



İLERİ ARAŞTIRMA YÖNTEMLERİ

56901007

2020-21 BAHAR

DR. GÜNSELİ ÇUBUKÇUOĞLU DENİZ

PROTEİN ANALİZ YÖNTEMLERİ-1

DERS 11

PROTEİN YAPI VE FONKSİYONU

YAPI

primer yapı: aa lineer sekansı

sekonder yapı: heliks ve kırmalı tabaka katlanmaları

tersiyer yapı: globüler veya fibröz domeynler

kuarterner yapı: tekil proteinlerin biraraya gelip supramoleküler kompleksler oluşturması

FONKSİYON

enzim: kimyasal reaksiyonların katalizi

transport: küçük molekül ve iyonların taşınması

sinyal iletimi: çevreyi algılayıp reaksiyon gösterme

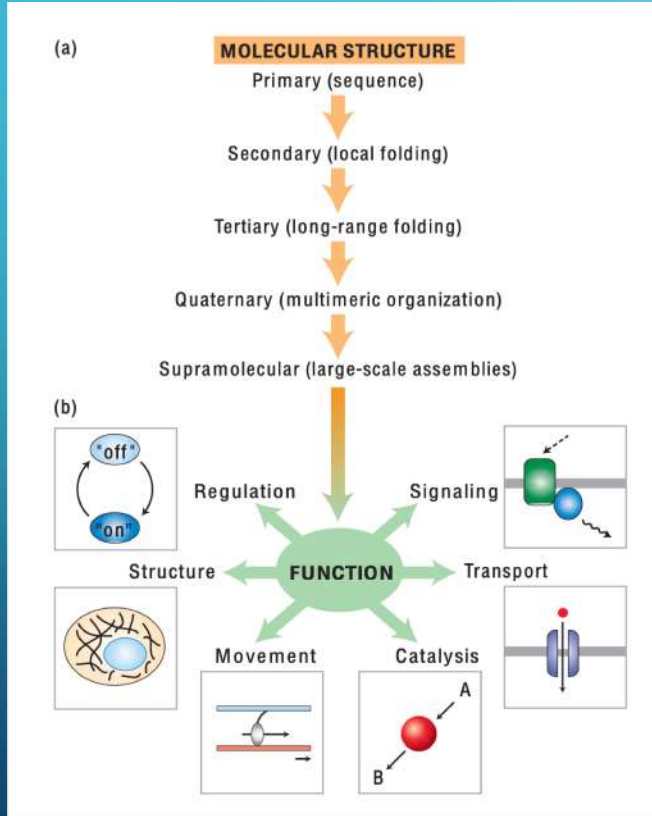
regülasyon: protein aktivitesinin kontrolü

yapıtaşı proteinler: genom organizasyonu, lipid bilayer membran ve sitoplazma yapısında bulunma

motor proteinler: hareket için güç oluşturma

immün proteinler: sitokinler, immünoglobülinler

.....



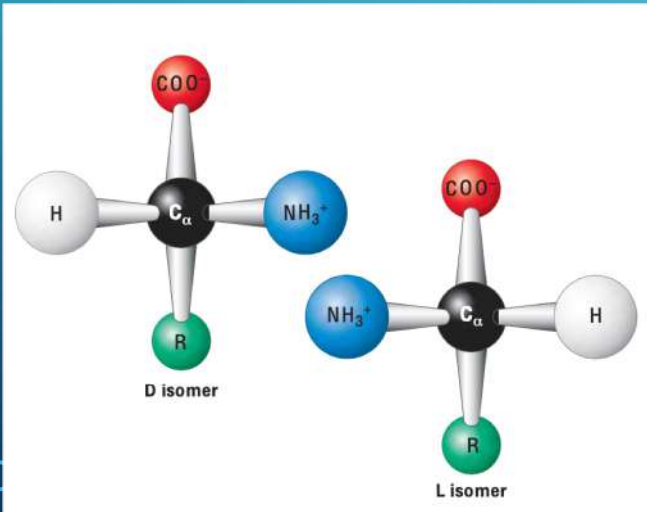
PROTEİNLERİN PRİMER YAPILARI VE AMİNOASİTLER

glisin dışındaki tüm aa'lerde asimetrik C atomu var

L ve D optik izomerler olarak

bulunuyorlar. Proteinlerde L izomer aa'ler var.

Yan zincirler (R grupları) aa'nin özelliğini belirler



Proteinlerin primer yapısında aa'ler peptid bağlarıyla bağlanır. Her aa rezidüsünün amid N atomu, C α atomu ve karbonil C atomu iskelet oluşturur. Linear proteinin bir ucunda serbest amino (N-terminus), diğer ucunda serbest karboksil (C-terminus) grubu bulunur.

Peptid (20-30 aa'ten az) Polipeptid (1000 aa ve fazlası) Polipeptidlerin büyüklüğü, dalton (kütle birimi) veya MW olarak ifade edilir. bir dalton 1 atomik kütle birimidir.

ÖRN: 10000 MW protein 10000 Da = 10 kDa kütlesi vardır.

A GUIDE TO THE TWENTY COMMON AMINO ACIDS

AMINO ACIDS ARE THE BUILDING BLOCKS OF PROTEINS IN LIVING ORGANISMS. THERE ARE OVER 500 AMINO ACIDS FOUND IN NATURE - HOWEVER, THE HUMAN GENETIC CODE ONLY DIRECTLY ENCODES 20. 'ESSENTIAL' AMINO ACIDS MUST BE OBTAINED FROM THE DIET, WHILST NON-ESSENTIAL AMINO ACIDS CAN BE SYNTHESISED IN THE BODY.

