

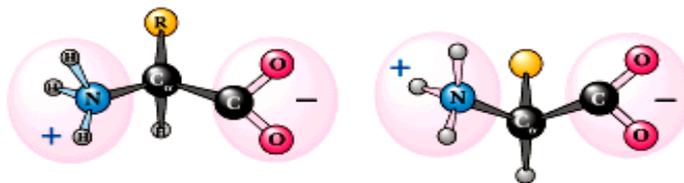
Tema 4. Proteínas: funciones biológicas y estructura primaria.

Enlace peptídico. Péptidos y proteínas. Diversidad de funciones biológicas. Niveles de organización estructural de las proteínas. Separación y purificación de proteínas. Estructura primaria. Información a partir de la secuencia de aminoácidos. Proteínas homólogas. Métodos de análisis de proteínas

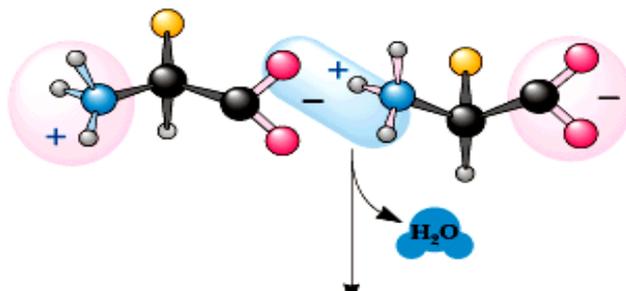
BIOQUÍMICA-1º de Medicina
Dpto. Biología Molecular
Jesús Navas



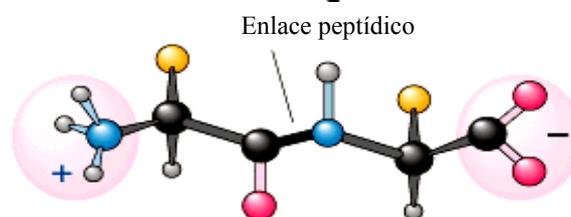
LOS AMINOÁCIDOS SE PUEDEN UNIR POR ENLACES PEPTÍDICOS



Dos aminoácidos



Eliminación de una
molécula de agua



... Formación del enlace
CO-NH

Extremo amino

Extremo carboxilo



PEPTIDOS Y PROTEINAS

- **Péptido:** hasta 50 aminoácidos.
- **Oligopéptido:** péptido pequeño.
- **Polipéptido:** péptido grande.
- **Proteínas oligoméricas:** formadas por subunidades idénticas llamadas protómeros.
- Proteínas sencillas y **conjugadas (grupo prostético)**

SECUENCIA DE LA INSULINA DE VACA

La insulina tiene dos cadenas unidas por dos puentes disulfuro. La cadena A tiene 21 aa y la B tiene 30 aa.

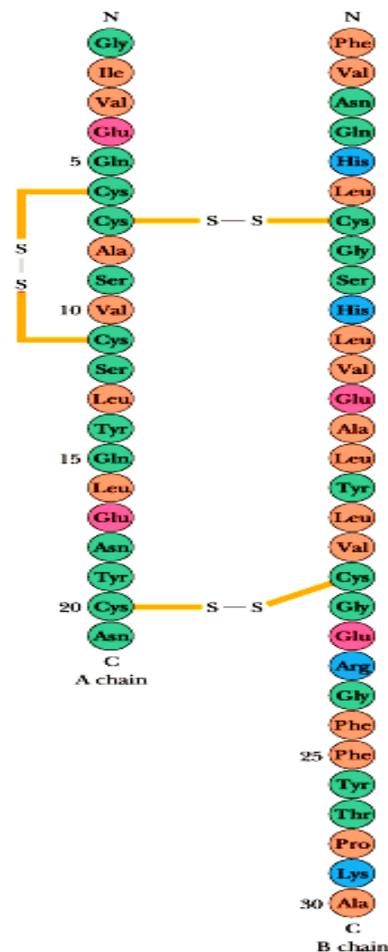


Table 5.1 An Overview of Protein Functions

Type of Protein	Function	Examples
Enzymatic proteins	Selective acceleration of chemical reactions	Digestive enzymes (hydrolyze polymers in food)
Structural proteins	Support	Silk fibers (cocoons and spider webs), collagen and elastin (animal connective tissues), keratin (hair, horns, feathers)
Storage proteins	Storage of amino acids	Ovalbumin (egg white), casein (milk), storage proteins in seeds
Transport proteins	Transport of other substances	Hemoglobin (blood), proteins that transport molecules across cell membranes
Hormonal proteins	Coordination of an organism's activities	Insulin (helps regulate concentration of sugar in blood)
Receptor proteins	Response of cell to chemical stimuli	Nerve cell receptors (detect chemical signals released by other nerve cells)
Contractile and motor proteins	Movement	Actin and myosin (muscles), proteins responsible for undulations of cilia and flagella
Defensive proteins	Protection against disease	Antibodies (combat bacteria and viruses)

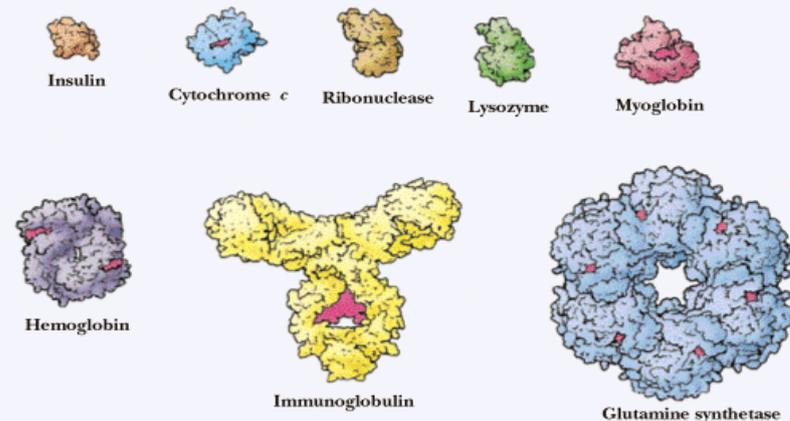
Copyright © 2005 Pearson Education, Inc. Publishing as Pearson Benjamin Cummings. All rights reserved.



