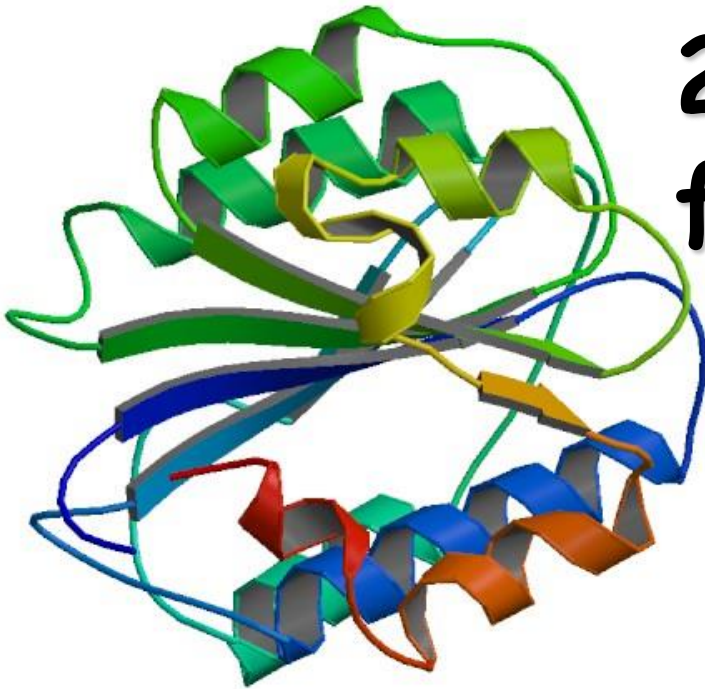


Biochemie

2. 2 Struktura a funkce proteinů



http://www.wikiskripta.eu/index.php/Soubor:PBB_Protein_VWF_image.jpg

Proteiny – klíčové vlastnosti- široký rozsah funkcí

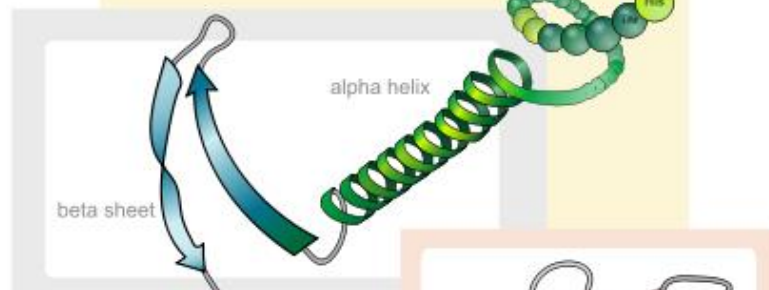
1. Proteiny jsou lineární polymery sestavené z monomerních jednotek aminokyselin - spontánně složeny do prostorových struktur
2. Proteiny obsahují velké množství funkčních skupin- **alkoholy, thioly, thioethery, karboxylové kyseliny, karboamidy**, a další základní skupiny - např. chemická reaktivita nezbytná pro funkci *proteinů*
3. Proteiny mohou interagovat spolu navzájem, s dalšími biologickými makromolekulami za vzniku komplexních struktur
4. Některé proteiny jsou rigidní, zatímco ostatní vykazují určitou flexibilitu- strukturální elementy v cytoskeletu

Funkce proteinů

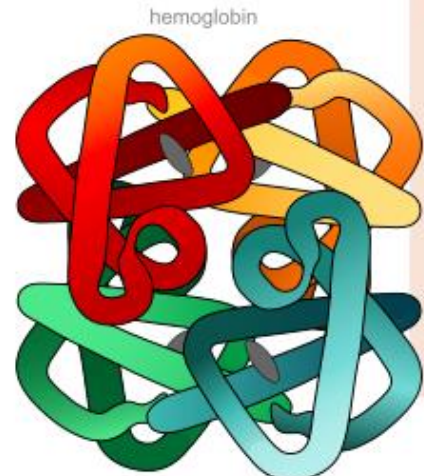
- **1) Katalýza** - Enzymy (proteiny, které řídí a urychlují 1000 biochem. reakcí, mírné podmínky, teplota)
- **2) Struktura** (strukturní materiály, poskytují ochranu a podporu, specifické vlastnosti - kolagen, elastin, fibroin)
- **3) Pohyb** (všechny typy pohybu v buňce, aktin, tubulin, další cytoskeletární proteiny)
- **4) Obrana** (protektce, keratocyty v kůži, proteiny krevní srážlivosti-fibrinogen, trombin; imunoglobuliny)
- **5) Regulace** (hormony inzulin, glukagon, růstový hormon)
- **6) Transport** (nosiče molekul nebo iontů přes membránu, Na⁺K⁺ATPáza, glukózový přenašeč, hemoglobin, lipoproteiny)

TEST

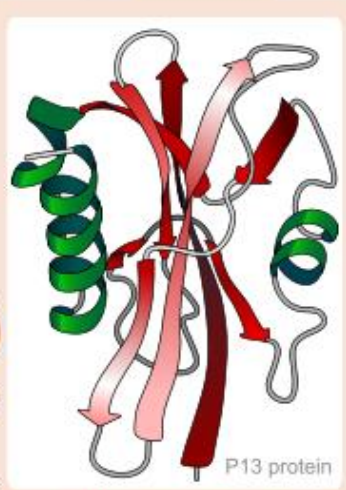
Primary structure
amino acid sequence



Secondary structure
regular sub-structures



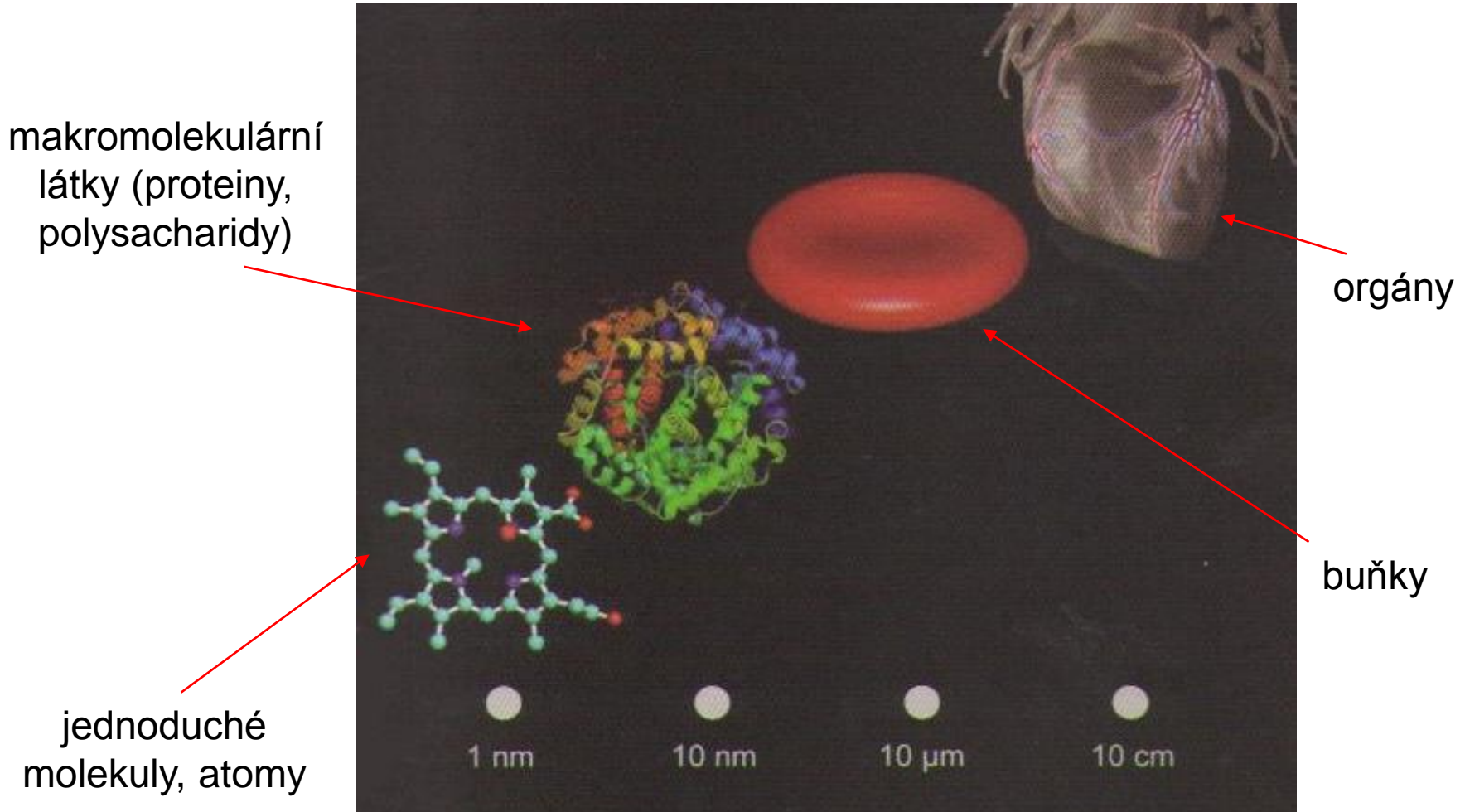
Quaternary structure
complex of protein molecules



