

Proteínas de transporte:

- Hemoglobina
- Lipoproteínas
- Transportadores de membranas biológicas

Proteínas nutritivas de reserva:

- Proteínas de semillas (trigo, maíz, arroz)
- Ovoalbúmina
- Caseína
- Ferritina (Fe)

Enzimas: reacciones bioquímicas

Propiedades Biológicas de las Proteínas

Otras:

- Monelina (vegetal: edulcorante)
- Anticongelantes (sangre de peces Antárticos)

Proteínas reguladoras:

- Hormonas y proteínas G
- Regulación génica

Proteínas contráctiles o motiles:

- actina y miosinas
- tubulina: dineinas y kinesinas

Proteínas estructurales:

- Colágeno (tendones, cartílagos, piel)
- Elastina (ligamentos)
- Queratinas (pelos, uñas, plumas)
- Fibroína (fibras de seda de de telarañas)
- Resilina (unión de alas en insectos)

Proteínas de defensa:

- Inmunoglobulinas (anticuerpos)
- Fibrinógeno y trombina (coagulación)
- Venenos de serpientes, toxinas bacterianas, toxinas vegetales (ricina)

Contenido de la clase

Proteínas

- **Determinación de pesos moleculares**
- **Proteínas Simples y conjugadas**
- **Métodos de estudio**
- **Purificación**
- **Secuenciación**
- **Homología**

Proteínas: moléculas grandes

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

Mayoría de polipéptidos naturales < 2000 Aa

Estimación del N° de Aa en una proteína

Masa molecular relativa (M_r)
media de los 20 Aa es ≈ 138

Según proporciones de Aa en la
proteínas, M_r media es de 128

Formación del enlace peptídico
Perdida de H₂O (M_r 18):
 $128 - 18 = 110$

$N^\circ \approx \text{de Aa} = M_r \text{ prot.} / 110$

*Note that standard procedures for the acid hydrolysis of proteins convert Asn and Gln to Asp and Glu, respectively. In addition, Trp is destroyed. Special procedures must be employed to determine the amounts of these amino acids.

Composición de Aa de dos proteínas

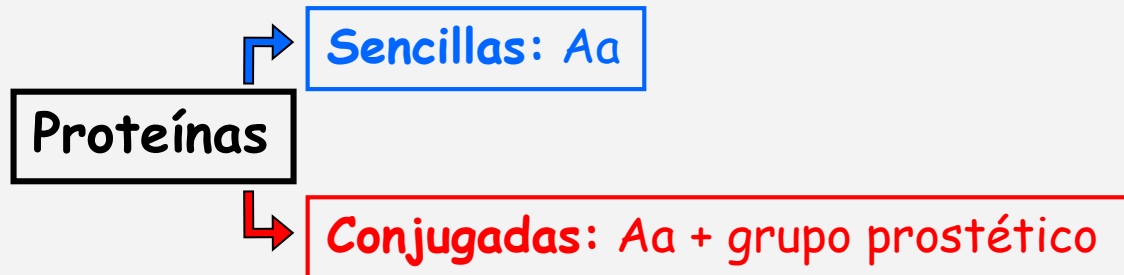
Amino acid	Number of residues per molecule of protein	
	Bovine cytochrome c	Bovine chymotrypsinogen
Ala	6	22
Arg	2	4
Asn	5	15
Asp	3	8
Cys	2	10
Gln	3	10
Glu	9	5
Gly	14	23
His	3	2
Ile	6	10
Leu	6	19
Lys	18	14
Met	2	2
Phe	4	6
Pro	4	9
Ser	1	28
Thr	8	23
Trp	1	8
Tyr	4	4
Val	3	23
Total	104	245

Contenido de la clase

Proteínas

- Determinación de pesos moleculares
- **Proteínas Simples y Conjugadas**
- Métodos de estudio
- Purificación
- Secuenciación
- Homología

Proteínas compuestas por grupos químicos diferentes a Aa



Conjugated Proteins

Class	Prosthetic group(s)	Example
Lipoproteins	Lipids	β_1 -Lipoprotein of blood
Glycoproteins	Carbohydrates	Immunoglobulin G
Phosphoproteins	Phosphate groups	Casein of milk
Hemoproteins	Heme (iron porphyrin)	Hemoglobin
Flavoproteins	Flavin nucleotides	Succinate dehydrogenase
Metalloproteins	Iron	Ferritin
	Zinc	Alcohol dehydrogenase
	Calcium	Calmodulin
	Molybdenum	Dinitrogenase
	Copper	Plastocyanin

Contenido de la clase

Proteínas

- Determinación de pesos moleculares
- Proteínas Simples y Conjugadas
- **Métodos de estudio**
- Purificación
- Secuenciación
- Homología

Métodos de estudio de las proteínas

Fuentes: tejidos o células.

Homogeneización: extracto crudo.

Centrifugación: fraccionamiento subcelular.

Separación y purificación:

- Precipitación selectiva: ácido, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, temperaturas elevadas.
- Cromatografía:
 - Intercambio iónico (carga),
 - Filtración en gel (tamaño),
 - Afinidad (ligandos).
- SDS-PAGE y Isoelectroenfoco (2DG), Western blot, ELISA (Métodos analíticos).
- Tecnología del DNA recombinante: Proteínas recombinantes

“Cuantificación” de la proteína (estimación)

- Enzima: determinación de la actividad enzimática.
- Proteína de transporte: ensayos de unión de la molécula que transporta.
- Hormonas y toxinas: determinación de efectos biológicos.
- Proteínas estructurales: generalmente representan gran parte de la masa tisular por lo que no es necesario un ensayo específico.

