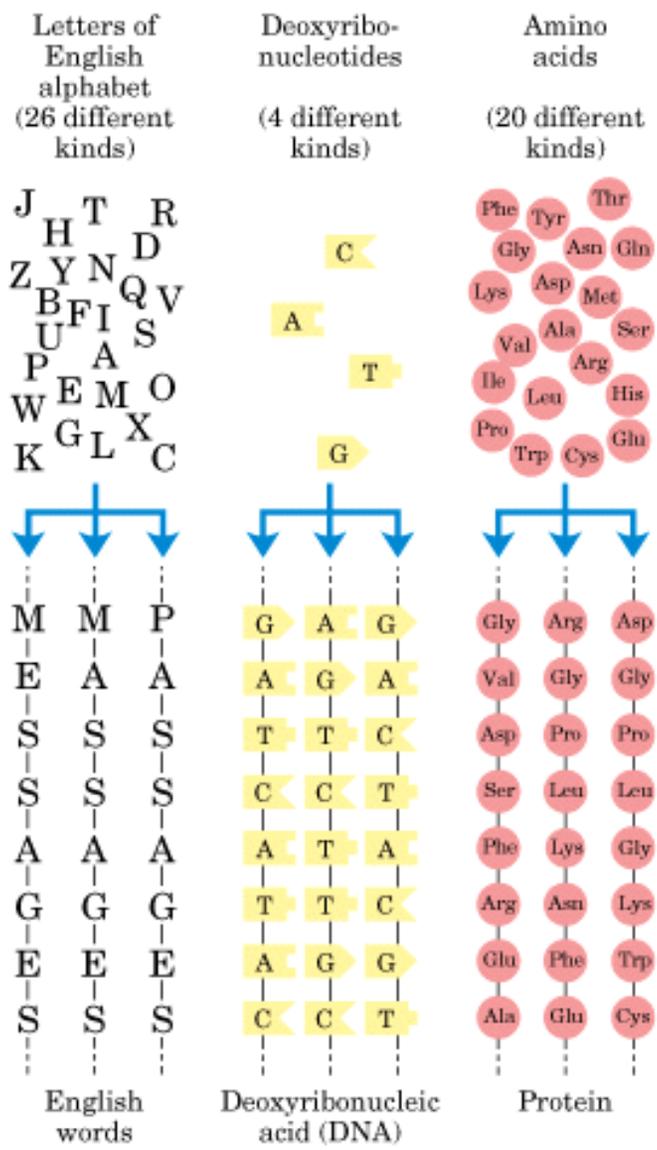


Propiedades de las proteínas y técnicas de análisis.

Carlos Morgan
INTA, Universidad de Chile
7 de julio de 2009

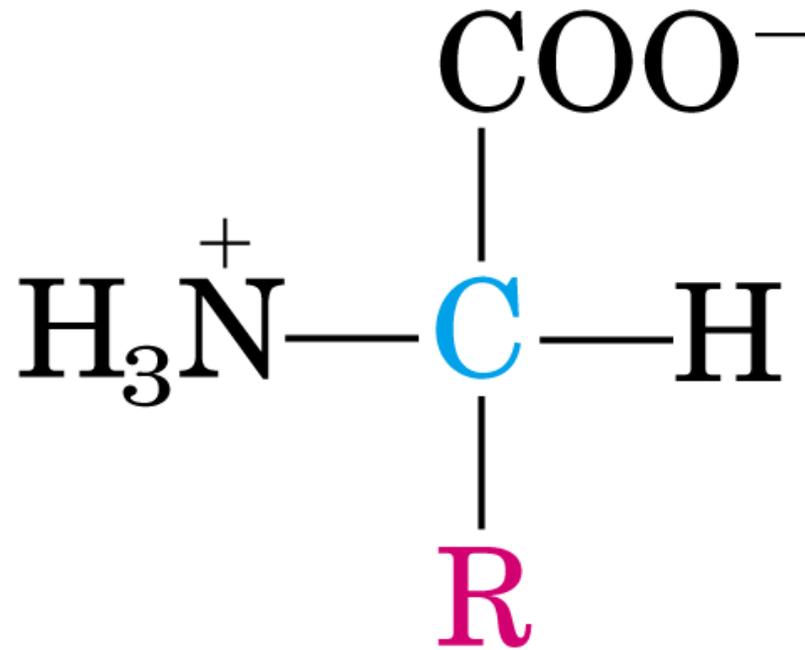
Monomeric subunits



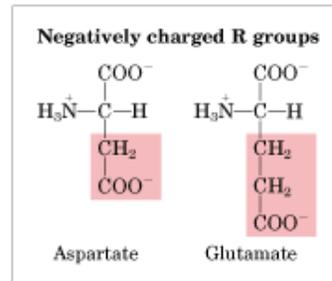
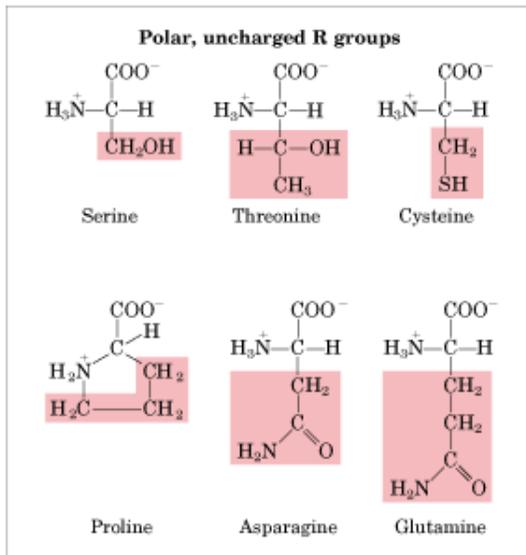
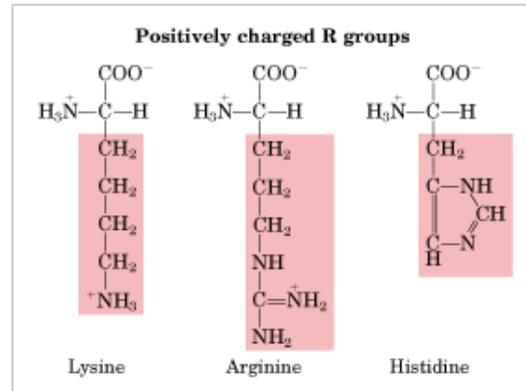
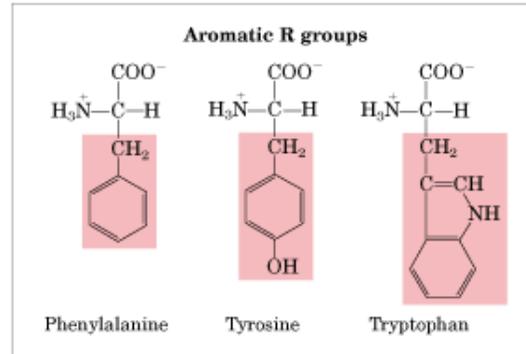
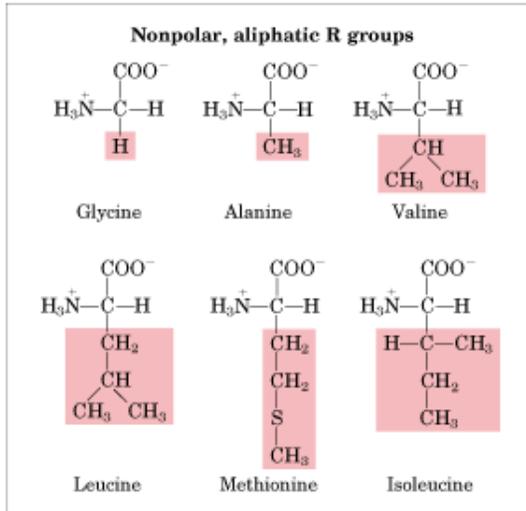
Ordered linear sequences

For a segment of 8 subunits, the number of different sequences possible =

26^8 or 2.1×10^{11}	4^8 or 65,536	20^8 or 2.56×10^{10}
--------------------------------	-----------------	---------------------------------



α -aminoácido denota que un mismo carbono une un grupo carboxilo y un grupo amino



Potencialmente, con 20 aminoácidos
Se podrían formar:

$$20^2=400 \text{ dipéptidos diferentes}$$

$$20^3=8000 \text{ tripéptidos diferentes}$$

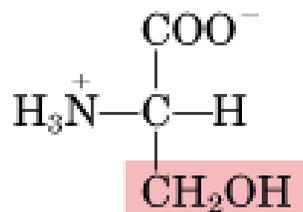
$$20^{100}=1.27 \times 10^{130}$$

Proteínas diferentes conteniendo
100 residuos de aminoácidos.

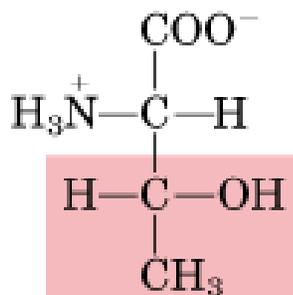
El número de átomos del universo
Es estimada en 9×10^{78} .

Los aminoácidos pueden diferenciarse
por su polaridad,
propiedades ácido-base,
Hidrofobicidad, tamaño, flexibilidad
conformacional, reactividad química,
capacidad de formar puentes de
hidrógeno.

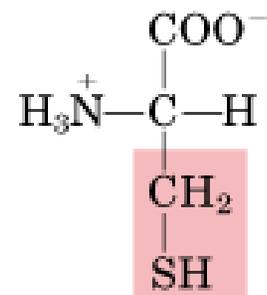
Polar, uncharged R groups



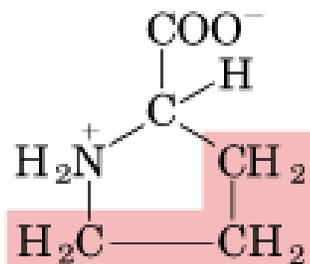
Serine



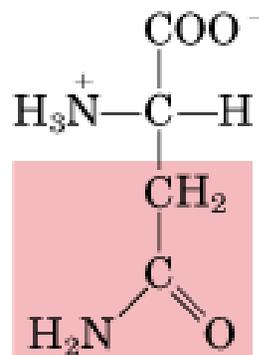
Threonine



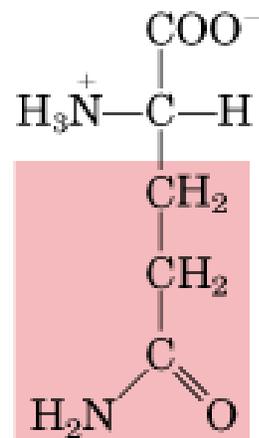
Cysteine



Proline



Asparagine

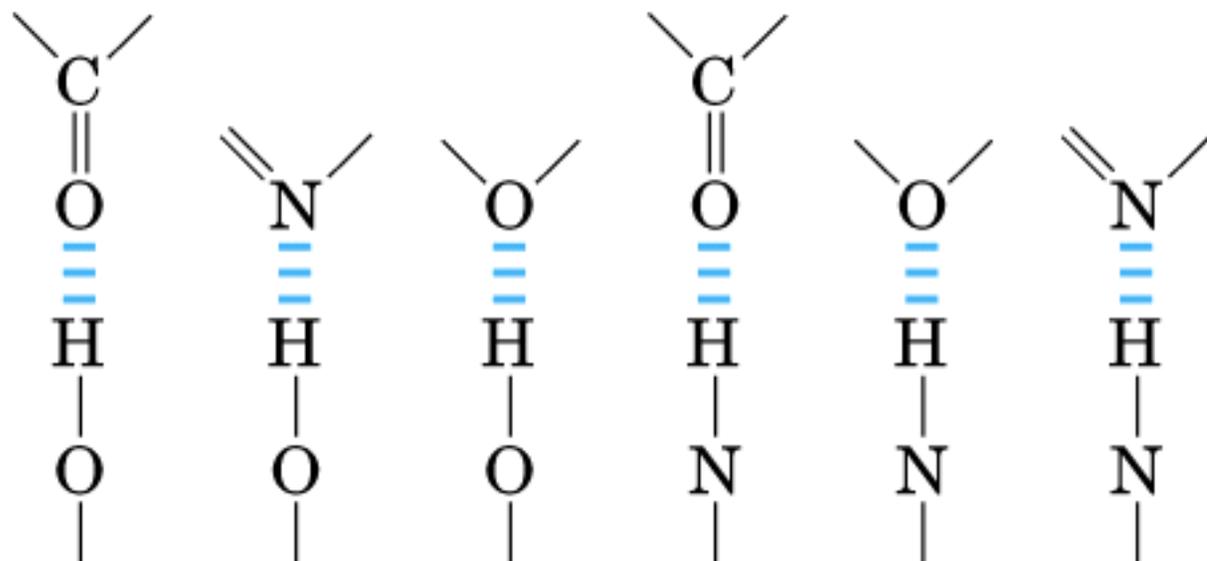


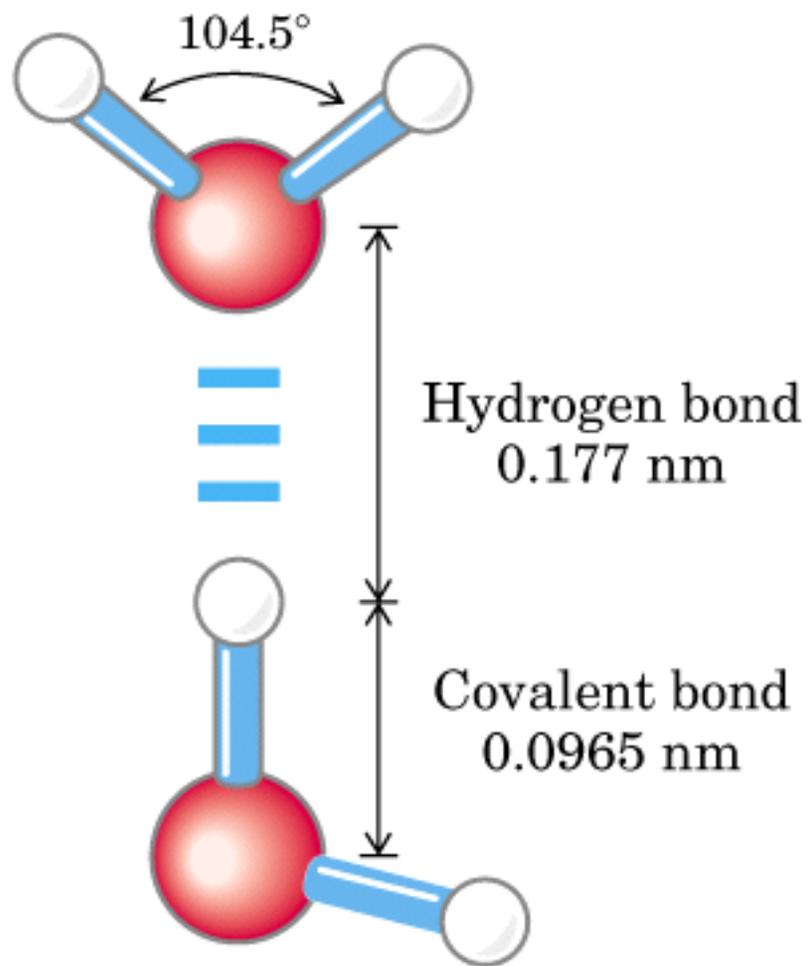
Glutamine

Las cadenas laterales de estos aminoácidos son capaces de establecer puentes de Hidrógeno