Tertiary structure
three-dimensional structure

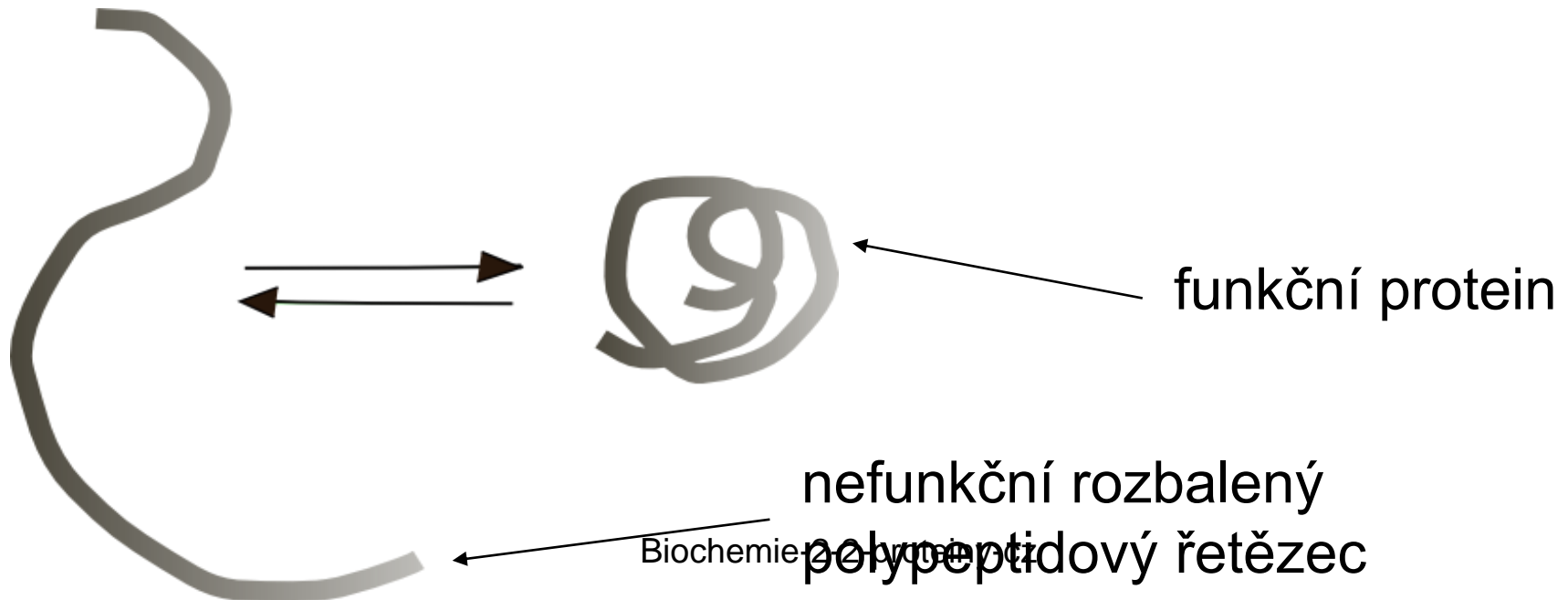
http://en.wikipedia.org/wiki/Protein_structure#mediaviewer/File:Main_protein_structure_levels_en.svg

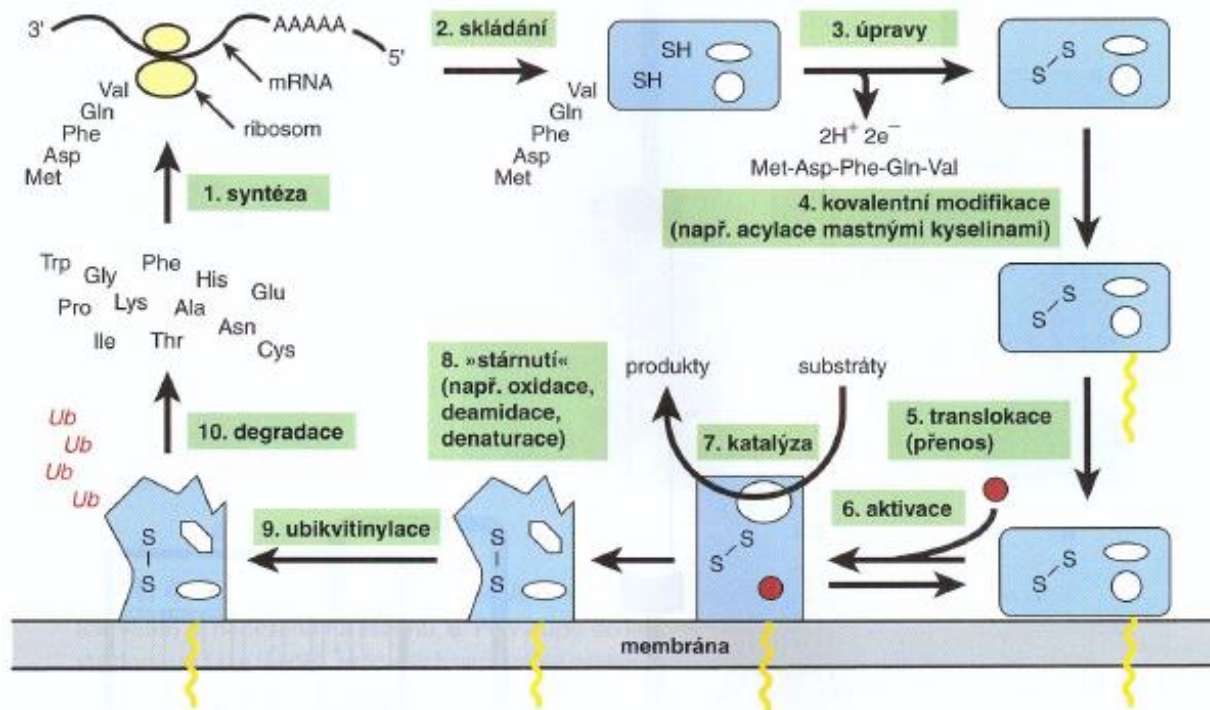
Úrovně popisu organismu – velikost proteinů



Proteiny – nativní konformace

- proteiny jsou molekuly s velmi složitou strukturou
- po syntéze polypeptidu, se řetězec skládá do své **přirozené (nativní) konformace - trojrozměrná struktura s nejnižší energií**
- stav, kdy může protein plnit svojí biologickou funkci



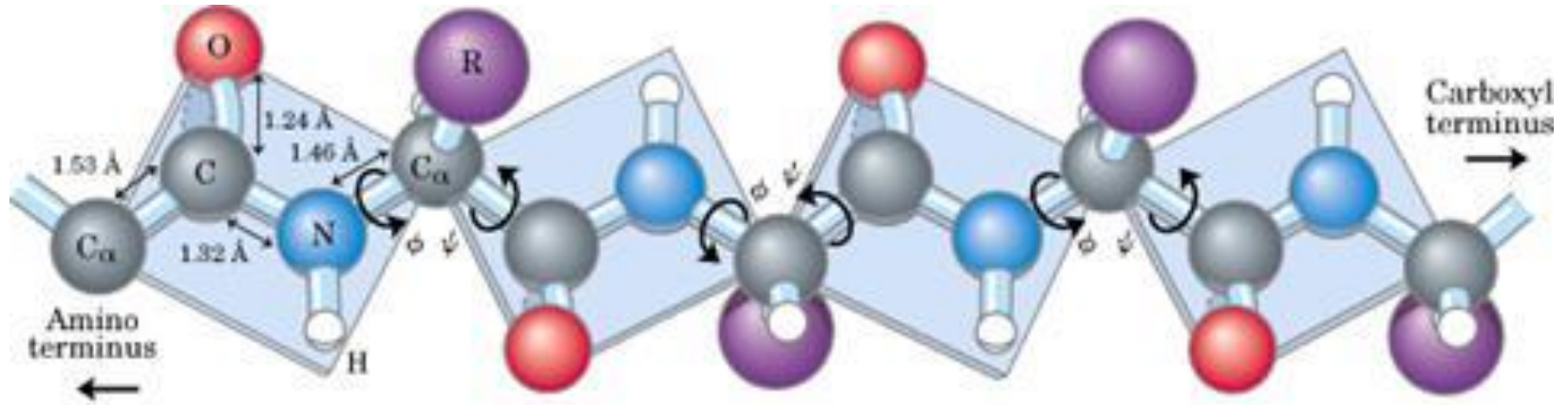


OBR. 4-1. Schematické znázornění životního cyklu hypotetického proteinu. **(1)** Životní cyklus začíná syntézou polypeptidového řetězce na rybosomu. Jeho primární struktura je předurčena mRNA. **(2)** Jak pokračuje syntéza, protein se začíná skládat do své nativní konformace (modře). **(3)** Skládání může být provázeno úpravami, jako je proteolytické štěpení od N-terminální vedoucí sekvence (Met-Asp-Phe-Gln-Val), nebo tvorbou disulfidových můstků (S-S). **(4)** Postupnými kovalentními modifikacemi může být například připojena molekula mastné kyseliny (žlutě) pro **(5)** translokaci modifikovaného proteinu do membrány. **(6)** Vazba allosterického efektoru (červeně) může spustit změnu do katalyticky aktivní konformace. **(7)** Postupem času je protein poškozován chemickými atakami, deaminací, denaturací a **(8)** může být označen kovalentním připojením několika ubikvitinovými molekulami (Ub). **(9)** Ubikvitinylovaný protein je postupně degradován na jeho základní komponenty – aminokyseliny, které se tak stanou dostupnými pro syntézu nových proteinů.

