



GÖTEBORGS
UNIVERSITET

Att utforska proteiner

LPG001

Biokemi

2025-11-17

Linda Johansson, Ph.D.

linda.johansson.4@gu.se

INNEHÅLL

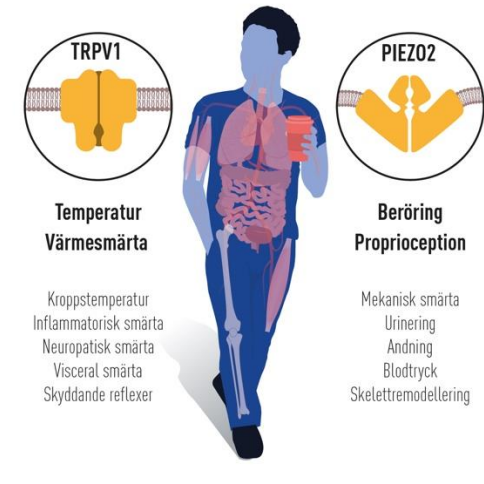
- Begreppet "proteom"
- Skillnader i proteiners kemiska och fysikaliska egenskaper samt hur dessa ligger till grund för olika principer för renframställning av proteiner. Gelfiltrering, jonbyteskromatografi, affinitetskromatografi.
- Principer och tillämpning av elektrofores (SDS-PAGE).
- Översiktlig beskrivning av protein-analys med immunologiska tekniker och 'blottnig'. Antikropp och antigen. Skillnaden mellan monoklonala och polyklonala antikroppar m a p igenkänning av antigen. Principen för detektion av antikroppar m h a ELISA-metoden. Exempel på kliniska tillämpningar för ELISA kommer ges.
- Masspektrometri – en introduktion
- Förutsättningarna för proteinstrukturbestämning med röntgenkristallografi, NMR och kryo-EM och deras applikation på medicinskt relevanta proteiner.

Varför studera proteiner?

- **Forskning:** hur ser de ut (strukturbiologi)? Vad binder de till för molekyler (biokemi)? Vart finns de i kroppen? Hur påverkar de olika sjukdomar?
- **På kliniken:** provtagning ex. för HIV-infektion (antikroppar, detektion mha ELISA), COVID-19 (antigen, antikropp, detektion mha ELISA), vid misstänkt myelom (detektion av IgM mha proteinelektrofores).

Proteiner

- Proteiner utför viktiga funktioner i de flesta biologiska processer, t.ex. DNA replikation, signalöverföring i synapser samt t.ex. att kunna känna lukt eller smak.
- ... Eller för att känna temperatur eller beröring (2021 års Nobelpris i Medicin eller Fysiologi).
- Proteinets aminosyrasekvens dikterar konformationen (den tredimensionella strukturen) och därmed också proteinets funktion.



2021 års nobelpris tilldelades Arden Patapoutian och David Julius "för deras upptäckter av receptorer för temperatur och beröring".

(Nobelprize.org)

Proteiner – 2024 års Nobelpris!

David Baker

“for computational protein design”



David Baker. Ill. Niklas Elmehed © Nobel Prize Outreach

Demis Hassabis

“for protein structure prediction”



Demis Hassabis. Ill. Niklas Elmehed © Nobel Prize Outreach

John Jumper

“for protein structure prediction”



John Jumper. Ill. Niklas Elmehed © Nobel Prize Outreach

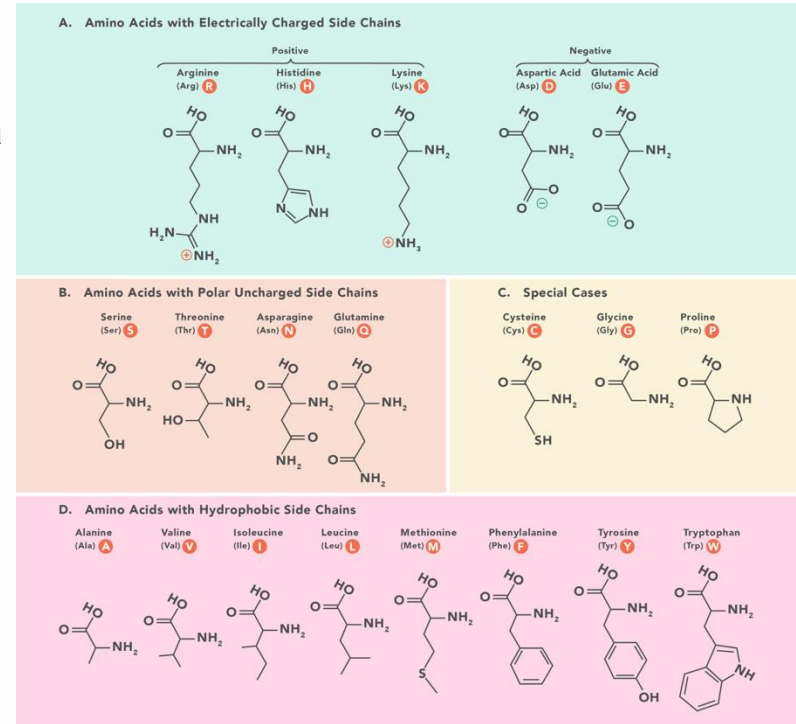
The Nobel Prize in Chemistry 2024 is about proteins, **life's ingenious chemical tools**. David Baker has succeeded with the almost impossible feat of building entirely new kinds of proteins. Demis Hassabis and John Jumper have developed an AI model to solve a 50-year-old problem: predicting proteins' complex structures. These discoveries hold enormous potential. (*Nobelprize.org*)

Proteom

- Genom: komplett DNA sekvens hos en organism (i människa ca 3 miljarder DNA baser och 23000 gener).
- Proteom: de faktiska proteiner som uttrycks av en given cell, vid en given tidpunkt (alla gener uttrycks inte alltid i alla celler). Exempel på gener som uttrycks vid speciella tillfällen kan vara sådana som uttrycks under embryonala stadiet.
- Proteom innefattar också proteinmodifikationer, interaktioner (kortlivade) och är därför mycket dynamiskt.
- Oändliga kombinationer av expressionsmönster, celltyper, proteininteraktioner, proteinmodifikationer gör att proteomet är mycket komplext.

