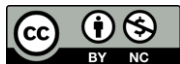


Ово дело је заштићено лиценцом Креативне заједнице Ауторство - некомерцијално<sup>1</sup>.

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License.



---

<sup>1</sup> Опис лиценци Креативне заједнице доступан је на адреси [creativecommons.org.rs/?page\\_id=74](https://creativecommons.org.rs/?page_id=74).



UNIVERZITET U NOVOM SADU

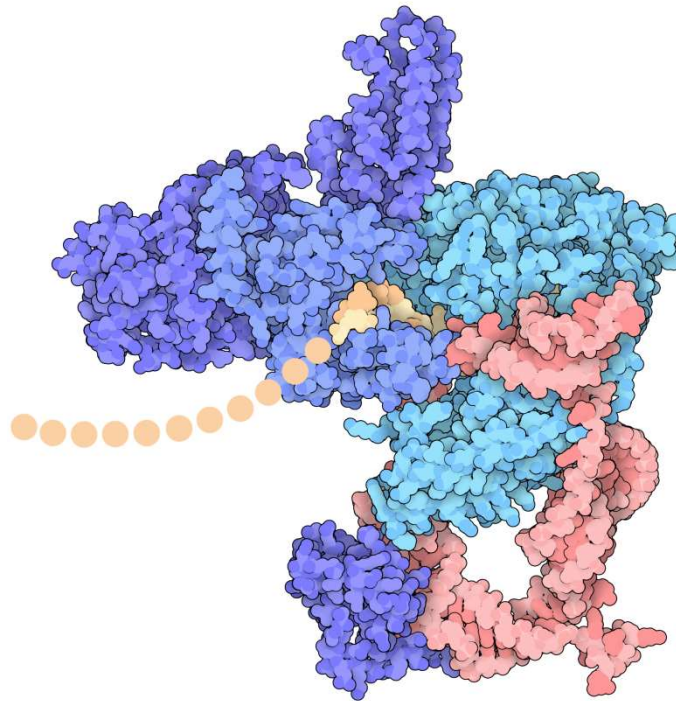
Prirodno-matematički fakultet

Departman za hemiju, biohemiju i  
zaštitu životne sredine



Nataša Simin, Ivana Beara, Milena Rašeta

# PRAKTIKUM IZ STRUKTURE I FUNKCIJE PROTEINA



*"Сва права задржава издавач. Забрањена је свака употреба или трансформација електронског документа осим оних који су експлицитно дозвољени Creative Commons лиценцом која је наведена на почетку публикације."*

*"Sva prava zadržava izdavač. Zabranjena je svaka upotreba ili transformacija elektronskog dokumenta osim onih koji su eksplicitno dozvoljeni Creative Commons licencom koja je navedena na početku publikacije."*

---

*Izdavač*

Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu

Trg Dositeja Obradovića 3, 21000 Novi Sad

[www.pmf.uns.ac.rs](http://www.pmf.uns.ac.rs)

*Za izdavača*

dr Milica Pavkov Hrvojević, dekan

*Recenzenti*

dr Marija Gavrović-Jankulović, redovni profesor Hemijskog fakulteta u Beogradu

dr Neda Mimica-Dukić, redovni profesor Prirodno-matematičkog fakulteta u Novom Sadu

Odlukom Nastavno-naučnog veća Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu, broj 0602-802/8 od 16. decembra 2019. godine „Praktikum iz strukture i funkcije proteina“ je prihvaćen kao pomoćni univerzitetski udžbenik za predmet Struktura i funkcija proteina za studente Osnovnih akademskih studija biohemije.

СР - Каталогизација у публикацији  
Библиотеке Матице српске, Нови Сад

577.112(075.8)(076)

**СИМИН, Наташа, 1975-**

Praktikum iz structure i funkcije proteina [Elektronski izvor] / Nataša Simin, Ivana Beara, Milena Rašeta. - Novi Sad : Prirodno-matematički fakultet, Departman za hemiju, biohemiju i zaštitu životne sredine, 2019

Način pristupa (URL):

[https://www.pmf.uns.ac.rs/studije/epublikacije/hemija/simin\\_beara\\_raseta\\_praktikum\\_strukture\\_funkcije\\_proteina.pdf](https://www.pmf.uns.ac.rs/studije/epublikacije/hemija/simin_beara_raseta_praktikum_strukture_funkcije_proteina.pdf). - Opis zasnovan na stanju na dan 18.12.2019. - Nasl. s naslovnog ekrana. - Bibliografija.

ISBN 978-86-7031-530-3

1. Beara, Ivana, 1976- [аутор] 2. Рашета, Милена [аутор]  
а) Протеини

COBISS.SR-ID 332251911

UNIVERZITET U NOVOM SADU  
Prirodno-matematički fakultet  
Departman za hemiju, biohemiju i zaštitu životne sredine

Nataša Simin, Ivana Beara, Milena Rašeta

# **PRAKTIKUM IZ STRUKTURE I FUNKCIJE PROTEINA**

## *PREDGOVOR*

„Praktikum iz strukture i funkcije proteina“ je pomoćni udžbenik, pre svega za studente treće godine biohemije Prirodno-matematičkog fakulteta u Novom Sadu, a takođe i za studente drugih srodnih fakulteta na kojima se izučava Struktura i funkcija proteina. Osnovna namena ovog praktikuma je povezivanje teorijskih i praktičnih aspekata nastave, u cilju lakšeg savladavanja gradiva iz pomenutog predmeta. Veći broj vežbi obuhvata računске zadatke i probleme, primenu teorijskog znanja na praktičnim primerima, kao i primenu programa za vizuelizaciju i kompjutersku manipulaciju molekulskim modelima proteina. Osmo vežba odnosi se na praktičnu primenu Western blot metode u biohemiji.

Iskreno se zahvaljujemo dr Svetlani Trivić, redovnom profesoru u penziji Prirodno-matematičkog fakulteta u Novom Sadu na ukazanoj pomoći pri izboru odgovarajuće literature za pojedine vežbe.

Posebno se zahvaljujemo recenzentima, dr Mariji Gavrović-Jankulović, redovnom profesoru Hemijskog fakulteta u Beogradu i dr Nedi Mimica-Dukić, redovnom profesoru Prirodno-matematičkog fakulteta u Novom Sadu na korisnim sugestijama i uloženom vremenu za pregledanje rukopisa ovog praktikuma.

Nadamo se da će vežbe iz ovog praktikuma omogućiti studentu da lakše savlada gradivo predmeta Struktura i funkcija proteina i da će ga motivisati da nastavi da istražuje i proširuje znanja u ovoj oblasti.

*Autori*

***Tabela za overu vežbi***

<b>Br. vežbe</b>	<b>Naziv vežbe</b>	<b>Datum</b>	<b>Mesto za overu</b>
1.	<i>Struktura, podela i kiselo-bazne osobine aminokiselina i peptida</i>		
2.	<i>Primarna struktura proteina i određivanje aminokiselinske sekvence</i>		
3.	<i>Sekundarna struktura proteina</i>		
4.	<i>Vizuelizacija proteinskih struktura pomoću DEEP VIEW programa</i>		
5.	<i>Tercijarna struktura</i>		
6.	<i>Kvaternarna struktura</i>		
7.	<i>Imunoglobulini</i>		
8.	<i>Western blot metoda</i>		
9.	<i>Membranski proteini</i>		

---

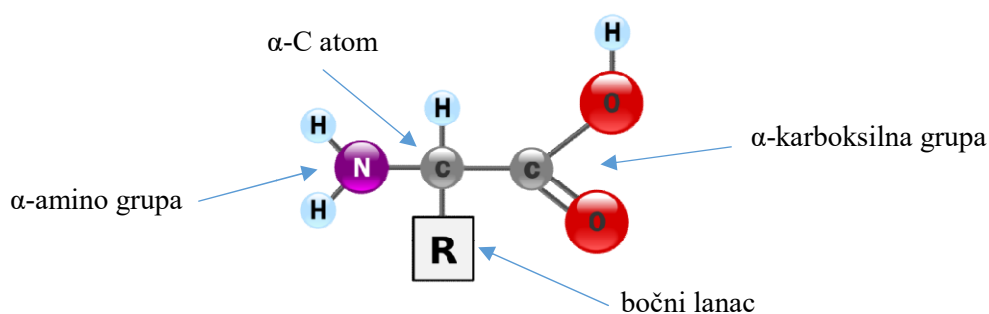
Ime i prezime studenta

---

Broj indeksa

## ***Vežba 1. Struktura, podela i kiselo-bazne osobine aminokiselina i peptida***

Proteini su veliki biomolekuli ili makromolekuli izgrađeni od jednog ili više polipeptidnih lanaca uvijenih u specifičnu trodimenzionalnu strukturu. Polipeptidni lanci su linearni i izgrađeni su od aminokiselina međusobno povezanih peptidnim vezama, koje su nastale kondenzacijom karboksilne grupe jedne aminokiseline sa amino grupom druge aminokiseline. Postoji ukupno 20 aminokiselina koje se mogu naći u sastavu proteina, pa se ove aminokiseline zovu proteinogene. Zajedničko za sve njih je da imaju centralni ugljenikov atom ( $C\alpha$ ) i za njega vezan vodonikov atom, karboksilnu i amino grupu (sa izuzetkom prolina, koji umesto amino ima imino grupu). Ono što ih razlikuje jeste bočni lanac R vezan za  $C\alpha$ , koji je određen genetskim kodom (Slika 1).



**Slika 1.** Opšta struktura L-aminokiselina

Bočni lanci aminokiselina imaju različite osobine od kojih zavisi njihova tendencija da interaguju između sebe ili sa vodom. Interakcije između bočnih aminokiselinskih lanaca obezbeđuju stabilnost molekulu proteina i odgovorne su za njegovu funkciju.

Prema osobinama bočnog lanca na fiziološkom pH, aminokiseline se mogu podeliti na: hidrofobne (glicin, alanin, valin, leucin, izoleucin, fenilalanin, prolin, metionin, triptofan), hidrofilne (serin, treonin, cistein, asparagin, glutamin i tirozin) i naelektrisane (asparaginska i glutaminska kiselina, histidin, lizin i arginin) (Tabela 1). Za obeležavanje aminokiselina obično se koriste troslovne ili jednoslovne skraćenice (Tabela 1).

$\alpha$ -amino i  $\alpha$ -karboksilna grupa, zatim imino grupa prolina i grupe u bočnim ostacima Glu, Asp, His, Arg, Lys, Cys i Tyr ispoljavaju kiselo-bazne osobine u vodenom rastvoru, što znači da svaka od ovih grupa podleže disocijaciji i ima karakterističnu konstantu disocijacije ( $K_a$ ). Negativni dekadni logaritam konstante disocijacije je  $pK_a$ .

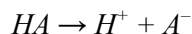
$$-\log K_a = pK_a$$

Stvarne, eksperimentalno određene  $pK_a$  vrednosti jonizabilnih grupa za svaku pojedinačnu aminokiselinu date su u Tabeli 2, dok su aproksimativne vrednosti ovih grupa date u Tabeli 3. U računskim zadacima koriste se aproksimativne vrednosti iz Tabele 3, ukoliko u zadatku nije drugačije naznačeno.

Iz početne formule za konstantu disocijacije može se izvesti Henderson-Hasselbalch-ova jednačina, iz koje se na osnovu poznate  $pK_a$  vrednosti može odrediti koncentracija deprotonovanog i protonovanog oblika svake jonizabilne grupe aminokiseline na određenom pH. Kada je  $pH = pK_a$



koncentracije protonovanog i deprotonovanog oblika su jednake, kada je  $pH < pK_a$  preovlađuje protonovani oblik, a kada je  $pH > pK_a$  preovlađuje deprotonovani oblik.



$$K_a = \frac{[H^+][A^-]}{[HA]} \quad [H^+] = \frac{K_a[HA]}{[A^-]}$$

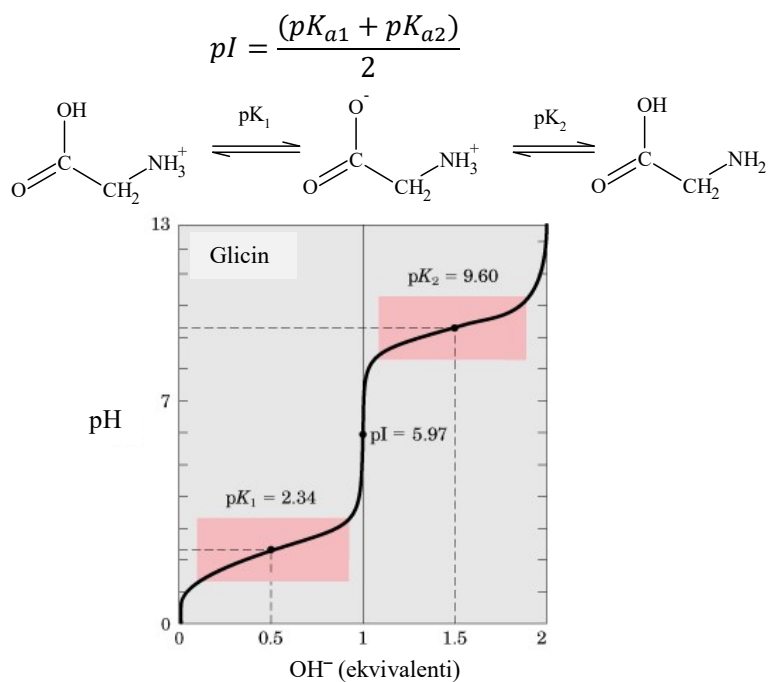
$$-\log[H^+] = -\log K_a + \log \frac{[A^-]}{[HA]}$$

$$pH = -\log K_a + \log \frac{[A^-]}{[HA]}$$

$$pH = pK_a + \log \frac{[\text{deprotonovani oblik}]}{[\text{protonovani oblik}]}$$

Ukupno naelektrisanje svake aminokiseline na određenom pH jednako je zbiru naelektrisanja pozitivno i negativno naelektrisanih grupa na tom pH. pH na kojem je ukupno naelektrisanje aminokiseline jednako 0 zove se izoelektrična tačka (pI). Kada je  $pH < pI$  ukupno naelektrisanje aminokiseline je pozitivno, a kada je  $pH > pI$  ukupno naelektrisanje aminokiseline je negativno.

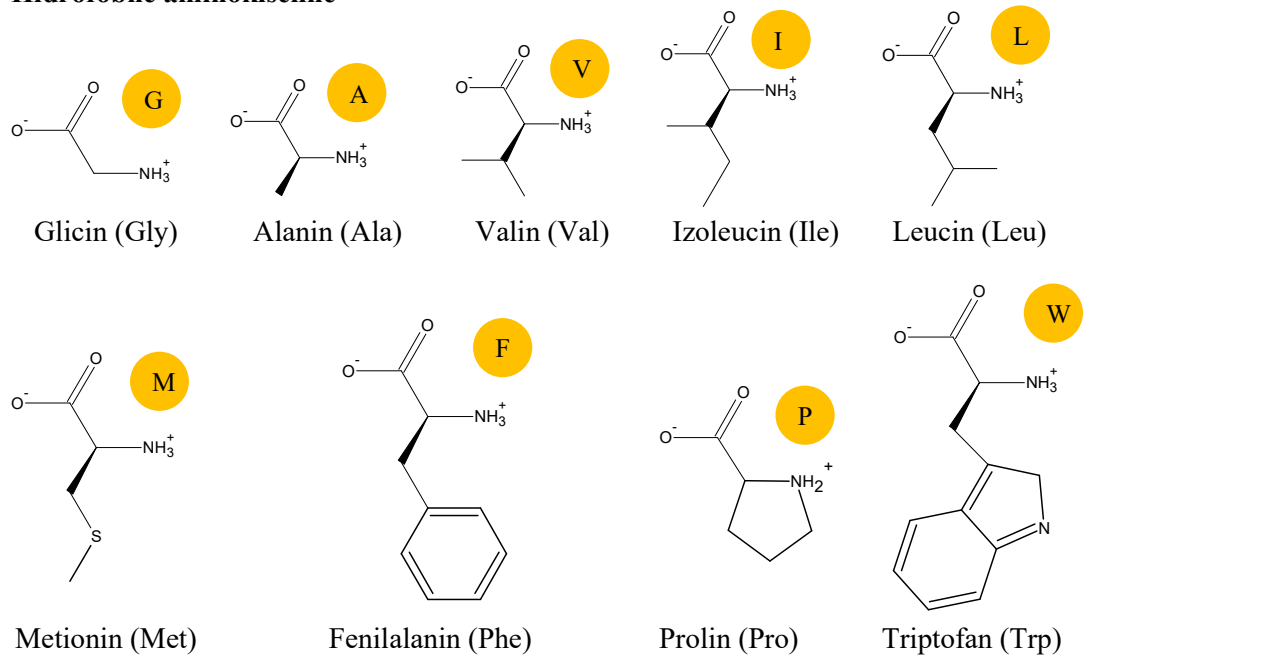
Aminokiseline mogu da se titruju kiselinama i bazama, pri čemu se konstantno meri pH rastvora. Iz dobijenih rezultata merenja konstruišu se kalibracione krive (zavisnost pH rastvora od zapremine dodatog titracionog sredstva). Na Slici 2 prikazana je kriva titracije Gly·HCl sa NaOH. Iz titracione krive se jasno vidi da je izoelektrična tačka (pI) jednaka polovini zbira  $pK_a$  grupe čijom deprotonacijom nastaje neutralni oblik i  $pK_a$  grupe čijom protonacijom nastaje neutralni oblik.



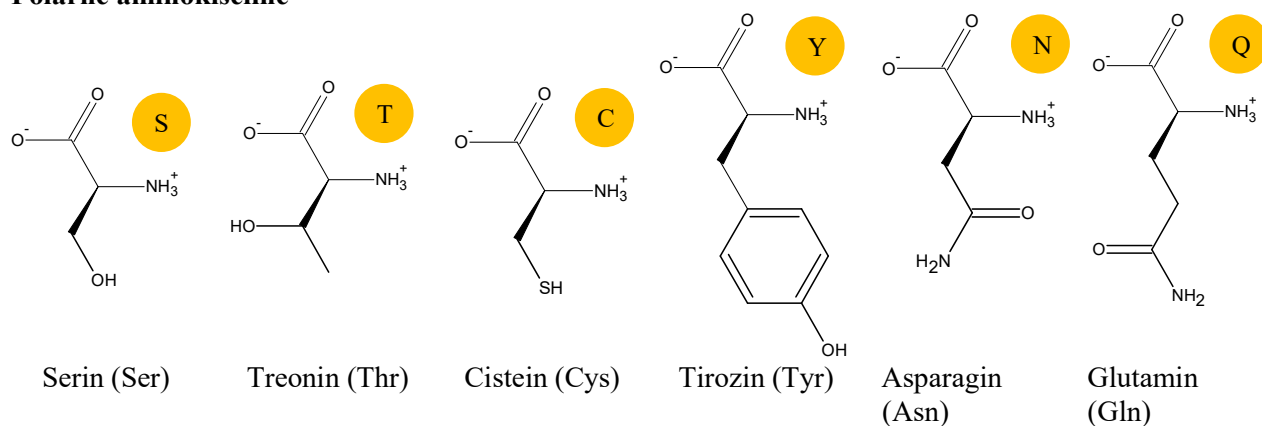
Slika 2. Titraciona kriva glicina

**Tabela 1.** Hemijske strukture proteinogenih aminokiselina na pH 7, njihovi nazivi i troslovnne i jednoslovne skraćenice

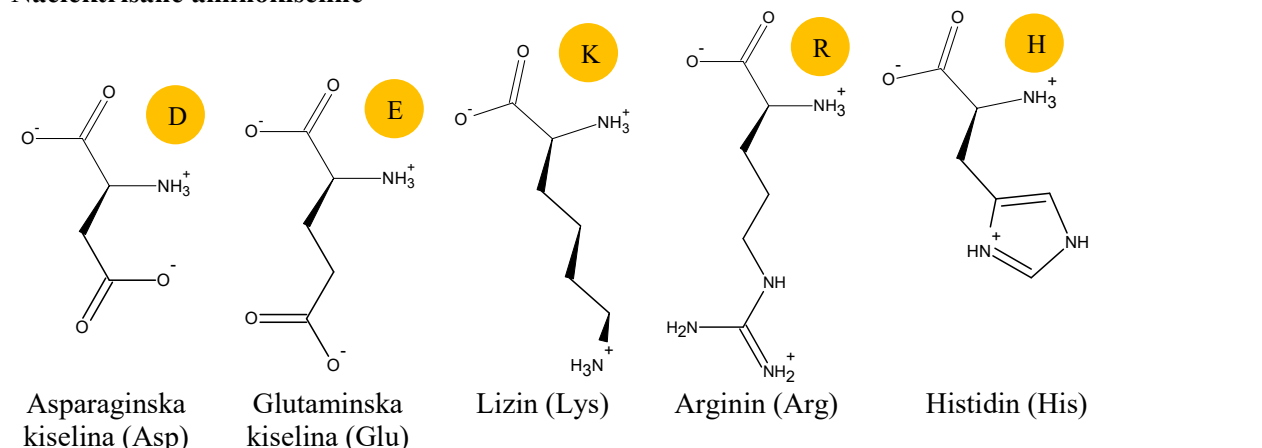
**Hidrofobne aminokiseline**



**Polarne aminokiseline**



**Naelektrisane aminokiseline**



**Tabela 2.** Stvarne pKa vrednosti jonizabilnih grupa aminokiselina

Aminokiselina	Skraćenice naziva aminokiseline	pKa ( $\alpha$ -COOH)	pKa ( $\alpha$ -NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> )	pKa (-R)
<b>Nepolarne - alifatičan R*</b>				
Glicin	Gly, G	2,34	9,60	-
Alanin	Ala, A	2,34	9,69	-
Valin	Val, V	2,32	9,62	-
Leucin	Leu, L	2,36	9,60	-
Izoleucin	Ile, I	2,36	9,68	-
Metionin	Met, M	2,28	9,21	-
<b>Aromatične</b>				
Fenilalanin	Phe, F	1,83	9,13	-
Tirozin	Tyr, Y	2,20	9,11	10,07
Triptofan	Trp, W	2,38	9,39	-
<b>Polarne - neutralan R</b>				
Serin	Ser, S	2,21	9,15	13,1
Prolin	Pro, P	1,99	10,96	-
Treonin	Thr, T	2,11	9,62	13,1
Cistein	Cys, C	1,96	10,28	8,18
Asparagin	Asn, N	2,02	8,80	-
Glutamine	Gln, Q	2,17	9,13	-
<b>Polarne - bazni R</b>				
Lizin	Lys, K	2,18	8,95	10,53
Histidin	His, H	1,82	9,17	6,00
Arginin	Arg, R	2,17	9,04	12,48
<b>Polarne - kiseli R</b>				
Asparaginska	Asp, D	1,88	9,60	2,77
Glutaminska	Glu, E	2,19	9,67	3,22

\*R – bočni ostatak aminokiseline

**Tabela 3.** Aproksimativne (generičke) vrednosti pKa jonizabilnih grupa aminokiselina

Jonizabilne grupe aminokiselina	Generičke pKa vrednosti
$\alpha$ -amino	8,0
$\alpha$ -karboksilna	3,0
$\epsilon$ -amino	10,0
Guanidino	12,0
Tiol	8,5
Imidazol	6,5
aromatična hidroksilna	10,0
R-karboksilna	4,0
R-hidroksilna	13,0

**Zadaci:**

1. Nacrtati dominantne jonske vrste aminokiselina polazeći od nižeg ka višem pH. Izračunati pI vrednost za svaku aminokiselinu na osnovu stvarnih pKa vrednosti datih u Tabeli 2.