1) Primární struktura

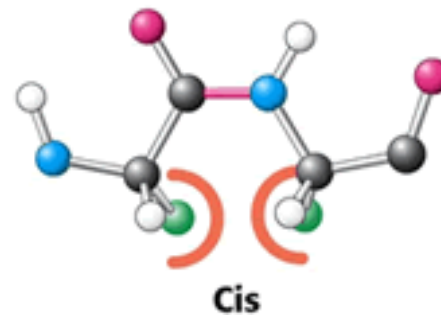
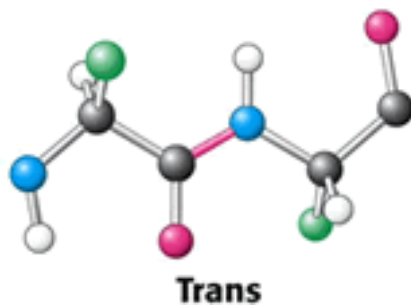
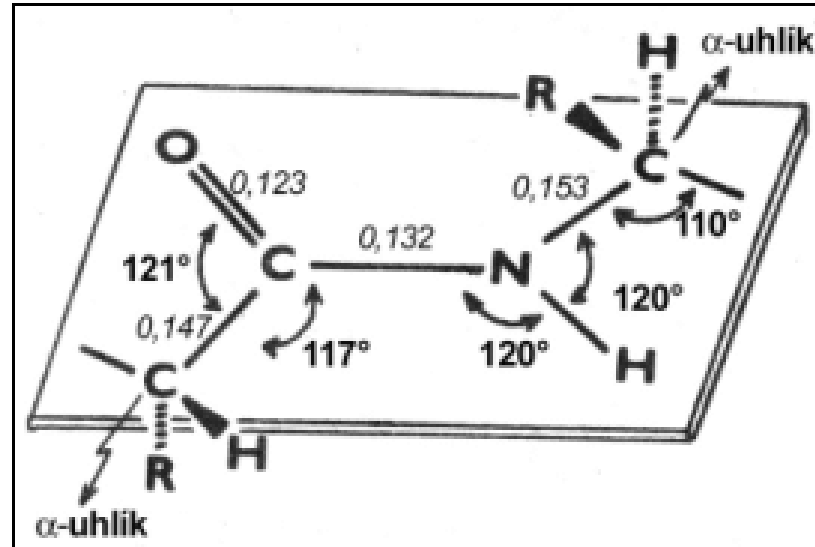
- pořadí (sekvence) aminokyselin
- **polypeptidový řetězec, ve kterém jsou aminokyseliny spojeny peptidovou (kovalentní) vazbou**
- primární struktura proteinů je přímý obraz genetické informace
- ***základní řetězec, pořadí a typy aminokyselin určují, jak bude protein prostorově uspořádán***
(např. hydrofobní postranní řetězce aminokyselin se shlukují uvnitř proteinů, aby se nedostaly do styku s vodou)
- záměna jen jedné aminokyseliny může způsobit nefunkčnost proteinu (př. srpkovitá anemie)

Primární struktura



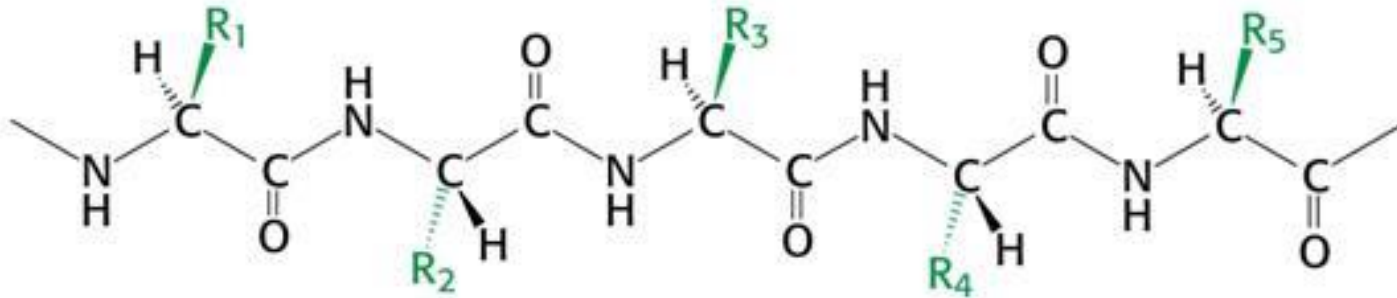
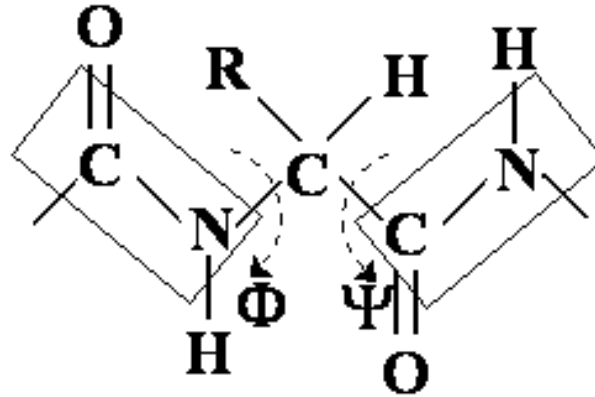
http://orion.chemi.muni.cz/e_learning/=Texty/04-Peptidy/04-Peptidy_soubory/image019.jpg

Peptidová vazba – trans konfigurace



<http://oldweb.izip.cz/ds3/hypertext/AJDOB.htm>
http://orion.chemi.muni.cz/e_learning/=Texty/04-

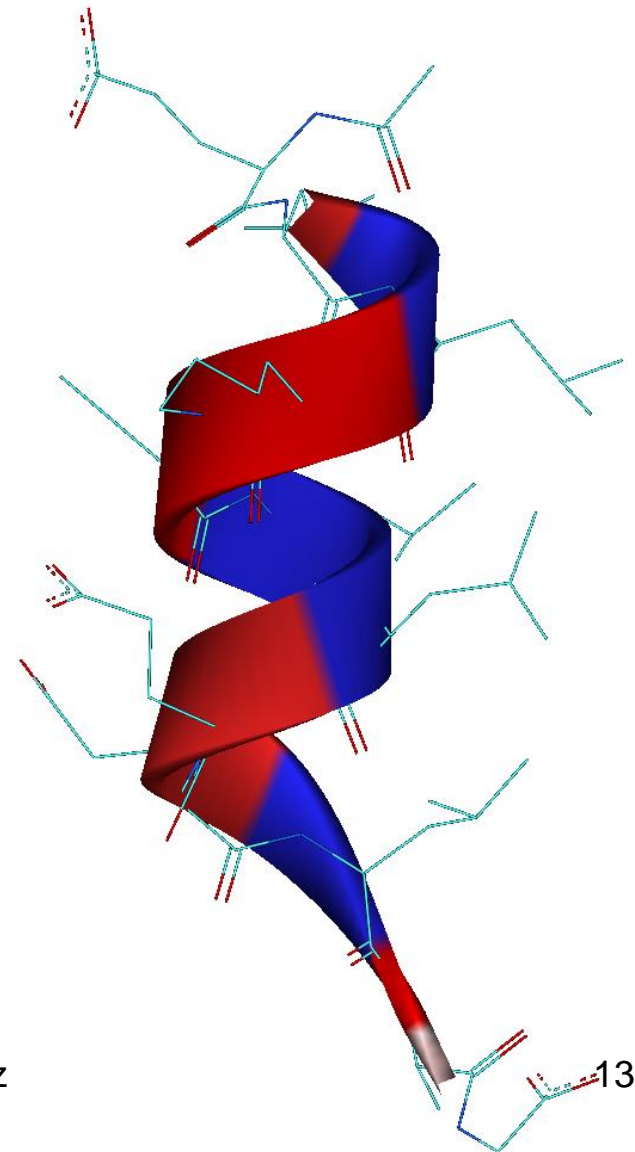
Peptidové vazba ležící v rovině zaujímají torzní úhel



http://orion.chemi.muni.cz/e_learning/=Texty/04-Peptidy/04-Peptidy.htm

2) Sekundární struktura

- polypeptidové řetězce se skládají do několika strukturních prvků
- dva základní jsou: α -helix (šroubovice) a β -skládaný list, ale existují i další
- sekundární strukturu stabilizují *H-můstky* (vodíkové vazby)



Sekundární struktura proteinů

- Vyjadřuje místní konformaci některých částí polypeptidového řetězce

Typy:

- α helix
- β skládaný list
- β smyčka
- **Vodíková vazba**
- mezi karbonylovou skupinou a N-H v polypeptidu



Linus Pauling, 1901–1994

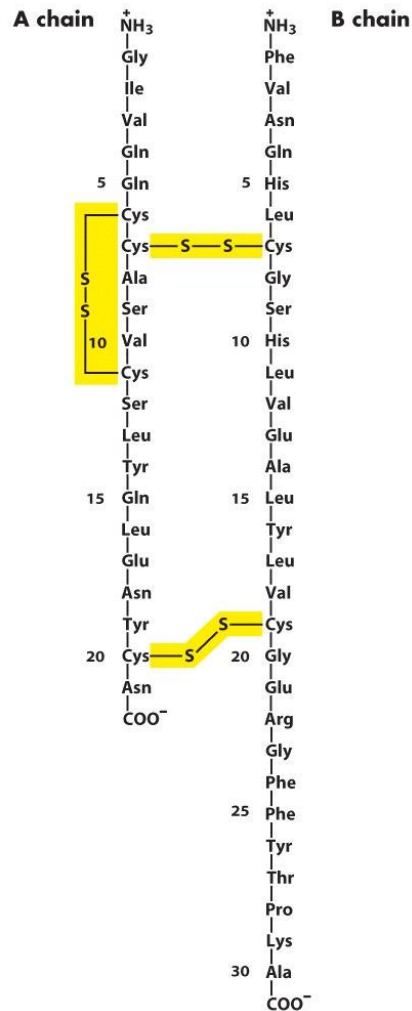


Robert Corey, 1897–1971

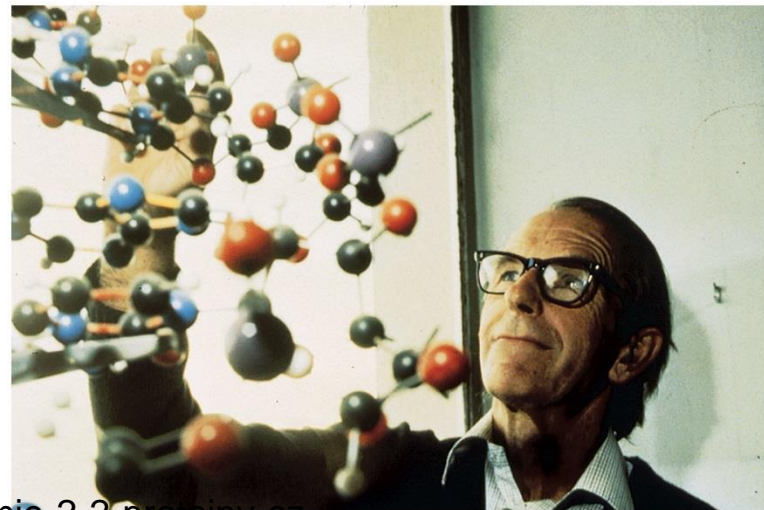
Pauling and Corey

Předpověděli existenci těch sekundárních struktur v roce 1951, několik let před tím než byla objasněna struktura prvního proteinu

Primární struktura hovězího insulínu



First protein to be fully sequenced (by Fred Sanger in 1953). For this, he won his first Nobel Prize (his second was for the Sanger dideoxy method of DNA sequencing).