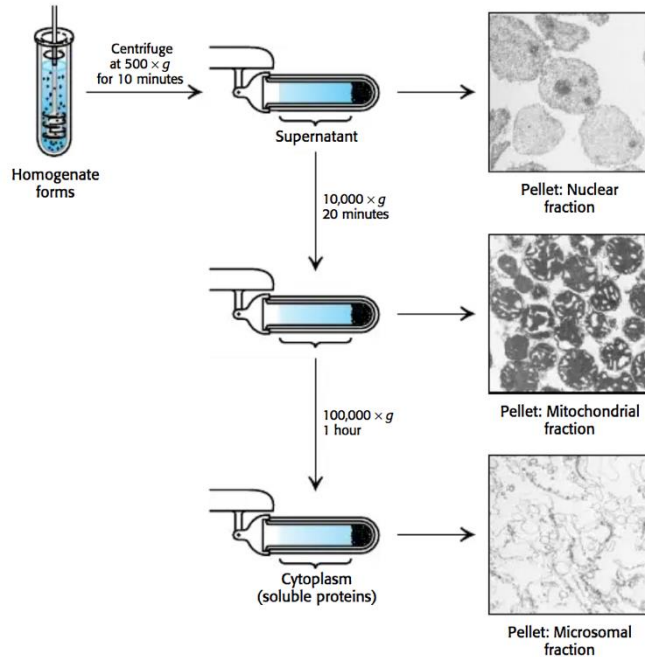
Hur kan vi studera proteiner?

- För att studera ett specifikt protein behöver vi rena fram det från alla andra proteiner som finns i en cell (tusentals olika proteiner).
- Proteiner har olika egenskaper- t.ex. aminosyrasekvens men också tredimensionell struktur, vilka kan användas för framrening av ett specifikt protein.
- Två vanliga egenskaper att separera protein efter är storlek och laddning. Det är aminosyrasekvensen som avgör båda dessa.
- Andra egenskaper är t.ex. löslighet och bindningsaffinitet.



Preparation av protein

Homogenisat



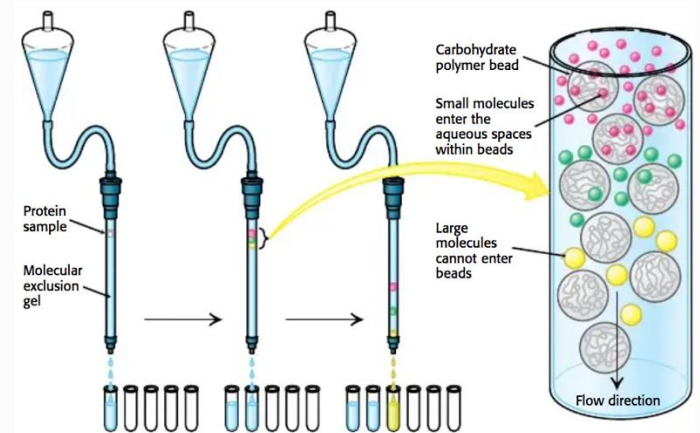
- För att rena fram proteiner måste dessa lösliggöras från cellen. Denna mix kallas homogenisat.
- Man kan dela upp detta homogenisat i sina beståndsdelar genom olika centrifugeringssteg.
- Det som hamnar i botten av röret kallas pellet och det ovan kallas supernatant.

Kromatografi

- Små kulor (beads på engelska) kan tillverkas med olika egenskaper. T.ex. vara laddade eller bära på en specifik molekyl. Denna kallas för fast fas.
- Dessa kulor förpackas i en kolonn – ett långt rör med två öppningar, ett där provet appliceras och ett där provet samlas upp (elueras).
- För att prover ska kunna röra sig igenom kolonnen krävs tillsats av en buffert (=en vattenbaserad lösning som är kompatibel med prov och kolonn).
- Provet och dess buffert kallas mobil fas.
- **Finns flera olika typer:**

Gelfiltrering – separation med avseende på STORLEK

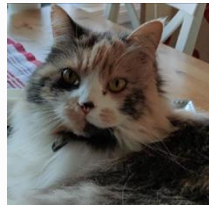
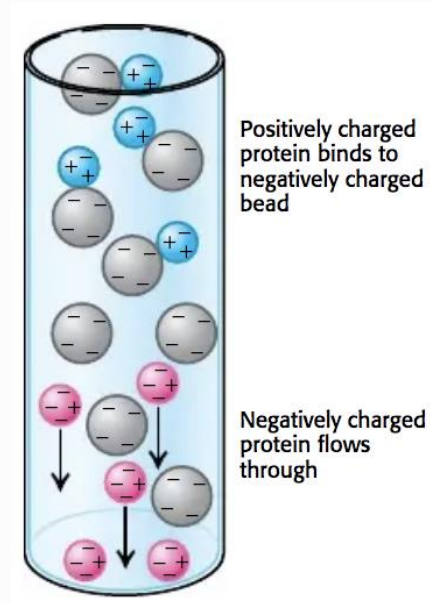
- Separation av proteiner med avseende på storlek.
- Proteinprovet appliceras på en kolonn bestående av porösa kuler. Små molekyler kan gå in i porerna medan större vandrar runt.
- Stora prover kommer ut FÖRE de små.
- Grov och fin storleksseparation möjlig.



Störst först!