Hydrogen
acceptor

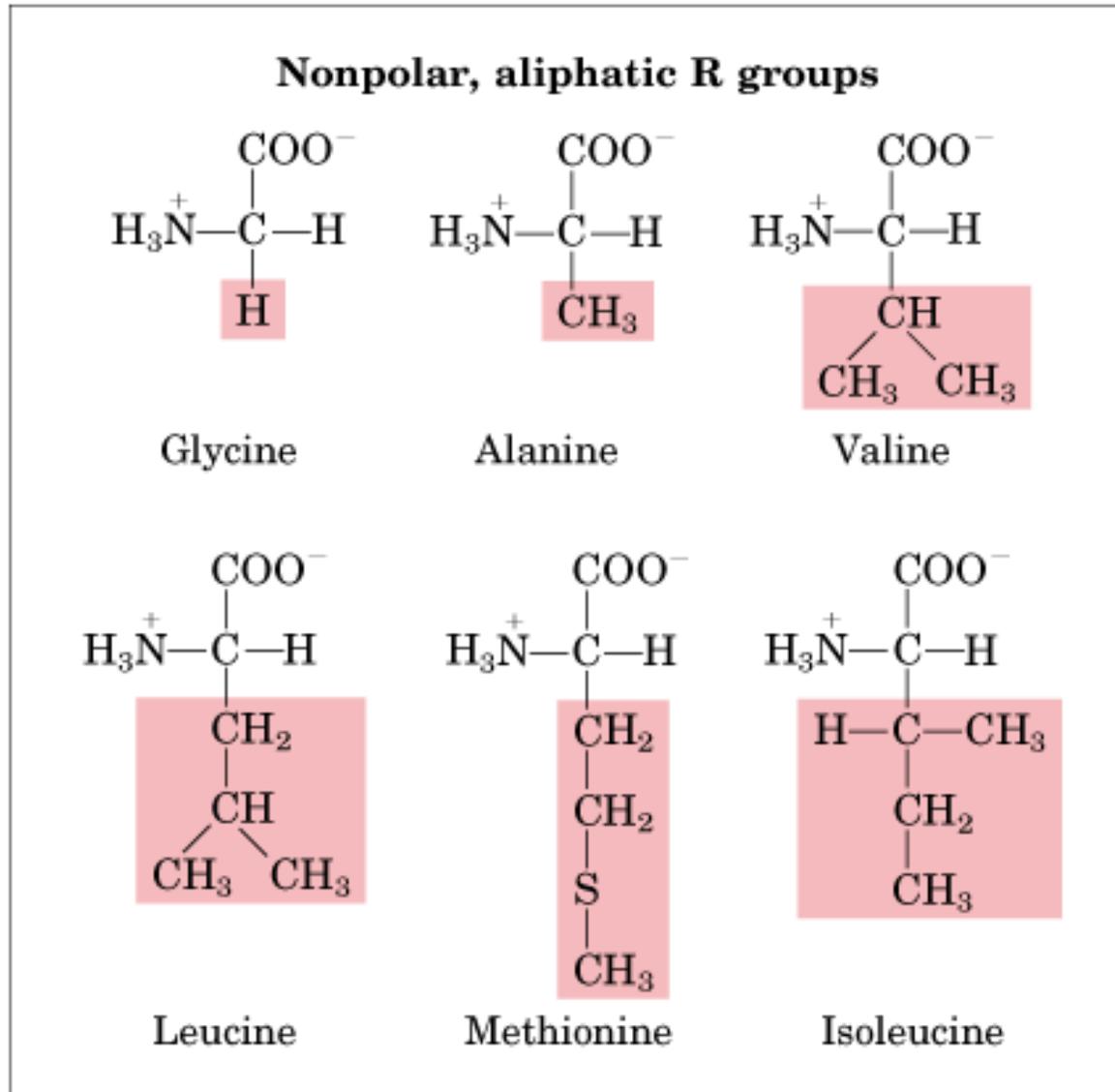
Hydrogen
donor



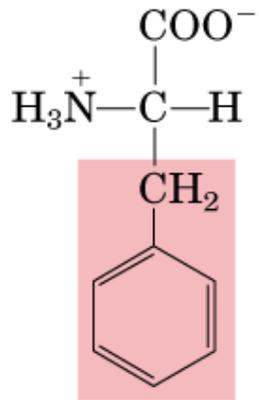


(c)

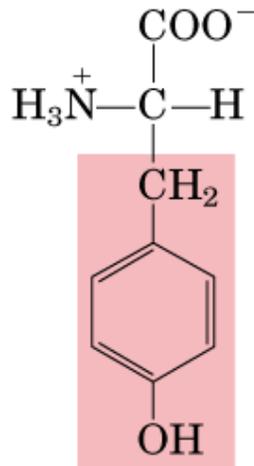
Las cadenas laterales no polares interactúan a través de interacciones hidrofóbicas, tales como Interacciones de Van der Waals, que corresponden a interacciones débiles, en estrechos rangos de Distancia (en el radio de Van der Waals). Los grupos apolares son incapaces de formar interacciones Polares, tales como puentes de Hidrógeno o interacciones iónicas.



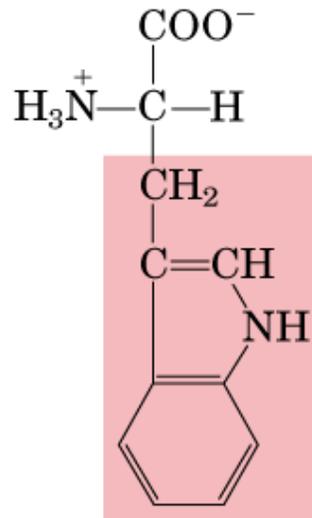
Aromatic R groups



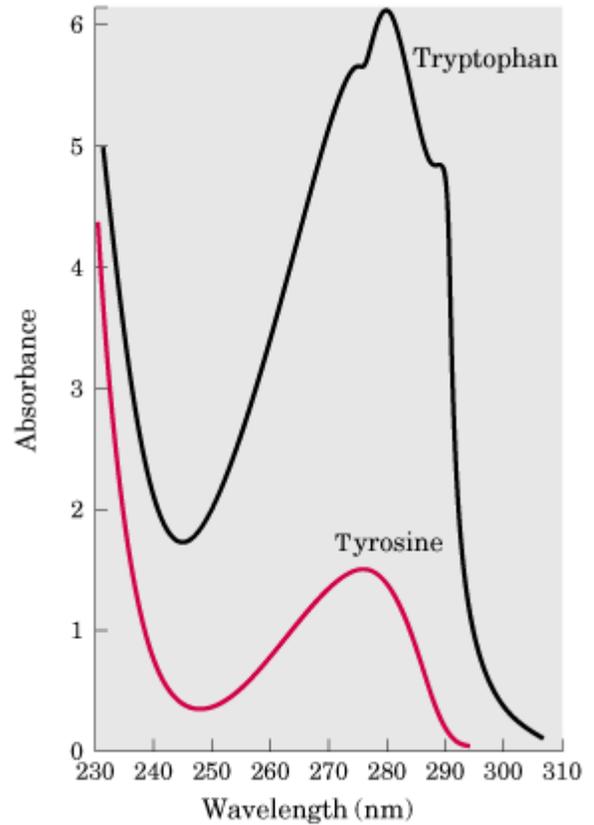
Phenylalanine



Tyrosine

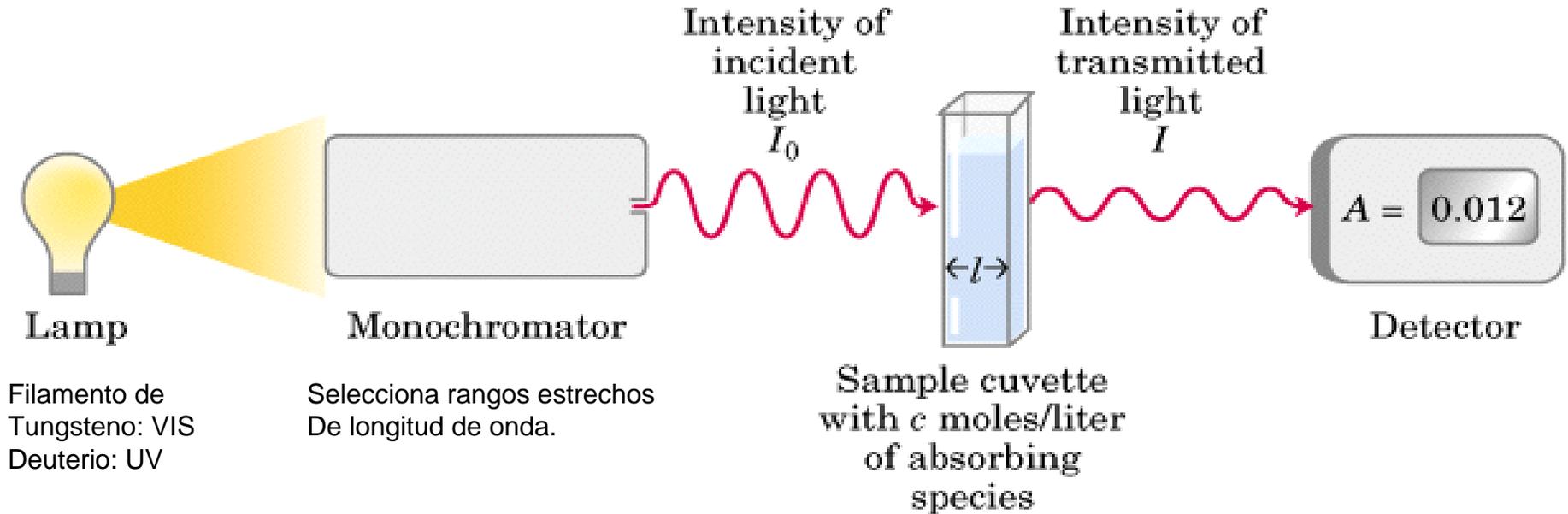


Tryptophan



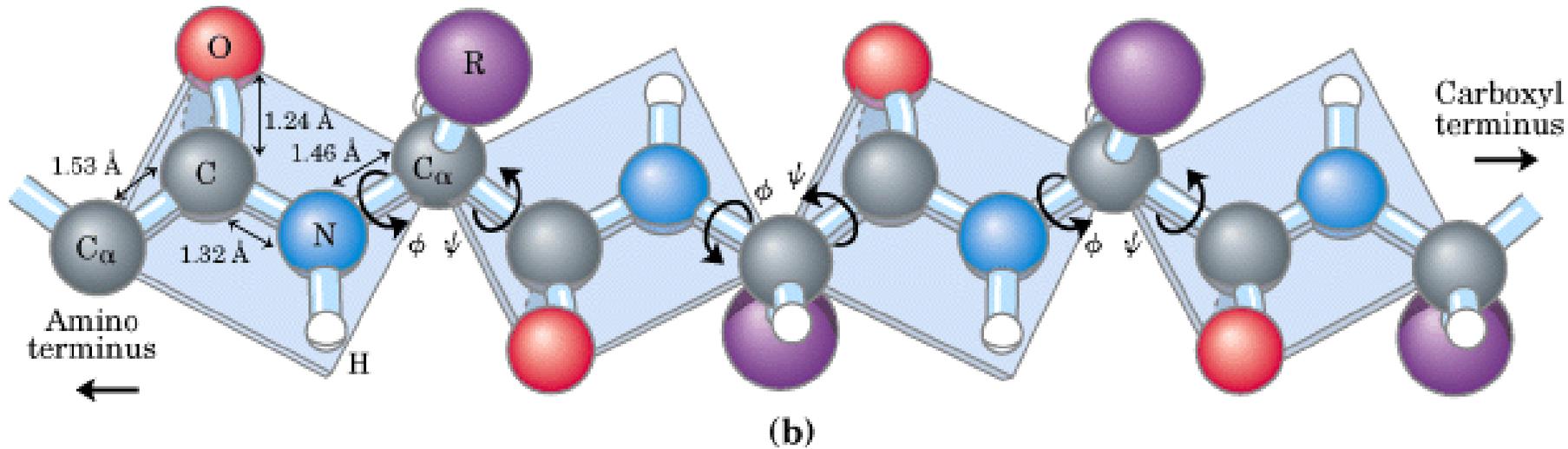
Los residuos aromáticos absorben luz ultravioleta, alrededor de los 280 nm de longitud de onda. Estos grupos son capaces de formar interacciones hidrofóbicas, principalmente entre grupos aromáticos.

Un cromóforo es una molécula capaz de absorber luz en un cierto rango de longitudes de onda característico, en el espectro UV-VIS. La absorbancia de un compuesto en solución es medida en un espectrofotómetro.



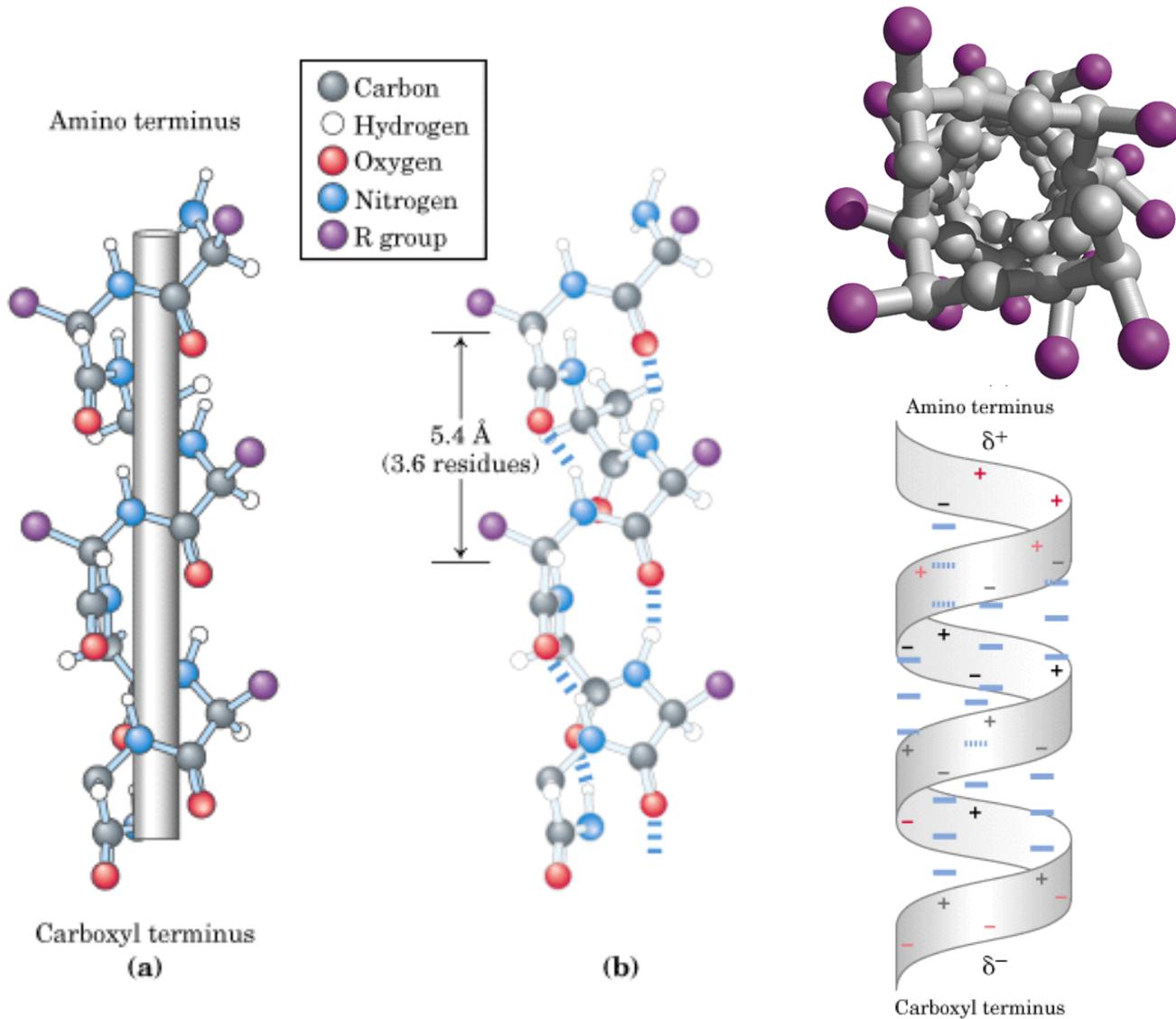
Si $A > 0$; $I < I_0$ $A = \log(I_0/I)$ $A = \epsilon Cl$ (Ec. de Lambert-Beer)

A , absorbancia; I_0 , intensidad de luz incidente; I intensidad de luz transmitida al atravesar la muestra en un trayecto l .



