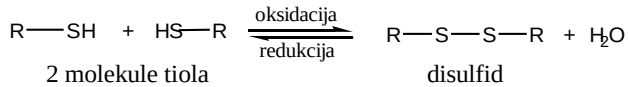
Polipeptidi i proteini

Prof. dr. Silvana Raić-Malić

Disulfidni mostovi

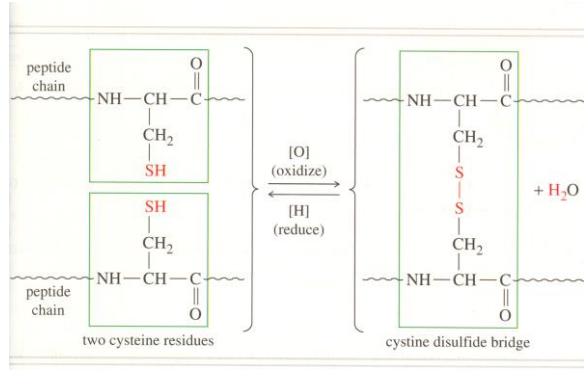
- Osim amidne veze postoji i druga kovalentna veza pomoću koje se povezuju dva cisteinska ogranka – disulfidne veze
- Blagi oksidacijski uvjeti uzrokuju vezivanje dvije skupine SH (tiola) preko disulfidnog mosta



2 molekule tiola — disulfid

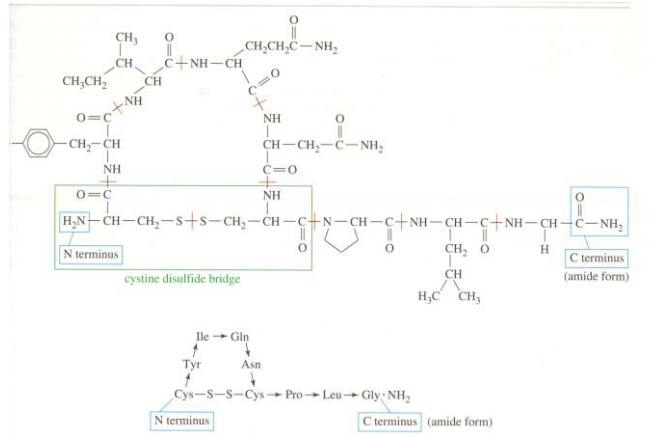
Disulfidni mostovi

- Dimer cisteina povezanih disulfidnim mostom zove se cistin
- Disulfidni most unutar jednog lanca tvori omču ili prsten



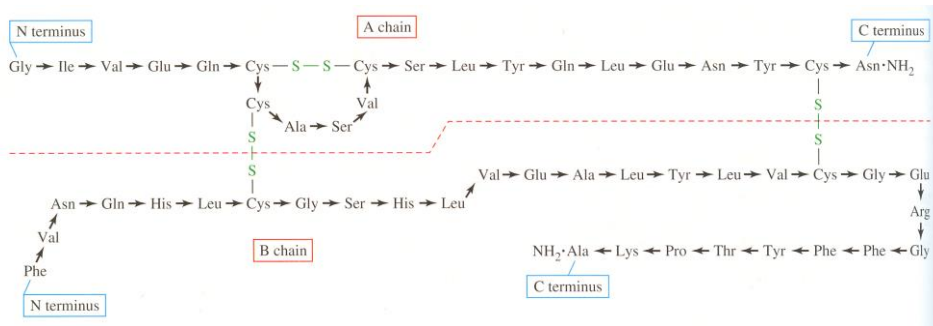
Disulfidni mostovi

- Humani oksitocin – peptidni hormon koji uzrokuje kontrakcije maternice i trudove
- Nonapeptid s dva cisteinska ogranka na položaju 1 i 6, međusobno povezani disulfidnom vezom



Disulfidni mostovi

- Inzulin goveda – složeniji peptidni hormon koji regulira metabolizam glukoze
- Sadrži dva peptidna lanca: lanac A sadrži 21 AK, lanac B sadrži 30 AK, lanci A i B su međusobno povezani s dva disulfidna mosta, jedan disulfidni most povezuje 6 AK u omču u lancu A

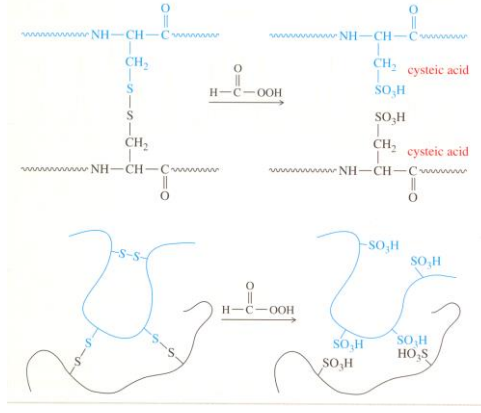


Određivanje primarne strukture polipeptida i proteina

- Primarna struktura polipeptida ili proteina - redoslijed aminokiselina u polipeptidu ili proteinu
- Tripeptid može imati 6 različitih primarnih struktura, a tetrapeptid 24
- Protein sa 100 AK od kojih su 20 različite AK ima 1.27 x 10^{130} mogućih redoslijeda AK
- Različite metode određivanja redoslijeda aminokiselina!
- Prvi stupanj je cijepanje svih disulfidnih mostova, te odvajanje, pročišćavanje i analiziranje nastalih peptidnih lanaca

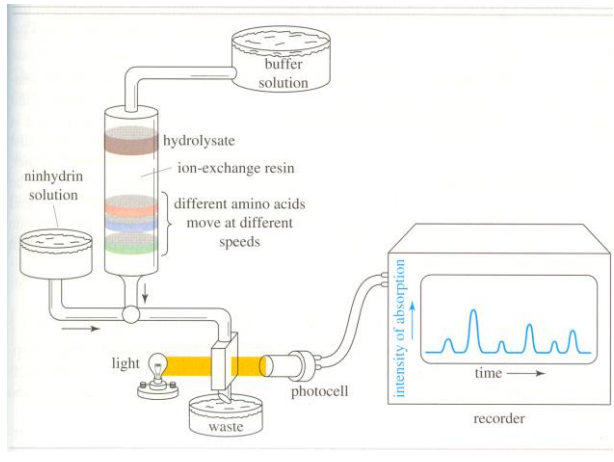
Cijepanje disulfidnih mostova

- Cijepanje disulfidnih mostova u cistinu redukcijom do tiolnog oblika → tendencija reoksidacije i ponovnog stvaranja disulfidnih veza
- Djelotvornije cijepanje disulfidnih mostova oksidacijom s peroksimravljom kiselinom do $–SO_3H$ skupina