Jonbyteskromatografi – separation med avseende på LADDNING

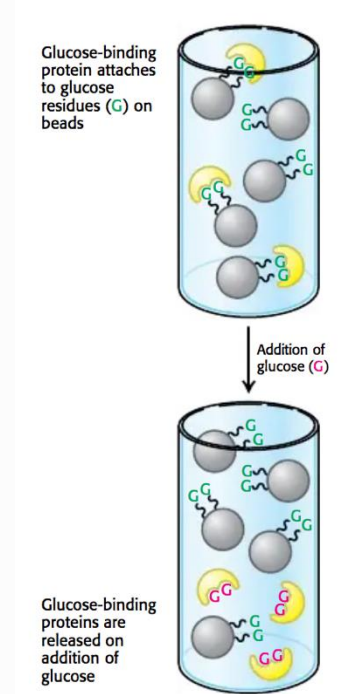
- Ett proteins aminosyrasekvens avgör den totala laddningen hos proteinet.
- Två typer av kolonner innehållande porösa kulor:
 - A) Anjonbytare: binder negativt laddade grupper (positivt laddade går rakt igenom)
 - B) Katjonbytare: binder positivt laddade grupper (negativt laddade går igenom)
- Prov elueras med pH eller salt (ofta båda)



Katt=positivt

Affinitetskromatografi – separation med avseende på SELEKTIVITET

- Specifik egenskap (t.ex. glukosmodifikation) hos proteinet kan användas för att binda till en kolonn som har glukosbindande egenskaper.
- Ofta använt för överuttryckta proteiner.
- Exempel: På DNA-nivå adderas en sträng av 6st Histidinaminsyror (6xHis tag). Dessa binder mycket starkt till en kolonn innehållande nickel (II) joner. Proteinet elueras ut med t.ex. imidazol.



Berg et al. Biochemistry 10e, W.H. Freeman and Company.

Figur 4.5

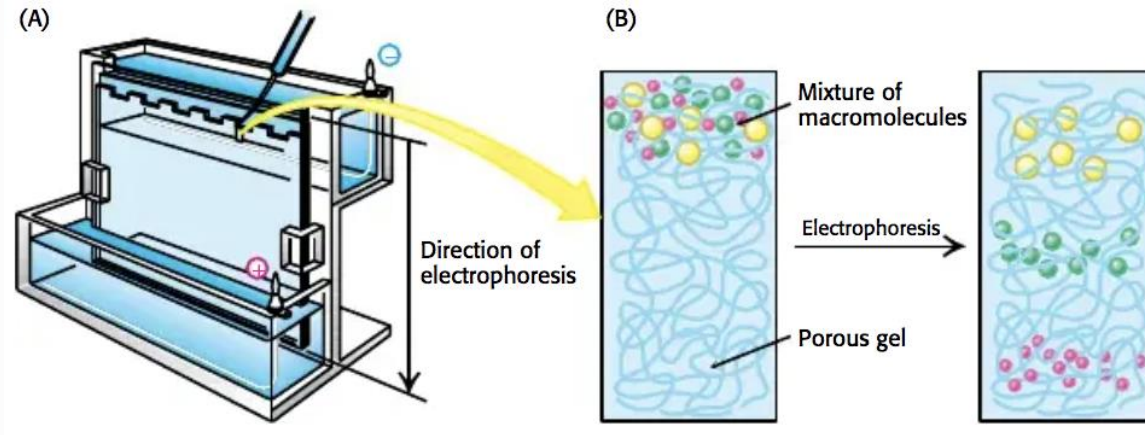
Analys av proteiner

Analys av proteinrening

- Ofta utförs flera reningssteg efter varandra för att få hög renhet på proteinet.
- Vi vill följa hur provet renas vid varje steg, samt verifiera att rätt protein har renats fram.
- Vilka metoder man använder beror på 1) vilken renhet som önskas och 2) vilka egenskaper som finns hos proteinet.

Gelelektrofores

- En molekyl med en viss nettoladdning kommer röra sig i ett elektroniskt fält – detta kallas elektrofores.
- Metoden kallas polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE)

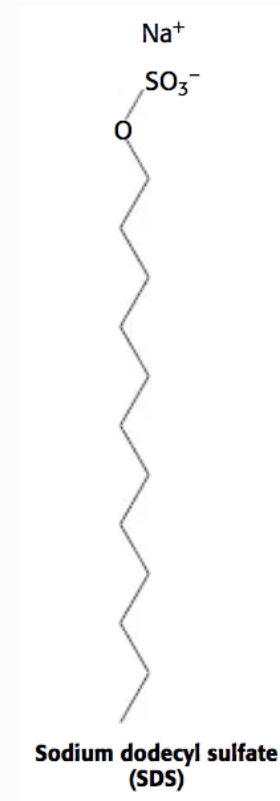


Polyakrylamiden bildar ett nät där stora proteiner bromsas medan små slinker igenom.

Alla vandrar mot (+)-polen

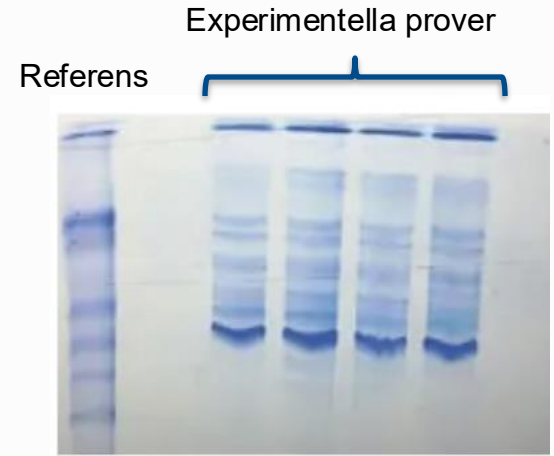
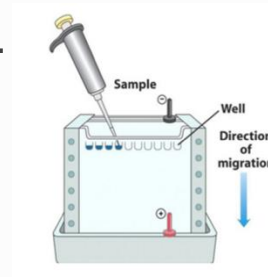
Gelelektrofores: SDS PAGE

- SDS-PAGE eller Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis.
- Proteinprov blandas med Sodium dodecyl sulfate (SDS, eller Natrium dodecylsulfat), en negativt laddad molekyl, som binder till proteiner.
- Ett stort protein kommer binda fler SDS och ett litet protein färre. Alltså kommer proteinets laddning vara proportionell mot dess massa (kDa).
- Proteiner separeras med avseende på **STORLEK**.