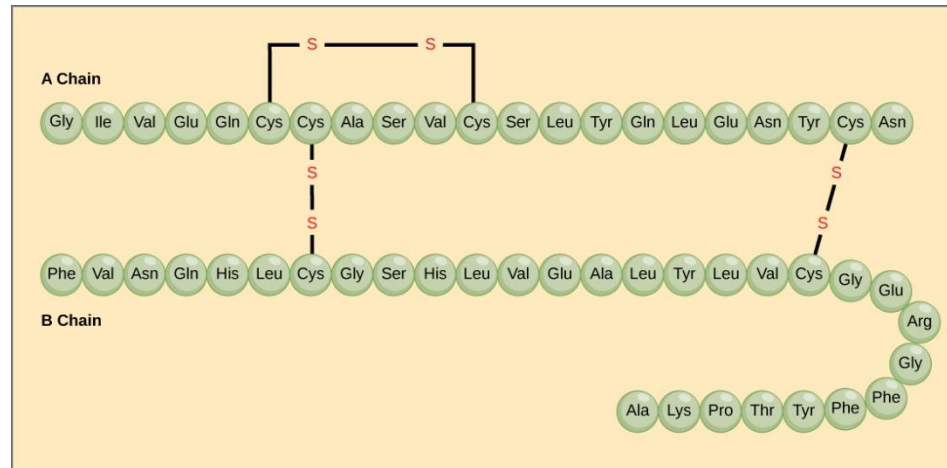


Bovinní insulin: AMK sekvence

1953, Fred Sanger stanovil sekvenci inzulinu, mezník!

Ukázáno vůbec poprvé, že protein má přesně definovanou sekvenci
Také dokázáno, že jsou přítomny pouze L-aminokyseliny spojené
peptidickou vazbou

Nyní je známa AMK sekvence > 100,000 proteinů

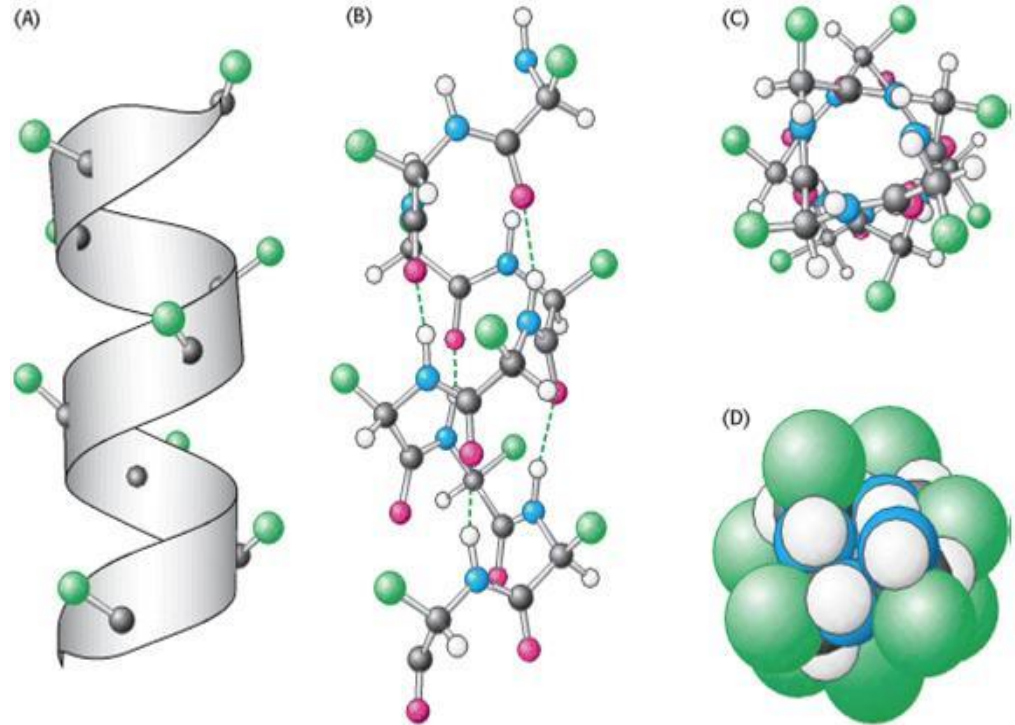


1950-1960 léta: studie rovněž dokázaly genetické ovlivnění
sekvence

Každá z 20 AMK je kódována jednou nebo více specifickými
sekvencemi 3 nukleotidů.

α - helix

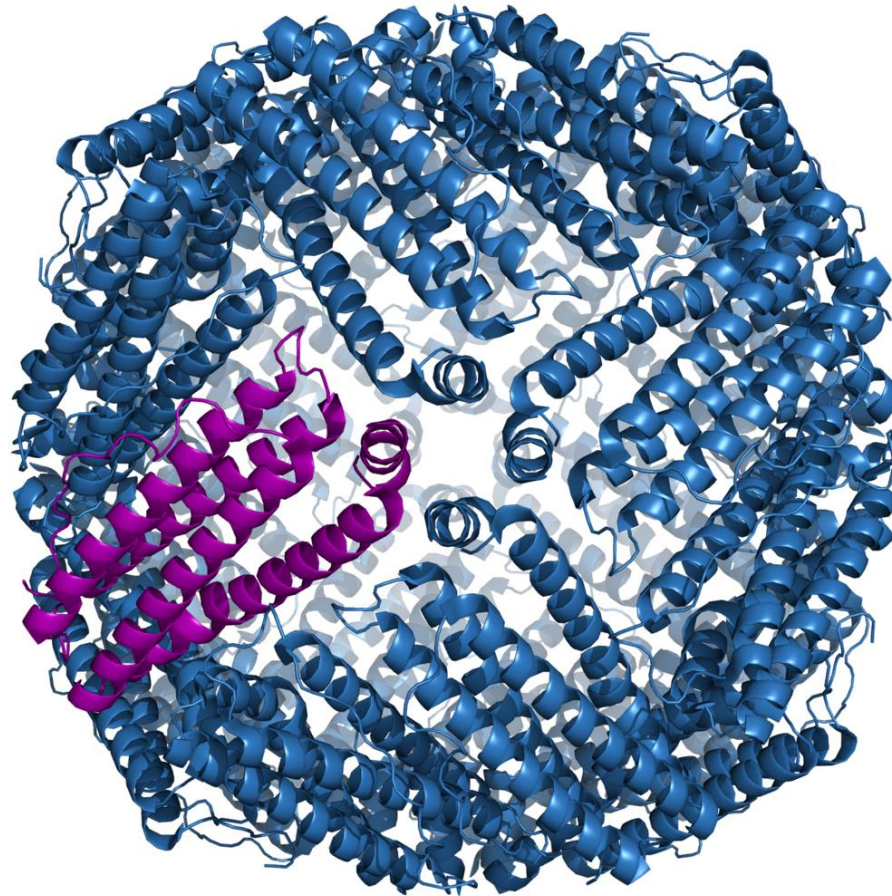
- Rigidní vláknitá struktura,
- pravotočivá spirálovitá konformace
- 3.6 AMK na jednu otočku
- Vodíkové vazby mezi N-H skupinou každé AMK a CO skupinou vzdálenou o 4 AMK
- **kolagen** –prolin – levotočivá helix
- Nabité AMK a Try jsou inkompatibilní s α - helix



<http://biochemistrycourse.blogspot.cz/2011/05/secondary-structure-of-proteins.html>

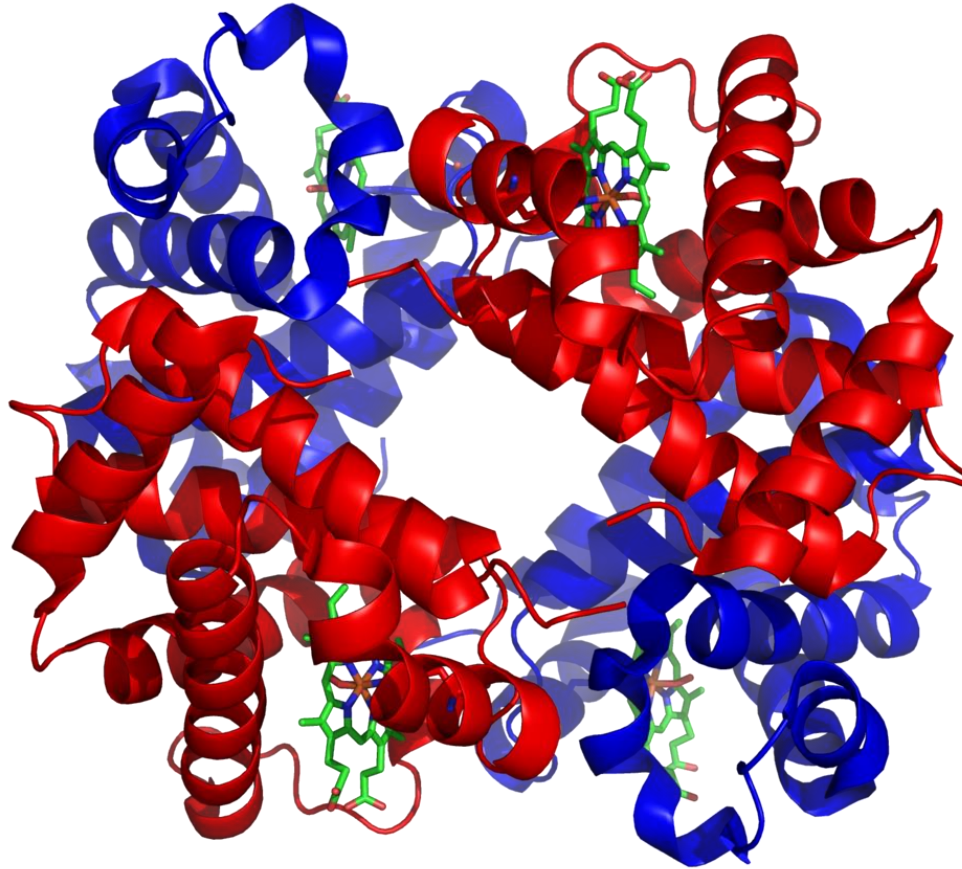
Ferritin, zásobní forma železa

75% α helix



<http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/6/67/Ferritin.png/1024px-Ferritin.png>