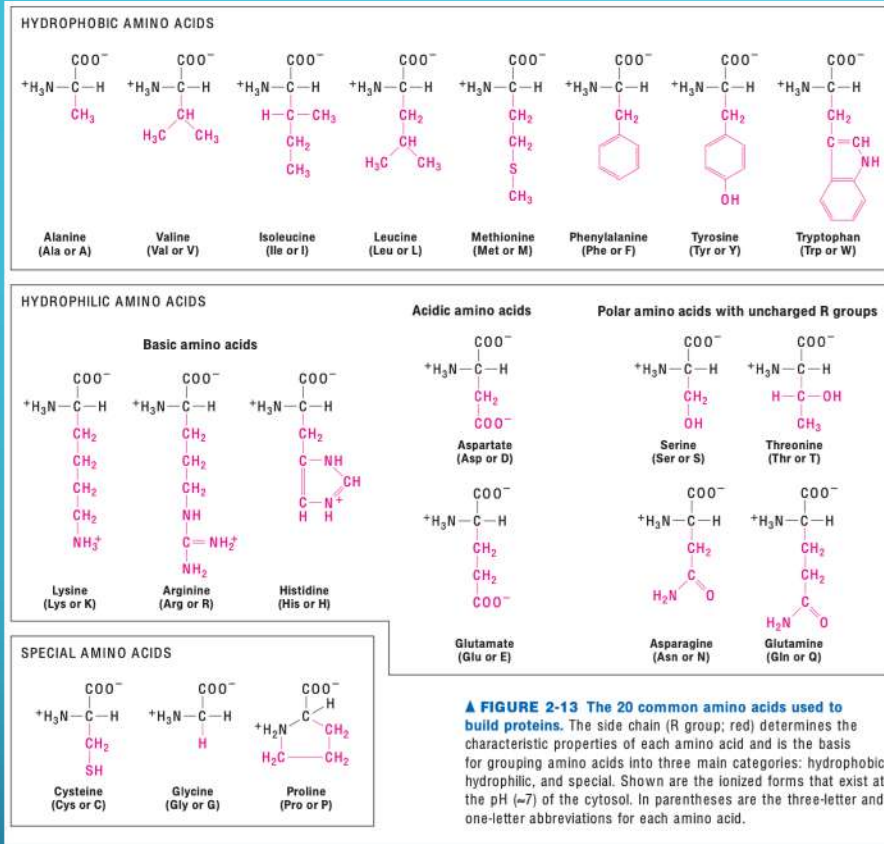
Chart Key: ● ALIPHATIC ● AROMATIC ● ACIDIC ● BASIC ● HYDROXYLIC ● SULFUR-CONTAINING ● AMIDIC ○ NON-ESSENTIAL ○ ESSENTIAL

Chemical Structure	NAME	Three letter code	DNA codons
	ALANINE (A)	Ala	GCT, GCC, GCA, GCG
	GLYCINE (G)	Gly	GGT, GGC, GGA, GGG
	ISOLEUCINE (I)	Ile	ATT, ATC, ATA
	LEUCINE (L)	Leu	CTT, CTC, CTA, CTT, TTA, TTG
	PROLINE (P)	Pro	CCT, CCC, CCA, CCG
	VALINE (V)	Val	GTT, GTC, GTA, GTG
	PHENYLALANINE (F)	Phe	TTT, TTC
	TRYPTOPHAN (W)	Trp	TAT, TAC
	TYROSINE (Y)	Tyr	TAT, TAC
	ASPARTIC ACID (D)	Asp	GAT, GAC
	GLUTAMIC ACID (E)	Glu	GAA, GAG
	ARGININE (R)	Arg	CCT, CCG, CCA, CCG, ACA, AGG
	HISTIDINE (H)	His	CAT, CAC
	LYSINE (K)	Lys	AAA, AAG
	SERINE (S)	Ser	TCT, TCC, TCA, TCG, AGC, AGC
	THREONINE (T)	Thr	ACT, ACC, ACA, ACG
	CYSTEINE (C)	Cys	TGT, TGC
	METHIONINE (M)	Met	ATG
	ASPARAGINE (N)	Asn	AAT, AAC
	GLUTAMINE (Q)	Gln	CAA, CAG

Note: This chart only shows those amino acids for which the human genetic code directly codes for. Selenocysteine is often referred to as the 21st amino acid, but is encoded in a special manner. In some cases, distinguishing between asparagine/aspartic acid and glutamine/glutamic acid is difficult. In these cases, the codes asx (B) and glx (Z) are respectively used.

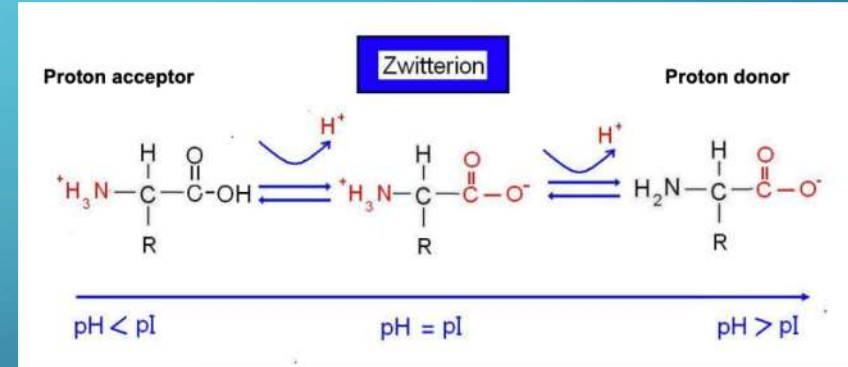
© COMPOUND INTEREST 2014 - WWW.COMPOUNDCHEM.COM | Twitter: @compoundchem | Facebook: www.facebook.com/compoundchem
Shared under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives license.