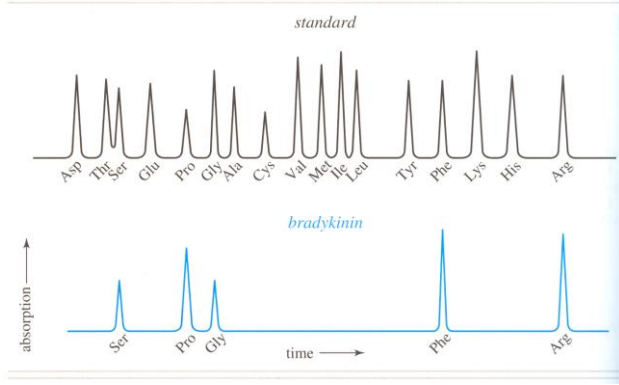
Određivanje primarne strukture polipeptida i proteina

- **Odrediti prisutne aminokiseline i njihovu koncentraciju**
- Potpuna hidroliza peptidnog lanca – kuhanje u 6M otopini HCl-a 24 h
- Odvajanje AK u hidrolizatu:
  – elektroforeza za odvajanje jednostavnih AK
  – kromatografija (gel-filtracijska, kromatografija s ionskim izmjenjivačem, “reversed-phase”)



Određivanje primarne strukture polipeptida i proteina

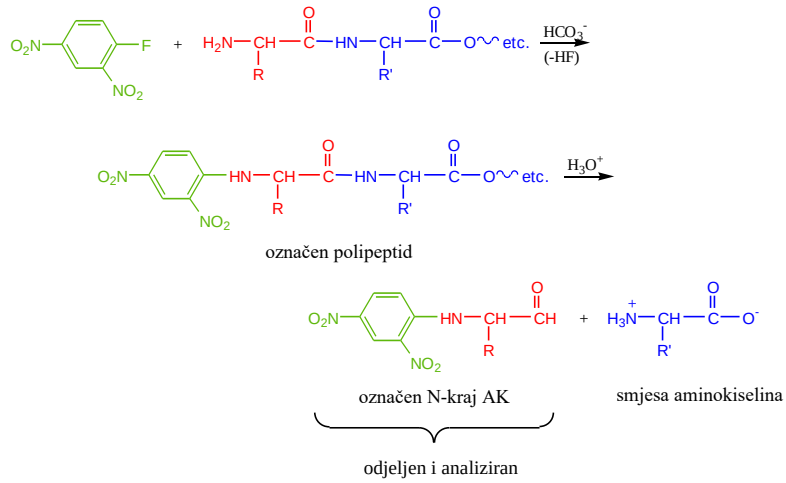
- Otopina nakon kolone se tretira s ninhidrinom → nastaje derivat intenzivne boje → mjerenje absorbancije (kod 570 nm) u funkciji vremena – svaka AK sa svojim retencijskim vremenom
- Rezultat automatske analize AK je ovakav kromatogram:



Određivanje primarne strukture polipeptida i proteina

- Odrediti redoslijed aminokiselina u lancu
- **Sangerova metoda određivanja *N*-kraja lanca**
- Reakcija peptida s 2,4-dinitrofluorbenzenom (DNFB) u blago bazičnoj otopini → reakcija slobodne amino skupine nukleofilnom aromatskom supstitucijom SnAr → označavanje N-kraja 2,4-dinitrofenilnom skupinom → hidroliza polipeptida → separacija i identificiranje AK prema standardu
- Nedostatak metode: reakcija DNFB s bilo kojom amino skupinom peptidnog lanca (u ogranku lizina) i pri analizi se hidrolizom uništi cijeli peptidni lanac

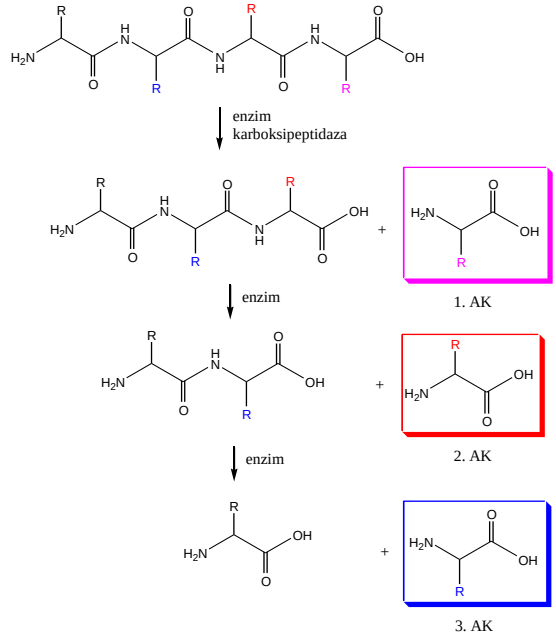
Određivanje primarne strukture polipeptida i proteina



Određivanje primarne strukture polipeptida i proteina

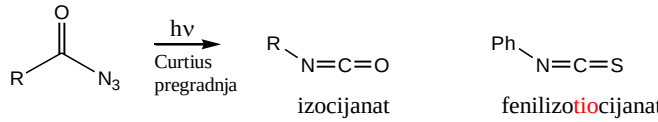
- Određivanje C-kraja lanca probavnim enzimom *karboksipeptidazom*
- Selektivno cijepa karboksilni kraj peptidnog lanca
- Pažljiva analiza nastalih AK u funkciji vremena
- Duži lanac daje složeniju analizu

