

Anders Hansson

Så fungerar proteiner!

Kompaktversion

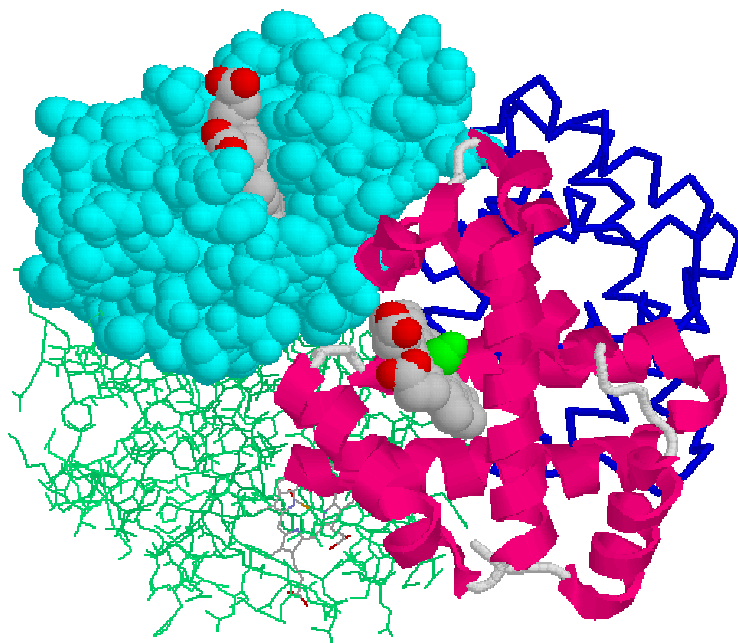
Grundläggande lektion

Inledning -----	1
Nerladdning av filer -----	2
RasWin-----	4
Att studera proteinstrukturer med RasWin -----	5
Proteiner med alfa- och beta-strukturer -----	6
Vattenlösliga proteiner är endast polära på ytan--	6
Hur kan ett active site se ut?-----	7

Inledning

Proteiner

Proteiner är de molekyler i cellen som gör att allt fungerar. De är enzymer, hormoner, signalflaggor på cellens yta, mottagare och omvandlare av signaler, stödproteiner, jonkanaler, transportörer och motorer. Utan proteiner kan inte liv inte existera, som vi ser livet idag. Proteiner bildas i enlighet med den centrala dogmen, som innebär att arvsmassans information bärs mellan generationer genom replikationen av DNA. Informationen i DNA transkriberas sedan till RNA, som i sin tur translateras till protein. Här ska betydelsen av proteiners struktur för deras funktion beskrivas i ord och med hjälp av ett grafiskt presentationsprogram; RasWin. Vi förutsätter en viss kunskap om aminosyror och proteiners kemiska uppbyggnad.



KORRESPONDENS TILL
 Anders Hansson
 Rudbecksskolan, Sollentuna
anhans@edu.sollentuna.se

Proteinstrukturer

Proteiner består av en eller flera kedjor av aminosyror, primärstrukturer, som veckas och binder till varandra i speciella sekundärstrukturer. Tre sådana strukturer som vi ska studera närmare är alfa-helix, beta-sträng och loop. De två första strukturerna bär de delar av aminosyrorna som har en särskilt aktiv roll i proteinets funktion, och håller dem på rätt plats och i rätt vinkel för att proteinet ska kunna utföra sin funktion. Alfa-helixen och beta-strängar hålls samman genom vätebindningar mellan peptidbindningarnas karbonylsyre och kvävebundna väte. Beta-strängar bildar tillsammans beta-flak. Programmet RasWin, som beskrivs i denna text, är ett verktyg för att betrakta och analysera proteiners struktur, främst då sekundärstrukturer, men även strukturer i active site.