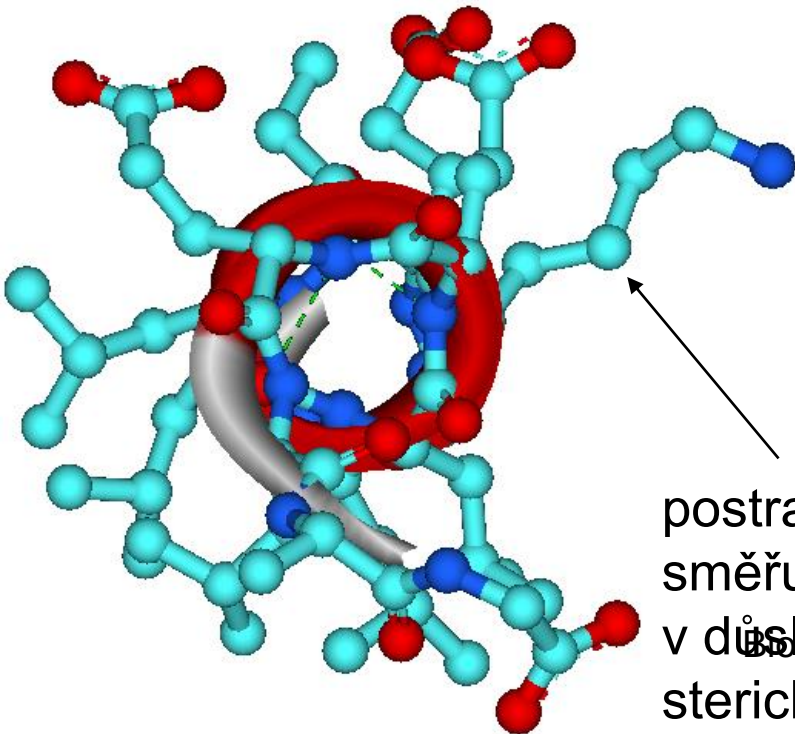
α – helix v hemoglobinu



http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/b/3/3d/1GZX_Haemoglobin.png/1024px-1GZX_Haemoglobin.png

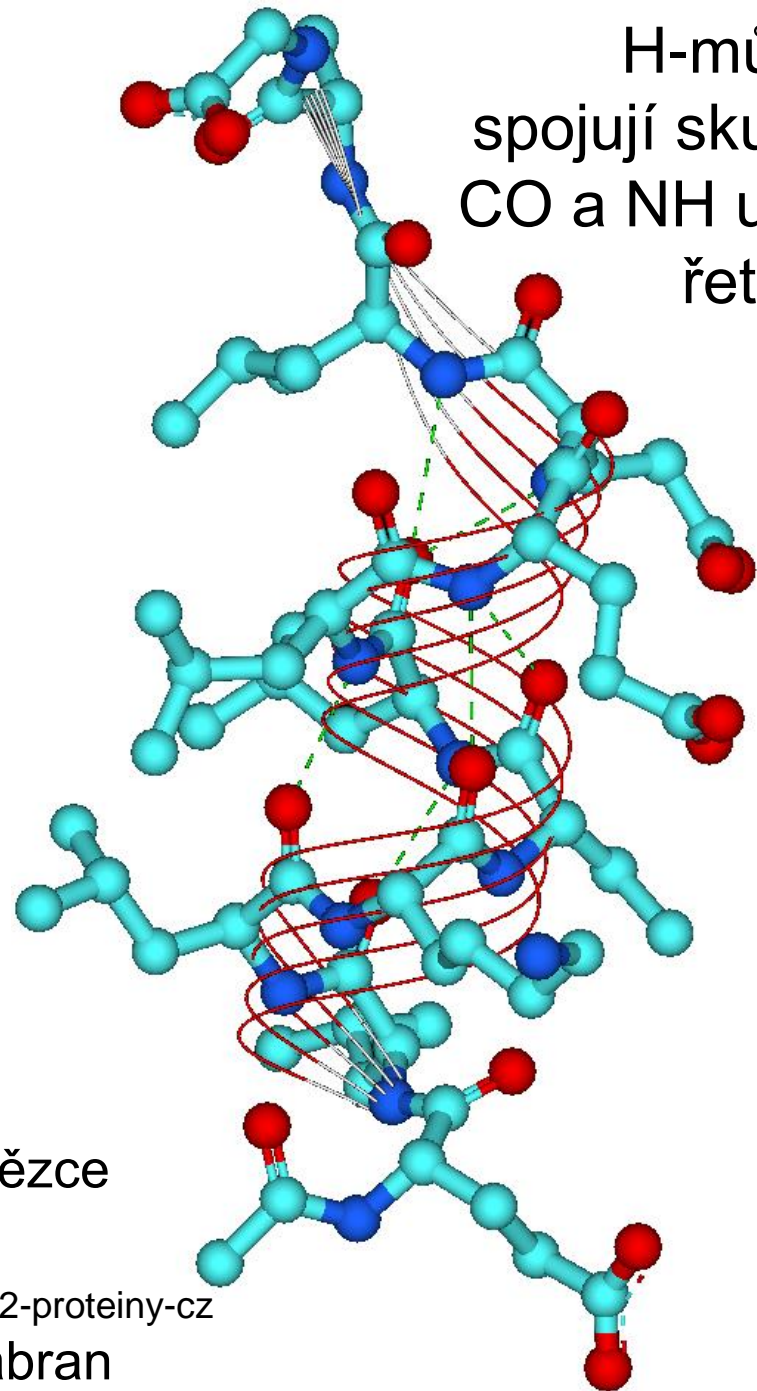
α -helix

v proteinech pravotočivá
šroubovice



postranní řetězce
směřují ven,
v důsledku
sterických zábran

H-můstky
spojují skupiny
CO a NH uvnitř
řetězce

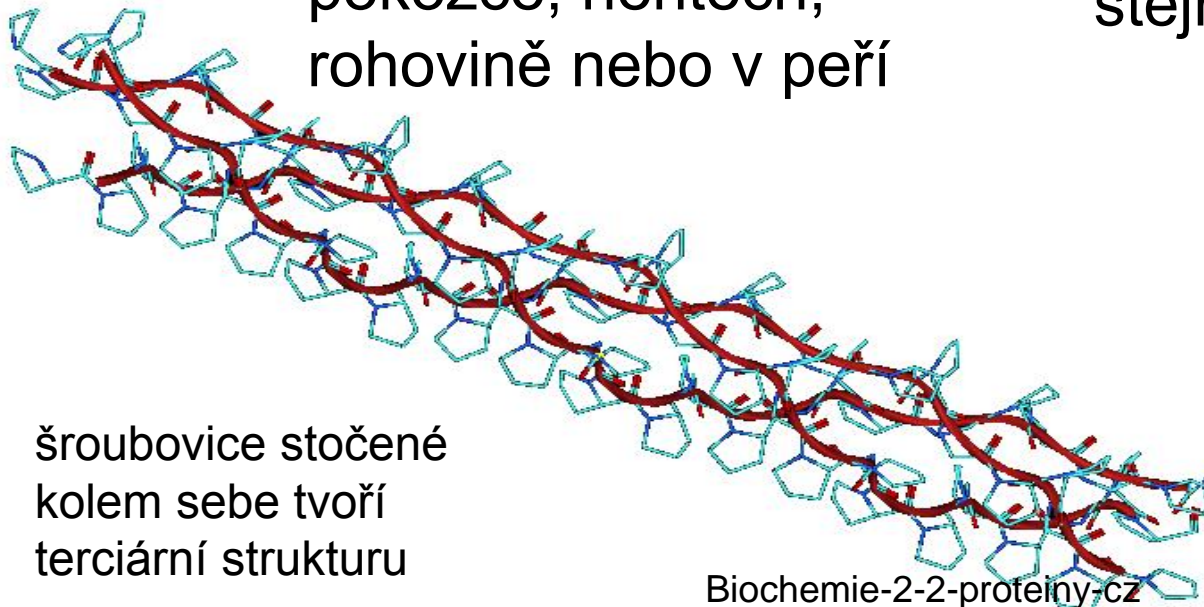


Keratin a kolagen

tyto dva proteiny jsou složeny ze šroubovic, které se ještě stáčíjí kolem sebe a tvoří pevná vlákna

keratin se vyskytuje např. ve vlasech, v pokožce, nehtech, rohovině nebo v peří

kolagen – protein kostí, zubů a šlach, v tahu je pevný stejně jako ocel



Super helix: alfa helikálně svinutá α - helix

Může být dlouhá až 1000 Å, velmi stabilní

Helikální struktura v těchto proteinech zastává mechanickou roli,
Tvoří pevné svazky vláken