Određivanje C-kraja lanca probavnim enzimom *karboksipeptidazom*



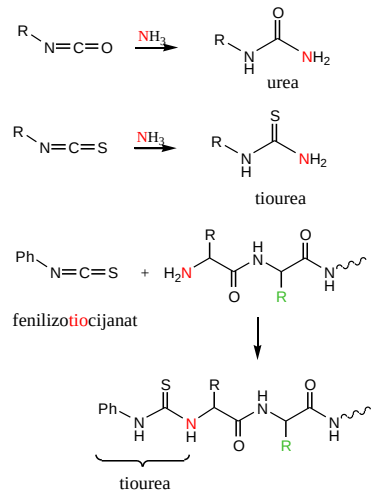
Određivanje primarne strukture polipeptida i proteina

- **Edmanova degradacija (odgradnja)**
- Stupnjevito sekvencioniranje peptida
- Primjena fenilizotiocijanata, Ph-N=C=S
- Izotiocijanat je sumporni analog izocijanata



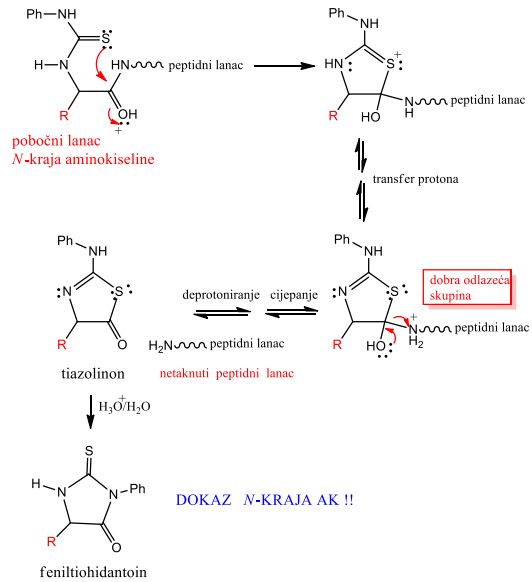
Edmanova odgradnja

- Izocijanati s amonijakom ili aminima tvore derivate uree
- Izotiocijanati s amonijakom ili aminima tvore tioureu kao prvi intermedijar



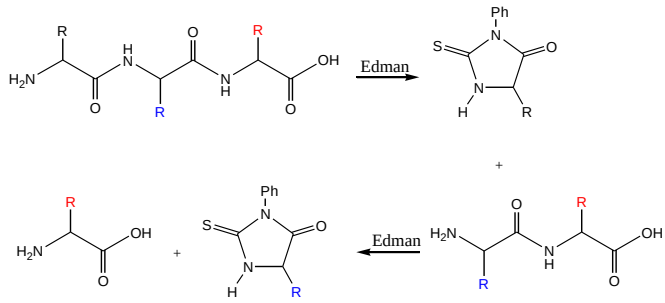
Edmanova odgradnja

- Tiourea se u kiselini cijepa bez utjecaja na druge amidne veze
- Protoniranje susjedne karbonilne skupine pomoću susjednog atoma S → nastaje tiazolinon → s kiselinom daje feniltiohidantoin koji sadrži ogranak R terminalne aminokiseline
- Prednosti metode: ostatak peptida ostaje netaknut, moguće ponavljanje Edmanove metode za sekvencioniranje čitavog proteina



Edmanova odgradnja

- Struktura čitavog polipeptidnog lanca može se odrediti uzastopnim ponavljanjem Edmanove metode



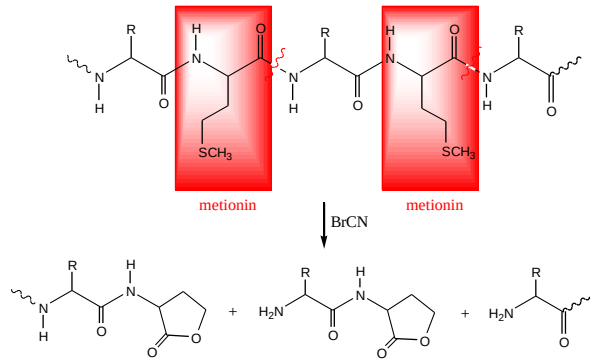
- Nedostaci Edmanove metode:
- Nije pouzdana za određivanje strukture polipeptidnih lanaca koji sadrže više od 20-30 AK
- Nakon svakog stupnja nastaju nečistoće i reakcijska smjesa postaje sve složenija – otežana potvrda stvaranja feniltiohidantoina

Određivanje primarne strukture polipeptida i proteina

- Razvijaju se druge metode kojima se cijepaju proteini na poznatom, određenom položaju AK
- Specifično cijepanje peptida uzrokovano malim molekulama, npr. BrCN

Određivanje primarne strukture polipeptida i proteina

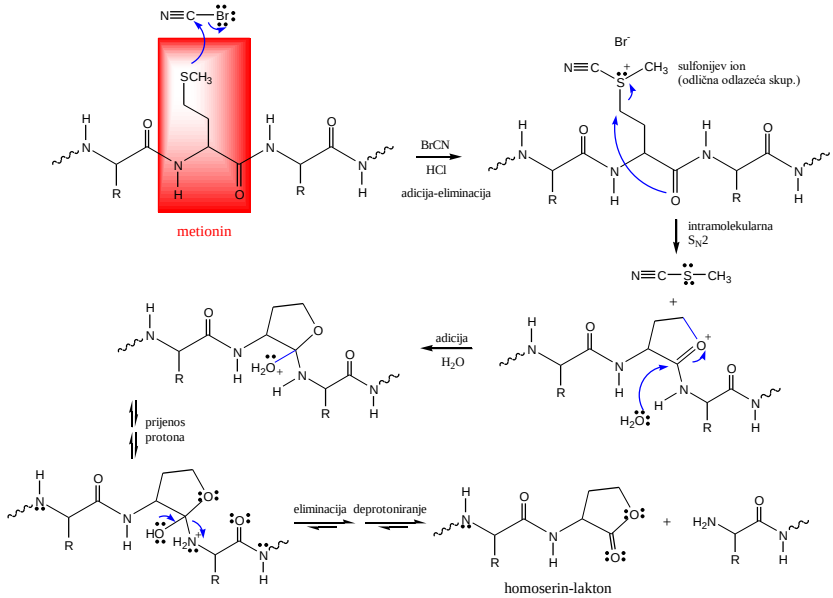
- Cijepanje peptida uzrokovano bromcijanidom (BrCN)
- Nukleofilnost sumpora i susjedne skupine uzrokuje cijepanje amidne veze CO-NH aminokiseline metionina