Gelelektrofores: SDS PAGE

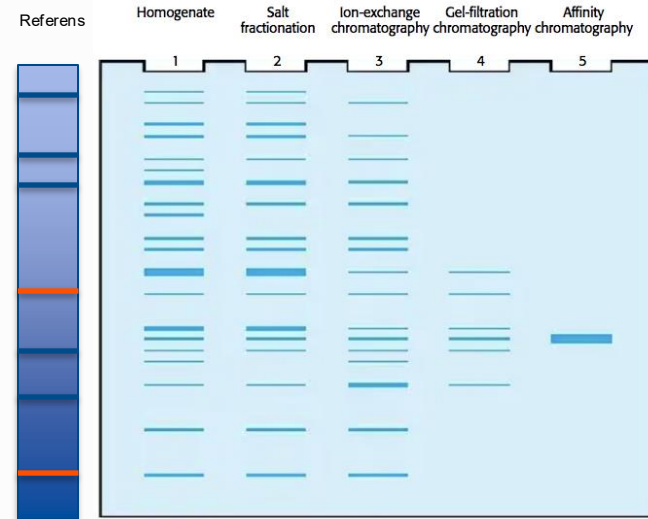
- Storleksreferens (en blandning av proteiner med känd storlek) laddas tillsammans med proverna (till vänster i bild).
- Proverna laddas i så-kallade brunnar.



- Efter körning färgas gelen in med en proteinbindande färg, Coomassie blue.

SDS-PAGE kan användas för att följa en proteinrening

- Exempel på en proteinrening som följs på en SDS-PAGE.
- Ett prov tas ut från varje reningssteg och körs på SDS-PAGE-gelen.
- Efter infärgning med Coomassie blue ser man att proteinet "av intresse" successivt blir renare för varje steg.



Gelfiltrering vs. gelelektrofores

- **Gelfiltrering**

- ❖ Separation av proteiner med avseende på storlek.
- ❖ Används för proteinrening.
- ❖ Störst först!

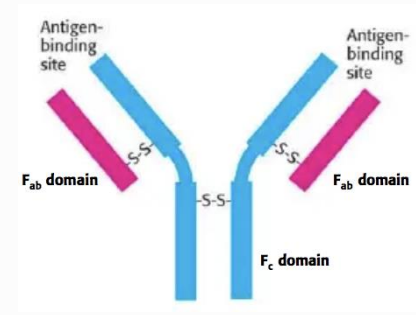
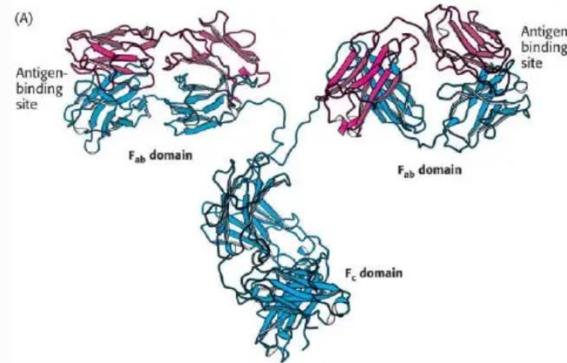
- **Gelelektrofores**

- ❖ Separation av proteiner med avseende på storlek.
- ❖ Används för proteinanalys.
- ❖ Minst först!

Hur immunologi kan användas för att undersöka proteiner

Antikroppar och antigen

- **Antikroppar är proteiner** som genereras i respons mot främmande element (eller *antigen*).
- Bindning av antikropp till antigen leder till en immunrespons som skyddar individen mot infektion.
- De grupper eller aminosyror som antikroppen känner igen på antigenet kallas *epitop*.



Berg et al. Biochemistry 9e, W.H. Freeman and Company.

Figur 3.17

2023 års Nobelpris

COVID-19 vaccinet ger upphov till antikroppar!

Även 2025 års Nobelpris rör kroppens immunförsvar!

The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2023



Ill. Niklas Elmehed © Nobel Prize Outreach
Katalin Karikó
Prize share: 1/2

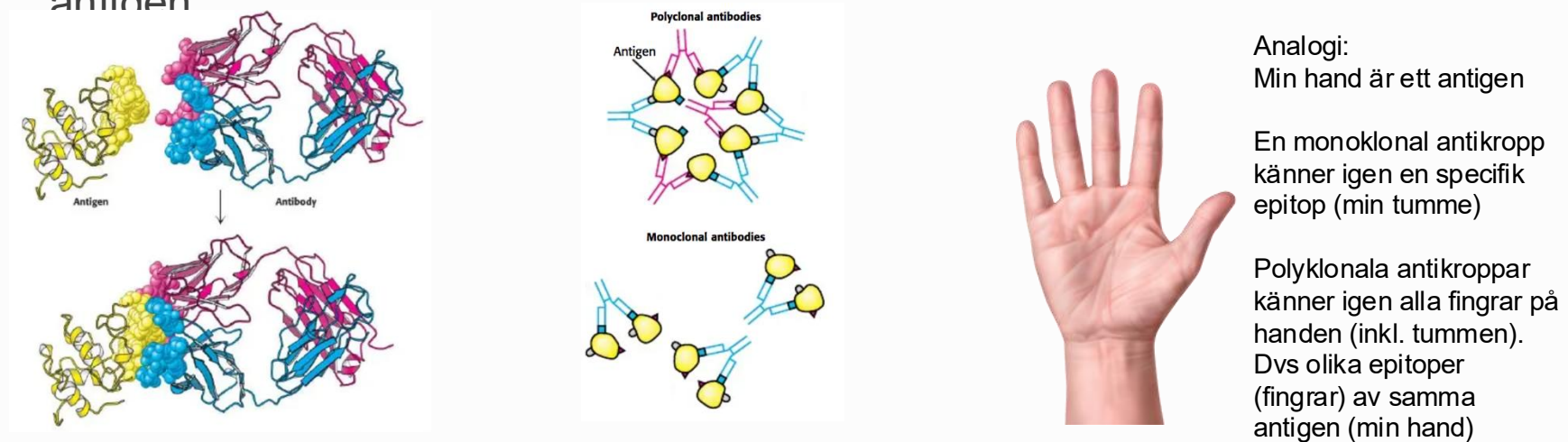


Ill. Niklas Elmehed © Nobel Prize Outreach
Drew Weissman
Prize share: 1/2

The 2023 Nobel Prize in Physiology or Medicine was awarded jointly to Katalin Karikó and Drew Weissman "for their discoveries concerning base modifications that enabled the development of effective mRNA vaccines against COVID-19"