Purificación de una proteína con actividad enzimática

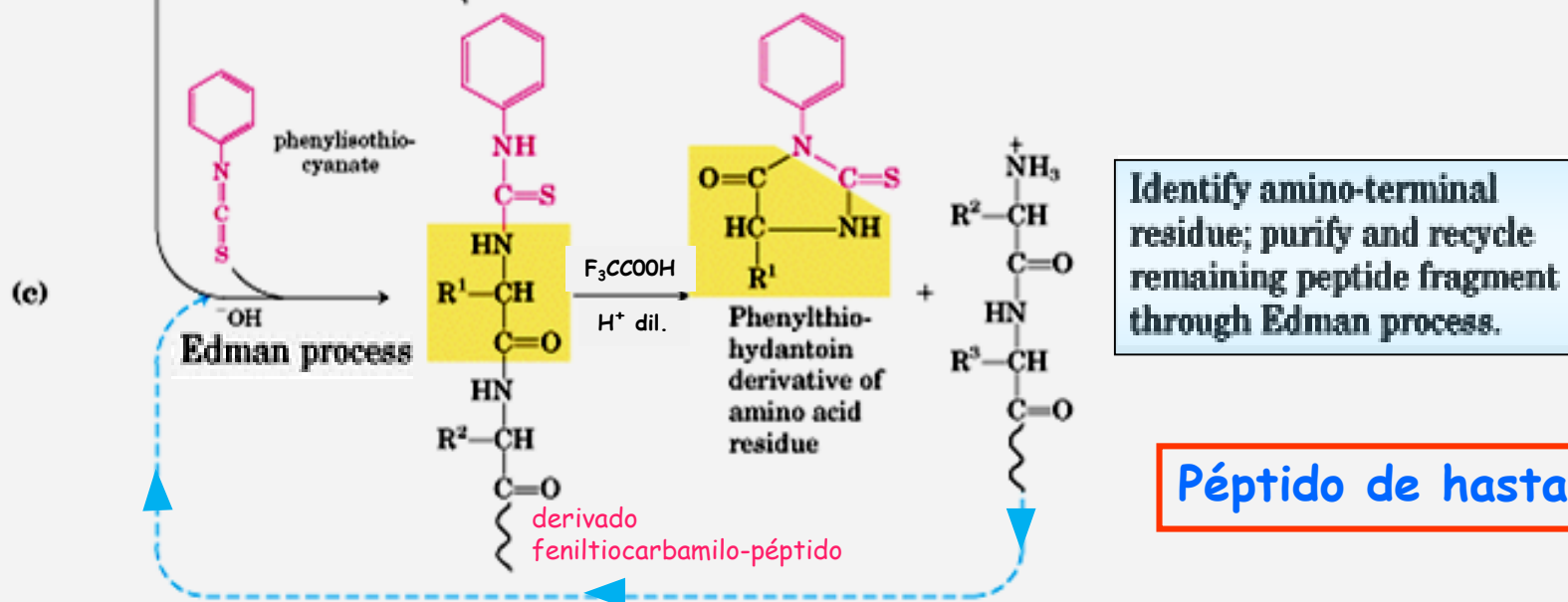
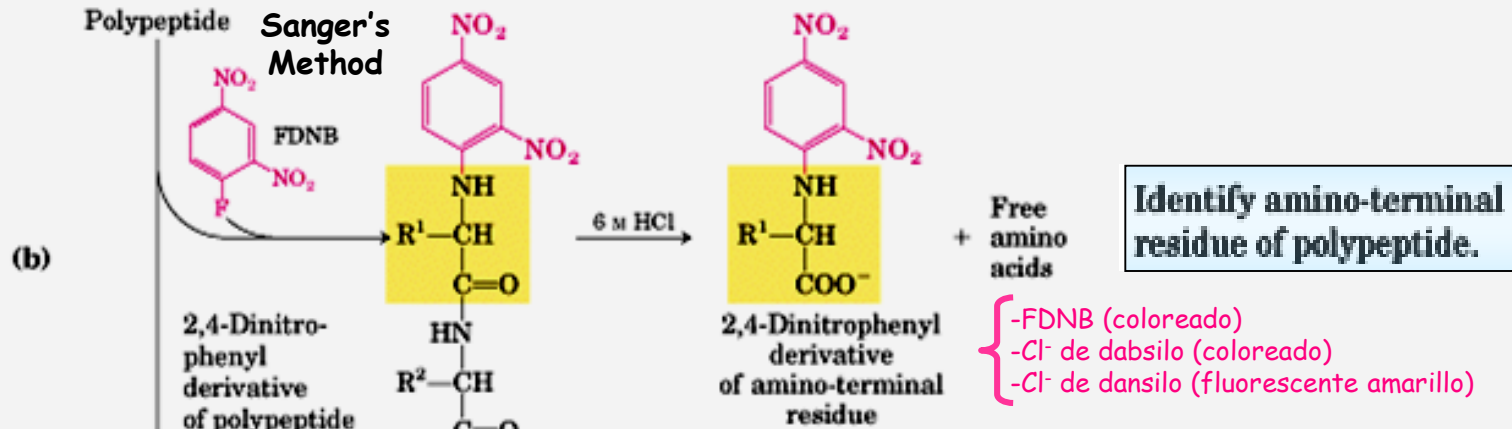
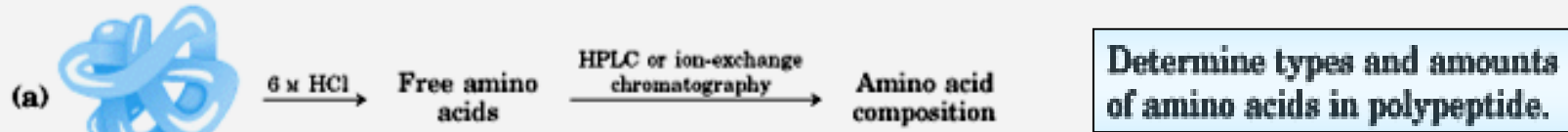
Procedure or step	Fraction volume (ml)	Total protein (mg)	Activity (units)	Specific activity (units/mg)
1. Crude cellular extract	1,400	10,000	100,000	10
2. Precipitation with ammonium sulfate	280	3,000	96,000	32
3. Ion-exchange chromatography	90	400	80,000	200
4. Size-exclusion chromatography	80	100	60,000	600
5. Affinity chromatography	6	3	45,000	15,000

