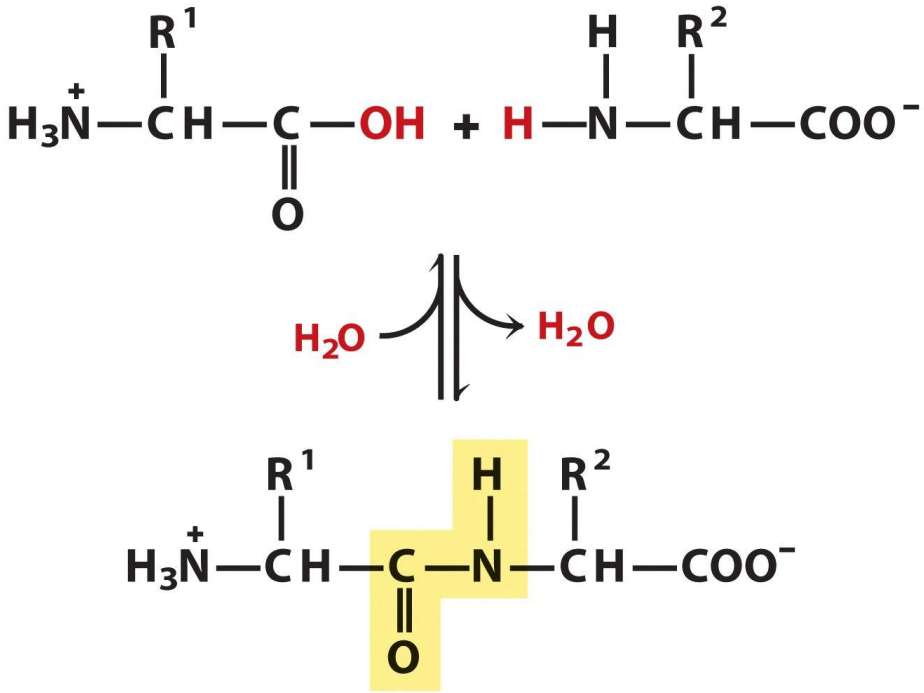
Amino Asitler, Peptitler, Proteinler

Dr. Fatih Büyükserin

PEPTİD

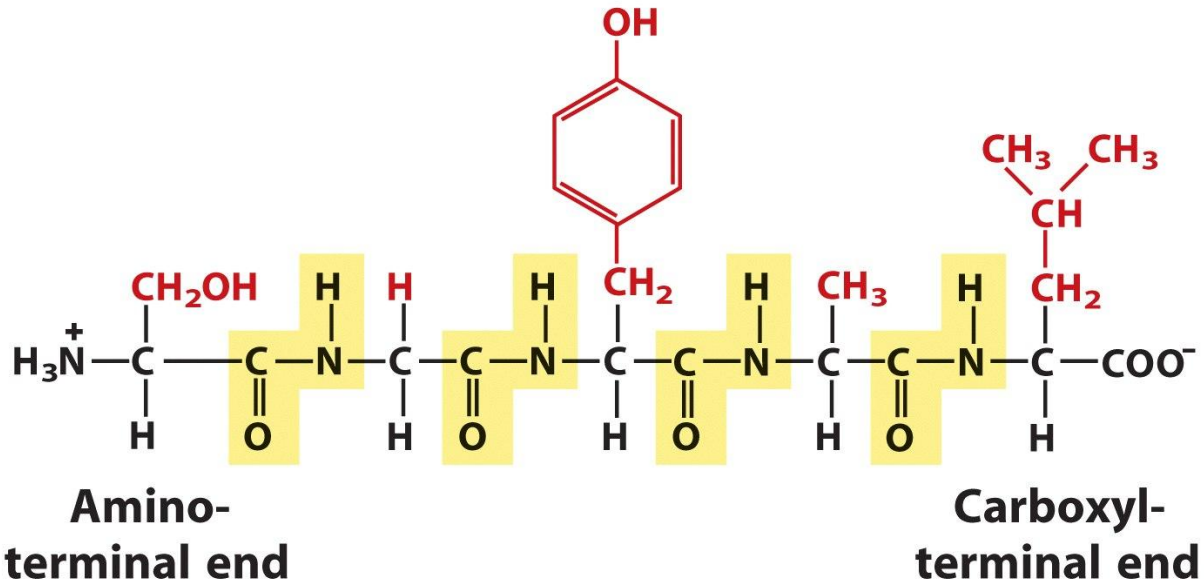
•İki AA molekülü, peptit bağı denilen bir amit bağıyla kovalent bağlanarak dipeptit oluşturur
•Karboksillerden hidroksil, aminodan hidrojen ayrılır, amitte karbonil tarafı 1. AA, azotla başlayan taraf ikinci amino aside aittir. (Decoding de işimize yarayacak).
•Su çıkışı olduğundan kondenzasyon tepkimesi, çok kararlı yapılar, yarı ömürleri 7 yıldır
•Polipeptitteki AA birimleri çoğunlukla AA kalıntısı olarak adlandırılır, ayrılan gruplardan dolayı normal halleri dışında bir yapıdalar



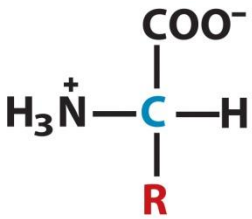
•n=20 ye kadar birim oligopeptit bunun üzeri ise polipeptit olarak adlandırılır

PEPTİD

•Bir peptitte serbest α-amino grubunu içeren amino asit kalıntısı N terminal kalıntı.
•Diğer uçtaki serbest α-karboksil grubunu içeren kalıntı da C-terminal kalıntı olarak adlandırılır.



•Pentapeptit, oligopeptit
•Serilglisiltirozilalanillösin
•N-terminal = serin kalıntısı
•C-terminal = lösin kalıntısı
•İsimlendirme N-terminalden başlayarak yapılır
•R grubunda amid olanlarla, amin olanlara (N terminusu belirlerken) dikkat



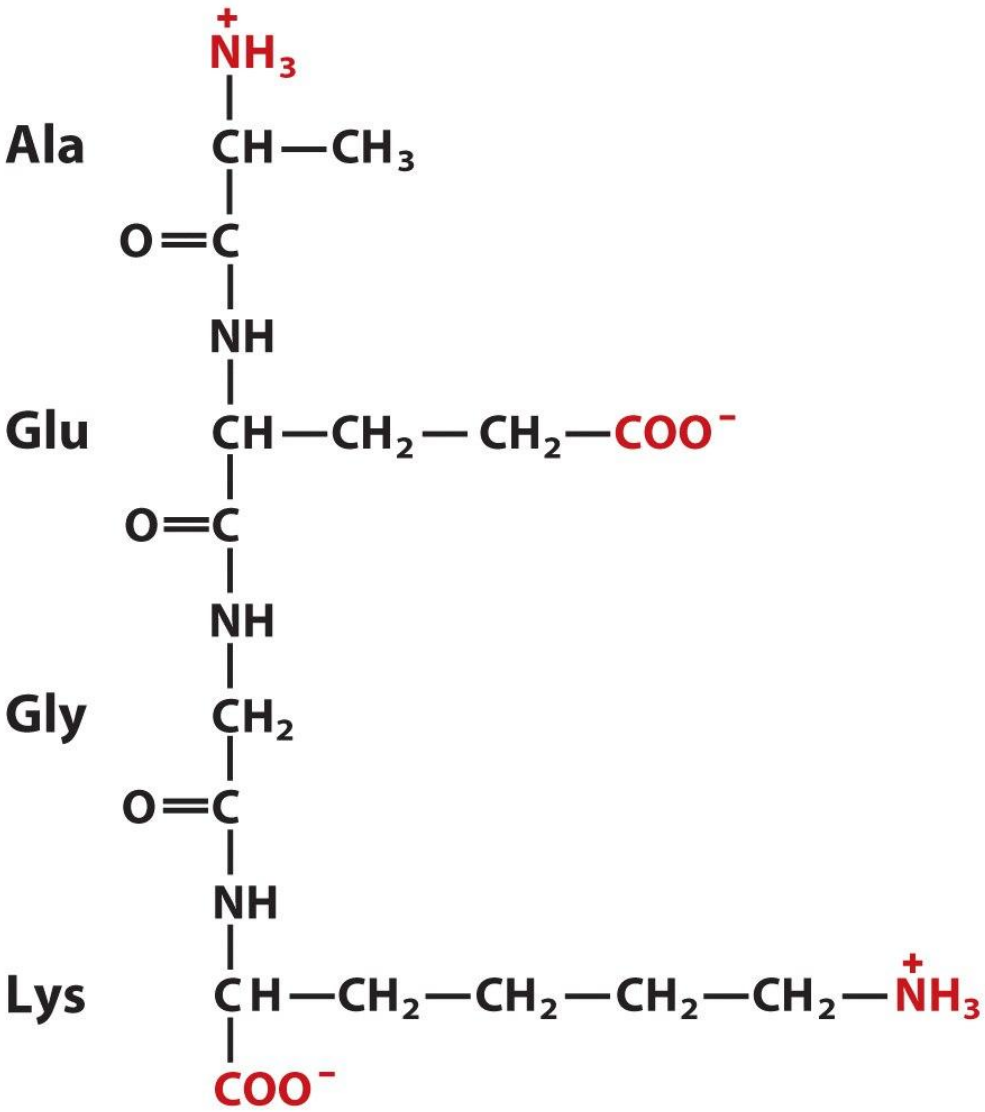
PEPTİD

- Bir peptitte serbest α-amino grubu ve serbest α-karboksil serbest amino asit gibi iyonize olur.
    - Ufak pKa farklarıyla

- Uçlar dışındaki α-amino ve α-karboksil grupları peptit bağı oluşumuna katıldıkları için asit-baz davranışına katkıda bulunmazlar

- Ancak zincirde iyonlaşabilen R grup taşıyan kalıntılar varsa toplam peptidin asit baz davranışına uçlardaki amino ve karboksile ek olarak katkıda bulunurlar
    - Yan gruplarında pKa değerleri serbest AA dan hafif sapabilir

- Kompleks ama moleküle özgü titrasyon eğrileri ve pI değerleri oluşur
    - Sağdaki peptid için kaç plato beklerim?

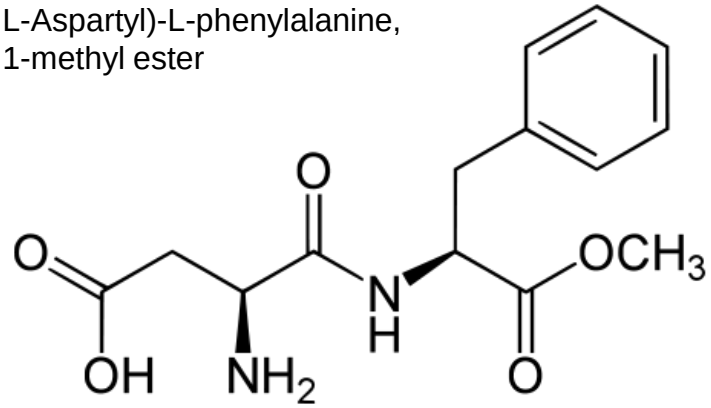


PEPTİD

- İşlev ile molekül ağırlığı ilişkilendirilemez

- Çok önemli oligopeptitler mevcuttur
  - Aspartam
  - 9 AA oksitosin
  - Glukagon 29 AA küçük polipeptit

L-Aspartyl)-L-phenylalanine,
1-methyl ester



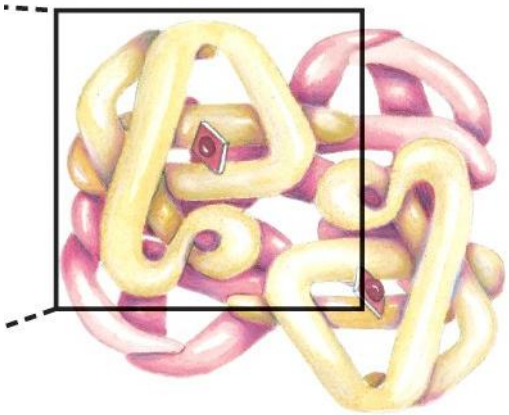
  - Çoklualtbirimli proteinler
  - Bazı proteinler tek polipeptit zincirden oluşurken bazıları nonkovalent birleşmiş polipeptitlerden oluşur
  - Titin kasların elastisiyetinden sorumlu olan mikrobiyopolimer

TABLE 3–2 Molecular Data on Some Proteins

	Molecular weight	*Number of residues*	*Number of polypeptide chains*
Cytochrome *c* (human)	13,000	104	1
Ribonuclease A (bovine pancreas)	13,700	124	1
Lysozyme (chicken 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 (*E. coli*)	450,000	4,158	5
Apolipoprotein B (human)	513,000	4,536	1
Glutamine synthetase (*E. coli*)	619,000	5,628	12
Titin (human)	2,993,000	26,926	1

PEPTİD

•Polipeptit altbirimlerden en az ikisi benzerse bu proteine oligomerik proteinler denir



•Ör Hemoglobin 2 alpha, 2 beta zincir nonkovalent olarak bir arada

•Bir proteinin kaç aminoasitten oluştuğunu nasıl buluruz

•M/110

•Avr 138 ama küçükler daha çok
•128-18!
•110

Prostetik Gruplar

- Proteinler AA or mdf AA dışında grup İçerir mi?