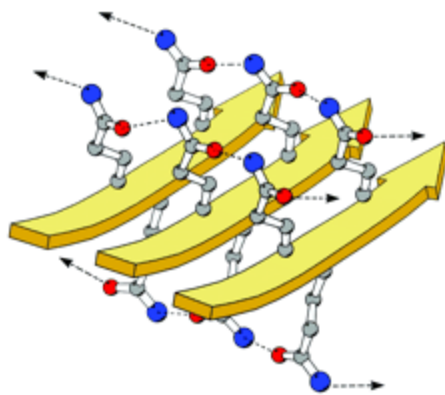


Figure 2.38
Biochemistry, Seventh Edition
© 2012 W. H. Freeman and Company

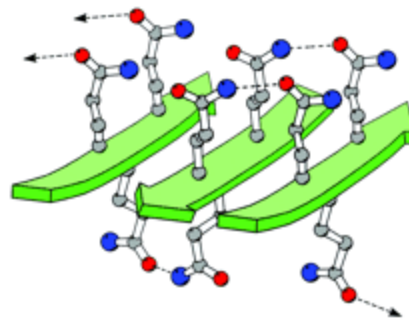
- Výskyt:
- **myosin** a tropomyosin ve svalech,
 - **fibrin** v krevních sraženinách,
 - **keratin** ve vlasech, ostnech, drápech, kopytech, rozích
 - intermediární filamenta (**cytoskelet**)

β – skládaný list

- Dva a více polypeptidových řetězců seřazené vedle sebe
- Každý řetězec je plně prodloužený
- Vodíkové vazby mezi polypeptidovými N-H and CO skupin sousedních řetězců
- Paralelní (stejný směr)
- Antiparalelní (opačný směr)



parallel

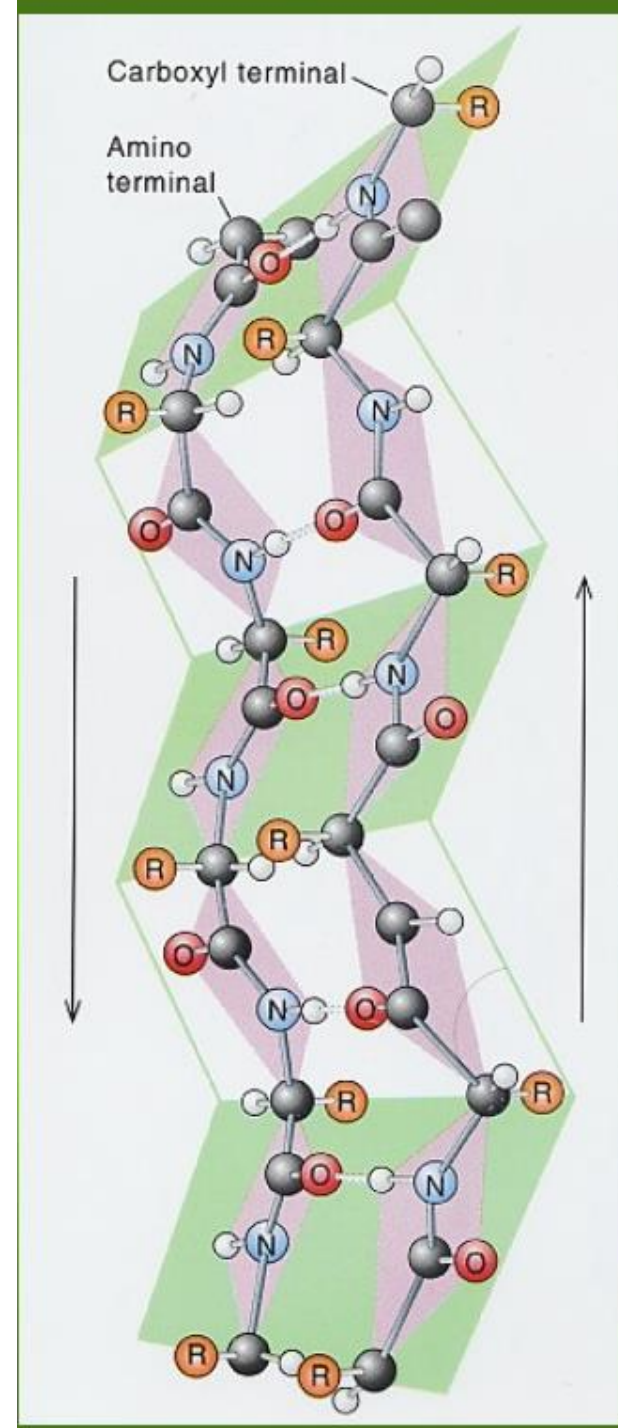


antiparallel

<http://biology.kenyon.edu/courses/biol63/dna-prot/dna-prot.htm>

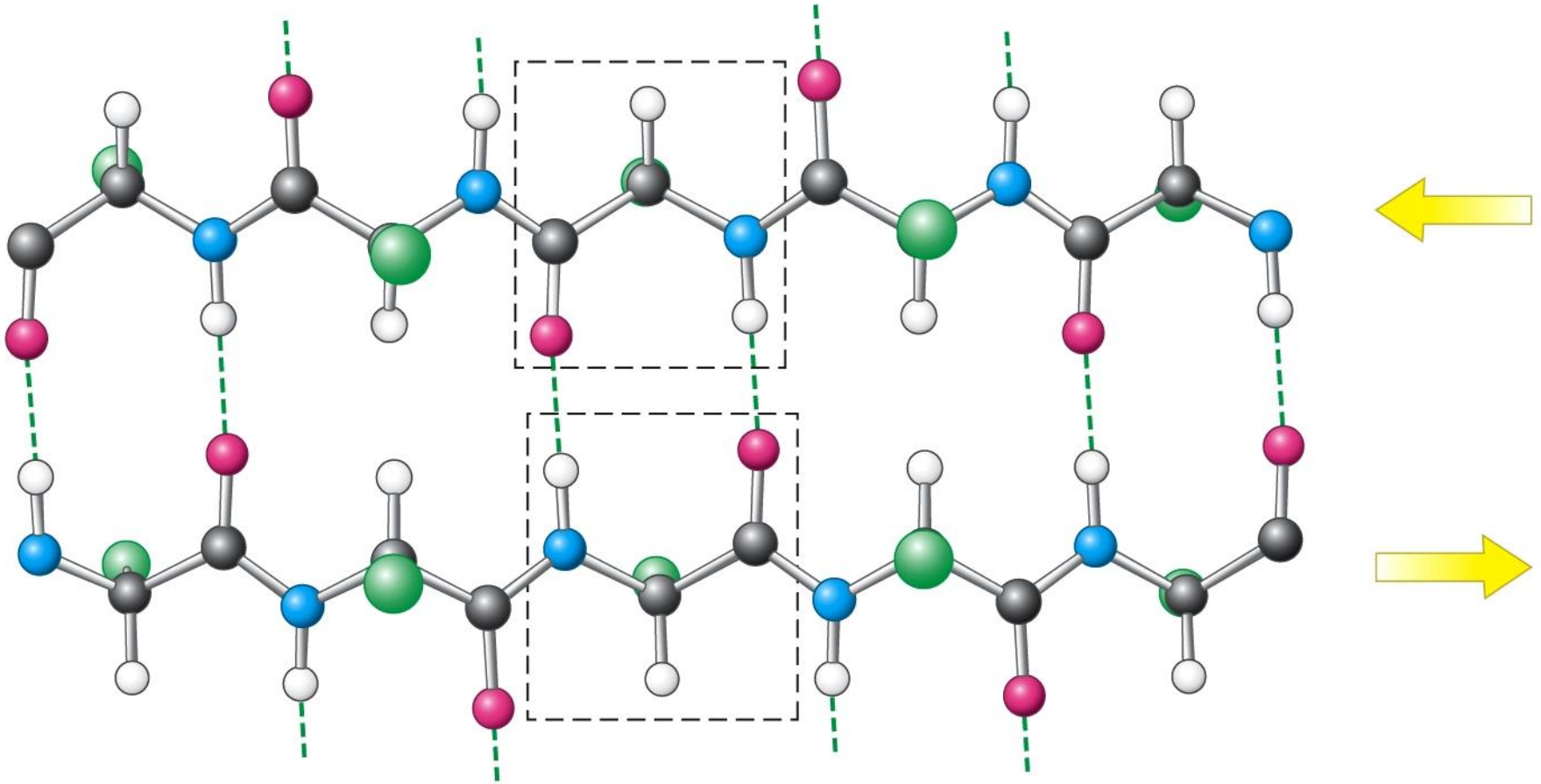
<http://www.pnas.org/content/98/21/11955/F6.large.jpg>