<b><i>1. Aminokiseline sa alifatičnim bočnim nizom</i></b>
Glicin (Gly; G)
Alanin (Ala; A)
Valin (Val; V)
Leucin (Leu; L)

Izoleucin (Ile; I)

**2. Aromatične aminokiseline**

Fenilalanin (Phe; F)

Tirozin (Tyr; Y)

Triptofan (Trp; W)

**3. Dikarbonske aminokiseline i njihovi amidi**

Asparaginska kiselina (Asp; D)

Asparagin (Asn; N)

Glutaminska kiselina (Glu; E)

Glutamin (Gln; Q)

<b>4. Aminokiseline sa baznim bočnim nizom</b>
Lizin (Lys; K)
Histidin (His; H)
Arginin (Arg; R)
<b>5. Aminokiseline sa sumporom u bočnom nizu</b>
Cistein (Cys; C)

Metionin (Met; M)

**6. Oksiaminokiseline**

Serin (Ser; S)

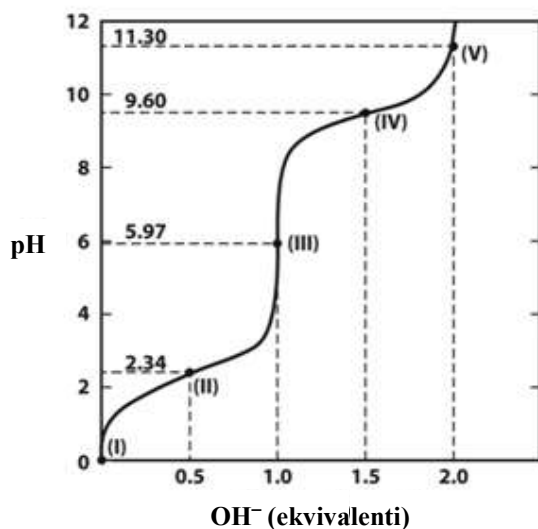
Treonin (Tre; T)

**7. Iminokiseline**

Prolin (Pro; P)



2. Odgovoriti na sledeća pitanja sa da ili ne.
  - a) Nejonizovani oblik aminokiseline dominira samo na vrlo visokom ili vrlo niskom pH
  - b) Leu je manje hidrofoban od Ala
  - c) Na  $\text{pH} > \text{pKa}$  više od polovine jonizujuće grupe je disosovano.  
Ukratko obrazložiti odgovore.
  
3. Prevesti sledeću sekvencu u sekvencu sa jednoslovnim oznakama aminokiselina:  
Ala-Phe-Phe-Lys-Arg-Ser-Ser-Ser-Ala-Thr-Leu-Ile-Val-Thr-Lys-Lys-Gln-Gln-Phe-Asn-Gly-Gly-Pro-Asp-Glu-Val-Leu-Arg-Thr-Ala-Ser-Thr-Lys-Ala-Thr-Asp.
  
4. Na slici je data titraciona kriva glicina, a ključne tačke titracije označene su brojevima od I do V. Prikazati disocijaciju glicina, a zatim za svaku tvrdnju od a) do i) identifikovati odgovarajuću tačku titracije (I-V).



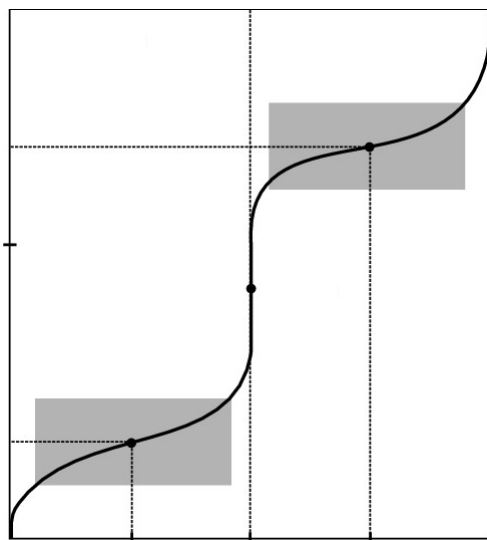
- a) Gly je prisutan predominantno kao jon  $^+\text{H}_3\text{N}-\text{CH}_2-\text{COOH}$
- b) Prosečno ukupno naelektrisanje Gly je +1/2
- c) 50% amino grupa je jonizovano
- d) pH je jednak pKa karboksilne grupe
- e) pH je jednak pKa protonovane amino grupe
- f) ukupno naelektrisanje Gly je nula
- g) karboksilna grupa je potpuno istitrovana
- h) Gly je potpuno istitrovan
- i) ukupno naelektrisanje Gly je -1

5.  $\gamma$ -karboksilna grupa Glu ima pKa 4,3.

- Koji % ove grupe će u razblaženom rastvoru Glu na pH 6 biti protonovan?
- Objasnite zašto je ova pKa vrednost veća od pKa za  $\alpha$ -COOH grupu.

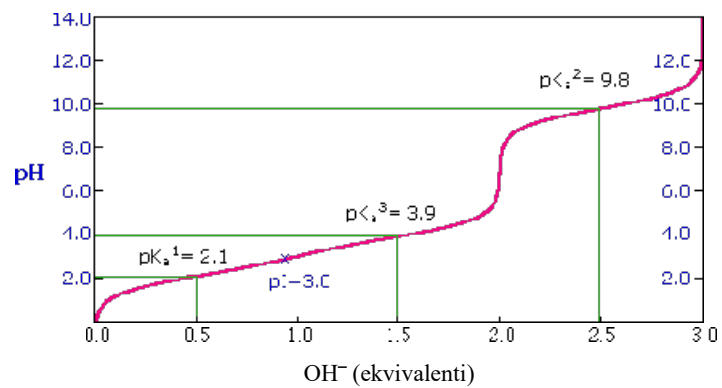
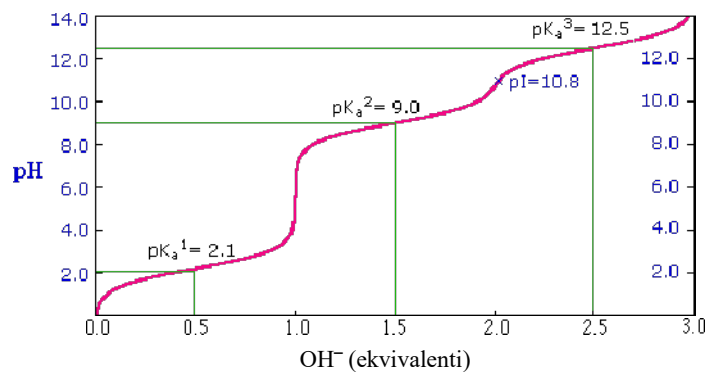
6. Koje su glavne jonske vrste prisutne u 0,15 M rastvoru (a) Leu, (b) Asp, (c) Lys na pH 7,5? Obrazložiti!

7. Na titracionoj krivoj Ala označiti pKa<sub>1</sub>, pKa<sub>2</sub> i pI, a zatim izračunati pI, na osnovu poznatih vrednosti pKa iz Tabele 2.



8. Konstruisati titracione krive Glu i Lys na osnovu poznatih vrednosti pKa iz Tabele 2.

9. Identifikovati aminokiseline čije su titracione krive date na sledećim slikama:



10. Koristeći stvarne pKa vrednosti iz Tabele 2 izračunati naelektrisanje Gly, Asp i Lys na pH = 3.

11. Odrediti pH vrednost rastvora:

- a) lizina, ako je amino grupa iz bočnog niza  $\frac{3}{4}$  disosovana
- b) fenilalanina, ako je  $\alpha$ -COOH disosovana 25%
- c) asparaginske kiseline, ako je karboksilna grupa bočnog niza disosovana 80%.

U izračunavanju koristiti podatke za pKa iz Tabele 2.

**12.** Koliko je mL 0,1 M KOH potrebno za potpunu neutralizaciju:

- a) 400 mL 0,2 M Ala·HCl
- b) 200 mL 0,15 M izoelektrične Glu?

**13.** Pod pretpostavkom da  $\alpha$ -amino grupa enzima treba da učestvuje u jonskoj interakciji da bi enzim bio aktivan, i da  $\alpha$ -amino grupa enzima ima pKa vrednost 8,4, izračunajte koji procenat enzima će biti aktivan na pH 7,8.

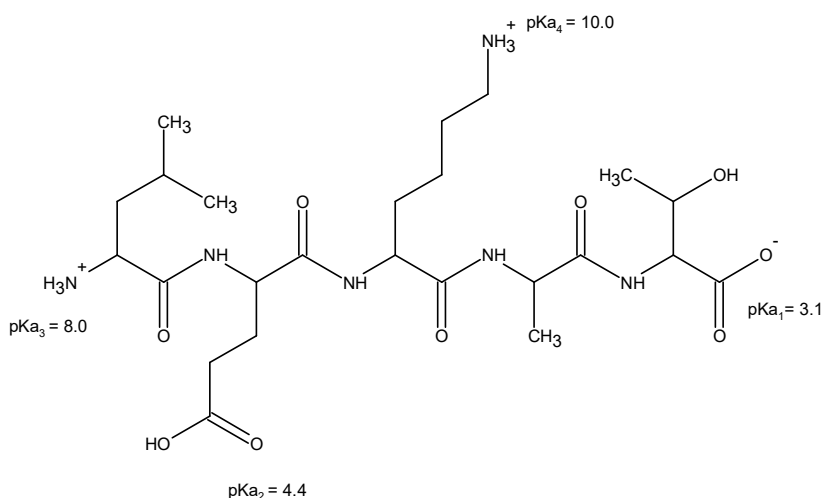
14. Pod pretpostavkom da aktivnost enzima zavisi od sposobnosti bočnog lanca Lys da prima protone, tj. da se ponaša kao proton-akceptor i da je pKa te grupe 8.3.
- Nacrtati bočni lanac Lys u obliku koji je potreban da bi imao svojstva proton-akceptora.
  - Na pH 8, koji procenat enzima će imati bočni lanac Lys u tom obliku?
  - Imajući u vidu stvarnu pKa vrednost ostatka Lys u ovom enzimu, da li će ovaj ostatak u terciarnoj strukturi biti na površini ili u unutrašnjosti enzima?
15. Enzim papain ima ostatak Cys u svom aktivnom centru, koji mora biti naelektrisan da bi enzim bio aktivan. pKa ovog Cys ostatka je 3,3.
- Izračunati koji procenat enzima će biti aktivan na pH 4,0
  - Stvarna pKa vrednost ostatka Cys u papainu se razlikuje od aproksimativne, zbog toga što on učestvuje u stvaranju jonske veze sa susednim ostatkom His. Da li će očekivana pKa vrednost His ostatka biti manja ili veća od njegove aproksimativne pKa?
  - Kada bi se Cys ostatak modifikovao, npr. građenjem S-metil disulfidnog derivata Cys pomoću metil-metantiolsulfonata, enzim bi se deaktivirao, ali kako bi to uticalo na pKa vrednost bočnog ostatka His, u odnosu na pKa vrednost bočnog ostatka His u nepromenjenom papainu?

16. Ostatak His koji se ponaša kao proton akceptor je važan za funkciju određenog enzima. pKa vrednost His ostatka je 6,7. Na pH 7, koliki procenat od ukupnog sadržaja proteina je u obliku u kome His ima ulogu proton akceptora?

### Izračunavanje izoelektrične tačke peptida

Izoelektrična tačka peptida je pH na kome je ukupno naelektrisanje peptida (zbir naelektrisanja svih pozitivnih i negativnih grupa u peptidu) jednako 0. Grupe u peptidima koje mogu da disosuju su terminalna amino i terminalna karboksilna grupa i grupe iz bočnih ostataka sedam aminokiselina: bazne grupe iz Lys, His i Arg, karboksilne grupe Asp i Glu, fenolna grupa Tyr i sulfhidrilna grupa Cys. pKa vrednosti ovih grupa kod peptida i proteina mogu znatno da odstupaju od onih u slobodnim aminokiselinama. Na veličinu odstupanja utiče blizina elektrofilnih grupa, kao što su hidroksilna, amidna ili tiolna, koje povećavaju kiselost grupa sa kojima interaguju. Na pKa vrednosti utiče i jonska sila rastvora: što je jonska sila rastvora veća pKa vrednosti su manje. Navedeni faktori ne utiču podjednako na sve ostatke aminokiselina u molekulu proteina, pa se pKa vrednosti ostataka istih aminokiselina u molekulu proteina mogu međusobno razlikovati.

Na slici je data struktura peptida LEKAT.



Da bismo izračunali njegovu pI treba da pratimo šta se dešava sa naelektrisanjem peptida nakon gubitka svakog protona krećući se od kisele ka baznoj sredini.

Ako je pH < 2, ukupno naelektrisanje peptida je +2.

Kada se doda baza prvo se uklanja proton iz terminalne karboksilne grupe i naelektrisanje peptida postaje +1.

Kada se pH poveća iznad pKa<sub>2</sub> drugi proton se uklanja i naelektrisanje peptida je sada 0.

Kada se pH poveća iznad pKa<sub>3</sub> treći proton se uklanja i naelektrisanje molekula postaje -1.

Kada se pH poveća na iznad pKa<sub>4</sub> četvrti proton se uklanja i naelektrisanje molekula je -2.

pI vrednost se izračunava kao polovina zbira dve pKa vrednosti – jedne koja prethodi i jedne koja sledi neutralan oblik polipeptida.

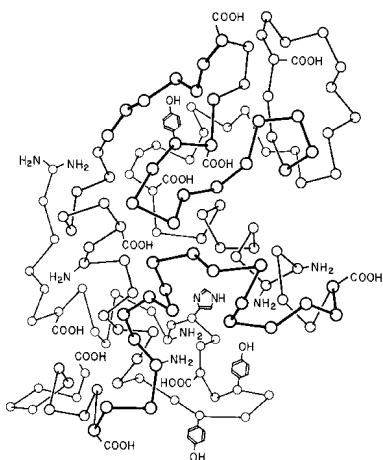
$$pI = (pKa_2 + pKa_3)/2$$

$$pI = (4.4 + 8.0)/2$$

$$pI = 6.2$$



Izračunavanje pI vrednosti proteina je znatno komplikovanije. Ako uzmemo primer kokošijeg lizozima belanceta (HEWL), jonizabilne grupe nalaze se u bočnim ostacima sledećih aminokiselina: His 15, Glu 7, Glu 35, Asp 18, Asp 48, Asp 52, Asp 66, Asp 87, Asp 101, Asp 119, Tyr 20, Tyr 23, Tyr 53, Lys 1, Lys 13, Lys 33, Lys 96, Lys 97, Lys 116. Pored toga jonizabilne su i terminalna karboksilna i terminalna amino grupa. Koliko je pI ovog proteina?



Ukupna šarža u kiseloj sredini biće +8 (1 His+, 6 Lys+, 1 terminalna -NH<sub>3</sub><sup>+</sup>). Pošto molekul lizozima ima 10 COOH grupa, 8 od njih treba da otpusti proton kako bi naelektrisanje proteina bilo 0.

pI kod ovako kompleksnog molekula ne može da se izračuna na način pokazan za peptide.

Aproksimativno pI se može izračunati pomoću Henderson-Hasselbach-ove jednačine uzimajući da je pKa(COOH) = 4 (aproksimativna vrednost za COOH grupe u bočnom nizu). Na taj način dobijamo:

$$\text{pI} = 4 + \log(8/2) = 4,6$$

8 = broj COO<sup>-</sup> grupa  
2 = broj preostalih COOH grupa

Dobijena vrednost se dobro slaže sa eksperimentalno određenom vrednošću za pI lizozima koja iznosi 4,8.

### Zadaci:

1. Dat je peptid čija sekvenca je **A K L Y E N F M**.
  - a) Predstaviti strukturnom formulom ovaj peptid.

- b) Koje će biti ukupno naelektrisanje peptida na pH 5, a koje na pH 1? Koristiti aproksimativne pKa vrednosti. Rešiti zadatak popunjavanjem tabele.

jonizabilne grupe	aproksimativne pKa vrednost	naelektrisanje na pH 5	naelektrisanje na pH 1
$\alpha$ -karboksil			
R-karboksil (E)			
$\alpha$ -amino			
aromatično OH (Y)			
$\epsilon$ -amino (K)			
ukupno naelektrisanje peptida			

- c) Izračunati izoelektričnu tačku (pI) ovog peptida, koristeći aproksimativne pKa vrednosti.

2. Dat je peptid čija sekvenca je **Val-His-Leu-Arg-Tyr-Trp**

- a) Izračunati pI ovog peptida. Koristiti aproksimativne pKa vrednosti.

b) Koristeći aproksimativne pKa vrednosti izračunati naelektrisanje peptida na pH 7.2.

3. Dat je peptid čija sekvenca je **Trp-Lys-Leu-His-Asn-Arg-Phe**.

a) Koje će biti ukupno naelektrisanje peptida na pH 9? Koristiti aproksimativne pKa vrednosti.

b) Izračunati pI ovog peptida koristeći aproksimativne pKa vrednosti.

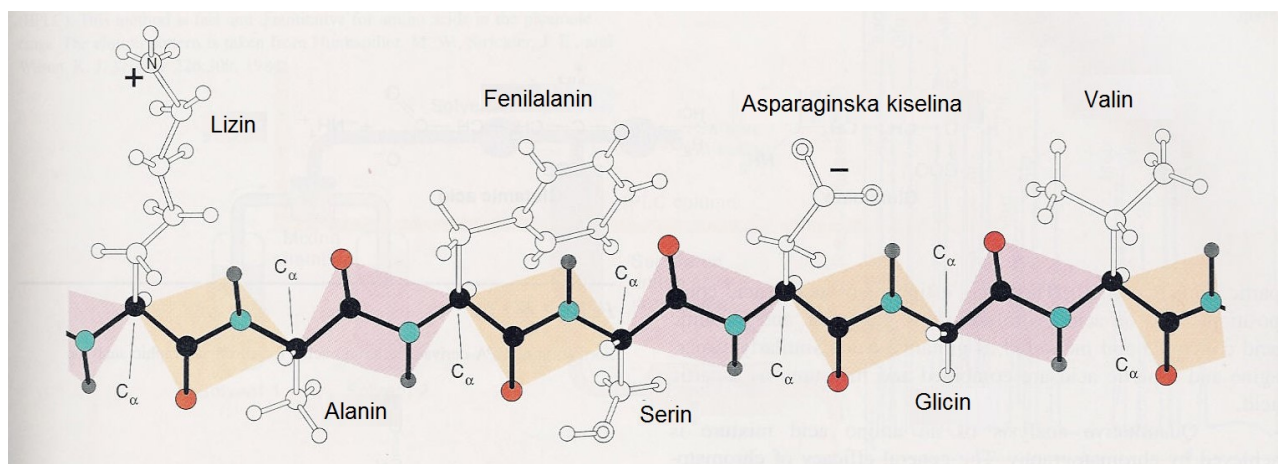
4. Dat je peptid čija sekvenca je **Ala-Glu-Asn-Arg-Leu**

a) Koje je najveće (pozitivno) i najmanje (negativno) ukupno naelektrisanje koje ovaj peptid može da ima u opsegu pH od 0-14?

b) Koje će biti ukupno naelektrisanje peptida na pH 9? Koristiti aproksimativne pKa vrednosti.