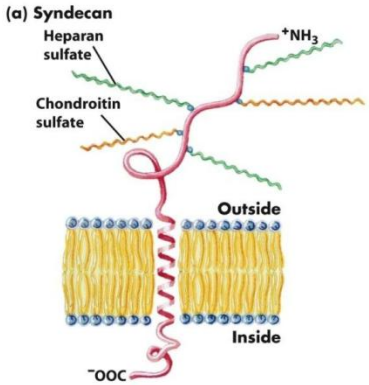
- Pekçok protein sadece aminoasit kalıntıları içerirler (basit protein)
  - Ribonukleaz A

- Bazı proteinler aa lere ek kalıcı gruplar içerirler ve bunlara konjuge proteinler denir
  - Aminoasit olmayan kısma prostetik grup denir ve bu grubun kimyasal yapısına göre sınıflandırılır

    - Lipoproteinler, lipit
    - Glikoproteinler, şeker
    - Metalloproteinler, özgül metal

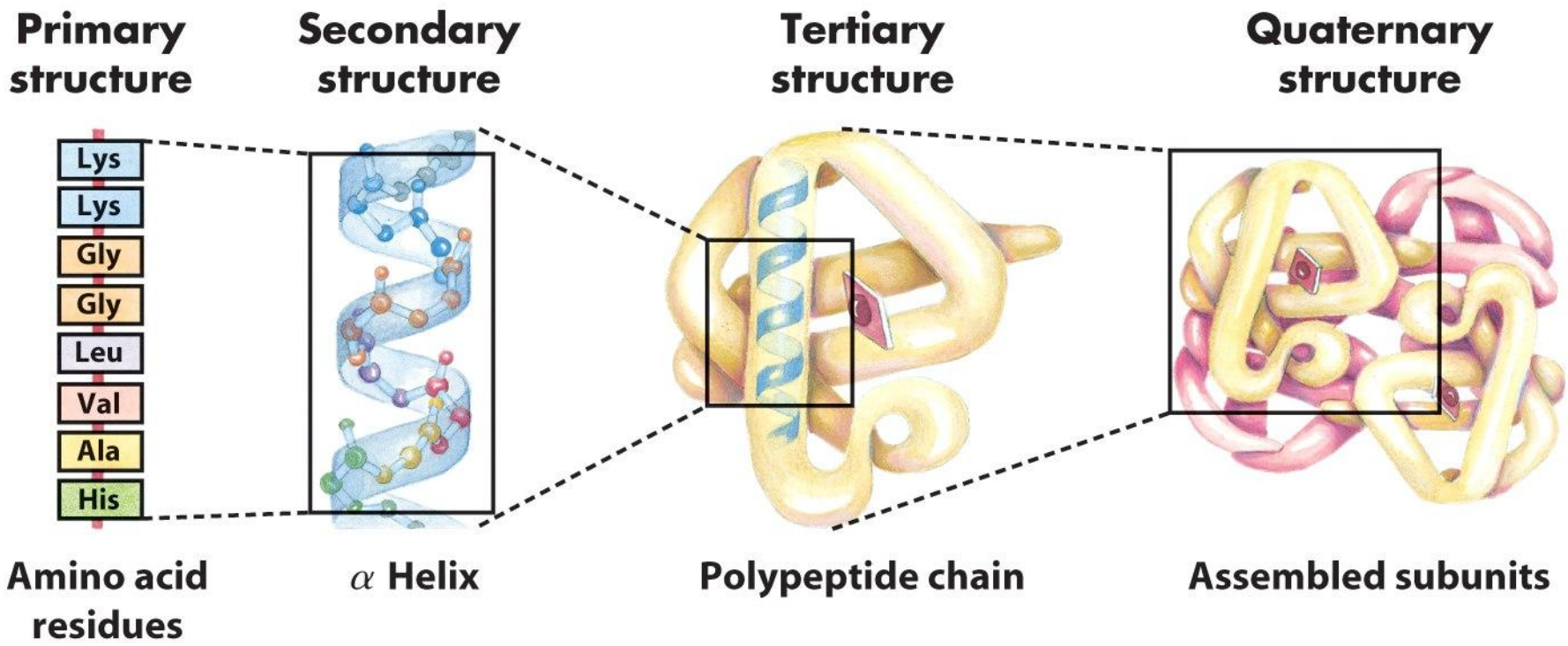
TABLE 3–4 Conjugated Proteins

Class	*Prosthetic group*	*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



PROTEİN YAPISININ DÜZEYLERİ

- Karmaşık yapı 4 düzeyde incelenir
- Dizi birincil
- Kısmi kararlı düzenlemelerle tekrarlayan yapısal modeller ikincil yapı
- Polipeptid yapının tüm 3 boyutlu katlanmalarının bir görüntüsü
- Çoklualtbirimli proteinde polipeptitlerin uzaysal düzeni dördüncül yapı

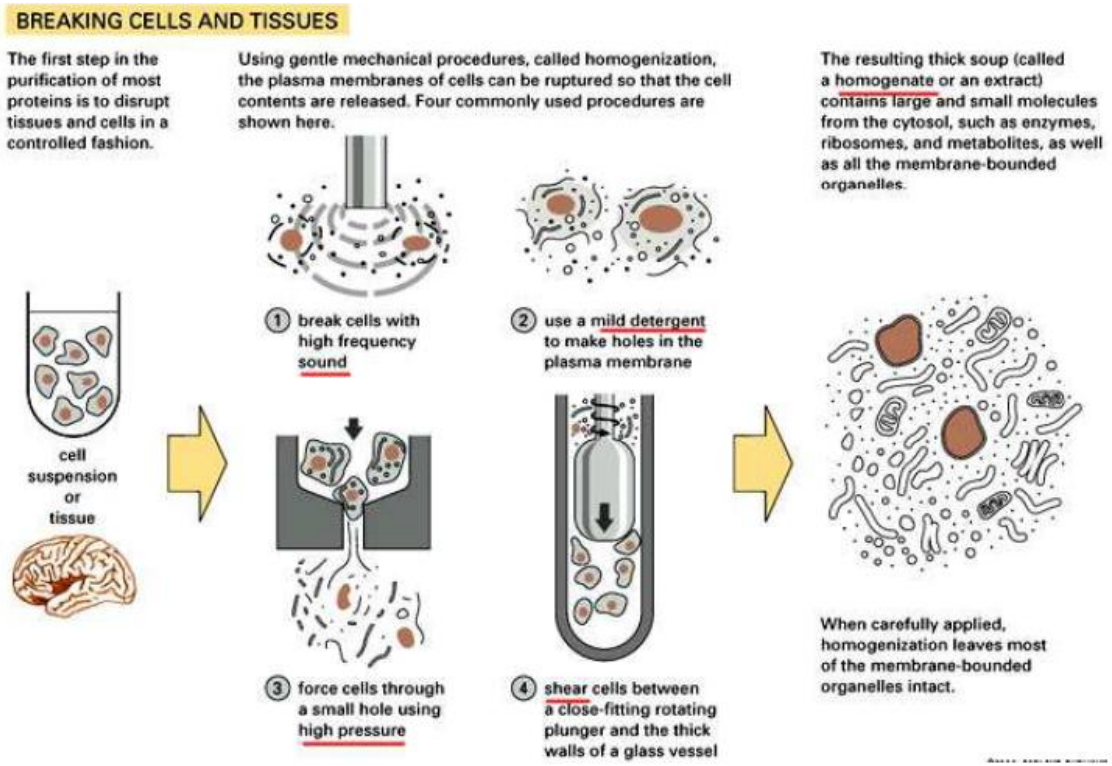


Proteinlerle Çalışmalar

•Bir protein hakkında herhangi bir ayrıntıyı çalışmak için bu diğerlerinden ayrılıp saflaştırılmalıdır, Ör Hemoglobin oksijeni nasıl tutuyor?

•Hücrelerdeki binlerce farklı proteinden bir tanesi nasıl saflaştırılabilir?

- •Biyomolekül etkileşimler özgüldür, bu kullanılabilecek avantajlardan sadece birisidir
- •İlk aşama zardan kurtulma ve differansiyel santrifüjleme ile protein çorbası (ham özüt)eldesi
- •Denaturasyonu engellemek amacıyla sıcaklık kontrol altında



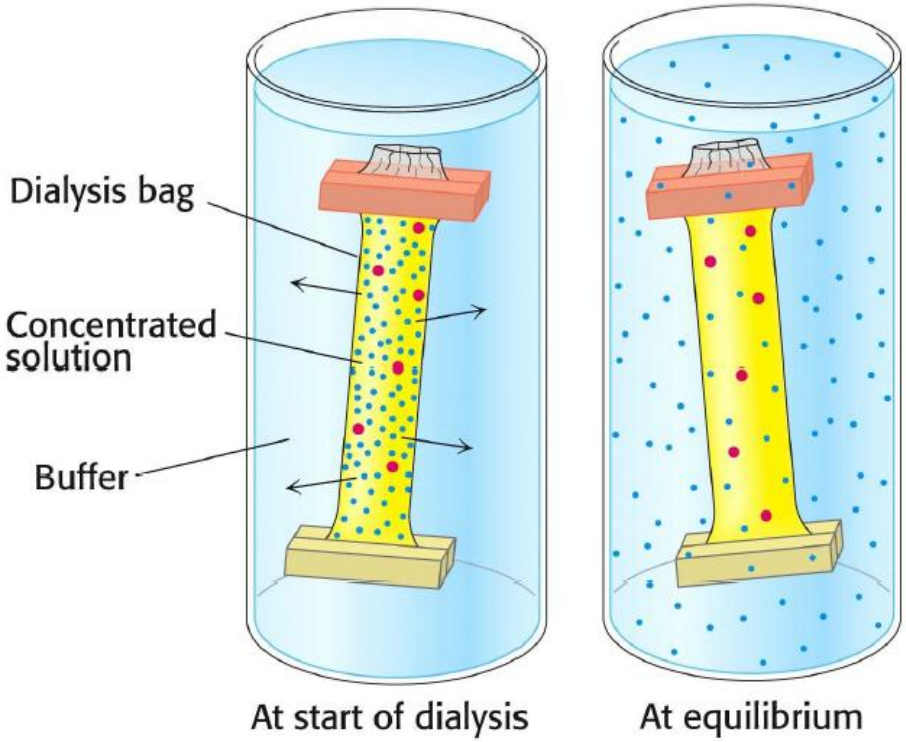
Strategies
– 1. step: Solubility.
• adjust charge (pH=pI da minimum, temperature, [salt])
• [salt] less solublecentrugationprecipation
– Mostly used salt ammonium persulfate (NH4)2SO4)
– Process**salting out**
– 2. Dialysis
– Both purification and removal of salts
– 3. Chromotography

Proteinlerle Çalışmalar

•Bu aşamadan sonra saflaştırıcı değişik yöntemler mevcuttur.

•Bunlardan ilki çözünürlük farklarından yararlanarak fraksiyonlara ayırmaktır

- •Salting out, yani tuzlayarak çöktürmede $(NH_4)_2SO_4$ sıklıkla kullanılır
- •Su proteinleri hidrate etmek yerine tuzu hidrate eder ve bazı proteinler çökerken bazıları çözünür kalabilir ve böylece ilk ayrım gerçekleşir
- •Bunun ardından uygulanacak diyaliz işlemiyle proteinler çözücüde istenmeyen tuzlardan ve bileşiklerden temizlenebilir

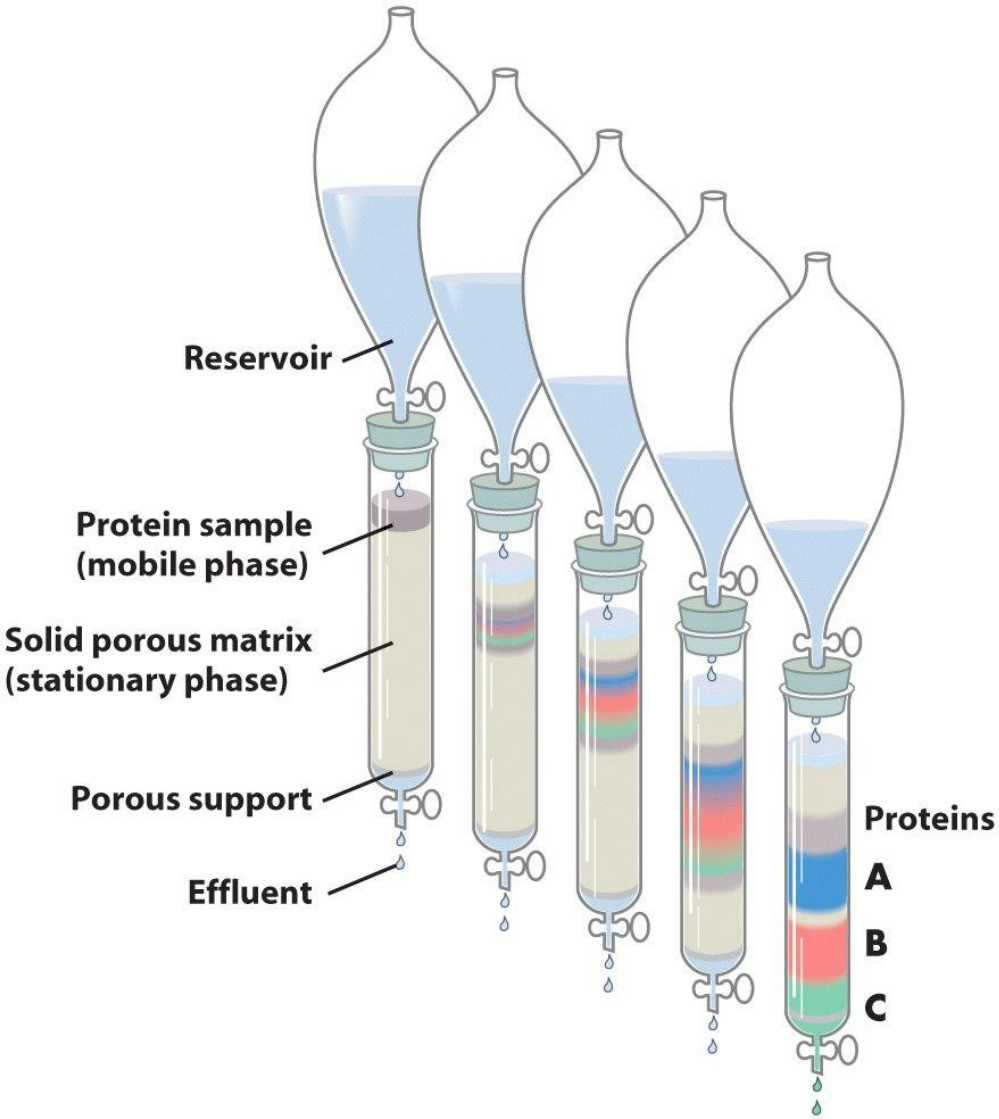


Kolon Kromatografisi

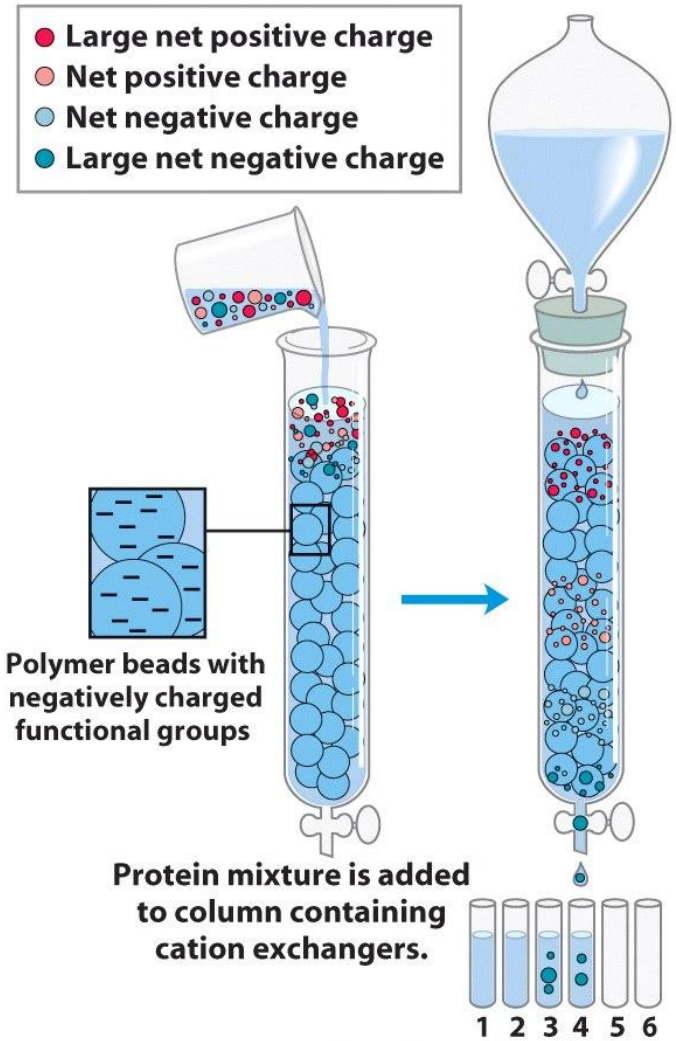
•Proteinlere ayırmada kullanılan en güçlü teknik kolon kromatografisidir.