Contenido de la clase

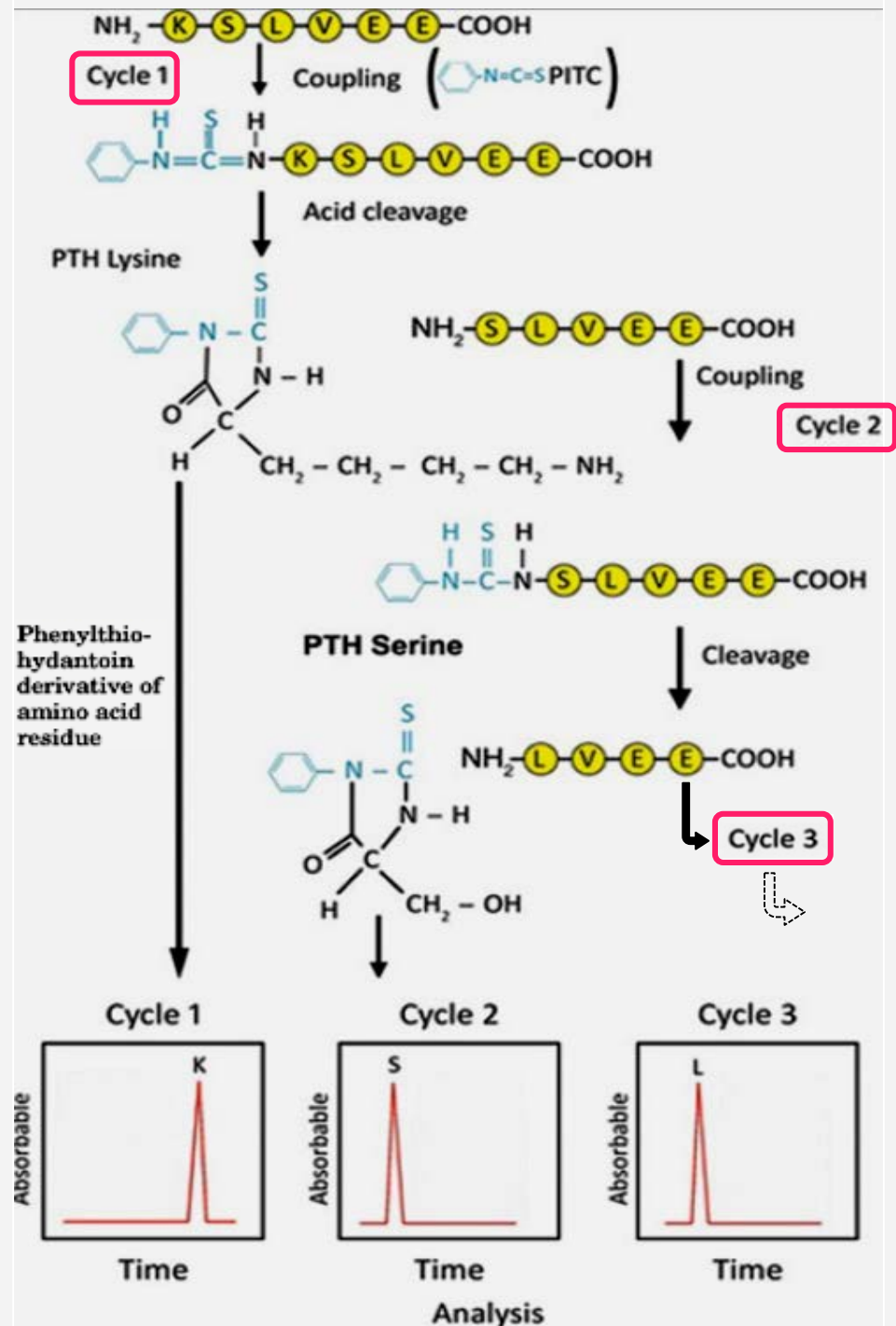
Proteínas

- Determinación de pesos moleculares
- Proteínas Simples y Conjugadas
- Métodos de estudio
- Purificación
- **Secuenciación**
- Homología

Se-cuen-cia-ción de un pép-ti-do (estructura primaria)



Degradación de Edman: secuenciación de un péptido



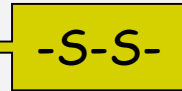
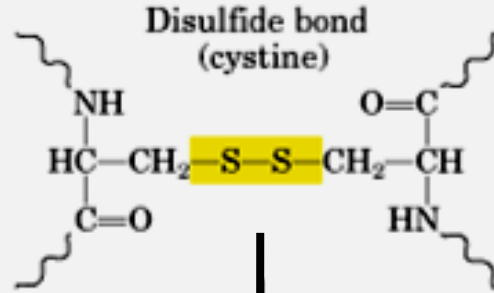
Secuenciación de un polipéptido de más de 50 aa

precisión $1/\alpha$ longitud del polipéptido

Pasos para la secuenciación

- 1- Rotura de puentes -S-S-
- 2- Rotura de cadena polipeptídica
- 3- Secuenciación del péptido
- 4- Ordenamiento de los fragmentos peptídicos
- 5- Localización de puentes -S-S-

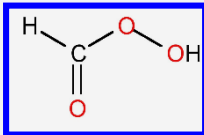
Rotura de puentes -S-S-



No es alterado por:

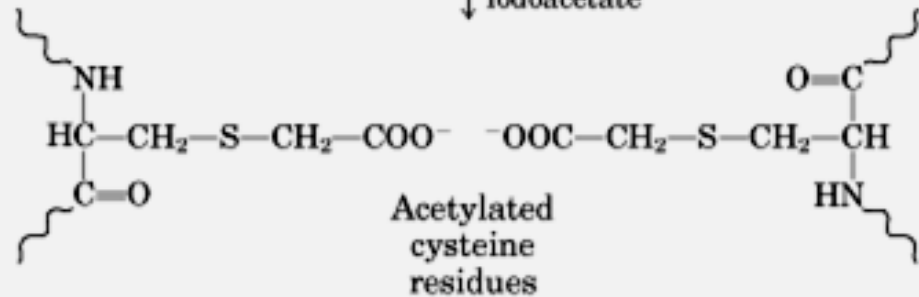
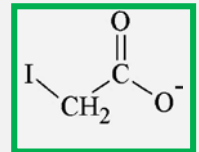
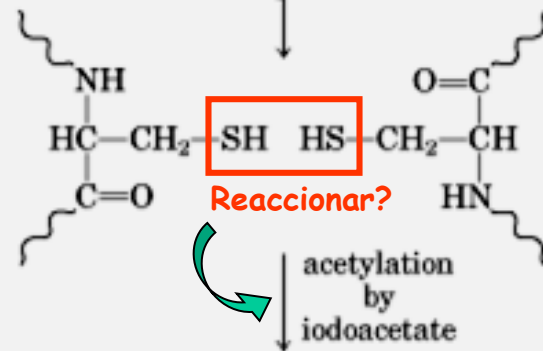
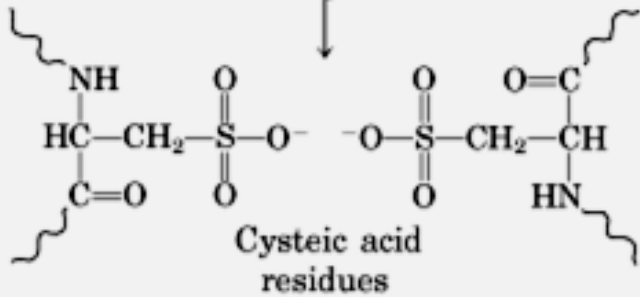
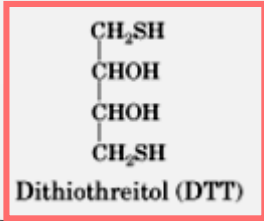
- la Rn de degradación de Edman
- la rotura enzimática o química

