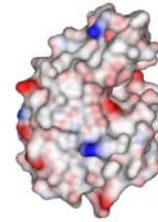
silk line

hard crystals and spring-like chains

GLOBULARNI PROTEINI

Značilnosti

- Večina polarnih ostankov na površini molekule v interakciji s topilom (vodo)
- Večina nepolarnih ostankov v notranjosti molekule – hidrofobne interakcije
- Pakiranje ostankov je tesno
- Razmerje med volumnom ostankov in totalnim volumnom molekule je 0.72 do 0.77, obstajajo prazni prostorčki znotraj molekule
- Včasih v notranjosti nekaj molekul vode



GLOBULARNI PROTEINI- različni razredi

ALFA



E. coli
citokrom b_{562}



človeški
rastni
hormon



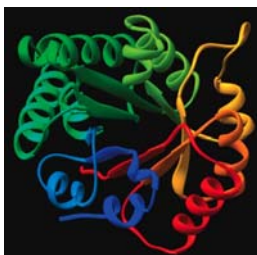
imunoglobinsko
zvitje

BETA

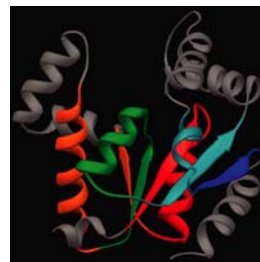


retinol
vezavni
protein

MEŠANO



triozefosfat
izomeraza



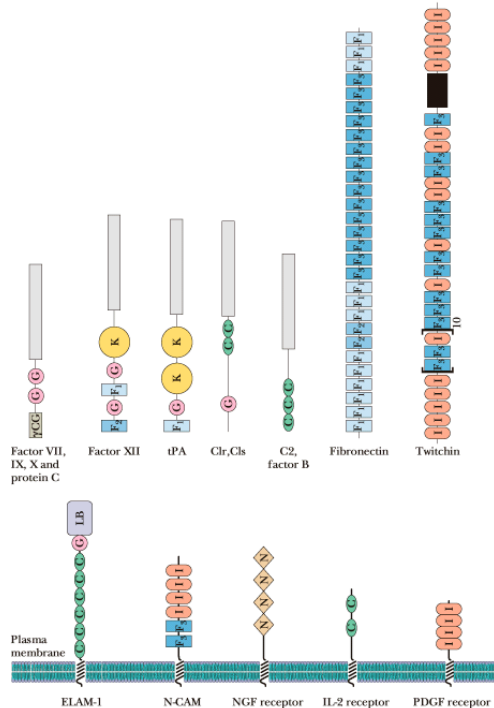
adenilat
kinaza

PROTEINSKE DOMENE

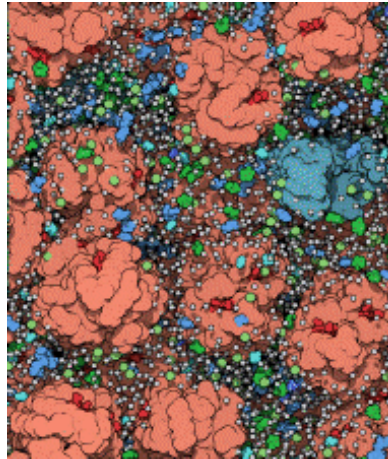
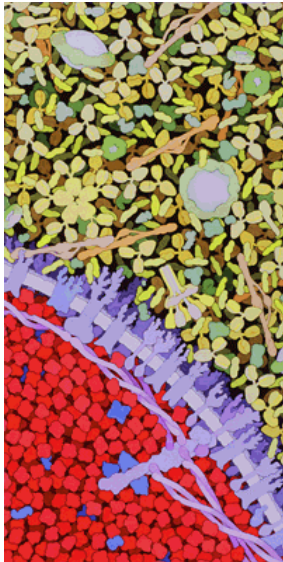
- Domena (modul, območje) – zaokrožena proteinska struktura, ki se lahko ponavlja v enem ali različnih proteinih
- Mnogo proteinov je sestavljenih iz ene ali več domen
- Uporaba domen je določena gensko



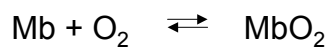
Sheme proteinov, ki vsebujejo več različnih domen