•Bu teknik proteinleri yük, büyüklük, bağlanma afinitesi ve diğer bazı özelliklerine göre ayırır

- •Mobil ve Kalıcı Faz
- •Proteinler kolonda ilerlerken kalıcı fazdaki matriks materyaliyle farklı etkileşimlere göre farklı derecelerde yavaşlar
- •Böylece protein bandının tamamı kolondan ilerlerken genişler
- •Genel olarak uzun kolon ayırımı kolaylaştırır, uzun kolon uzun süre etkileşim farkları, ayırım kolaylığı
- •B ile C nin ayırımı zor
- •HPLC yüksek basınçlarla bu ayrım işini çok kısa sürelerde yapabilir
  - •Matriks materyali özel yapıda

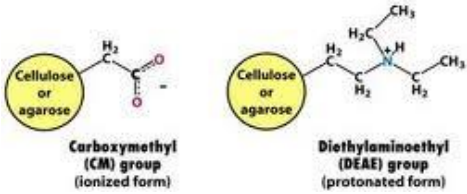


İyon Değiştirme Kromatografisi



Proteins move through the column at rates determined by their net charge at the pH being used. With cation exchangers, proteins with a more negative net charge move faster and elute earlier.

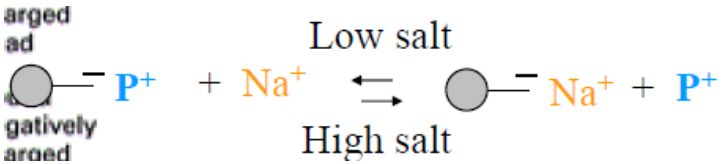
•Burda katyon değiştirme kromatografisi



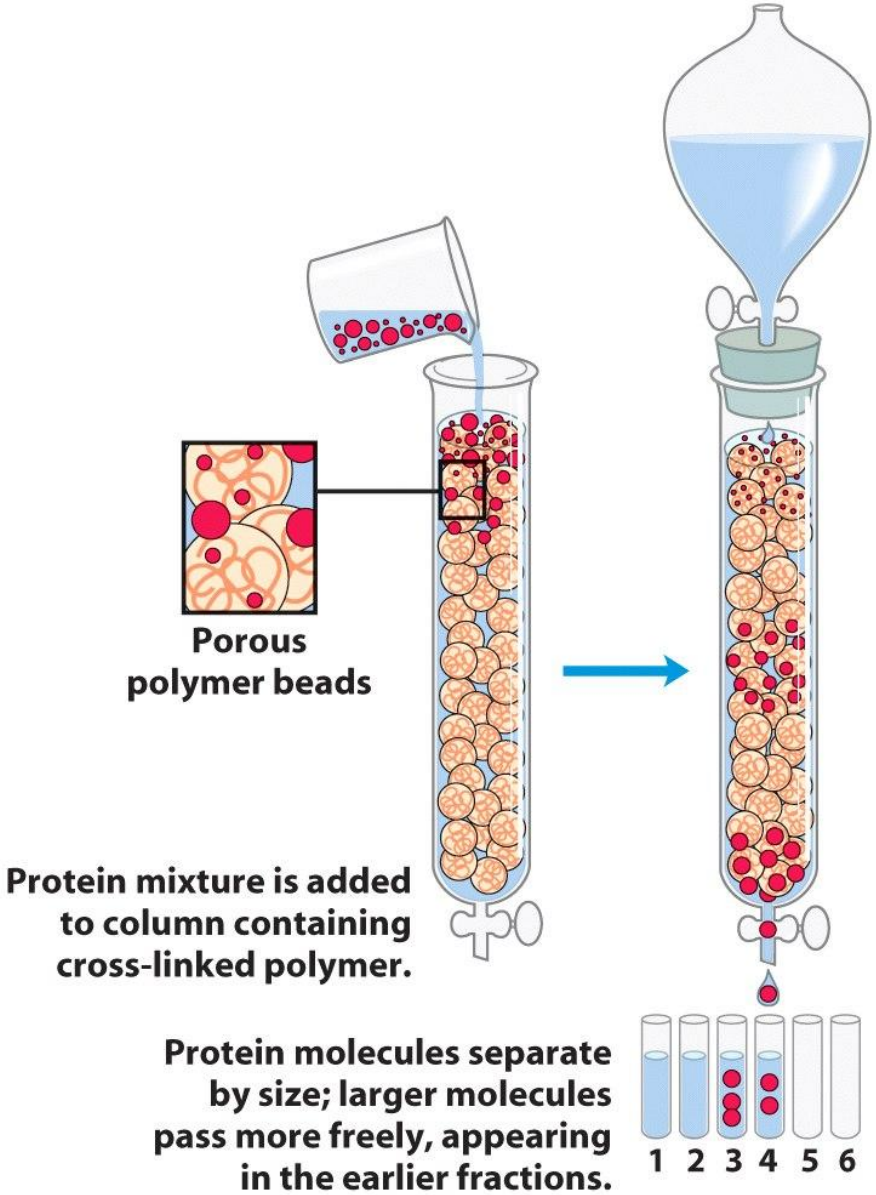
Charge of protein
– At pI, it is zero, above pI, negative and below pI, positive. Each protein has characteristic pI

• Anion exchange
– Use resin that has positive charge. Use a pH above pI of protein. Protein of interest adheres and drive off with salt gradient.
– Proteins with highest pIs elute first
– DEAE cellulose (or sephadex)

• Cation exchange
– Use resin that has negative charge and use at pH below pI of proteins.
– Proteins with highest pIs elute last
– CM-cellulose or Sephadex.

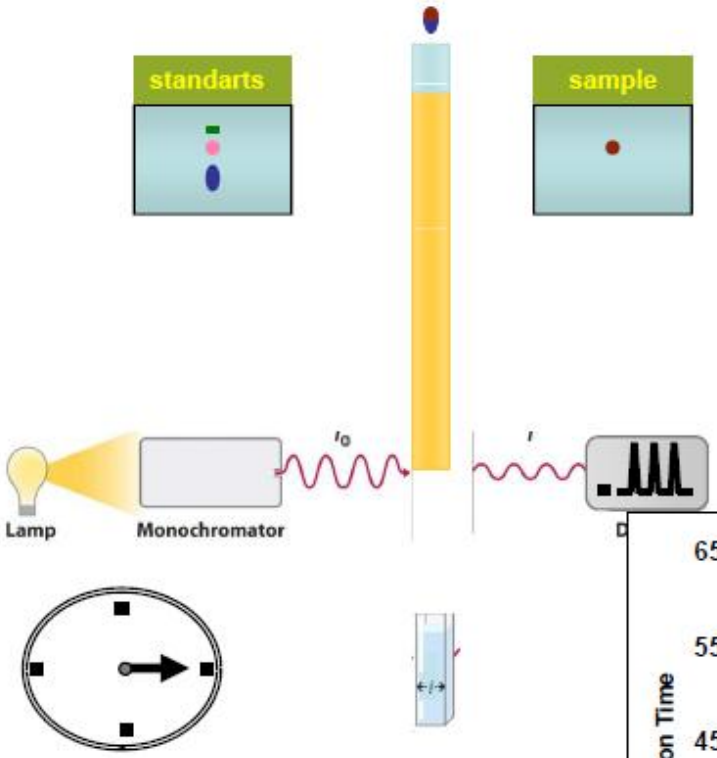


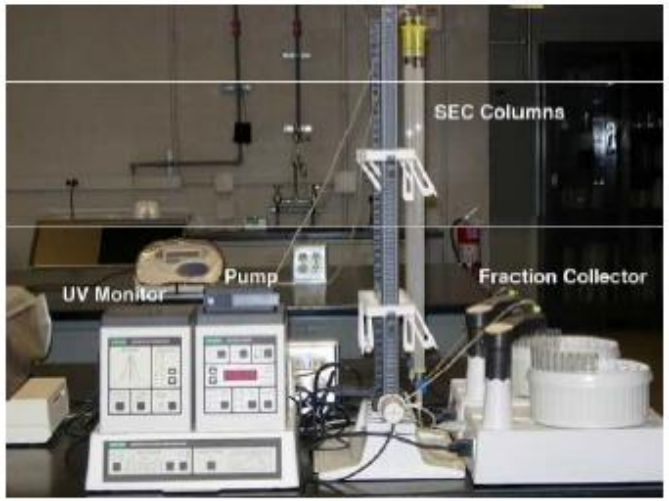
Boyut Ayırma Kromatografisi



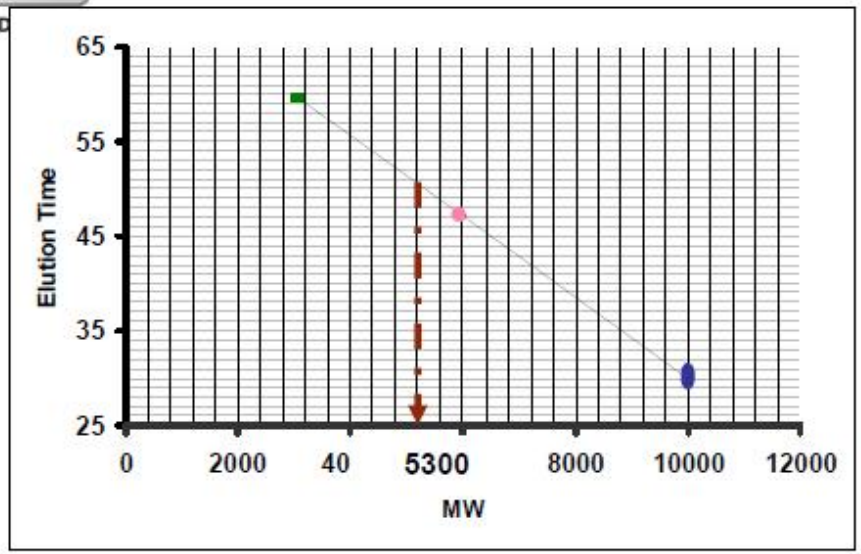
Büyükler önden!