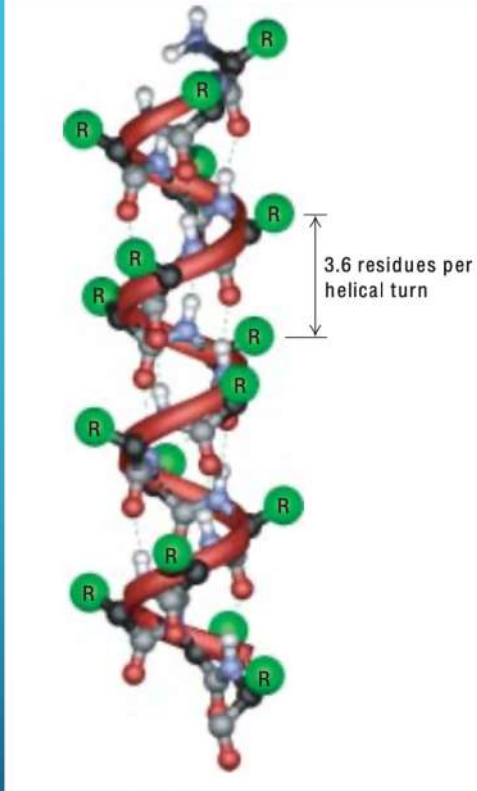
Aromatik R grubu olan aa nedeniyle proteinler ultraviyole ışığı absorplar. (Tirozin, fenilalanin, triptofan)
 Çoğu protein 280 nm dalga boyunda güçlü absorbands gösterir. Bu özellik protein çalışmalarında önemlidir.

aa'ler suda çözüldüklerinde hem asit hem baz gibi davranabilirler. Böyle dipolar iyonlara 'zwitterion' denir. suda çözülen aa'in net yükü 0 olur ve ortamın o andaki pH değeri bu aa'in **izoelektrik noktası (pI)**'na eşittir.

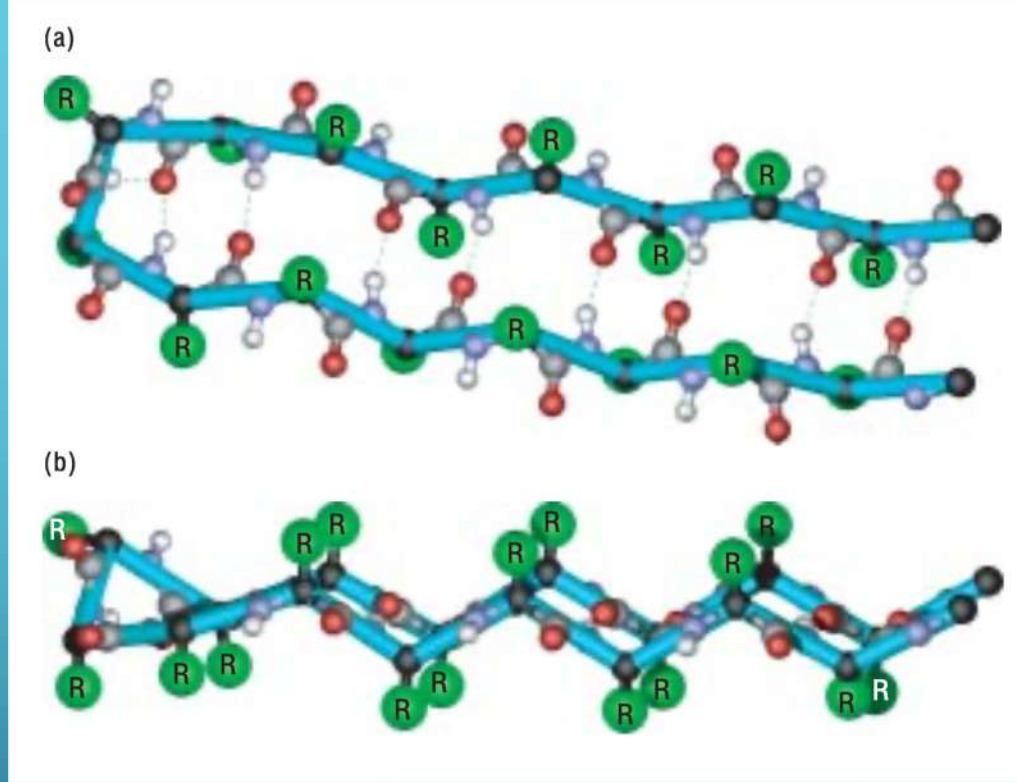


Hidrofilik aa'lerin bir kısmı fizyolojik pH'da iyonizedir. Histidin, asitlikteki küçük değişimlerle ya + yüklenir ya da yüksüzdür. Birçok proteinin aktivitesi R gruplarındaki histidinin ortam asiditesindeki değişimlerle protonasyonuna göre ayarlanır. Asparağın, glutamin ve serin, treonin yüksüzdür ama R gruplarında N ve Q polar amid; S ve T polar hidroksil grupları taşırlar.

PROTEİNLERİN SEKONDER YAPILARI



α -heliks: Her peptid bağındaki karbonilin O atomu ile 4 sonraki aa rezidüsünün amid H arasında oluşan Hidrojen bağlarıyla ortaya çıkar



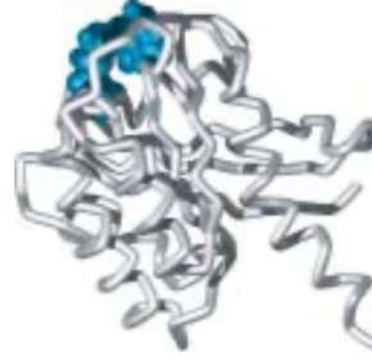
β -tabaka: Komşu lateral paketlenmiş β tabakalar arasındaki Hidrojen bağlarıyla stabilize edilir. Her β -iplik 5-10 aa rezidülük kısa segmentlerdir. Proteinlerin hidrofobik kor bölgelerinde çok fazla β -tabaka yapısı gözlenir. Bazı proteinlerin bağlanma bölgelerinde düzlem oluştururlar.

rasgele sarım (random-coil)
dönüş (turn)
ilmik (loop)

PROTEİNLERİN ÜÇÜNCÜL YAPILARI

2° yapılar da gözlenen H-bağları yerine, esasen nonpolar R grupları arasındaki hidrofobik interaksyonlarla stabilize olurlar. Ek olarak polar R grupları arasındaki H-bağları ve peptid bağları da tersiyer yapı konformasyonuna katkı sağlar. Üçüncül yapıyı birarada tutan güçler, ikincil yapı elemanlarının kompakt olarak birarada durmasını sağlar. Proteinlerin üçüncül yapılarındaki stabilizatör interaksyonlar daha zayıftır. Dalgalanan gevşemeler protein fonksiyonunun regülasyonunda oldukça önemlidir.