Mehanizam cijepanja primjenom BrCN

- Atom sumpora metionina zamijenjuje bromid → nastaje sulfonijev ion
- Napad karbonilne skupine metionina, izlazak dobro odlazeće skupine metiltiocijanata → nastaje peteročlani prsten homoserin-lakton
- Stupnjevi hidrolize → dva manja peptida

Mehanizam cijepanja primjenom BrCN



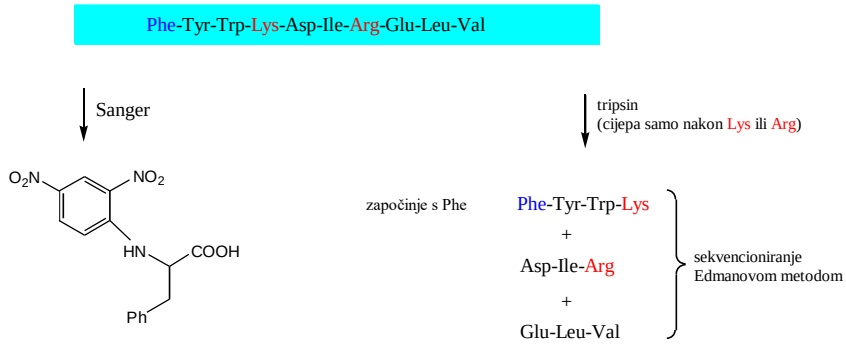
Primjena enzimskih reakcija pri određivanju primarne strukture proteina

- Kimotripsin – enzim koji cijepa AK s aromatskim pobočnom skupinom (fenilalanin, triptofan, tirozin) na položaju karboksilne skupine

- Tripsin – cijepa karboksilni kraj lanca AK: lizina i arginina
- Struktura dobivenih kraćih peptidnih lanaca se potom može odrediti Edmanovom metodom

Primjena enzimskih reakcija pri određivanju primarne strukture proteina

- Primjer dekapeptida:
- Određivanje *N*-kraja lanca Sangerovom metodom (npr. peptid započinje s Phe)
- Primjena enzima tripsina za cijepanje molekule u tri fragmenta – cijepanje na položaju Lys i Arg

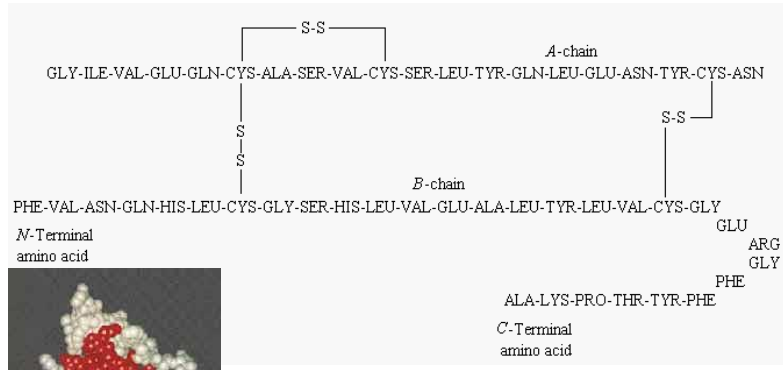


Određivanje primarne strukture polipeptida i proteina

- Primjena spektrometrije masa i usporedba nastalih sekvencija peptida s bazom podataka već poznatih sekvencija peptida
- Velika preciznost i pouzdanost metode
- Enzimatska razgradnja (npr. *karboksipeptidazom*) dugog peptidnog lanca → smjesa kraćih fragmenata peptida
- Skala pikova od niže do više molekulske mase
- Primjena ove metode i u određivanju oligonukleotida
- Cijepanje intaktnog proteina u spektrometru masa pomoću sudara s molekulama plina u vakuumskoj komori spektrometra (CID, collision induced dissociation) → analiza peptidnih fragmenata primjenom tehnike MS/MS

Primarna struktura proteina

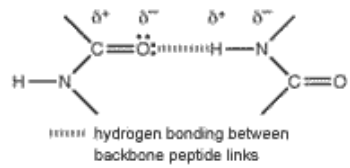
- Primarna struktura aminokiselina = redoslijed aminokiselina, od N-kraja do C-kraja AK
- Inzulin – 51 AK, sadrži dva lanca (A i B) i 3 S-S veze



3D struktura inzulina

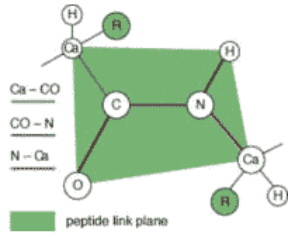
Sekundarna struktura proteina

- Označava konformaciju peptidne okosnice, odnosno prostorno usmjerenje peptidnih veza u proteinu
- Dvije klase strukturnih proteina:
  - fibrilni (snopovi ili ploče): proteini kože
  - globularni (kugle): enzimi

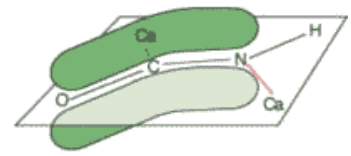


Sekundarna struktura proteina

- Cα-vezan za COOH i NH_2
- H-veza – povezivanje polipeptidnog lanca, za max. vrijednost (25 kJ/mol) atomi O, H i N leže na istom pravcu



