

Osnove biokemije
Metode proteinske kemije

Boris Mildner

1

Proteom je funkcionalni odraz genoma

Proteom je ukupan broj proteina koje ekspimira stanica, te ukazuje na funkciju, modifikacije proteina te kako proteini interferiraju s drugim molekulama.

Za razliku od genoma, proteom nije statičan već varira obzirom na vrstu stanice, stupanj razvoja organizma kao i na utjecaj okoliša.

2

Tehnike koje koristimo tijekom purifikacije i karakterizacije proteina

Proteine prvo moramo izolirati iz stanica i organela.

Shematski prikaz diferencijalnog centrifugiranja.

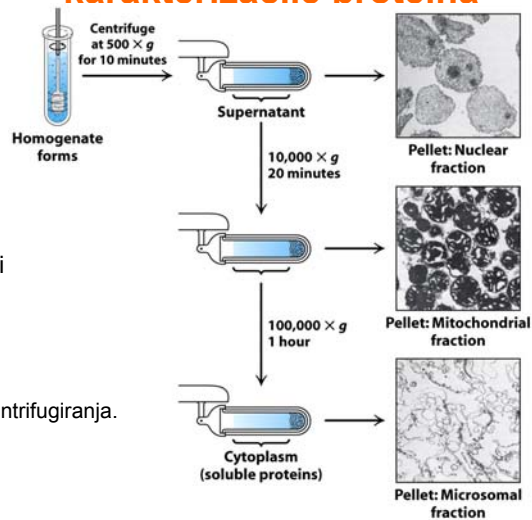


Figure 3-1
Biochemistry, Sixth Edition
© 2007 W. H. Freeman and Company

3

- Za razumijevanje funkcije proteina, proteine prvo moramo izolirati iz homogenata stanica, te ispitati njihove funkcije *in vitro*.

4

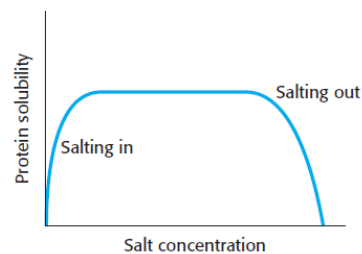
- Proteine možemo izolirati obzirom na njihovu:
- Topljivost
- Veličinu
- Naboj
- Afinitet vezivanja

Tijekom purifikacije, smjesu proteina podvrgavamo različitim postupcima od kojih je svaki specifičan. U svakom koraku procesa purifikacije, prati se aktivnost i koncentracija proteina.

Za purifikaciju proteina potreban je specifičan test. Za enzime, najčešće su to spektrofotometrijski testovi. Ako protein nije enzim, može se koristiti npr. gradijentno centrifugiranje, ili imunološki testovi.

5

Isoljavanje proteina



Promjena koncentracije soli utječe na topljivost hipotetskog proteina. Raznovrsni proteini imati će različite krivulje topljivosti.

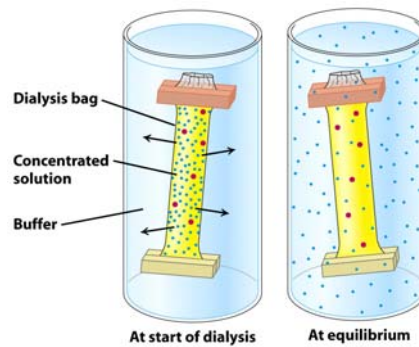
6

Purifikacija proteina

- **Isoljavanje proteina;**
Većina proteina je netopljiva u visokim koncentracijama soli. Taloženje proteina pomoću soli nazivamo izoljavanje.

Uklanjanje soli vršimo dijalizom.

Dijaliza



7

Purifikacija proteina

- Proteini se mogu međusobno odvojiti, kao i pročistiti od drugih molekula, obzirom na topljivost, veličinu, naboj i afinitet vezanja.
- U postupku pročišćavanja proteina koristimo kombinacije ovih tehnika.