Table 5.1

Size of Protein Molecules*

Protein	M _r	Number of Residues per Chain	Subunit Organization
Insulin (bovine)	5,733	21 (A) 30 (B)	$\alpha\beta$
Cytochrome <i>c</i> (equine)	12,500	104	α_1
Ribonuclease A (bovine pancreas)	12,640	124	α_1
Lysozyme (egg white)	13,930	129	α_1
Myoglobin (horse)	16,980	153	α_1
Chymotrypsin (bovine pancreas)	22,600	13 (α) 132 (β) 97 (γ)	$\alpha\beta\gamma$
Hemoglobin (human)	64,500	141 (α) 146 (β)	$\alpha_2\beta_2$
Serum albumin (human)	68,500	550	α_1
Hexokinase (yeast)	96,000	200	α_4
γ-Globulin (horse)	149,900	214 (α) 446 (β)	$\alpha_2\beta_2$
Glutamate dehydrogenase (liver)	332,694	500	α_6
Myosin (rabbit)	470,000	1800 (heavy, <i>h</i>) 190 (α) 149 (α') 160 (β)	$h_2\alpha_1\alpha'\beta_2$
Ribulose biphosphate carboxylase (spinach)	560,000	475 (α) 123 (β)	$\alpha_6\beta_6$
Glutamine synthetase (<i>E. coli</i>)	600,000	468	α_{12}



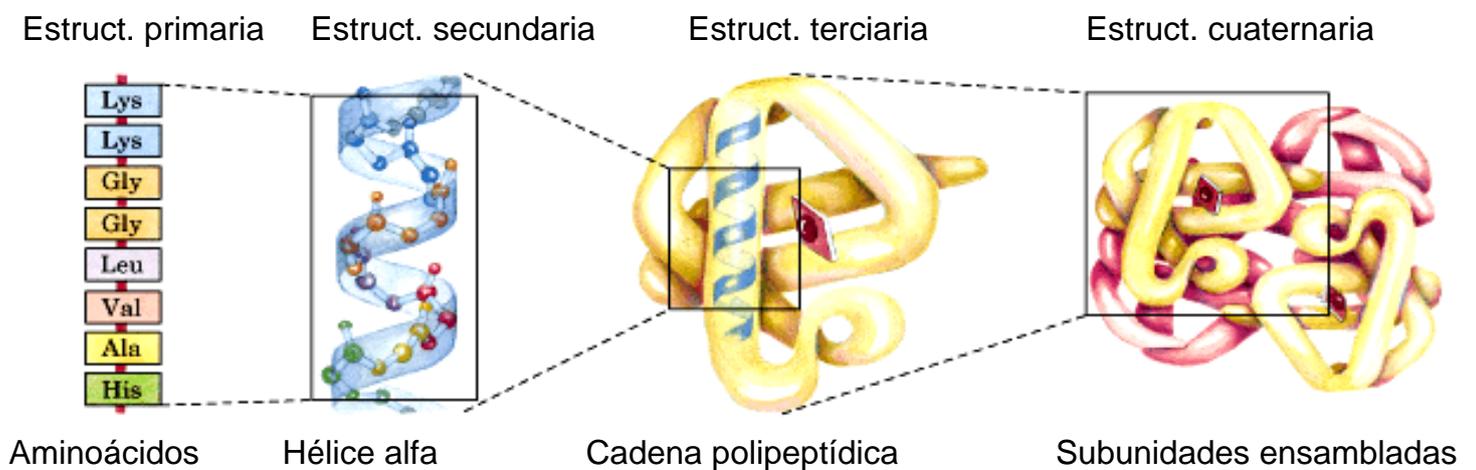
*Illustrations of selected proteins listed in Table 5.1 are drawn to constant scale. Adapted from Goodsell and Olson, 1993. *Trends in Biochemical Sciences* 18:65-68.



Clasificación de proteínas según su grupo prostético

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

Niveles de organización de las proteínas



Factores que determinan la conformación proteica

Además de la estructura primaria, las condiciones físico-químicas del entorno: cambios en el pH, concentración salina, temperatura, otros factores ambientales.

Desnaturalización es la pérdida de la conformación de una proteína.

Una proteína desnaturalizada pierde su actividad biológica.

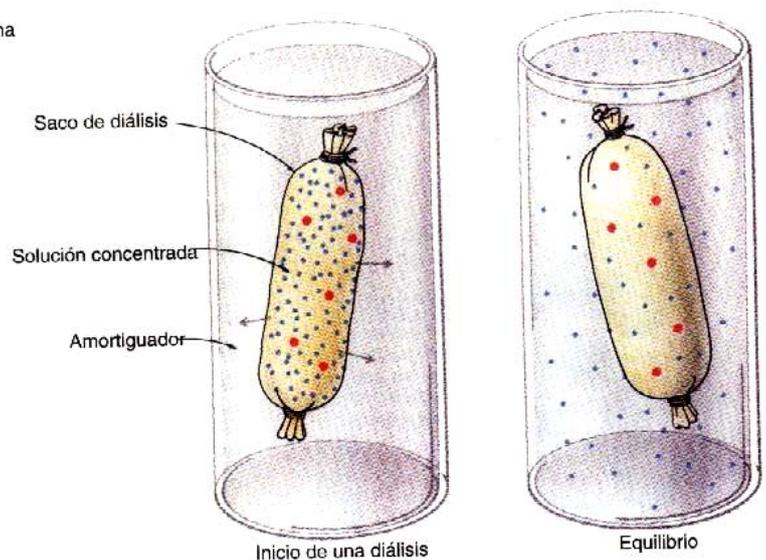
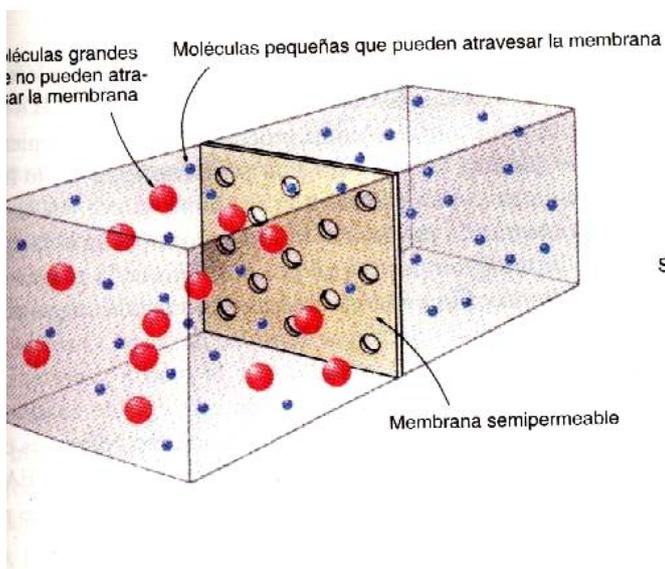
Clasificación de proteínas según su grupo prostético