Sidokedjors polaritet

En grundfunktion i proteinstrukturer är polaritet, och olika aminosyror sidokedjor har högst varierande polaritet. Att aminosyror är polära betyder i praktiken att de är vattenlösliga och dessa aminosyror kallas i RasWin för "polar", medan opolära aminosyror snarare domineras av van der Waals-krafter, i RasWin kallas dessa "hydrophobic". Naturligtvis finns det grader av polaritet bland aminosyror. Opolära aminosyror finns ofta lokaliserade i varandras närhet, och binder varandra genom så kallad hydrofoba effekter. För vattenlösliga proteiner gäller normalt att insidan av proteinet är opolärt och att utsidan är polär. Det finns också andra krafter mellan aminosyror som håller samman proteiner; vätebindningar, saltbryggor och disulfidbindningar.

Strukturanalys

Strukturer i proteiner bestäms i praktiken genom två olika tekniker; kärnmagnetisk resonans (NMR) och röntgenkristallografi. Med NMR kan man få en bild av proteinets struktur i vattenlösning, medan röntgenkristallografi främst ger en bild av proteinets struktur i den något artificiella kristallen. Forskare deponerar sedan data med atomernas rymdkoordinater i en allmänt tillgänglig databank. Med hjälp av freeware-programmet RasWin ska vi titta på en rad proteiner som redan laddats ner från en sådan databank. Särskilt användbara funktioner i RasWin tas upp stegvis genom att vandra genom bildgalleriet i en följd som i sig innebär en lektion i proteiners struktur och funktion. Slutligen får du lite tips om du vill specialstudera något annat protein, exvis för ett projektarbete.

Nerladdning av filer

För att köra detta material krävs nerladdning av nio filer från Internet, RasWin .exe- och .hlp-filer samt .pdb-

datafiler för lysozym, glucagon, triosfosfatisomeras, immunoglobulin G, myoglobin och två varianter av trypsin med atomkoordinater för proteinerna.

På Internet ska du använda adressen

<http://www.umass.edu/microbio/rasmol/getras.htm>

och följa instruktionerna för att ladda ner RasWin 2.6 och rashlp.exe. Spara dem tillsammans i en lämplig mapp.

I samma mapp ska du också ladda ner följande filer med atomkoordinater:

- 1IY4 sparas som [Lysozym](#) (NMR-data från humant enzym)
- 1GCN sparas som [Glucagon](#) (peptid från gris).
- 1YPI sparas som [Triosfosfatisomeras](#) (detta enzym kommer från vanlig bagerijäst).
- 1K6Q sparas som [IgG Fab-fragment](#) (delar av ett protein från mus)
- 1L2K sparas som [Myoglobin](#) (material från kaskelotval, studerat med neutron diffraktion)
- 1HJ8 sparas som [Trypsin med benzamidinhibitor](#) (laxenzym med lågmolekylär proteasinhämmare).
- 3TGI sparas som [Trypsin med pankreatisk inhibitor](#) (en provrörsblandning av proteiner från råttor och ko).

Du gör på följande sätt för att ladda ner dessa filer:

- gå in på <http://www.rcsb.org/pdb/> och skriv där in ID numret; exempelvis 1IY4, markera PDB ID och klicka i rutan "search"
- klicka "Download/Display File" och under Download the Structure File/compression none och klicka på "X" för PDB
- högerklicka på molekylen, följt av file och save as, markera nu din RasMol-mapp och ange det specifika namnet för den valda filen, i detta fall Lysozym.

Eftersom dessa filer distribueras fritt på nätet kan de laddas ner och distribueras till studenter genom CD-skivor eller ett nätverk. Andra datafiler för proteiner kan återfinnas på Entrez;

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/>.

Välj Structures I fönstret Search, sök på ditt protein och följ proteinkoden via Download/Display File till PDB/Compression None. Ladda ner enligt beskrivningen ovan. Det finns också andra sätt att studera proteiners struktur, ex vis Chime och Protein Explorer, men det är min uppfattning att det bara är RasWin som är flexibel nog att användas i skolmiljö.

RasWin

Att öppna programmet

Sök upp mappen med nedladdat material och start RasWin; normalt Rw32b2a.exe. Dra it fönstret så det täcker hela skärmen. Observera att du nu har två öppna program; RasMol Command Line and RasMol Version 2.6. Vi börjar med att titta på ett litet protein och pröva några av de basala kommandona i RasWin.