8

Odvajanje proteina obzirom na veličinu (gel filtracija, ekskluzijska kromatografija)

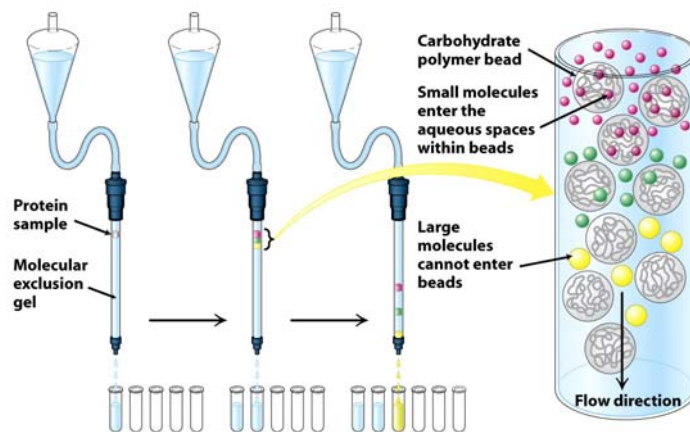


Figure 3-3
Biochemistry, Sixth Edition
© 2007 W. H. Freeman and Company

9

Odvajanje obzirom na naboj kromatografija na ionskim izmjenjivačima

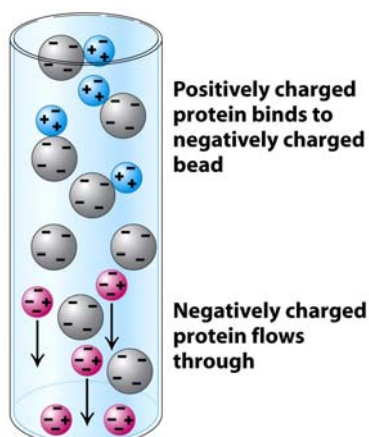
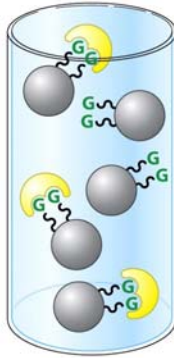


Figure 3-4
Biochemistry, Sixth Edition
© 2007 W. H. Freeman and Company

10

Odvajanje proteina obzirom na afinitet afinitetna kromatografija

Glucose-binding protein attaches to glucose residues (G) on beads



Addition of glucose (G)

Glucose-binding proteins are released on addition of glucose

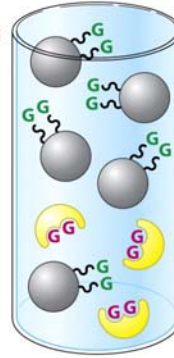


Figure 3-5
Biochemistry, Sixth Edition
© 2007 W. H. Freeman and Company

11

Suvremene kromatografske tehnike
svaki od ranije navedenih kromatografskih postupaka moguće je
provesti kromatografijom visokog učinka (HPLC)

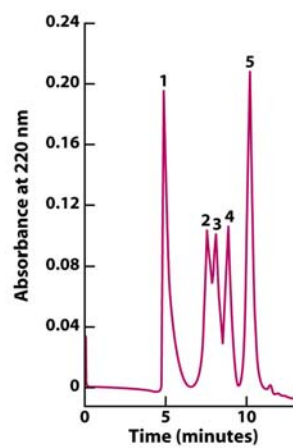


Figure 3-6
Biochemistry, Sixth Edition
© 2007 W. H. Freeman and Company

12

Purifikacija proteina

- Osim sa specifičnim testom, provjeru čistoće (homogenost) izoliranog proteina možemo provjeriti elektroforetskim tehnikama.

13

Praćenje tijeka purifikacije

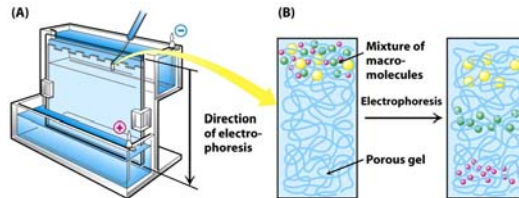
Purifikacija hipotetskog proteina				
Procedure or step	Fraction volume (mL)	Total protein (mg)	Activity (units)	Specific activity (units/mg)
1. Crude cellular extract	1,400	10,000	100,000	10
2. Precipitation with ammonium sulfate	280	3,000	96,000	32
3. Ion-exchange chromatography	90	400	80,000	200
4. Size-exclusion chromatography	80	100	60,000	600
5. Affinity chromatography	6	3	45,000	15,000

Note: All data represent the status of the sample *after* the designated procedure has been carried out. Activity and specific activity are defined on page 91.