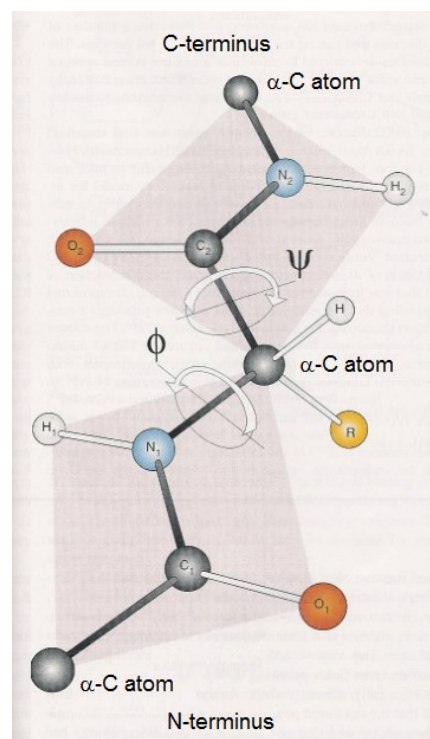
## Vežba 2. Primarna struktura proteina i određivanje aminokiselinske sekvence

Primarnu strukturu proteina čini linearna sekvenca (redosled) aminokiselina u polipeptidnom lancu. Svaki protein ima jedinstvenu aminokiselinsku sekvencu. Aminokiseline su međusobno povezane peptidnim vezama nastalim reakcijama između  $\alpha$ -COOH i  $\alpha$ -NH<sub>2</sub> grupa susednih aminokiselina u polipeptidnom lancu (Slika 3).



Slika 3. Raspored ravni peptidnih grupa u potpuno opruženom polipeptidnom lancu

Peptidna veza ima parcijalni karakter dvostruke veze zbog delokalizacije  $\pi$  elektrona između O, C i N atoma, zbog čega ima planarnu geometriju. O, C, N i H atomi peptidne veze smešteni su u jednoj ravni, a samim tim su sa njima koplanarni i susedni  $\alpha$ -C atomi sa obe strane peptidne veze. Svaki  $\alpha$ -C atom predstavlja mesto na kome se dve susedne ravni peptidnih veza dodiruju. Zbog planarnosti peptidne veze dopuštena je samo rotacija oko veza:  $\alpha$ -C i amidnog N ( $\phi$  ugao) i  $\alpha$ -C i C-atoma karbonilne grupe ( $\psi$  ugao). Rotacijom oko ovih veza nastaju različite konformacije polipeptidnog lanca.  $\phi$  i  $\psi$  uglovi zovu se torzioni uglovi (Slika 4). Pozitivne vrednosti  $\psi$  i  $\phi$  uglova odgovaraju rotaciji u smeru kazaljke na satu (gledajući sa  $\alpha$ -C u pravcu  $\alpha$ -C-C i  $\alpha$ -C-N), a negativne vrednosti rotaciji u smeru suprotnom od kretanja kazaljke na satu, sa krajnjim dometom od 180°, pa je opseg jednog ugla rotacije od -180° do +180°. Zbog steričnih smetnji između bočnih ostataka aminokiselina i atoma glavnog lanca ili između samih atoma glavnog lanca, broj mogućih konformacija koje nastaju rotacijama polipeptidne kičme je ograničen.

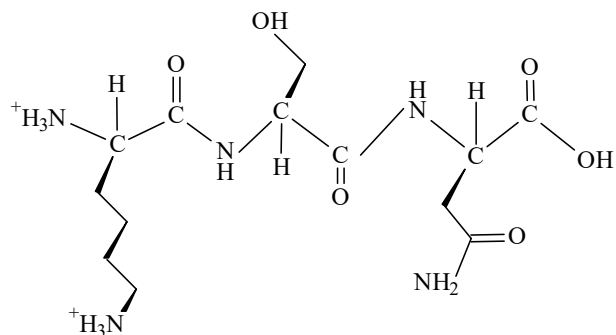


Slika 4. Torzioni uglovi u peptidima

**Zadaci:**

1. Napisati reakciju formiranja peptidne veze između Gln i Arg.
  
  
  
  
  
  
  
  
  
  
2. Nacrtati pentapeptid Ala-Ser-Glu-Met-Arg na pH 7.
  - a) označiti N- i C-terminuse
  - b) označiti  $\psi$  i  $\phi$  uglove
  - c) sastaviti ovaj peptid koristeći set za molekularno modelovanje
  - d) posmatrati mogućnosti rotacije oko peptidnih veza
  - e) koje su vrednosti  $\psi$  i  $\phi$  uglova kada je polipeptidni lanac potpuno opružen?

3. Dat je prikaz sekvence peptida koji sadrži tri aminokiseline.



a) Troslovnim i jednoslovnim oznakama ispiši sekvencu peptida.

b) Označiti koplanarne atome.

c) Rotacijom oko kojih veza se menjaju  $\varphi$  i  $\psi$  uglovi (označiti strelicom)?

d) Označiti mesta na kojima je moguće stvaranje vodonične veze.

### Metode sekvenciranja proteina

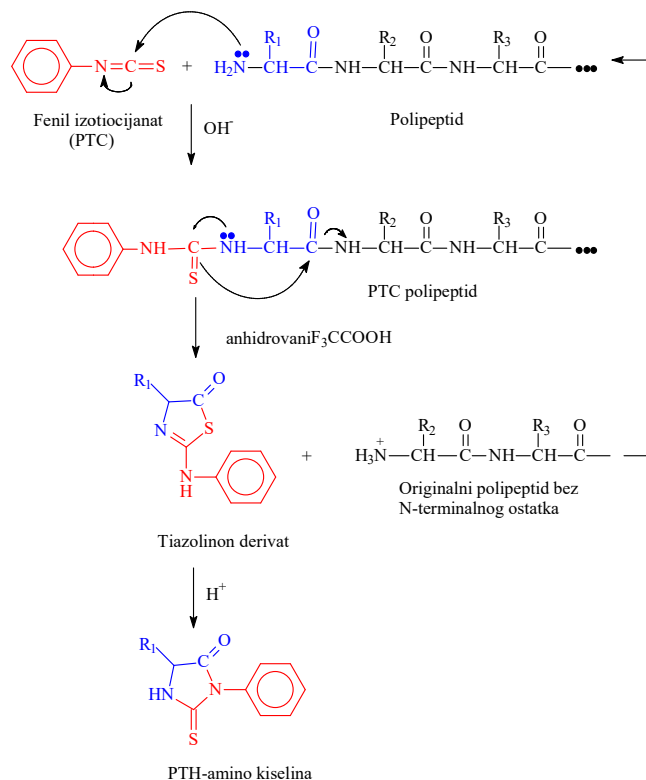
Klasično sekvenciranje proteina zasniva se na Edmanovoj metodi, u kojoj se u reakciji sa Edmanovim reagensom (fenilizotiocijanatom) odvaja i identifikuje jedna po jedna aminokiselina sa N-terminusa. Pre nego što se pristupi sekvenciranju, potrebno je da protein bude izolovan iz biološkog materijala i prečišćen (metode izolacije i prečišćavanja obrađene su u predmetu Eksperimentalna biohemija). Sekvenciranje proteina sastoji se od više faza. Polipeptidni lanci ukoliko ih ima više moraju se razdvojiti (Faza I), disulfidni mostovi raskinuti i slobodne SH grupe zaštititi (Faza II). Nakon toga, određuje se aminokiselinski sastav svakog polipeptidnog lanca (Faza III), a zatim aminokiseline na N- i C-terminalnom kraju polipeptida (Faza IV). Edmanovom tehnikom se precizno mogu sekvencirati samo peptidi kraći od 80 aminokiselinskih ostataka. Zbog toga se proteinski lanac raskida na manje fragmente koji se izoluju (Faza V) i sekvenciraju (Faza VI). Za fragmentaciju polipeptidnog lanca proteina koriste se enzimi proteaze ili reagensi specifični za hidrolizu pojedinih peptidnih veza u proteinu (Tabela 4). Neophodno je protein fragmentisati sa nekoliko različitih reagenasa za fragmentaciju, sekvencirati fragmente, a zatim na osnovu poznatih sekvenci fragmenata i preklapajućih sekvenci rekonstruisati sekvencu proteina (Faza VII). Nakon sekvenciranja određuje se položaj disulfidnih mostova različitim metodama (Faza VIII).

**Tabela 4.** Reagensi za fragmentaciju polipeptidnog lanca pre sekvenciranja

		Mesto cepanja polipeptidnog lanca
hemijski reagensi	bromcijan	karboksilni kraj Met
	<i>o</i> -jodozobenzoat	karboksilni kraj Trp
	hidroksilamin	Asp-Gly veza
	2-nitro-5-tiocijanobenzoat	karboksilni kraj Cys
enzimi	tripsin	karboksilni krajevi Arg i Lys
	himotripsin	karboksilni kraj AK sa voluminoznim hidrofobnim R (Tyr, Trp, Phe, sporija reakcija sa Leu, Met, His, Asn)
	thrombin	karboksilni krajevi Arg i Lys
	proteaze stafilokoka	karboksilni krajevi Asp i Glu
	pepsin	amino grupa Phe, Tyr, Trp i Leu

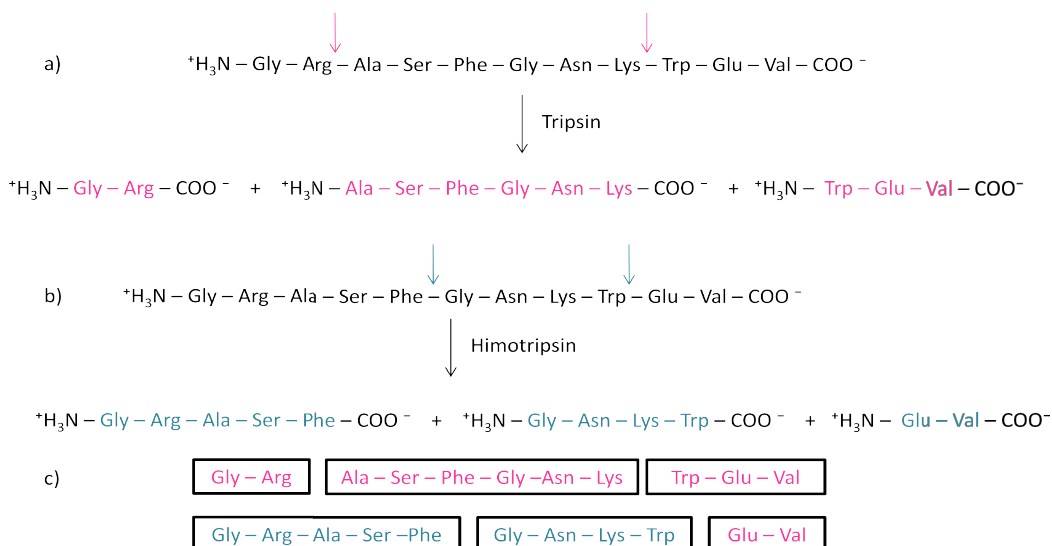
Faza VI – sekvenciranje peptidnih fragmenata – obuhvata reakciju sa Edmanovim reagensom (Slika 5) u kojoj nastaje feniltiokarbamoil derivat (PTC-peptid). PTC-peptid se tretira anhidrovanom kiselinom, pri čemu se raskida peptidna veza N-terminalnog aminokiselinskog ostatka i oslobađa se tiazolinonski derivat te aminokiseline. Ovaj derivat se ekstrahuje organskim rastvaračem i tretira kiselinom, što ga prevodi u stabilan feniltiohidantoinijski derivat (PTH-aminokiselinu), koji se identifikuje hromatografski, najčešće pomoću HPLC tehnike.





**Slika 5.** Odvajanje N-terminalne aminokiseline u reakciji sa Edmanovim reagensom; PTH-aminokiselina – feniltiohidantoinski derivat aminokiseline

Primer fragmentacije i sekvenciranja oligopeptida dat je na Slici 6.

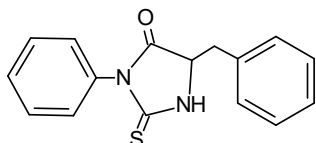


**Slika 6.** Fragmentacija, sekvenciranje fragmenata i rekonstrukcija sekvence oligopeptida. a) Rasliđanje peptidnih veza tripsinom. b) raskidanje peptidnih veza himotripsinom. c) rekonstrukcija sekvence peptida prklapanjem sekvenci fragmenata

**Zadaci:**

1. Aminokiselinska analiza peptida koji je sastavljen od sedam aminokiselinskih ostataka daje: D, L, K, 2 M, F i Y. Odrediti sekvencu peptida iz sledeća četiri eksperimenta:

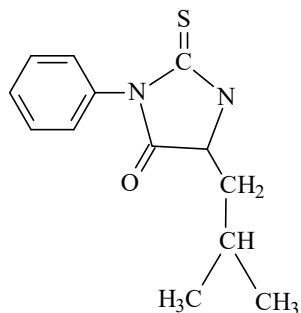
- a) Tretman tripsinom ne deluje na peptid  
b) Nakon tretmana Edmanovim reagensom dobijen je sledeći proizvod:



- c) Tretman sa himotripsinom daje dipeptid, tetrapeptid i slobodan fenilalanin. Aminokiselinski sastav tetrapeptida je bio L, K, i M.  
d) Tretman sa CNBr je dao dipeptid, tetrapeptid i slobodan K

2. Enkefalini su endogeni peptidni ligandi opioidnih receptora. Odrediti sekvencu jedne od dve forme enkefalina – leucin enkefalina (Leu-Enk), ako je poznato da se:
- potpunom hidrolizom sa 6 M HCl na 110 °C dobijaju Gly, Leu, Phe i Tyr u odnosu 2:1:1:1
  - tretiranjem sa 1-fluoro-2,4-dinitrobenzenom, koju prati kompletna hidroliza, nastaje 2,4-dinitrofenil derivata tirozina
  - inkubacijom peptida sa himotripsinom nastaju Tyr i Leu, kao i tripeptid koji sadrži Phe i Gly u odnosu 1:2

3. Nepoznati peptid je hidrolizovan zagrevanjem sa koncentrovanom HCl pri čemu su dobijene sledeće aminokiseline: Arg, Gly, Leu, Lys, Met, Phe, Ser, Thr, Trp, Tyr. Odrediti sekvencu peptida ako:
- Tretiranjem sa Edmanovim reagensom u prvom ciklusu nastaje sledeće jedinjenje:



- b) Reakcija peptida sa tripsinom proizvodi peptide koji nakon kisele hidrolize daju:  
Peptid 1: Gly, Met, Ser, Trp  
Peptid 2: Lys, Phe, Thr, Tyr  
Peptid 3: Arg, Leu, Met
- c) Reakcija peptida sa himotripsinom proizvodi peptide sa sledećim aminokiselinama  
Peptid 1: Thr, Tyr  
Peptid 2: Lys, Met, Trp  
Peptid 3: Gly, Ser  
Peptid 4 : Arg, Met, Leu, Phe
- d) Reakcija peptida sa cijanobromidom daje peptide sa sledećim aminokiselinama:  
Peptid 1: Arg, Lys, Met, Phe, Thr, Tyr  
Peptid 2: Gly, Ser, Trp  
Peptid 3: Leu, Met
- e) Reakcijom sa karboksipeptidazom dobijen je Gly.  
Sekvencu peptida napisati jednoslovnim oznakama, a zatim nacrtati strukturu peptida.

4. U cilju sekvenciranja nepoznatog proteina, prečišćeni uzorak je tretiran:
1. tripsinom, pri čemu su dobijena 4 peptida i vrlo kratki fragment koji nije bilo moguće izolovati:  
Met-Phe-Ala-Ala-Val  
Val-Leu-Ser-Ala-Asp-Asp-Lys  
Gly-Gly-Gly-Glu-Tyr-Gly-Leu-Gln-Arg  
Asn-Met-Cys-Trp-Gly-Lys
  2. BrCN-om, što je dalo tri peptida:  
Val-Leu-Ser-Ala-Asp-Asp-Lys-Ile-Lys-Asn-Met  
Cys-Trp-Gly-Lys-Gly-Gly-Gly-Glu-Tyr-Gly-Leu-Gln-Arg-Met  
Phe-Ala-Ala-Val
- a) Predložiti sekvencu proteina.
  - b) Dati formulu kratkog peptida iz proizvoda digestije tripsinom, koji nije bio izolovan.
  - c) Koji od proizvoda digestije sa BrCN-om ne apsorbuje UV-zračenje na  $\lambda=280$  nm?

5. Polipeptid je podvrgnut degradaciji i dobijeni su peptidi sledeće sekvence:

1. Tretman sa cijanobromidom je dao sledeće fragmente:

Asp-Ile-Lys-Gln-Met

Lys

Lys-Phe-Ala-Met

Tyr-Arg-Gly-Met

2. Hidroliza tripsinom je dala sledeće fragmente:

Gln-Met-Lys

Gly-Met-Asp-Ile-Lys

Phe-Ala-Met-Lys

Tyr-Arg

Koja je aminokiselinska sekvenca celokupnog peptida?

6. Polipeptid je podvrgnut sledećim degradativnim reakcijama, pri čemu nastaju odgovarajući polipeptidni fragmenti:

a) Tretman sa cijanobromidom:

M

A-G-K-Y-M

R-W-Y-L-S-K-P-R-N

b) Hidroliza tripsinom:

Met-Ala-Gly-Lys

Tyr-Met-Arg

Trp-Tyr-Leu-Ser-Lys-Pro-Arg

Asn

c) Hidroliza himotripsinom:

M-A-G-K-Y

M-R-W

Y

L-S-K-P-R-N

Odrediti aminokiselinsku sekvencu celokupnog polipeptida.

7. Odrediti primarnu sekvencu heptapeptida na osnovu sledećih podataka:

a) Reakcijom peptida sa odgovarajućim reagensom ili enzimom nastaju tri peptida sledećih sekvenci:

Tyr-Lys

Glu-Ser

Ala-Phe-Arg

Koji reagens ili enzim je korišćen?

b) Reakcijom peptida sa odgovarajućim reagensom ili enzimom nastaju takođe tri peptida sledećih sekvenci:

Lys-Glu-Ser

Ala-Phe

Arg-Tyr

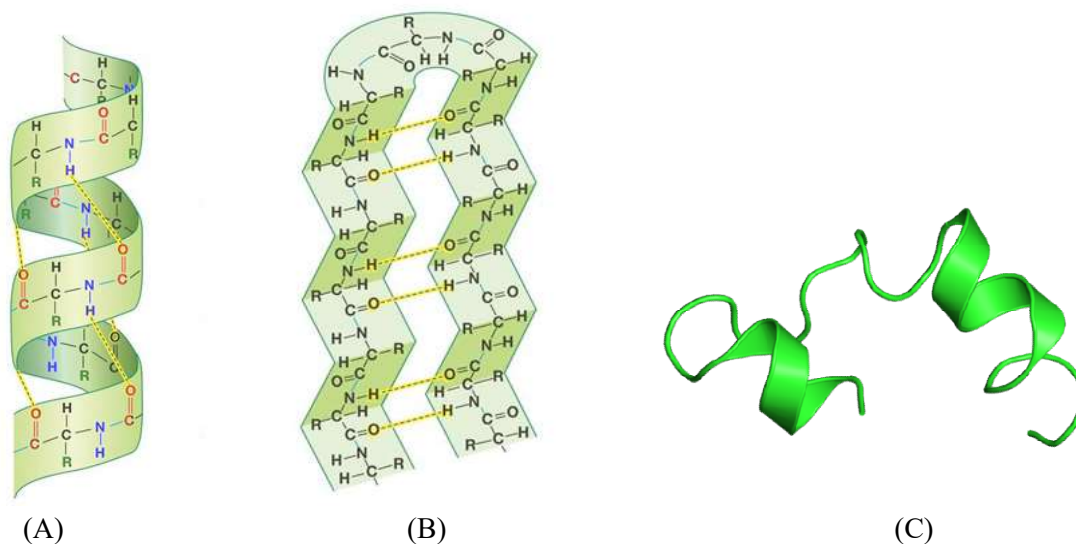
Koji reagens ili enzim je korišćen u ovom eksperimentu?

Objasniti odgovore.



### Vežba 3. Sekundarna struktura proteina

Sekundarna struktura proteina predstavlja prostorni raspored polipeptidne kičme, ne uzimajući u obzir konformacije bočnih ostataka aminokiselina. Između polarnih grupa peptidnih veza (karbonilnih kiseonika i amidnih vodonika) obrazuje se maksimalan broj H-veza, što dovodi do povezivanja peptidnih grupa i formiranja pravilne sekundarne strukture (Slika 7). Postoje tri osnovna tipa sekundarnih struktura: heliks ( $\alpha$ ,  $310$ ,  $\pi$ ),  $\beta$ -nabrana struktura i  $\beta$ -savijena struktura ( $\beta$ -zaokret). Sekundarne strukture su stabilne i slabo pokretne u prostoru. Elementi sekundarne strukture su u proteinu najčešće povezani petljama koje karakteriše znatno manja uređenost i veća pokretljivost.