Boyut Ayırma Kromatografisi

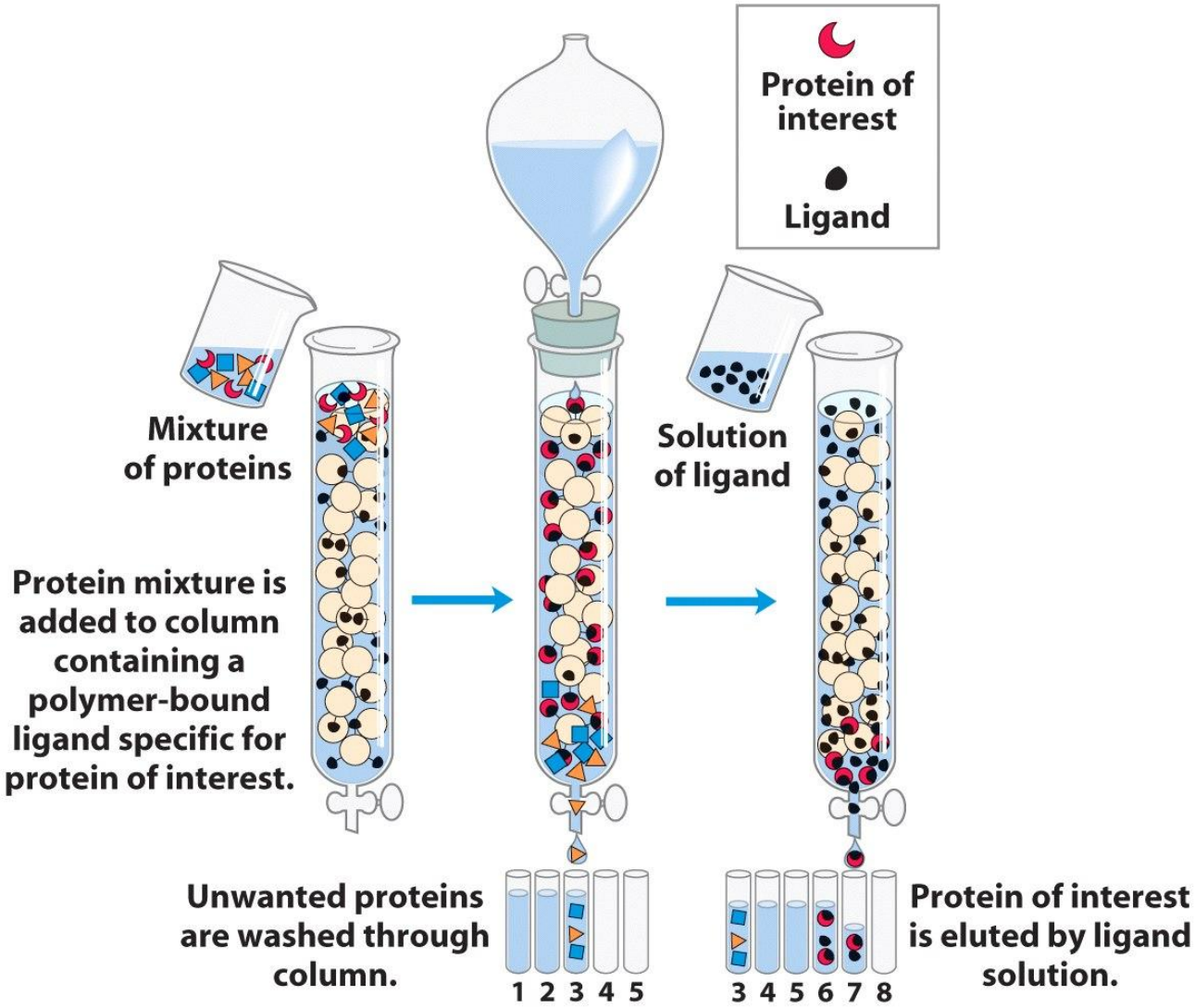




Proein	MW	Elution Time
	10000	30
	6000	47
	3000	60
	5300	50

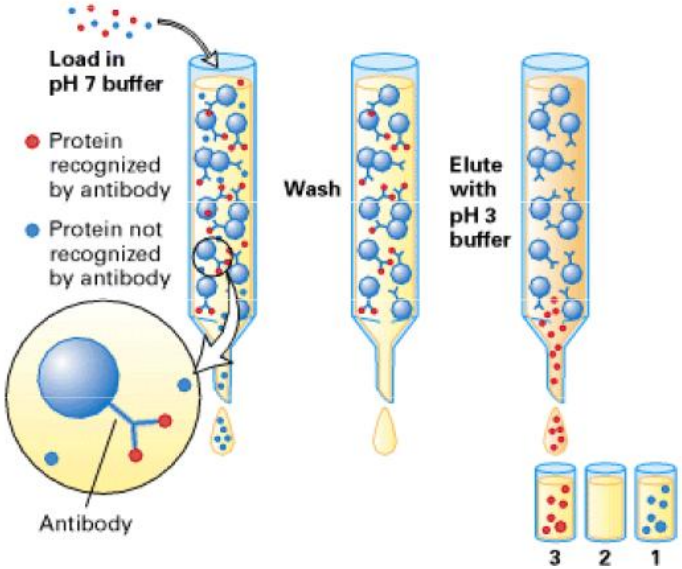


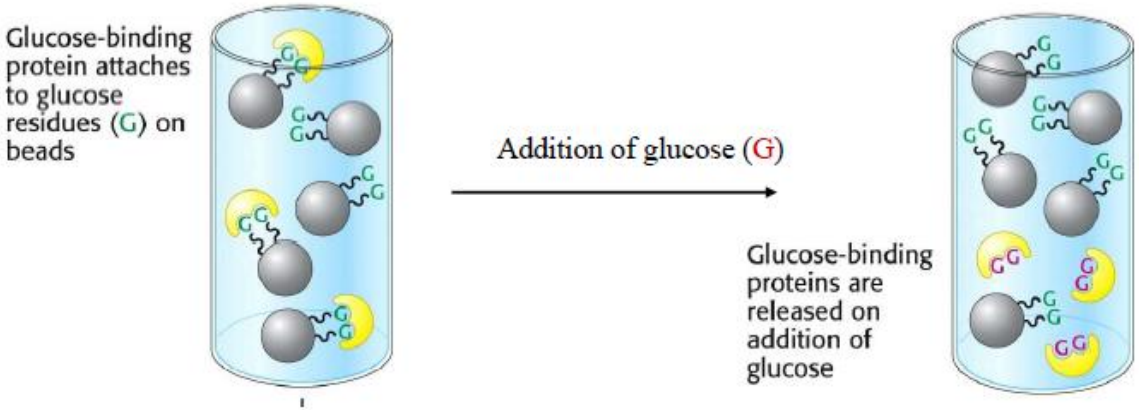
Afinite Kromatografisi



Afinite Kromatografisi

Antibody affinity chromatography





Protein Ayırma

•Pekçok durumda birçok farklı yöntem sırayla uygulanmalıdır
•Genelde başta örnek çok olduğundan fazla materyal harcanacağından en ucuz yöntem ilk olarak yapılır

•Kromatografik yönteminin (özellikle afinitenin) başta kullanılması fazla miktarda özel kromatografik madde tüketimini gerektirecektir
- •Bol örnek, bol kolon malzemesi harcanmasını doğuracak
  - • ideal olmayan etkileşimler sonucu maliyetli olan kolon malzemesi harcanması

TABLE 3–5 A Purification Table for a Hypothetical Enzyme

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

Note: All data represent the status of the sample *after* the designated procedure has been carried out. Activity and specific activity are defined on page 94.

Özgül Aktivite

•Enzim özelliğindeki proteinlerde herbir basamağın verimini anlamada Özgül Aktivite kullanılabilir

•Aktivite/toplam protein

•Her bir ayırmadan sonra toplam protein önemli ölçüde azalır

•Ayrılacak olan proteinin de karışım içinde aktivitesi azalabilir, burda inaktifleşmeden dolayı ya da diğer moleküllerle veya kromatografik maddeyle ideal olmayan etkileşimlerle aktivite kaybı olur, birinci kayıp çok daha fazladır.

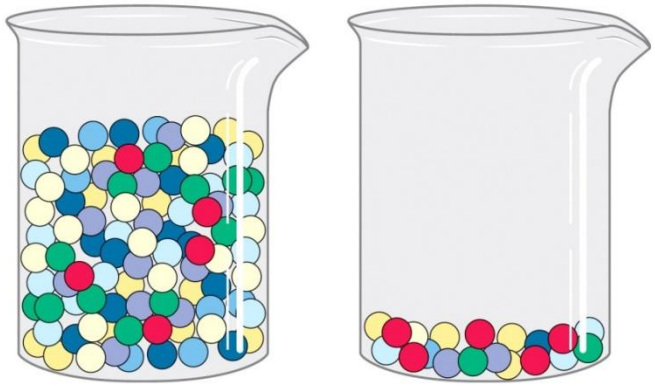


TABLE 3–5 A Purification Table for a Hypothetical Enzyme

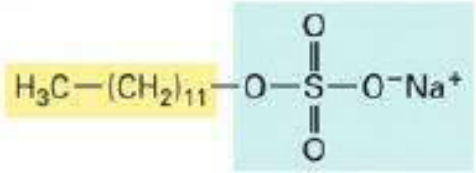
Procedure or step	*Fraction volume (ml)*	*Total protein (mg)*	*Activity (units)*	*Specific activity (units/mg)*
1. Crude cellular extract	1,400	10,000	100,000	10
2. Precipitation with ammonium sulfate	280	3,000	96,000	32
3. Ion-exchange chromatography	90	400	80,000	200
4. Size-exclusion chromatography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

Note: All data represent the status of the sample *after* the designated procedure has been carried out. Activity and specific activity are defined on page 94.

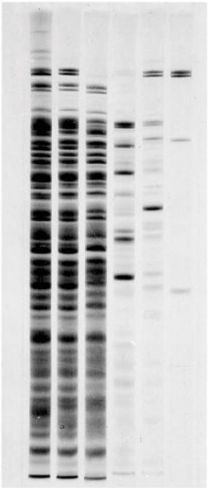
Elektroforez

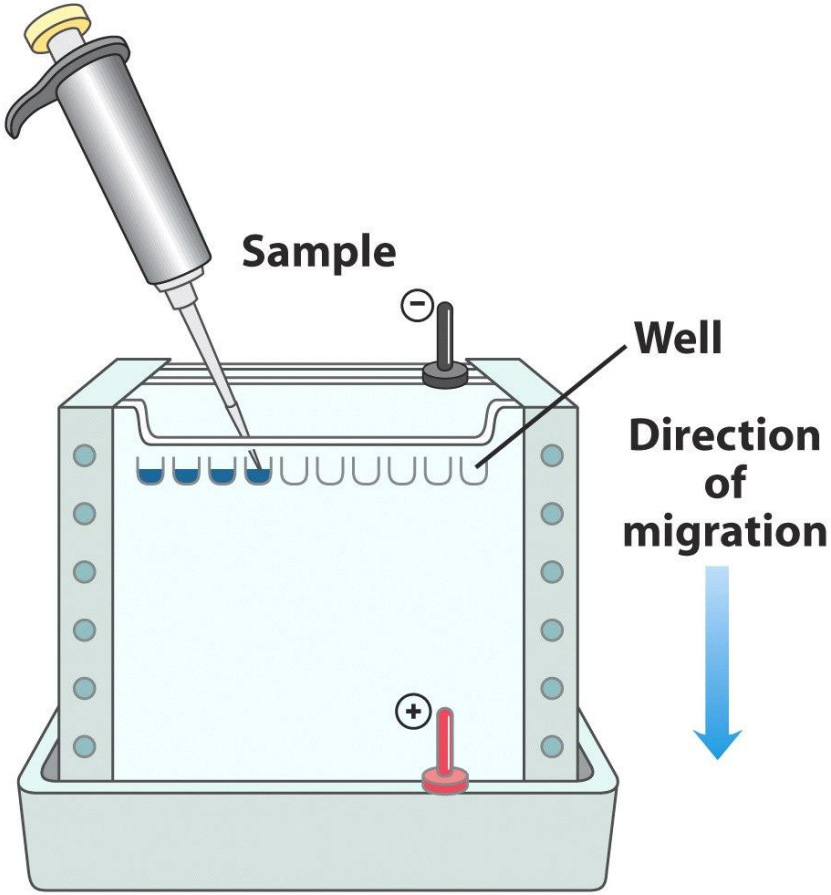
- Proteinlerin elektrik alandaki göçlerini esas alır ve aynı zamanda ayrışıp görüntülenmesini sağlar

- Poliakrilamid jel elek vazifesi görür
- SDS ile proteinlere net negatif yük kazandırılır
    - Elektrik alan altında q/m esaslı ama kendi yükleri baskılanır (bağlanan SDS dominant yük)
    - Şekiller küreselleşir
    - Sadece molekül ağırlık bazlı ayırım
    - Çoklualtbirimli proteinleri altbirimlerine ayr.
    - Comassie Blue ile sadece protein boyanıyor

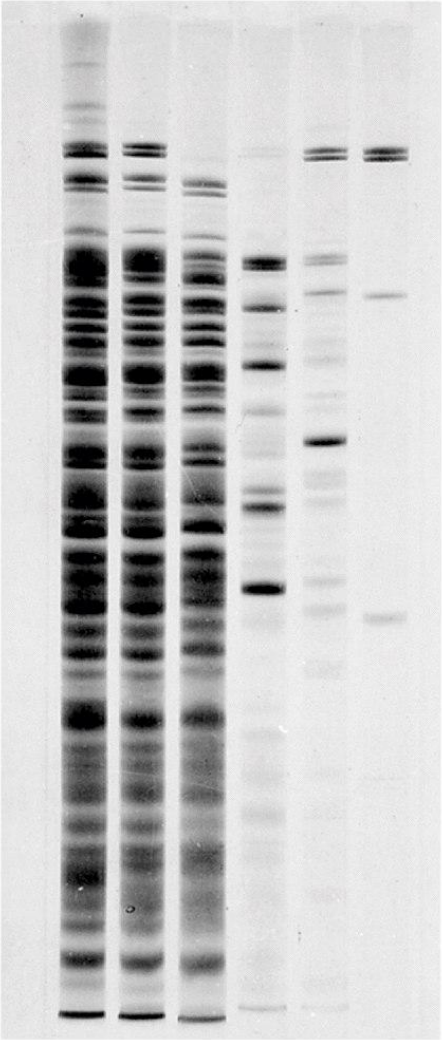


Sodium dodecylsulfate (SDS)

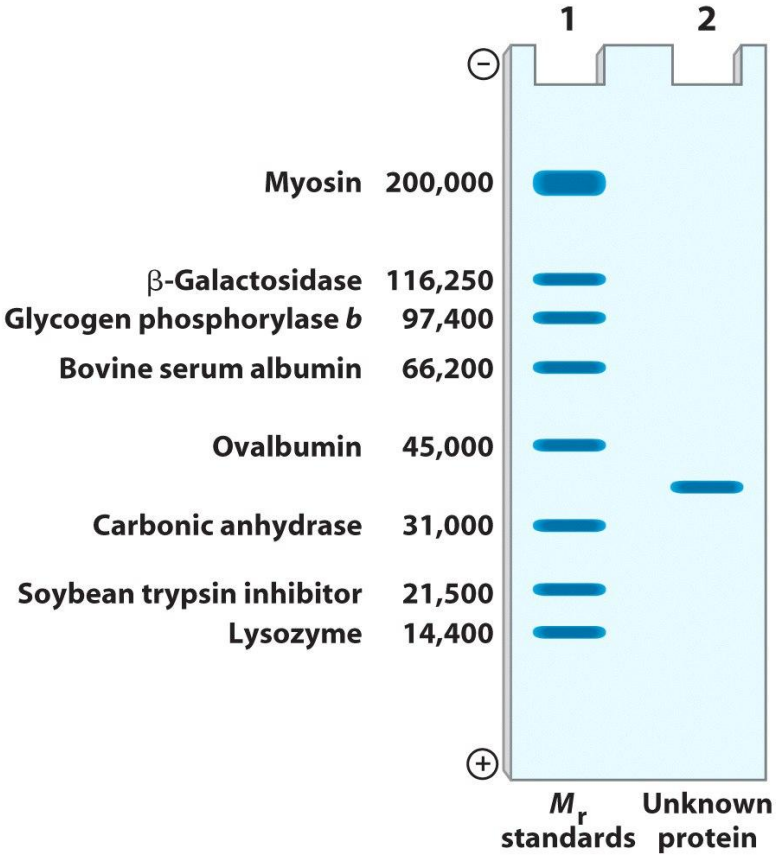




Elektroforez

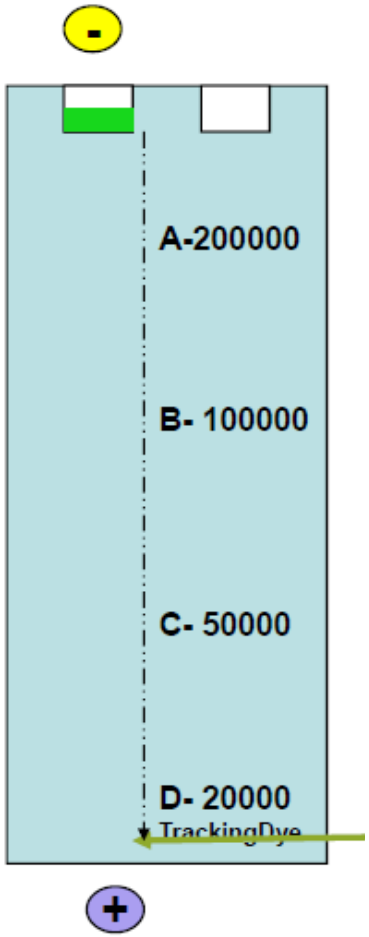


- Saflaştırma evreleri elektroforez ile takip edilebilir
  - Her aşamadan sonra daha az bant
  - En son 4 altbirim RNA polimeraz
  - Bilinen örneklerle bilinmeyen örnek için Mw tayini
  - İç standart Tracer dye



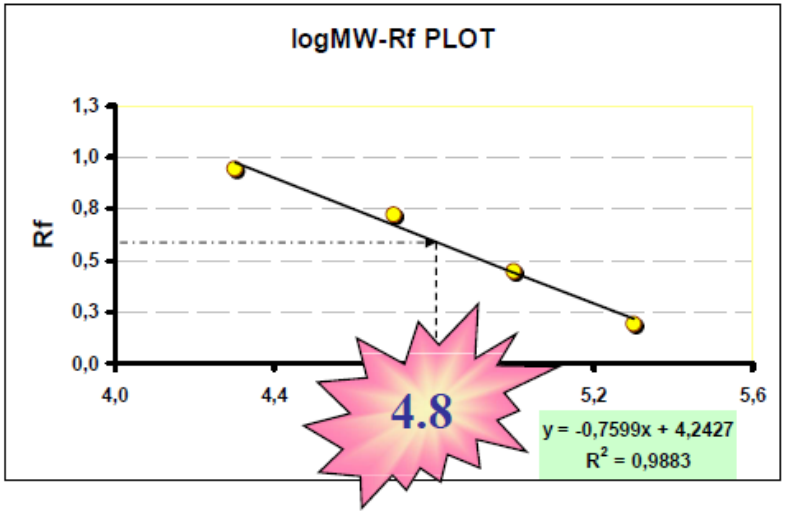
Elektroforez

- Bilinen örneklerle bilinmeyen örnek için Mw tayini
- İç standart Tracer boya, relatif göçü bulmak için kullanılır
  - Rf relativite faktörü, boyaya yani referansımıza göre