VEZAVA KISIKA NA MIOGLOBIN IN HEMOGLOBIN



<http://www.scripps.edu/pub/goodsell/>



Vezava kisika na mioglobin

$$K = \frac{[\text{Mb}][\text{O}_2]}{[\text{MbO}_2]}$$

disociacijska konstanta

$$Y_{\text{O}_2} = \frac{[\text{MbO}_2]}{[\text{Mb}] + [\text{MbO}_2]}$$

zasedenost vezavnih mest s kisikom

$$Y_{\text{O}_2} = \frac{[\text{O}_2]}{K + [\text{O}_2]}$$

$$Y_{\text{O}_2} = \frac{p_{\text{O}_2}}{K + p_{\text{O}_2}}$$

koncentracijo kisika izrazimo s parcialnim tlakom kisika

$$Y_{\text{O}_2} = \frac{p_{\text{O}_2}}{p_{50} + p_{\text{O}_2}}$$

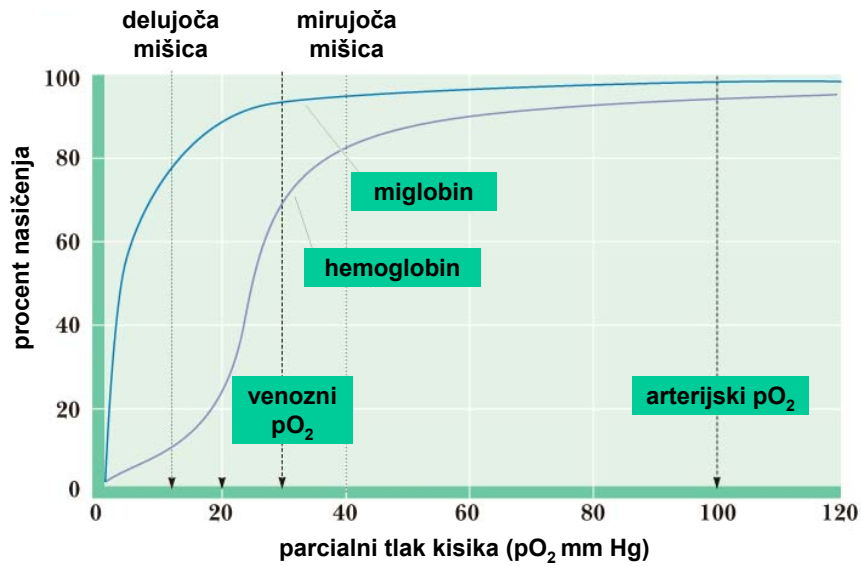
p_{50} koncentracija kisika pri kateri je zasedenih 50% vezavnih mest

Hillov koeficient

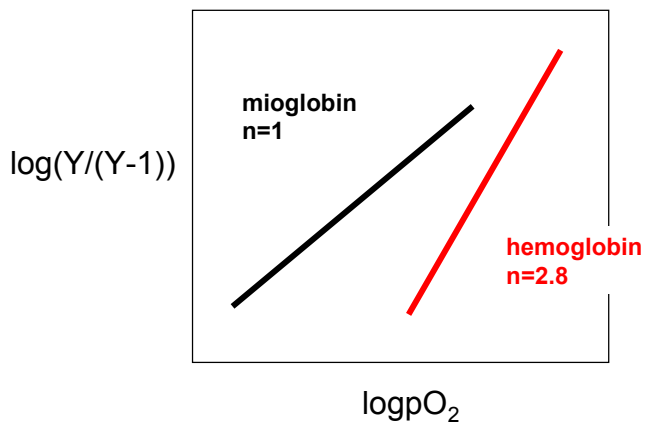
$$Y/(Y-1) = p_{\text{O}_2}/p_{50}$$

$$\log(Y/(Y-1)) = \log p_{\text{O}_2} - \log p_{50}$$

Hiperbolična oz. sigmoidna vezava O₂ na Mb oz. Hb



Hillov graf



$$\log(Y/(Y-1)) = n \cdot \log pO_2 - \log p_{50}$$

n = Hillov koeficient

$n=1$ nekooperativno
 $n>1$ pozitivna kooperativnost
 $n<1$ negativna kooperativnost

Pomen

pri $n=1$ se mora pO₂ spremeniti 81 x da zasedemo 90% mest iz 10% začetno zasedenih
 pri $n=2.8$ se mora pO₂ spremeniti samo za 4.8 x

FIZIOLOŠKI POMEN

- Hb mora vezati O_2 v pljučih
- Hb mora sprostiti O_2 in ga oddati v kapilarah
- To omogoča kombinacija sigmoidne in hiperbolične vezavne krivulje Hb oz. Mb!
- Ko se prva molekula O_2 veže na Fe^{2+} v hemu, se premakne v ravnino hema (porfirinskega obroča)
- Posledica: serija konformacijskih sprememb, ki se prenesejo na sosednje podenote
- Afiniteta sosednjih podenot za kisik se poveča - **pozitivna kooperativnost**

HEMOGLOBIN, MIOGLOBIN

primer pozitivne kooperativnosti in alosterije

- Hemoglobin (Hb) in mioglobin (Mb) prenašata in hranita molekularni kisik O_2
- Mioglobin (Mb): 153 ostankov, 17,200 Da;
- Hemoglobin (Hb): 2 α -podenoti (141 ostankov), 2 β -podenoti (146 ostankov)
- Mioglobin: monomeren, vezavna krivulja za O_2 hiperbolična
- Hemoglobin: tetrameren, vezavna krivulja za O_2 sigmoidna