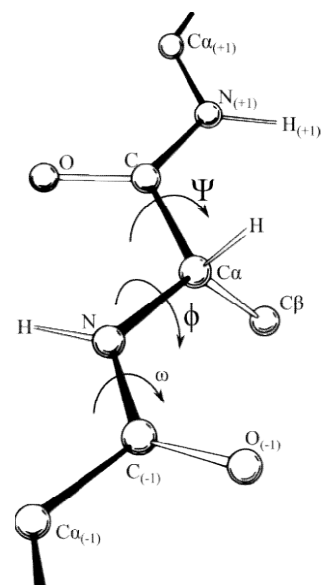


**Slika 7.** Elementi sekundarne strukture: (A) desni  $\alpha$ -heliks, (B) antiparalelna  $\beta$ -nabrana struktura i  $\beta$ -zaokret i (C) dva heliksa povezana petljom

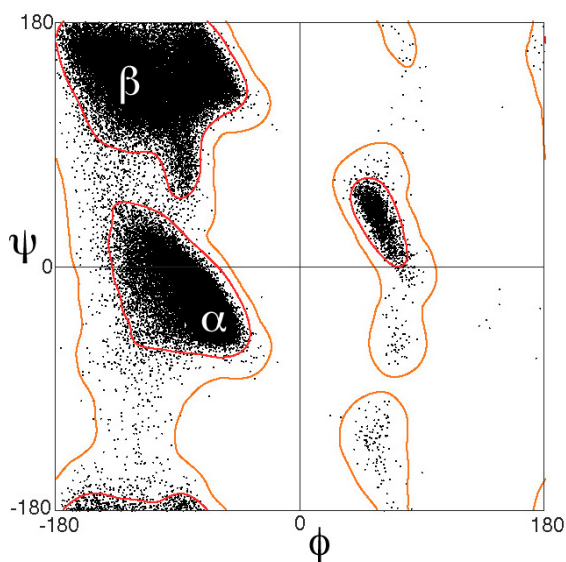
Svaki tip sekundarne strukture ima svoje karakteristične  $\phi$  i  $\psi$  uglove koji određuju prostorni raspored polipeptidne kičme u datoj strukturi.

Ramachandran i saradnici su 1963. godine napravili proračun kojim se izračunavaju sterne smetnje u peptidu u zavisnosti od torzionih uglova. Oni su grafički predstavili raspodelu dozvoljenih kombinacija  $\phi$  i  $\psi$  uglova u proteinima koje ne dovode do sternih smetnji (Ramačandranov dijagram). 95% eksperimentalno određenih  $\phi$  i  $\psi$  uglova u do sada poznatim proteinima nalaze se u dozvoljenim zonama Ramachandranovog dijagrama (Slika 4). Svaka tačka na dijagramu prikazuje kombinaciju  $\phi$  i  $\psi$  uglova za jedan aminokiselinski ostatak u proteinu.

Moguće je konstruisati Ramačandranov dijagram za određeni protein, na kome će biti predstavljene kombinacije  $\phi$  i  $\psi$  uglova svih aminokiselinskih ostataka u tom proteinu. Takođe je na jednom Ramačandranovom dijagramu moguće prikazati sve kombinacije  $\phi$  i  $\psi$  uglova koje jedna određena aminokiselina može da zauzima u različitim proteinima.



Na Ramačandranovom dijagramu uočavaju se oblasti sa kombinacijama  $\phi$  i  $\psi$  uglova karakterističnim za pojedine tipove sekundarnih struktura (Slika 4).



**Slika 8.** Ramačandranov dijagram sa 100.000 tačaka za aminokiselinske ostatke iz do sada određenih kristalnih struktura proteina. Oblasti sa tačkama koje se odnose na aminokiselinske ostatke iz  $\alpha$ -heliksa označene su sa  $\alpha$ , a one sa tačkama iz  $\beta$ -nabranih struktura oznakom  $\beta$ . Gly i Pro ostatak su isključeni iz dijagrama zbog specifičnih konformacija koje mogu da zauzimaju u polipeptidnom lancu, pa se njihovi Ramačandranovi dijagrami znatno razlikuju od dijagrama ostalih aminokiselina.

Svaka aminokiselina ima različite preferencije za građenje određenog tipa sekundarne strukture (Tabela 5). Iz aminokiselinske sekvence proteina je često moguće predvideti elemente sekundarne strukture koje taj protein sadrži.

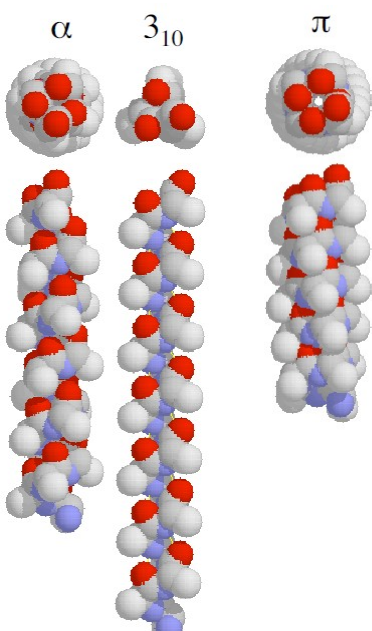
**Tabela 5.** Normalizovane konformacione preferencije aminokiselina za građenje određenog tipa sekundarne strukture (Petsko i Ringe, 2004, Protein structure and Function, New Science Press Ltd.)

Amino kiselina	$\alpha$ -heliks	$\beta$ -nabrana struktura	zaokret
Glu	<b>1.59</b>	0.52	1.01
Ala	<b>1.41</b>	0.72	0.82
Leu	<b>1.34</b>	1.22	0.57
Met	<b>1.3</b>	1.14	0.52
Gln	<b>1.27</b>	0.98	0.84
Lys	<b>1.23</b>	0.69	1.07
Arg	<b>1.21</b>	0.84	0.9
His	<b>1.05</b>	0.8	0.81
Val	0.9	<b>1.87</b>	0.41
Ile	1.09	<b>1.67</b>	0.47
Tyr	0.74	<b>1.45</b>	0.76
Cys	0.66	<b>1.4</b>	0.54
Trp	1.02	<b>1.35</b>	0.65
Phe	1.16	<b>1.33</b>	0.59
Thr	0.76	<b>1.17</b>	0.9
Gly	0.43	0.58	<b>1.77</b>
Asn	0.76	0.48	<b>1.34</b>
Pro	0.34	0.31	<b>1.32</b>
Ser	0.57	0.96	<b>1.22</b>
Asp	0.99	0.39	<b>1.24</b>

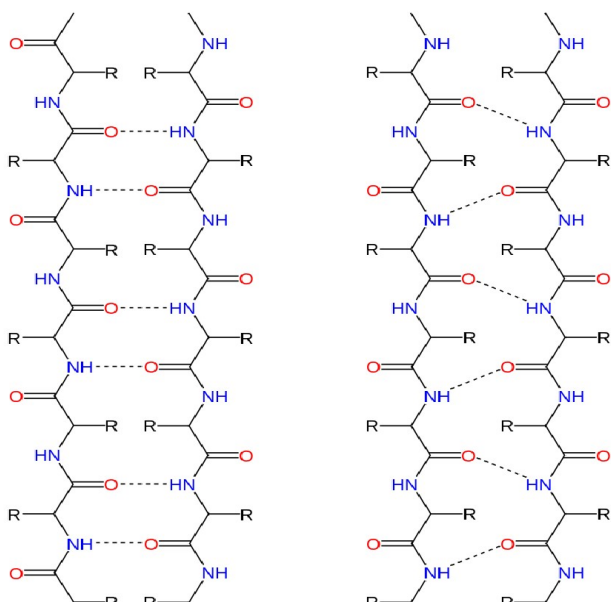
### Zadaci

1. Navesti osnovne karakteristike desnog  $\alpha$ -heliksa (način uvijanja, položaj vodoničnih veza, bočnih ostataka, broj aminokiselina u navoju)

2. Po čemu se razlikuju  $3_{10}$  i  $\pi$ -heliksi od  $\alpha$ -heliksa?

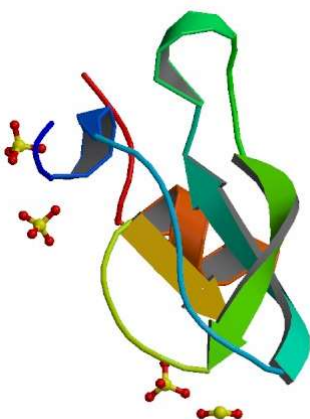


3. Na slici označiti tipove  $\beta$ -nabrane strukture (paralelna i antiparalelna), navesti razlike između ova dva tipa i objasniti zašto je antiparalelna  $\beta$ -nabrana struktura stabilnija od paralelne. Koja je razlika u prirodi i rasporedu bočnih ostataka aminokiselina u paralelnoj i antiparalelnoj  $\beta$ -nabranoj strukturi i shodno tome, koji je najčešći položaj ovih struktura u proteinu?



4. Koju ulogu imaju  $\beta$ -zaokreti u proteinu? Navesti osnovne karakteristike  $\beta$ -zaokreta.
5. Koje aminokiseline najčešće ulaze u sastav petlji i shodno tome kakav položaj petlje imaju u proteinu? Navesti osnovne uloge petlji u proteinima.
6. Asparaginska i glutaminska kiselina se često mogu naći na N-terminusu  $\alpha$ -heliksa. Zbog čega njihovo prisustvo na tom mestu stabilizuje heliks?
7. Prolin se ne nalazi često u  $\alpha$ -heliksu zbog toga što može da doprinese stvaranju zavoja koji mogu izazvati sterični napon. Isto tako, prolin se vrlo retko može naći na C-terminusu, a vrlo često na N-terminusu  $\alpha$ -heliksa. Imajući u vidu jedinstvenu strukturu prolina i interakcije u heliksu, zbog čega će se on češće moći naći na N- nego na C-terminusu?

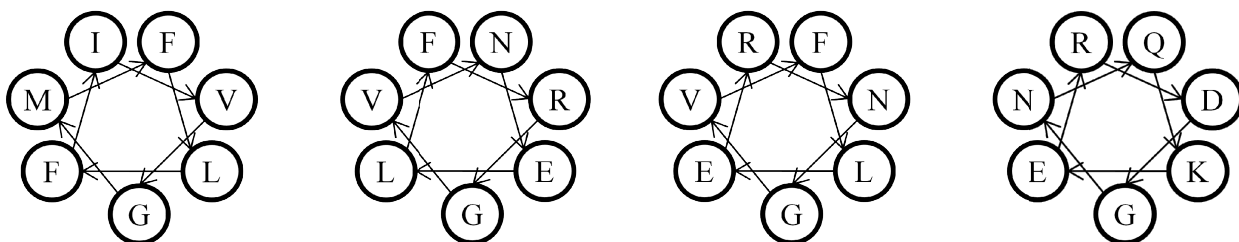
8. Na modelu goveđeg pankreasnog inhibitora tripsina uoči i označi sekundarne strukture.



9. U navedenoj proteinskoj sekvenci predvidi elemente sekundarne strukture na osnovu podataka iz Tabele 4.

MTKNESYSGIDYFRFIAALLIVAIHTSPLFSFSETGNFIFTRIVAPVAVPFFFMTSGFFLISRYTC

10. Na slici su prikazana četiri topološka dijagrama  $\alpha$ -heliksa. Koji od njih je amfipatičan? Objasniti.



11. Homopolimer lizina (polilizin) može, u zavisnosti od pH sredine formirati  $\alpha$ -heliks ili biti neuređen. Predvideti sekundarnu strukturu na različitim pH vrednostima. Obrazložiti.

a) pH 1:

b) pH 7:

c) pH 11:

12. Calmodulin (CaM) je protein koji vezuje kalcijum i reguliše aktivnost mnogih proteina. CaM-Ca<sup>2+</sup> kompleks se vezuje za pozitivno naelektrisane, amfipatične  $\alpha$ -helikse enzima čiju funkciju reguliše. Ciljni peptid jednog od enzima za koje se CaM-Ca<sup>2+</sup> vezuje ima sekvencu QTEKMWQRLQRLKGILRSLVKQ.

Na 307 K, energija vezivanja ( $\Delta G$ ) CaM-Ca<sup>2+</sup> za protein iznosi -37.9 kJ/mol, a entalpija ( $\Delta H$ ) -71.8 kJ/mol.  $R = 8.315 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ .

A. Izračunati entropiju stvaranja kompleksa CaM-Ca<sup>2+</sup>-protein.

B. Objasniti da li je ova promena entropije povoljna ili nepovoljna.

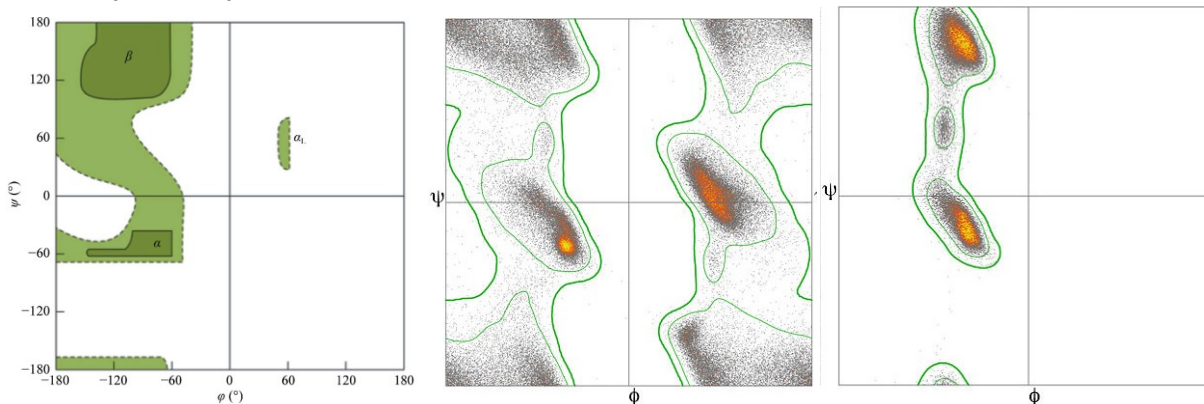
13. Date su vrednosti  $\phi$  i  $\psi$  uglova za aminokiselinske ostatke 24-54 za nepoznati protein.

res. #	amino acid	$\Phi$ (°)	$\Psi$ (°)	res. #	amino acid	$\Phi$ (°)	$\Psi$ (°)
24		-60	147	40		-70	-18
25		-49	-32	41		-89	-36
26	Gly	-67	-34	42		-137	142
27		-58	-49	43		-142	140
28		-60	-42	44		-141	129
29		-57	-46	45		-135	132
30		-62	-44	46		-102	83
31		-61	-48	47	Pro	-60	-33
32		-59	-51	48	Gly	-91	-4
33		-60	-44	49	Ser	-45	122
34		-63	-43	50		-137	138
35		-61	-51	51		-136	142
36	Pro	-55	-8	52		-143	135
37		68	27	53		-138	133
38		79	6	54	xxx?	67	-179
39		-90	109				

Na osnovu Slike 4 i datih vrednosti  $\phi$  i  $\psi$  uglova iz tabele odredi:

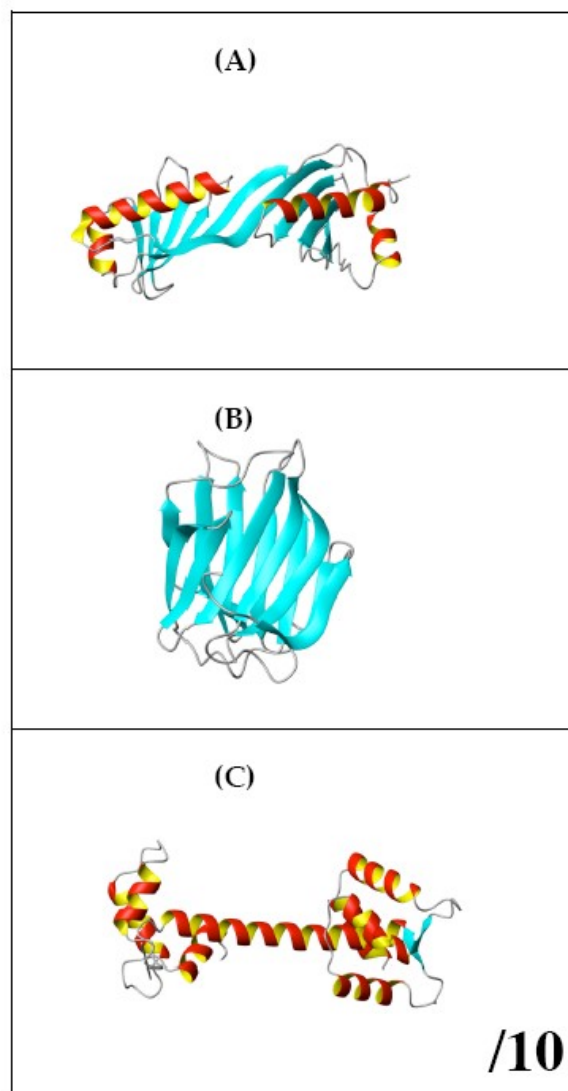
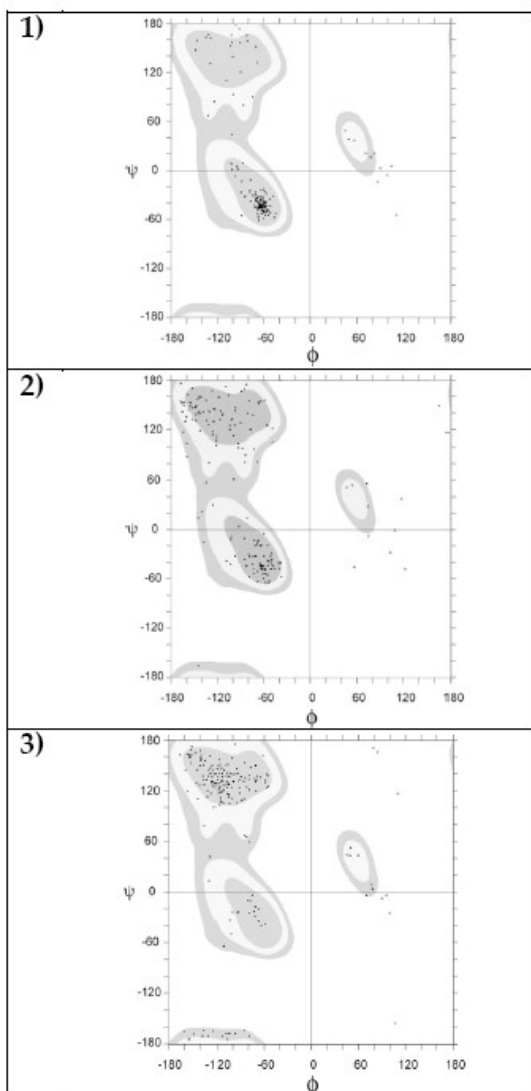
- Koja je verovatna sekundarna struktura ostataka 27-35?
- Koja je verovatna sekundarna struktura ostataka 42-53?
- Koja je verovatna sekundarna struktura ostataka 47-49?

14. Dati su Ramačandranovi dijagrami za ostatke Ala, Gly i Pro. “Dozvoljene“ oblasti su osenčene. Šta se može uočiti sa ovih dijagrama? Zbog čega se ovi dijagrami razlikuju? Šta određuje koja je oblast dozvoljena, a koja ne?





15. Data su tri Ramačandranova dijagrama (1, 2 i 3), od kojih svaki odgovara po jednom proteinu (A, B i C). Svaka tačka u Ramačandranovom dijagramu predstavlja  $\phi$  i  $\psi$  koordinate jednog aminokiselinskog ostatka u datom proteinu.



**a)** Odrediti dominantne sekundarne strukture u svakom proteinu:

Protein A:

Protein B:

Protein C:

**b)** Šta se može pretpostaviti za ostatke koji se nalaze izvan osenčenih oblasti na dijagramima?

**c)** Koji Ramačandranov dijagram odgovara kojem proteinu?

Graf 1:

Graf 2:

Graf 3:

## Vežba 4. Vizuelizacija i kompjuterska manipulacija 3D struktura proteina

Atomske koordinate poznatih struktura proteina čuvaju se u bazama podataka kao što je “Protein Data Bank” (PDB, <https://www.rcsb.org/>). PDB baza trenutno sadrži atomske koordinate za strukture 48708 proteinskih sekvenci (koje su određene metodama difrakcije X-zraka, NMR, elektronske mikroskopije). U PDB bazi, fajlovi sa atomskim koordinatama strukture proteina sačuvani su u pdb formatu. Za otvaranje i rad sa ovim fajlovima koriste se specijalizovani programi za vizuelizaciju i kompjutersku manipulaciju 3D struktura proteina. Jedan od ovih programa, koji se koristi u ovoj vežbi, je Deep view program.

Besplatna instalacija Deep view programa nalazi se na linku <https://spdbv.vital-it.ch/disclaim.html>. Snimiti je na računar i otvoriti program (spdbv fajl). Paralelno otvoriti prazan Word dokument u koji će se unositi i čuvati rezultati dobijeni tokom vežbe (dokument **Rezultati**). Ovaj dokument nakon vežbe odštampati i slike rezultata zalepiti u predviđena polja u ovom praktikumu.

Deep view program ima tri osnovna prozora:

1. **Display or graphics window** - prozor za prikazivanje tj. grafički prozor
2. **Control Panel** – za odabir aminokiselinskih ostataka koje će biti prikazane u Display prozoru, njihovo obeležavanje i bojenje
3. **Tool Bar** – za manipulaciju i merenja unutar 3D modela molekula prikazanog u Display prozoru

Klikom na spdbv fajl otvara se **Tool Bar** prozor. Tek kada otvorimo pdb file nekog proteina možemo otvoriti ostale prozore (u **Wind** meniju odabira se koji DeepView prozori će biti prikazani).

Značenje komandi u Deep view programu biće objašnjeno na primeru proteina lizozima (1hew pdb fajl iz PDB baze). Prateći sledeća uputstva student individualno radi na računaru, zapisuje svoje zaključke i kopira dobijene rezultate u word dokument **Rezultati**.

### 1. **File: Open**

Ova komanda otvara pdb file proteina.

Otvoriti PDB dokument 1HEW (prethodno preuzet iz baze [www.rcsb.org](http://www.rcsb.org) i sačuvan na računaru) – protein lizozim vezan za inhibitor tri-N-acetilhitotriozu.