Kommandon

Högst uppe i fönstret finns menyerna File, Edit, Display, Colours, Options, Export och Help.

Under File kan du välja att öppna eller stänga en datafil. I Edit kan du välja alla atomer i en molekyl med select all.

Display är mer användbar. Här finns möjligheten att visa molekylen på olika sätt. När en datafil öppnas visas den direkt i Wireframe, dvs alla bindningar mellan molekylerna visas. Prova att öppna filen Lysozym med File Open. Rör lite på molekylen genom att hålla vänsterknappen nedtryckt och flytta på pekaren med musen. Använd nu Display. Skifta till Backbone så ser du enbart peptidbindningarna i proteinet. Varje kedja får en färg. Sticks liknar Wireframe, men ger lite mer rymdkänsla. Spacefill ger en rymdmodell av molekylen yttersta elektronskal. Detta ger en mycket verklighetstrogen bild av proteinet. Ball & Sticks liknar de modeller man ofta använder i skolan. Varje atom är en boll och varje bindning en pinne. Ribbons visar sekundärstruktur, dvs alfa-helix och beta-strängar. Strands och Cartoons är varianter på Ribbons, där Cartoons gör det lättare att följa aminosyrasekvensen genom ett komplicerat protein

Färger

Prova olika inställningar i Colours, gärna i kombination med de olika inställningarna i Display-meny. Monochrome ger en svartvit bild, CPK ger standardfärger (C=svart, H=vit, N=blå). Shapely ger varje aminosyra en unik färg. Group färgar varje kedja i ett spektrum från blått till rött. Chain ger varje proteinkedja en unik färg, medan Structure ger alfahelixar och betastrukturer olika färger. Slutligen ger Temperature ett mått på hur rörliga delar av proteinet är; blå färg indikerar små rörelser och röd färg stora.

Att styra kameran

Ställ nu in Ribbons och Chain. Roter proteinet genom att vänsterklicka och dra, zooma genom Shift+vänsterklick+dra, och förskjut i sidled genom att högerklicka och dra.

Stäng nu genom File Close.

Command Line

I RasWin finns också ett dolt Command Line fönster nere på Windows Verktygsfält. Klicka där och du kan ge kommandon som ger en mer specifik bild av vad som finns i molekylen. Man kan också använda Command Line för att markera atomer i RasWin-fönstret och sedan läsa av vilka aminosyror de hör till. Se även detaljer i User Manual under menyradens Help.

Help

När du går igenom denna stencil kommer du få flera exempel på hur RasWin och Command line kan användas. Under Help User Manual finns en hel del finesser i programmet beskrivna, och det följande tar jag bara upp en del av de möjligheter till analys som kan utnyttas. Experimentera gärna på egen hand när du börjar lära dig RasWin mer grundligt.

Att studera proteinstrukturer med RasWin

Vi börjar med att titta närmare på en kortare polypeptid; glukagon, som bara visar en typ av sekundärstruktur, men ändå är användbar för att visa hur RasWin fungerar.

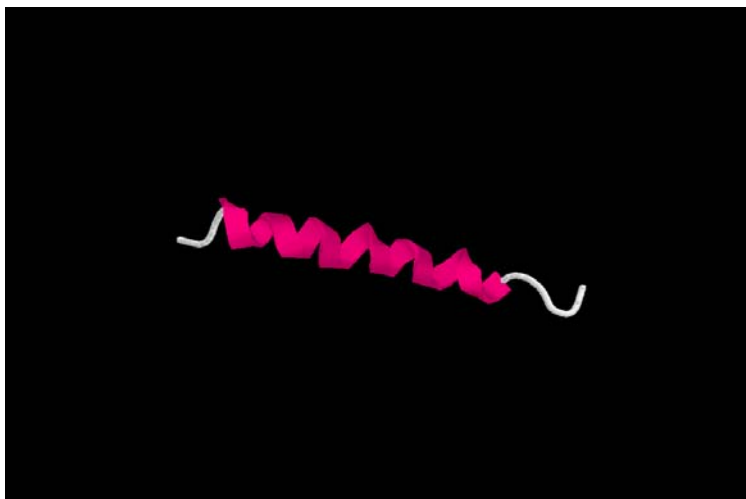


Fig 1. Alfa-helix visad med "ribbons"(glukagon)