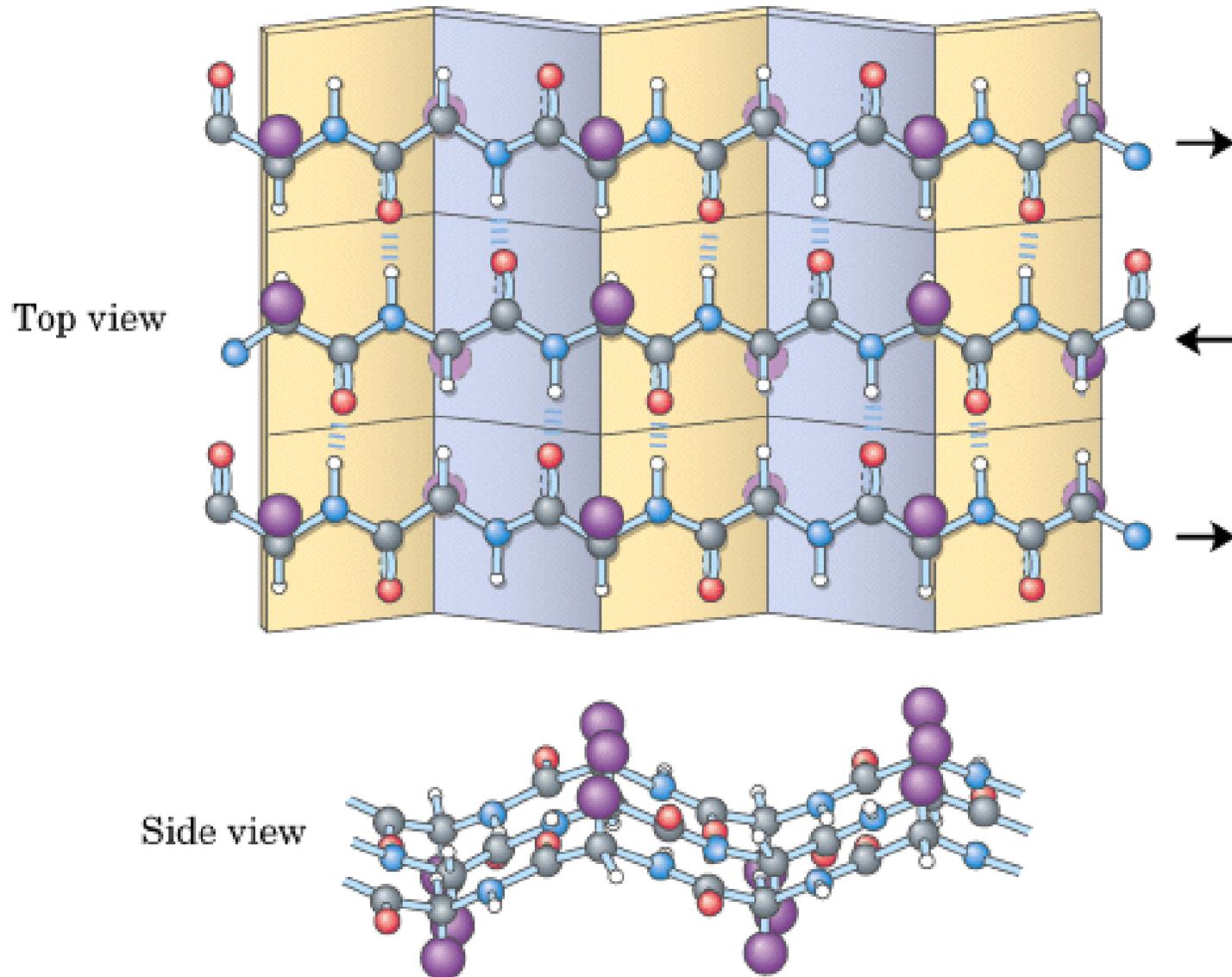
Los ángulos de torsión en torno al Carbono alfa permiten flexibilidad conformacional a la cadena principal (cadena polipeptídica, sin considerar los grupos de cadena lateral, característicos de cada aminoácido).

Estructuras secundarias: el alfa hélice



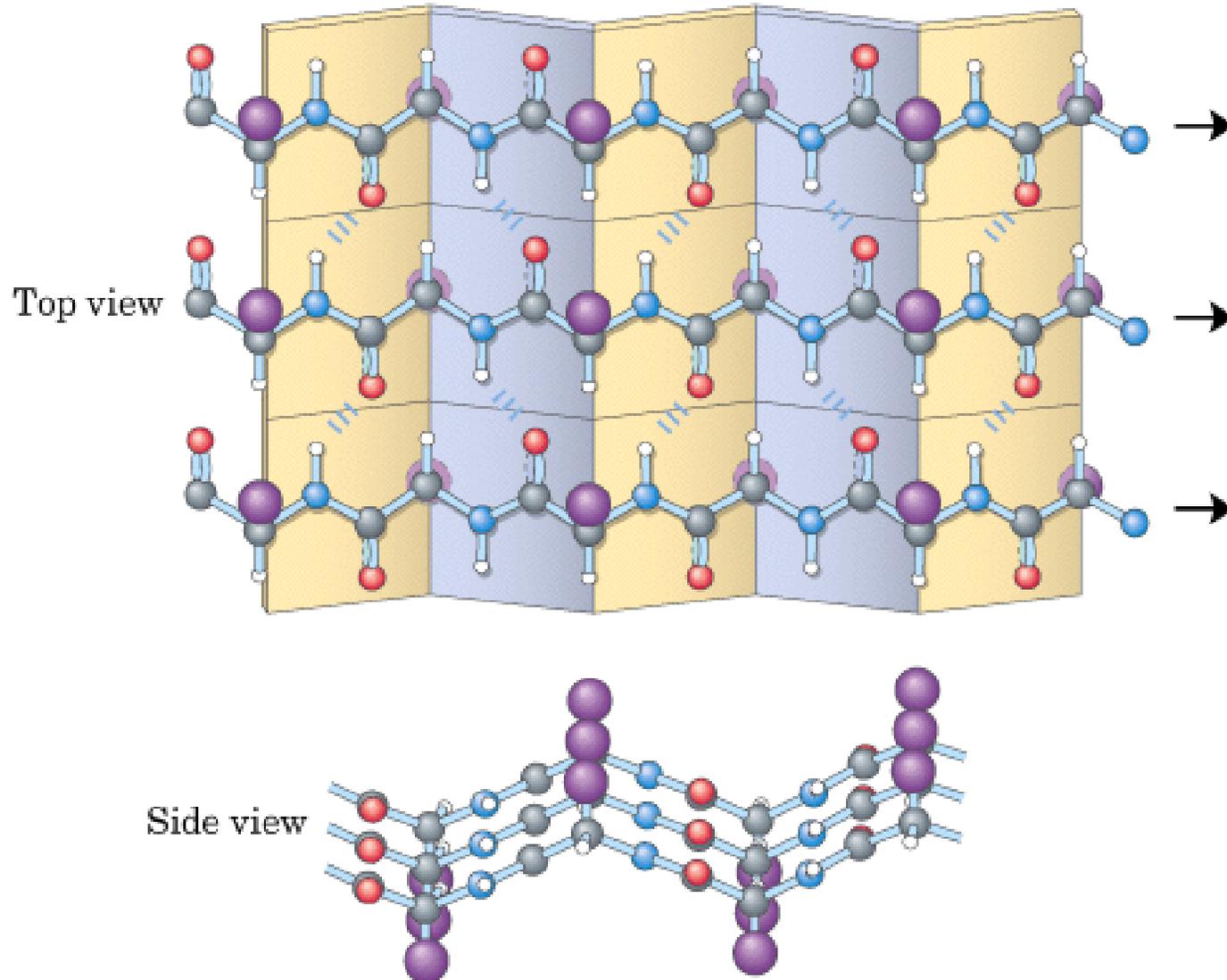
Hoja β antiparalela (los puentes de H corren perpendiculares a la cadena principal).
Una hoja β es el arreglo de varias hebras β .

(a) Antiparallel

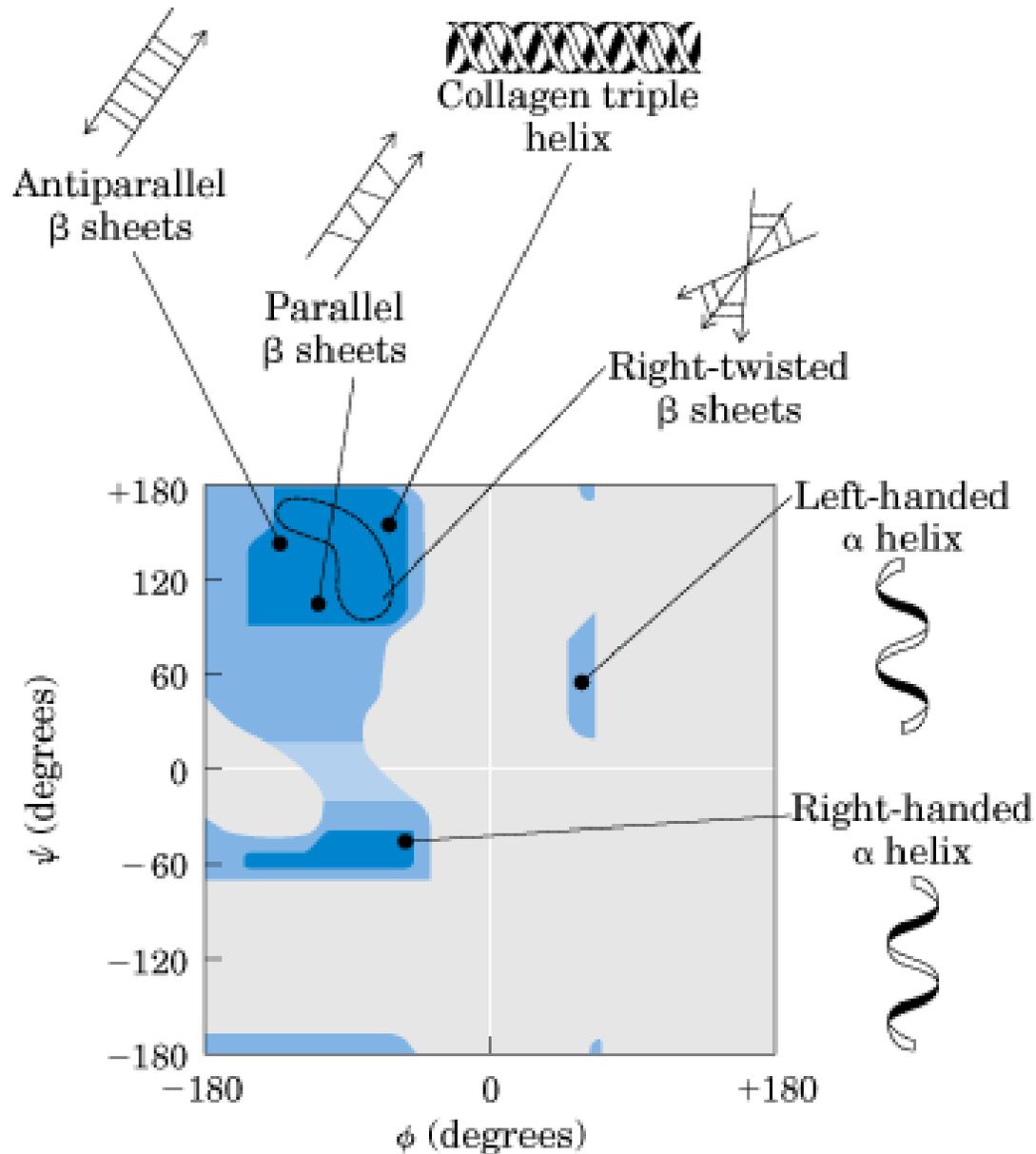


Hoja β paralela. Los puentes de H corren oblicuos a la cadena principal

(b) Parallel



Un subconjunto restringido de valores para los ángulos de torsión de la cadena principal son observados en proteínas y se pueden distinguir rangos de valores esperados para cada estructura secundaria.



(a)

Determinación experimental del contenido de estructuras secundarias

Las estructuras secundarias de proteínas pueden ser determinadas mediante dicroísmo circular, una técnica, en principio, similar al de la espectrofotometría sólo que ahora se incide luz circularmente polarizada sobre la muestra. Para la luz polarizada en cada sentido (izquierda o derecha), una molécula quiral presenta dos valores de su coeficiente de extinción molar

ϵ_L y ϵ_R . La diferencia entre ambas ($\Delta\epsilon$) es graficada contra la longitud de onda incidente y se obtiene un espectro de dicroísmo circular. En la figura se muestran los espectros característicos de alfa hélice (α), hoja b (β) y una cadena desestructurada (random coil, rc).