Table 3-5
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
© 2008 W. H. Freeman and Company

14

Proteine možemo odijeliti i karakterizirati poliakrilamidnom gel elektroforezom (PAGE)



- Brzina gibanja proteina (v) ili bilo koje molekule u gelu ovisi o jačini električnog polja (E), o neto naboju proteina (z), i o koeficijentu trenja (f):

$$v = Ez/f$$

Koeficijent trenja ovisi i o masi i o obliku molekule koja se giba u električnom polju, a ovisi i o viskoznosti (η) medija. Za kugle radijusa r :

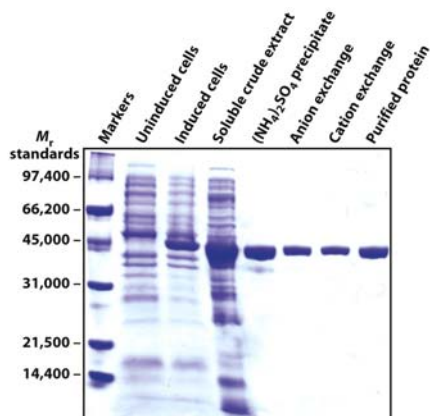
$$f = 6\pi\eta r$$

Električnu pokretljivost molekule μ , možemo izraziti kao $\mu = v/E = z/f$.

U PAGE male molekule koje su manje od pora gela brzo putuju u električnom polju, dok velike molekule zaostaju. Molekule koje su veće od pora gela gotovo su nepokretne.

15

Praćenje purifikacije proteina pomoću SDS-PAGE



SDS – Na dodecilsulfat

SDS-PAGE, u denaturirajućim uvjetima odvaja polipeptidne lance proteina obzirom na njihovu masu.

16

SDS-PAGE određivanje molekulske mase

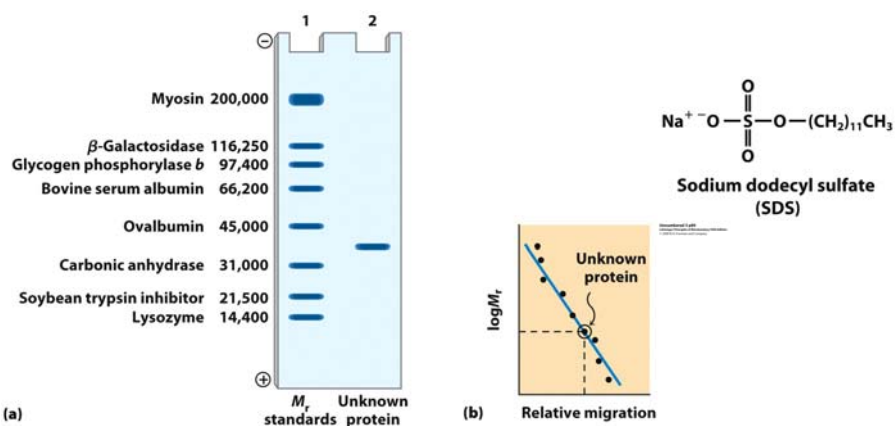


Figure 3-19
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
© 2008 W. H. Freeman and Company

17

Proteine možemo odvojiti izoelektričnim fokusiranjem i dodatno karakterizirati odvajanjem pomoću SDS-PAGE – 2D elektroforeza

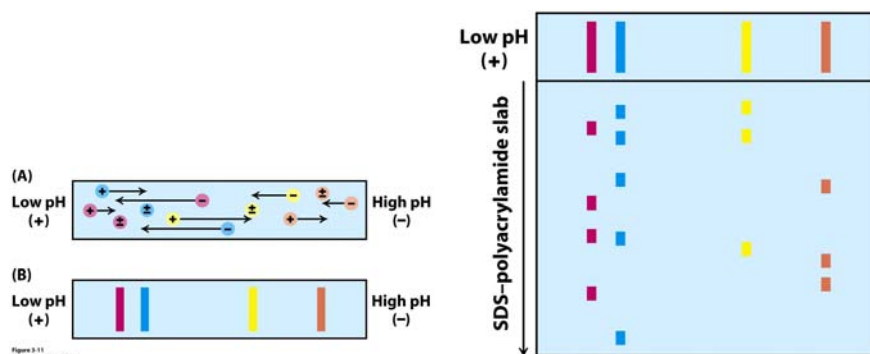


Figure 3-11
Biochemistry, Sixth Edition
© 2007 W. H. Freeman and Company

Figure 3-12a
Biochemistry, Sixth Edition
© 2007 W. H. Freeman and Company

U gelu napravimo gradijent pH. U električnom polju proteini će se gibati do svoje izoelektrične točke, odnosno do pH kod kojeg je njihov naboj nula.

Shema 2-D elektroforeze – nakon što odvojimo proteine izoelektričnim fokusiranjem, proteini se dodatno odjeljuju SDS-PAGE.