fragmentos unidos



oxidation by performic acid

reduction by dithiothreitol



Rotura de la cadena polipeptídica

The Specificity of Some Common Methods for Fragmenting Polypeptide Chains

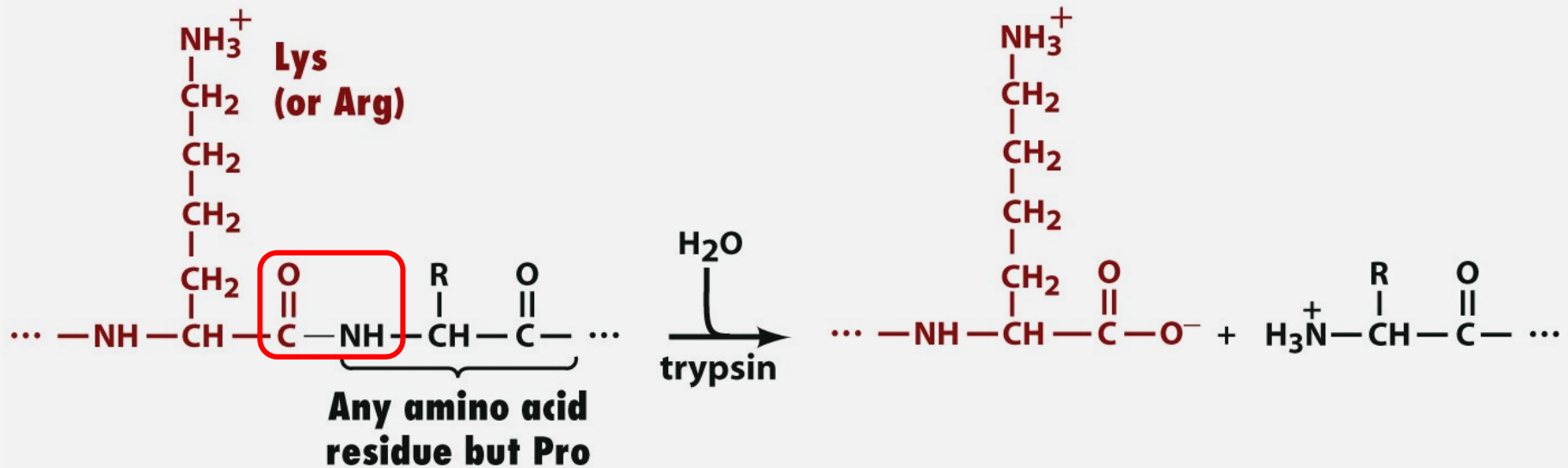
Treatment*	Cleavage points†
Trypsin	Lys, Arg (C)
<i>Submaxillarus</i> protease	Arg (C)
Chymotrypsin	Phe, Trp, Tyr (C)
<i>Staphylococcus aureus</i> V8 protease	Asp, Glu (C)
Asp- <i>N</i> -protease	Asp, Glu (N)
Pepsin	Phe, Trp, Tyr (N)
Endoproteinase Lys C	Lys (C)
Cyanogen bromide	Met (C)

*All except cyanogen bromide are proteases. All are available from commercial sources.

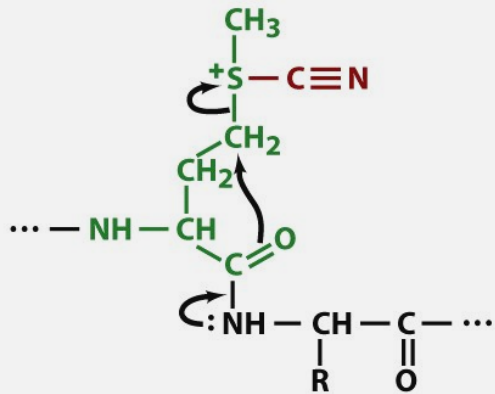
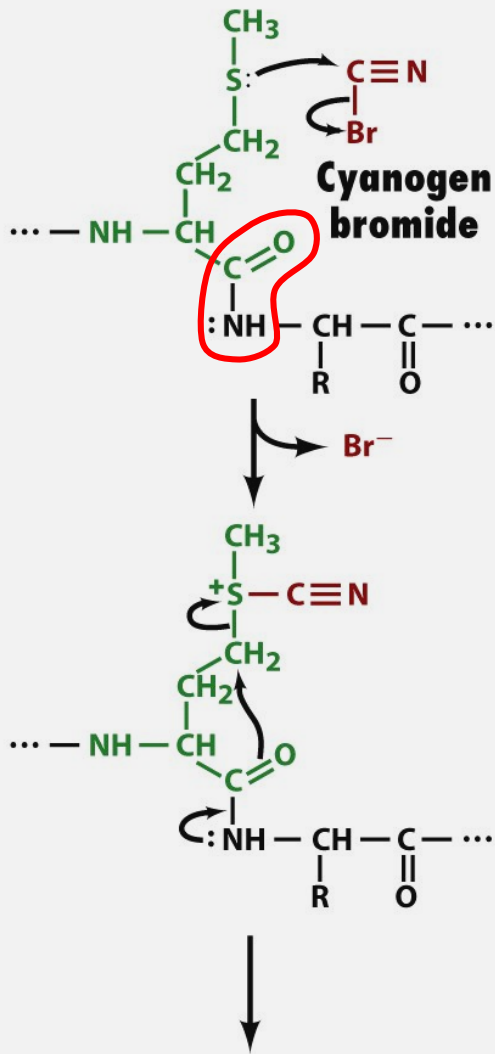
†Residues furnishing the primary recognition point for the protease or reagent; peptide bond cleavage occurs on either the carbonyl (C) or the amino (N) side of the indicated amino acid residues.

Corte del polipéptido con tripsina

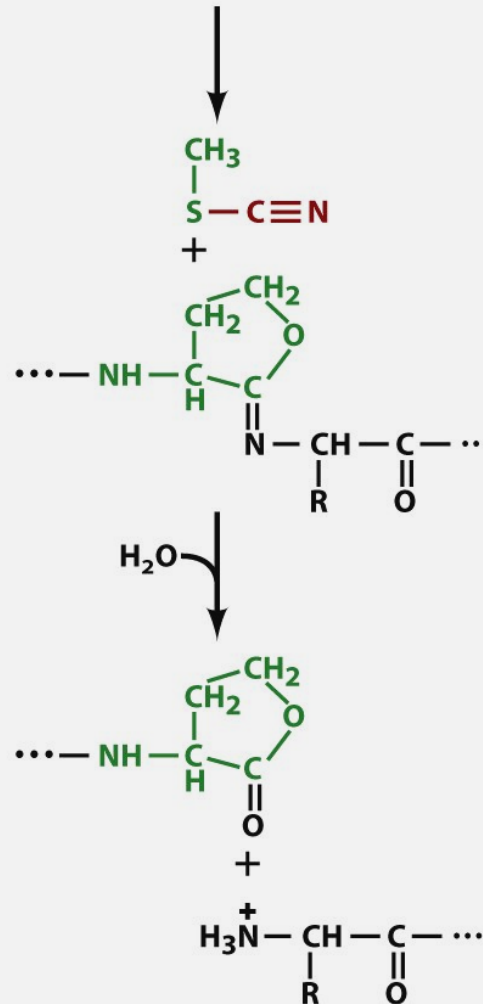
Treatment*	Cleavage points†
Trypsin	Lys, Arg (C)