Antikroppar och antigen

- Polyklonala antikroppar är en mix av antikroppar, vilka känner igen **olika epitoper** av en specifik antigen.
- Monoklonala antikroppar känner igen exakt **samma epitop** av en specifik antigen



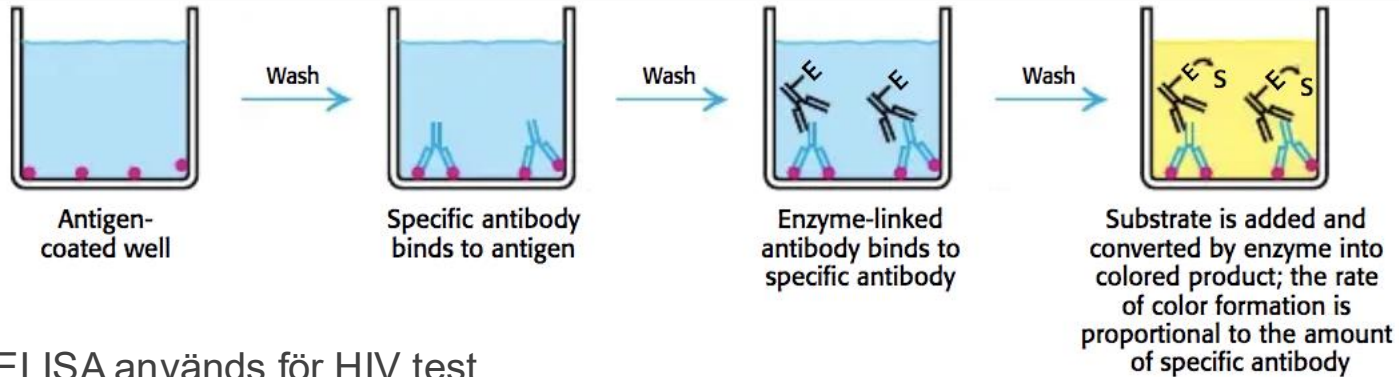
Berg et al. Biochemistry 10e, W.H. Freeman and Company.

Figur 4.15

ELISA

- ELISA eller enzyme-linked immunosorbent assay, kan användas för att kvantifiera protein (eller andra antigen) i ett prov.
- En antikropp länkas kovalent till ett enzym (enzym-antikropp). Detta enzym kan ge en färg vid tillsats av ett substrat.
- Om ett visst antigen finns i ett prov, kommer enzym-antikropp binda till antigenet. Vid tillsats av substrat kommer enzymet katalysera reaktionen och färg kommer uppkomma.
- **Två huvudtyper, indirekt och sandwich ELISA:**

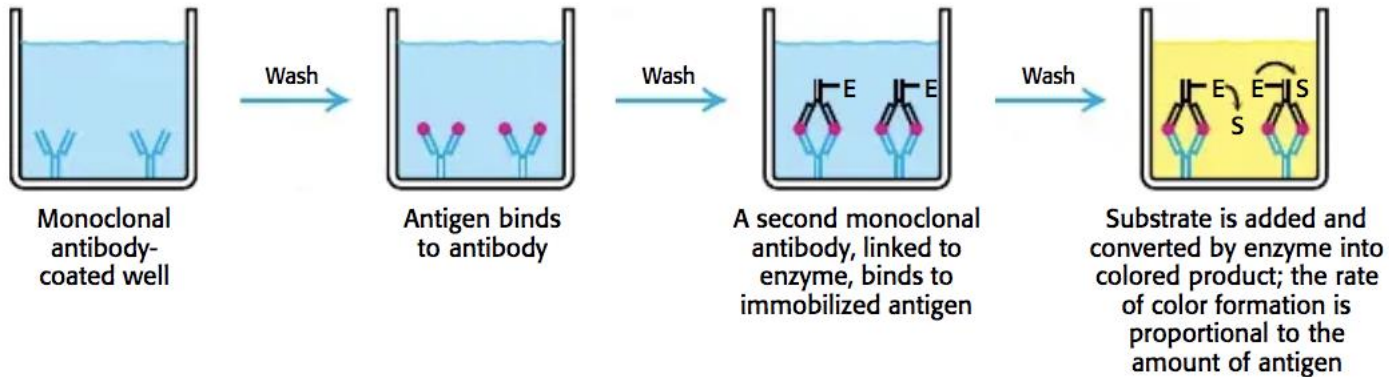
Indirekt ELISA



- Indirekt ELISA används för HIV test.
- Antigen (för HIV-viruset) fästs i en brunn.
- Om patienten har antikroppar för viruset, kommer dessa binda till antigenet i brunnen.
- En enzymbunden antikropp som känner igen den specifika antikroppen appliceras.
- Substrat adderas → om färg → personen bär på HIV antikroppar.

Sandwich ELISA

- Används för att detektera *antigen*, t.ex. för COVID-19.
- Antikroppar mot ett specifikt antigen sätts i en brunn.
- Prov (t.ex. urin eller blod) appliceras.
- En enzymbärande antikropp (som också binder antigenet) appliceras.
- Substrat adderas → om färg → antigen finns i provet.