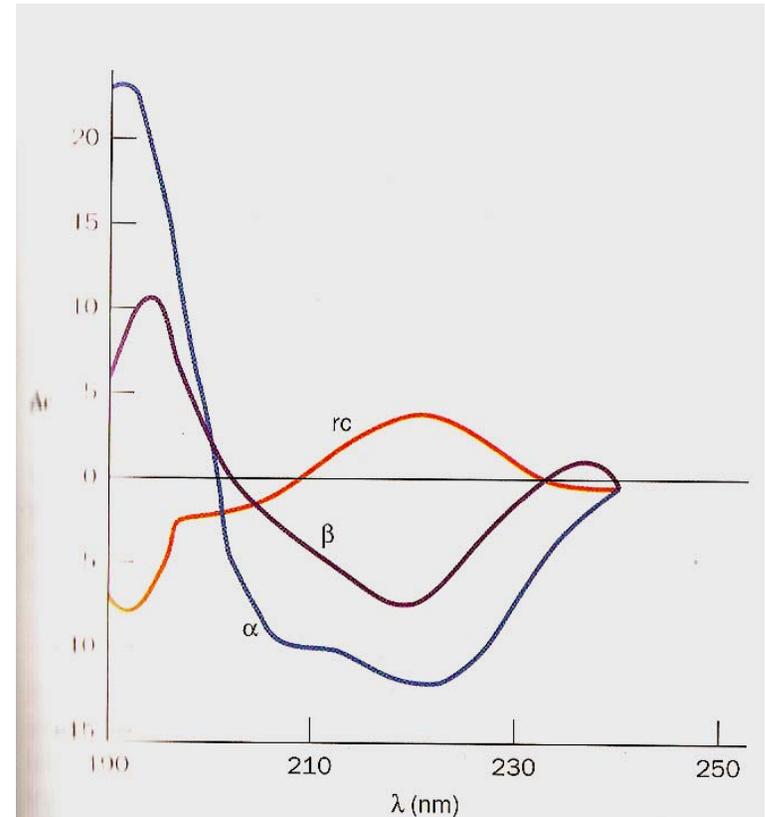
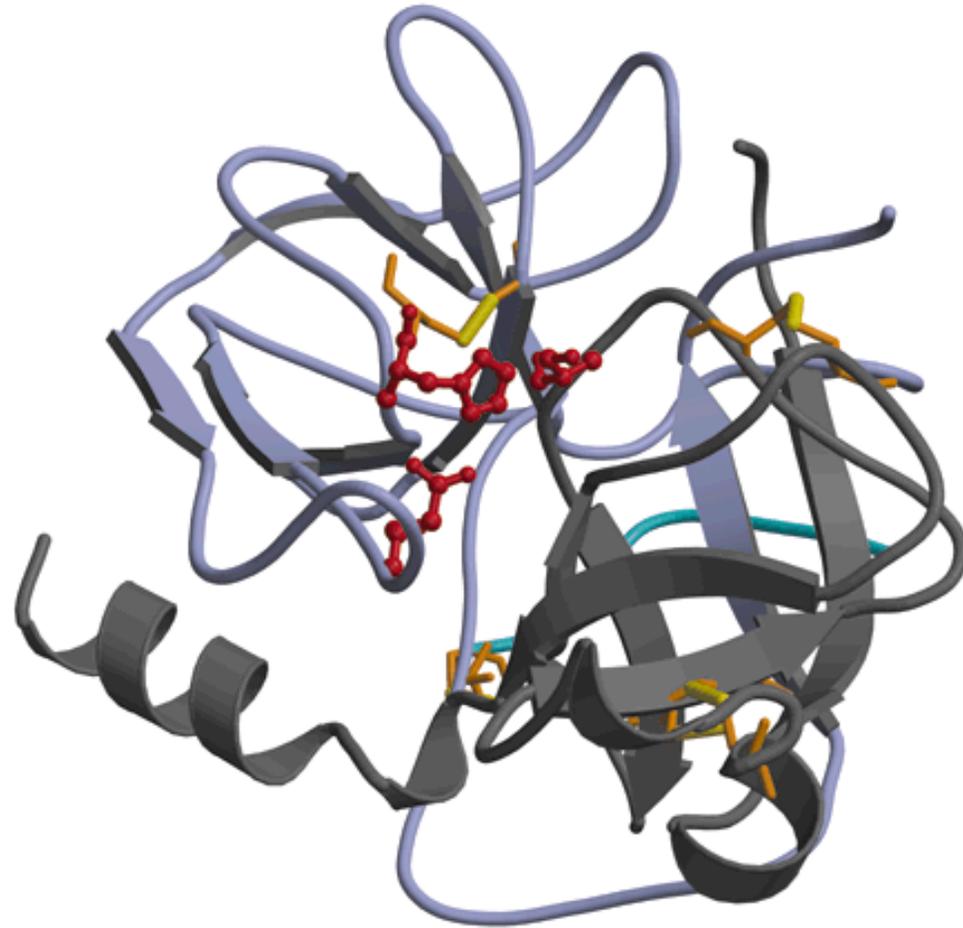


FIGURE 9-10 Circular dichroism (CD) spectra of polypeptides. Polypeptides in the α helix, β sheet, and random coil (rc) conformations were determined from the CD spectra of proteins of known X-ray structures. By comparing these spectra with the absorption spectra in Fig. 9-9, it can be seen that $\Delta\epsilon = \epsilon_L - \epsilon_R$ is a small difference of two large numbers. [After Saxena, V.P. and Wetlaufer, D.B., *Proc. Nat'l. Acad. Sci.* **66**, 971 (1971).]

La estructura III puede ser determinada por métodos físicos tales como NMR y Difracción de rayos X.



La proteína para ser funcional adopta una estructura definida, llamada usualmente su estado nativo.

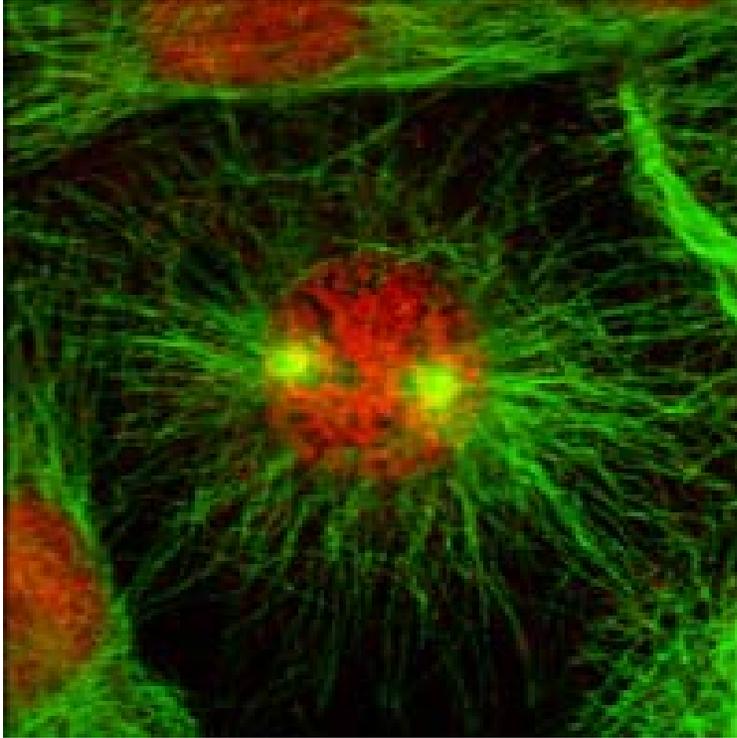
Denaturación: El estado nativo se puede perder Por la acción de la temperatura, fuerza iónica, detergentes, agentes oxidantes, y caotrópicos.

Principio de Anfinsen:

“La estructura tridimensional de una proteína está determinada por la secuencia de aminoácidos”.

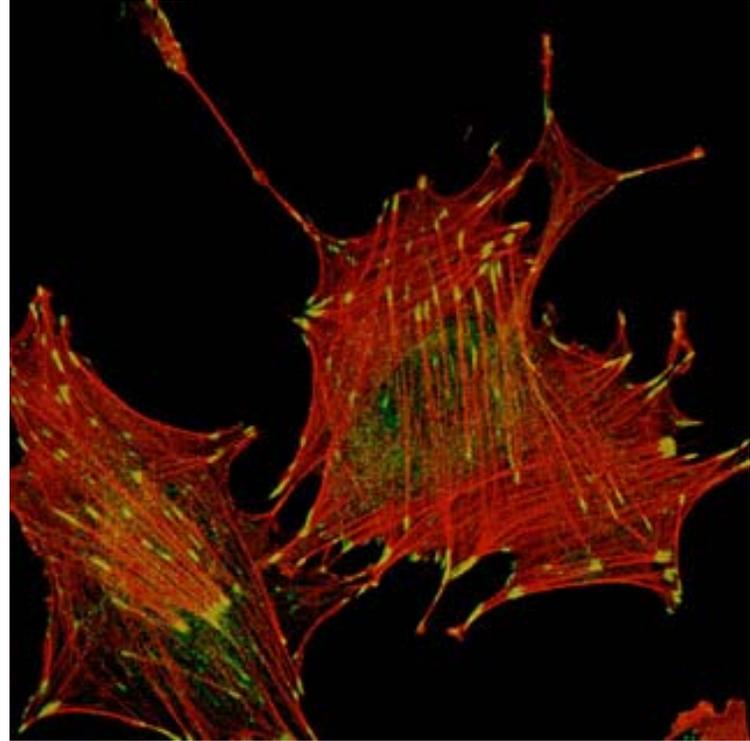
Pese a numerosos progresos, el código de plegamiento, es decir, la predicción del estado nativo en base a la secuencia de aminoácidos aún no ha sido elucidado.

INMUNOFLOURESCENCIA



**ANTICUERPO PRIMARIO
ANTI-TUBULINA**

**ANTICUERPO SECUNDARIO
FLOURESCEINA**



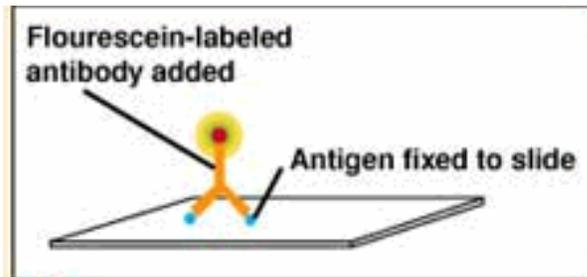
ANTI-ACTINA

RODAMINA

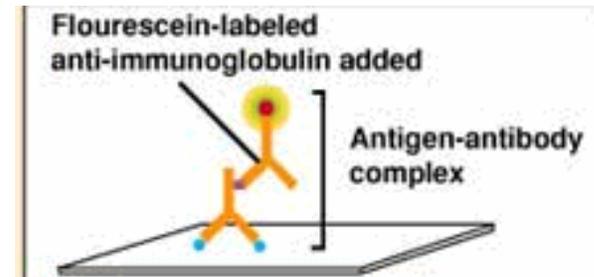
- **INMUNOHISTOQUIMICA/INMUNOFLUORESCENCIA**
DETECTA LA PRESENCIA DE UNA PROTEINA EN UNA CELULA/TEJIDO/ORGANISMO PERMITIENDO CONOCER SU EXPRESION ESPACIAL

INMUNOFLUORESCENCIA

A) DIRECTA



B) INDIRECTA

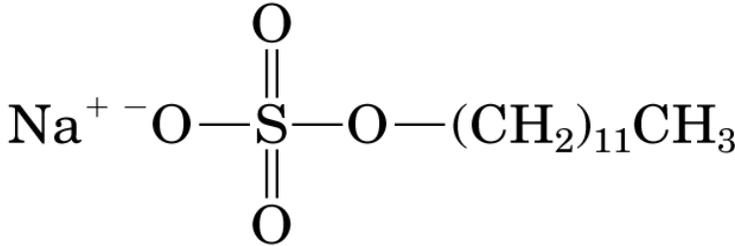
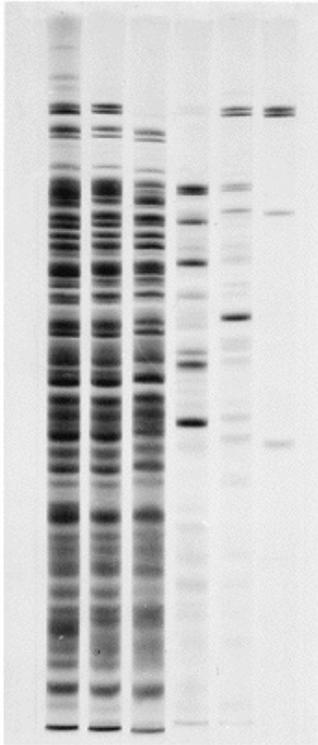
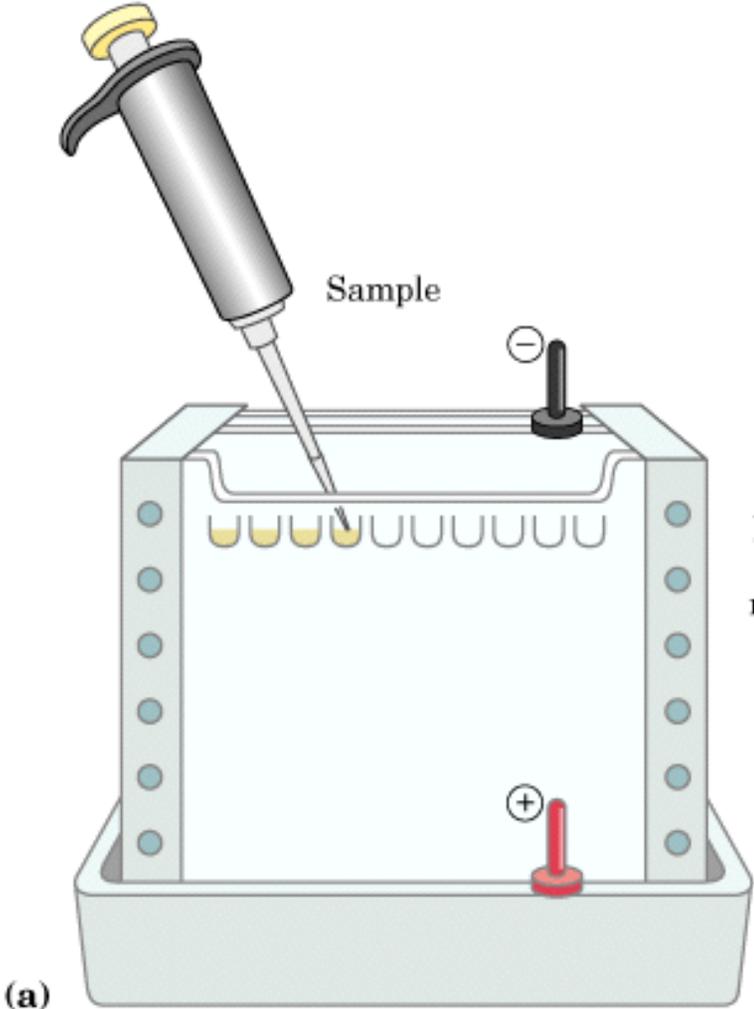