Corte del polipéptido con bromuro de cianógeno

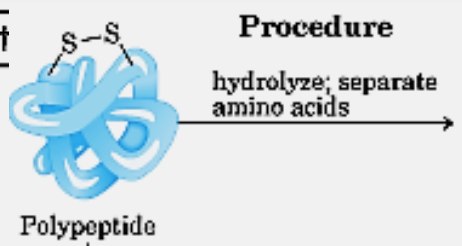


**Peptidyl
homoserine
lactone**



Treatment*	Cleavage points†
Cyanogen bromide	Met (C)

Treatment*	Cleavage points†
<u>Trypsin</u>	<u>Lys, Arg (C)</u>
<u>Cyanogen bromide</u>	<u>Met (C)</u>



Procedure
hydrolyze; separate amino acids

Result

A	5	H	2	R	1
C	2	I	3	S	2
D	4	K	2	T	1
E	2	L	2	V	1
F	1	M	2	Y	2
G	3	P	3		

Conclusion
Polypeptide has 38 amino acid residues. Trypsin will cleave three times (at one R (Arg) and two K (Lys)) to give four fragments. Cyanogen bromide will cleave at two M (Met) to give three fragments.

Amino acid	Abbreviated names	
Glycine	Gly	G
Alanine	Ala	A
Valine	Val	V
Leucine	Leu	L
Isoleucine	Ile	I
<u>Methionine</u>	<u>Met</u>	<u>M</u>
Phenylalanine	Phe	F
Tyrosine	Tyr	Y
Tryptophan	Trp	W
Serine	Ser	S
Proline	Pro	P
Threonine	Thr	T
Cysteine	Cys	C
Asparagine	Asn	N
Glutamine	Gln	Q
<u>Lysine</u>	<u>Lys</u>	<u>K</u>
<u>Histidine</u>	<u>His</u>	<u>H</u>
<u>Arginine</u>	<u>Arg</u>	<u>R</u>
Aspartate	Asp	D
<u>Glutamate</u>	<u>Glu</u>	<u>E</u>

react with FDNB; hydrolyze; separate amino acids
reduce disulfide bonds (if present)

2,4-Dinitrophenylglutamate detected

E (Glu) is amino-terminal residue.



cleave with trypsin; separate fragments; sequence by Edman degradation

- (T-1) GASMALIK
- (T-2) EGAAYHDFEPIDPR
- (T-3) DCVHSD
- (T-4) YLIACGPMTK

(T-2) placed at amino terminus because it begins with E (Glu).
(T-3) placed at carboxyl terminus because it does not end with R (Arg) or K (Lys).

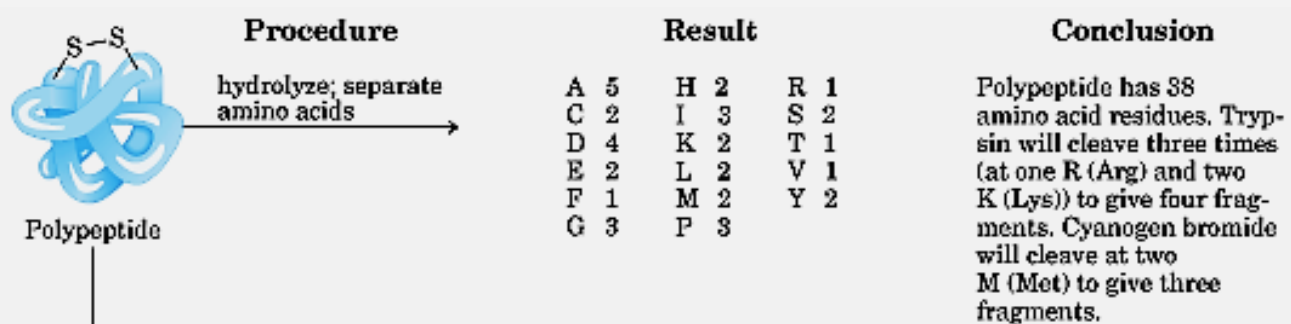
cleave with cyanogen bromide; separate fragments; sequence by Edman degradation

- (C-1) EGAAYHDFEPIDPRGASM
- (C-2) TKDCVHSD
- (C-3) ALIKYLIACGPM

(C-3) overlaps with (T-1) and (T-4), allowing them to be ordered.