Glukagon

Glukagon är ett hormon som bildas av bukspottkörteln när blodssockret är lågt. Den består av 29 aminosyror, och cirkulerar i blodet där den stimulerar glukosfrisättning från levern.

Alfa-helix

I RasWin gör du följande: Klicka på File, Open, Glukagon. Prova olika inställningar på Display. Med Spacefill ser man hur tätt packad ett protein är.

Det finns ingen "luft" i strukturen. Testa även Colour, där exvis Shapely ger var och en av de 20 aminosyrorerna en unik färg. Glukagon bildar en tydlig alfa-helix, vilket man kan se med Ribbons. Det bästa sättet att skaffa sig en överblick av sekundärstrukturer i ett protein är med Cartoons Structure.

Markera enstaka aminosyror

På menyraden har du en knapp för RasWin Command

Line. Klicka. Prova först att rödmarkera alla tryptofaner i glukagon på följande sätt. Skriv `select trp` Enter `color red` Enter och titta i RasWin-fönstret. Enter används efter varje `select`-kommando i det följande.

Markera en typ av aminosyror

Testa också att markera alla rent opolära aminosyror. Skriv i kommandofönstret `select hydrophobic`. Gå tillbaka till RasWin-fönstret, Display, Ball & Sticks. Du ser nu de opolära aminosyrorna avteckna sig mot glukagonets övriga aminosyror.

Stäng filen med File Close.

Proteiner med alfa- och beta-strukturer

Glukagon visade bara alfa-helix, och som exempel på proteiner med båda typerna av struktur kan man ta lysozym, enzymet i tårvätska som bryter ner bakteriers cellvägg. Öppna filen Lysozym. Cartoons Structure gör att du ser sekundärstrukturerna tydligt. Ett annat exempel är triosfosfatisomeras, det enzym som katalyserar omvandlingen av DHAP till 3-GAP direkt efter glykolysens omvandling av 6-kolfragment till två 3-kolfragment. Öppna filen Triosfosfatisomeras. Använd även här Cartoons Structure för bästa överblick av sekundärstruktur. Ett tredje och sista exempel på protein med bägge typerna av sekundärstruktur är immunglobuliner. Du kan hämta en del av immunglobulin G, IgG, i filen IgG Fab-fragment där du hittar en del av proteinet och med Cartoons Structure kan du lätt se att det består av stora beta-flak med omgivande små alfa-strukturer.

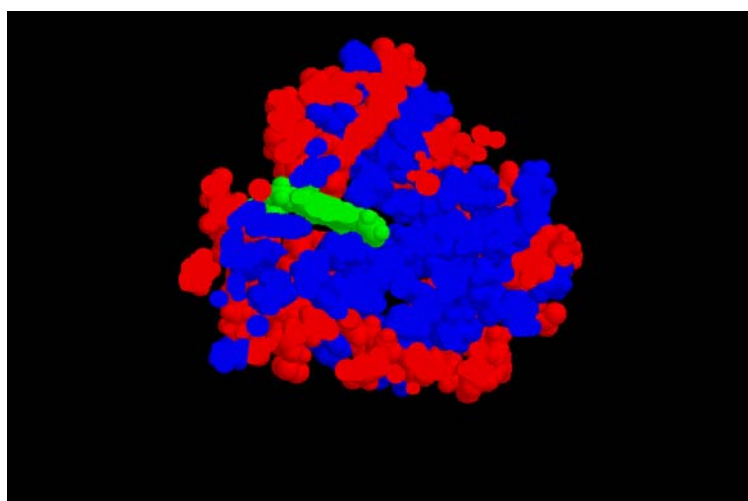


Fig 2. Myoglobin visad med "spacefill". Hemgruppen är grön, polära aminosyror röda, och hydrofoba aminosyror visas i blått.