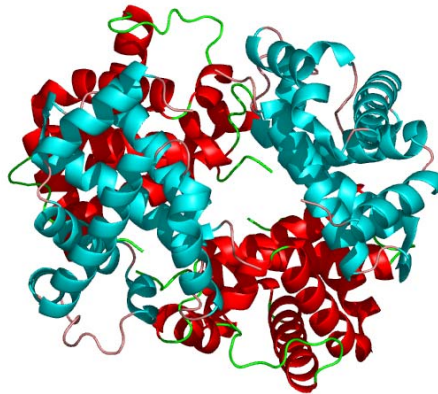
ALPHA	-EVLSEADKTNVKLAWGKVGRHAGEYGAEPATERMELSEP	38
BETA	MVHLTEEEKSAVTAIWGKVN--VDEVGGEALGRLLVWYP	37
MYOGLOBIN	-MGLSDGEWQLVLNVWGVKVERDIPGHGQEVLIIRLEKGRP	38
ALPHA	TKKTYEPHEDLSH-----G-SAQVKGHGKKVADALTNAY	71
BETA	WIQRFFESFGDTSPFLAVMGNPKVKAHGKKVIGAFSDGL	76
MYOGLOBIN	EILEKFDKPKKPKSELEPKASEDLKKHGATVLTALGGIT	77
ALPHA	AHVDDMPNALSAISDDEHAKLEVDPVNFKLLSHCLIVTI	110
BETA	AHLDNLIKGTFAITSELEHCDKLEHVDPENFRILGNVIVCVI	115
MYOGLOBIN	KKKGHEAEIKPIAQSHATKHKIPVKYLEFISECIIQVI	116
ALPHA	AAHLPAEFTFAVHASLDKFLASVSTVLTISKYR-----	142
BETA	AHFGKETEPVQAAVQKVVAGVANALAHKYH-----	147
MYOGLOBIN	QSKHEGDEGADAQGAMNKATELFRKDMASNYKELGFQG	154

3D zgradba izredno ohranjena, kljub temu, da je samo 18% ustreznih ostankov identičnih med vsemi tremi proteini!



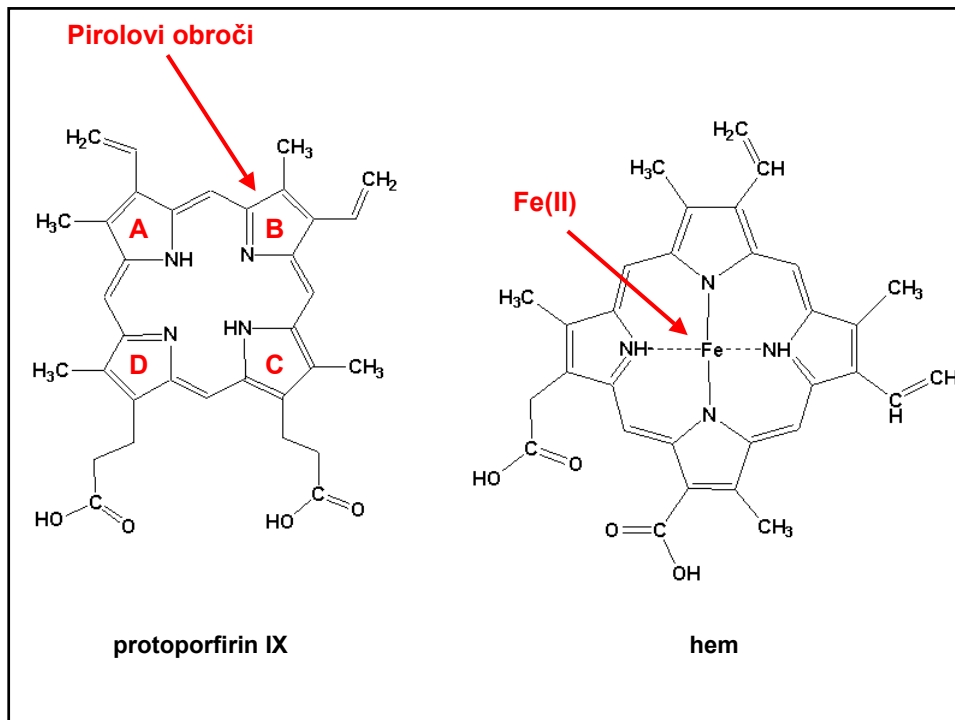
mioglobin

8 heliksova (označeni A-H)



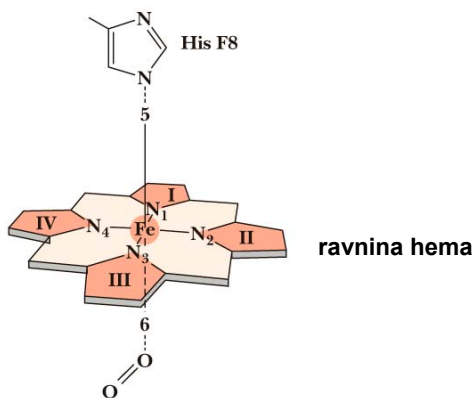
hemoglobin
adultni 2α in 2β podenoti

- 7 heliksova (označeni A-G)
- $\alpha 1$ - $\beta 1$ ($\alpha 2$ - $\beta 2$) kontakti vključujejo 35 ostankov
- $\alpha 1$ - $\beta 2$ ($\alpha 2$ - $\beta 1$) 19 ostankov
- hidrofobne interakcije, H-vezi, ionski pari
- med $\alpha 1$ - $\alpha 2$ in $\beta 1$ - $\beta 2$ malo kontaktov, bolj polarni, kanal med obema podenotama