(a) C_α backbone trace



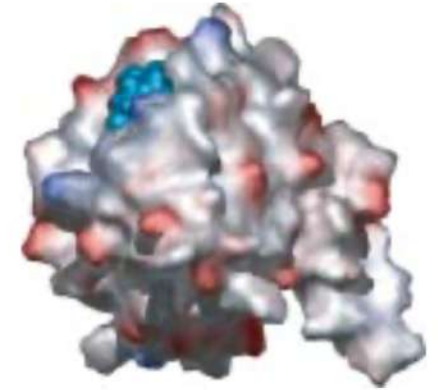
(b) Ball and stick



(c) Ribbons

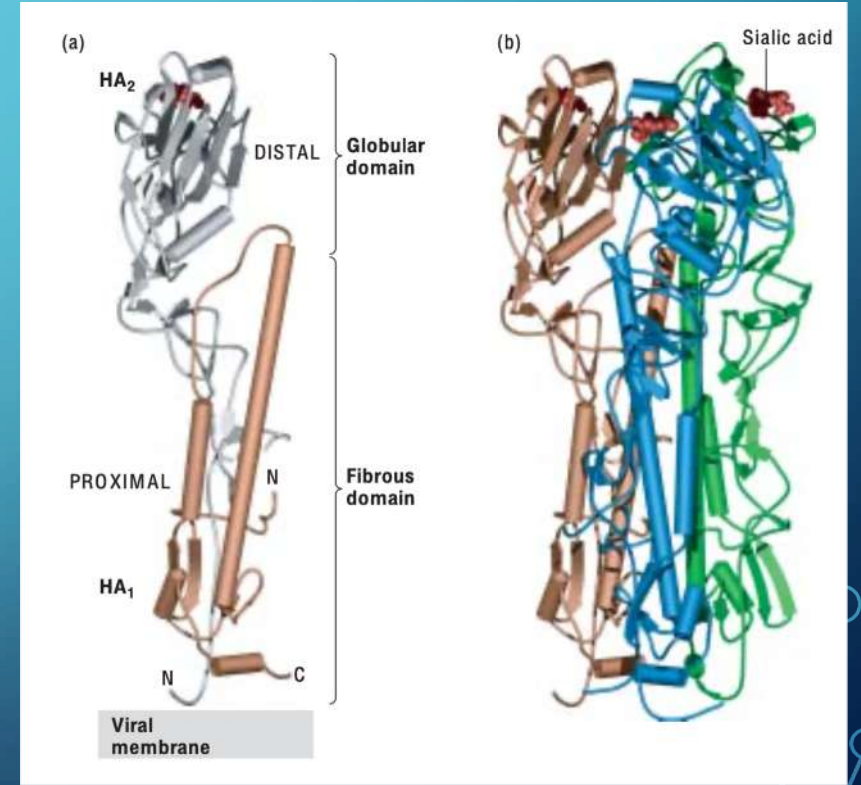


(d) Solvent-accessible surface



PROTEİNLERİN DÖRDÜNCÜL YAPILARI

- Yapısal ve fonksiyonel domeynler birleşip başka bileşenleri de katarak fonksiyonel kompleksler oluşturur.
- Influenza virüsünün hemagglutinin proteini 3° ve 4° yapıları:
 - HA1 ve HA2 polipeptid zincirlerinde 2° yapılar
 - Protein üç subunitesinde fibröz domeynlerdeki heliksler arası interaksiyonlarla 4° yapı stabilize olmuştur.



PROTEİN EKSTRAKSİYONU

- Proteinin yerine göre ilk aşamalar belirlenir
- Ekstrasellüler proteinler santrifüleme veya filtrasyonla
- Membrana bağlı veya intrasellüler proteinler önce homojenize edilir: mekanik, ultrasonikasyon (18 kHz üzeri), ozmotik şok (%20 sükröz-su), dondurma-çözme gibi fiziksel veya solvent (SDS), enzimatik (lizozim, tripsin, proteinaz K) gibi kimyasal yöntemler
- Proteaz inhibitörü gerekebilir (fenilmetilsülfonil PMSF)

PROTEİN KONSANTRASYONUNUN BELİRLENMESİ

- Protein miktarının belirlenmesi ayırma ve saflaştırma deneylerinde bazı aşamalarda mutlaka yapılır. Özellikle elektroforetik ve kromatografik ayırmalarda optimizasyon amacıyla mutlaka miktar tayini yapılır.

PROTEİN KONSANTRASYONUNUN BELİRLENMESİ

- **A_{280}/A_{260} Oranı (Warburg-Christian yöntemi):** Aromatik aa nedeniyle birçok protein 280 nm dalga boyunda max absorpsiyon gösterir. Nükleik asitler 260 nm'de ancak 280 nm'de de absorpsiyon verir, kontaminasyon ekstremelerde hatalı sonuç gelebilir. Duyarlılığı çok yüksek değildir.
- **Biüret:** Biüret belirtecindeki Cu^{2+} iyonları, aa azotlarına bağlanır, alkali ortamda 540-560 nm'de absorpsiyon veren renkli bir kompleks oluşturur.
- **Bradford:** Coomassie brilliant blue bazı aromatik aa'lere bağlanır. Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan protein çözeltilerinde değişik şiddette mavi renk ortaya çıkar. Absorpsiyon-konsantrasyon grafiği çizilerek örnek protein derişimi bulunur.
- **Lowry:** Fosfomolibdotungstik asit çözeltisinin tirozin rezidüleriyle reaksiyona girerek mavi renk oluşturması esasına dayanır.