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

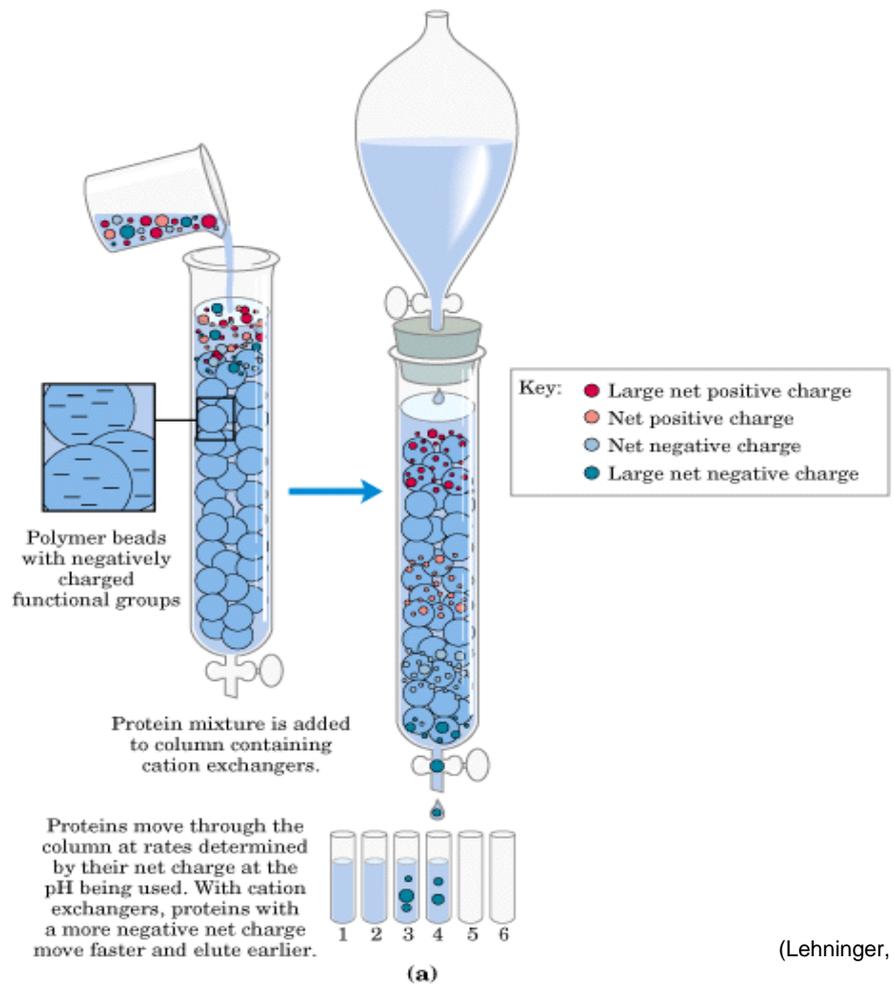
PURIFICACIÓN Y ANÁLISIS DE PROTEÍNAS

1. Obtención del extracto crudo
2. Fraccionamiento del extracto crudo por precipitación con sulfato amónico y diálisis
3. Cromatografía en columna:
 - Por su carga: cromatografía de intercambio iónico
 - Por su masa: cromatografía de filtración molecular
 - Por sus propiedades biológicas: cromatografía de afinidad
4. Electroforesis en gel:
 - Electroforesis en poliacrilamida-SDS
 - Enfoque isoelectrico
 - Electroforesis bidimensional