18

Odvajanje proteina E. coli pomoću 2-D elektroforeze
Odvojeno je više od 1000 proteina

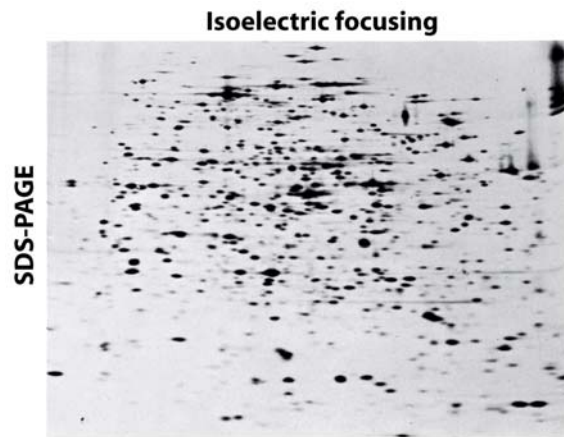


Figure 3-12b
Biochemistry, Sixth Edition
© 2007 W. H. Freeman and Company

19

Određivanje primarne strukture omogućava
razumijevanje funkcije proteina

- Aminokiselinski sastav proteina može se odrediti hidrolizom purificiranog proteina.
- Aminokiseline u hidrolizatu mogu se razdvojiti ionskom kromatografijom te kvantificirati pomoću fluoroscaminu.

20

Amino skupine aminokiselina možemo specifično obilježiti i kvantificirati

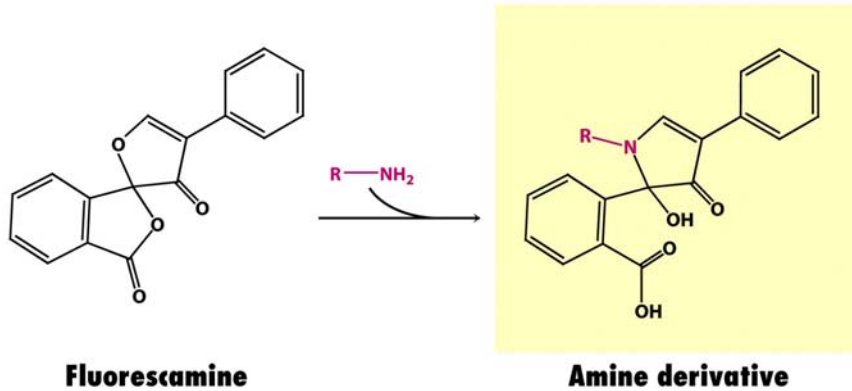


Figure 3-17
Biochemistry, Sixth Edition
© 2007 W. H. Freeman and Company

21

Peptidne veze u proteinu možemo hidrolizirati $6 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ HCl tijekom 24 h pri 110°C . Dobivenu smjesu aminokiselina moguće je odvojiti ionskom kromatografijom npr. kromatografijom na sulfoniranim polistirenskim nosačima