!-proteiny-cz



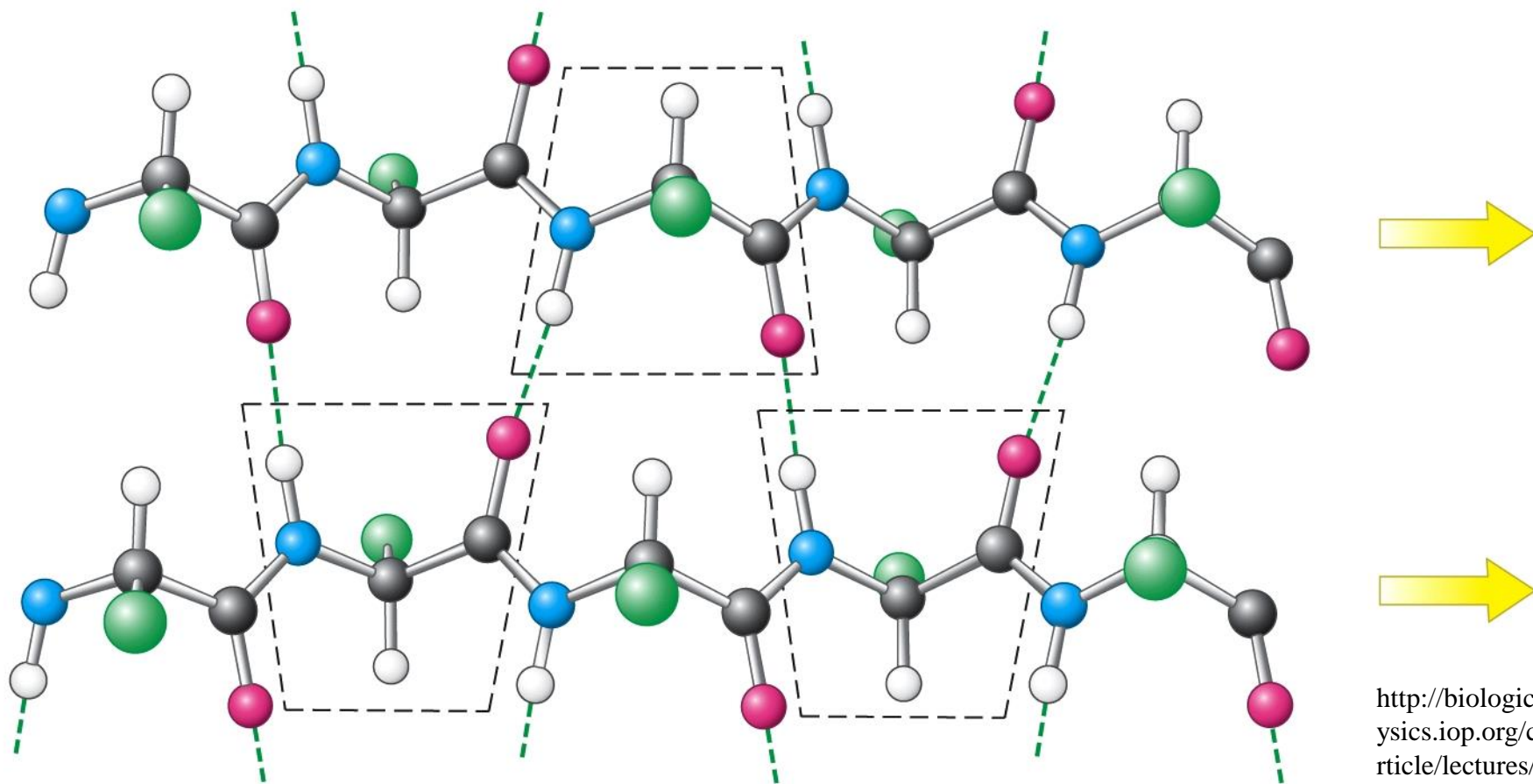
Antiparalelní beta list

Řetězce spojené H – můstky mezi protějšími aminokyselinami

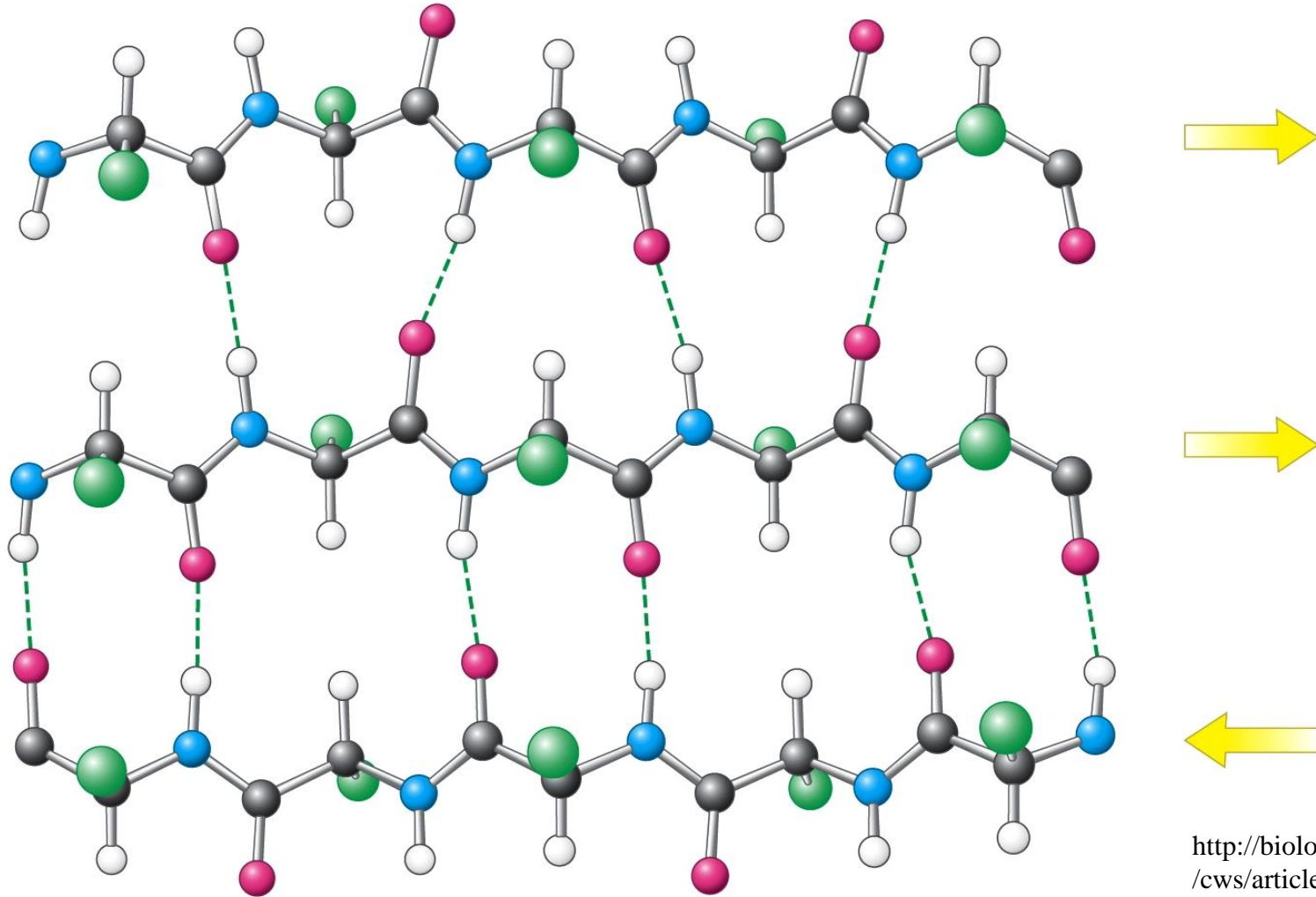


Paralelní beta list

Řetězce spojené H – můstky mezi AMK jednoho řetězce a dvěma různými AMK sousedního řetězce