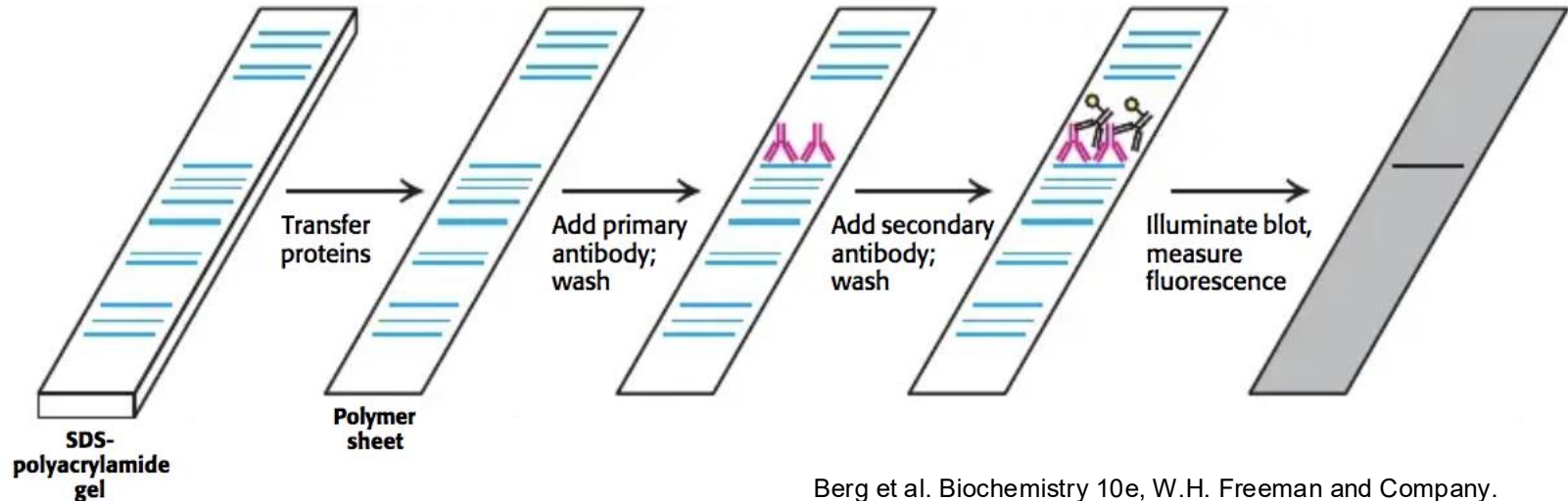


Berg et al. Biochemistry 10e, W.H. Freeman and Company.

Figur 4.17

Western blot

- Första steget är att köra en SDS-PAGE. Många band, vilket är specifikt för proteinet av intresse?
- Lösning: kör en WB genom att föra över proteiner till ett membran.
- Inkubera med primär antikropp.
- Inkubera med sekundär antikropp (som bär enzym eller fluorescens) → mät färgskifte.



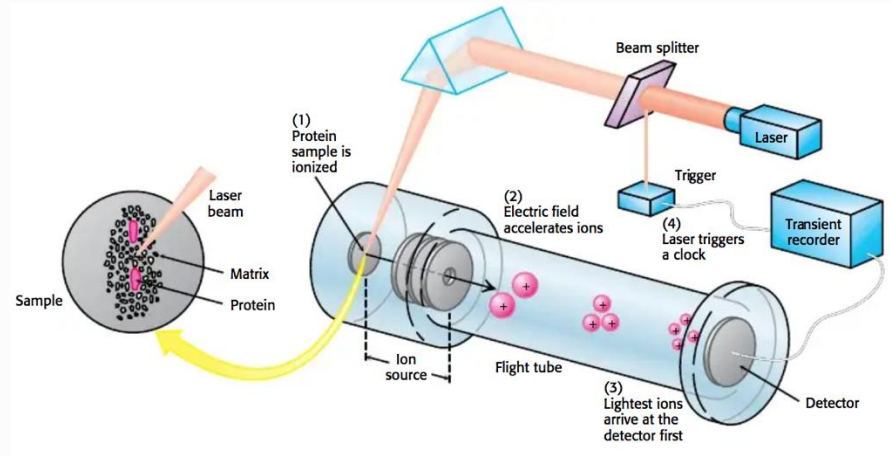
Berg et al. Biochemistry 10e, W.H. Freeman and Company.

Figur 4.18

Masspektrometri

Masspektrometri

- Används för att identifiera peptider och proteiner.
- Kan användas för att detektera posttranslationella modifieringar.
- Princip: proteiner sönderdelas i mindre delar, så kallade peptider.
- Dessa peptider joniseras.
- Och körs i en masspektrometer som kan bestämma peptidens massa.
- En vanlig metod är MALDI-TOF (matrix-assisted laser desorption/ionization – time of flight).

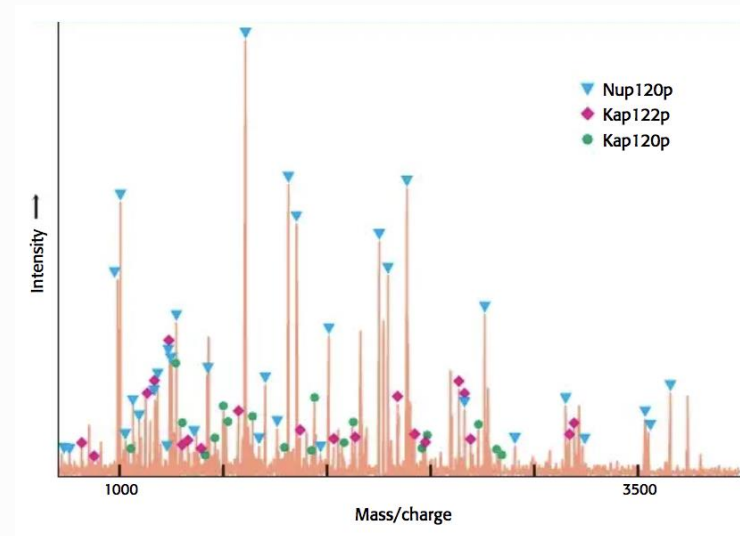


Berg et al. Biochemistry 10e, W.H. Freeman and Company.

Figur 4.23

Masspektrometri -användningsområden

- Kan användas för att sekvensera ett okänt protein.
- Kan användas för att verifiera att rätt protein renats fram.
- Posttranslationella modifieringar kan identifieras.
- Aminosyrasekvensen kan till exempel ge information om evolutionärt ursprung, identifiera medlemmar i ett stort proteinkomplex samt identifiera signalpeptider.