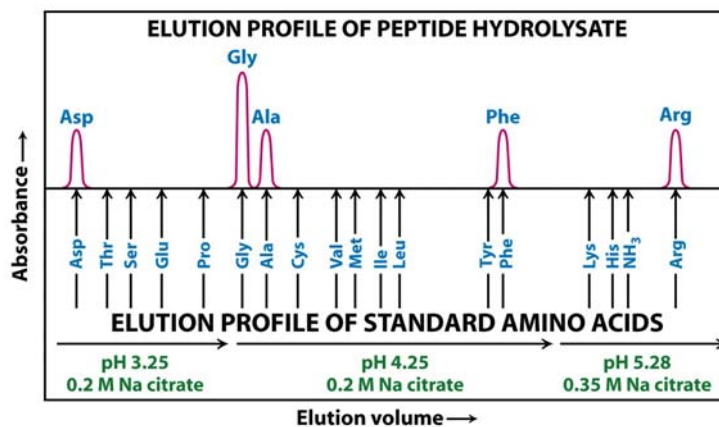


Figure 3-16
Biochemistry, Sixth Edition
© 2007 W. H. Freeman and Company

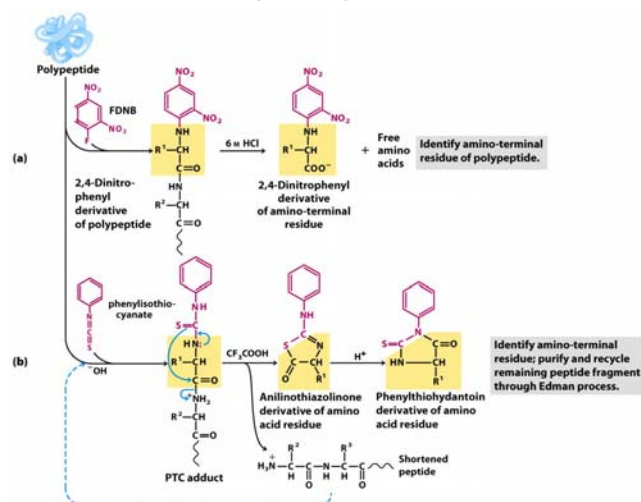
22

Određivanje primarne strukture omogućava razumijevanje funkcije proteina

- Slijed (sekvenca) peptida možemo odrediti Sangerovim (DNFB) reagensom te hidrolizom (dugotrajno)
- Slijed (sekvenca) aminokiselina purificiranog proteina može se odrediti Edmanovom odgradnjom pri čemu se sukcesivno uklanja po jedna aminokiselina s amino-kraja proteina.
- Fenil-izotiocijanat reagira s krajnjom amino skupinom pri čemu nastaje fenilhidantoin-aminokiselina kompleks i peptid kraći za jednu aminokiselinu.

23

Usporedba Sangerovog postupka (a) i Edmanove odgradnje (b)



24

Slijed aminokiselina nekog proteina možemo odrediti Edmanovom odgradnjom

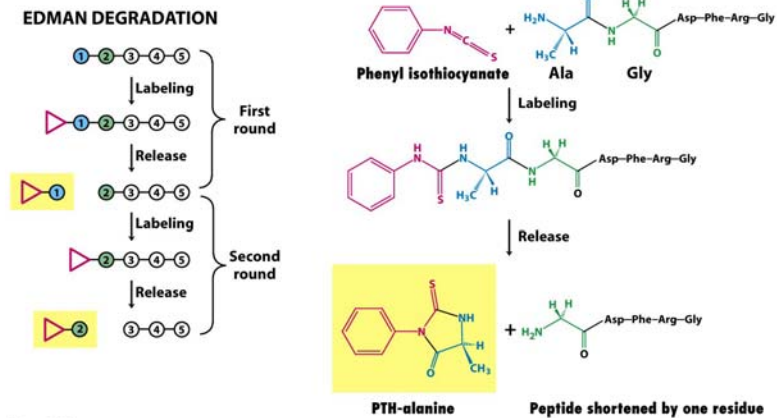


Figure 3-18
Biochemistry, Sixth Edition
© 2007 W. H. Freeman and Company

25

Primarnu strukturu proteina možemo specifično cijepati

- Dulji peptidni lanci mogu se cijepati sa specifičnim reagensima na specifičnim mjestima (povećava se učinkovitost Edmanove odgradnje).

26

Peptidni lanac možemo specifično cijepati

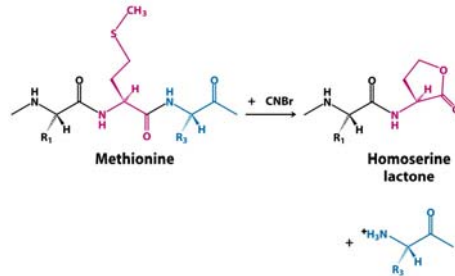


Figure 3-20
Biochemistry, Sixth Edition
© 2007 W. H. Freeman and Company

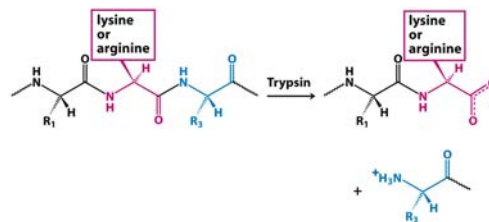


Figure 3-21
Biochemistry, Sixth Edition
© 2007 W. H. Freeman and Company

27

Kemikalije i enzimi koje koristimo za specifično cijepanje polipeptida na manje peptide

TABLE 3.3 Specific cleavage of polypeptides

Reagent	Cleavage site
Chemical cleavage	
Cyanogen bromide	Carboxyl side of methionine residues
O-Iodosobenzoate	Carboxyl side of tryptophan residues
Hydroxylamine	Asparagine–glycine bonds
2-Nitro-5-thiocyanobenzoate	Amino side of cysteine residues
Enzymatic cleavage	
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)