INCUBACION

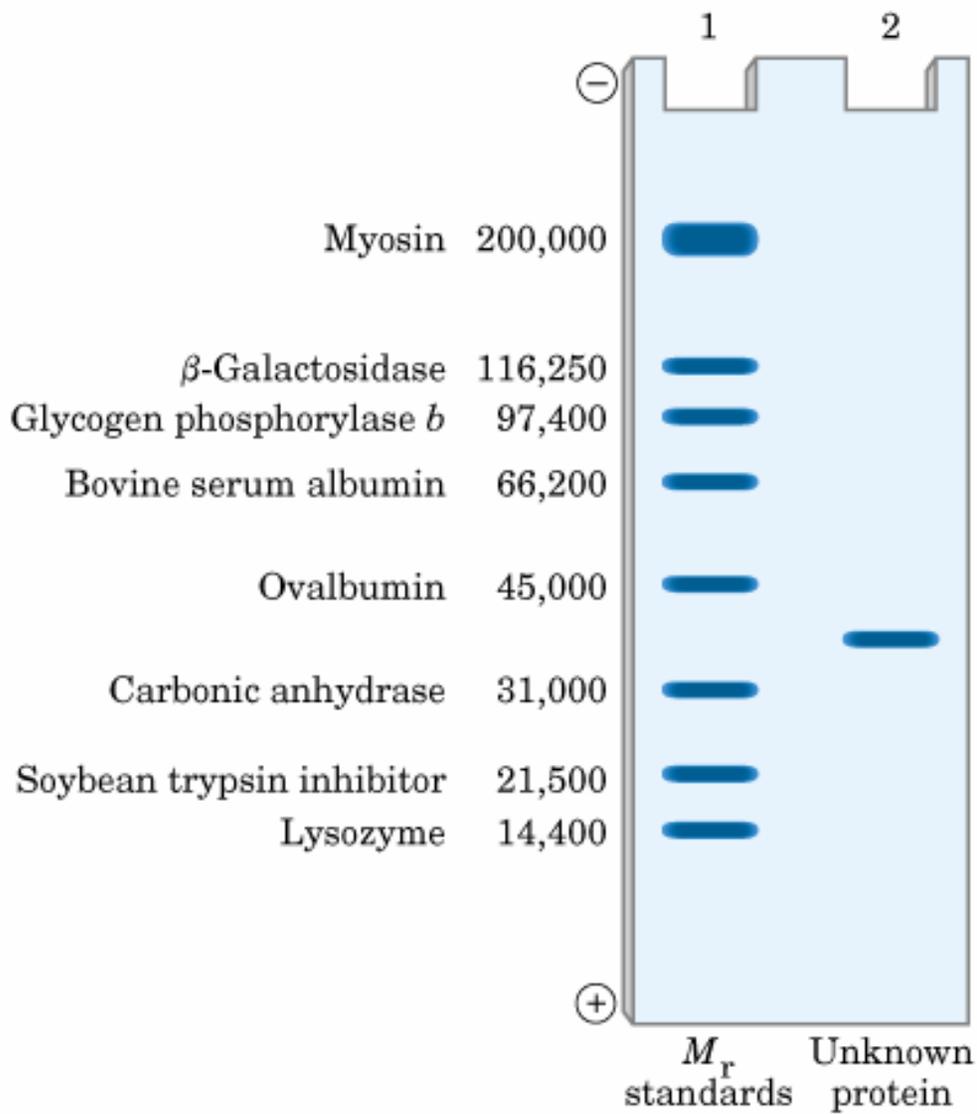
LAVADO

**VISUALIZACION EN
MICROSCOPIO**

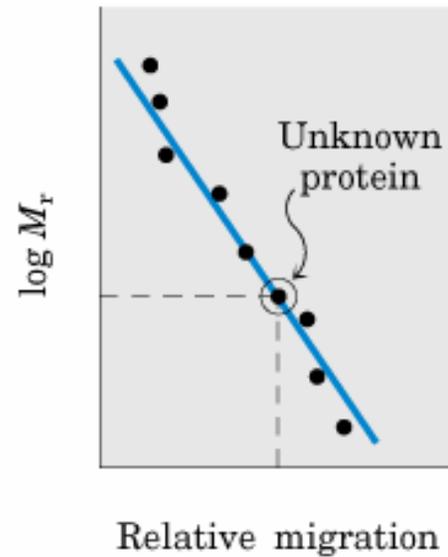
SDS-PAGE



Sodium dodecyl sulfate
(SDS)



(a)



(b)

Electroforesis en solución (teoría)

Electroforesis es una técnica de separación de proteínas y ácidos nucleicos basados en su migración en un campo eléctrico. En solución:

$$Ez = 6\Pi\eta r v$$

Donde E, campo eléctrico; z, carga eléctrica del analito; η , viscosidad del medio; r, radio de Stokes (similar Al radio hidrodinámico), v, velocidad de migración.

Luego, $\mu_0 = z/6\Pi\eta r$ (Tiselius, 1937)

Donde μ_0 es la migración electroforética en solución, o también llamada migración específica.

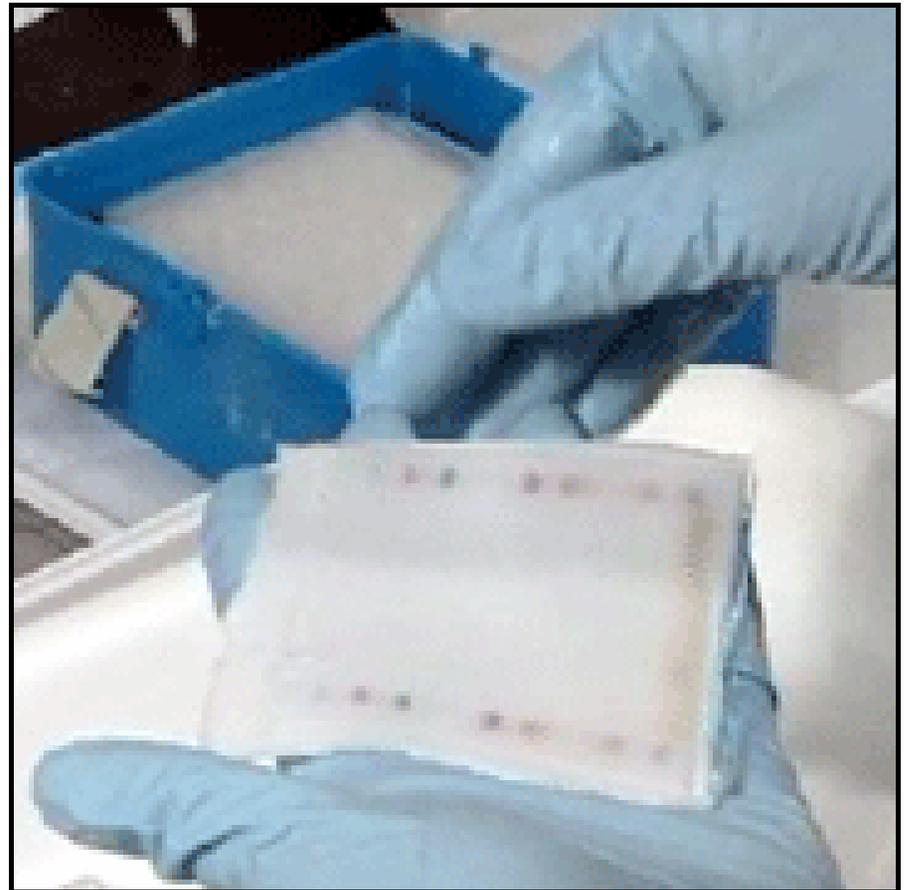
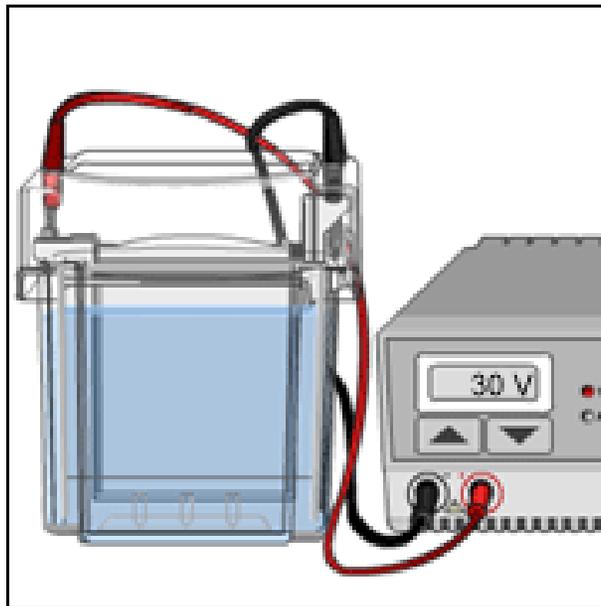
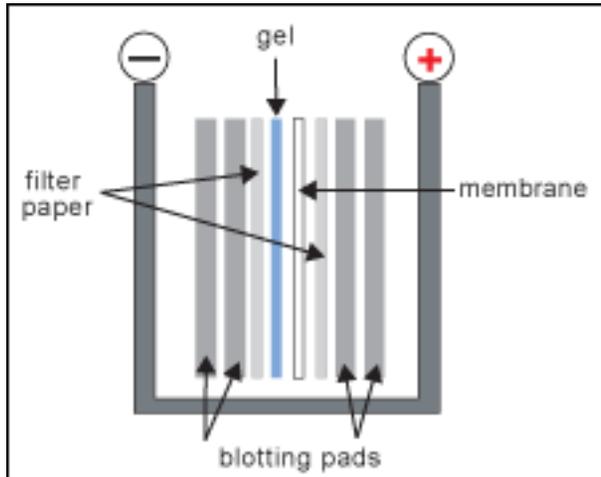
La electroforesis en solución fue reemplazada por la electroforesis en gel. En el caso de separar proteínas Se realiza electroforesis denaturante en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE, del inglés "SDS-Polyacrylamide Gel electroforesis). El gel funciona como soporte y es un medio poroso capaz de filtrar las proteínas por su tamaño (las moléculas pequeñas atraviesan el gel más rápido), mientras que el campo eléctrico aplicado sobre el gel, Permite su separación por carga. La acción del detergente aniónico, SDS permite imprimirle a la proteína denaturada Una carga eléctrica negativa, aproximadamente proporcional a su masa. En SDS-PAGE, se cumple aproximadamente que:

$$\mu = \mu_0 (A - \log MW)/A,$$

Donde MW, peso molecular en daltons (g/mol); $A = \log MW_0$, una especie de tamaño tal que no migraría en el gel; μ , migración en mm. Luego μ es inversamente proporcional al $\log MW$, con una pendiente μ_0/A , y un intercepto μ_0 .

WESTERN BLOT.

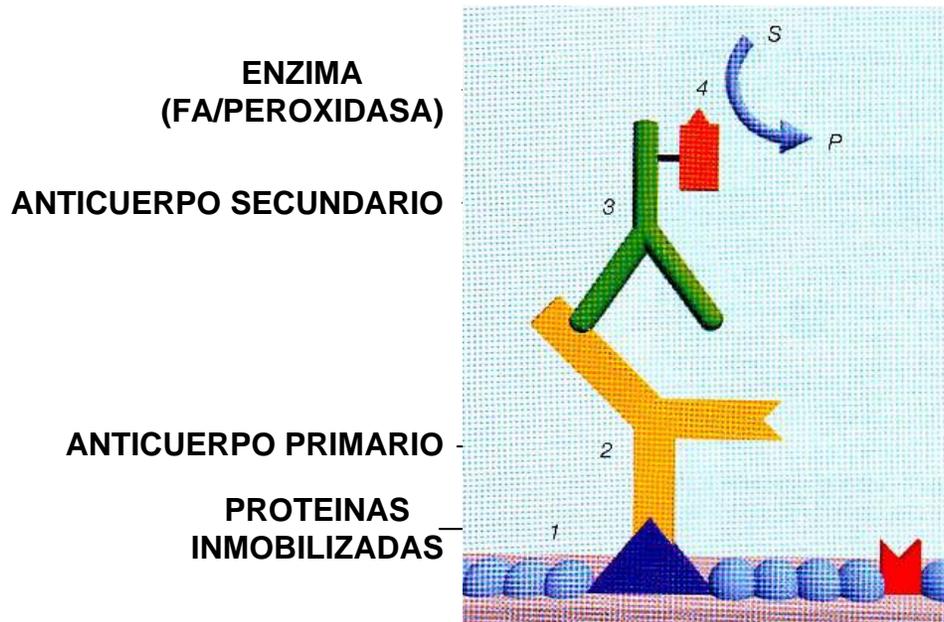
Transferencia electroforética de proteínas desde un gel a una matriz Sólida (ej. nitrocelulosa). Proteínas específicas son identificadas después de incubarlas con anticuerpos específicos y revelar la reacción antígeno-anticuerpo mediante una reacción coloreada o quimio-luminiscente.



WESTERN BLOT

3. INCUBACION CON EL ANTICUERPO PRIMARIO
4. INCUBACION CON UN ANTICUERPO SECUNDARIO ACOPLADO A UNA ENZIMA (FOSFATASA ALCALINA O PEROXIDASA)
5. DETECCION

PROTEINAS



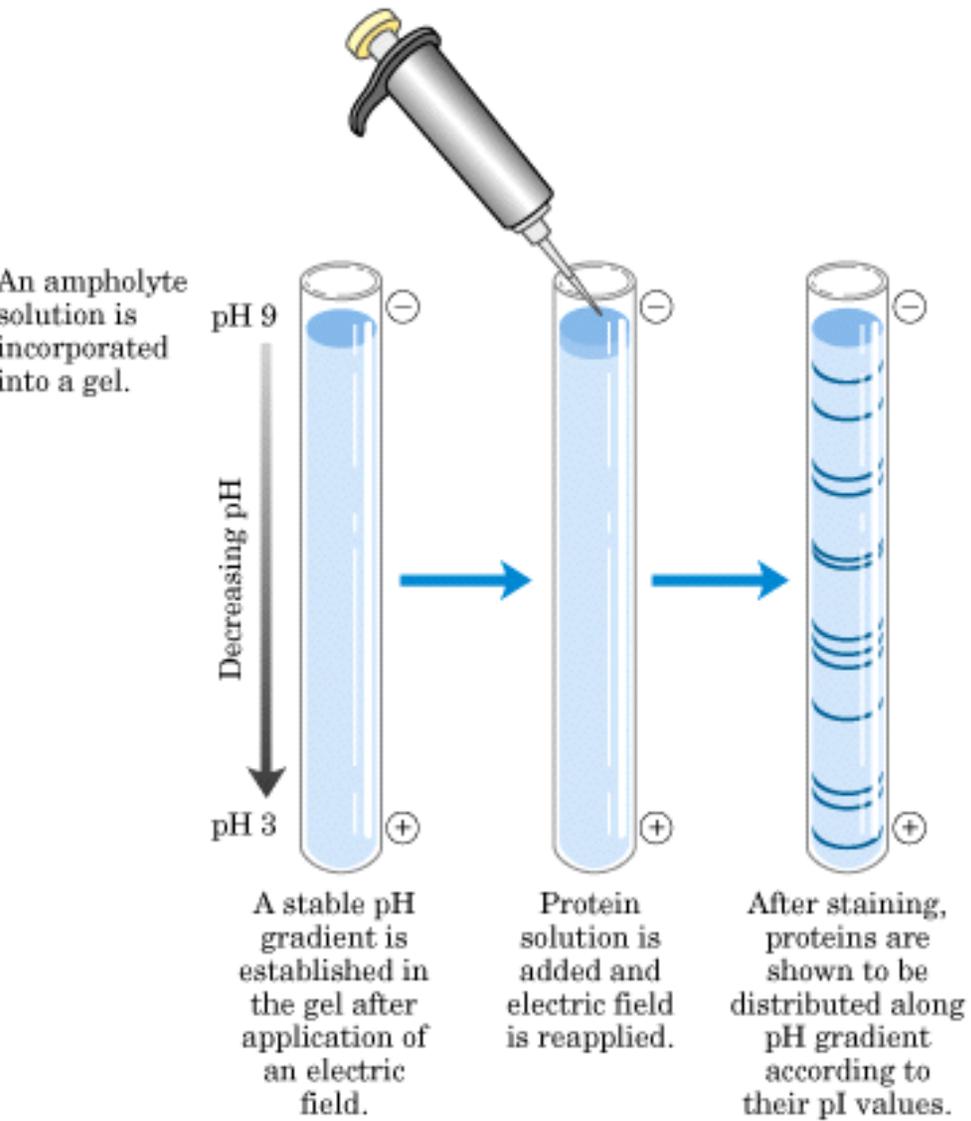
Las proteínas también pueden ser separadas por su punto isoeléctrico