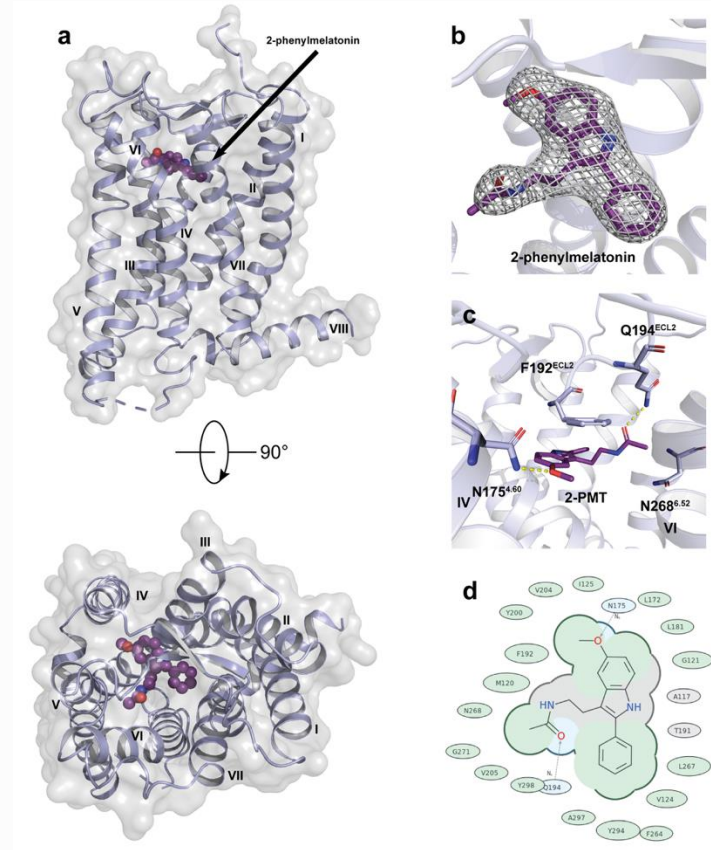
Berg et al. Biochemistry 10e, W.H. Freeman and Company.

Figur 4.30

Strukturbestämning av proteiner

Proteiners 3D-struktur

- Aminosyrasekvensen bestämmer proteinets 3D-struktur.
- MEN svårt att förutspå exakta 3D-strukturen hos ett protein även om man känner till aminosyrasekvensen.
- AI till stor hjälp! (AlphaFold)
- Strukturen måste dock ofta bestämmas experimentellt.
- Olika metoder för strukturbestämning.
- Struktur viktig för läkemedelsutveckling.
- Till höger visas strukturen av den humana melatonin MT₂ receptorn med bunden ligand.



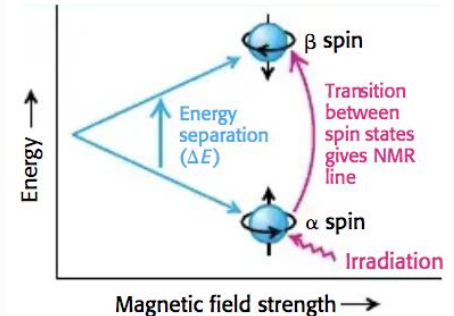
Johansson et al. Nature 569: 289-292

Nuclear Magnetic Resonance (NMR)

- Teknik som baseras på att visa atomkärnor är magnetiska.
- Endast ett fåtal isotoper har denna egenskap.
- Om man tillför en elektromagnetisk puls kan en proton gå från lågenergi alfa-stadium till högenergi beta. Detta ger upphov till resonans.
- Protonens omgivning → influerar resonans.
- Kan därför användas för att undersöka en protonens omgivning.

TABLE 3.4 Biologically important nuclei giving NMR signals

Nucleus	Natural abundance (% by weight of the element)
^1H	99.984
^2H	0.016
^{13}C	1.108
^{14}N	99.635
^{15}N	0.365
^{17}O	0.037
^{23}Na	100.0
^{25}Mg	10.05
^{31}P	100.0
^{35}Cl	75.4
^{39}K	93.1

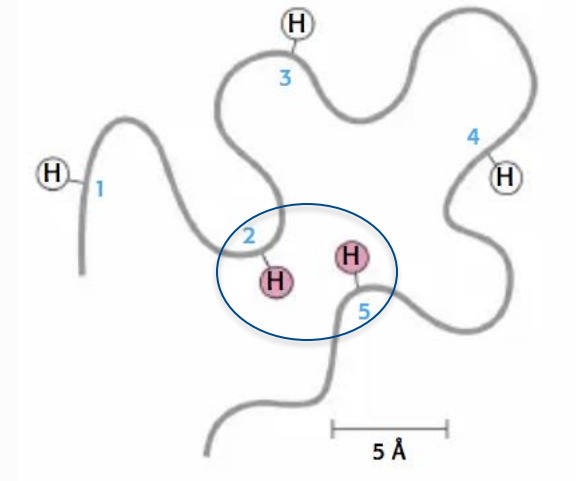


Berg et al. Biochemistry 10e, W.H. Freeman and Company.

Figur 4.38, tabell 4.4

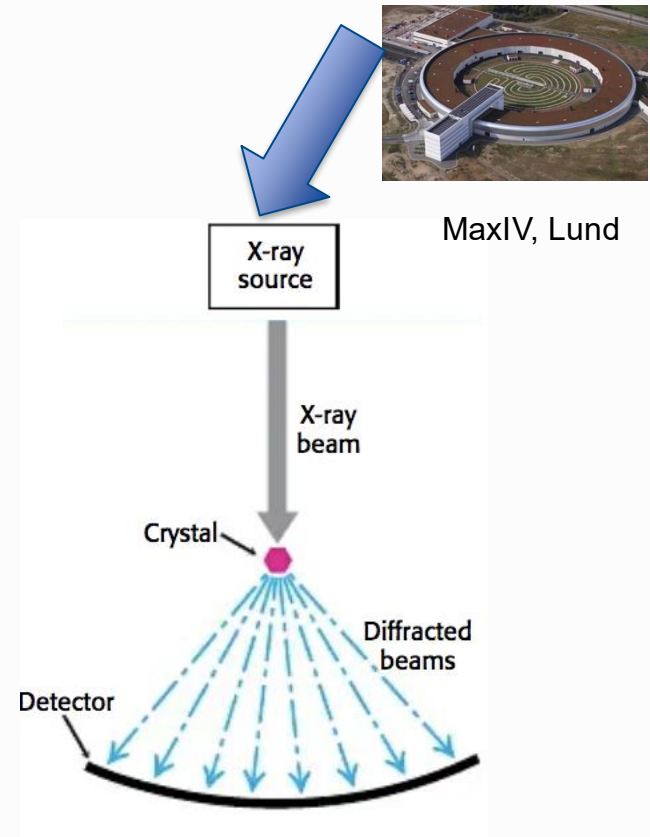
Nuclear Magnetic Resonance (NMR)

- En-dimensionell NMR: undersöker omgivningen hos en proton åt gången. Används ofta för att undersöka veckning hos proteinet.
- NOESY: en typ av metod för att undersöka proton-par som är nära varandra avståndsmässigt (dvs strukturmässigt).
- Avståndet behöver vara mindre än 5Å för NOESY.
- 3D-strukturen beräknas sedan, men flera möjligheter existerar → en ensemble av strukturer.
- Nackdelar: proteinet måste vara mindre än 50 kDa.