Table 3-3
Biochemistry, Sixth Edition
© 2007 W. H. Freeman and Company

28

Iz rezultata cijepanja polipeptida, te određivanjem sekvence peptida, možemo odrediti sekvencu polipeptida

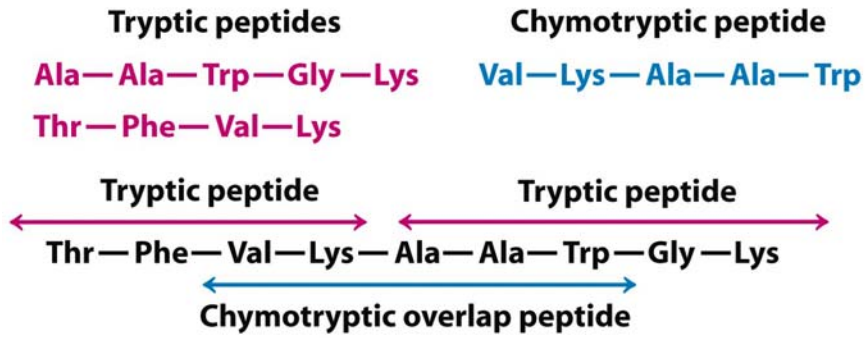


Figure 3-22
Biochemistry, Sixth Edition
© 2007 W.H. Freeman and Company

29

Iz slijeda nukleotida možemo zaključiti sekvencu proteina



Figure 3-26
Biochemistry, Sixth Edition
© 2007 W.H. Freeman and Company

Aminokiselinski slijed koji se dobiva iz sekvence gena ne govori ništa o post-translacijskim modifikacijama proteina. Zbog toga je potrebno kemijski odrediti sekvencu proteina. Zbog toga su genomske i proteomske analize komplementarne tehnike kako bi se ustanovile strukture i funkcije proteina.

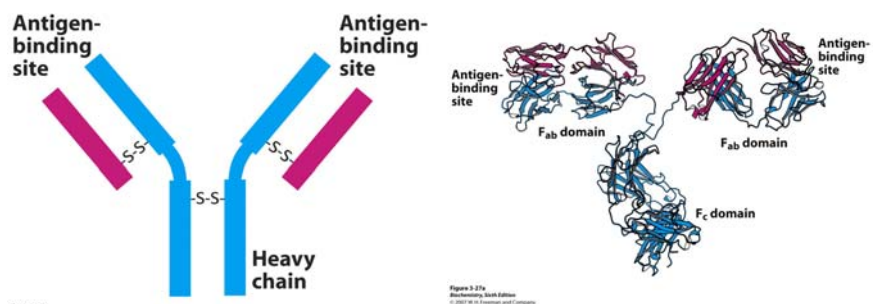
30

Imunološke tehnike

- Proteini se mogu detektirati i kvantificirati pomoću vrlo specifičnih protutijela. Naročito su korisna monoklonska protutijela budući da su homogena.
- Monoklonska protutijela na specifični protein mogu se koristiti za imunoprecipitaciju, ELISA i Western tehnike.

31

Koristimo različite imunološke tehnike tijekom ispitivanja proteina



Prikazi strukture imunoglobulina G (IgG)

32

U istraživanju koristimo monoklonska i poliklonska protutijela

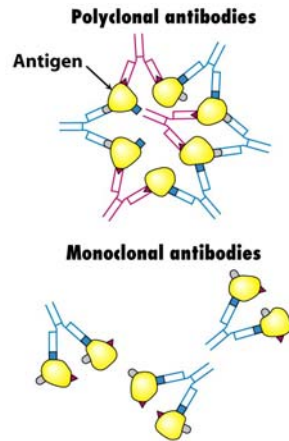
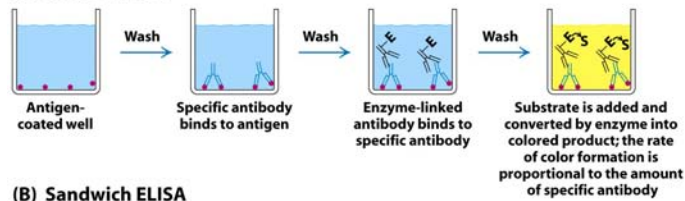