Vattenlösliga proteiner är endast polära på ytan

Som exempel på vattenlösligt protein väljer vi myoglobin, ett protein som binder syre i muskler. Öppna Myoglobin. Cartoons Structure. Titta på alfa-helixarna. Gå till Command Line och skriv in `select polar` följt av `color red`. Välj nu Spacefill `select hydrophobic` `color blue` Spacefill `select hem`, `color green` Spacefill och under Mode-menyn Slab. Sök dig nu genom molekylen skiva för skiva genom att röra pekaren

på bildytan med vänsterknappen nedtryckt. Se hur insidan domineras av opolära och hur utsidan framför allt är uppbyggd av polära aminosyror. Se också hur fickan där hemgruppen binds framför allt består av opolära aminosyror. Häm är relativt opolärt.

Hur kan ett active site se ut?

Trypsin bildas i bukspottkörteln och bryter ner proteiner i födan till mindre peptider, mera lämpliga för slutlig nedbrytning och upptag i blodet som fria aminosyror. Trypsin har som egenhet att binda peptider med en basisk aminosyra, dvs lysin eller arginin, i sitt active site.

Trypsin med lågmolekylär hämmare

Öppna Trypsin med bensamidininhibitor. Titta med Ribbon. Markera den katalytiska triaden i active site med select his57, asp102, ser195. Spacefill. Visa den bundna inhibitorn genom select hetero and not hoh, Spacefill, Groups. Just där den blå inhibitorn ligger binder normalt den basiska delen av substratets lysin- eller argininsidokedja. Inhibitorn benzamidin fungerar genom att blockera substratets tillträde till active site.



Fig 3. Trypsin med en inhibitor på active site.

Trypsin med inhibitorprotein

Öppna filen Trypsin med pankreatisk protein inhibitor: Ribbon, Chain, select asp102, his57, ser195. Spacefill. Du ser nu den katalytiska triaden i active site. Inhibitorn fyller hela utrymmet i active site och förhindrar bindning av eventuella substrat för enzymet. Detta gör det möjligt för bukspottkörteln att tillverka och lagra trypsin utan att bryta ner sig själv. Select lys15i, asp189e Spacefill, Chain. Du ser nu den lysinrest på inhibitorn som binder

till den normalt substratbindande asparaginsyraresten i botten av active site. Det är denna sura, negativt laddade asparaginsyrarest som binder till de basiska aminosyrorna i substratproteiner.

Du har nu fått pröva på tre huvuddrag hos proteiner; sekundärstruktur, polaritet/opolaritet och active site. I originalversionen finns fler exempel på proteiner och sambandet mellan struktur och funktion så att du kan välja område efter intresse, och lära dig nya sätt att använda RasWin.

Originalversionen av detta material har tillkommit för att underlätta undervisning i proteinstrukturers betydelse inom biokemi och biologi på gymnasiet, och detta är en minimiversion av originalet. Jag har haft stor hjälp av Karin Sandelius Hellström, Paul Strömquist samt elever och lärare vid Rudbecksskolan, som med sina kritiska synpunkter och sitt stöd gjort det möjligt att ställa samman detta material. Eventuella kvarvarande brister ansvarar jag för själv. Materialet är riktat både till lärare och elever; till lärare som en del av fortbildning i ämnet och som inspiration, och till elever som en introduktion till moderna tekniker för att förstå biokemiska sammanhang.

Jag är tacksam för synpunkter och påpekanden, vilka lämpligen skickas till adress anhan_s@edu.sollentuna.se, alternativt till **Anders Hansson, Bävervägen 9, 19139 Sollentuna**. Den som bidrar med synpunkter kommer naturligtvis få del av kommande uppdateringar och förbättringar.

Anders Hansson

anhan_s@edu.sollentuna.se

Illustrationer från programmet RasWin