establish sequence





Localización de los puentes -S-S-

Tratamiento

Tripsina

+

+

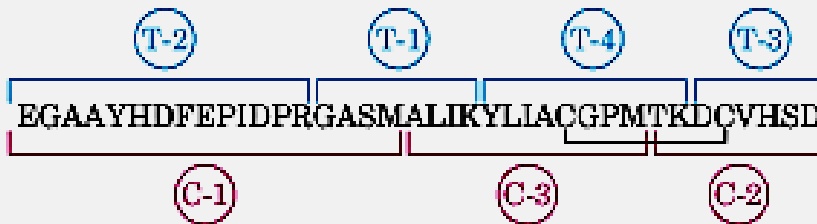
DTT

+

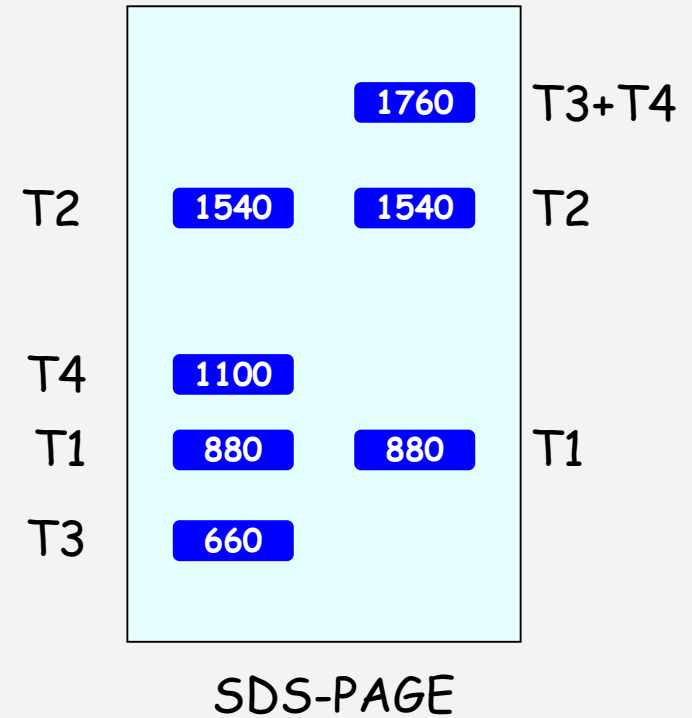
-

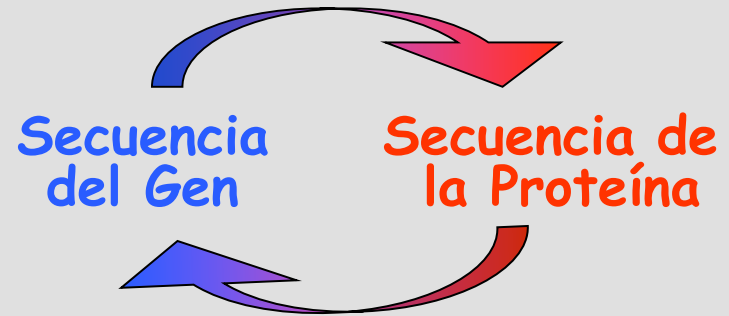
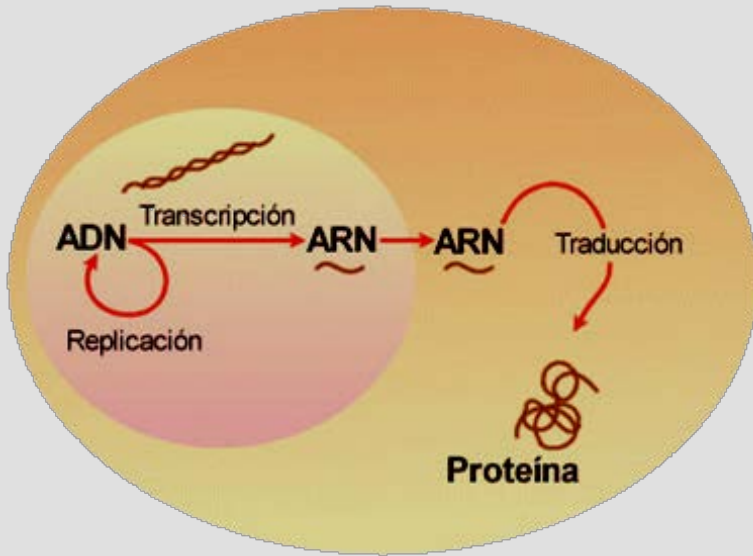
- T-1 GASMALIK
- T-2 EGAAYHDFEPIDPR
- T-3 DCVHSD
- T-4 YLIACGPMTK

Amino terminus



Carboxyl terminus



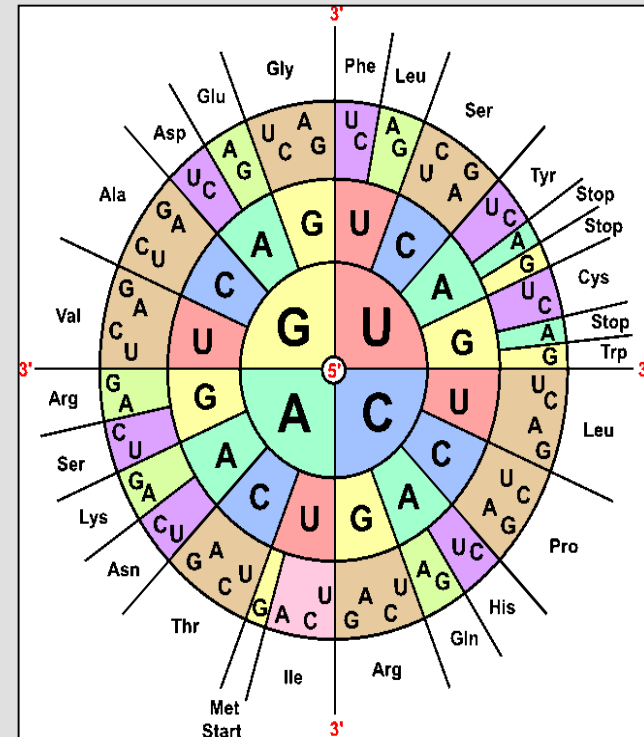


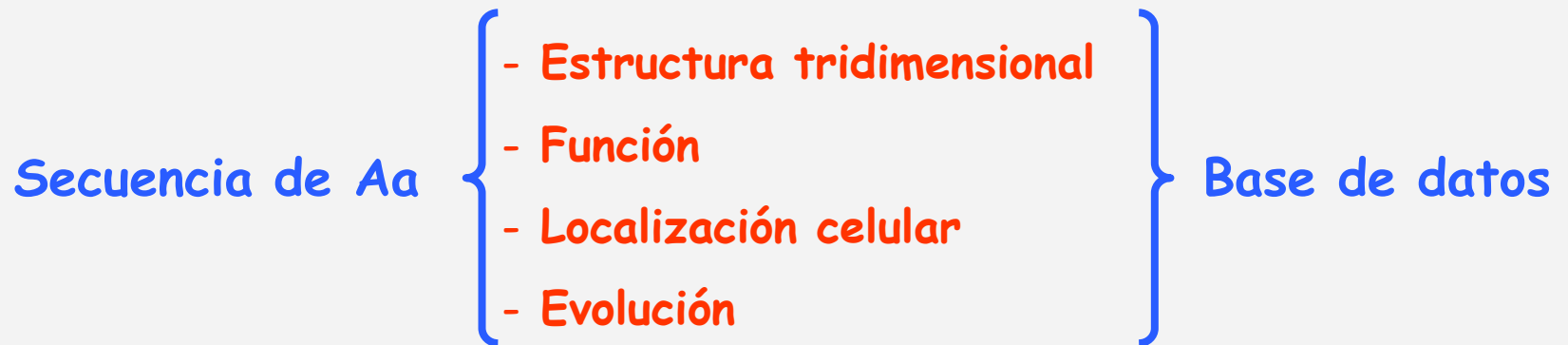
Amino acid
sequence (protein)

Gln-Tyr-Pro-Thr-Ile-Trp

DNA sequence (gene)

CAGTATCCTACGATTTGG





Contenido de la clase

Proteínas

- Determinación de pesos moleculares
- Proteínas Simples y Conjugadas
- Métodos de estudio
- Purificación
- Secuenciación
- Homología

Proteínas homólogas entre especies

- Relacionadas evolutivamente.
- Similar función (Hb).
- Longitud idéntica.
- Muchas posiciones con = Aa:

Residuos invariables: = Aa en = posición

Residuos variables: variación de Aa en = posición

- sustituciones conservadoras (\approx Aa)

- sustituciones NO conservadoras (\neq Aa)

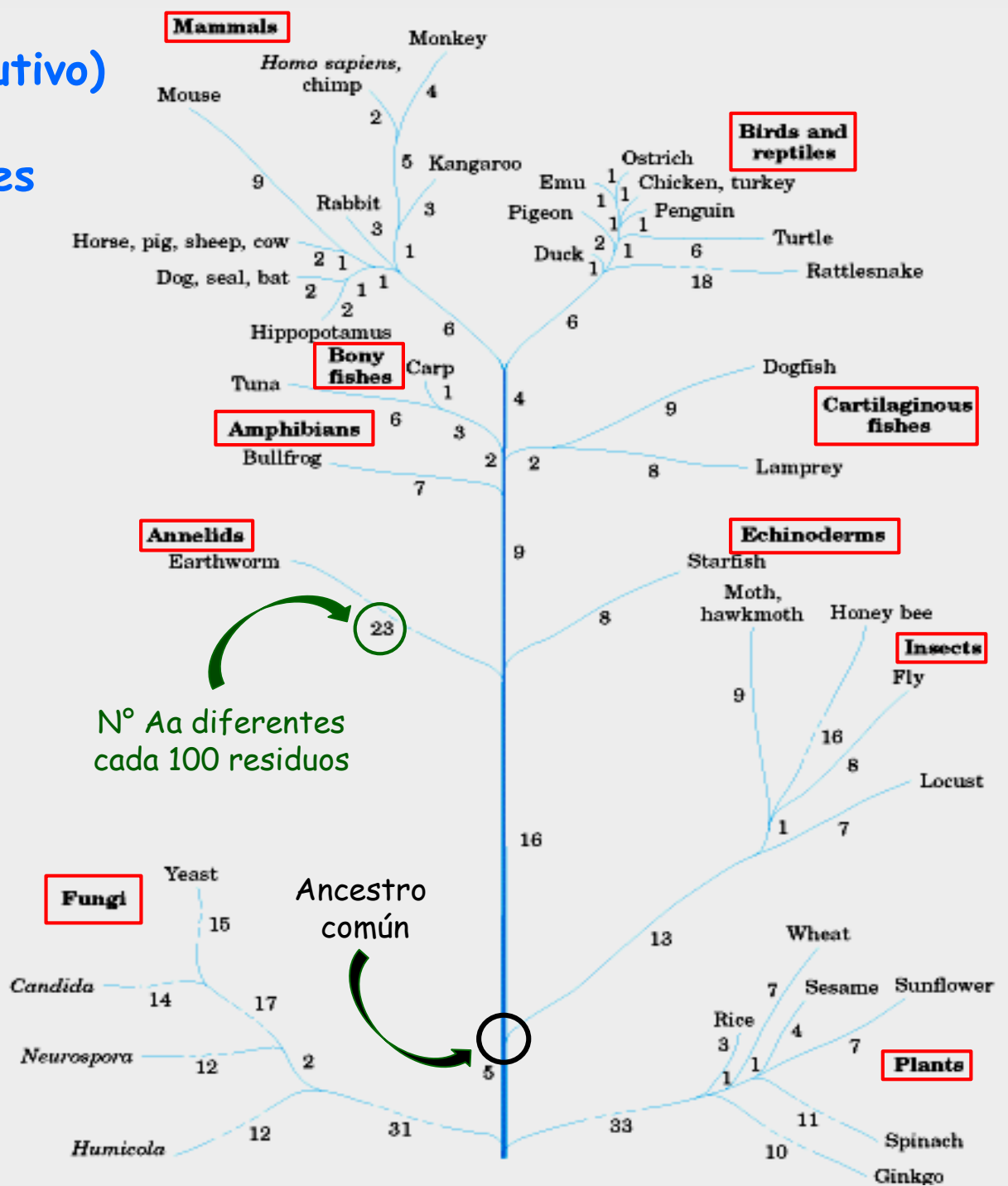
posición hipervariable

Comparación de la secuencias de Aa en el citocromo de \neq especies

Amino acid	Abbreviated names
Glycine	Gly G
Alanine	Ala A
Valine	Val V
Leucine	Leu L
Isoleucine	Ile I
Methionine	Met M
Phenylalanine	Phe F
Tyrosine	Tyr Y
Tryptophan	Trp W
Serine	Ser S
Proline	Pro P
Threonine	Thr T
Cysteine	Cys C
Asparagine	Asn N
Glutamine	Gln Q
Lysine	Lys K
Histidine	His H
Arginine	Arg R
Aspartate	Asp D
Glutamate	Glu E