Figure 3-29
Biochemistry, Sixth Edition
© 2007 W. H. Freeman and Company

33

Shematski prikaz ELISA tehnike

(A) Indirect ELISA



(B) Sandwich ELISA

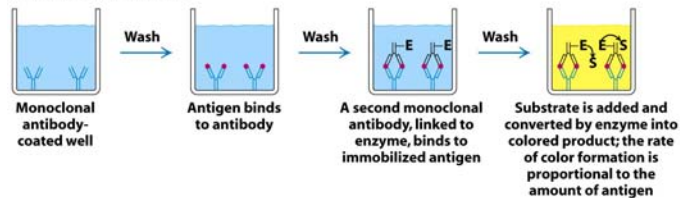


Figure 3-32
Biochemistry, Sixth Edition
© 2007 W. H. Freeman and Company

34

Protutijela koristimo za identifikaciju proteina nakon separacije proteina SDS-PAGE, tzv. Western analiza (blotting)

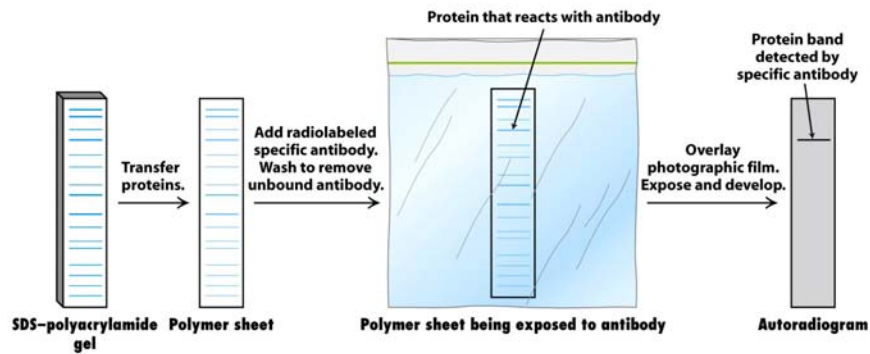


Figure 3-33
Biochemistry, Sixth Edition
© 2007 W.H. Freeman and Company

35

Protutijela obilježena fluorescentnim bojama koristimo za detekciju proteina

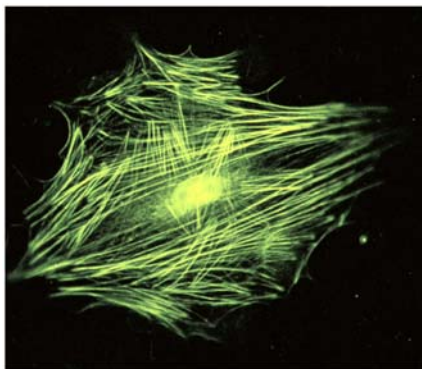


Figure 3-24
Biochemistry, Sixth Edition
© 2007 W.H. Freeman and Company

Mikrografija aktinskih filamenata u stanici koja je obojena s fluorescentnim protutijelom specifičnim za aktin.

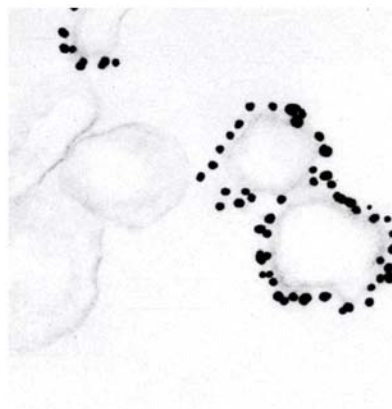


Figure 3-36
Biochemistry, Sixth Edition
© 2007 W.H. Freeman and Company

Imunoelektronska mikrografija proteina u membrani vezikula neurona.

36

Peptide možemo sintetizirati na krutim nosačima (automatizirane sinteza peptida)

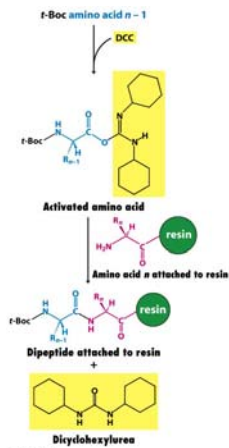


Figure 3-38
 Biochemistry, Sixth Edition
 © 2007 W. H. Freeman and Company

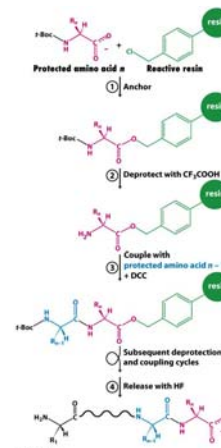
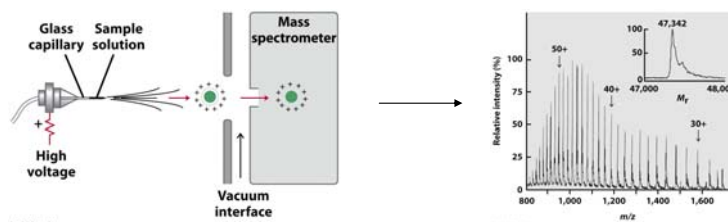