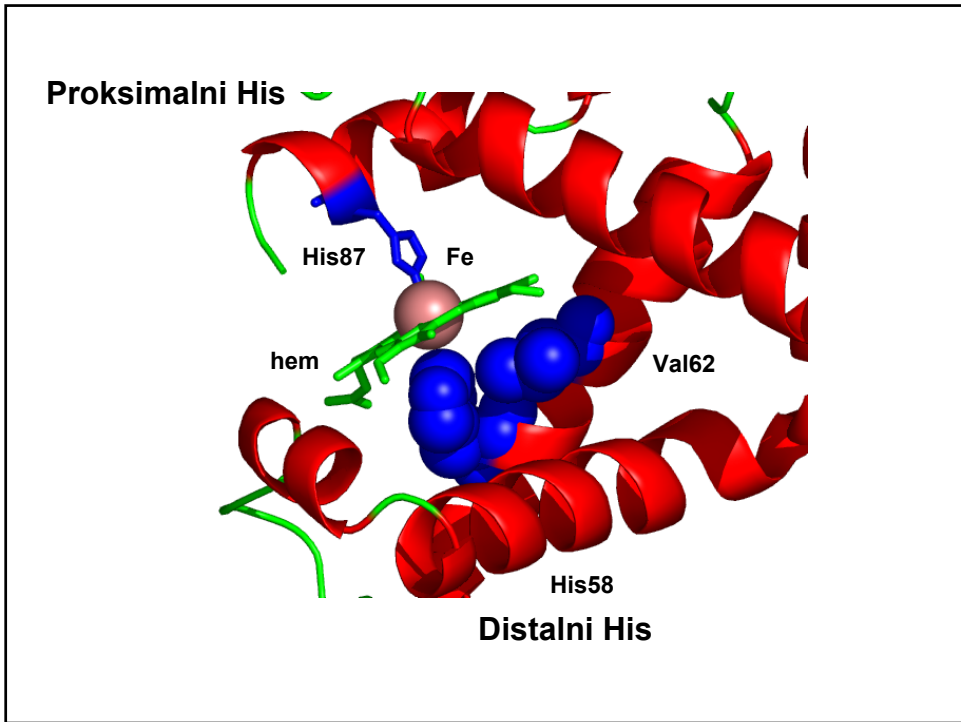
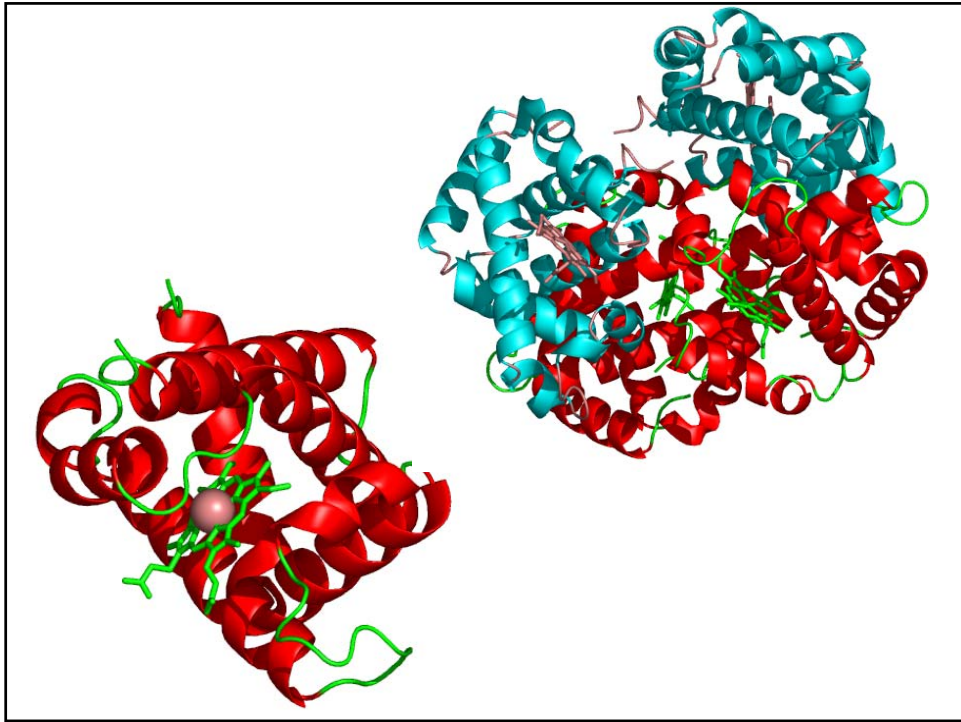
Hb in Mb vsebujeta hem

- vsebujeta hem- porfirinski obroč z železom (**deoksi Hb**)
- Fe je Fe^{2+} (fero železo) – veže kisik (**oksi Hb**), CO, NO, H_2S
- oksidacija v Fe^{3+} (feri železo) – ne veže kisika (**met Hb**)
- O_2 se veže kot šesti ligand na Fe^{2+}



Met Hb v posušeni krvi in starem mesu.