POLİAKRİLAMİD JEL ELEKTROFOREZİ

- Proteinler izoelektrik noktalarının (pI) üzerindeki pH değerlerinde (-) yüklüdür, elektriksel alanda anoda göç ederler veya tam tersi.
- Poliakrilamid destek matriksi; akrilamid monomerlerinin bis (N,N'-metilen-bis-akrilamid) çapraz bağlayıcı (cross-linker) moleküller aracılığıyla kovalent bağlanmasından oluşan bir polimerdir. Bis eklenmesiyle jel matriksinde polipeptidlerin geçebileceği porlar oluşur.
- Kimyasal (amonyum persülfat veya riboflavin) veya fotokimyasal (floresan ışık) olarak polimerizasyon başlatılır.
- Her ikisinde de TEMED (N,N,N',N'-tetrametilenetilendiamin) katalizör olarak kullanılır.

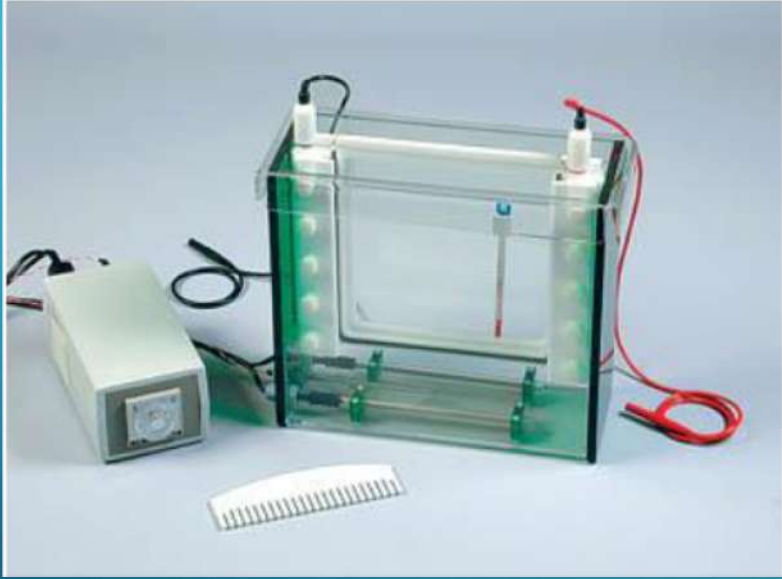
PAGE

- Jelde por çapının büyüklüğü akrilamid ve bis içeriğini ifade eden %T (total akrilamid yüzdesi w/v) ve %C_{bis} (bis'in monomere oranı w/w) değerleriyle belirlenir:

$$\% T = \frac{\text{Akrilamid (g) + Bis (g)}}{\text{Hacim (ml)}} \times 100$$
$$\% C_{\text{bis}} = \frac{\text{Bis (g)}}{\text{Akrilamid (g) + Bis (g)}} \times 100$$

- %T arttıkça por çapı küçülür. Herhangi %T koşulunda %5 bis bulunması optimum por büyüklüğünü sağlar. %5'in altındaki ve üstündeki %C_{bis} değerleri por büyüklüğünü artırır.

PAGE



- Tampon kesiksiz (continuous) veya kesikli (discontinuous) olabilir.
- Kesiksiz: Tek bir ayırıcı jel bulunur. Tanklarda ve jelde aynı tampon kullanılır.
- Kesikli: Jel farklı tamponlarla hazırlanmış 2 kısımdan oluşur:

1- büyük porlu yükleme jeli (%5 total akrilamid)

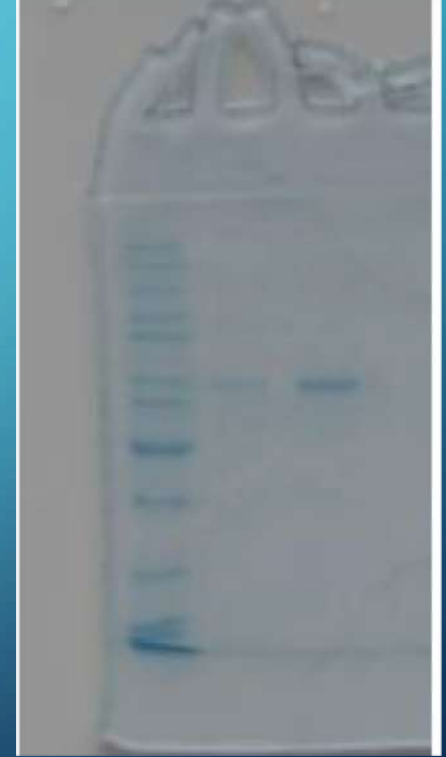
2- küçük porlu ayırma jeli (%10 total akrilamid)

Kesikli sistemde tankta kullanılan tampon da farklı seçilerek jel boyunca pH gradyenti oluşturulur.

Daha seyreltik örnekler için uygun ayırıştırma sağlanır.