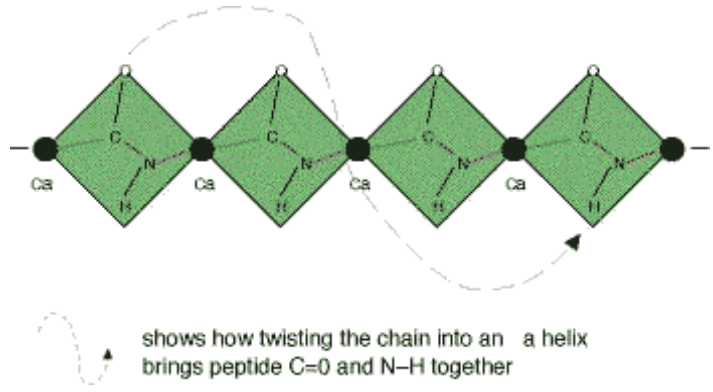
geometrija peptidne veze

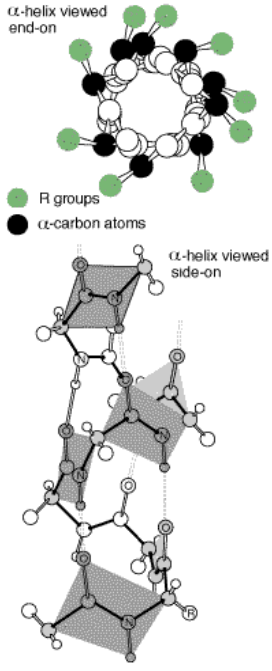


delokalizacija elektrona peptidne veze
CO-N veza slična C=C vezi, rotacija otežana, 6 atoma peptidne veze u istoj ravnini

Sekundarna struktura proteina

- Rotacija Cα-CO i N - Cα veza nije toliko ograničena
- Steričke smetnje – veći pobočni lanci, te prolin, hidoksiprolin
- Zakretanje ravnina u uzvojitu srukturu





Sekundarna struktura proteina

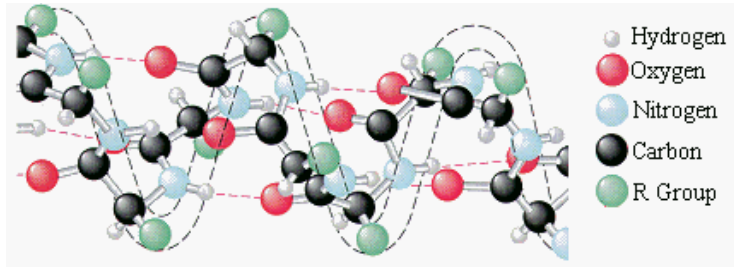
- α-heliks konformacija stabilizirana jer su:

  1. skupine pobočnog lanca prostorno odvojene

  2. svaka peptidna veza je uključena u dvije H-veze (atomi linearni – H-veza max. jakosti)

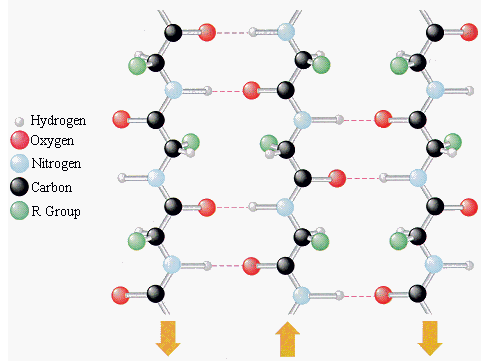
Sekundarna struktura proteina

- α-heliks (stabiliziran H-vezama između N-H⋯O=C u razmaku od četiri peptidne veze), R-skupine usmjerene s vanjske strane i okomite na os uzvojnice
- Glicin i prolin ne favoriziraju nastajanje α-heliks strukture
- Jedan zaokret u heliksu sadrži 3,6 AK ogranka



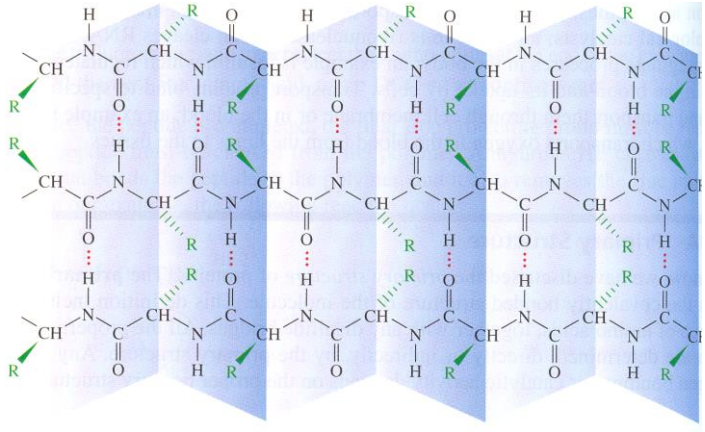
Sekundarna struktura proteina

- β-naborana ploča – sadrži dva ili više polipeptidna lanca
- Polipeptidni lanac gotovo potpuno izdužen
- Naborana ploča – zbog naizmjeničnog položaja α-C atoma iznad i ispod ravnine ploče
- Paralelne ili antiparalelne
- Antiparalelni polipeptidni lanci nađeni u kosi

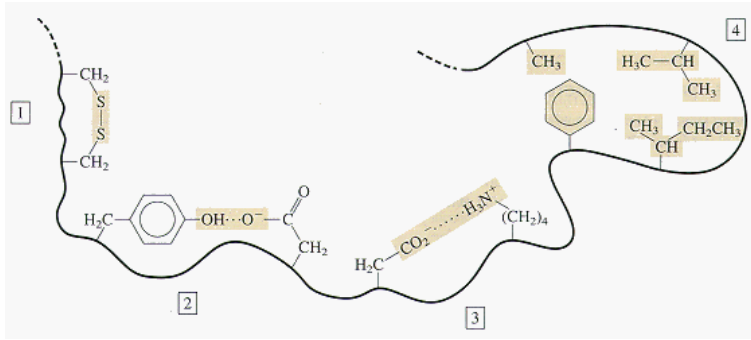


Sekundarna struktura proteina

- β-naborana ploča



Tercijarna struktura proteina

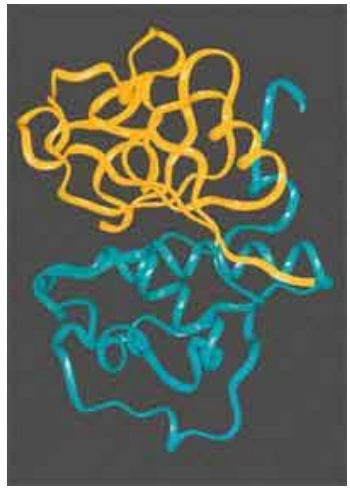


- Potpuna 3D struktura polipeptidnih lanaca, sekundarna struktura u prostornom odnosu
- Četiri čimbenika ključna za tercijarnu strukturu proteina:
  1. Disulfidni mostovi
  2. Vodikove veze
  3. Elektrostatske interakcije
  4. Hidrofobne interakcije