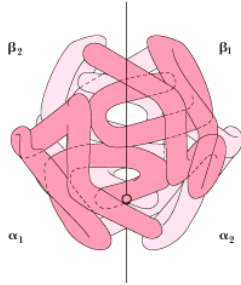
V eritrocitih met Hb reduktaza pretvori met Hb nazaj v obliko, ki vsebuje Fe(II) .



SPREMEMBA KVARTARNE STRUKTURE

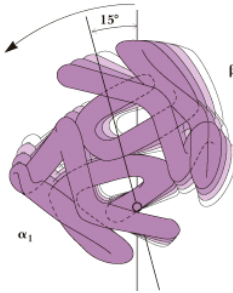
- če kristali deoksi-Hb izpostavljeni O_2 , se spremenijo-
strukturna sprememba
- en par $\alpha\beta$ se premakne glede na drugega za 15°
- razlog- premik Fe^{2+} za 0.039 nm, ko je vezan O_2

deoksi Hb bin

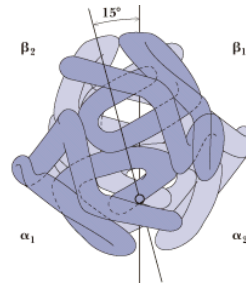


T stanje ("tense")

ALOSTERIČNE SPREMEMBE



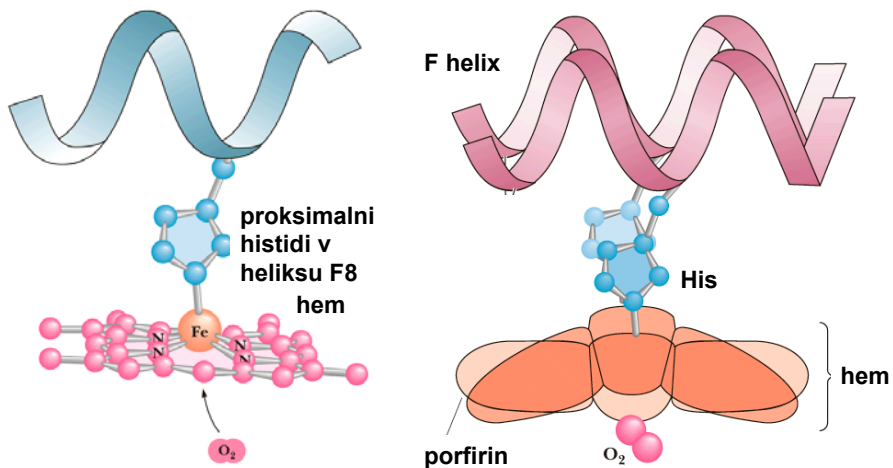
oksi Hb



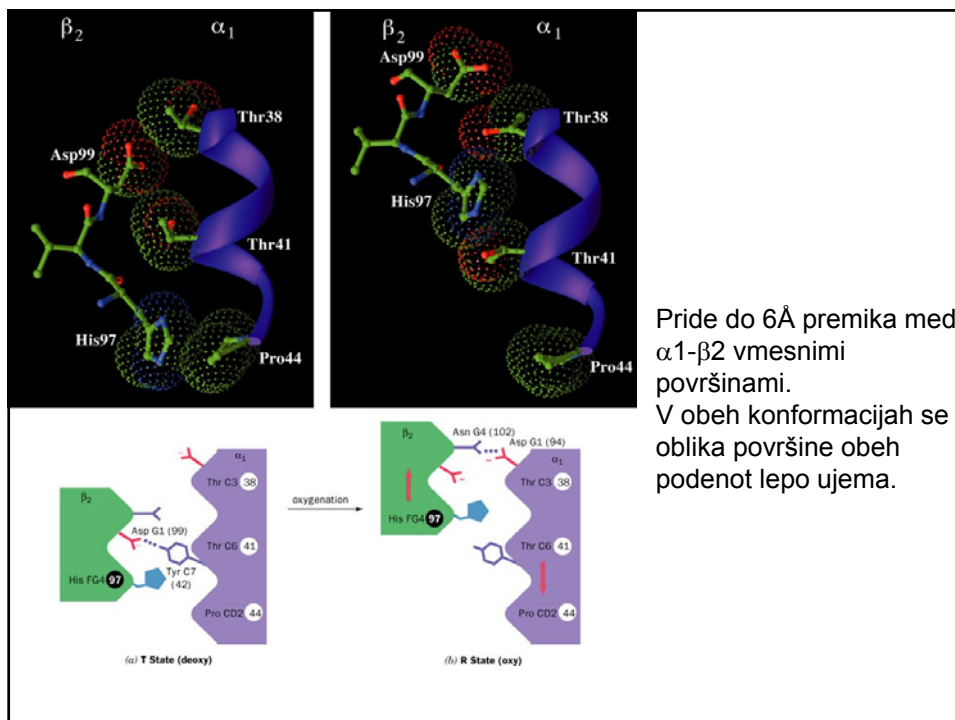
R stanje ("relaxed")