Röntgenkristallografi

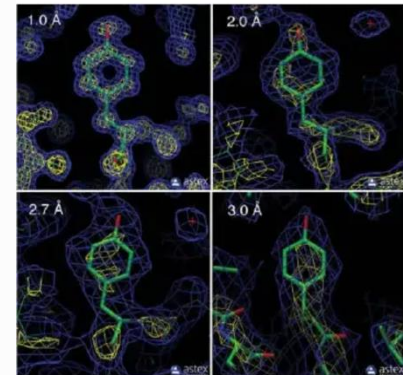
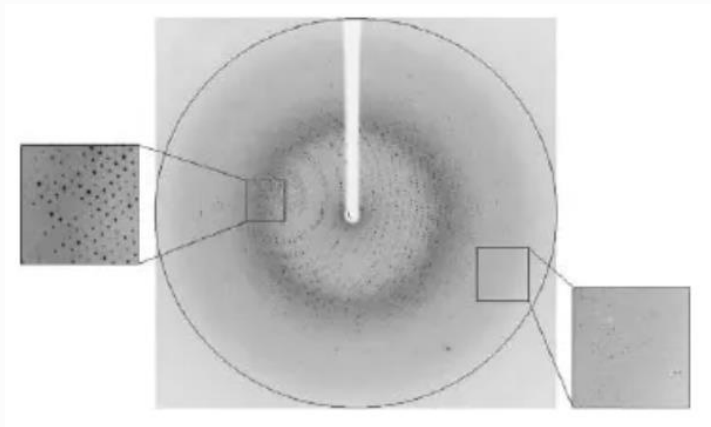
- Proteinet *kristalliseras* (ofta tidskrävande process).
- Kristall behövs för att signalen från enskilda proteinmolekyler är för låg.
- Proteinkristallen exponeras för röntgenstrålning.
- Arrangemanget av atomer i kristallen bestämmer hur röntgenstrålningen sprids.
- Detta fångas upp av en detektor.



MaxIV, Lund

Röntgenkristallografi

- Det mönster som fås kallas diffraktionsmönster.
- Många sådana mönster samlas från kristallen (från olika vinklar).
- Med matematik kan man räkna fram en 3D elektrondensitetskarta och passa in aminosyror i denna. Ju högre *upplösning*, desto fler detaljer kan urskiljas.

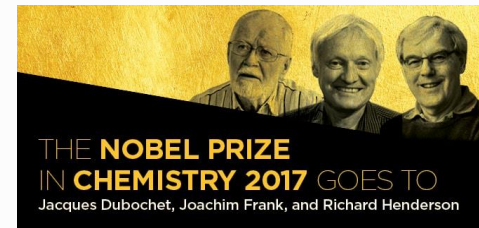


Berg et al. Biochemistry 10e, W.H. Freeman and Company.

Figur 4.35 och 4.36

Kryo-Elektronmikroskopi (kryo-EM)

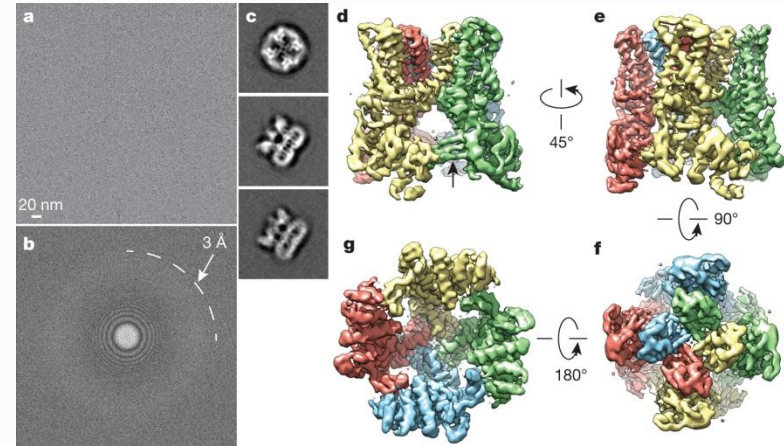
- Mikroskop-baserad metod (dvs direkt visualisering av strukturen).
- Enskilda proteinmolekyler kan studeras (så kallat "single particle").
- Inga specifika egenskaper hos proteinet behövs (inga kristaller, inga specifika isotoper).
- Mycket snabb metodutveckling de senaste 5-10 åren har lett till att detta är den dominerade metoden för strukturbestämning.
- Storlek på proteinet avgör upplösningen. Proteiner med låg massa har länge varit problematiska, men metodutveckling t.ex. antikroppar som ökar massan har möjliggjort strukturbestämning av mycket små proteiner.
- Nobelpris 2017 (Dubochet, Frank, Henderson).



Nobelprize.org

Kryo-Elektronmikroskopi (kryo-EM)

- Framrenat protein av god kvalitet fryses på ett grid (ett rutmönstrat metallnät), i flytande helium.
- Grid placeras i ett transmissionselektronmikroskop under vakuum och exponeras för en elektronstråle.
- De proteinmolekyler som interagerar med elektronstrålen producerar en 2D bild på detektorn.
- Flera bilder, i olika vinklar, samlas och en 3D bild av strukturen kan sedan skapas.



TRPV1 strukturen från David Julius laboratorium (Nobelpris i Medicin 2021).

Liao et al. Nature 504:107-122