Tercijarna struktura proteina

- *Disulfidne (S-S) veze*. Ako se kod slaganja proteina dva cisteinska ostatka nađu u blizini dvije -SH skupine se oksidiraju, nastaje kovalentna S-S veza ⇨ međusobno povezivanje polipeptidnih lanaca
- *Vodikove veze*. Vodikove veze između amidnih skupina (peptidnih veza) - sekundarna struktura. Vodikove veze između ogranaka aminokiselinskih lanaca, molekule vode u okruženju su donori i akceptori H-veza – tercijarna struktura
- *Ionske veze*. Stabiliziranje strukture proteina privlačnim silama između ogranaka AK suprotnog naboja (npr. $-NH_3^+$ u Leu i $-CO_2^-$ u Asp)
- *Hidrofobne interakcije*. Često su hidrofobni pobočni lanci u Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Met, Phe i Trp uvučeni unutar proteina i tvore hidrofobne džepove ⇨ stabiliziranje strukture proteina

Tercijarna struktura proteina



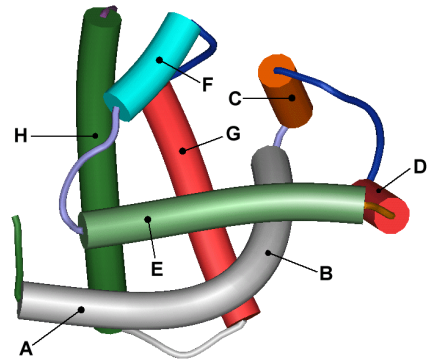
- Globularni proteini – tercijarne strukture sa suženim dijelom u sredini
- Gornji i donji dio nazivamo domenama, a pukotina (cleft) – aktivno mjesto enzima
- Model enzima papain (izoliran iz papaje)

Kvaterna struktura proteina

- Kvaterna struktura = udruživanje dva ili više peptidnih lanaca intramolekularnim (van der Waalsovim i elektrostatskim) silama
- Kvaternu strukturu nemaju svi proteini
- Interakcije između individualnih polipeptidnih lanaca ⇨ kvaterna struktura
- Identične podjedinice = homooligomeri
- Različite podjedinice = heterooligomeri

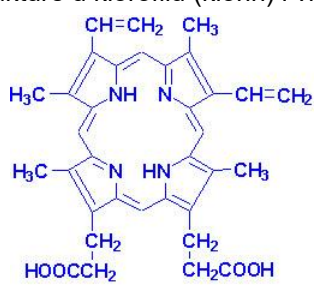
Kvaterna struktura proteina

- Mioglobin i hemoglobin - hemproteini koji skladište O_2 u mišiće ili ga prenose putem krvi
- Mioglobin – monomerni hemprotein nađen u mišićima, tipičan globularni protein topljiv u vodi
- Neobična sekundarna struktura: 75% α-heliks struktura (8 desnozakrečućih uzvojnica, A-H)
- Hem prostetička skupina u hidrofobnoj šupljini proteina

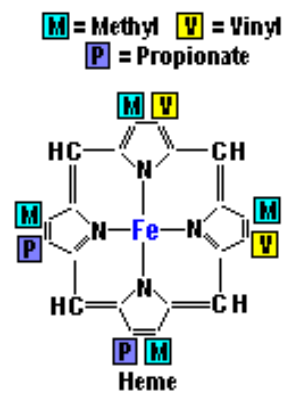


Kvaterna struktura proteina

- Hem – važna prostetička skupina u kojoj je željezo koordinirano s četiri dušikova atoma
- Tetraciklički aromatski spoj – porfirin
- Porfirini sintetizirani višestupnjevitim reakcijama iz sukcinil-CoA i glicina, keliranje Fe završni stupanj
- Primjena kao prostetičke skupine u mioglobinu, hemoglobinu, peroksidazi (katalitička oksidacija s vodikovim peroksidom) i citokromu C (prenosi elektron u elektron-transportnom lancu)
- Hemu slične strukture u klorofilu (klorin) i vitaminu B_{12} (korin)



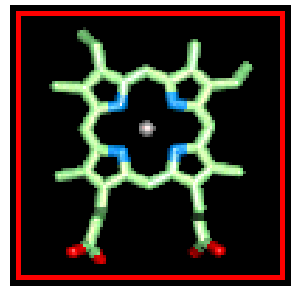
protoporfirin



Fe-protoporfirinski kompleks

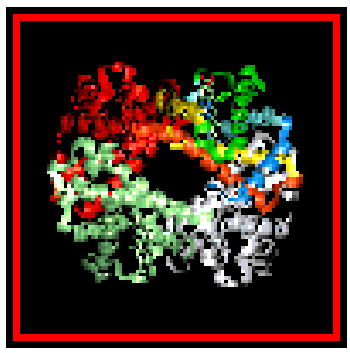
Kvaterna struktura proteina

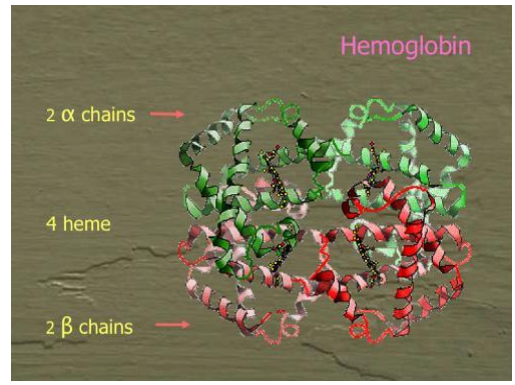
- Fe^{2+} u središtu tetrapirolnih prstenova
  - koordiniran s dušikovim atomima hem skupine
  - N-atom histidina
  - molekulom vode → stabilizira interakciju hem skupine i proteina
- Vezanjem kisika za željezo nastaje Fe-O_2 kompleks