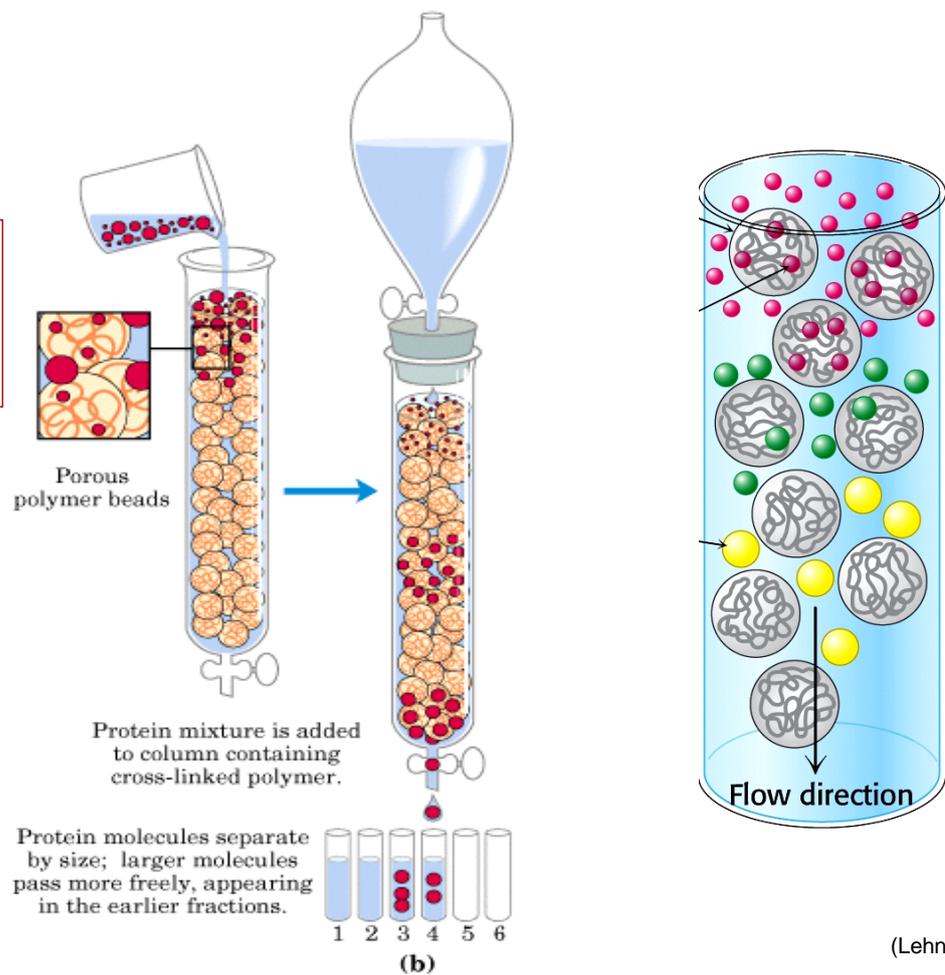
Diálisis



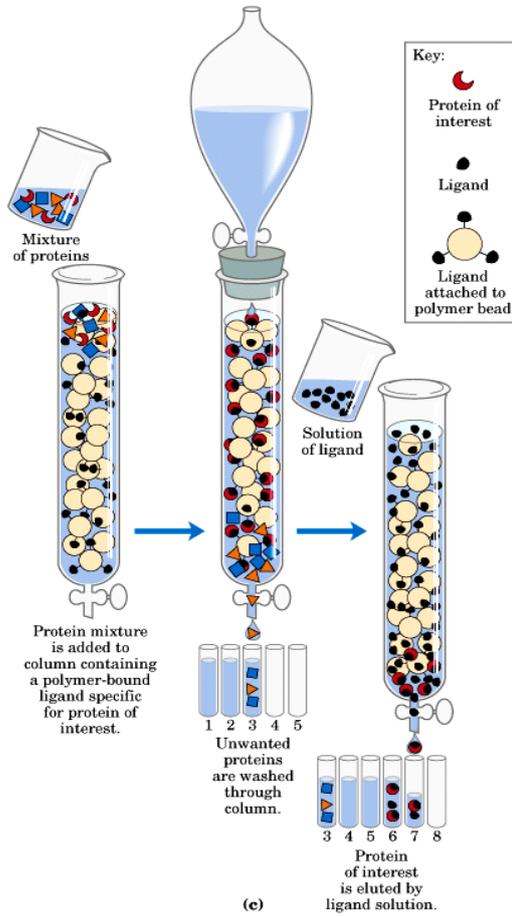
Cromatografía intercambio iónico



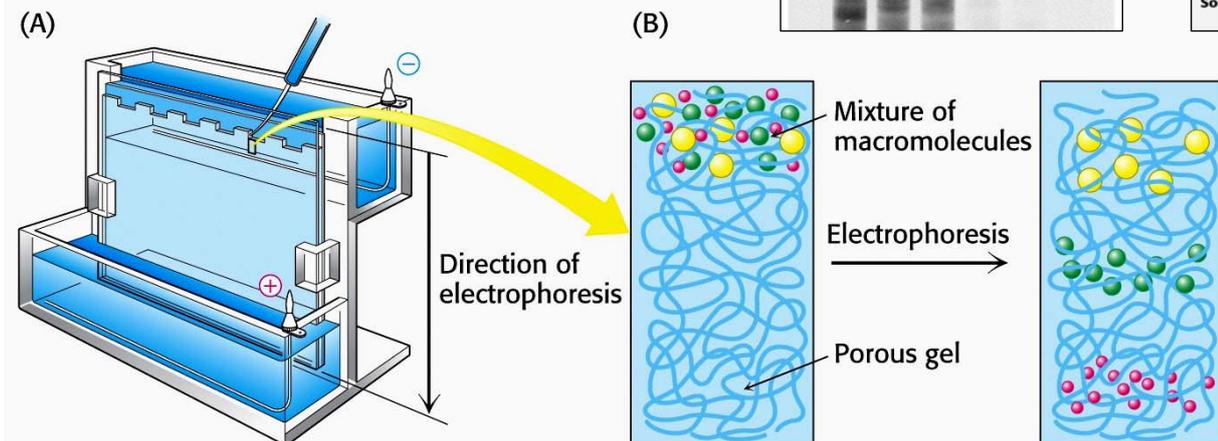
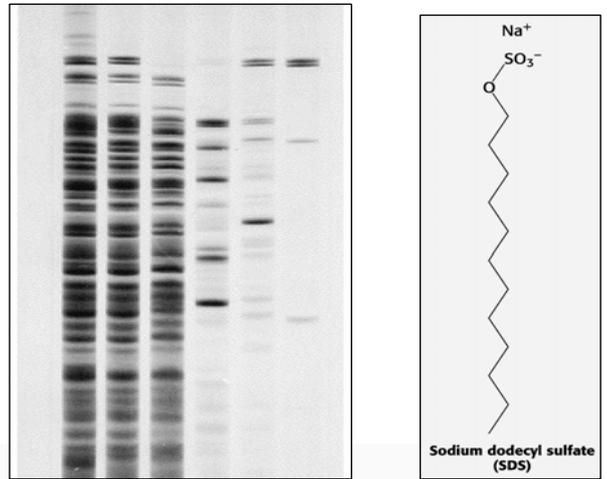
Cromatografía de exclusión molecular



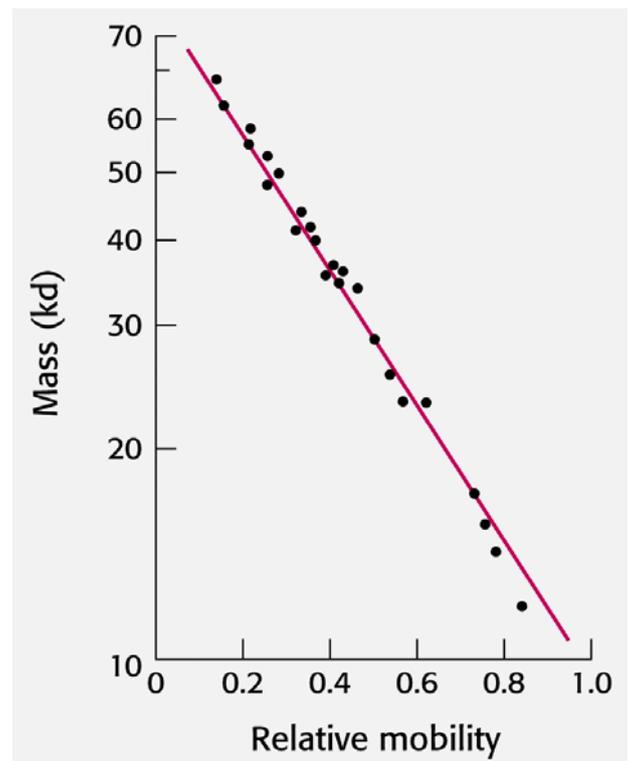
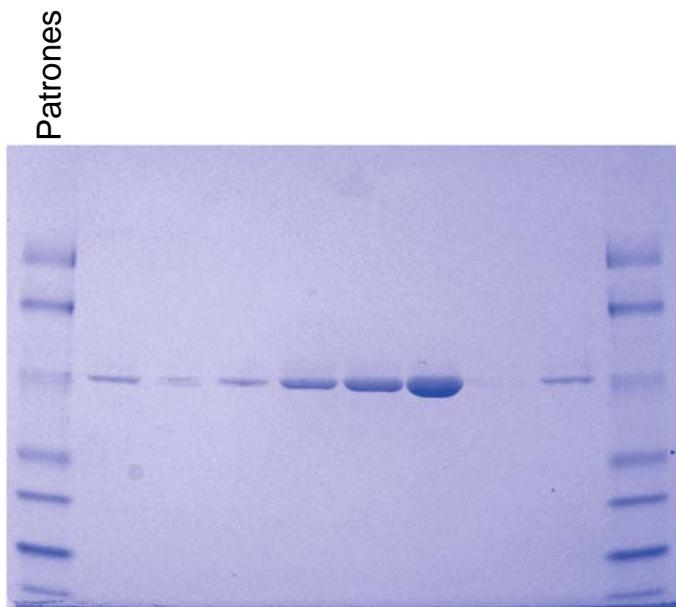
Cromatografía de afinidad



Separación de proteínas por electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS



Determinación de la masa molecular de una proteína por electroforesis en poliacrilamida-SDS



Sangre: células y proteínas plasmáticas

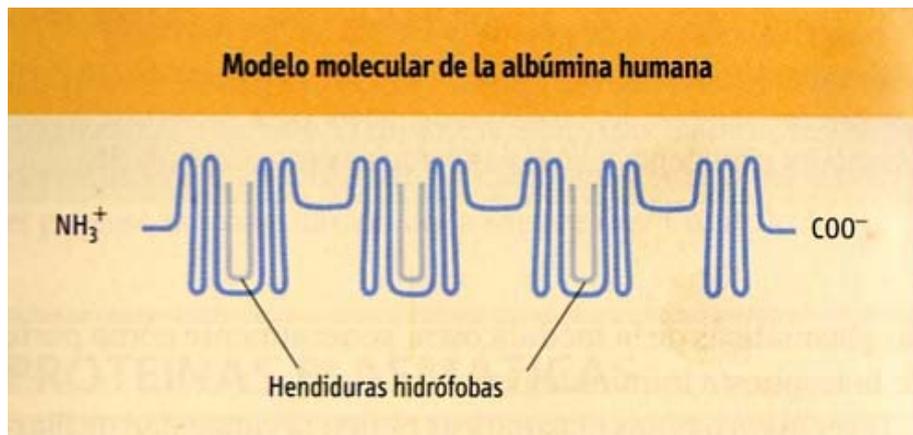
- La sangre es un sistema de transporte y distribución de nutrientes.
- Está formada por una solución acuosa que contiene moléculas de tamaño variable y diversos tipos de elementos celulares.

Plasma y suero

- Los elementos formes de la sangre se encuentran en una suspensión acuosa denominada plasma. Es el sobrenadante obtenido al centrifugar una muestra de sangre tratada con anticoagulante.
- Suero: sobrenadante obtenido al centrifugar una muestra de sangre después de haber dejado que coagule. La mayoría de las determinaciones químicas se hacen en suero.

Proteínas plasmáticas

- Sintetizadas en el hígado: albúmina.
- Producidas por las células plasmáticas de la médula ósea: inmunoglobulinas.



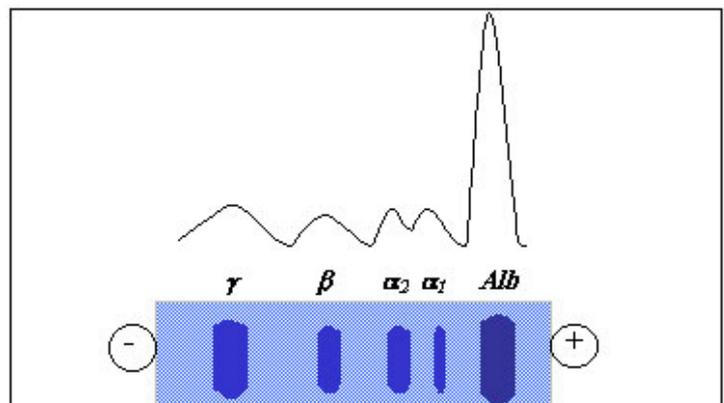
- 50% de la proteína plasmática humana
- Concentración en sangre: 35-55 g/l
- Pm = 66 kDa, muy soluble en agua.
- A pH 7 es un polianión con 20 cargas negativas (fija muchos ligandos)
- Posee hendiduras hidrófobas capaces de fijarse a ácidos grasos

PROTEINOGRAMA

- Proteínas totales: 6-8 g/100ml
- Albúmina: 3'5-5'5 g/100 ml
- Globulinas: 2-3 g/100 ml

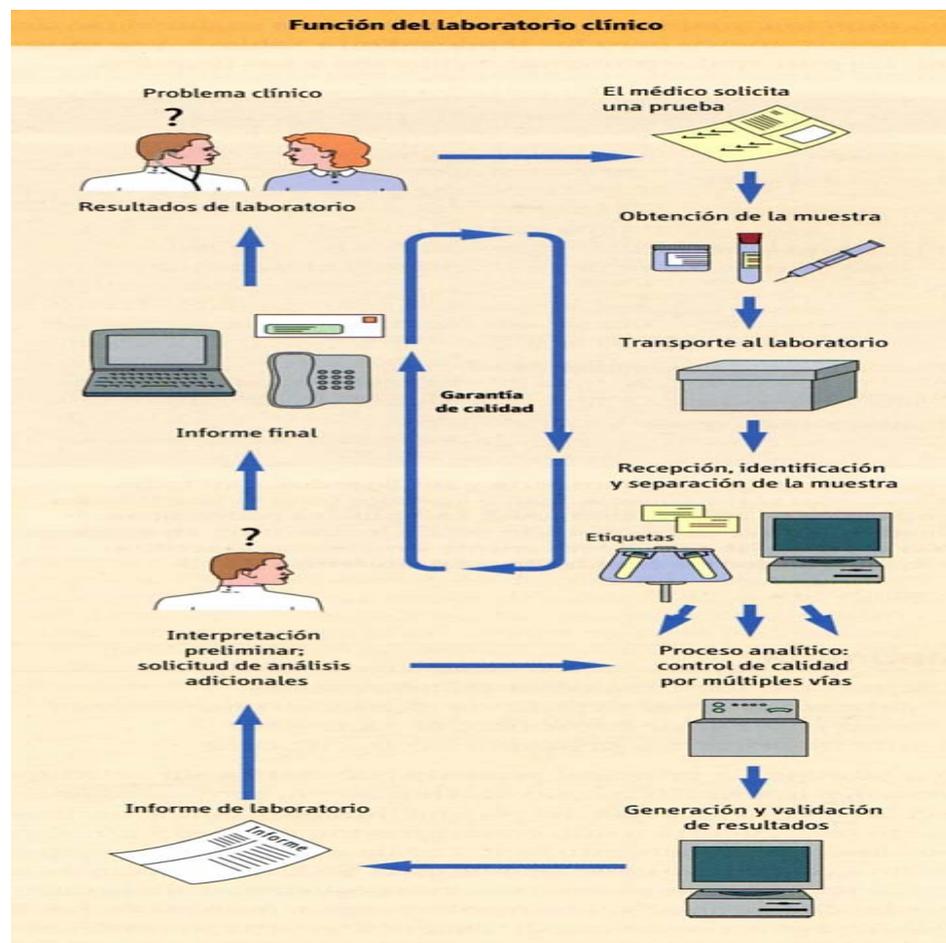
ELECTROFORESIS

Albúmina	45-55 % total
Globulinas	
α_1	5-8 %
α_2	8-13 %
β	11-17 %
γ	15-25 %



PATRONES DE ALTERACION DEL PROTEINOGRAMA

	<i>Prot Tot</i>	<i>Alb</i>	$\alpha 1$	$\alpha 2$	β	γ
Sínd. nefrótico	↓	↓	↘	↘	↘	↘
Ins renal crónica	↓	↓	↘		↘	↘
γ -patía monoclonal	↗	↘				↗
Reacción fase aguda	↘	↓	↑	↗		↑(PCR)
Artr. reumatoide	↘	↑		↗	↑(PCR)	↗
Anemia ferropénica					↑	
Hepatopatía crónica	↘	↓	↘	↘	↘	↑



CUANTIFICACION DE PROTEINAS

- **Proteína total** (Biuret, Bradford).
- La cuantificación de una proteína requiere un ensayo biológico específico que permita medir su actividad (ej: ensayo de la actividad de un enzima).
- Parámetros más utilizados:

ACTIVIDAD: unidades totales de la proteína (definir 1 U)

ACTIVIDAD ESPECIFICA: n° unidades de la proteína/mg de proteína total.

