



1. PREDMET: STRUKTURA PROTEINOV

Šifra: 30-0176

Število kreditnih točk (ECTS): 11,0

Obseg ur: 150; predavanja 60, vaje 75, seminarji 15

Program: univerzitetni študijski program Biokemija

2. VZGOJNOIZOBRAŽEVALNI CILJI

V okviru predmeta bo študent seznanjen s strukturami makromolekul, s povezavo med strukturo in njihovim delovanjem, in bo spoznal nekatere načine določevanja struktur.

3. VSEBINA

Primarna struktura proteinov: Predstavljeni bodo encimski in kemijski postopki fragmentacije beljakovin, metode za izolacijo in čiščenje peptidov, načini in instrumentacija za določanje aminokislinske sestave proteinskih vzorcev, pri določanju strukture proteinov najpomembnejše kemijske modifikacije proteinov in načini za določanje števila ter položaja disulfidnih vezi. Povdarjeno bo predstavljen Edmanov postopek za določanje aminokislinskega zaporedja proteina z njegovega N-konca, omenjeni pa bodo tudi drugi postopki in instrumentacija. Predstavljene bodo glavne metode za določanje zaporedja aminokislin s C-konca polipeptida. Opisane bodo posttranslacijske modifikacije proteinov s katerimi se najpogosteje srečujemo, njihova detekcija in analiza. Osrednja pozornost bo namenjena proteinski glikozilaciji. Podani bodo principi in postopki določanja primarne strukture proteinov z masno spektrometrijo. Predstavljen bo pomen in vloga identifikacije proteinov s pomočjo masne spektrometrije v proteomiki.

3-dimenzionalni del: Razumevanje mehanizma delovanja makromolekul izhaja iz interpretacije 3-dimezionalnih struktur. Ta povezuje atomarno strukturo in funkcijo proteina. Šele poznavanje strukture skeleta (zvitje) in aktivnega mesta proteinov v atomarnih detajlih omogoča racionalno poseganje v interakcije posameznih proteinov, to je v racionalno načrtovanje zdravilnih učinkovin in pesticidov.

Kristalne in NMR strukture so shranjene v PDB (Protein Data Bank). Strukture so določene na različne stopnje natančnosti, ki imajo osnovo v številu izmerjenih eksperimentalnih podatkov. Predstavljen bo pregled različnih tipov zvitja posameznih domen in njihovo prostorsko zlaganje v funkcionalne celote. Strukture so lahko sestavljene iz ene ali več podenot, vključno z virusi. Opis posameznih domen izhaja iz povezave osnovnih elementov sekundarne strukture kot so alfa-vijačnice, beta-strukture, vloge hidrofobnih in hidrofilnih aminokislinskih ostankov, vodikovih vezi, konformacij in interakcij z okoljem (topilom oziroma membrano).

Predmet obravnava globularne in membranske proteine kot so receptorji, encimi, protitelesa, membranski proteini itd. ter strukture DNA in RNA-strukture ter njihove medsebojne interakcije preko katerih poteka regulacija bioloških procesov.

VAJE:

Primarna struktura proteinov:

- Določitev navidezne molekulske mase proteina ter vrste in števila podenot, ki ga sestavljajo s pomočjo gelske kromatografije in NaDS-PAGE.
- Določitev števila prostih in disulfidno vezanih Cys v proteinu.
- Priprava vzorca za aminokislinsko analizo in izvedba analize (demonstracija).
- Karboksimetiliranje in piridiletiranje Cys v proteinu, razsoljevanje vzorca z gelsko kromatografijo, HPLC ali spiranjem oborine.
- Encimska razgradnja proteina z V8-proteinazo *S. aureus*, tripsinom in endoproteinazo Lys-C v raztopini ali PA gelu.
- Kemijska cepitev proteina s CNBr.
- Analiza razgradnih produktov proteina z NaDS-PAGE in HPLC.
- Prenos proteinov v električnem polju iz PA gela na PVDF-membrano (western-prenos).
- Detekcija proteinov v PA gelu s koloidnim srebrom, $ZnCl_2$ v prisotnosti imidazola in Coomassie modrim.
- Detekcija glikoproteinov z barvanjem PA gela s Schiffovim reagentom.
- Detekcija proteinov na PVDF-membrani s Coomassie modrim.
- Izvedba N-terminalne sekvenčne analize proteina (demonstracija).
- Identifikacija proteina na osnovi računalniške primerjave ugotovljenega delnega aminokislinskega zaporedja in baze sekvenčnih podatkov.
- Priprava vzorca za masno spektrometrijo in izvedba analize (demonstracija).

3-dimenzionalni del:

Vaje potekajo na PC-jih z operacijskim sistemom LINUX. Obsegajo naslednje teme:

- vizualizacija proteinov,
- prepoznavanje sekundarnih struktur, aminokislinskih ostankov in preko njih proteinov ob pomoči podatkovnih bank,
- poravnava aminokislinskega zaporedja in priprava homolognega 3-dimenzionalnega modela proteinske strukture.

4. POVEZANOST Z DRUGIMI PREDMETI

Predmet je povezan in hkrati dopolnjuje zlasti naslednje predmete: splošna biokemija, spektroskopija v biokemiji, analizna kemija, encimatika, biofizikalna kemija in molekularna genetika in je osnova za predmet določevanje 3-dimenzionalnih struktur makromolekul.

5. ŠTUDIJSKA LITERATURA

OSNOVNI UČBENIKI:

- Križaj, I. *Struktura proteinov: Primarna struktura - zapiski predavanj*. 2002.
- Križaj, I. *Struktura proteinov : Primarna struktura - vaje – skripta*. 2002.
- Branden, I. in Tooze, J. *Introduction to Protein Structure*.

DODATNA LITERATURA:

Znanstveni in pregledni članki.

6. OBVEZNOSTI ŠTUDENTA

Vaje, seminarska naloga, pisni in po potrebi še ustni izpit.

PRIPRAVILA: Igor Križaj, Dušan Turk

DATUM: 19. 09. 2003