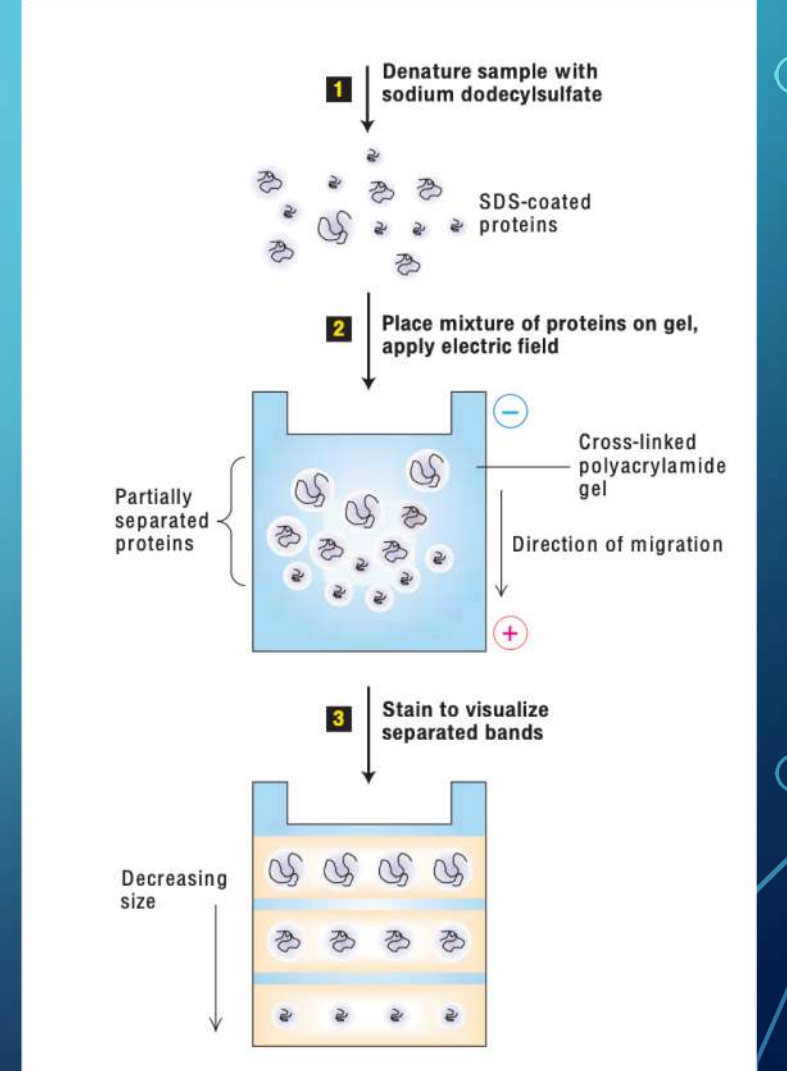
PAGE

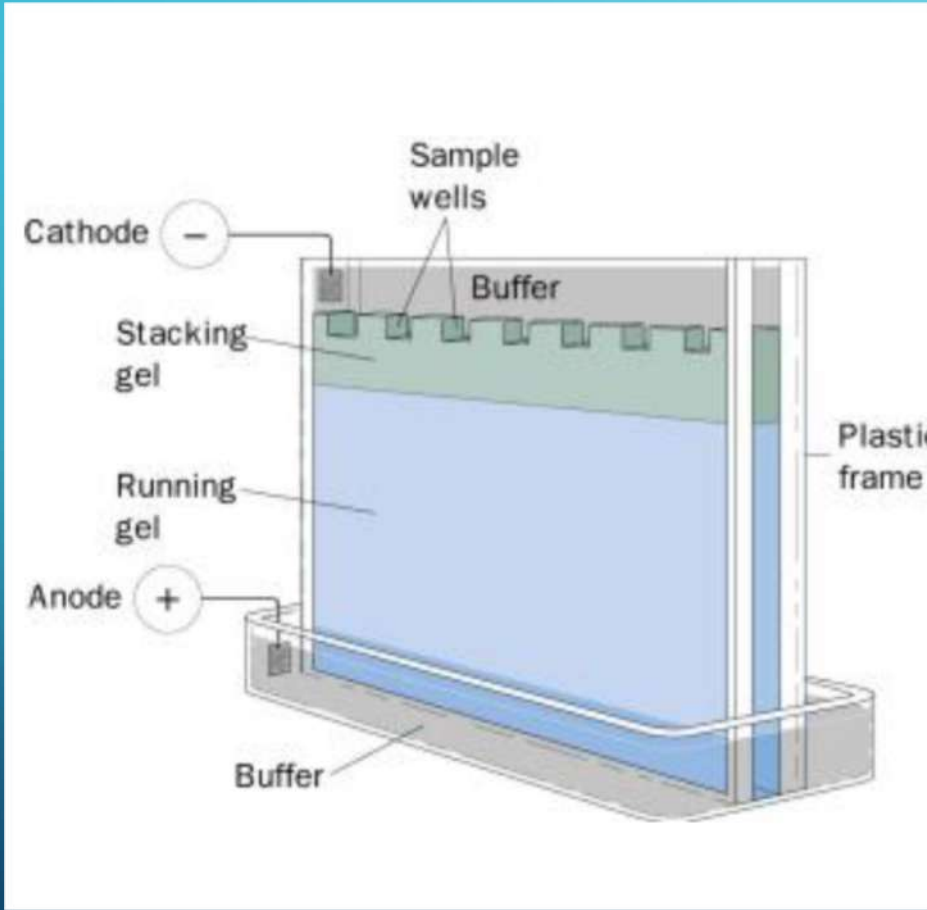
- Elektroforezi takip etmek için bromofenol mavisiyle jel boyanır.
- Elektroforetik ayrımın sonunda proteinler ya doğrudan jel üzerinde ya da sabit bir yüzeye aktarıldıktan sonra analiz edilir.
- Jeldeki proteinler Coomassie brilliant blue veya gümüş nitratla, filtreye emdirilmiş proteinler ise amido black, Hint mürekkebi veya Ponceau S gibi boyalarla boyanır.