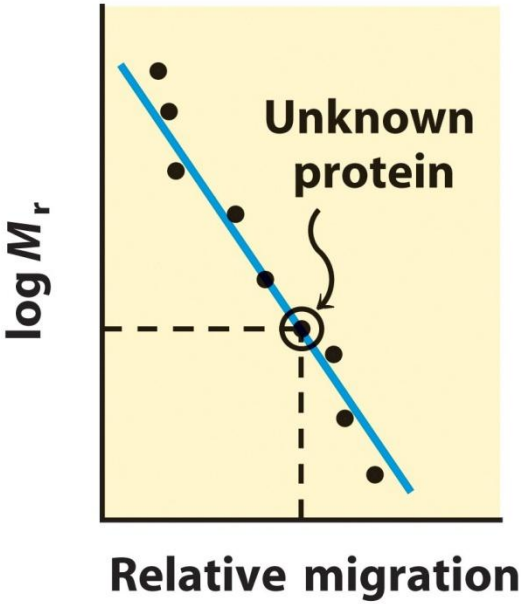


distance of sample protein migration= 7.4 cm

Rf = 7.4 / 12.5 = 0.59



$10^{4.8}=63.095$



İzoelektrik Odaklama

- Proteinleri pI larına göre ayırma işlemi
- Organik asit-bazlardan bir pH gradyanı oluşturulur
    - HAc negatif yani anota…

- Protein karışımı jele uygulandığında her protein kendi pI değerine ait pHya gelinceye kadar göç eder, boyama sonrası en sagdaki görüntü ortaya çıkar

- Proteinler pI larına göre dağılırlar
    - pI sı 5 ve 7 olan?

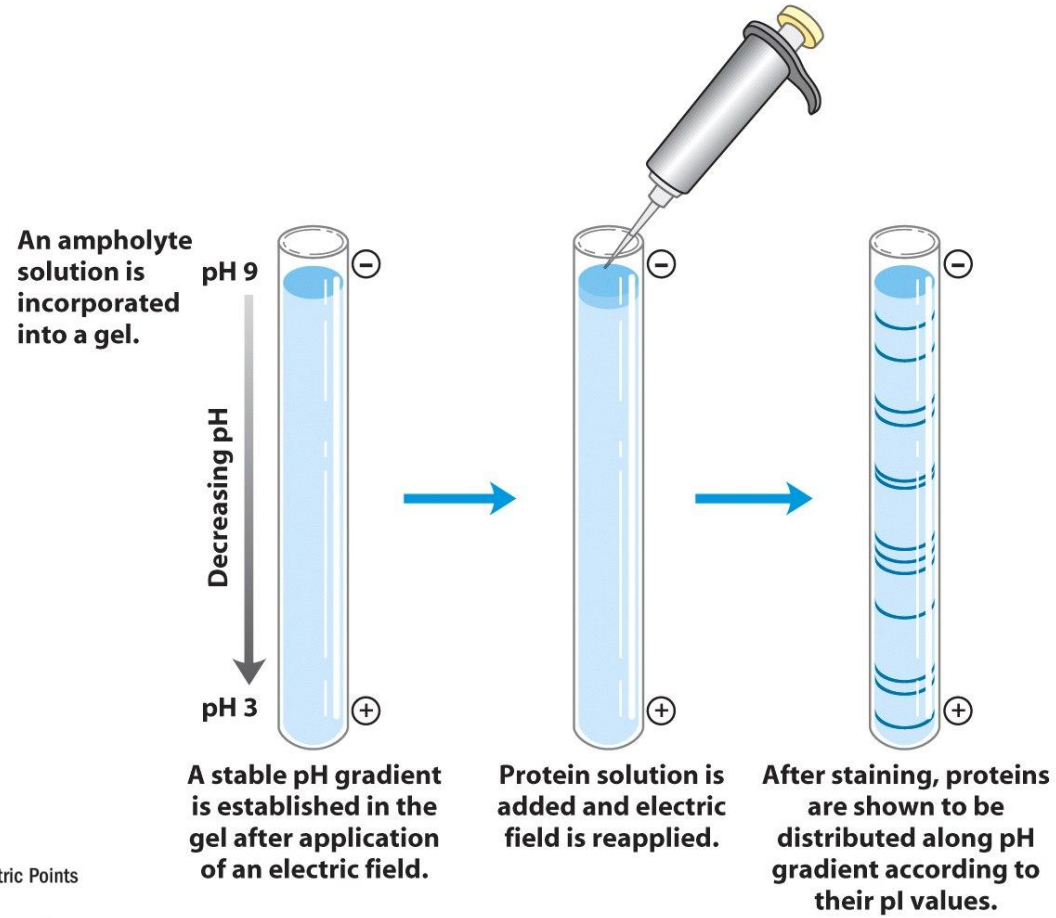
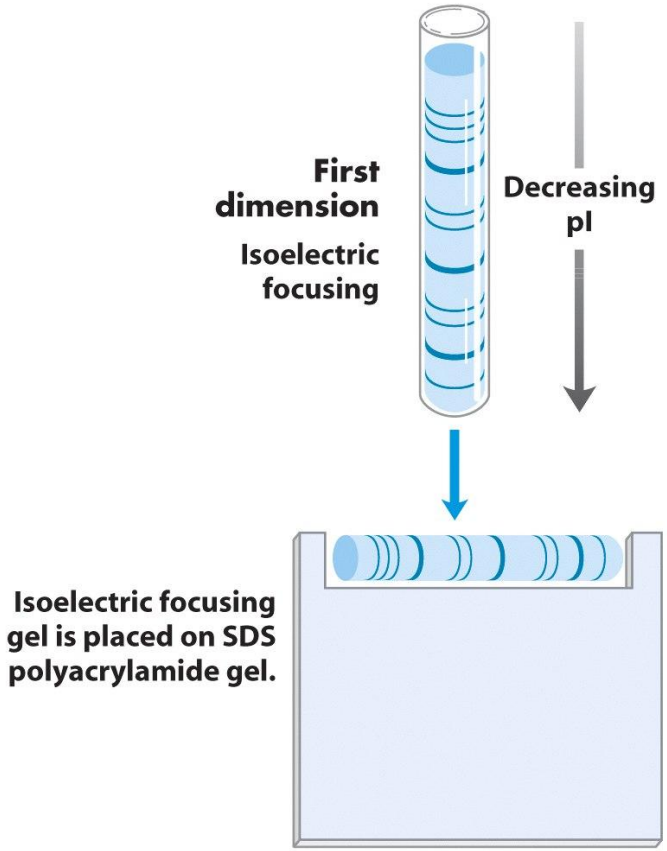


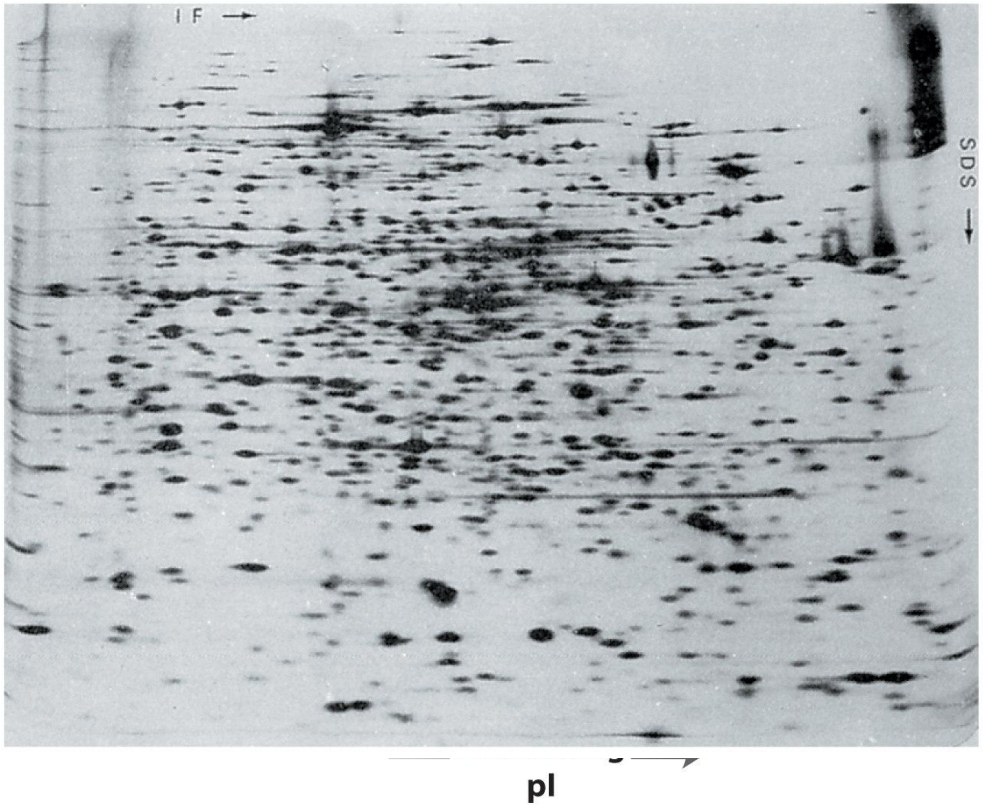
TABLE 3–6 The Isoelectric Points of Some Proteins

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 *c*	10.7
Lysozyme	11.0

2D Elektroforez

- Sırasıyla izoelektrik odaklama ve SDS elektroforez kullanımı 2D elektroforez olarak adlandırılır
- Kompleks karışımları ayıran hassas bir tekniktir, kalın bantları ya da subunitleri ayırır
- pI ları aynı ağırlıkları farklı yada tam tersi durumdaki protein çiftelerini ayırır
- E.coli de binden fazla protein ayrıldığı 2D elektroforez, jelden ektrakte edilme ile tamamlanır





Proteinlerde Kovalent Yapı

- Bir proteini enzim, hormon veya antikor yapan nedir?
    - Temel etmen yapısal farklılıklardır

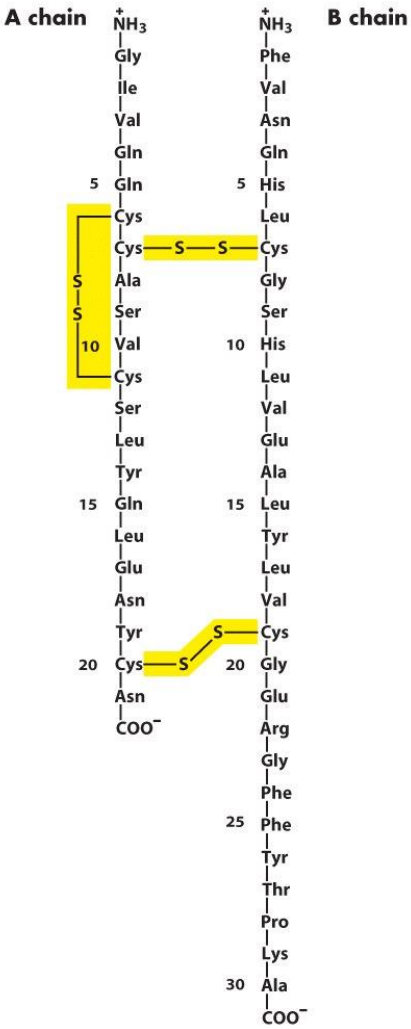
- Birincil yapı, bu yapı farkını anlamada aydınlatıcıdır
- Her protein farklı sayı ve dizide AA kalıntısına sahiptir
- Birincil yapı ilerde göreceğimiz katlanma özelliğini belirlerken bu da protein işlevini belirler

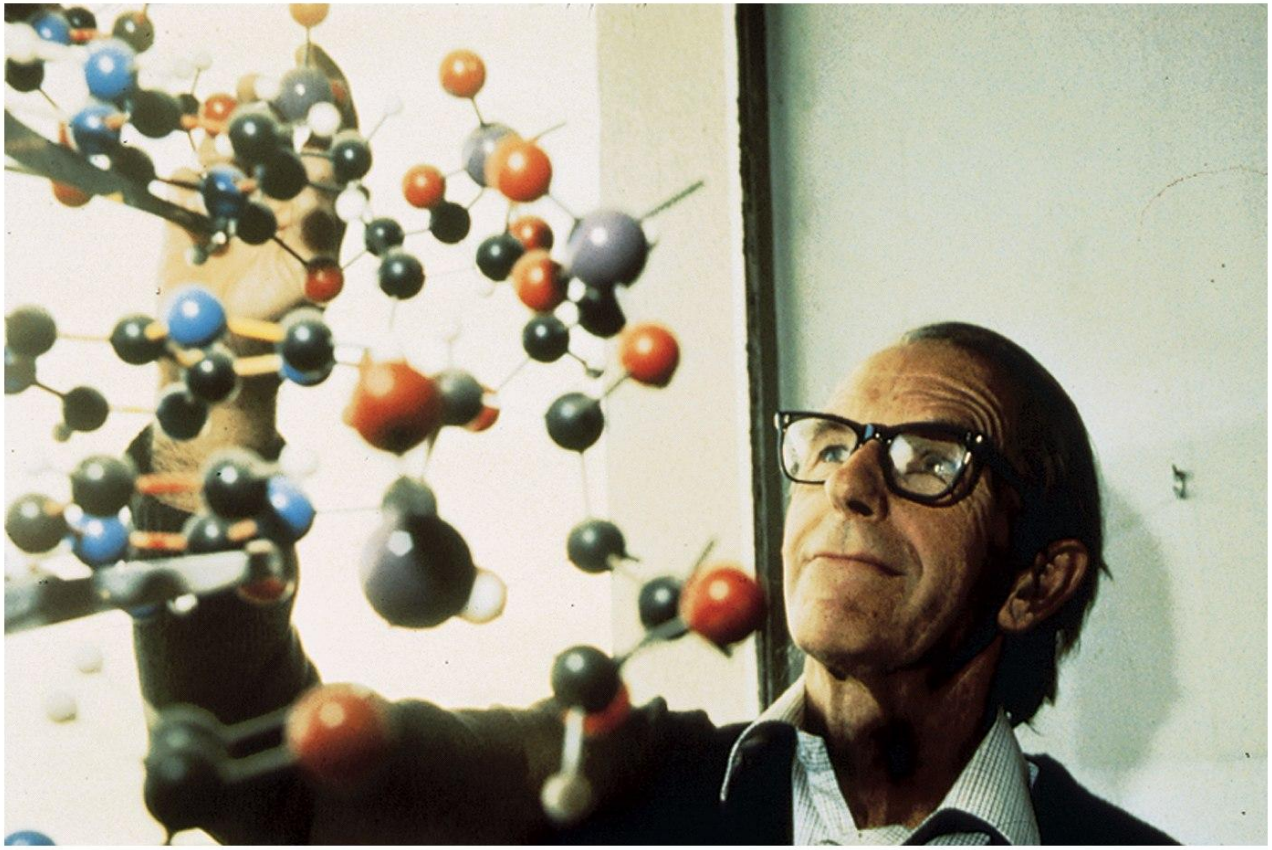
- İnsanda 50000 ila 100000 protein
- Her tip özgün AA dizisine sahip
- Her biri tek bir 3D yapıya sahip ve bu yapı tek bir işlev sağlar