"skozi prostor"

vezava O_2



vezava O_2 spremeni konformacijo
 brez vezanega O_2 je Fe^{2+} izven ravnine hema
 vezava O_2 potegne Fe^{2+} v ravnino hema
 Fe^{2+} potegne His F8 s seboj
 F-heliks se med vezavo O_2 premakne



KOOPERATIVNOST ZA VEZAVO KISIKA JE POSLEDICA T→R KONFORMACIJSKE SPREMEMBE

Vezava kisika zahteva celo serijo koordiniranih sprememb:

1. Fe(II) katerekoli podenote ne more v ravnino hema brez reorientacije proksimalnega His.
2. Proksimalno His je tesno spakiran z drugimi ostanki in se ne more reorientirati, če ne pride do premika heliksa F.
3. Premik heliksa F je možen samo ob hkratnem kvartarnem premiku na površini med α_1 in β_2 podenotami.
4. Nefleksibilnost α_1 - β_1 in α_2 - β_2 vmesnih površin zahteva, da do spremembe v kvartarni zgradbi pride simultano na obeh površinah α_1 - β_2 in α_2 - β_1 .

Nobena podenota ali dimer ne more spremeniti konformacije neodvisno od drugih podenot. Hb molekula je lahko samo v dveh oblikah, R in T.

V T stanju je dokler ne pride, ob zadostni koncentraciji kisika, do vezave na Fe(II). Potem pride do konformacijskih sprememb v podenotah, ne glede na to ali je ligand vezan ali ne. Zdaj je afiniteta ostalih podenot do kisika večja.

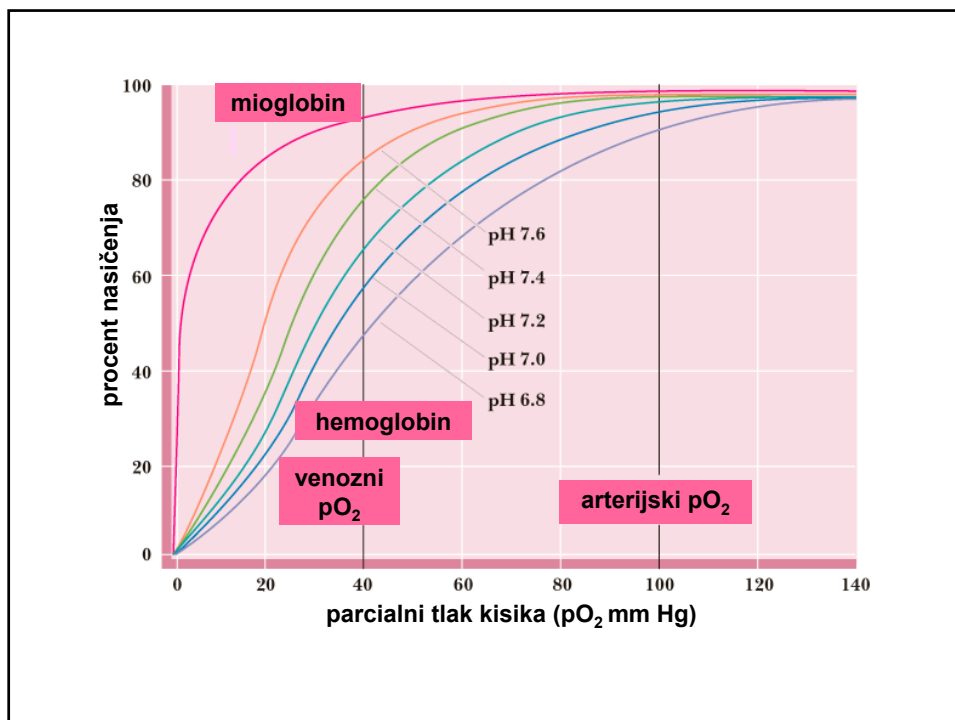
Bohr-ov efekt (vpliv O₂ in H⁺)

- tekmovanje med O₂ in H⁺ za vezavo na Hb
- odkritje Christian Bohr
- pomembne fiziološke posledice !

Ob vezavi O₂ pri fizioloških pogojih pride do sprostitve protonov (ker pride do sprememb pKa nekaterih stranskih skupin zaradi alosteričnih sprememb)



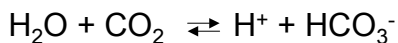
Nižanje pH niža afiniteto do kisika
Višanje pH viša afiniteto do kisika



Bohr-ov efekt (vpliv CO₂ in 2,3-BFG)

Ogljikov dioksid zmanjša vezavo kisika

- hidracija CO₂ v tkivih in ekstremitetah zniža pH (več protonov !)

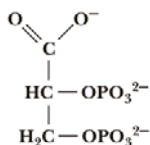


- H⁺ se veže na Hb, ko disociira O₂
- v pljučih obraten proces!