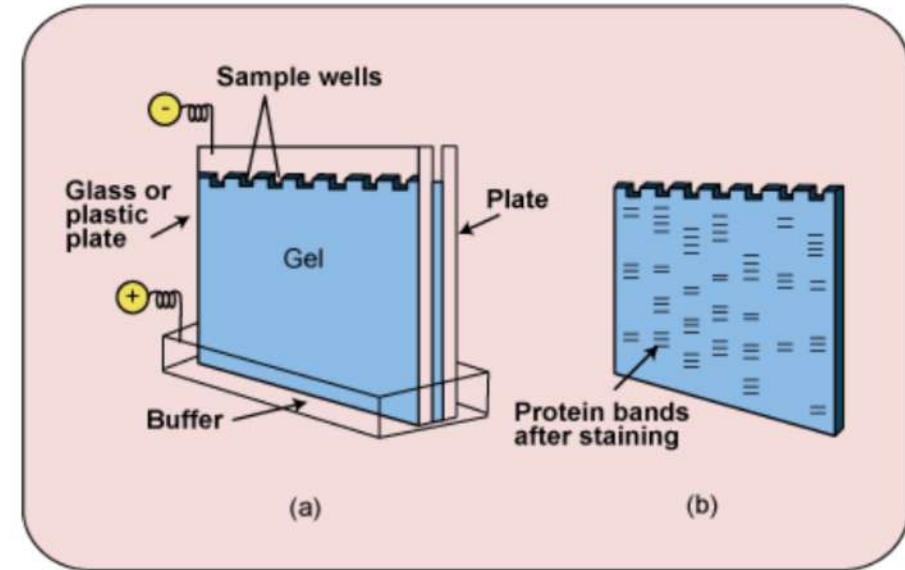
PROTEİN ELEKTROFOREZİ

- Proteinler denatüre (SDS-PAGE) bir jelde moleköl büyüklüğüne; doğal (native) bir jelde ise moleköl biçimi, büyüklüğü ve yüküne göre ayrılırlar.
- Denatüre ortamda elektroforez moleköl ağırlığı belirlemelerinde kullanılır. Bu tür elektroforetik ayırmada çözünürlüğü az olan proteinlerin ayrışması sağlanabilir. Ancak kullanılan 2-merkaptoetanol, DTT ve SDS varlığında biyolojik aktivite ortadan kalkar.
- Native elektroforezde suda çözünebilen proteinler biyolojik ve enzimatik aktivitelerini kaybetmeden ayrılırlar.





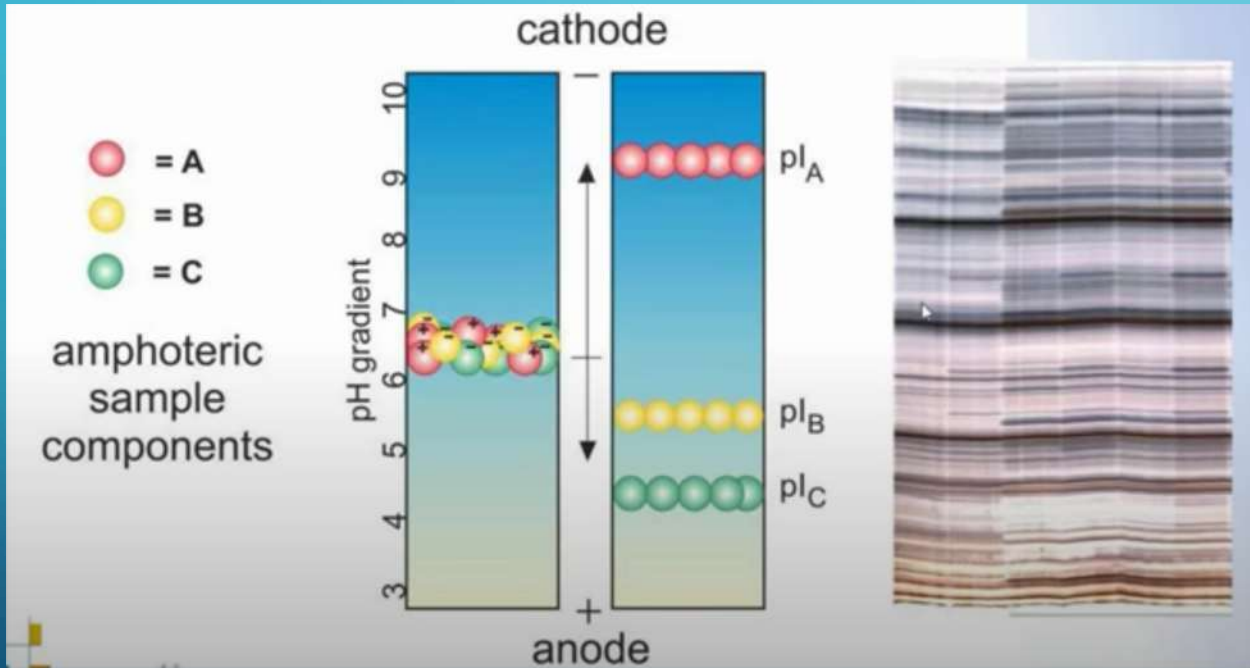
Düzlemsel poliakrilamid jel belli uzaklıkta (0.5-2 mm) tutulan iki cam plaka (jel kaseti) arasında ve genellikle 8x10 cm veya 10x10 cm boyutunda hazırlanır. Polimerizasyon plakaların içinde gerçekleştirilir.



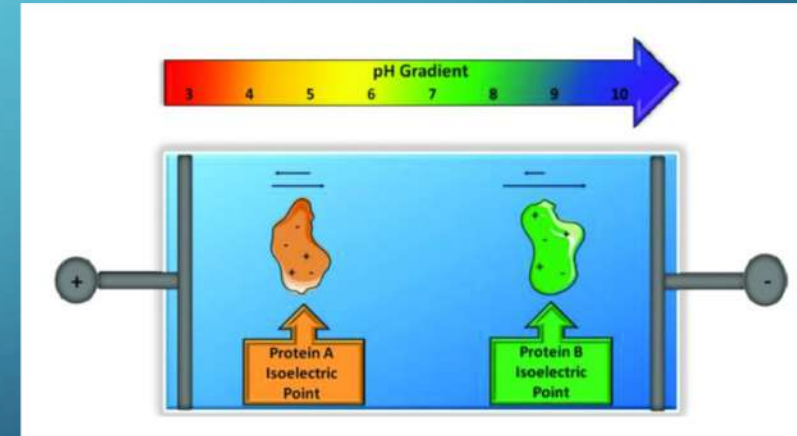
İZOELEKTRİK FOKUSLAMA VE 2 BOYUTLU JEL ELEKTROFOREZİ (2-DE)

- Polipeptidlerin farklı izoelektrik noktalara sahip olmalarından yararlanılarak ayrılmalarını sağlayan bir yöntemdir.
- Analitik veya preparatif amaçla tek başına da yapılır. 2-DE'in birinci boyutunu da oluşturabilir.
- Jel boyunca pH gradyenti oluşturmak için izoelektrik noktaları belli düşük molekül ağırlıklı amfolitler kullanılır. Ayrım hem geniş pH aralığında hem daha dar pH aralıklarında gerçekleştirilebilir.