    - AA dizisi işlevi tanımlamada rol alır mı?
        - Genellikle doğru bir tarif yani diziden işleve ulaşabiliriz
            - Ör ubikutinin AA dizisi sinek ve insanda aynı 76 AA
        - Bazı proteinlerde ise kor işlevi tayin eden bölge aynıdır bunun dışındaki AA dizisi işlevi etkilemeden değişebilir
        - insanlar arasında mesela farklılıklar gözlemlenir (polimorfik proteinler tümünün içinde % 20)

AA Dizisi Tayini

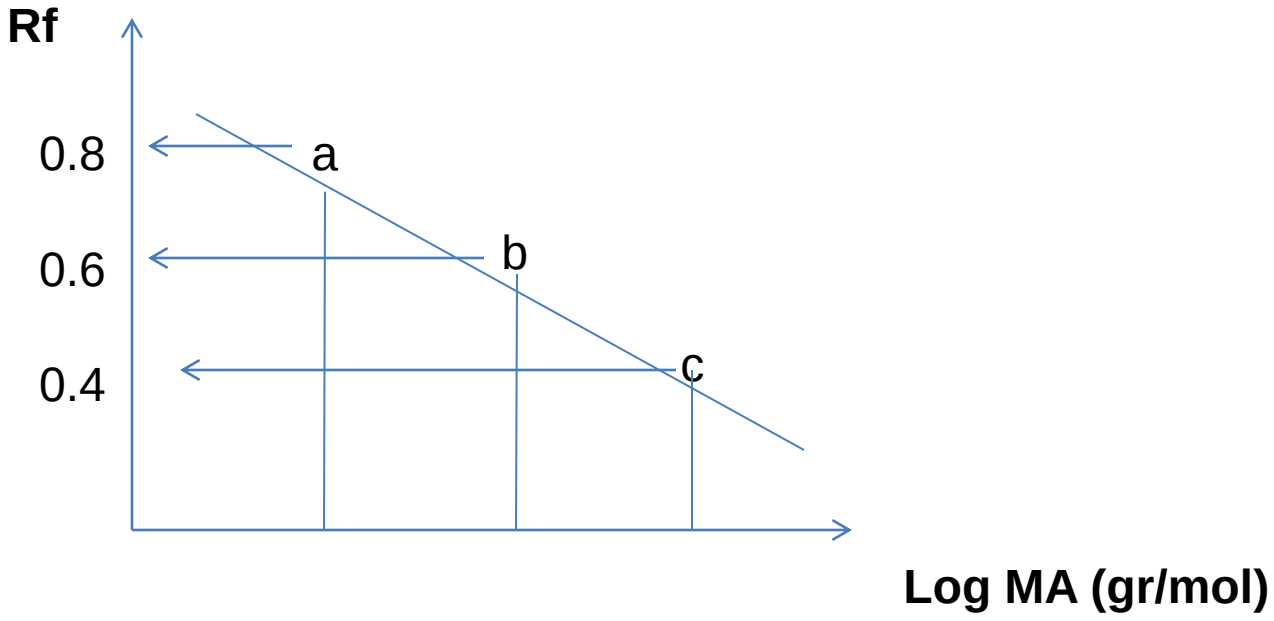
- 1953 Fred Sanger insulin hormonun polipeptit zincirlerinin AA dizisini göstermiştir
- Protein hidrolizlenip AA içeriği saptanabilir





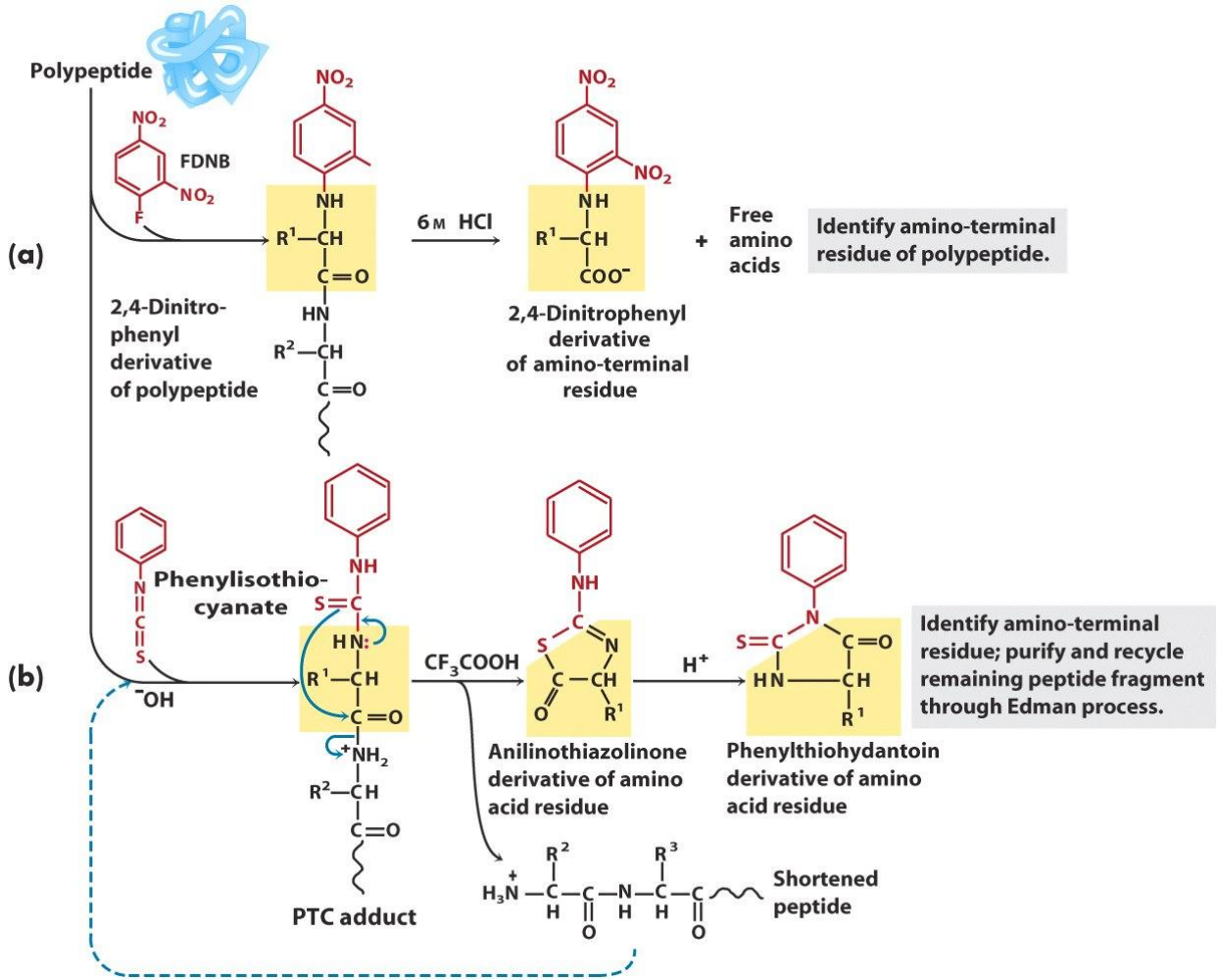
Soru: Aşağıda molekül ağırlıkları bilinen 3 standart protein için elektroforez çıktısı ve herbirine karşılık gelen Rf değerleri verilmiştir.

Elde edilen eğrinin denklemi y= -0,7x + 4 ise elektroforez sonucu b proteini ile c proteini arasında bir bantta gelen, bilinmeyen protein örneği için molekül ağırlık (MA) aralığı nedir?



AA Dizisi Tayini

•Protein hidrolizlenip , mesela HCl ile AA içeriği saptanabilir (HPLC gibi) ancak dizi???



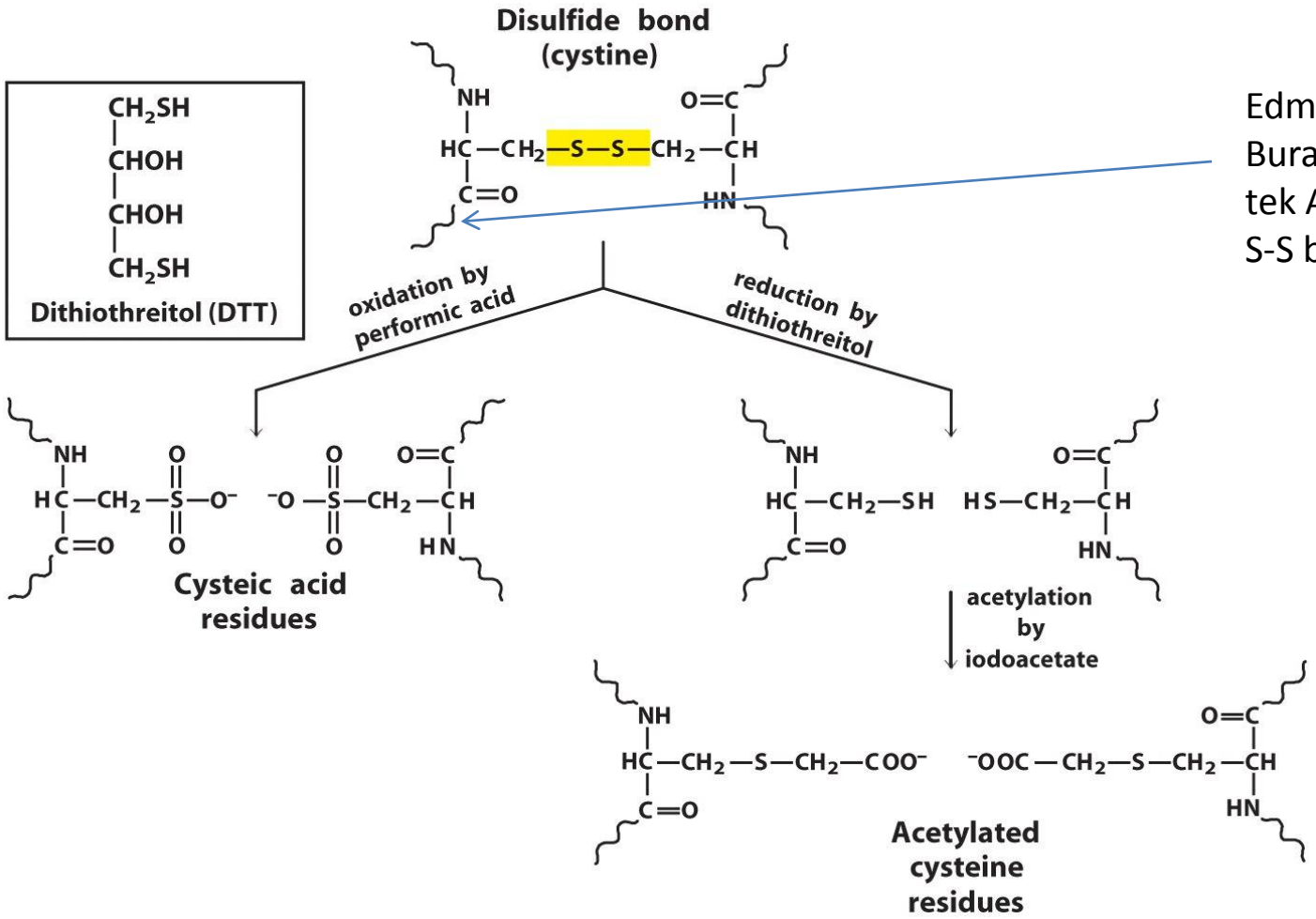
•Dizi için N terminalden başlayarak sırası önemli
•Sanger (a) da FDNB ile N terminus tayini, gerisinde HCl yani dizi is gone.

•Edman indirgemesi sırası ile dizi tayini, ayrılan dışındaki dizi aynen kalır, bir sonraki basamakta kullanılır
•Tam verim yoksa AA dizisi yanlış
    •Gly-Pro-Lys % 97 verim varsa Gly-Gly-Pro-Pro-Lys-Lys okunabilir en kötü senaryo..
    •Kısa dizileri bulma daha güvenli

•Teyit edici mekanizmalar ile doğrulanır
•Sekanatörler ticari olarak var

Proteinlerde AA Dizisi Tayini

- Peptit uzunluğu arttıkça AA dizisinin belirlenme doğruluğu azalır
- Bunun için takip edilecek belli bir akış vardır
    - Disülfit bağlarının kırılması



Edmandan sonra
Burası ayrılır ama
tek AA yerine
S-S bağlı zincir!!