### 2. **Wind: Alignment (redosled aminokiselina)**

Uzani Align prozor se pojavljuje ispod grafičkog prozora, i pokazuje AK sekvencu odabranog proteina jednoslovnim skraćenicama. Koristi se za poređenje sekvenci dva ili više proteina.

### 3. **Select: All**

Boja rezidua izlistanih u Control Panel-u menja se iz crne u crvenu (u Sequences Alignment prozoru iz bele u sivu). Nova boja označava da su AK trenutno selektovane. Neke DeepView komande izvršavaju se samo na selektovanim AK.

Sada kada su sve AK selektovane, u glavnom meniju kliknuti **Edit: Copy**, a zatim desni klik u dokument **Rezultati** i **Paste**. Pojavljuje se kopirana sekvenca selektovanih AK.

Sekvenca proteina lizozima
----------------------------

#### 4. **Wind: Ramachandran Plot**

Pojavljuje se Ramachandran Plot prozor. Ovaj prozor se koristi za procenu kvaliteta modela, na osnovu broja aminokiselinskih ostataka sa torzionim uglovima izvan dozvoljenih regiona. Moguće je promeniti torzione uglove u modelu. Svaka tačka na dijagramu označava  $\phi$  i  $\psi$  uglove jednog aminokiselinskog ostatka u proteinu. S obzirom da su svi ostaci prethodno selektovani, svi se i nalaze prikazani na dijagramu. Postavljanjem kursora na tačku u levom uglu pojavljuje se oznaka aminokiseline koja odgovara toj tački. Klikuti **Tab** taster nekoliko puta. Šta se dešava na ekranu? Vrednosti  $\phi$  i  $\psi$  uglova mogu da se sačuvaju kao .txt file i da se kasnije koriste (**File: Save: Ramachandran plot values**).

#### 5. **Wind: Layer Info**

Pojavljuje se mala Layer Info tabela, u kojoj se označava koji protein će biti prikazan u Display prozoru, kada imamo otvorene pdb fajlove više proteina u različitim Layer-ima.

Sada zatvoriti prozore Align, Ramachandran Plot, i Layer Infos.

#### 6. **Prefs: Display**

U ovom prozoru je moguće podesiti tačne dimenzije Display prozora kada je potrebna slika za štampanje. Dimenzije je moguće podešavati i jednostavnim povećanjem i smanjenjem prozora korišćenjem strelice u uglu Display prozora. Ono što je prikazano u Display prozoru može se u svakom momentu sačuvati kao slika **File: Save : Image**.

#### 7. **Tool Bar**

Prva ikonica sa leve strane (Zoom/Center) postavlja uvek model proteina u centar Display prozora (<insert> dugme na tastaturi ima isti efekat), sledeća ikona desno omogućava pomeranje modela u svim pravcima u ravni prozora. Treća ikona u redu omogućava zumiranje, četvrta rotaciju modela u svim pravcima. Cursor označava koja ikona je aktivna, <tab> taster na tastaturi menja cikično funkcije iz jedne u drugu. Takođe, levi klik daje rotaciju, desni pomeranje u ravni, a levi + desni zumiranje.

#### 8. **Edit: undo**

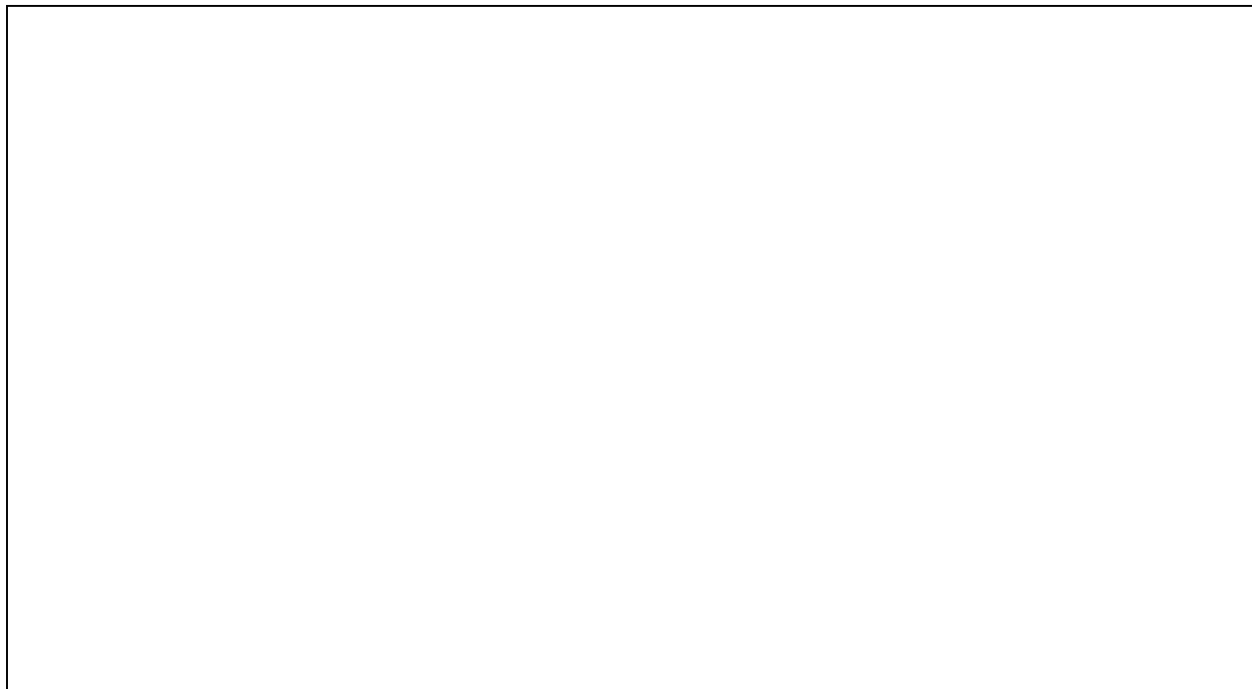
Ova opcija vraća jedan korak u nazad (ne može više koraka).

#### 9. **Control panel**

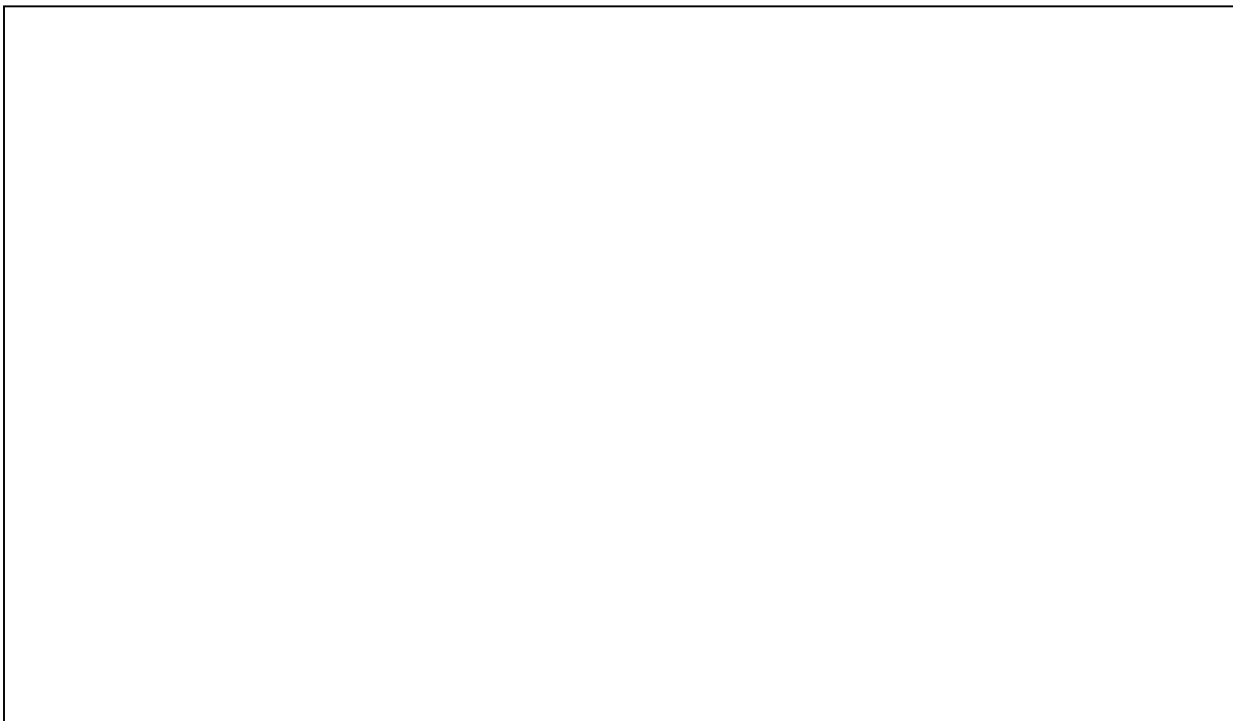
U Control panel-u data je lista svih aminokiselinskih ostataka datog proteina pravilnim redosledom od N ka C kraju. Skrolovanjem se pregleda koliko protein ima rezidua. Tri-NAG inhibitor je na kraju liste dat kao tri NAG ostatka, numerisanih sa 201 do 203.

Levi klik na **Show** – svi aminokiselinski ostaci postaju nevidljivi. Selektovati (click and drag) rezidue od GLY4 do GLY16 i centrirati ih. Selektovati ove ostatke u koloni **Show**. Samo ovaj deo proteina je vidljiv. Na Met12 isprobati šta ostale komande (osim **Ribn** komande) u Control panel-u rade, zatim na celom selektovanom delu (GLY4 do GLY16) isprobati ove komande. Levi klik na naslov kolone izvršava datu komandu na svim obeleženim aminokiselinskim ostacima, levi klik u polje pored nekog ostatka izvršava datu komandu samo na tom ostatku. Ponovni levi klik poništava komandu.

Desni klik na GLY4, u kolonu **Label**, levi klik kod ovog ostatka, i onda **Zoom** (treća ikona u **Tool bar**-u). Na ovaj način zumiramo reziduu koja je obeležena (njen karbonilni C se javlja u centru Display prozora). Kopirati sliku u dokument Rezultati, a kasnije zalepiti sliku u polje ispod.



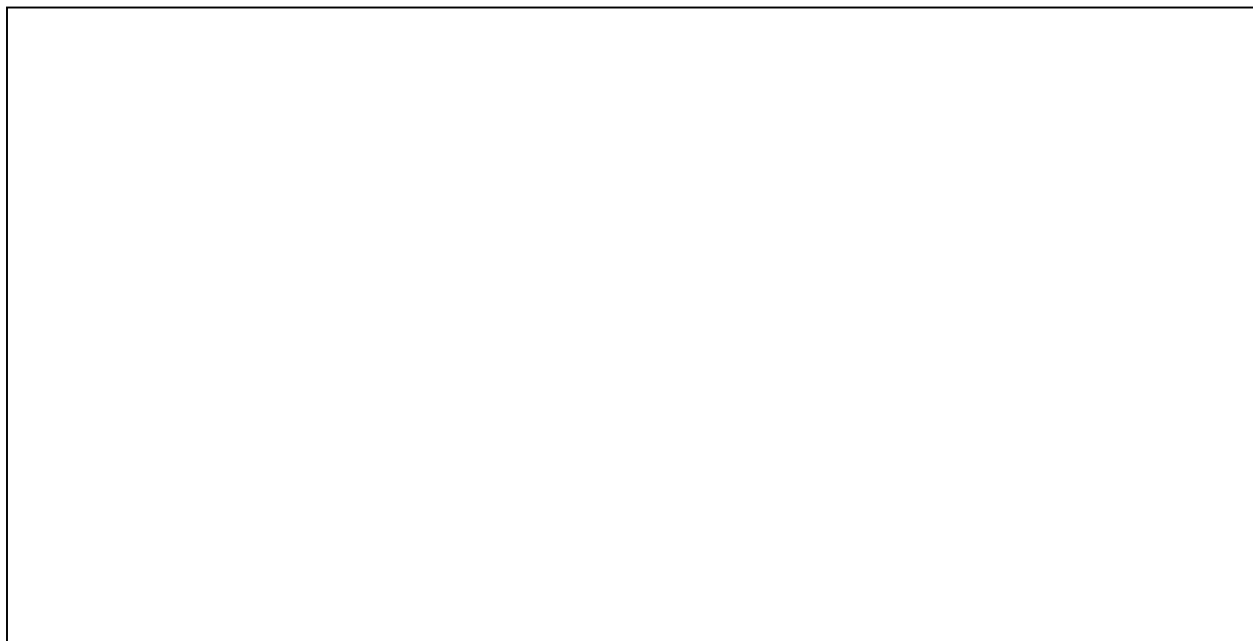
10. Ponovni klik na 1. ikonicu s leva u **Tool bar**-u (ponovo je centriran ceo fragment). Neka bude prikazana samo polipeptidna kičma, ukloniti bočne lance aminokiselina (klik (-) iznad kolone **Side** – nestaju bočni lanci obeleženog fragmenta). Rotirati sliku na Display-u. Koja sekundarna struktura je prikazana?  
Klik (+) iznad kolone **Ribn** – pojavljuje se traka polipeptidne kičme u obliku heliksa. Kopirati sliku u dokument Rezultati, a kasnije zalepiti sliku u polje ispod.



11. Ako se žele izbrisati sve oznake u koloni – drži se **Shift** i levi klik unutar kolone – brišu se sve oznake. Izbrisati oznake u svim kolonama.

Moguće je selektovati fragment i na sledeći način: shift + klik na prvi i na poslednji aminokiselinski ostatak u fragmentu.

Moguće je selektovati i fragmente koji nisu susedni u sekvenci. Selektovati rezidue od GLY4 do GLY16, a zatim **Ctrl + Shift** + klik na TYR20 i LEU25. Klik na kolonu **Show**, a zatim **Zoom/Center**. Zarotirati sliku da se vide dva odvojena fragmenta, maksimalno zumirati i kopirati je u dokument Rezultati, a kasnije zalepiti sliku u polje ispod.



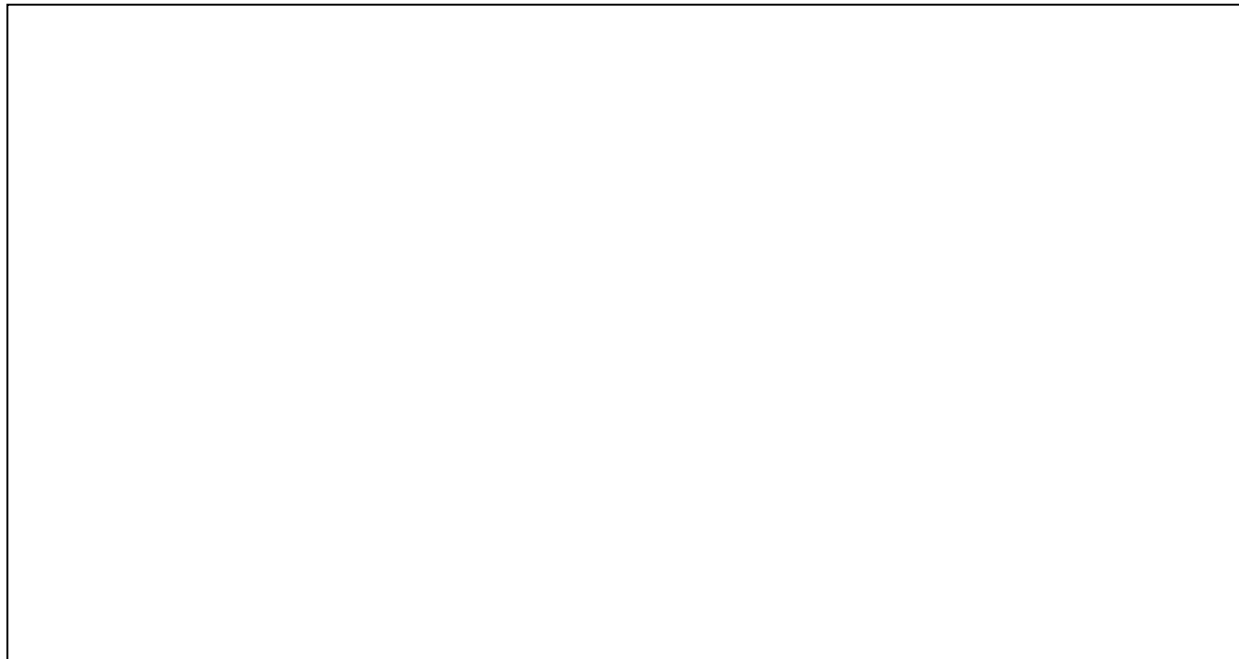
12. U koloni levo od imena rezidue nalaze se mala slova **h** i **s**; **h** označava one rezidue koje su u heliksu, a **s** one u  $\beta$ -lancu. Levim klikom na slovo **h** (npr. pored Asn 27) selektuje se ceo heliks. Selektovati još jedan heliks: **Ctrl + h** pored Ala90. Kliknuti na kolonu **Show** i **Zoom/Center**.

13. **Tools: Compute H Bonds** - DeepView nalazi sve potencijalne vodonične veze i obeležava ih zelenom isprekidanom linijom.

Desni klik unutar kolone **Show**. Pojavljuje se ceo molekul.

14. **Select: Secondary Structure: Helices + enter**

Na Display-u su samo fragmenti sa helikoidnom strukturom. Uveriti se da su sve vodonične veze formirane između karbonilnog C ostatka n i amidnog N ostatka n + 4. Kopirati sliku u dokument Rezultati, a kasnije zalepiti sliku u polje ispod.



**15. Select: Secondary Structure: Strands + enter**

Prikazani su samo beta slojevi. Kakav je raspored vodoničnih veza? Koji lanci su paralelni, a koji antiparalelni?



**16. Display: Show H Bonds**

Ova funkcija ima znak  $\surd$  sa leve strane, klikom na nju uklanjaju se H veze iz Display prozora.

Razmotriti ostale komande iz **Select** menija, npr. **Group property** i **Group kind**. Koristeći ove komande selektovati i prikazati sve bazne aminokiselinske ostatke u proteinu. Selektovati samo His. Koliko His ostataka ima u lizozimu?



### 17. **Wind: Layer Infos**

**Layer Infos** prozor daje informacije o tome šta je prikazano u Display prozoru. Selektovati bazne grupe (Group property → basic) i pogledati u **Layer info** u koloni **Sel Grp** koliko grupa je pronađeno. Sad selektovati kisele grupe (acidic) i pogledati koliko ih je selektovano, pa uporediti broj baznih i kiselih grupa u lizozimu. Da li se očekuje da izoelektrično pH (pI) bude ispod ili iznad pH 7?

Broj baznih grupa:

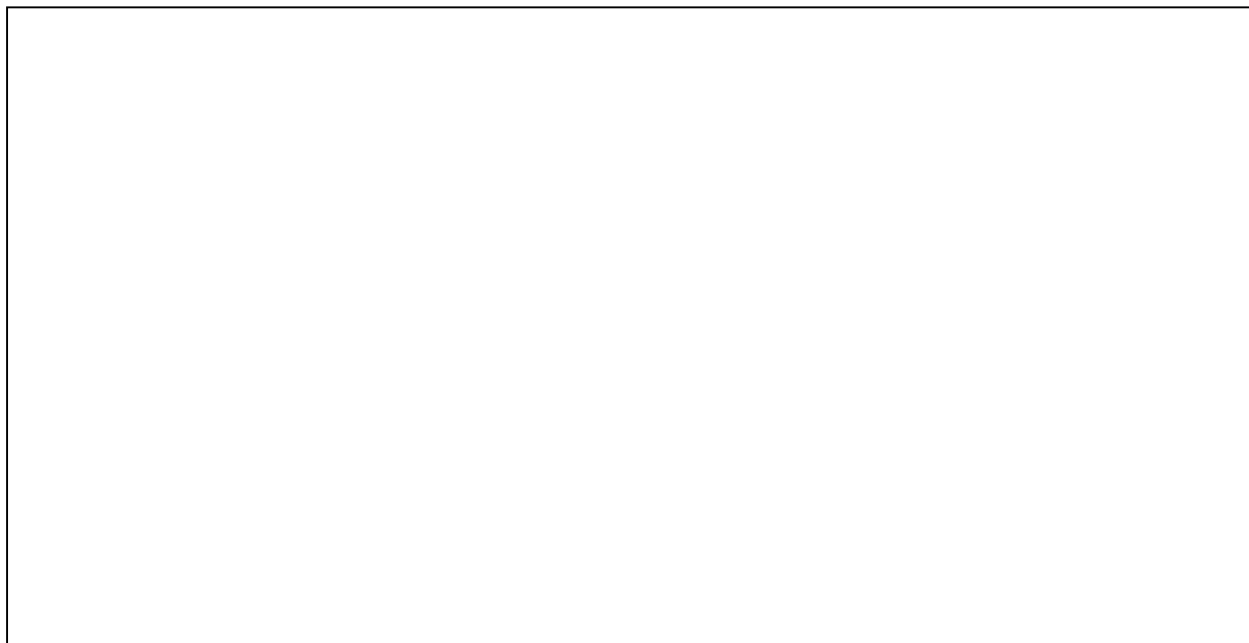
Broj kiselih grupa:

Očekivano izoelektrično pH:

Zatvoriti **Layer Infos** prozor.

### 18. Selektovati samo grupe NAG 201-203 i kliknuti na kolonu **Show**. U Display prozoru je samo struktura trisaharida tri-NAG.