A lo largo del proceso de purificación va disminuyendo la actividad total y aumentando la actividad específica.

tabla 5-5

Tabla de purificación para un enzima hipotético*

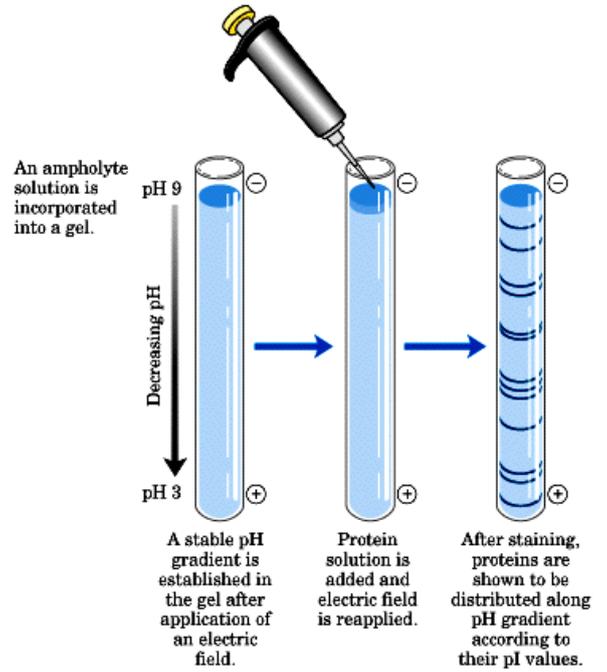
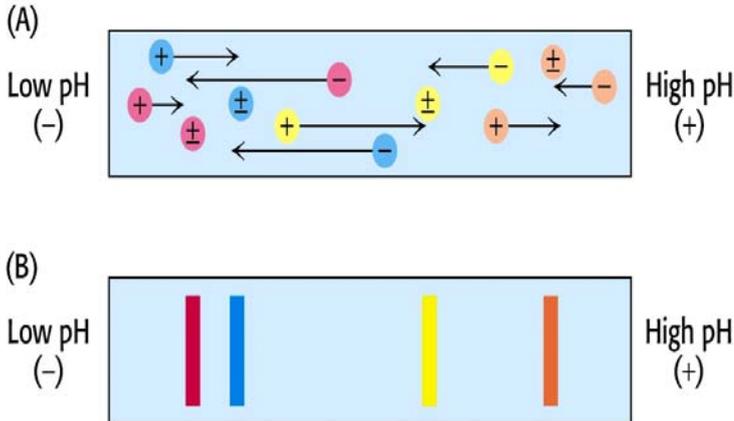
Procedimiento o paso	Volumen de la fracción (ml)	Proteína total (mg)	Actividad (unidades)	Actividad específica (unidades/mg)
1. Extracto celular crudo	1.400	10.000	100.000	10
2. Precipitación con sulfato amónico	280	3.000	96.000	32
3. Cromatografía de intercambio iónico	90	400	80.000	200
4. Cromatografía de exclusión por tamaño	80	100	60.000	600
5. Cromatografía de afinidad	6	3	45.000	15.000

* Todos los datos representan el estado de la muestra *después* de haber efectuado el procedimiento indicado. La actividad y la actividad específica se definen en la página 137.

Separación de proteínas por electroenfoque

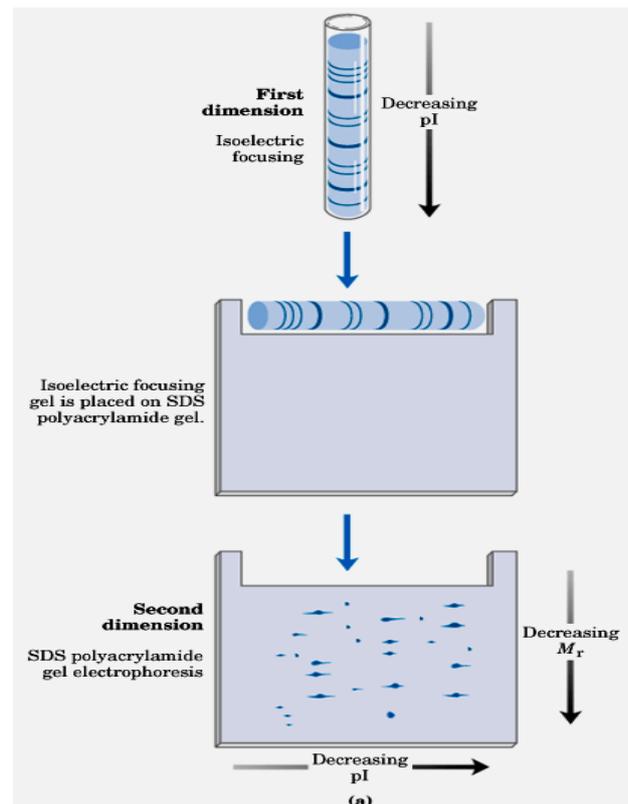
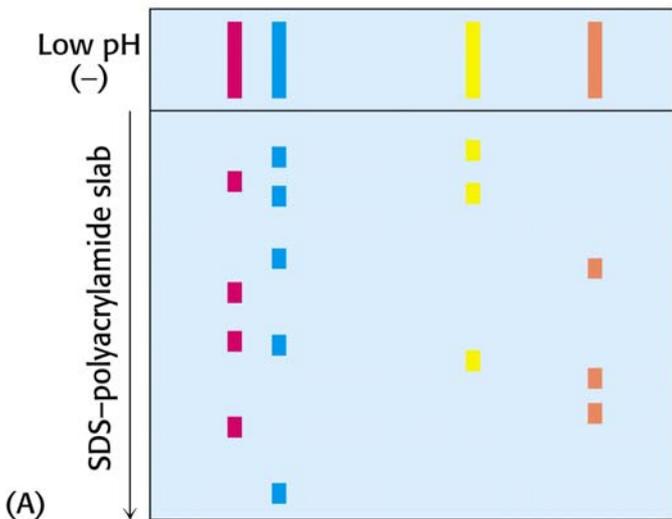
The Isoelectric Points of Some Proteins