table 5-6

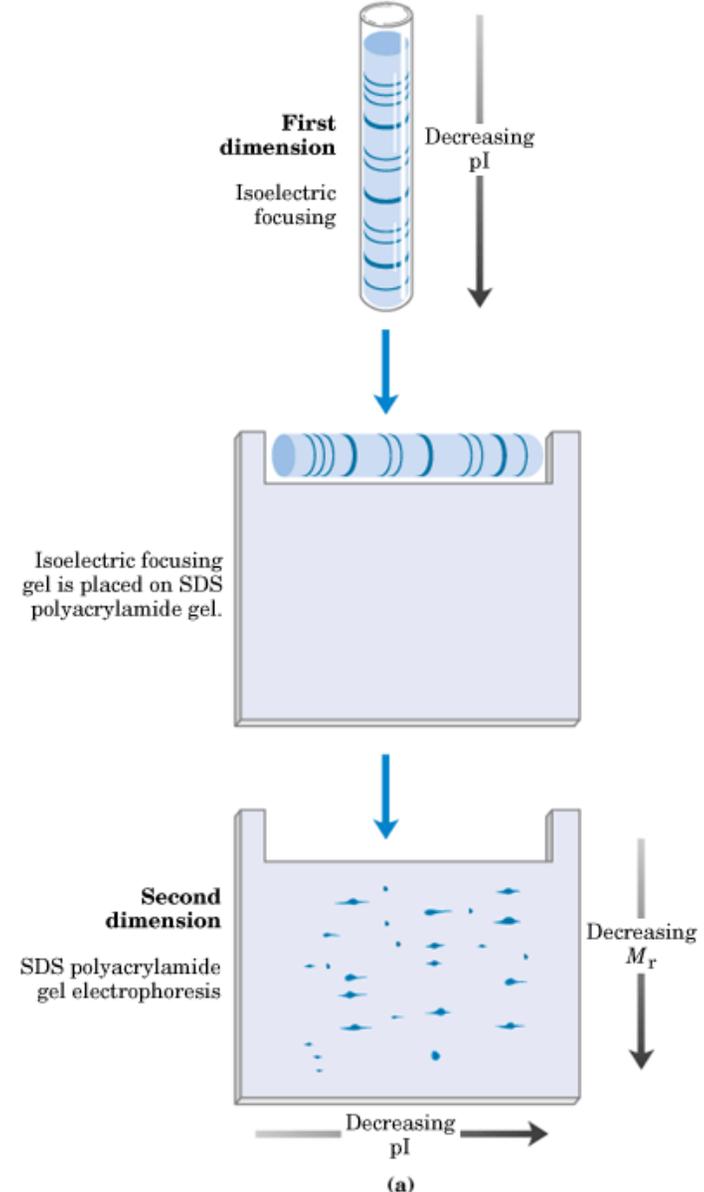
The Isoelectric Points of Some Proteins

Protein	pI
Pepsin	~1.0
Egg albumin	4.6
Serum albumin	4.9
Urease	5.0
β -Lactoglobulin	5.2
Hemoglobin	6.8
Myoglobin	7.0
Chymotrypsinogen	9.5
Cytochrome <i>c</i>	10.7
Lysozyme	11.0

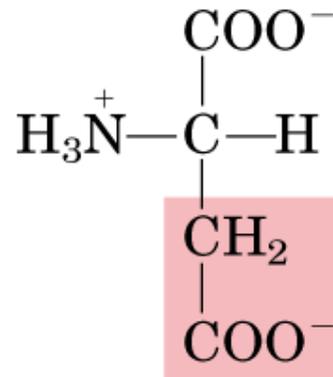
Isoelectroenfoque: Las proteínas migran en un campo eléctrico a través de una gradiente de pH. Las proteínas dejan de migrar cuando encuentran el pH que corresponde a su pI (z=0).



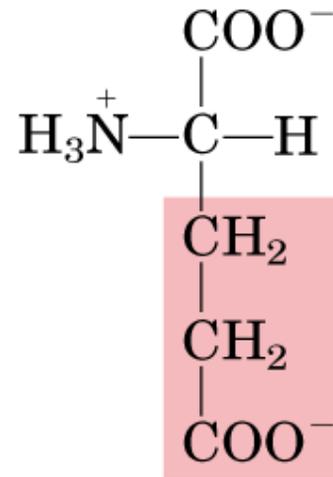
Electroforesis 2D: Después de un isoelectroenfoque Se corre un SDS-PAGE y se obtiene una separación En 2 dimensiones. Permite el análisis de muestras Conteniendo muchas proteínas distintas. Se usa en Proteómica.



Negatively charged R groups

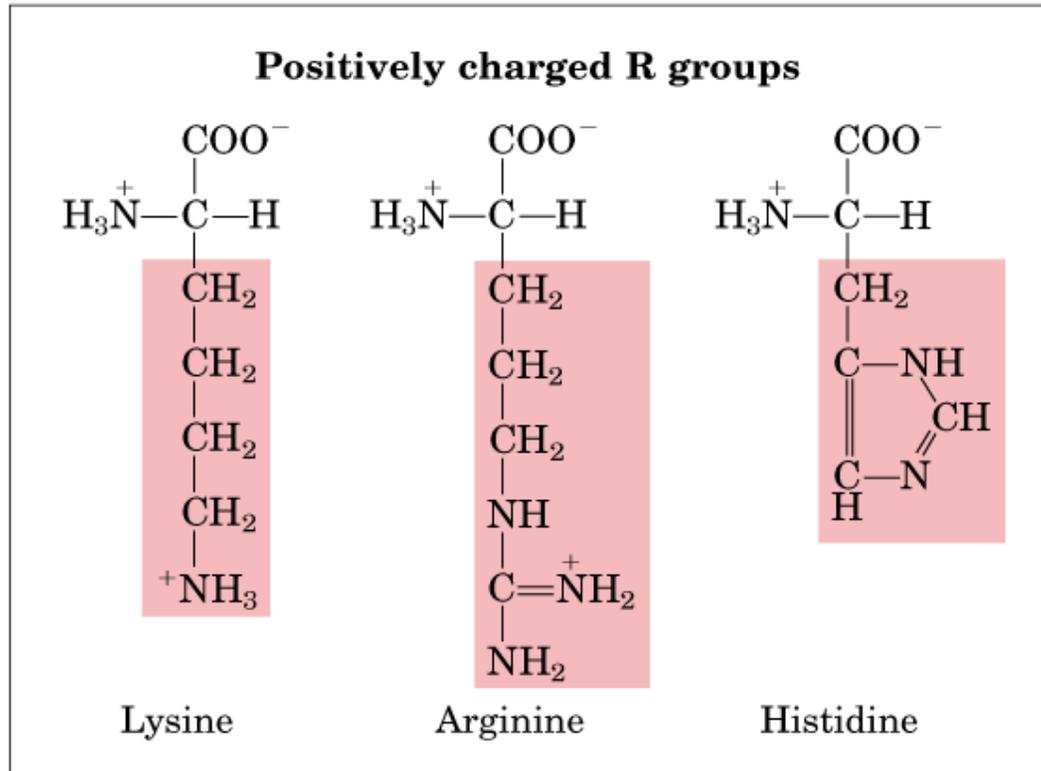


Aspartate



Glutamate

Cadenas laterales ácidas, pueden formar interacciones iónicas, dependientes del pH



Estas cadenas laterales tienen propiedades ácido-base, pueden formar interacciones iónicas.

table 5-1

Properties and Conventions Associated with the Standard Amino Acids

Amino acid	Abbreviated names		M_r	pK_a values			pI	Hydropathy index*	Occurrence in proteins (%) [†]
				pK_1 (-COOH)	pK_2 (-NH ₃ ⁺)	pK_R (R group)			
Nonpolar, aliphatic R groups									
Glycine	Gly	G	75	2.34	9.60		5.97	-0.4	7.2
Alanine	Ala	A	89	2.34	9.69		6.01	1.8	7.8
Valine	Val	V	117	2.32	9.62		5.97	4.2	6.6
Leucine	Leu	L	131	2.36	9.60		5.98	3.8	9.1
Isoleucine	Ile	I	131	2.36	9.68		6.02	4.5	5.3
Methionine	Met	M	149	2.28	9.21		5.74	1.9	2.3
Aromatic R groups									
Phenylalanine	Phe	F	165	1.83	9.13		5.48	2.8	3.9
Tyrosine	Tyr	Y	181	2.20	9.11	10.07	5.66	-1.3	3.2
Tryptophan	Trp	W	204	2.38	9.39		5.89	-0.9	1.4
Polar, uncharged R groups									
Serine	Ser	S	105	2.21	9.15		5.68	-0.8	6.8
Proline	Pro	P	115	1.99	10.96		6.48	1.6	5.2
Threonine	Thr	T	119	2.11	9.62		5.87	-0.7	5.9
Cysteine	Cys	C	121	1.96	10.28	8.18	5.07	2.5	1.9
Asparagine	Asn	N	132	2.02	8.80		5.41	-3.5	4.3
Glutamine	Gln	Q	146	2.17	9.13		5.65	-3.5	4.2
Positively charged R groups									
Lysine	Lys	K	146	2.18	8.95	10.53	9.74	-3.9	5.9
Histidine	His	H	155	1.82	9.17	6.00	7.59	-3.2	2.3
Arginine	Arg	R	174	2.17	9.04	12.48	10.76	-4.5	5.1
Negatively charged R groups									
Aspartate	Asp	D	133	1.88	9.60	3.65	2.77	-3.5	5.3
Glutamate	Glu	E	147	2.19	9.67	4.25	3.22	-3.5	6.3

*A scale combining hydrophobicity and hydrophilicity of R groups; it can be used to measure the tendency of an amino acid to seek an aqueous environment (- values) or a hydrophobic environment (+ values). See Chapter 12. From Kyte, J. & Doolittle, R.F. (1982) *J. Mol. Biol.* **157**, 105-132.

[†]Average occurrence in over 1150 proteins. From Doolittle, R.F. (1989) Redundancies in protein sequences. In *Prediction of Protein Structure and the Principles of Protein Conformation* (Fasman, G.D., ed) Plenum Press, NY, pp. 599-623.

Las proteínas también pueden ser separadas sólo por su tamaño

table 5-2

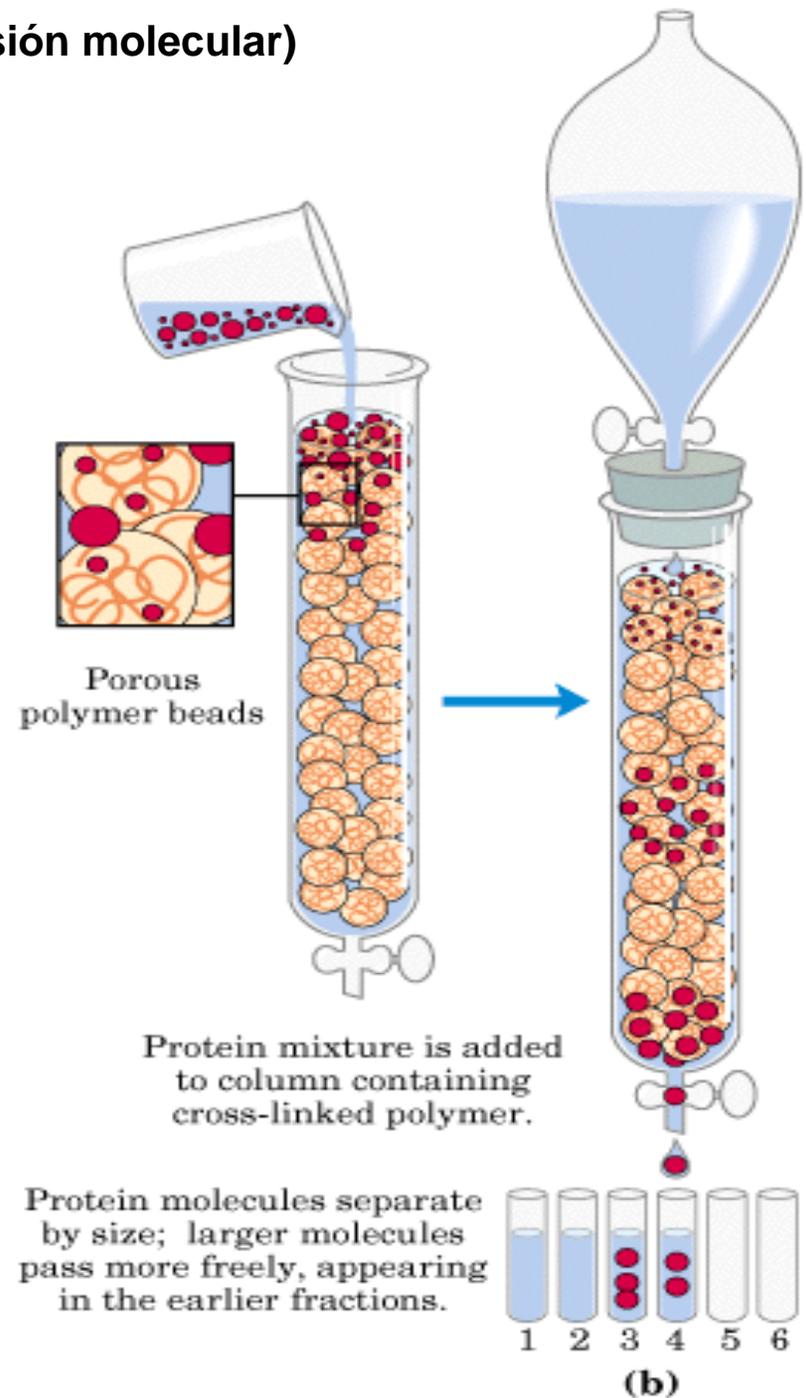
Molecular Data on Some Proteins

	Molecular weight	Number of residues	Number of polypeptide chains
Cytochrome <i>c</i> (human)	13,000	104	1
Ribonuclease A (bovine pancreas)	13,700	124	1
Lysozyme (egg white)	13,930	129	1
Myoglobin (equine heart)	16,890	153	1
Chymotrypsin (bovine pancreas)	21,600	241	3
Chymotrypsinogen (bovine)	22,000	245	1
Hemoglobin (human)	64,500	574	4
Serum albumin (human)	68,500	609	1
Hexokinase (yeast)	102,000	972	2
RNA polymerase (<i>E. coli</i>)	450,000	4,158	5
Apolipoprotein B (human)	513,000	4,536	1
Glutamine synthetase (<i>E. coli</i>)	619,000	5,628	12
Titin (human)	2,993,000	26,926	1

Cromatografía de Filtración en Gel (o de exclusión molecular)

Una matriz sólida porosa permite incluir en ella proteínas de bajo peso molecular (eluyen tardíamente de la columna porque recorren un camino más largo), y excluir proteínas de mayor peso molecular (que no caben en los poros de la fase sólida. La separación ocurre en solución.