Kvaterna struktura proteina

- Hemoglobin – tetramer, sadrži četiri polipeptidna lanca zajedno udružena u kompletnu proteinsku molekulu: dva α-lanca koji sadrže 141 AK, dva β-lanca koji sadrže 146 AK ($\alpha_2\beta_2$) i 4 hem skupine ⇨ heterooligomerni protein
- Nađen u eritrocitima



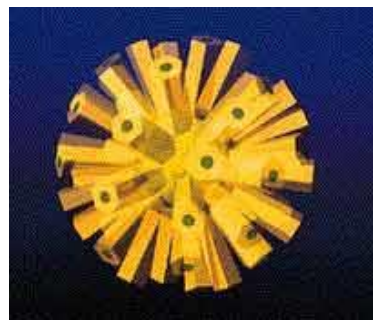


Kvaterna struktura proteina

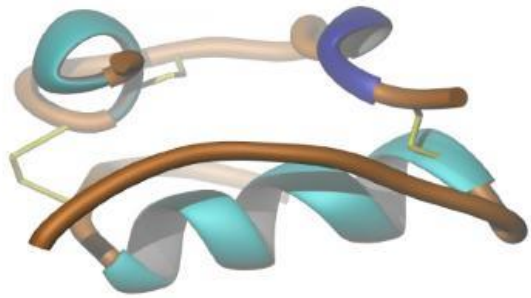
- Polimerni lanci u kvaternoj strukturi nisu povezani kovalentnim vezama, poput S-S veza (koje drže AK lance u inzulinu)
- Primarna privlačna sila između α- i β-lanca u hemoglobinu rezultat interakcije između hidrofobnih supstituenata polimernih lanaca
- Kod drugih kvaternih struktura vodikove veze ili ionske interakcije između ogranaka AK na površinama udruženih polimernih lanaca – udruživanje polimernih lanaca

Kvaterna struktura proteina

- Proteinski omotač virusa



Human Insulin. 51 residues, 3 S-S crosslinks.



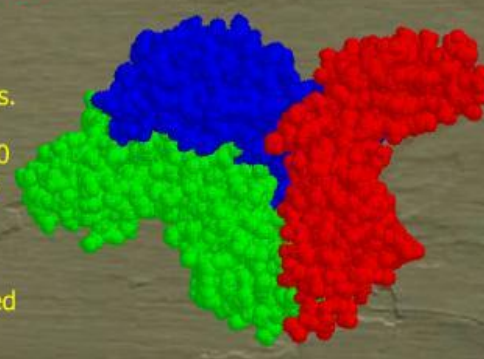
Protein gallery

Human growth hormone
596 residues

Originally obtained from human cadavers.

It would cost $20,000 per year to treat one child.

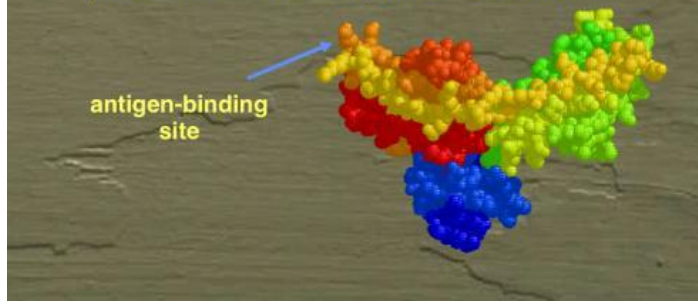
Now produced by genetically engineered bacteria.



Protein gallery

Immunoglobin FC - 262 residuals

A 'Y" shaped protein actually composed of 4 protein chains linked by disulfide bonds.

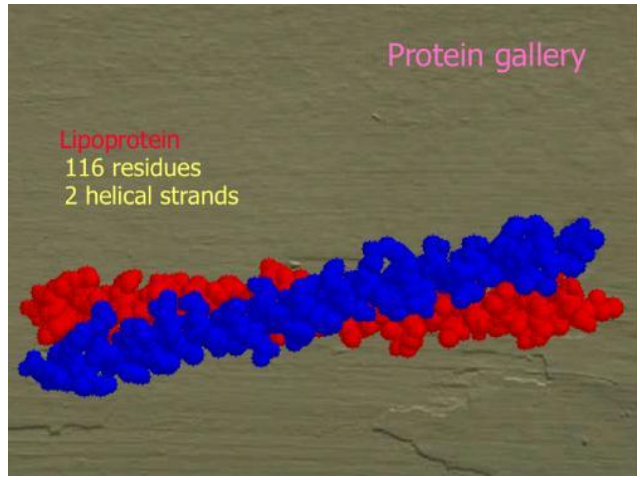


Example - cytochrome C 550



Contains Fe^{2+} Used in metabolism.

Aggregate of several types of proteins and structures.



- Lipoproteini – proteini povezani s lipidima nekovalentnim interakcijama
- **LDL** (“**low density lipoprotein”)** – loš → taloženje kolesterola na stijenke krvnih žila
- **HDL** (“**high density lipoprotein) -** dobar → povezan uz transport kolesterola izvan krvi
- Uloga: pomažu u transportu lipida i kolesterola

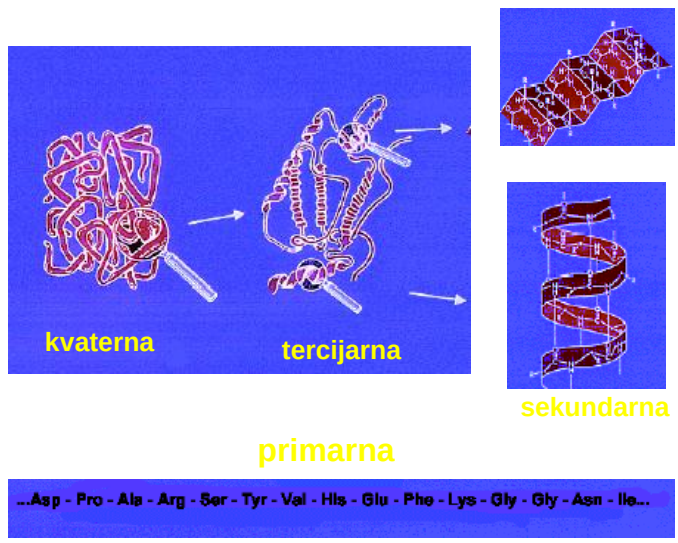
Protein hormone examples

	Source	Action
Gastrin	Stomach	Causes HCl production
Glucagon	Pancreas	Stimulates liver to metabolize glycogen
Insulin	Pancreas	Causes entry of glucose into cells
Prolactin	Pituitary	Stimulates lactation
Vasopressin	Pituitary	Reduces level of urine production