Deveta ikonica s leva na desno u tool bar-u (krug i oko) je takođe moćan alat za selekciju. Kliknuti na nju. Kliknuti N atom (plavi) na centralnom prstenu. Otvara se dijalog: Kliknuti na prvu opciju (add to view groups that are within), ukucati broj 8 i kliknuti **OK**. Prikazane su sve grupe koje sadrže bar jedan atom koji je udaljen na manje od 8 Å od izabranog atoma N. Ovo je korisna alatka za fokusiranje jednog određenog atoma i posmatranje njegove okoline. Kopirati sliku u dokument Rezultati, a kasnije zalepiti sliku u polje ispod.



### 19. **Select: Visible Groups** je opcija kojom se selektuju u Control panel-u sve grupe koje se vide u Display prozoru.

Selektovati i prikazati samo NAG 201-203. **Select: Neighbors of Selected Residues**. U dijalog prozor ukucati 4.5 i **OK**. Dodate su sve grupe koje imaju bar jedan atom bliži od 4.5 Å od nekog atoma u NAG 201-203. Centrirati sliku.



**Tools: Compute H-bonds.** (ili **Display: Show H-bonds** ako su ranije izračunate). Pojavljuju se sve vodonične veze. Sada u Control panel-u selektovati samo NAG 201-203.

**Display: Show Only H-Bonds From Selection**

**Display: Show Only Groups With Visible H-Bond**

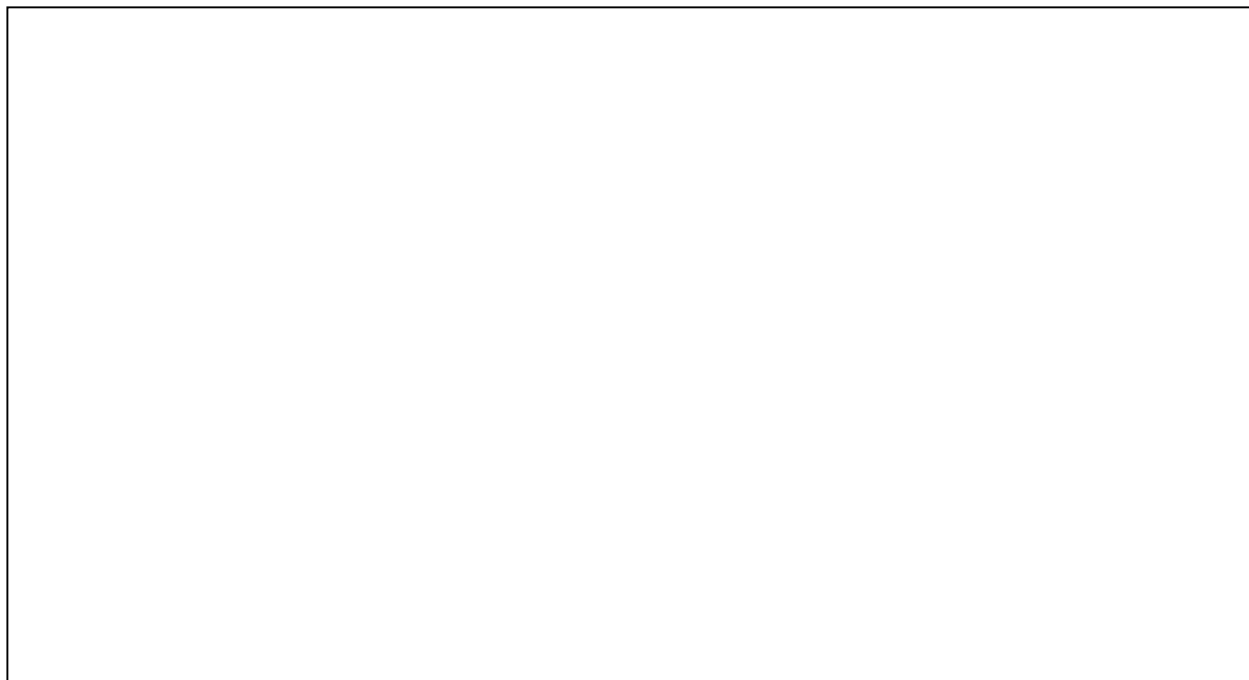
Na ovaj način prikazani su samo tri-NAG inhibitor i rezidue sa kojima je on vezan vodoničnim vezama.

**Select: Visible Groups**

**Select: Inverse Selection** (odlična komanda za selektovanje svega ostalog što nije prikazano u Display prozoru)

Levi klik na **heading ribn** kolone u Control panel-u.

Napravljen je model lizozima u kome su tri-NAG i grupe sa kojima je vezan vodoničnim vezama prikazane žičanim modelom, a ostatak molekula trakastim modelom. Kopirati sliku u dokument Rezultati, a kasnije zalepiti sliku u polje ispod.



20. Ukloniti trakasti model (**Shift\_** + klik na bilo koji checkmark u **Ribn** koloni).

Sad kliknuti bilo gde u prvu kolonu sa leve strane u Control Panel-u i Enter. Ceo lanac A se pojavljuje u Display prozoru, tj. ceo model lizozima jer ima samo jedan lanac.

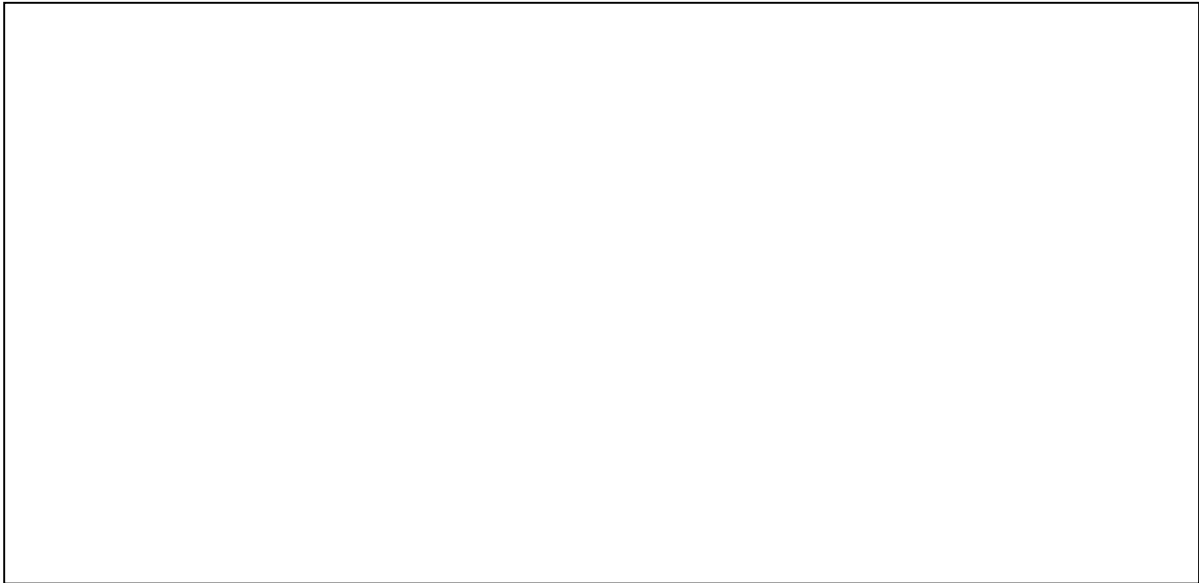
## 21. Bojenje

Bojenje modela je veoma značajno u molekulskom modelingu, jer se bojama mogu istaći strukturne i hemijske osobine molekula, naročito složenih molekula. DeepView ima mnogo opcija za bojenje modela.

Selektovati, prikazati i centrirati ceo molekul lizozima bez bočnih lanaca. Prikazana je polipeptidna kičma žičanim modelom.

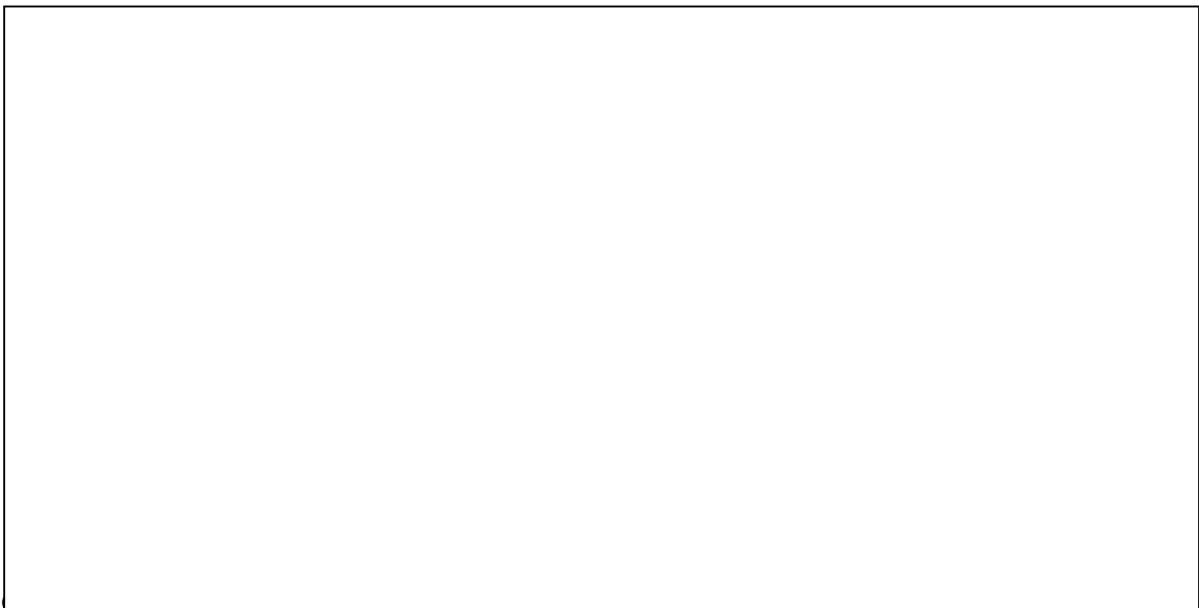
**Color: Secondary Structure**

DeepView boji helikoidne strukture crveno, beta lance žuto, a sve ostalo sivo (boja svakog ostatka prikazana je u kvadratiću Control Panel-a). Kopirati sliku u dokument Rezultati, a kasnije zalepiti sliku u polje ispod.



**Color: Secondary Structure Succession**

DeepView boji helikse i beta lance, ali sa ovom komandom boja govori i o redosledu svakog strukturnog elementa u sekvenci od N ka C terminusu – prvi element sekundarne strukture je ljubičast, poslednji je crven, a oni između obojeni su bojama vidljivog spektra između ljubičaste (400 nm) i crvene (700 nm). Kopirati sliku u dokument Rezultati, a kasnije zalepiti sliku u polje ispod.



DeepView boji ceo model u žuto. Ako ima više od jednog lanca u molekulu, svaki lanac boji se u drugu boju.

**Select: Group Property: non Polar**

Klik **heading side** u Control Panel-u. Dodati su bočni lanci na selektovane aminokiselinske ostatke.

**Color: act on Sidechains**

Označeno je da se naredne promene boje izvršavaju samo na bočnim lancima.

**Color: Type**

Ova komanda boji bočne lance prema hemijskom tipu. Napolarni bočni lanci boje se sivo (ostali bočni lanci nisu prikazani jer je ranije selektovano da se prikažu samo napolarni). Na modelu se vidi da se većina sivih bočnih lanaca nalazi u unutrašnjosti molekula.

U Control Panel-u prikazane su boje i za ostale tipove bočnih lanaca.

Koje su boje bazni, kiseli i polarni bočni lanci aminokiselina?

**Select: Group Property: Acidic**

Držati pritisnuto **Ctrl** i kliknuti **Select: Group Property: Basic**

Korišćenje **Ctrl** sa komandama iz **Select** menija dodajemo selektovane grupe bez deselektovanja drugih.

Kliknuti na **heading side** u Control Panel-u. Dodati su bočni lanci selektovanih rezidua. Sada su kiseli aminokiselinski ostaci prikazani crvenom bojom, bazni plavom bojom, a napolarni više nisu prikazani jer nisu selektovani. Plavo i crveno obojeni bočni lanci nalaze se uglavnom na površini molekula. Kopirati sliku u dokument Rezultati, a kasnije zalepiti sliku u polje ispod.

Sad prikazi i oboji samo polarne K.

22. Ponovo selektovati, prikazati i centrirati kompletni molekul sa bočnim lancima.

**Color: act on Backbone + Sidechains**

Ovom komandom označeno je da će se sve komande za boje odnositi i na polipeptidnu kičmu i na bočne lance.

**Color: Accessibility**

Prikazan je model obojen bojama od tamno plave do narandžaste. Boja svakog aminokiselinskog ostatka bazira se na procentu njegove površine koja je izložena (dostupna) rastvaraču. Najmanje izložene aminokiselinski ostaci na površinu (uronjeni u unutrašnjost) obojeni su ljubičasto. Kako se povećava njihova izloženost površini, oni su obojeni bojom sa sve većom talasnom dužinom vidljivog dela spektra (ljubičasta je oko 400 nm, a crvena na oko 700 nm). Tako su najizloženij aminokiselinski ostaci obojeni crveno. Pronađi tri-NAG (prikazati površinu ovog trisaharida, pa nađi njegovo mesto na modelu – kliknuti pored NAG 201, NAG 202 i NAG 203 u kolonu desno od kolone labl u Control panelu).

Koji NAG ostatak je nadostupniji rastvaraču?

Kopirati sliku u dokument Rezultati, a kasnije zalepiti sliku u polje ispod.

23. Ukloniti površinu sa tri-NAG. Selektovati Trp62. **Prefs: Display.** Ukucati 8 i za vdW i za surface dot density.

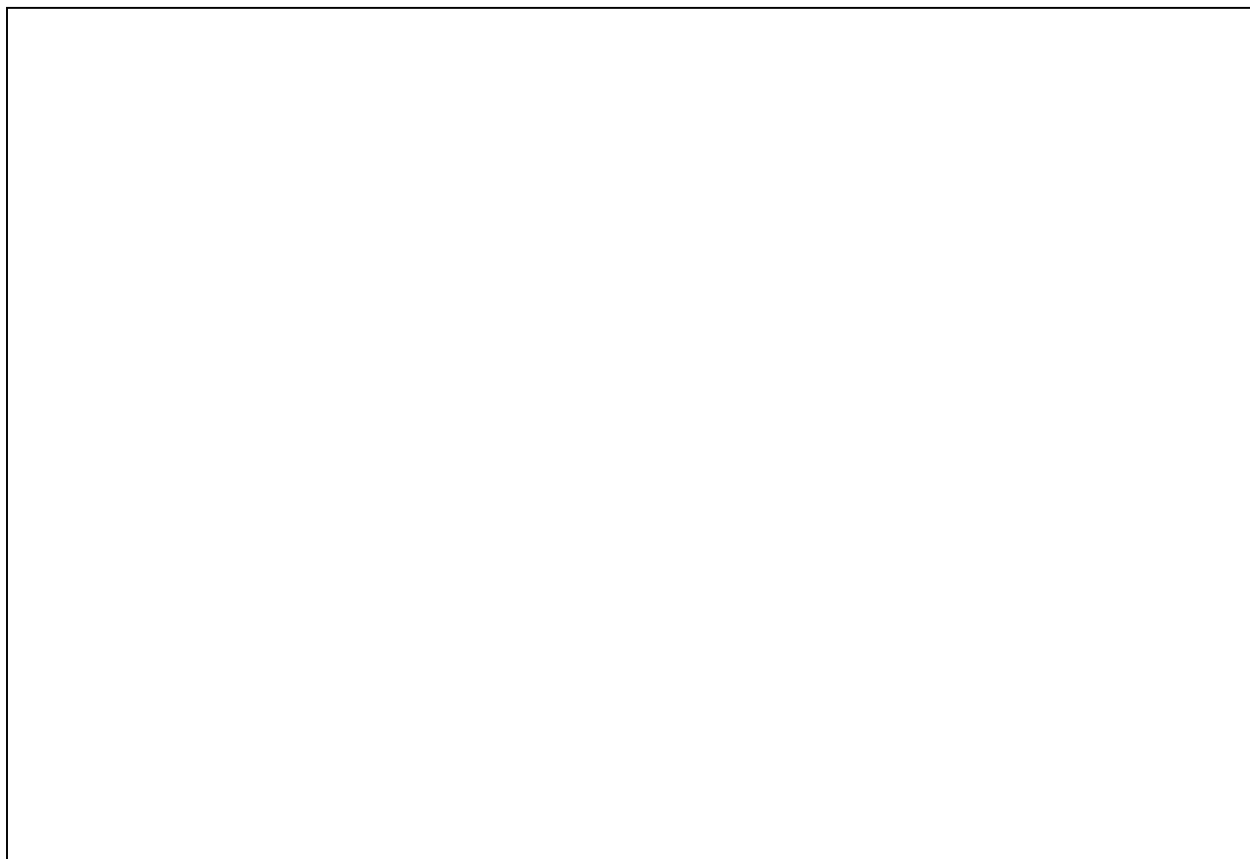
Kliknuti na **surface header** (mali skup tačaka sa v u Control Panel-u). TRP62 je sada prikazan sa tačkastom površinom koja predstavlja van der Valsove poluprečnike svakog atoma. Zimirati da može jasno da se vidi okolina Trp ostatka. Zapaziti da je skoro potpuno okružen drugim grupama. Kliknuti na crni trougao ispod **surface heading** i označiti **accessible**. Malo v prelazi u a. Kliknuti na **surface heading**. Prikazan je mali region tačkaste površine TRP62 koji je dostupan rastvaraču (to je površina sa kojom sferni molekul rastvarača poluprečnika ne većeg od 1.4 Å može da dođe u kontakt).

Isključiti površinu i ponovo centrirati model.

### Display: Slab

Ova komanda prikazuje tanak pločasti isečak koji prolazi kroz centar molekula. Prikazane su samo grupe koje leže u ravni ovog isečka. Ostale grupe koje se nalaze ispred i iza ove ploče su sakrivene. Na ovaj način je jasno prikazano da grupe u centru molekula nisu dostupne rastvaraču (tamno plave), dok su površinske rezidue dostupne. Rotirati molekul i videti da to važi za celu površinu molekula. Debljinu isečka je moguće podešavati. Držati pritisnut **Shift** i levi klik i povlačiti levo ili desno. Takođe, ravan isečka moguće je pomerati ka i od sebe, držeći pritisnuto **Shift** i levi klik i povlačiti miš napred - nazad. **Zoom/center** – isečak sada ponovo prolazi kroz centar molekula. Isključiti **Slab** opciju ponovnim klikom na **Display: Slab**.

Kolona **col** u **Control Panel**-u omogućava bojenje pojedinačnih rezidua ili selektovanih regiona (klikom na obojeni kvadratić pored rezidue bira se boja te rezidue, a klikom na **heading col** boja za sve selektovane regione). Prikazati ceo model sa bočnim lancima i selektovati sve grupe osim tri-NAG (ili selektovati NAG 201-203 i onda kliknuti na opciju **Select: Inverse Selection**). Kliknuti **heading: col**. Izabrati boju i kliknuti **OK**. Ceo model je obojen izabranom bojom osim tri-NAG. Sad obojiti tri-NAG drugom bojom. Kopirati sliku u dokument Rezultati, odštampati je i zalepiti u polje ispod.



Obojiti LEU129 u žuto. Centrirati jedan atom u žuto obojenoj grupi: kliknuti na četvrtu ikonicu sa desna u Toolbar-u (oko i 4 strelice), a zatim kliknuti na jedan izabrani atom. Taj atom postaje centar rotacije. Rotirati molekul.

### 24. Select: All, Color: CPK

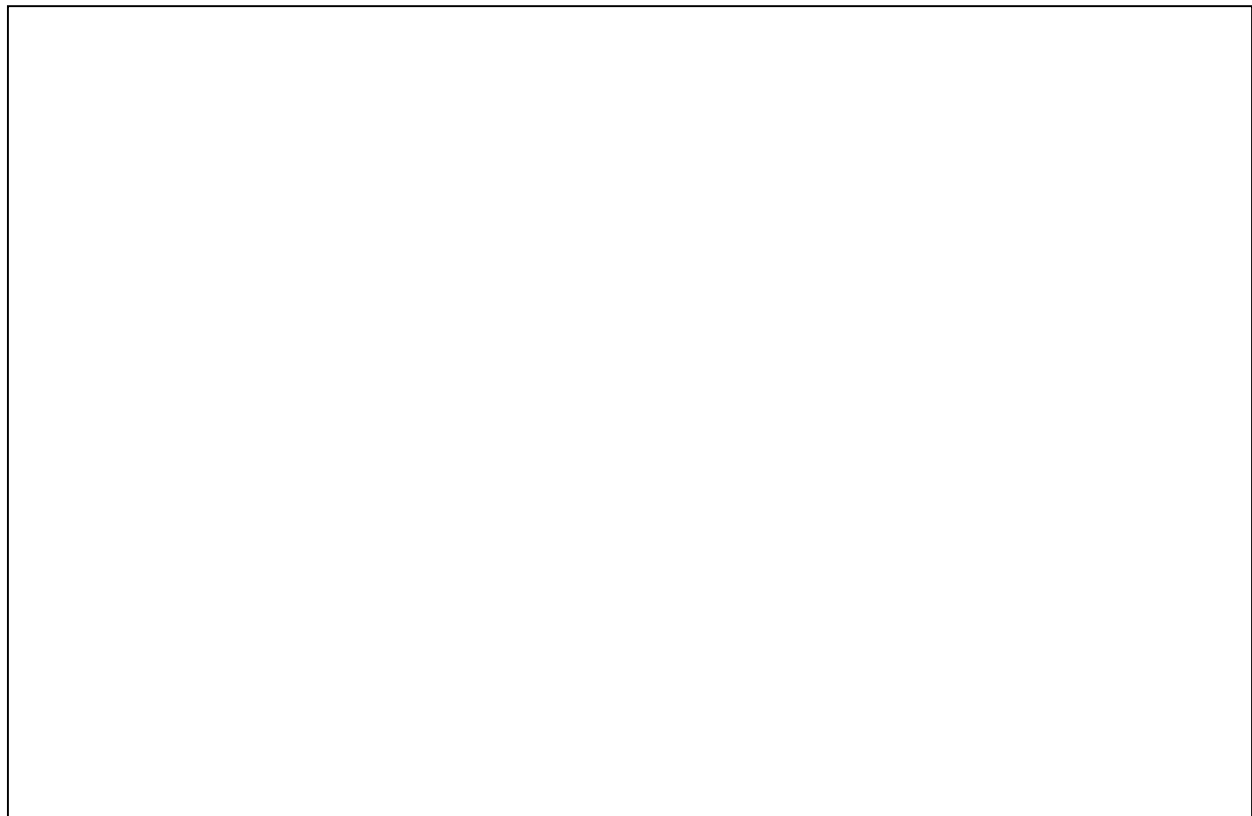
Ova komanda vraća standardne boje modelu: bela za ugljenik, crvena za kiseonik, plava za azot i žuta za sumpor. Zimirati i uočiti koliko ima disulfidnih veza između cisteinskih ostataka.