QuickTime™ and a TIFF (Uncompressed) decompressor are needed to see this picture.



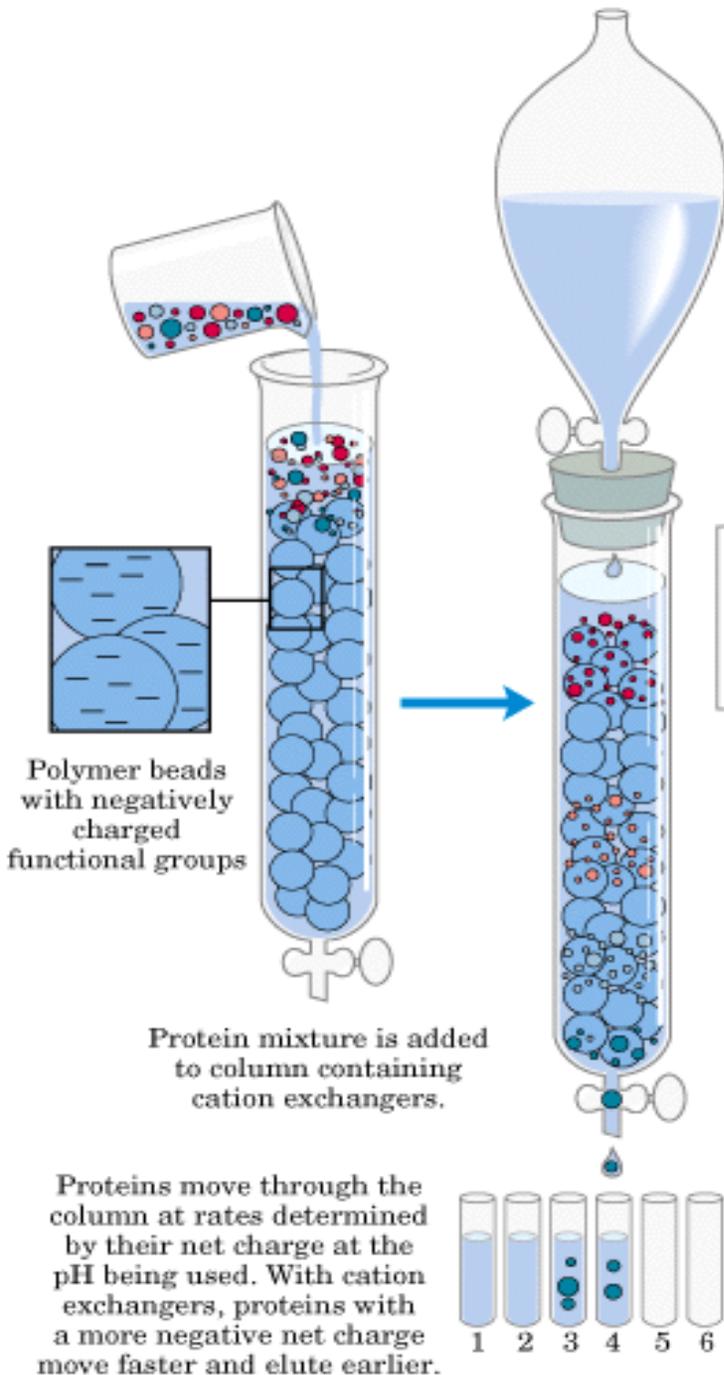
QuickTime™ and a
TIFF (Uncompressed) decompressor
are needed to see this picture.

$K_{av} = (V_e - V_o)/(V_t - V_o)$; donde V_o , volumen de exclusión; V_e , volumen de elución; V_t , volumen total.

Cromatografía de intercambio catiónico.

La matriz sólida (fase estacionaria) está cargada negativamente de modo que interactúa con cationes (cationes son retardados en la columna), mientras que los aniones son repelidos y eluyen inmediatamente. Los cationes pueden ser eluidos después de adicionar cationes que interactúen con la matriz, permitiendo la elución de proteínas básicas. Esto es, cargadas positivamente. El mismo principio es usado para realizar cromatografías de intercambio aniónico, sólo que en este caso, la matriz está cargada positivamente y permite el intercambio de aniones (proteínas cargadas negativamente, proteínas ácidas).

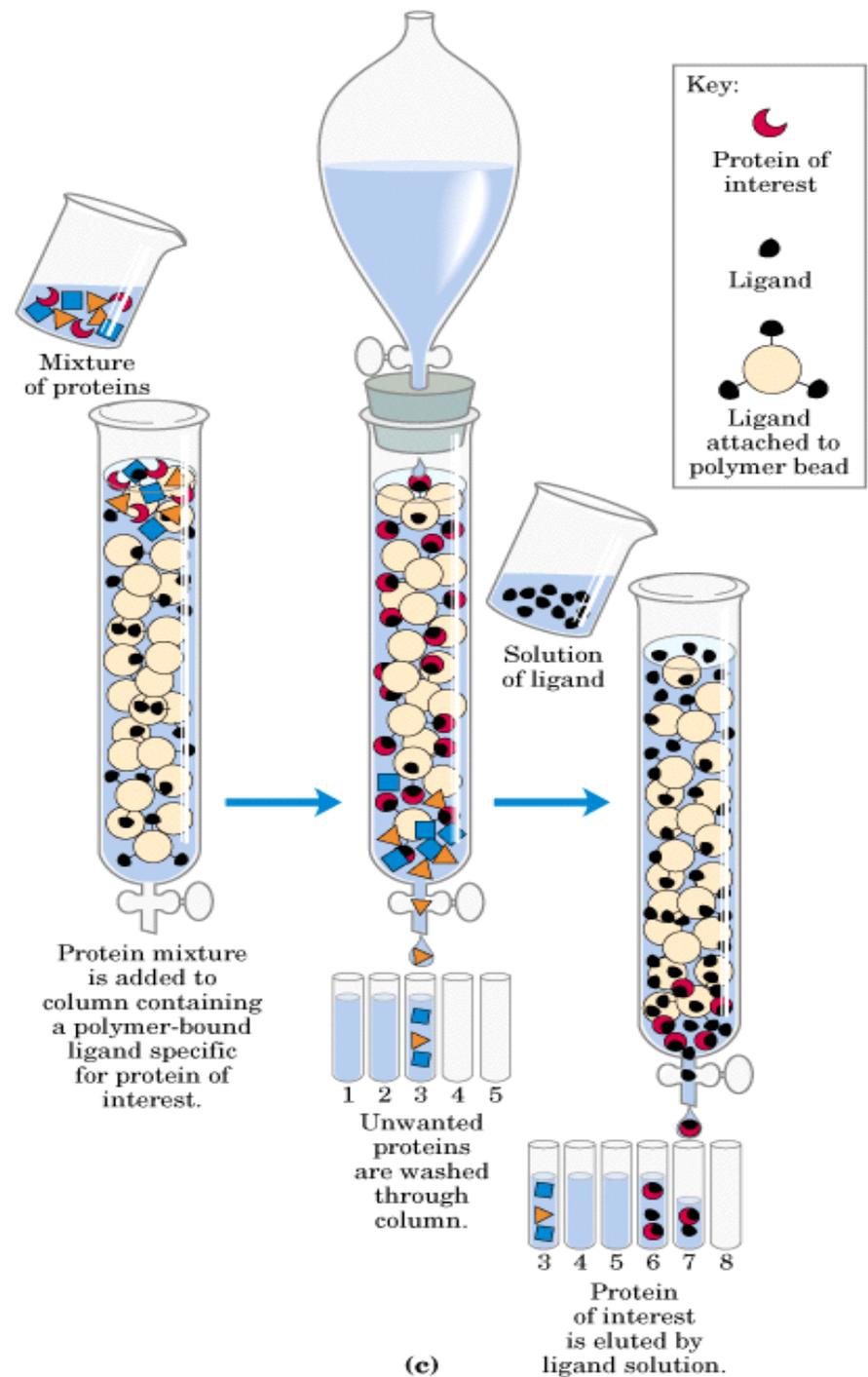
Ambos son casos de cromatografías de intercambio iónico.



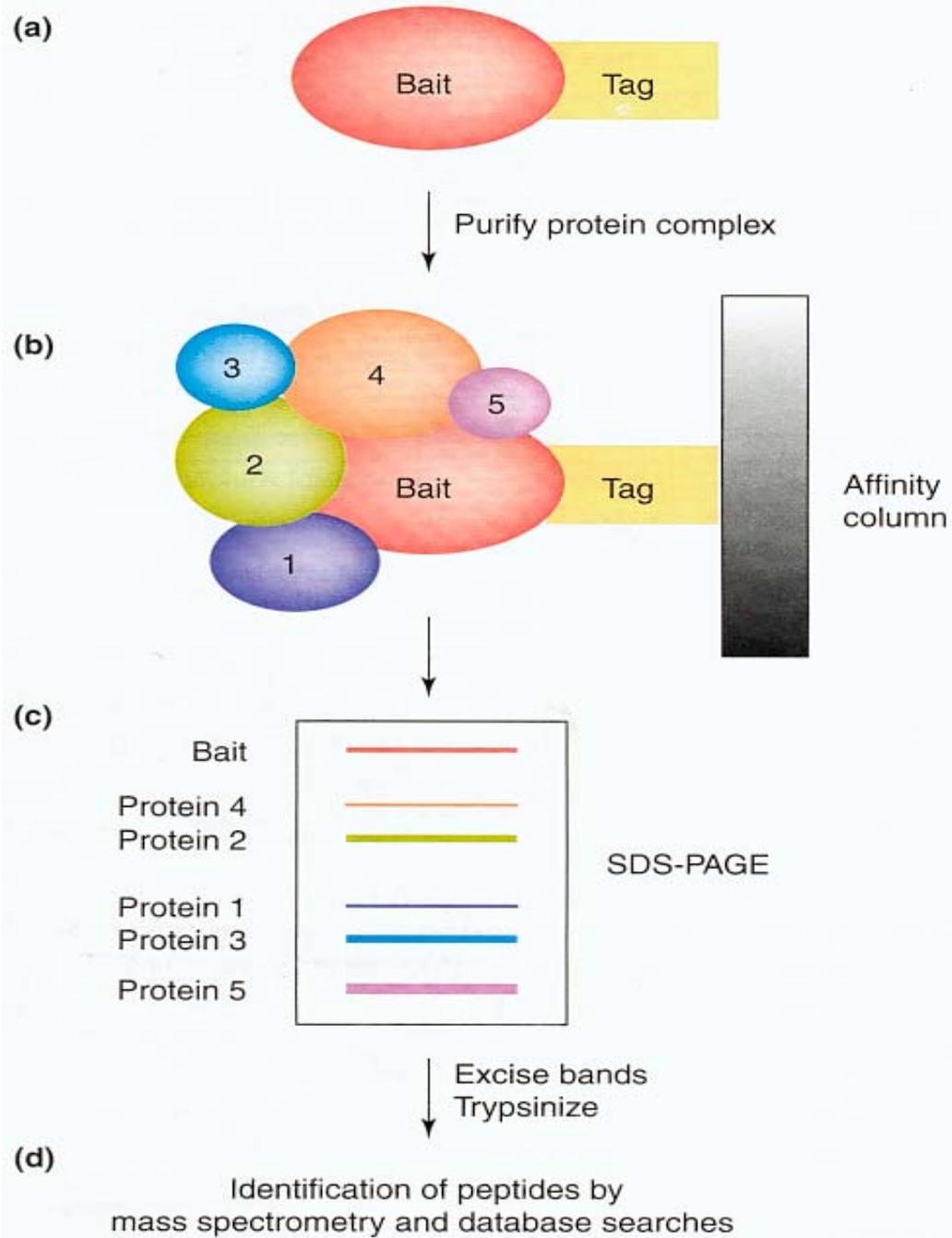
(a)

Cromatografía de afinidad.

En este caso, un ligando específico de una Proteína de interés está unido covalentemente a la matriz sólida. La proteína que une el ligando Permanece incluída en la columna, y puede ser Eluida por la adición de ligando soluble en La fase móvil (solución). Se utiliza en los últimos pasos De una purificación. Es ampliamente usado en La purificación de proteínas recombinantes.



La cromatografía de afinidad ocupa muestras de proteínas en estado nativo, de modo que permite identificar proteínas que interactúan con otras formando Complejos que pueden tener un significado funcional. Después de un análisis electroforético, los componentes Del complejo pueden llegar a ser identificados.