Proteinlerde AA Dizisi Tayini

- Peptit uzunluğu arttıkça AA dizisinin belirlenme doğruluğu azalır

- Bunun için takip edilecek belli bir akış vardır
  - Disülfit bağlarının kırılması
  - Polipeptit zinciri fragmanlara ayrılır, proteazlar
  - Tripsin ve siyanojen bromür en çok kullanılan
  - Kaç bölgeye ayrılır?
  - Neden tek enzim yeterli değil

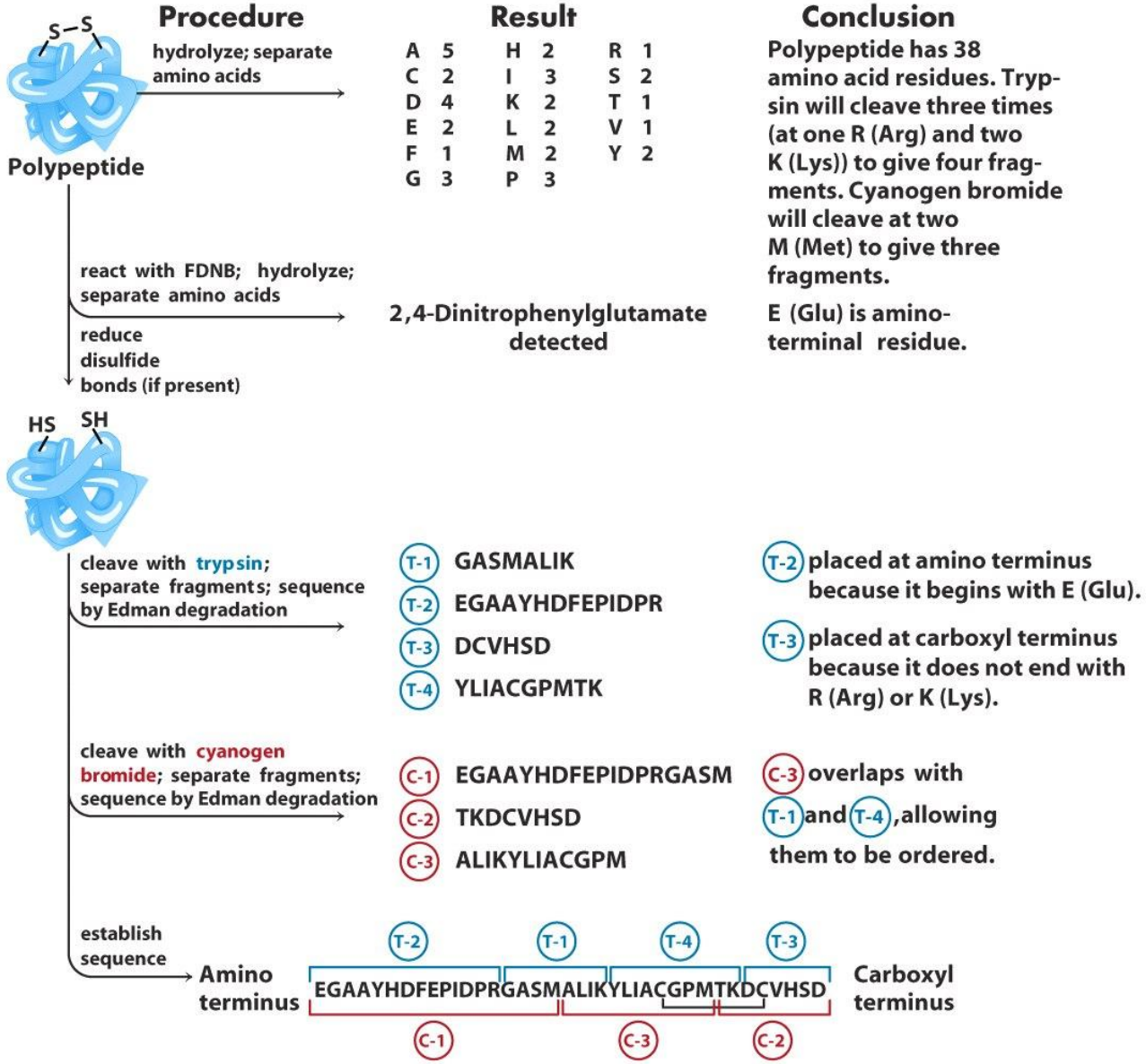
TABLE 3–7 The Specificity of Some Common Methods for Fragmenting Polypeptide Chains

*Reagent (biological source)**	*Cleavage points*†
Trypsin (bovine pancreas)	Lys, Arg (C)
Submaxillarus protease (mouse submaxillary gland)	Arg (C)
Chymotrypsin (bovine pancreas)	Phe, Trp, Tyr (C)
Staphylococcus aureus V8 protease (bacterium *S. aureus*)	Asp, Glu (C)
Asp-*N*-protease (bacterium *Pseudomonas fragi*)	Asp, Glu (N)
Pepsin (porcine stomach)	Phe, Trp, Tyr (N)
Endoproteinase Lys C (bacterium *Lysobacter enzymogenes*)	Lys (C)
Cyanogen bromide	Met (C)

*All reagents 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.

Proteinlerde AA Dizisi Tayini



Proteinlerde AA Dizisi Tayini

Amino acid sequence (protein) Gln – Tyr – Pro – Thr – Ile – Trp

DNA sequence (gene) CAGTATCCTACGATTTCG

Disülfit bağlarının yeri?

Proteinlerde AA Dizisi Tayini

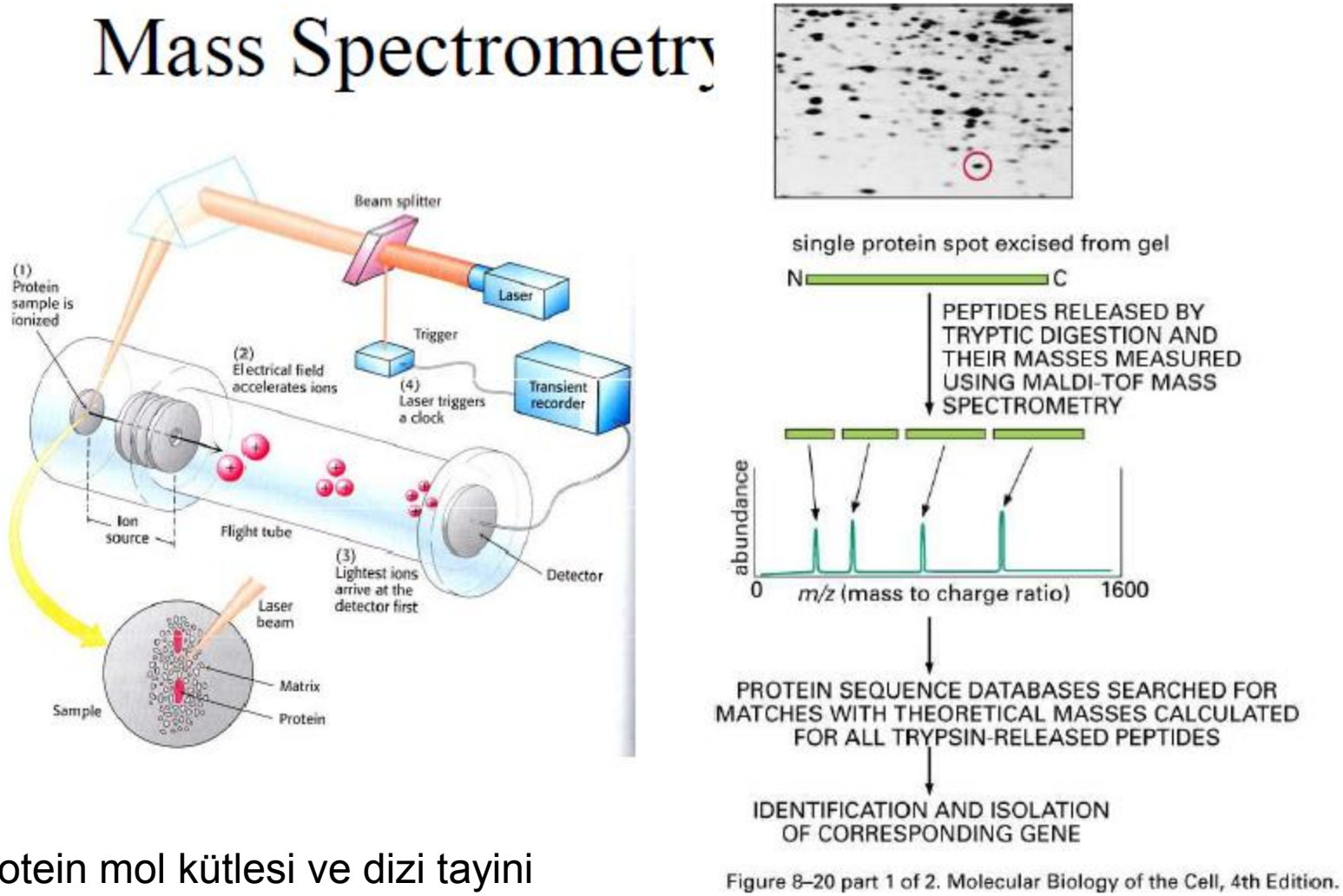
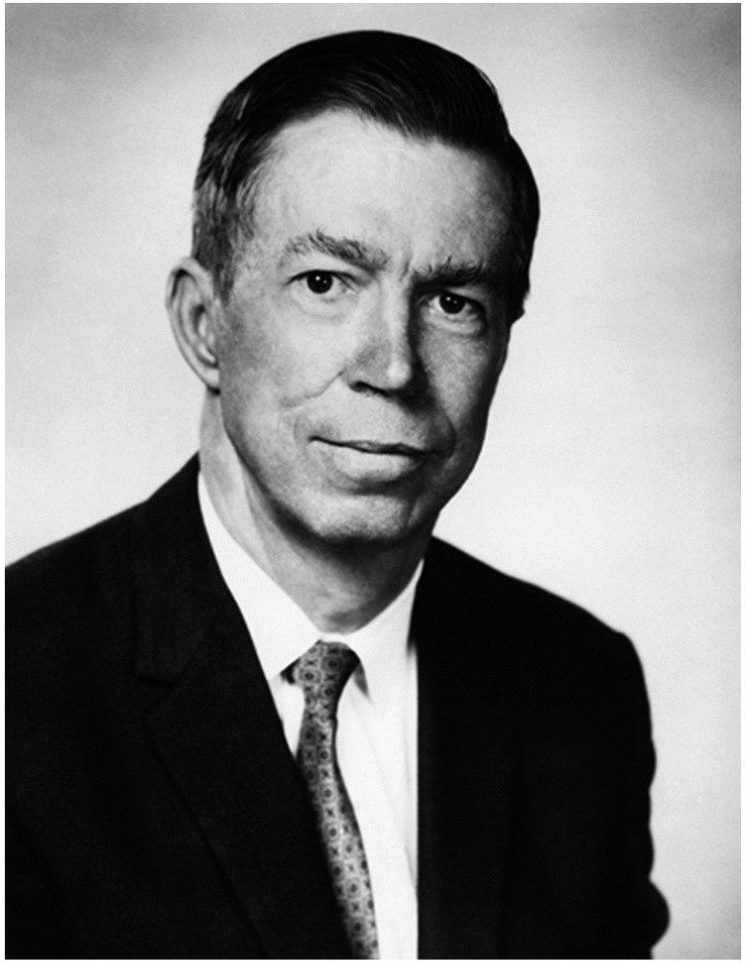


Figure 8–20 part 1 of 2. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

Protein mol kütlesi ve dizi tayini

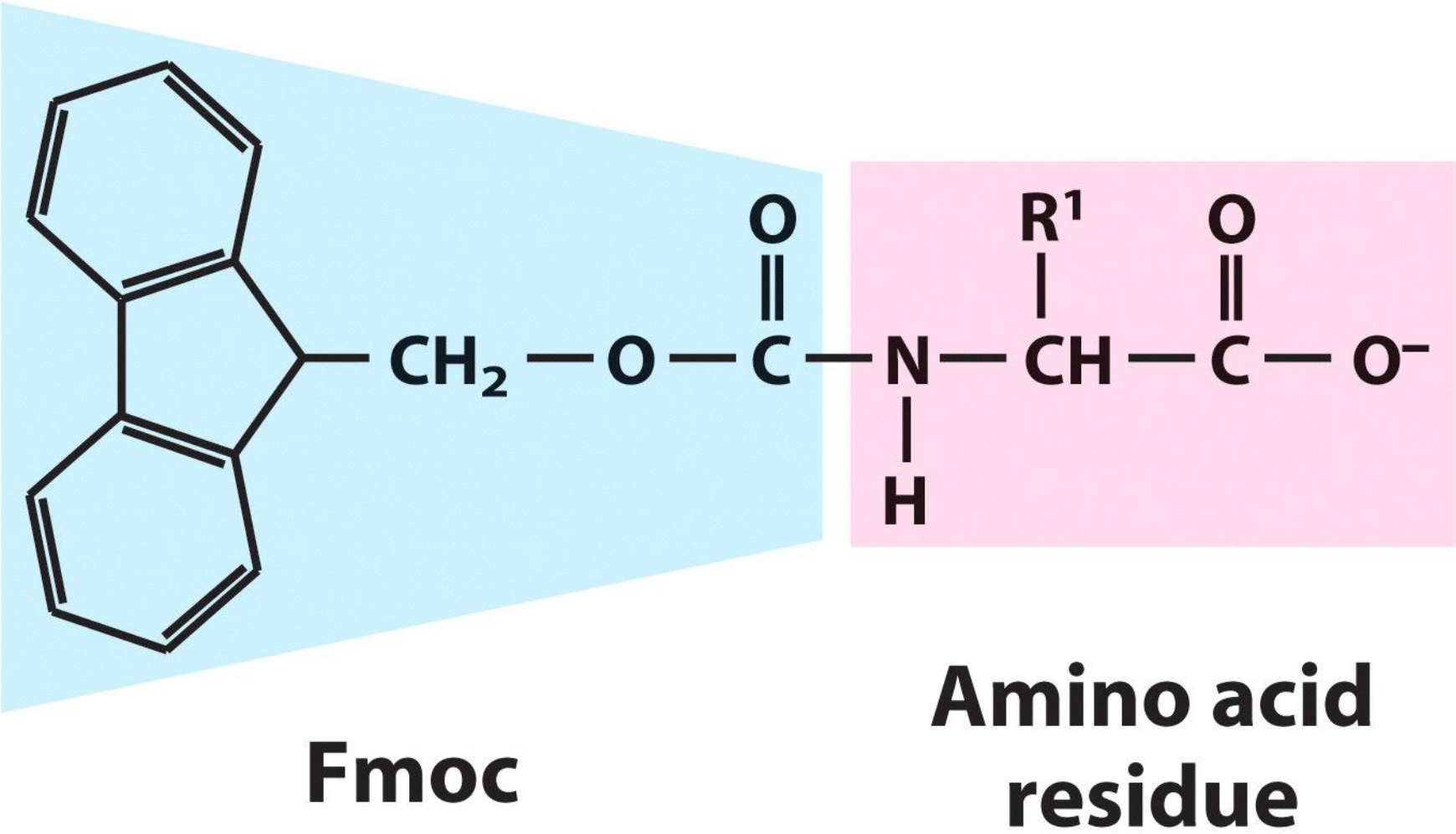
Peptit Sentezi

- İnsanda önemli işlevi olduğu düşünülen bir peptid ile ilgili çalışma yürütüleceğinde
  - Dokudan saflaştır
  - Kimyasal olarak sentezle
  - Bakterilere sentezlet