2,3-bifosfoglicerat (BFG) alosterični efektor Hb

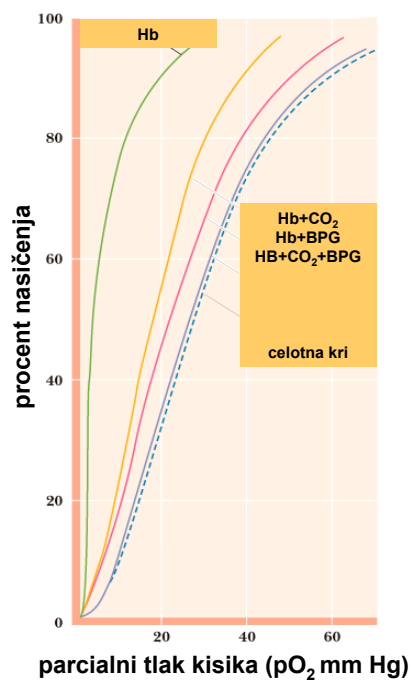
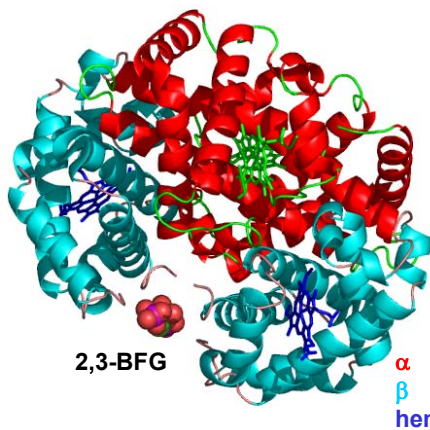
- 2,3-BFG je intermediat v glikolizi
- v odsotnosti 2,3-BPG ima Hb višjo afiniteto do O₂
- 2,3-BPG se veže na deoksi Hb z visoko afiniteto
- veže se na mesto, različno od vezavnega za O₂ v razmerju 1: 1 **alosterični efektor**

Vpliv 2,3-BFG in CO₂



2,3-bifosfoglicerat

- ionske interakcije
- veže se v centralno votlino med β podenoti
- stabilizira T konformacijo-povezovalc β podenot



```

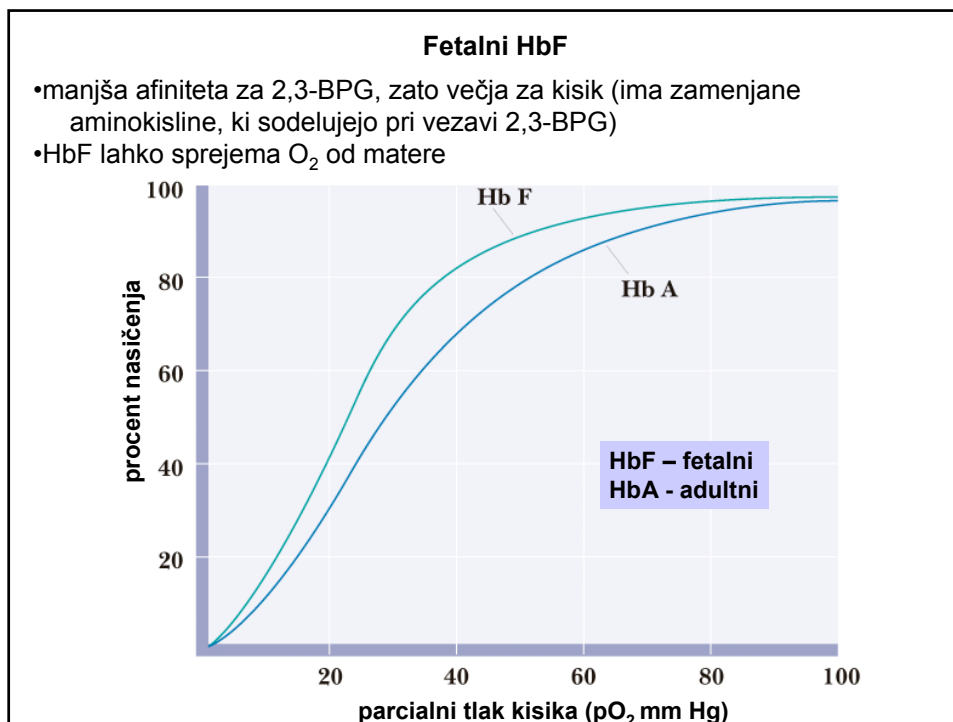
      10      20      30      40      50      60      70      80
ALPHA1  -MVVLSADKKNVKAAMGKVGAHAGCYCAEILRRMFTSPTTKTTPPHDLSSH----G-SAQVVGHGKRVADALTNVAHVDDMPNA 80
ALPHA2  -MVVLSADKKNVKAAMGKVGAHAGCYCAEILRRMFTSPTTKTTPPHDLSSH----G-SAQVVGHGKRVADALTNVAHVDDMPNA 80
THETA   -MAVLSADRALVRAAMGKVGSNVGVYTTRELERFEAAPPAAKTYPSHLDLSP----G-SSQVRAHGQVADALSDVVERLDDLPNA 80
GAMMA   MGFVFEEDKATLTSALWQKVN--VEDAGGELGRLLVVVPTQRFESDFGNLSSASAIMGNPRVKAHGKRVVTSFGDAIKHLDDLKGT 85
BETA    MVHLTPEKSAVVALWQKVN--VDVGGELGRLLVVVPTQRFESDFGNLSTPDAVMGNPRVKAHGKRVVTSFGDAIKHLDDLKGT 85
EPSILON MVHFTPEKAAVVALWQKVN--VEDAGGELGRLLVVVPTQRFESDFGNLSSPDAILGNPRVKAHGKRVVTSFGDAIKMDNLKPA 85
DELTA   MVHLTPEKAAVVALWQKVN--VDVGGELGRLLVVVPTQRFESDFGNLSSPDAVMGNPRVKAHGKRVVTSFGDAIKHLDDLKGT 85
MYOGLOBIN -MGVSDGGEWQLVNLVWQKVEADDPGHQGVVLRLEKGFPELEKEDKQKHKSEDEKASEDLKFKGATVITALGGIILKKKGHEAE 86

      90      100     110     120     130     140     150
ALPHA1  LSAISDDEHAKRVRVDPVNFKLLSHCLLVTLAAALPAEFTPAVHSLDQFLASVSVVTSKVR----- 142
ALPHA2  LSAISDDEHAKRVRVDPVNFKLLSHCLLVTLAAALPAEFTPAVHSLDQFLASVSVVTSKVR----- 142
THETA   LSAISDDEHACQLRVDPVAFQLLGHCLLVTLAAALHVPGFSPALQASLDQFLASVVISALVSEVR----- 142
GAMMA   FAKLSELCCKLLEVDPENFRLGNVLTVLAHFGKFTPEVQAAVORVIVGVAALAHKVF----- 147
BETA    FAKLSELCCKLLEVDPENFRLGNVLTVLAHFGKFTPEVQAAVORVIVGVAALAHKVF----- 147
EPSILON FAKLSELCCKLLEVDPENFRLGNVLTVLAHFGKFTPEVQAAVORVIVSAVADALAHKVF----- 147
DELTA   FAKLSELCCKLLEVDPENFRLGNVLTVLAHFGKFTPEVQAAVORVIVGVAALAHKVF----- 147
MYOGLOBIN IKPLAASLHAKHHPVKYLEFHSGLIQVLSKHPGDSGADAQGMNNADELFRKDLAENIKELGFGQ 154