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

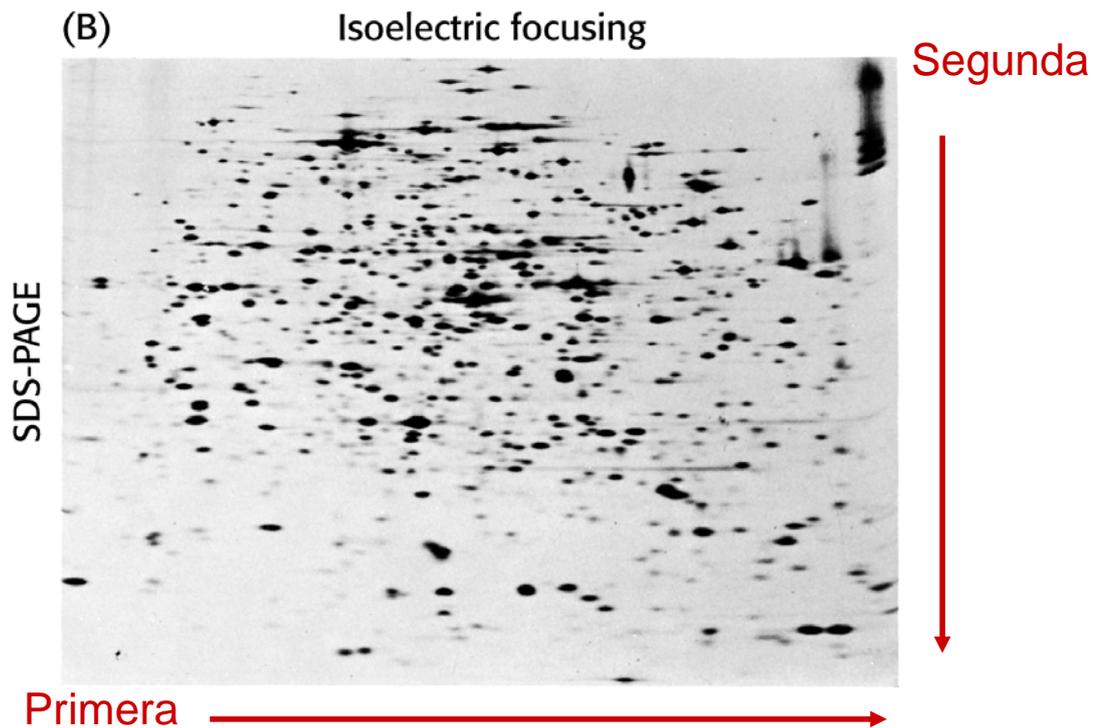


(Lehninger, 2000)

Electroforesis bidimensional de proteínas

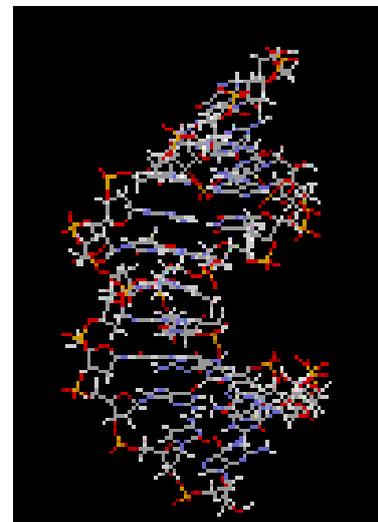


La electroforesis bidimensional (isoelectroenfoco + electroforesis en SDS) permite separar las 4.000-5.000 proteínas de una célula



PROTEOMA Y MEDICINA

- Proteoma: totalidad de las proteínas que concurren a la realización de distintos procesos biológicos.
- Posee una naturaleza dinámica modificable (ambiente, estrés, nutrición, enfermedad).
- El genoma humano consta de 30.000 genes, pero las proteínas serían unas 300.000.
- Importancia en Medicina: **muchos medicamentos ejercen su acción a través de proteínas o simplemente son proteínas.**



Para conocer la estructura primaria o secuencia de aminoácidos de una proteína:

a) Sabiendo la secuencia de codones del gen:

DNA sequence GGG | TTC | TTG | GGA | GCA | GCA | GGA | AGC | ACT | ATG | GGC | GCA |

Amino acid sequence Gly Phe Leu Gly Ala Ala Gly Ser Thr Met Gly Ala

b) Secuenciando la proteína:

- Enzimas proteolíticas específicas
- Método de degradación secuencial de Edman
- Espectrometría de masas

LA FUNCIÓN DE UNA PROTEÍNA DEPENDE DE SU SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS

- Proteínas con funciones distintas tienen secuencias distintas.
- Cada proteína tiene un nº de residuos y secuencia característicos
- Una mutación puntual produce un cambio en la secuencia de aacs que resulta en una proteína defectuosa, que puede causar enfermedad.
- Proteínas con funciones similares de diferentes especies tienen secuencias similares (ubiquitina, idéntica en la mosca y en el hombre).
- El 20-30% de las proteínas humanas son polimórficas (varían en diferentes individuos). La mayoría de estas variaciones no afectan a su función.