Broj disulfidnih veza:

S obzirom na mesto nalazenja lizozima u organizmu i njegovu ulogu, zaključiti koju ulogu imaju disulfidni mostovi u ovom proteinu.

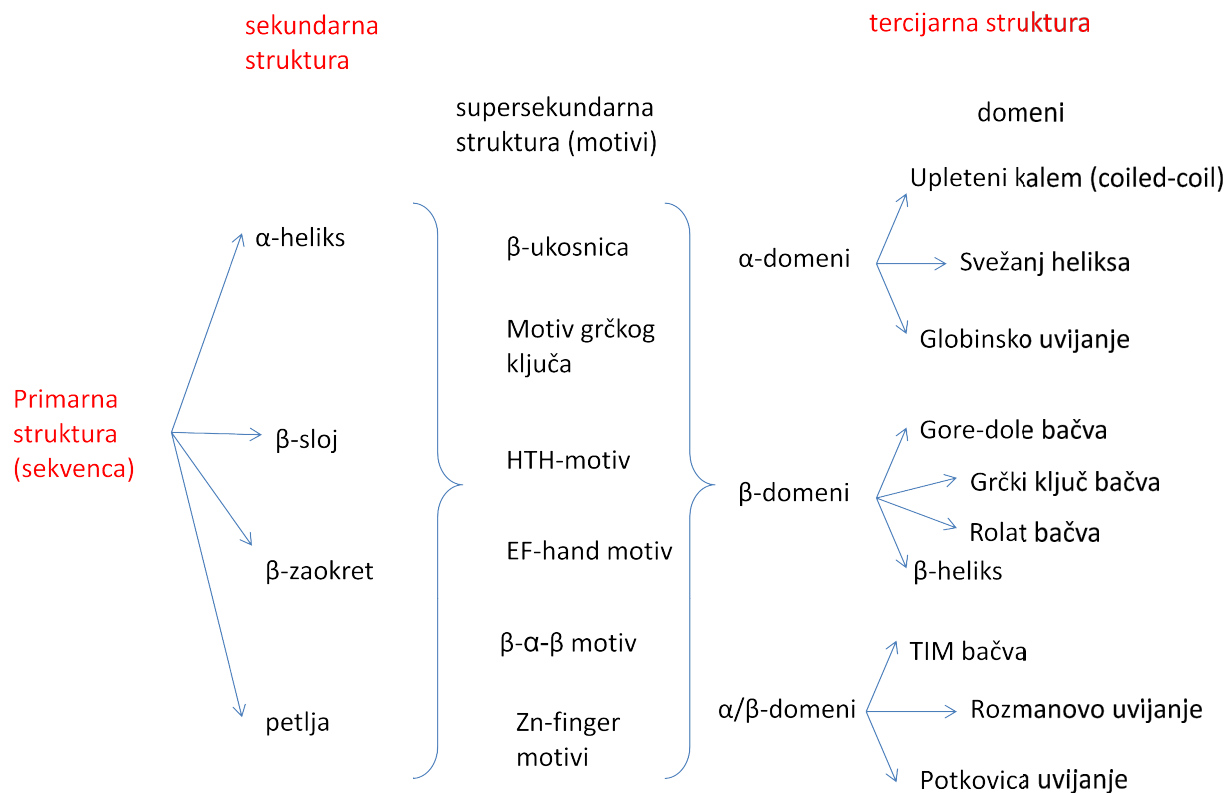
**25. U cilju testiranja savladanih DeepView veština uraditi sledeći zadatak:**

Napraviti trakasti model lizozima sa obojenim sekundarnim strukturama, gde je tri-NAG prikazan CPK bojama sa tačkastom van der Valsovom površinom. Kopirati sliku u polje ispod. Otvori Ramachndran plot in a njemu uočiti da se sada tačke u njemu obojene isto kao aminokiselinski ostaci u Display prozoru. Kopirati sliku u dokument Rezultati, odštampati je i zalepiti u polje ispod.



***Vežba 5. Tercijarna struktura***

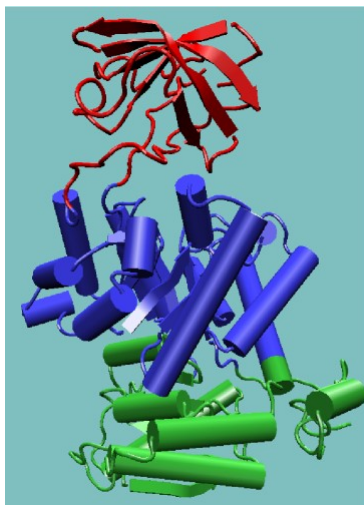
Tercijarna struktura predstavlja trodimenzionalni oblik potpuno uvijenog i kompaktnog polipeptidnog lanca. Jedinice tercijarne strukture su domeni. Domeni su izgrađeni od motiva koji su jedinice supersekundarne strukture (Slika 9).



**Slika 9.** Strukturna hijerarhija proteina

Motiv je stabilni segment polipeptidnog lanca izgrađen najčešće od nekoliko međusobno povezanih elemenata sekundarne strukture ( $\alpha$ -heliksa i  $\beta$ -strukture). U proteinima mogu da se nađu izolovani motivi, ponavljajući motivi ili kombinacije više različitih motiva. Motiv može imati određenu biološku funkciju (vezuje ligand supstrat, aktivator, inhibitor, koenzim sa velikom specifičnošću, vezuje se za DNK) ili biti deo veće strukturne celine. Motivi se dele na  $\alpha$ -motive,  $\beta$ -motive i  $\alpha,\beta$ -motive. Najčešći motivi su  $\beta$ -ukosnica, motiv grčkog ključa, motivi sa dva heliksa (heliks-zaokret-heliks (HTH) motiv i heliks-petlja-heliks (EF-hand) motiv),  $\beta$ - $\alpha$ - $\beta$  motiv i Zn-finger motivi.

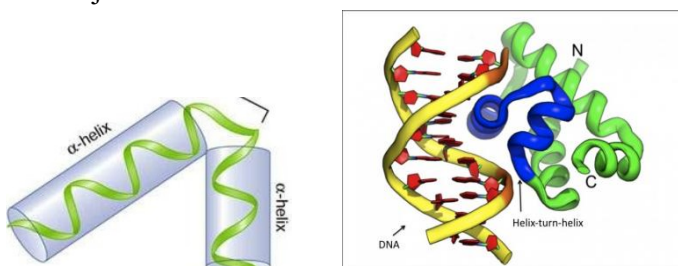
Za formiranje tercijarne strukture najviše su zaslužne interakcije između bočnih aminokiselinskih ostataka u proteinu. Domen je deo polipeptidnog lanca koji može samostalno da se uvije u stabilnu i kompaktnu 3D strukturu i da funkcioniše nezavisno od ostatka polipeptidnog lanca (funktionalna jedinica proteina). Jedan polipeptidni lanac može da ima više domena, povezanih petljama. Različiti domeni u jednom proteinu uglavnom imaju različite funkcije (Slika 10).



**Slika 10.** Piruvat-kinaza se sastoji od tri domena – crveni vezuje ATP, plavi je katalitički, a zeleni regulatorni

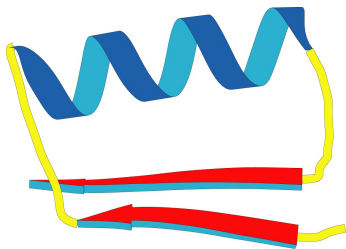
**Zadaci:**

1. Objasniti pojmove supersekundarna struktura i domen.
2. Koji motiv je prikazan na slici? Objasniti njegove strukturne karakteristike. Objasniti na koji način se on vezuje za DNA.

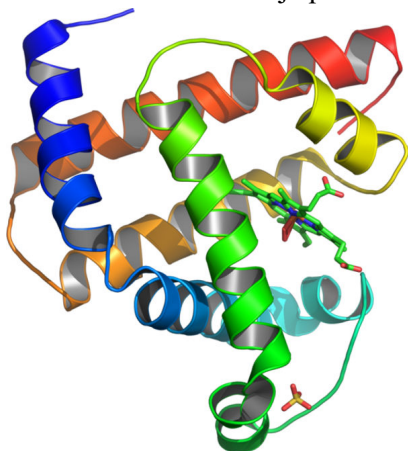




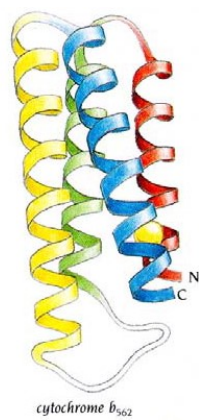
3. Objasniti strukturne karakteristike i navedi uloge  $\beta$ - $\alpha$ - $\beta$  motiva.



4. Koji karakterističan domen je prikazan na slici? Objasniti njegove strukturne karakteristike.

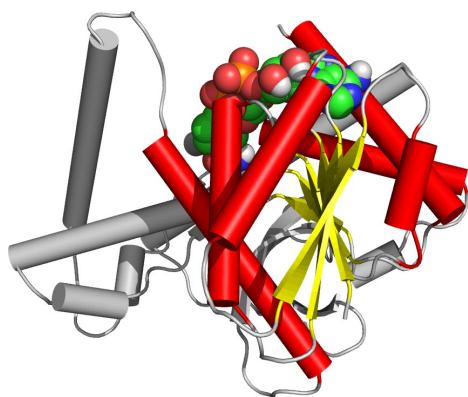


5. Predstaviti topološkim dijagramom svežanj od 4 heliksa iz citohroma b562 sa slike.



6. U  $\alpha$ -domenima se sreću dve vrste pakovanja  $\alpha$ -heliksa. Koje su to dve vrste? Zbog čega heliksi imaju tendenciju da se pakuju sa drugim heliksima? Da li se iz sekvence može pretpostaviti na koji način su heliksi pakovani?

7. Na slici je prikazan domen "Rosman fold" iz malate dehidrogenase (PDB 5KKA). Opiši strukturne karakteristike ovog domena i objasni funkciju ovog domena u proteinima.



8. Vodorastvoran globularni protein ima dva ostatka asparaginske kiseline u različitim delovima tercijarne strukture. Oba se nalaze skoro potpuno u unutrašnjosti proteina.
- U nativnom obliku proteina, prvi ostatak ima pKa 7.4, a u denaturisanom obliku 4.4. Objasniti razliku pKa vrednosti u ova dva stanja.
  - Drugi Asp ostatak, takođe u unutrašnjosti nativnog proteina, ima pKa 2.2. Da li je to očekivano za ovako orijentisan Asp ostatak? Ako nije, objasniti zbog čega nije i predložiti objašnjenje za ovako nisku vrednost pKa.

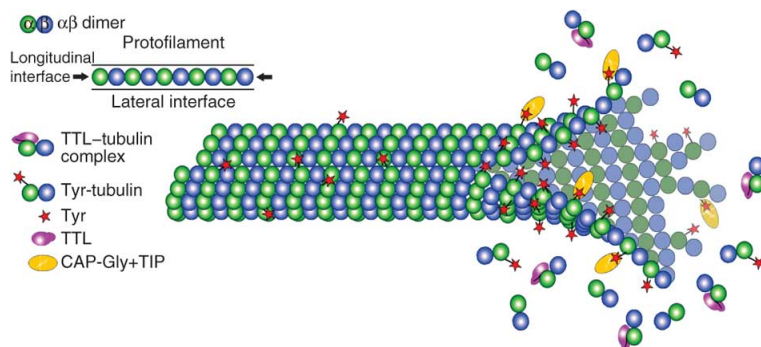
## **Vežba 6. Kvaternarna struktura**

Mnogi proteini sadrže više od jednog polipeptidnog lanca (multimerni proteini). Svaki polipeptidni lanac čini jednu subjedinicu multimernog proteina i predstavlja jedinicu kvaternerne strukture. Kvaternarna struktura označava broj i vrstu subjedinica u datom proteinu, njihov međusobni raspored u prostoru i način na koji su povezane. Svaka subjedinica ima sopstvenu tercijarnu strukturu. Subjedinice međusobno mogu biti povezane nekovalentnim interakcijama i disulfidnim mostovima. Veze između subjedinica moraju biti jače od smanjenja entropije do koje dolazi prilikom asocijacije. Da bi došlo do asocijacije, neophodno je da dodirne površine između subjedinica budu geometrijska komplementarne, da postoji komplementaran raspored hidrofobnih i polarnih grupa i donora i akceptora H-veza. Ako je protein sastavljen od istih subjedinica zove se *homooligomer*, a ako su subjedinice različite – *heterooligomer*.

### **Zadaci:**

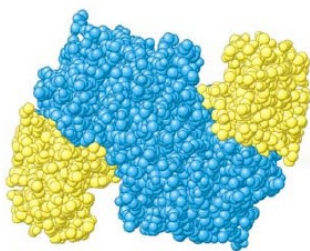
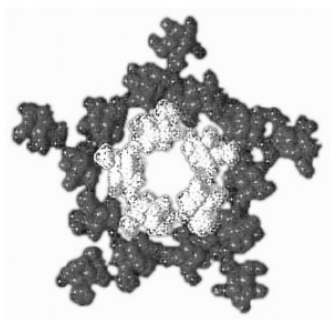
1. Navedi osnovne razloge zbog kojih dolazi do asosovanja subjedinica i formiranja složene strukture multimernih proteina.
  
  
  
  
  
  
  
  
  
  
2. Koji tipovi simetrije se javljaju kod kvaternerne strukture?

3. Navesti strukturne karakteristike mikrotubula koje su izgrađene od tubulina.

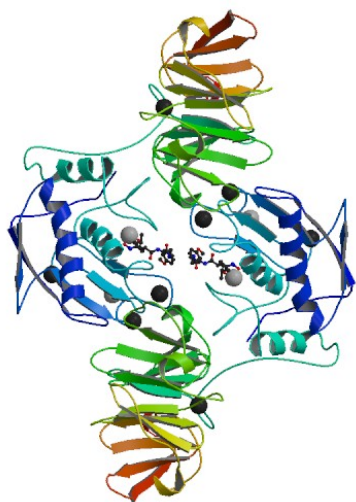


4. Primenom Deep view programa vizuelizovati strukture humanog PCNA proteina (u PDB bazi 1AXC), ribonukleotid reduktaze (u PDB bazi 1mrr), kalijumovog kanala (u PDB bazi 2A79), rotirati ih, odrediti tip simetrije i veze koje stabilizuju kvaternarnu strukturu.

5. Za navedene strukture proteina odrediti red ose simetrije



6. Molekul proteina sa slike je osno simetričan. Kog reda je njegova osa simetrije?



## ***Vežba 7. Imunoglobulini***

Imuni sistem čini treću liniju odbrane protiv infekcija. Ljudski organizam karakteriše proizvodnja antitela i specijalizovanih limfocita kao odgovor na prisustvo specifičnih antigena (imuni odgovor). Antigen je strana supstanca (najčešće protein iz stranog organizma) koji izaziva specifični imuni odgovor.

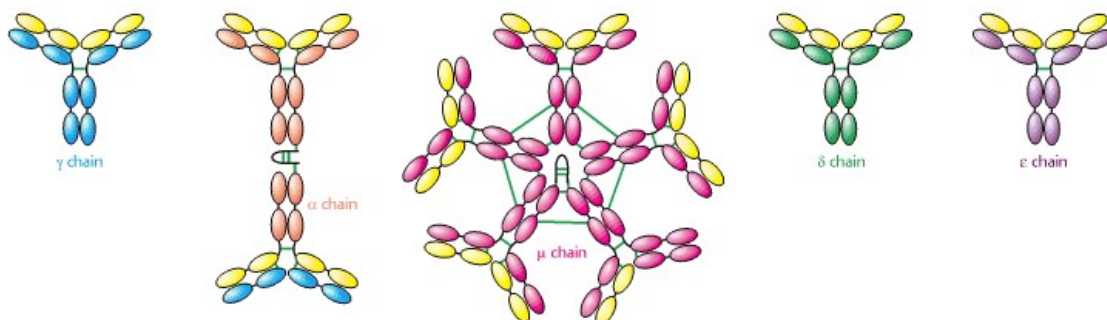
Antitela su proteini iz grupe imunoglobulina, koji se specifično vezuju za jedan određeni protein (antigen) u uzorku. Mesto na antigenu za koje se vezuje određeno antitelo zove se epitop, a do vezivanja dolazi zahvaljujući nekovalentnim interakcijama. Osobina antitela da specifično vezuje antigen iskorišćena je za razvoj različitih analitičkih tehnika, od kojih se najčešće primenjuju: Imunoblot (Western blot) tehnika, ELISA testovi i imunoafinitetna hromatografija.

Komercijalno dostupna antitela koja se koriste u laboratorijskim analizama mogu biti poliklonalna i monoklonalna. Poliklonalna antitela produkuju različiti B limfociti nekog organizma (npr. životinje) kao odgovor na strani antigen. Monoklonalna antitela proizvodi populacija identičnih B ćelija (klonova) koje rastu u kulturi. Monoklonalna antitela imaju monovalentni afinitet, što znači da se vezuju za isti epitop jednog antigena. Ova antitela su homogena i raspoznaju isti epitop nekog antigena, dok su poliklonalna antitela specifična za različite epitope istog antigena.

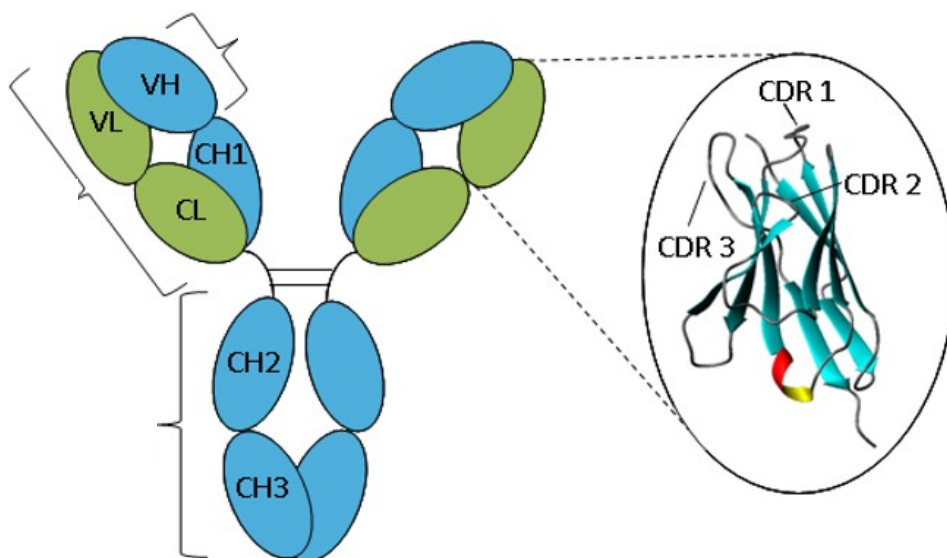
### ***Zadaci:***

1. Navesti uloge imunoglobulina.
  
  
  
  
  
  
  
  
  
  
2. Na koji način se obezbeđuje visoka specifičnost u vezivanju antigena od strane antitela? Uočiti tipove interakcija između antitela i antigena pomoću Deep View programa (3hfm). Zapisati zapažanja.

3. Kod kičmenjaka se javlja 5 klasa imunoglobulina. Označi na slici kojoj klasi pripada svaki od navedenih imunoglobulina. Po čemu su slične, a po čemu se razlikuju ove klase?