Árbol filogenético (evolutivo) de citocromo c de diferentes especies



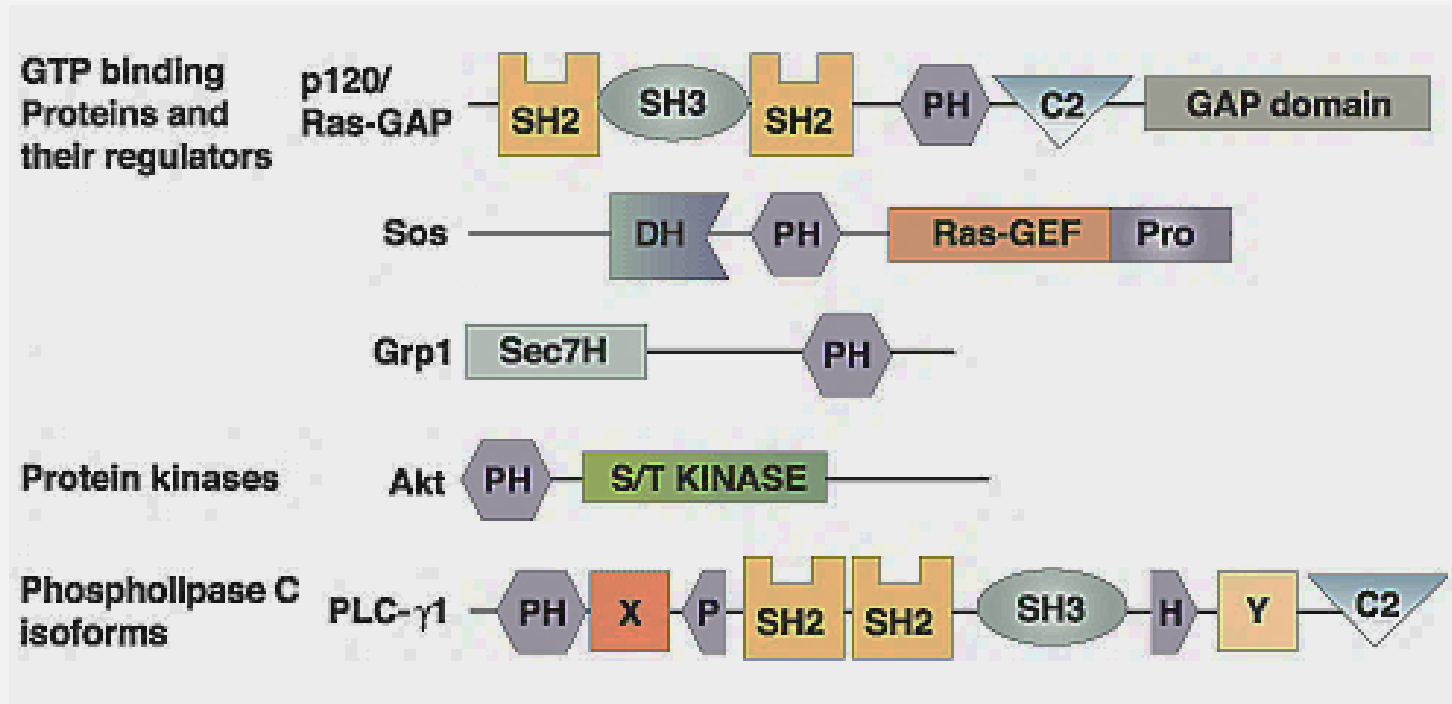
Dominios

Unión a membrana

- Dominios PH: unión a PIP (membrana)
- Dominios C2: unión a PS (membrana)

Unión proteína-proteína

- Dominios SH2: unión fosfo-Tyr
- Dominios PTB: unión fosfo-Tyr
- Dominios SH3: unión poli-Pro
- Dominios Death (DD): unión homotrópica



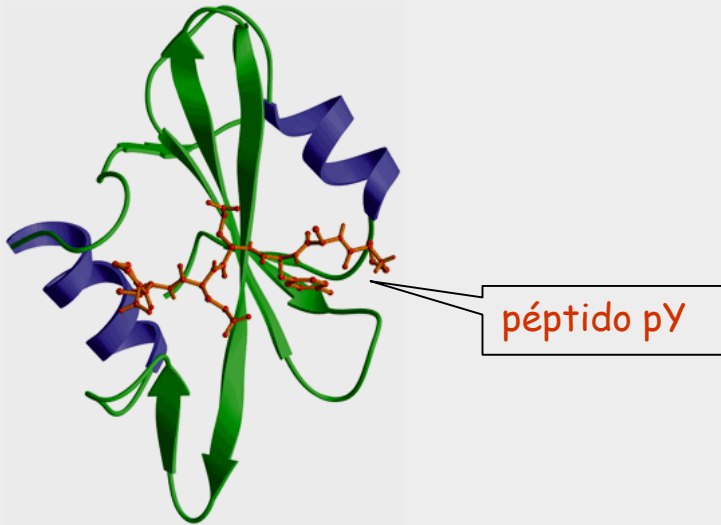
Unión a DNA

- Dominios en dedos de Zn
- Dominios cremalleras de Leucina
- Homeodominios

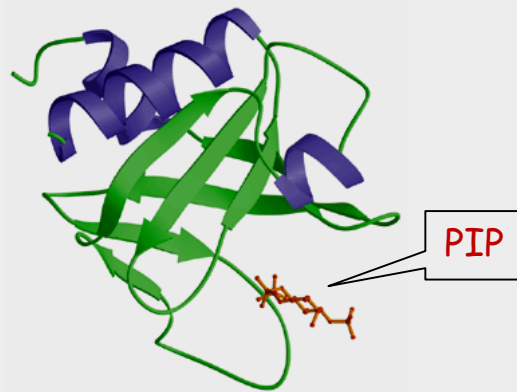
Catalíticos (unión al sustrato)

- Dominios quinasa (S/T, Y)
- Dominios GTPasa
- X e Y

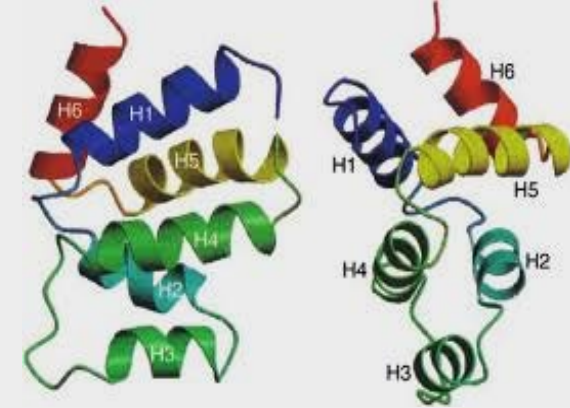
Dominio SH2:
Unión a fosfo-Tyr



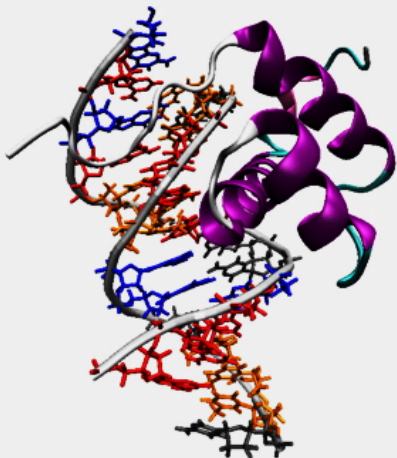
Dominio PH:
Unión a PIP



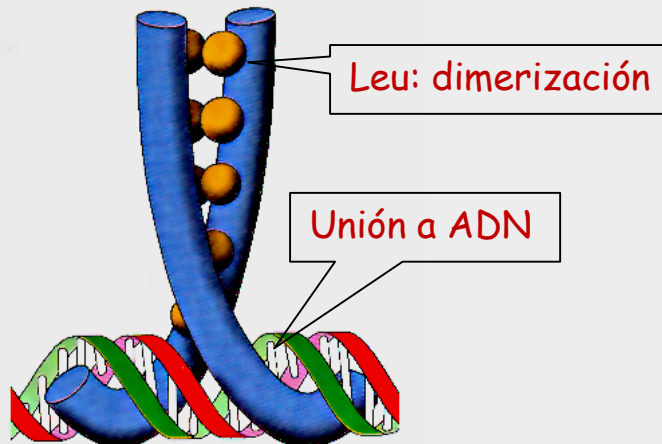
Dominios "Death"



Homeodominios
Unión a DNA



Dominio Cremallera de Leu. Unión a DNA



Dominio Dedo de Zinc
Unión a DNA