Secuencias de la mioglobina humana y de cachalote

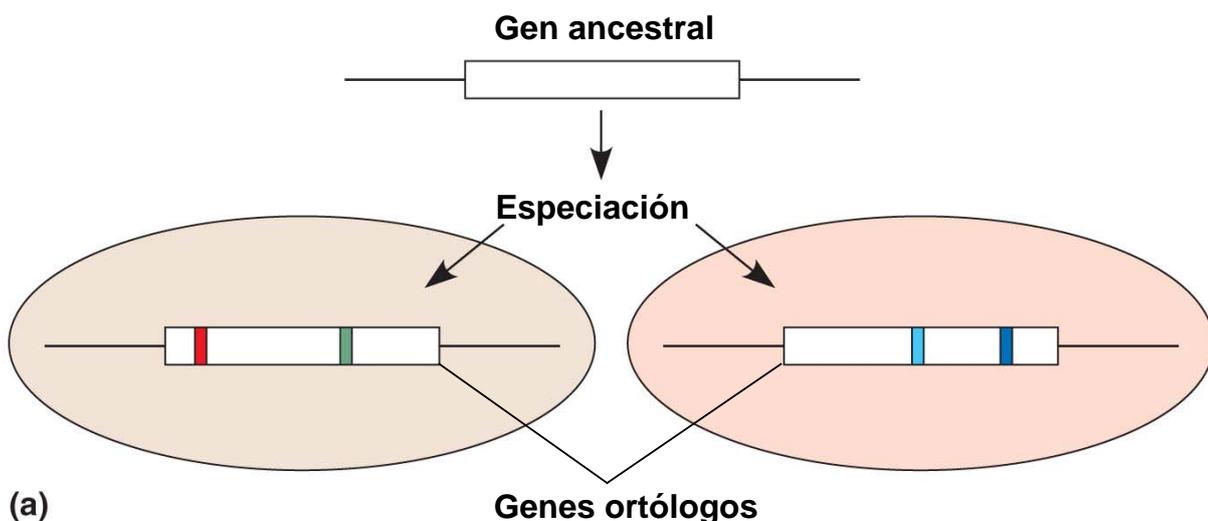
Número	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15			
Humano	G	L	S	D	G	E	W	Q	L	V	L	N	V	W	G			
Cachalote	V	L	S	E	G	E	W	Q	L	V	L	H	V	W	A			
Número	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30			
Humano	K	V	E	A	D	I	P	G	H	G	Q	E	V	L	I			
Cachalote	K	V	E	A	D	V	A	G	H	G	Q	D	I	L	I			
Número	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45			
Humano	R	L	F	K	Q	H	P	E	T	L	E	K	F	D	K			
Cachalote	R	L	F	K	S	H	P	E	T	L	E	K	F	D	R			
Número	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60			
Humano	F	K	H	L	K	S	E	D	E	M	K	A	S	E	D			
Cachalote	F	K	H	L	K	T	E	A	E	M	K	A	S	E	D			
Número	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75			
Humano	L	K	K	H	G	A	T	V	L	T	A	L	G	G	I			
Cachalote	L	K	K	H	G	V	T	V	L	T	A	L	G	A	I			
Número	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90			
Humano	L	K	K	K	G	H	H	E	A	E	I	K	P	L	A			
Cachalote	L	K	K	K	G	H	H	E	A	E	L	K	P	L	A			
Número	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105			
Humano	Q	S	H	A	T	K	H	K	I	P	V	K	Y	L	E			
Cachalote	Q	S	H	A	T	K	H	K	I	P	I	K	Y	L	E			
Número	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120			
Humano	F	I	S	E	C	I	I	Q	V	L	Q	S	K	H	P			
Cachalote	F	I	S	E	A	I	I	H	V	L	H	S	R	H	P			
Número	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135			
Humano	G	D	F	G	A	D	A	Q	G	A	M	N	K	A	L			
Cachalote	G	N	F	G	A	D	A	Q	G	A	M	N	K	A	L			
Número	136	137	138	139	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150	151	152	153
Humano	E	L	F	R	K	D	M	A	S	N	Y	K	E	L	G	F	Q	G
Cachalote	E	L	F	R	K	D	I	A	A	K	Y	K	E	L	G	Y	Q	G

¿Qué información proporciona la secuencia de aminoácidos?

- Predicción de la función de la proteína
- Clasificación de las proteínas en familias (25% de identidad mínima para pertenecer a la misma familia)
- Detección de motivos relacionados con funciones importantes (localización celular, anclaje de grupos prostéticos)

PROTEINAS HOMOLOGAS

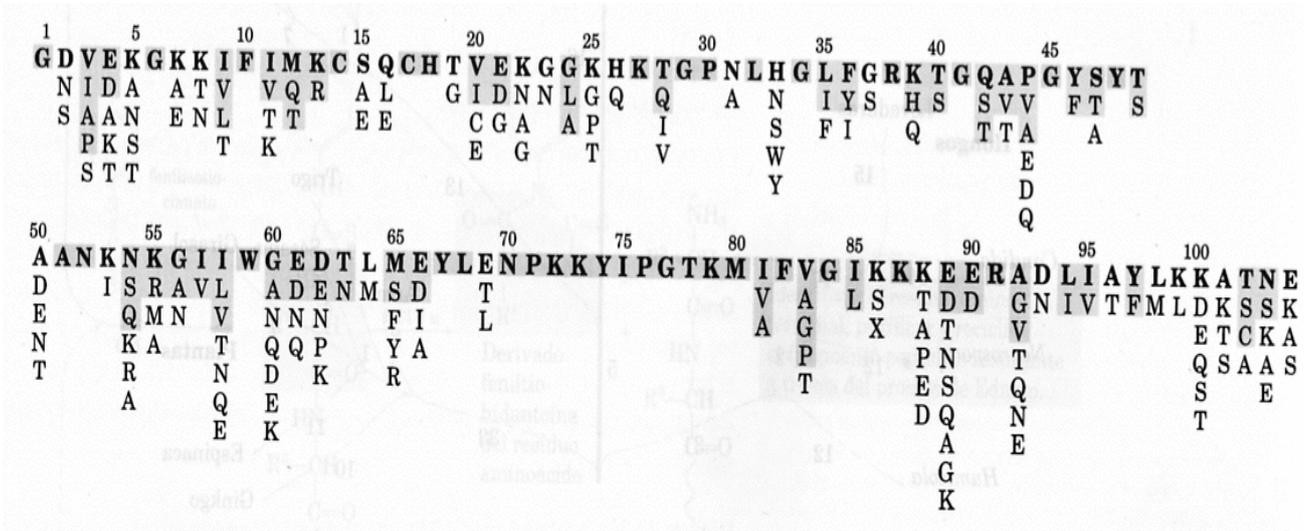
- Moléculas **homólogas**: derivan de un antecesor común.
- La homología se manifiesta por una similitud significativa en la secuencia de nucleótidos y aminoácidos, casi siempre proyectada en la estructura 3D y en la función.
- **Proteínas homólogas**: tienen secuencias de aacs y funciones semejantes.
- Homólogos **parálogos**: homólogos presentes en la misma especie. Se diferencian en sus funciones bioquímicas detalladas.
- Homólogos **ortólogos**: homólogos presentes en especies distintas, con funciones idénticas o similares.



Copyright © 2005 Pearson Education, Inc. Publishing as Pearson Benjamin Cummings. All rights reserved.

Homología de los citocromos C de distintas especies

104 aacs, 27 invariables, 42 sustituciones conservadoras



Comparación de secuencias de citocromo C

	Chimpanzee	Sheep	Rattlesnake	Carp	Snail	Moth	Yeast	Cauliflower	Parsnip
Human	0	10	14	18	29	31	44	44	43
Chimpanzee		10	14	18	29	31	44	44	43
Sheep			20	11	24	27	44	46	46
Rattlesnake				26	28	33	47	45	43
Carp					26	26	44	47	46
Garden snail						28	48	51	50
Tobacco hornworm moth							44	44	41
Baker's yeast (iso-1)								47	47
Cauliflower									13

Número de aminoácidos variantes

Evolución según la secuencia de los citocromos C