Figure 3-39
 Biochemistry, Sixth Edition
 © 2007 W. H. Freeman and Company

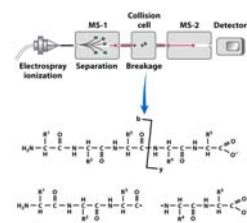
37

Masenom spektrometrijom možemo odrediti masu ali i sekvencu proteina



Box 3-2 Figure 1a
 Principles of Biochemistry, 6th Edition
 © 2004 W. H. Freeman and Company

Box 3-2 Figure 1b
 Principles of Biochemistry, 6th Edition
 © 2004 W. H. Freeman and Company



Box 3-2 Figure 2a
 Principles of Biochemistry, 6th Edition
 © 2004 W. H. Freeman and Company

Box 3-2 Figure 2b
 Principles of Biochemistry, 6th Edition
 © 2004 W. H. Freeman and Company

38

Rendgenskom strukturnom analizom određuje se trodimenzionalna struktura kristaliziranog proteina

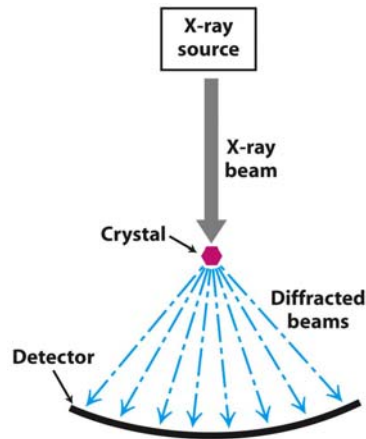


Figure 3-43
Biochemistry, Sixth Edition
© 2007 W. H. Freeman and Company

39

Nuklearnom magnetnom rezonancijom (NMR) možemo odrediti trodimenzionalnu strukturu proteina u otopini

TABLE 3.4 Biologically important nuclei giving NMR signals

Nucleus	Natural abundance (% by weight of the element)
¹ H	99.984
² H	0.016
¹³ C	1.108
¹⁴ N	99.635
¹⁵ N	0.365
¹⁷ O	0.037
²³ Na	100.0
²⁵ Mg	10.05
³¹ P	100.0
³⁵ Cl	75.4
³⁹ K	93.1

Table 3-4
Biochemistry, Sixth Edition
© 2007 W. H. Freeman and Company

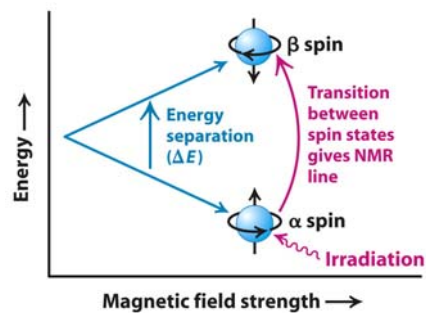
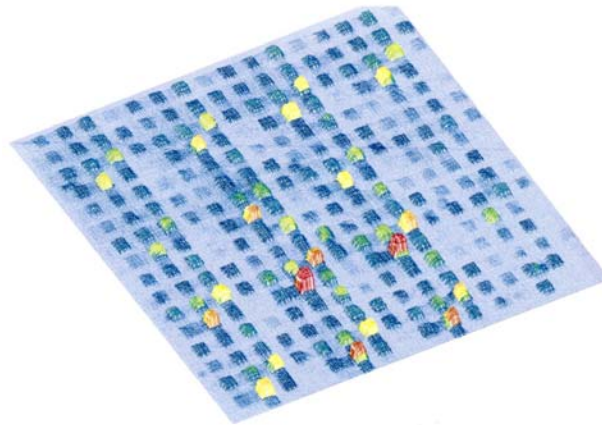


Figure 3-48
Biochemistry, Sixth Edition
© 2007 W. H. Freeman and Company

40

Proteinski čipovi – identifikacija 1024 peptida na površini od 1,6 cm² pomoću fluorescentnih protutijela (detekcija epitopa)



Unnumbered figure pg 105
Biochemistry, Sixth Edition
© 2007 W.H. Freeman and Company

41