PROTEİNLERİN İZOELEKTRİK FOKUSLANMASI (1. BOYUT)



Farklı pI noktaları olan proteinler, pH gradyenti gösteren elektrik alan içerisinde protein net yükü 0 olana kadar göç eder.

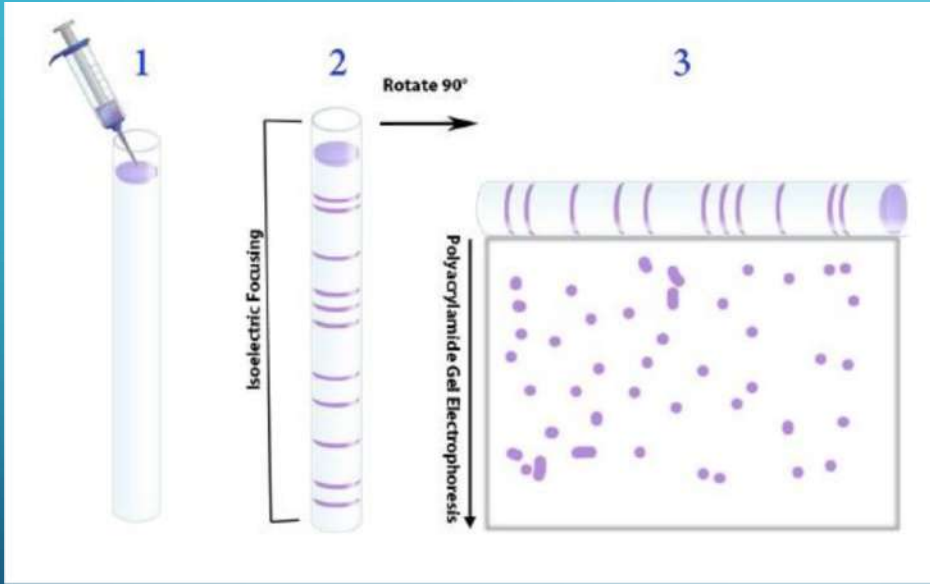


IEF (1. BOYUT)

- Immobilize pH gradyent (IPG) jellere amfolit solüsyonları eklenir. IPGler pH gradyenti olan akrilamid jel matriksleridir. pK değerine göre zayıf asit veya baz olan immonilinler kullanılarak hazırlanır. Oranı sürekli değiştirilerek immobilize pH gradyanı elde edilir.
- IPG jelde proteinler koşunca, her protein pl noktasında denk gelen pH bölgesinde güçlü bantlar oluşturur.

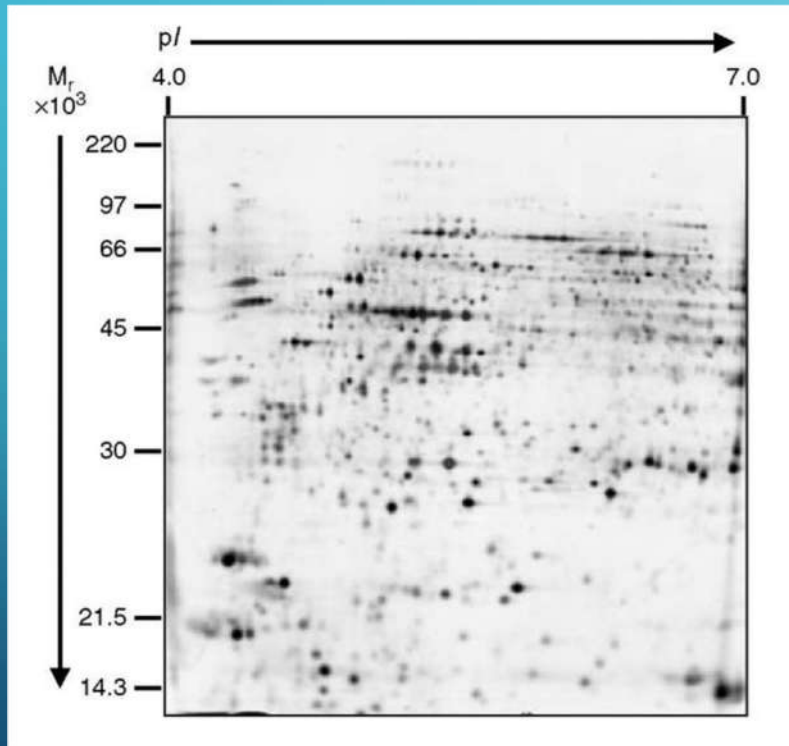


SDS-PAGE (2. BOYUT)



- IPG'nin boyutuna uygun bir SDS-PAGE hazırlanır. Proteinler IPG'de koşarken hazırlanır.
- Denatüre edici jelin üzerine dengeleme tamponu eklenir ve IPG'nin kolay yerleşmesi sağlanır.
- Elektroforez tankına elektriki alan uygulanır.
- Düzlemsel jel çıkarılıp boyanır.

2D-PAGE ÖRNEĞİ



A two-dimensional electrophoresis (2-DE) separation of proteins solubilized from brain grey matter. The first dimension comprised an 18-cm nonlinear pH 4-7 immobilized pH gradient (IPG) subjected to isoelectric focusing. The second dimension was a 21-cm 12% SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) gel. Proteins were detected by silver staining. The nonlinear pH range of the first-dimension IPG strip is indicated along the top of the gel, acidic pH to the left. The Mr (relative molecular mass) scale can be used to estimate the molecular weights of the separated proteins