```

Hemoglobin se pojavlja v več oblikah !

odrasli	HbA ₁	$\alpha_2\beta_2$
odrasli	HbA ₂	$\alpha_2\delta_2$
fetalni	HbF	$\alpha_2\gamma_2$
embrionalni	Hb Gower-1	$\zeta_2\varepsilon_2$
embrionalni	Hb Portland	$\zeta_2\gamma_2$



OMIM - Online Mendelian Inheritance in Man - Microsoft Internet Explorer

Address: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?CMD=search&DB=omim>

Search OMIM for hemoglobin

Display: Titles Show: 20 Send to: Text

All: 136 Items 1 - 20 of 136 Page 1 of 7

1: +141900 HEMOGLOBIN--BETA LOCUS; HBB BETA-THALASSEMIAS, INCLUDED Gene map locus [11p15.5](#) GeneTests, Links

2: +141800 HEMOGLOBIN--ALPHA LOCUS 1; HBA1 ALPHA-THALASSEMIAS, INCLUDED Gene map locus [16pter-p13.3](#) GeneTests, Links

3: *141850 HEMOGLOBIN--ALPHA LOCUS 2; HBA2 Gene map locus [16pter-p13.3](#) GeneTests, Links

4: *142250 HEMOGLOBIN, GAMMA G; HBG2 Gene map locus [11p15.5](#) Links

531 variant β verige!

Hemoglobin se pojavlja v več oblikah II

mutacije v populaciji, ki lahko spremenijo (ali pa ne) lastnosti Hb

Mutiran Hb	Mutacija	Efekt
α veriga		
Bibba	Leu136Pro	Nestabilnost. Pro razbije heliks.
M _{Boston}	His58Tyr	Methemoglobinemia , cianoza. Stabiliziran Fe(III) kompleks
β veriga		
Hammersmith	Phe42Ser	V notranjosti. Nastane votlinica, ki dopusti vdor vode → sprostitvev hema
E	Glu26Lys	Na površini, druga najbolj pogosta mutacija v populaciji (do 10%). Ni kliničnih manifestacij.
S	Glu6Val	Polimerizacija v fibrile, deformacija eritrocitov- srpastocelična anemija
Yakima	Asp99His	Ostanek med podenotami. Stabilizirana T oblika, zvišana afiniteta do kisika, brez kooperativnosti. Sprostijo manj kisika kot normalni Hb. To kompenzirajo z večjo količino eritrocitov v krvi- policitemija