Size of some important proteins

Protein	Formula mass	Amino acid residues
Insulin	6000	51
Cytochrome C	16000	104
Hemoglobin	65000	574
Gamma globulin	176000	1320
Myosin	800000	6100

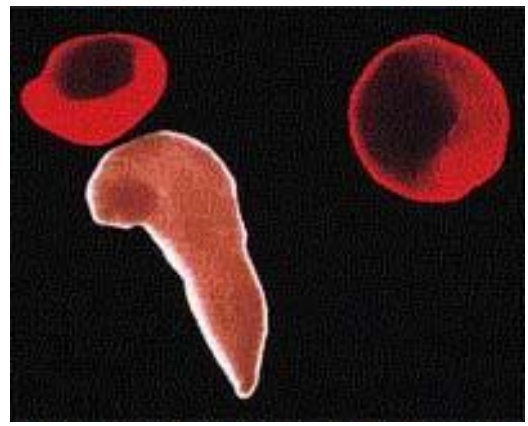
Primarna, sekundarna, tercijarna i kvaterna struktura proteina



Izmjene proteinske strukture

- Proteini – molekule osjetljive na izmjene u strukturi
- Organizmi proizvode neuobičajene proteine – mutacija
- Proizvodnja neprirodnog hemoglobina S češća kod Afričke populacije (1 od 300 Europljana)
- Srpasta anemija (“sickled cell anemia”) – uzrokovana izmjenom strukture proteina zbog promjene AK
- Zamjena polarnog Glu ogranka nepolarnim Val u položaju 6 β-lanca hemoglobina ⇨ promjene kvaterne strukture proteina i utjecaj na funkciju prenošenja kisika
- Nizak nivo kisika - molekule hemoglobina S se povezuju u crvenim krvnim stanicama, izmjena oblika ⇨ zatvaranje manjih krvnih žila

Izmjene proteinske strukture

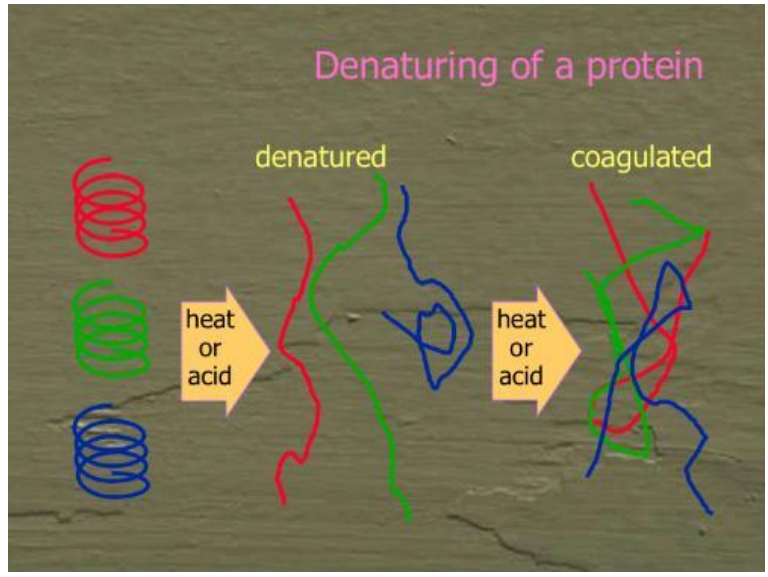


zdrave (crvene) i bolesne stanice eritrocita

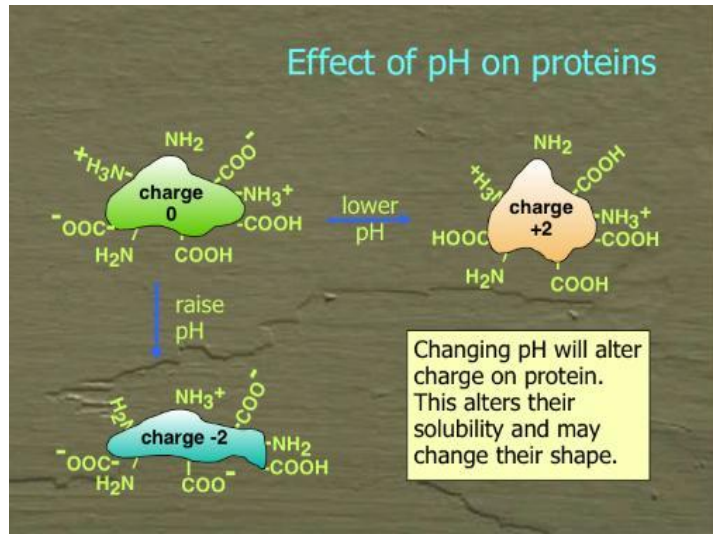
Denaturacija proteina

- Izmjena strukture proteina
- Uzročnici denaturacije proteina:
  - zagrijavanje – promjena sekundarne i tercijarne strukture
  - izmjene pH – utječe na ionske veze između ogranaka AK
  - deterđenti – nepolarni ogranci AK postaju topljivi, nema hidrofobnih interakcija koje tvore terc. strukturu
  - oksidirajući i reducirajući agensi – stvaraju ili kidaju S-S veze
  - reagensi poput uree utječu na H-veze koje formiraju sek. strukturu

Denaturacija proteina



Denaturacija proteina



Izmjene proteinske strukture

- Promjena oblika kose – kidanje S-S veza pomoću tioglikolata koji sadrži sumpor, redukcija do SH skupina – time je dozvoljena izmjena oblika kose

- Ispiranje tioglikolata, te primjena oksidirajućeg reagensa vodikovog peroksida, nastaje S-S veza i time fiksira izmijenjen oblik kose