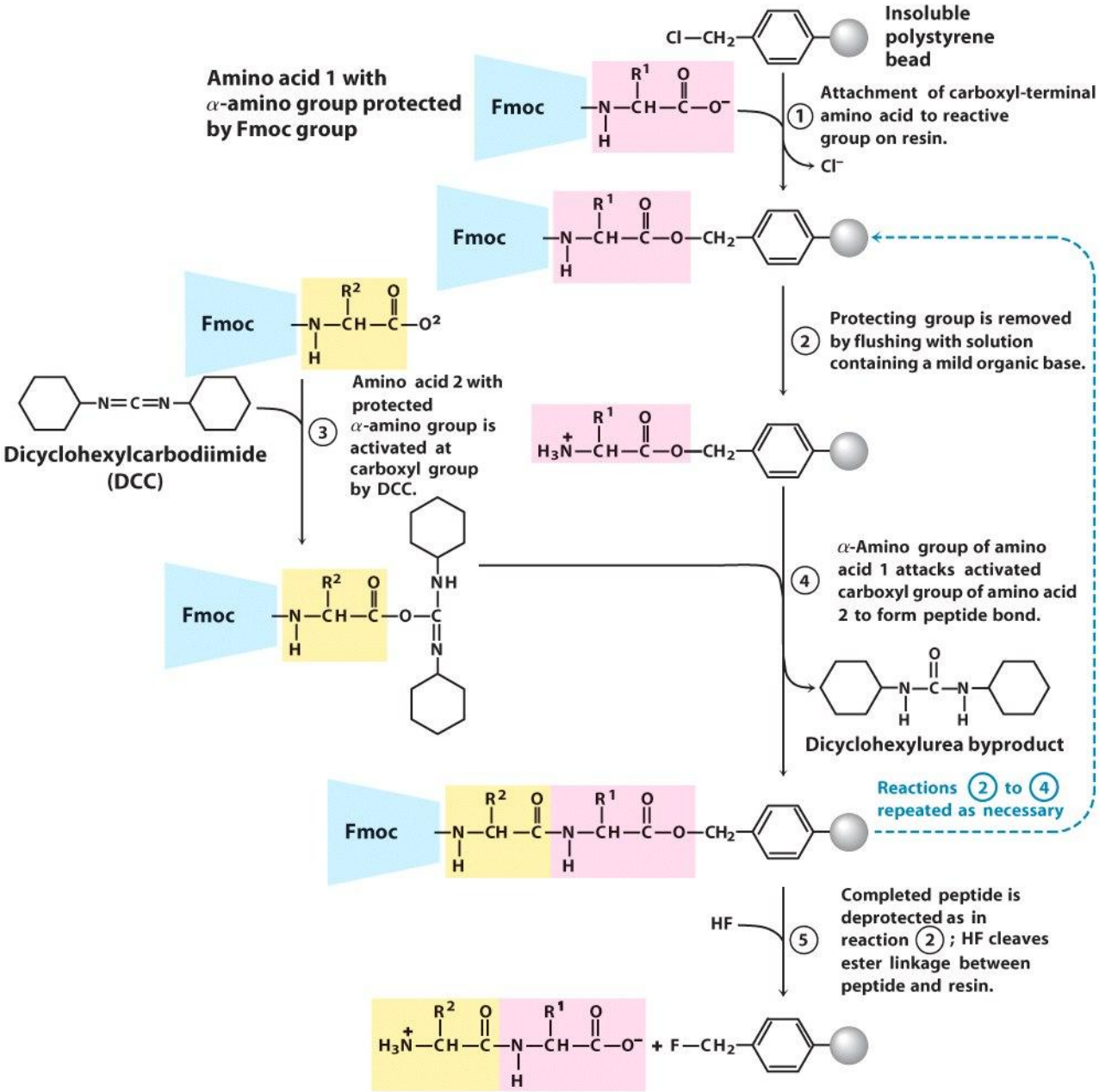


R. Bruce Merrifield

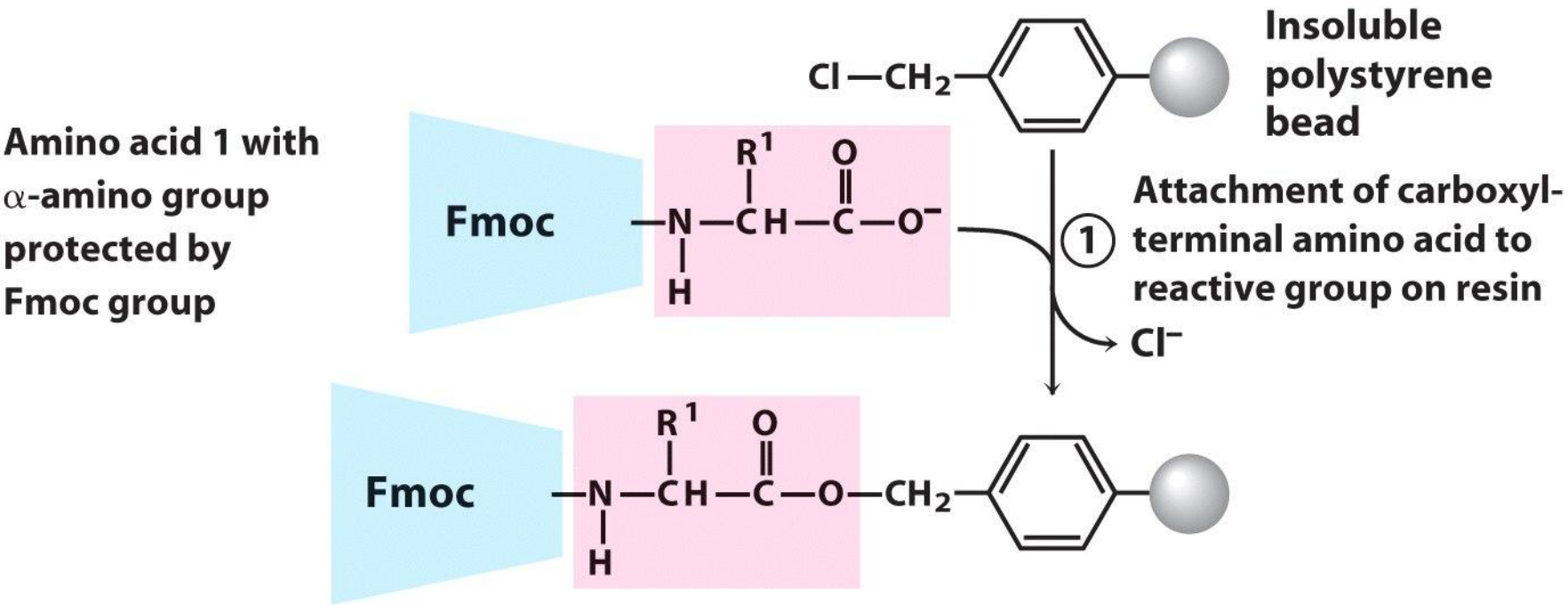
Peptit Sentezi



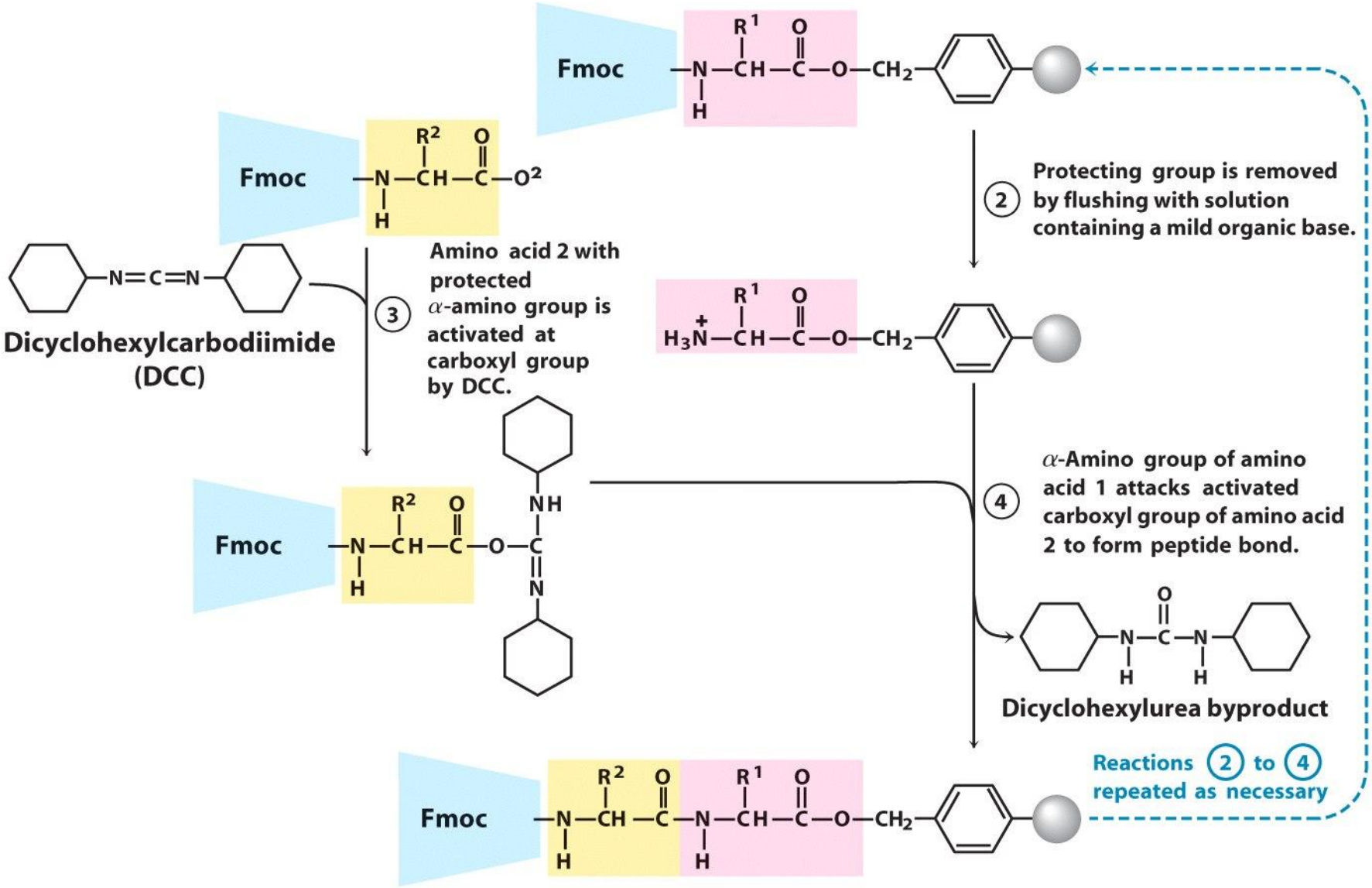
Peptit Sentezi



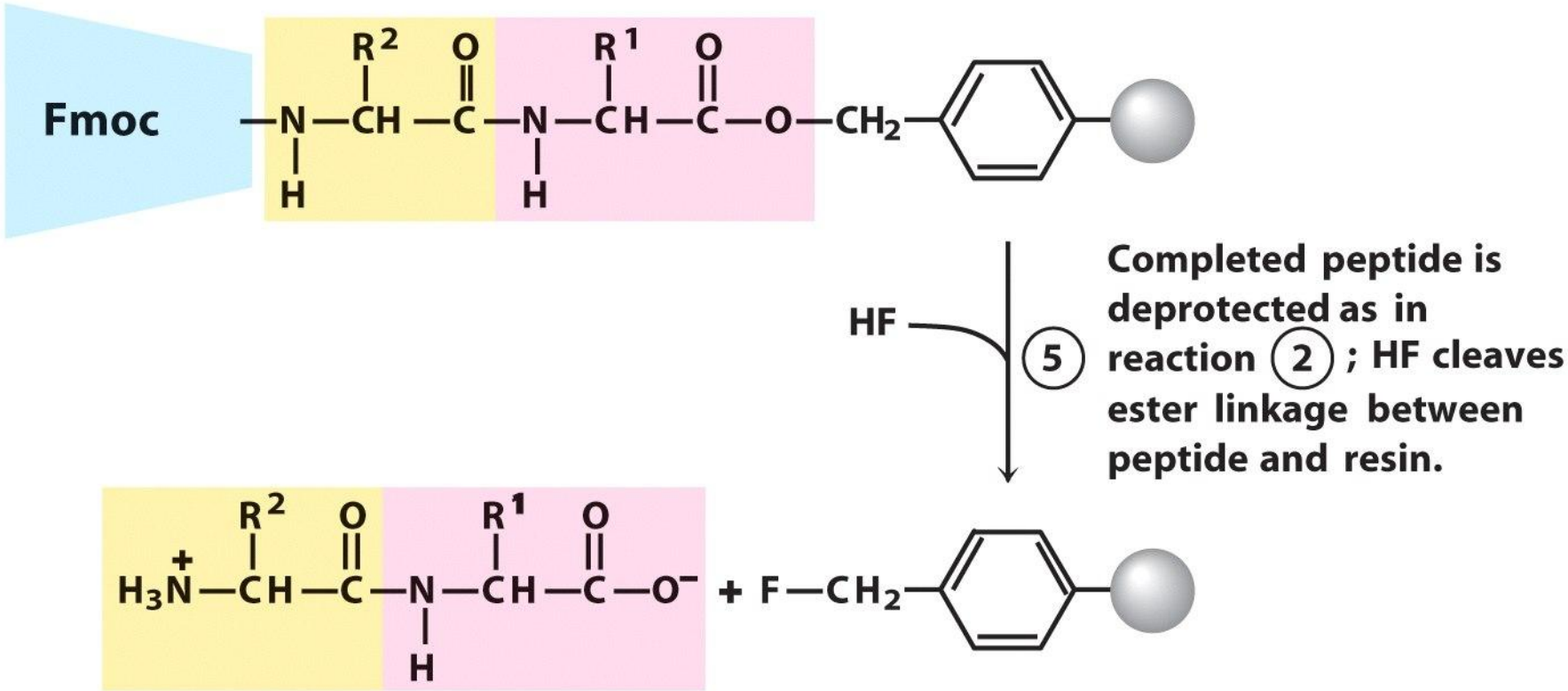
Peptit Sentezi



Peptit Sentezi



Peptit Sentezi



Peptit Sentezi

TABLE 3–8 Effect of Stepwise Yield on Overall Yield in Peptide Synthesis

Number of residues in the final polypeptide	*Overall yield of final peptide (%) when the yield of each step is:*	
	96.0%	*99.8%*
11	66	98
21	44	96
31	29	94
51	13	90
100	1.7	82

Örnek

E-G-A-D… şeklinde birincil yapıya sahip olduğu bilinen bir peptit zincirinin sırası Edman indirgemesi metodu ile teyit edilecektir. Her bir döngünün verimi % 97 ise, 2. döngü sonrası serbest kalan amino asitlerin % kaçı G dir?

Başlangıçta 100 molekül olduğunu düşünelim

- İlk döngü sonrası 97 molekül G-A-D şeklinde, 3 molekül hala E-G-A-D formundadır
  Serbest kalan 97 molekül E dir, başka serbest AA oluşmadığından serbest kalanların tamamı % 100 ü E dir.

- İkinci döngü sonrası 97*0,97 molekül A-D şeklindedir ve 97*0,97 G molekülü serbest kalmıştır. Ayrıca 3 molekül E-G-A-D den de 3*0,97 molekül G-A-D haline dönüşmüş ve 3 *0,97 molekül serbest E oluşmuştur.

Yani serbest kalan AA lerin 97*0,97/(97*0,97+3*0,97) *100 % = 97 % si G dir.

Dolayısıyla formülümüz 0.97^{n-1} dir.