4. Na slici je dat IgG. Na slici označi delove njegove strukture i objasni ulogu svakog dela.



## Vežba 8. Analiza proteina Western blot tehnikom

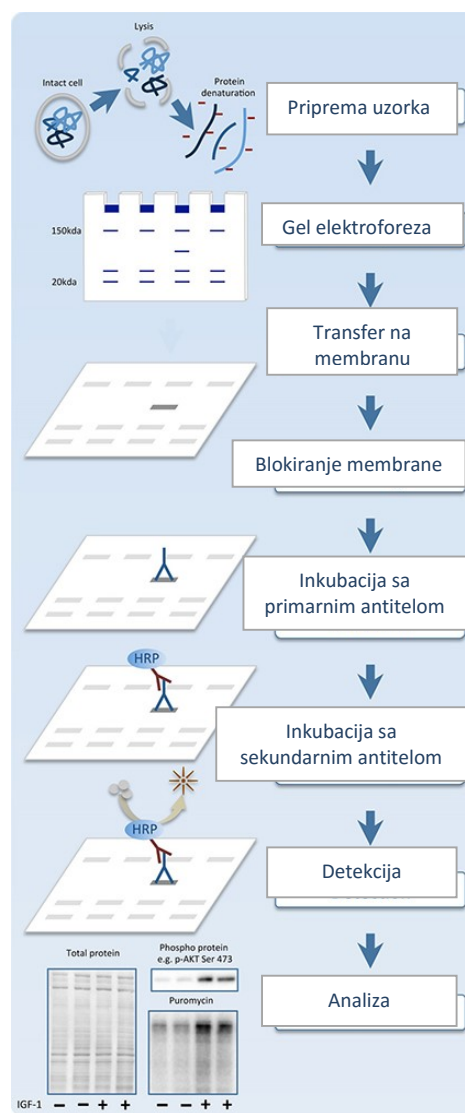
Western blot je tehnika koja se široko primenjuje u biohemiskim laboratorijama jer omogućava detekciju i kvantifikaciju određenog proteina u kompleksnim biološkim uzorcima, kao što su tkivni i ćelijski lizati. Smeša proteina iz lizata se prvo razdvaja elektroforezom na gelu (Slika 11), a zatim se razvojeni proteini prenose sa gela na membranu (najčešće nitroceluloznu ili poliviniliden-difluoridnu (PVDF)). Slobodna mesta na membrani blokiraju se nespecifičnim proteinom, najčešće proteinima mleka ili sa albuminom goveđeg seruma (BSA). Detekcija ciljanog proteina na membrani zasniva se na specifičnoj interakciji antigen - antitelo (zato se ova metoda zove još i imunoblot). Najčešće se primenjuje metoda kombinovanja primarnog i sekundarnog antitela. Primarno antitelo specifično prepoznaje deo aminokiselinske sekvence na antigenu (epitop) i vezuje se za njega. Sekundarno antitelo, koje je obeleženo enzimom za vizuelizaciju signala, se zatim vezuje za primarno antitelo. Kada se na membranu doda supstrat enzima vezanog za sekundarno antitelo pojavljuje se signal koji se detektuje. Jačina dobijenog signala proporcionalna je koncentraciji ciljanog proteina (antigena) u uzorku. U zavisnosti od toga kako je sekundarno antitelo obeleženo, detekcija signala može biti hemiluminiscentna i fluorescentna.

Hemiluminiscentna metoda detekcije podrazumeva vizuelizaciju hemiluminiscencije koja nastaje kao rezultat reakcije supstrata (luminola) sa enzimom (najčešće peroksidazom rena – HRP) vezanim za sekundarno antitelo. Oksidovani luminol nastao u reakciji emituje svetlost koja se može detektovati ozračivanjem X-ray filma direktno postavljenog na membranu u mračnoj komori.

Dobijena slika se dezintometrijski skenira i površine mrlja se analiziraju u posebnom programu za obradu slika (npr Image J). Umesto X-ray filma moguće je koristiti i luminimetrijski analizator slika (npr. Thermo Scientific myECL Imager).

Kako bi se koncentracije ciljanog proteina detektovane u različitim uzorcima međusobno mogle porediti neophodno je rezultate normalizovati na endogenu kontrolu. Endogenu kontrolu čini neki od strukturnih proteina čija ekspresija je u svim uzorcima skoro identična (tubulin, aktin, GAPDH).

Western blot metodom se mogu detektovati nanogramske do pikogramske koncentracije proteina. U slučaju da je koncentracija ciljanog proteina u uzorku manja, mora se uraditi koncetrovanje.



Slika 11. Šematski prikaz faza Western blot tehnike



**Reagensi:**

- Pufer za uzorak (4x): 2,5 mL 0,5 M Tris (pH = 6,8); 1 g SDS; 4 mL glicerola; 1 mL 2-merkaptetoanola; 0,8 mL bromfenol plavog, podesiti pH na 6,8 sa HCl i dopuniti do 10 mL destilovanom vodom.
- Pufer za elektroforezu (5x): 15 g Tris; 72 g glicina i 5 g SDS u 1 L destilovane vode (koristi se 1x).
- 1,5 M Tris, pH = 8,8: 36,3 g Tris u 100 mL destilovane vode, podesiti pH na 8,8 i dopuniti do 200 mL.
- 0,5 M Tris, pH = 6,8: 6 g Tris u 40 mL destilovane vode, podesiti pH na 6,8 i dopuniti do 100 mL.
- 0,1 g/mL SDS (natrijum dodecilsulfat): 10 g SDS u 100 mL destilovane vode.
- Akrilamid: 30 g akrilamida i 0,8 g N,N-bis-metilen akrilamida u 100 mL destilovane vode.
- 0,1 g/mL APS (amonium persulfat): 0,1 g u 1 mL destilovane vode.
- Smeša za gelove:

	Donji gel (7,5 %-ni) 29 mL	Gornji gel 10 mL
Destilovana voda	13,6 mL	6,3 mL
Tris pH = 8,8	7,5 mL	pH= 6,8 - 2,5 mL
SDS	0,3 mL	0,1 mL
Akrilamid	7,5 mL	1,2 mL
APS	150 µL	100 µL
TEMED	15 µL	10 µL

- Rastvor za bojenje gela: 0,02 g Coomassie blue rastvoriti u 10 mL MeOH, 8 mL destilovane vode i 2 mL  $\text{ccCH}_3\text{COOH}$ .
- Rastvor za obezbojavanje: jači – 50 % MeOH, 10 %  $\text{CH}_3\text{COOH}$  (ostaviti 20 min); slabiji – 10 %  $\text{CH}_3\text{COOH}$  (preko noći).
- Pufer za transfer (10x): 1,5 g Tris i 7,2 g glicina u 50 mL destilovane vode (koristi se 1x)
- TBST pufer: 20 mM Tris, 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20, podesiti pH sa HCl na 7.4–7.6.

**Postupak:**

Priprema uzorka proteina:

Uzorak proteina (krvni serum, lizat ćelija, homogenat tkiva), u kojem je prethodno određen sadržaj proteina, se meša sa puferom za uzorak u odnosu 3 : 1 i zagreva na 95°C u toku 5 minuta. Pufer za uzorak sadrži 2-merkaptetoanol koji raskida disulfidne mostove u proteinu i dovodi do njihove denaturacije, zatim SDS (natrijum dodecilsulfat) koji dodatno raspliće polipeptidne lance, vezuje se nekovalentnim vezama za njih i povećava im negativno naelektrisanje. Dodatno, u puferu za uzorak prisutna je referentna boja (najčešće bromfenol plavo) koja nam omogućava da vizuelno pratimo tok elektroforeze (boja ide prva, tj. ispred proteina). Na ovaj način pripremljeni uzorci su spremni za nanošenje na gel ili se mogu čuvati na -20°C do same analize.

### Elektroforeza na poliakrilamidnom gelu (SDS-PAGE)

Elektroforeza se izvodi u aparaturi za vertikalnu elektroforezu u nekoliko faza: prvo se pripreme poliakrilamidni gelovi, stalak sa gelom se postavi u kadu za elektroforezu, nalije se pufer za elektroforezu, nanesu se uzorci proteina u bunarčiće gela, priključi se struja i nakon razdvijanja elektroferograma gelovi se oboje kako bi se detektovalo da li je došlo do razdvajanja proteina.

#### *Priprema poliakrilamidnih gelova:*

Obrisati stakla za pravljenje gela (malo i veliko) etanolom, osušiti ih, postaviti željeni separator (1 mm) između dva stakla i montirati ih u postolje tako da donji deo stakla nalegne na donji sunder. Sipati malo destilovane vode između stakala u cilju provjere da li je aparatura zatvorena i da ne dolazi do curenja u donjem delu aparature (između stakala i sundera). Ukloniti vodu iz aparature i osušiti je filter hartijom.

Pomešati reagens za donji gel u odnosu datom u gornjoj tabeli. Obratiti pažnju da se TEMED dodaje na samom kraju, kada su svi reagensi pomešani i aparatura spremna za izlivanje gelova. Smešu za donji gel sipati tako da ostane oko 20 mm od vrha manjeg stakla prazno i obratiti pažnju da pri tome ne ostane mehurića u tečnosti. Pažljivo prelići sa nekoliko kapi destilovane vode. Kada se pojavi granična linija između donjeg gela i vode znači da je došlo do polimerizacije. Ovako napravljen donji gel može da se čuva na 4°C nekoliko dana.

Ukloniti vodu sa vrha ispolimerizovanog gela filter hartijom i pripremiti smešu reagenasa za gornji (stacking) gel. Izliti smešu za gornji gel do vrha manjeg stakla i postaviti odgovarajući češljic. Ostatak neiskorišćene smeše za gel ostaviti u epruveti i iskoristiti ga za proveru da li je došlo do polimerizacije. Gornji gel bi trebalo izliti na sam dan analize da ne bi došlo do mešanja dva gela difuzijom na dodirnoj površini. Nakon polimerizacije gela, pažljivo ukloniti češljic sa gela tako da se ne naruše granice bunarčića (mesta nanošenja uzorka). Bunarčići ne smeju ostati suvi, te ih nakon uklanjanja češljica treba navlažiti puferom za elektroforezu.

#### *SDS-PAGE*

Postolje sa gelovima montirati u kadu za elektroforezu. Povezati kadu za elektroforezu sa dovodom vode radi hlađenja aparature. Unutrašnju komoru (koja je u kontaktu sa katodom) ispuniti puferom za elektroforezu i nanositi uzorak u bunarčiće. Zapremina uzorka koja se nanosi na gel zavisi od veličine bunarčića i koncentracije proteina (npr. 15-35  $\mu$ L za 15-zupčani češljic). Bitno je da količina proteina naneta u bunarčiće jednog gela bude jednaka dok zapremina može malo da varira između uzoraka. Ostatak kade (spoljnu komoru) ispuniti puferom za elektroforezu, do 1 cm od vrha unutrašnje komore. Spoljna komora je u kontaktu sa donjom stranom gela i u njoj se nalazi anoda. Gornja strana gela (u unutrašnjoj komori) je u kontaktu sa katodom a donja strana gela sa anodom. Proteini okruženi SDS-om imaju negativnu šaržu te će se kretati u pravcu anode tj. od bunarčića na vrhu gela ka njegovom dnu. Postaviti poklopac na kadu za elektroforezu, povezati elektrode na izvor struje i podesiti napon na 200V u toku 1h. Prekinuti elektroforezu kada referentna boja dođe na 0,5 – 1 cm od dna gela.

#### *Vizuelizacija proteina na gelu*

Nakon završene elektroforeze proteini su razdvojeni na gelu prema njihovoj molekularnoj masi (najduže su putovali najmanji proteini te se nalaze pri dnu gela, dok se pri vrhu gela nalaze proteini veće molekularne mase). Da bi se proteini u gelu obojili, on se potapa u rastvor za bojenje (rastvor Coomassie

plavo) u toku 1h. Ova boja jednako boji i proteine i sam gel. Obezbojavanje gela vrši se potapanjem u rastvor za brzo obezbojavanje (50 % MeOH, 10 % CH<sub>3</sub>COOH) u toku 20 minuta a zatim u 10 % CH<sub>3</sub>COOH rastvor preko noći. U ovom procesu obezbojavanja se samo gel, dok proteini ostaju fiksirani i vide se kao obojene zone na providnom gelu.

#### Transfer proteina na membranu – blotting

Za identifikaciju i kvantitativno određivanje proteina potrebno je prebaciti proteine sa gela na nitroceluloznu ili PVDF (poliviniliden difluorid) membranu. Naime, membrana je mnogo kompaktnija u odnosu na gel koji se lako kida, te je lakša za manipulaciju. U ovu svrhu koristi se gel koji nije prethodno bojen Coomassie plavo bojom. Proces prebacivanja proteina sa gela na membranu (blotting ili transfer) se takođe odvija u polju jednosmerne struje. Proteini koji su još uvek negativno naelektrisani (zbog SDS-a) se kreću u pravcu anode, odnosno, gel i membrane se postavljaju tako da će proteini krećući se ka anodi da pređu (transferuju se) na membranu. Postoji više vrsta transfera od kojih se najčešće koriste mokri i polusuv transfer.

#### Mokri transfer:

Mokri transfer se odvija u aparaturi za elektroforezu sa razlikom da se kada puni puferom za transfer. Neophodno je da gel i membrana budu u savršenom kontaktu, bez mehurića vazduha i dobro pritisnuti. U te svrhe montira se “sendvič” ređajući sledeće komponente: sunder + 5-6 listova obične filter hartije + list deblje filter hartije + gel + membrana + list deblje filter hartije + 5-6 listova obične filter hartije + sunder. Sve komponente sendviča potrebno je iseći i prilagoditi dimenzijama samog gela i pre sklapanja sendviča potopiti u pufer za transfer (PVDF membranu je potrebno potopiti u MeOH). Ređajući komponente sendviča potrebno ih je izravnati tj. pobrinuti se da ne bude zaostalih mehurića vazduha, naročito između gela i membrane. Ovako napravljene sendviče montirati u postolje, a postolje zatim staviti u kadu za elektroforezu. Kadu ispuniti puferom za transfer, poklopiti, priključiti elektrode na izvor struje i pokrenuti transfer (na 200 V u toku 1h).

#### Polusuv transfer:

Polusuv transfer zahteva posebnu aparaturu, ali se odvija po istom principu kao i mokri transfer. Sklapa se sendvič na isti način - sve komponente sendviča su takođe prethodno natopljene puferom za transfer, ali se on ne montira u kadu za elektroforezu već direktno između elektroda aparata. Transfer se u ovom slučaju vrši na 200 mA u toku 1h.

#### Vizuelizacija proteina na membrani

Membrane se nakon transfera potapaju u boju Ponceau S crveno, u cilju provere da li su proteini prešli sa gela na membranu. Ovo je nespecifična boja i boji sve proteine. Ukoliko je transfer uspešan, membrana se ispira od crvene boje prvo destilovanom vodom a zatim 3 x po 5 minuta sa TBST puferom. Membrana se blokira u TBST puferu sa 1% BSA 1h. Nakon ispiranja 3 x 5 po min membrana se inkubira sa primarnim antitelom specifičnim za protein koji želimo da identifikujemo ili kvantifikujemo. Primarno antitelo se rastvara u 5%-nom rastvoru albumina u koncentraciji prema preporuci proizvođača i inkubira sa membranom preko noći na 4°C uz konstantno mućkanje. Nakon uklanjanja primarnog antitela, membrana se ispira 3 x po 5 minuta sa TBST puferom i inkubira sa sekundarnim antitelom za koji je vezan enzim peroksidaza. Sekundarno antitelo se rastvara u 5%-nom rastvoru mleka u prahu u koncentraciji prema preporuci proizvođača i inkubira sa membranom u toku 90 min uz konstantno

mućkanje. Po isteku ovog vremena, membrana se ispira 3 x po 5 minuta sa TBST puferom. Na membrani se nakon ove dve inkubacije nalazi sledeći kompleks:

**protein (na membrani) + primarno antitelo + sekundarno antitelo-peroksidaza**

Da bismo odredili količinu ciljanog proteina, na membranu se dodaje supstrat peroksidaze (Luminol) prema proceduri proizvođača i u reakciji koju katalizuje ovaj enzim dolazi do luminiscencije koja se meri na luminometru (ili slikanjem na X-ray filmu u mračnoj komori). Intenzitet luminiscencije je proporcionalan količini ciljnog proteina.

***Zadatak:***

Ispitati ekspresiju enzima COX-2 u lizatu humanih makrofaga (ćelijska linija U937) nakon izazivanja inflamacije u ovim ćelijama bakterijskim lipopolisaharidom.

***Rezultati:***

Zalepiti fotografiju gela obojenog sa Comassie plavo nakon završene elektroforeze, zatim fotografiju membrane obojene sa Ponsau S i fotografiju dobijenu na luminometru. Prokomentarisati dobijen rezultat.

## Vežba 9. Membranski proteini

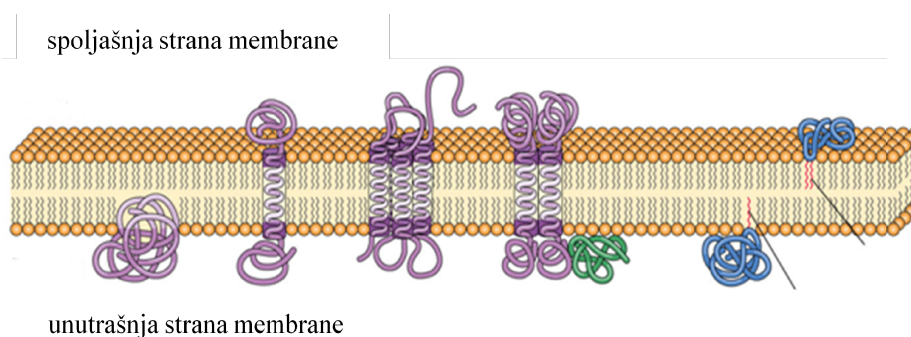
Membrane eukariotskih ćelija se sastoje od fosfolipida i sfingolipida koji grade lipidni dvosloj, zatim holesterola, glikolipida, ugljenih hidrata i globularnih proteina uronjenih u dvosloj. Najčešće su membranski proteini u obliku glikoproteina, gde su šećerne jedinice uvek okrenute ka spoljašnjoj strani ćelije. Količina i sastav membranskih proteina zavise od vrste membrane i mogu biti vezani za membranu na više načina:

1. integralni membranski proteini: transmembranski proteini i proteini izloženi na samo jednoj strani membrane (integralni monotopični proteini)
2. proteini vezani za lipide (*lipid-linked proteins*) ili usidreni proteini (*anchored proteins*): kovalentno su vezani za fosfolipid, masnu kiselinu ili izoprenoidno sidro i
3. periferni membranski proteini: vezani za integralne membranske proteine ili polarnim interakcijama za polarne glave fosfolipida.

### Zadaci:

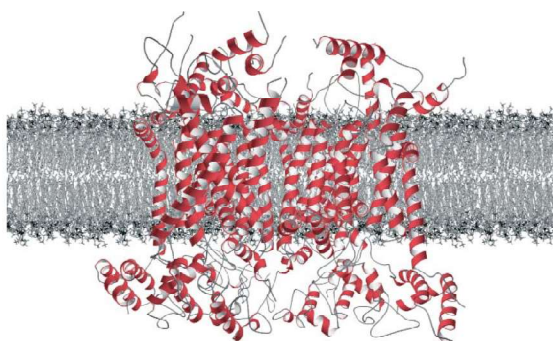
1. Navesti uloge membranskih proteina.

2. Pomoću slike objasniti razlike između integralnih i perifernih membranskih proteina.

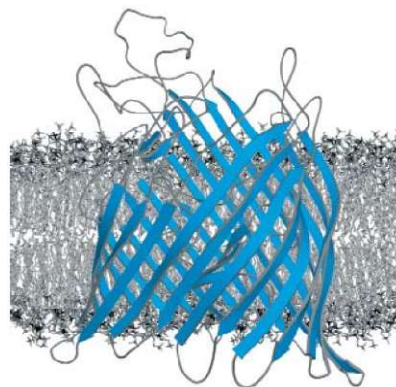


3. Napiši reakciju uvođenja farnezil grupe u protein u toku posttranslacionih modifikacija.

4. Objasni strukturne karakteristike i potencijalne uloge sledećih membranskih proteina:



(PDB 1bgy)



(PDB 1by3)

5. Primenom DeepView programa analizirati model nikotinskog acetilholinskog receptora (2BG9) i objasniti njegove strukturne karakteristike. Opisati izgled vezivnog mesta za acetilholin i navesti koji aminokiselinski ostaci učestvuju u njegovom vezivanju. Pronaći i obojiti Leu ostatke na M2 heliksima transmembranskih domena koji zatvaraju kanal za prolaz jona.

## LITERATURA

Branden C, Tooze J (1999): *Introduction to Protein Structure, 2<sup>nd</sup> Edition*, Garland Publishing, New York

<https://absoluteantibody.com/antibody-resources/antibody-overview/antibody-structure/>

<https://www.creative-biostructure.com/mempro%E2%84%A2-membrane-protein-platform-447.htm>

<https://precisionbiosystems.com/western-blot-troubleshooting-guide/>

<https://spdbv.vital-it.ch/disclaim.html>

<https://www.rcsb.org/>

Lesk AM (2010): *Introduction to Protein Science, Architecture, Function and Genomics, 2<sup>nd</sup> Edition*, Oxford University Press Inc., New York

Lide DR (1991): *Handbook of Chemistry and Physics, 72<sup>nd</sup> Edition*, CRC Press, Boca Raton, FL

Nelson DL, Cox MM (2004): *Lehninger principles of biochemistry, 4<sup>th</sup> Edition*, W.H. Freeman & Company, New York

Niketić V (1995): *Principi strukture i aktivnosti proteina*, Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu, Beograd

Niketić V, Nikolić M (2008): *Uputstva za vežbe iz biohemije proteina i nukleinskih kiselina (za studente ii godine biohemije)*, Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu, Beograd

Petsko G, Ringe D (2004): *Protein Structure and Function*, New Science Press Ltd, London, UK

Zubay GL, Parson WW, Vance DE (1995): *Principles of Biochemistry*, Wm C Brown, Iowa.

Whitford D (2005): *Proteins, Structure and Function*, John Wiley & Sons Ltd, Chichester, England

Horton HR, Moran LA, Ochs RS, Rawn JD, Scrimgeour KG (2002): *Principles of Biochemistry, 3<sup>rd</sup> Edition*, Prentice-Hall Inc, New York