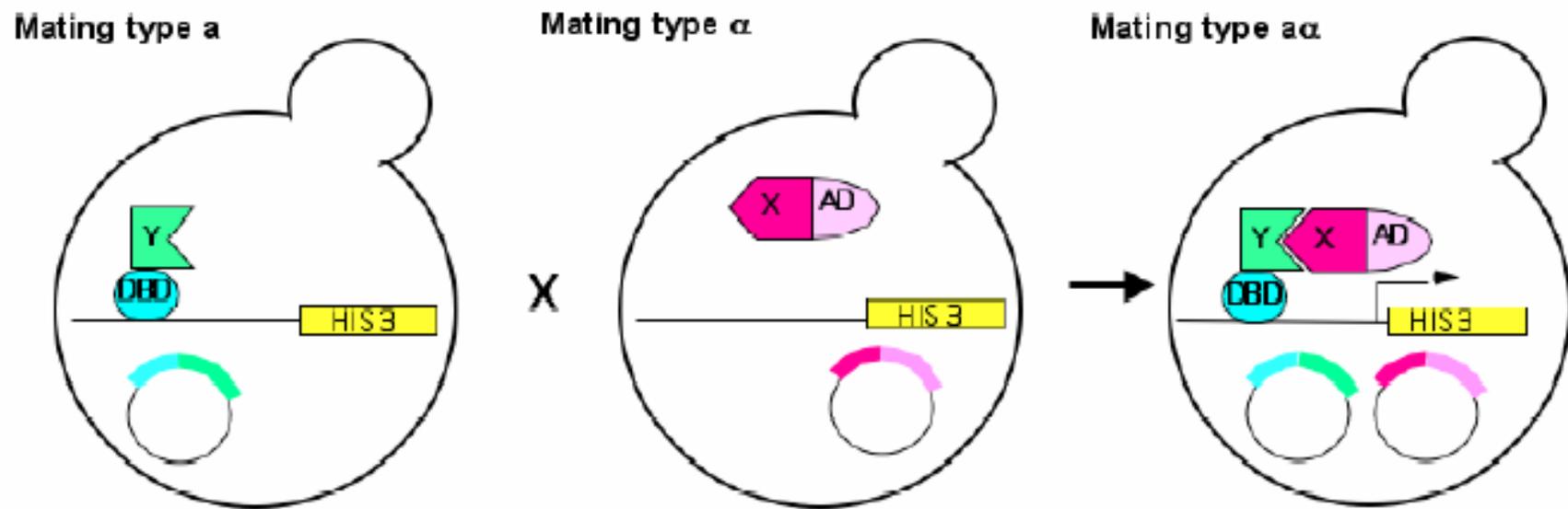
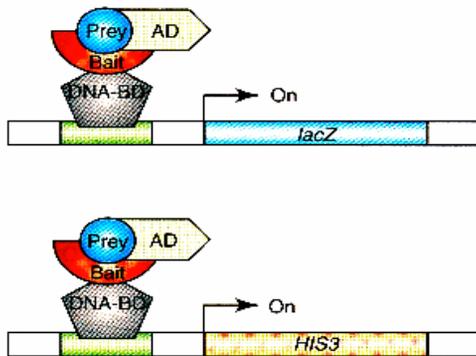


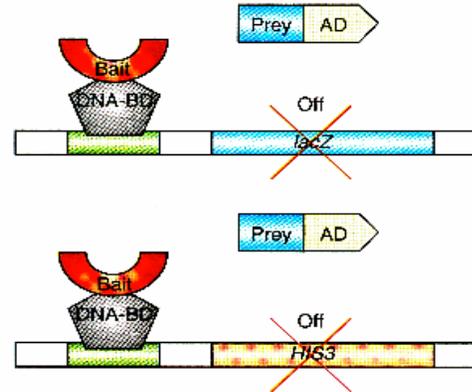
Figure 1: Classical Yeast Two-Hybrid System. A protein of interest Y is expressed in yeast as a fusion to a DNA-binding domain (DBD, “bait”; circles denote expression plasmids). Another protein of interest X is fused to a transcriptional activation domain (AD, “prey”). The two yeast strains are mated to combine the two fusion proteins in one cell. If proteins Y and X interact in the resulting diploids cells, they reconstitute a transcription factor which activates a reporter gene (here: HIS3) and therefore allows the cell to growth on selective media (here: media lacking histidine).

Sistema de Doble Híbrido. Permite identificar interacciones entre proteínas *in vivo*. Una proteína de fusión con un Dominio de unión a DNA sirve como carnada, mientras que una proteína de fusión con un dominio de activación sirve como Presa. Cuando el dominio de activación y el dominio de unión a DNA se encuentran cerca, producto de la interacción entre la proteína carnada y la proteína presa, se activa la transcripción de un gen reportero que evidencia que la interacción Ocurrió. Todo el sistema debe ser expresado en una misma célula, usualmente en levaduras.

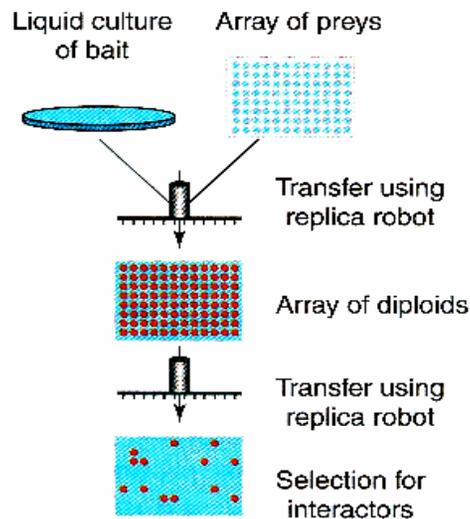
(a) Bait and prey interact



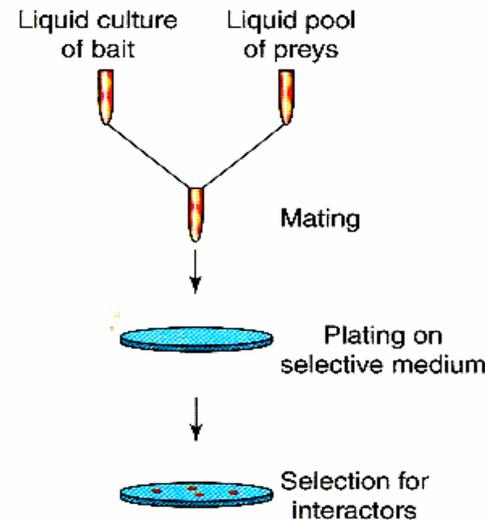
Bait and prey do not interact



(b)



(c)



Artefactos del sistema de doble híbrido

Falsos positivos:

1. Si un factor de transcripción es usado como cebo
2. Por interacciones inespecíficas
3. Si el cebo o la presa afectan la viabilidad celular
4. Eventos aleatorios de origen desconocido

Falsos negativos:

1. Impedimento estérico entre las proteínas de fusión previene la función del reportero
2. Inestabilidad de las proteínas de fusión
3. Falla en la localización subcelular relevante para la actividad del reportero

Identificación de los Artefactos:

1. Confirmar la reproducibilidad de la interacción
2. Uso de múltiples reporteros
3. Uso de métodos independientes para determinar especificidad

El principio de afinidad se puede usar a gran escala para probar interacciones proteína -proteína de una colección de productos génicos. Es una aproximación usada en análisis proteómicos.

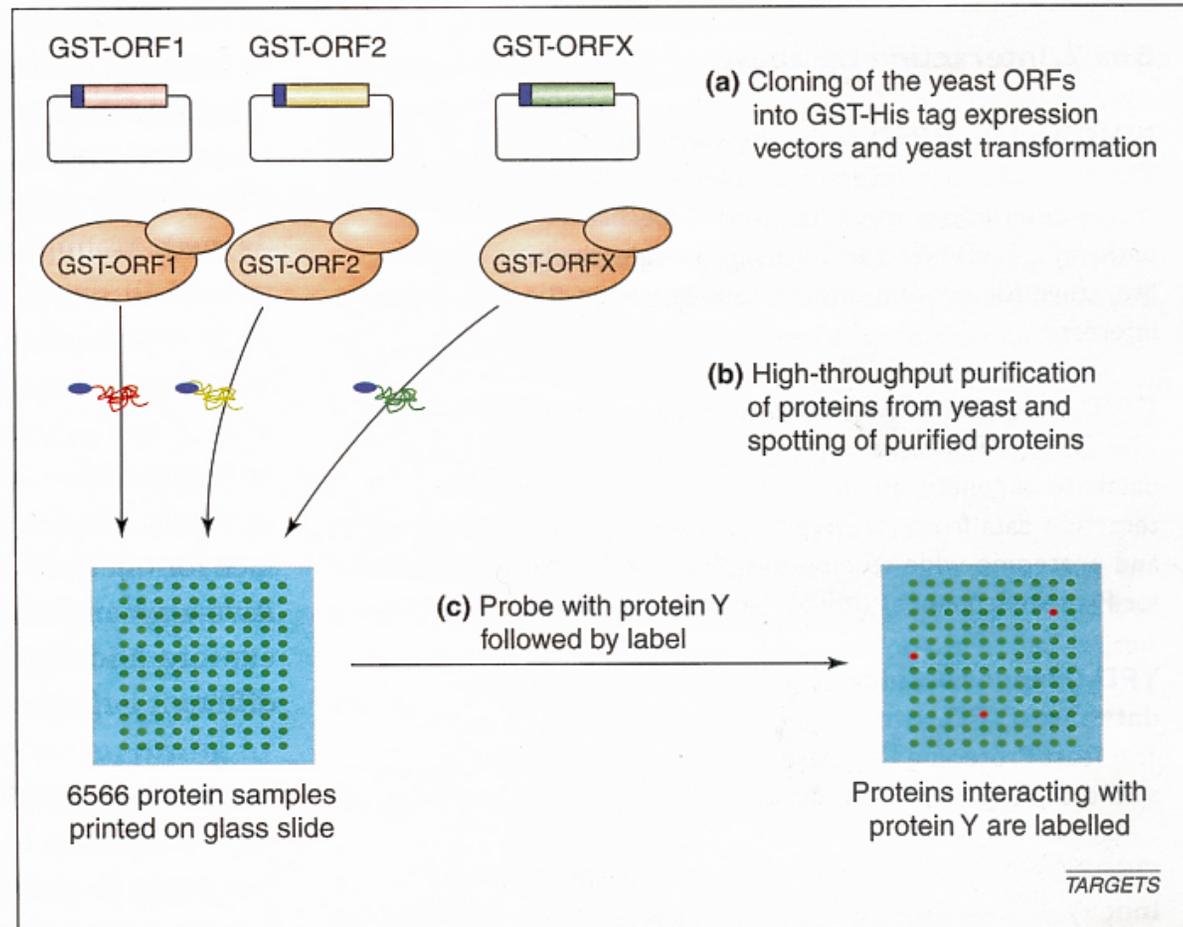
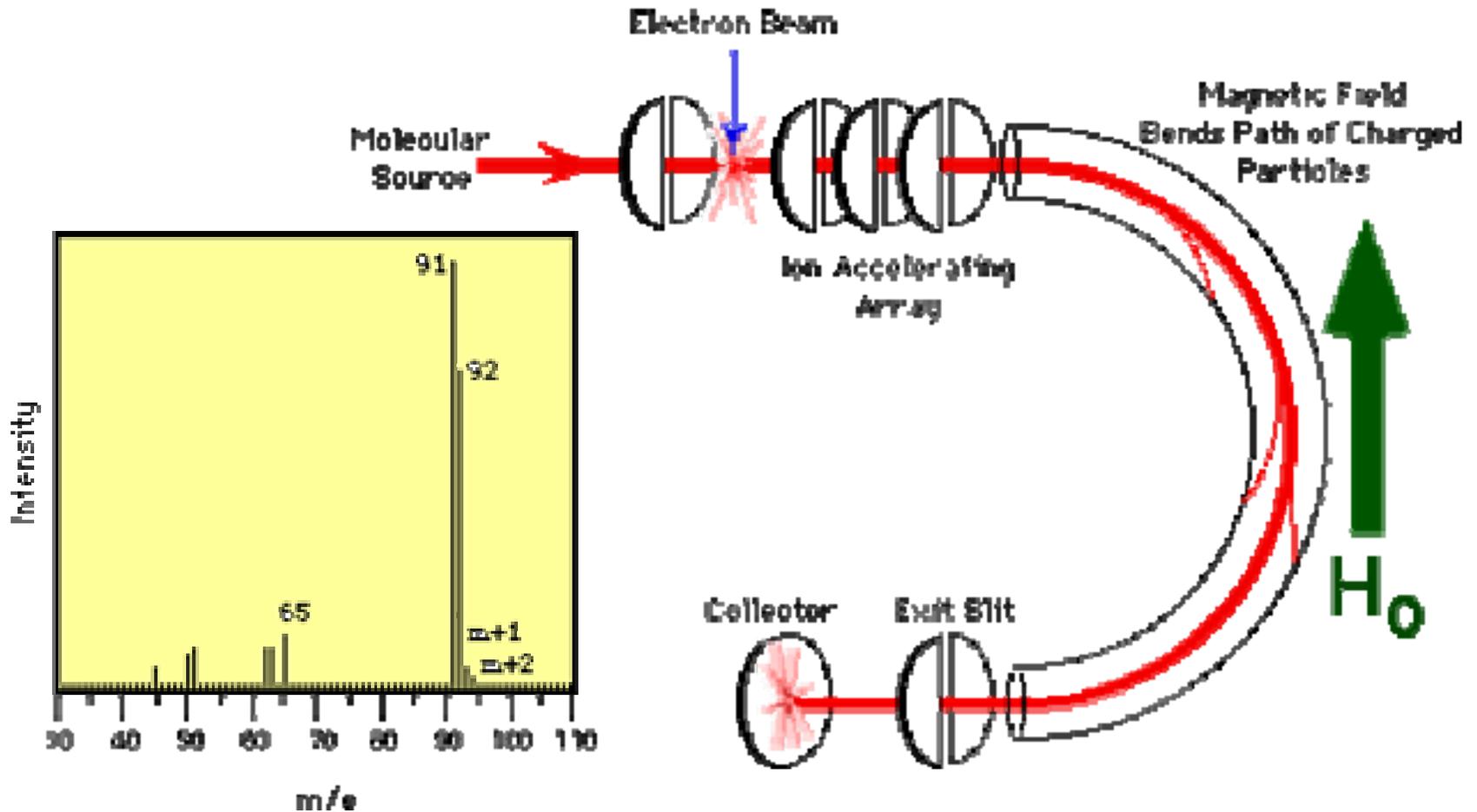
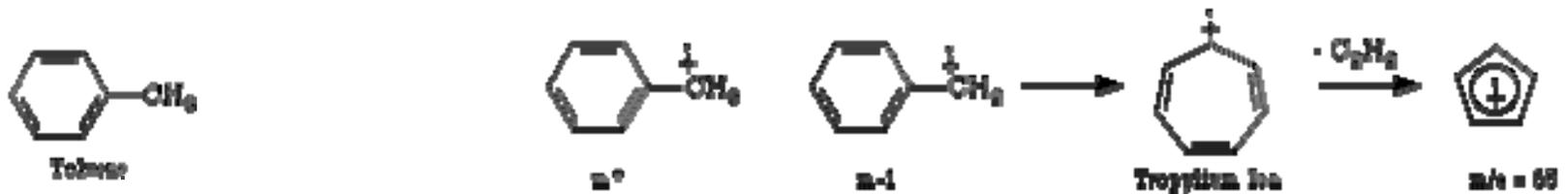


Figure 3. Identification of protein interactions on proteome chips. **(a)** Open reading frames (ORFs) encoding all bait proteins are cloned into expression vectors as fusions to glutathione-S-transferase (GST) and a polyhistidine tag, expressed in yeast and **(b)** purified by means of GST affinity chromatography. The purified proteins are printed onto nickel-coated glass slides to yield the final proteome chip. **(c)** A protein Y under investigation is incubated on the chip, followed by labelled antibodies directed against the protein Y. The identity of interacting proteins is determined by their position on the proteome chip.

Espectrometría de masas (MS)



QuickTime™ and a
TIFF (Uncompressed) decompressor
are needed to see this picture.

QuickTime™ and a
TIFF (Uncompressed) decompressor
are needed to see this picture.

Método

Ventajas

Desventajas

Doble híbrido
in vivo

Simple, barato y sensible

Falsos positivos

Espectrometría de Masas
in vivo

Detecta complejos proteicos

Caro, sofisticado
y lento (*)

Chips de proteínas
in vitro

Condiciones definidas

potencialmente
no fisiológico (*)

(*) Requiere purificación de proteínas

Referencias

- Lehninger, A. (1994) Principles of Biochemistry. 3rd ed.
- <http://www.bioinfo.org.cn/book/biochemistry/contents.htm>
- Mathews & van Holde (1999). Biochemistry
<http://www.aw-bc.com/mathews/>