Struktura smíšeného beta listu

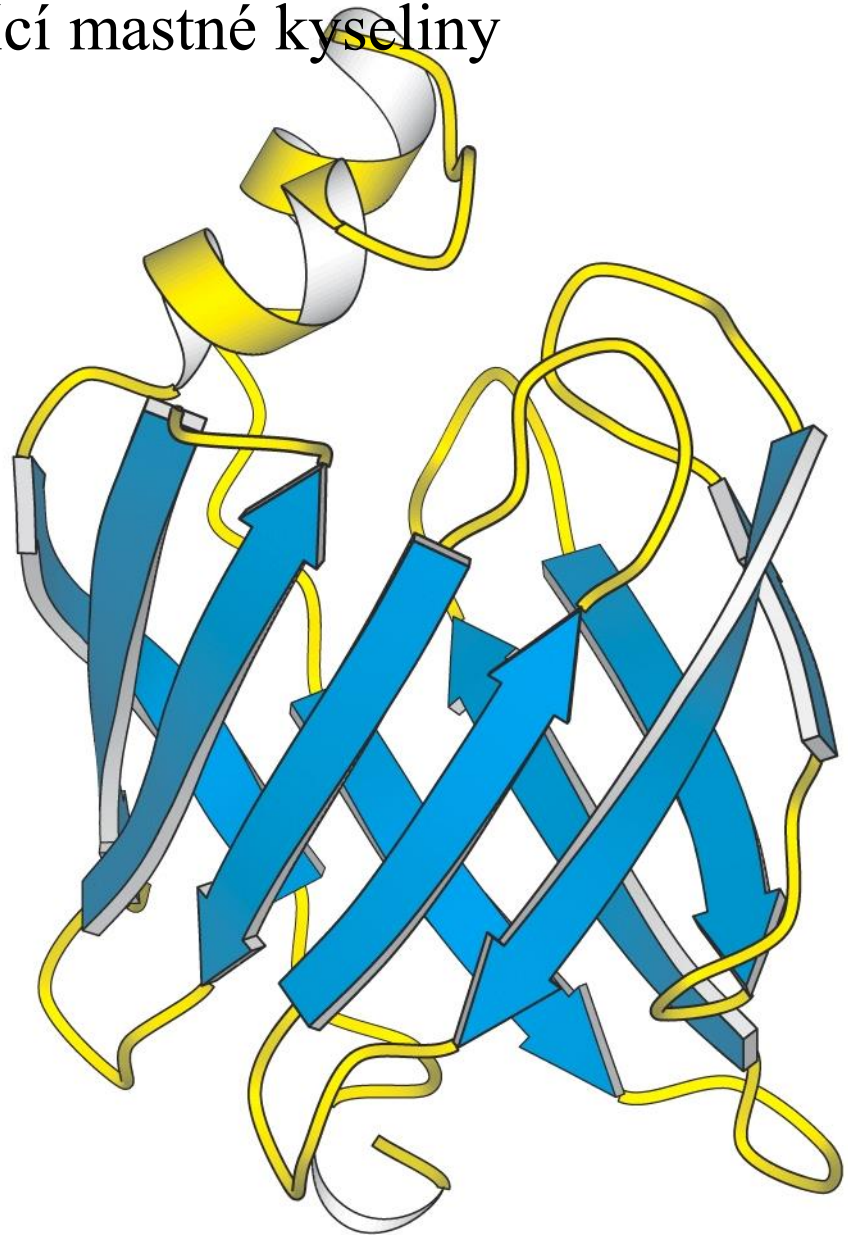


<http://biologicalphysics.iop.org/cws/article/lectures/46259>

Protein vázající mastné kyseliny

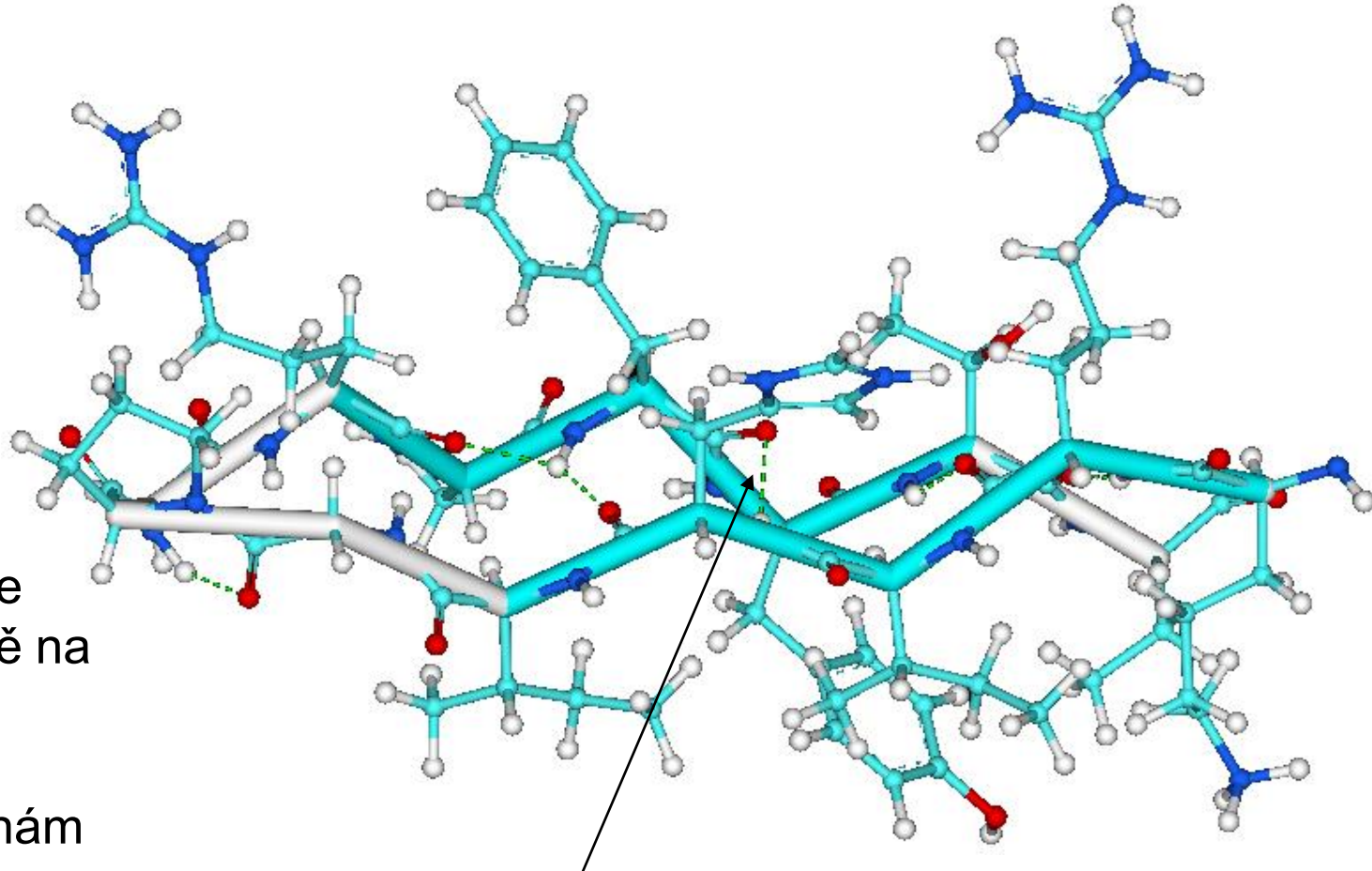
Bohatý na beta listy

Šipky směřují k
C- konci řetězce



<http://quizlet.com/15083412/biochem-lecture-7-flash-cards/>

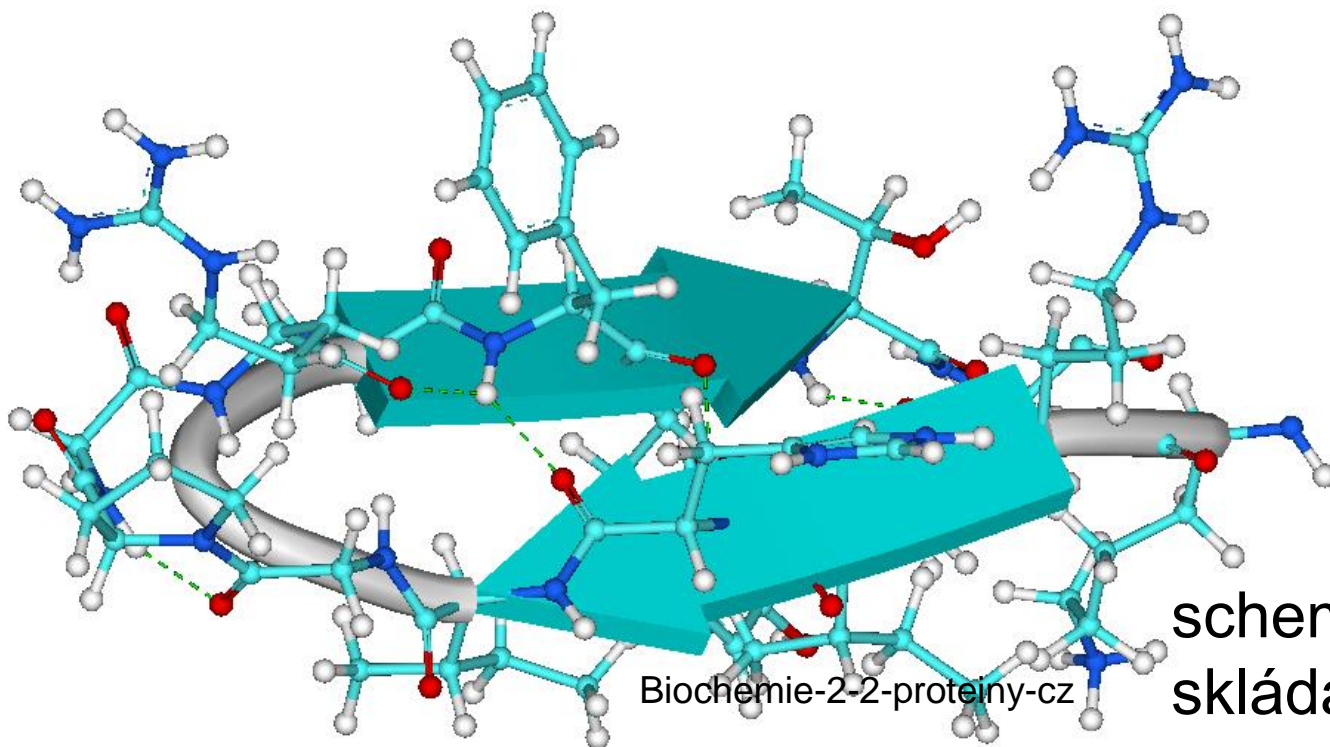
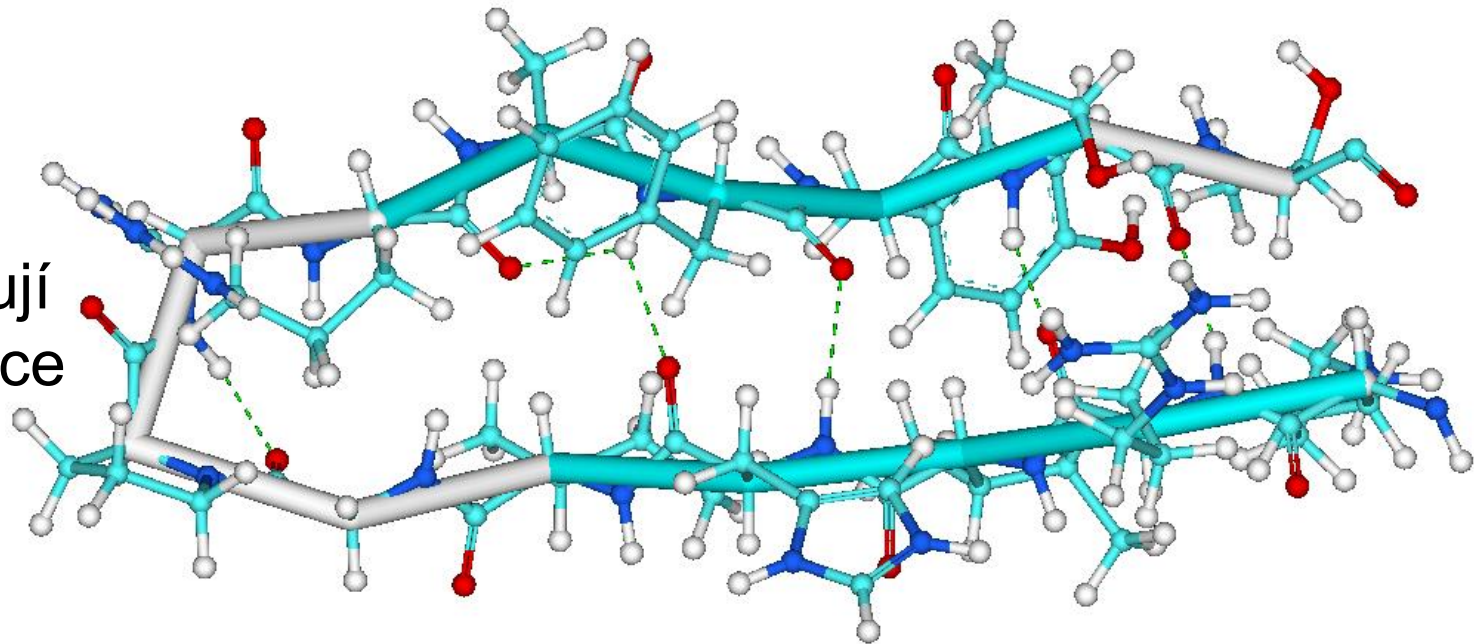
β -skládaný list



postranní řetězce
vyčnívají střídavě na
opačné strany
řetězce, kvůli
sterickým zábranám

H-můstky opět mezi skupinami CO a NH

H-můstky spojují
sousední řetězce

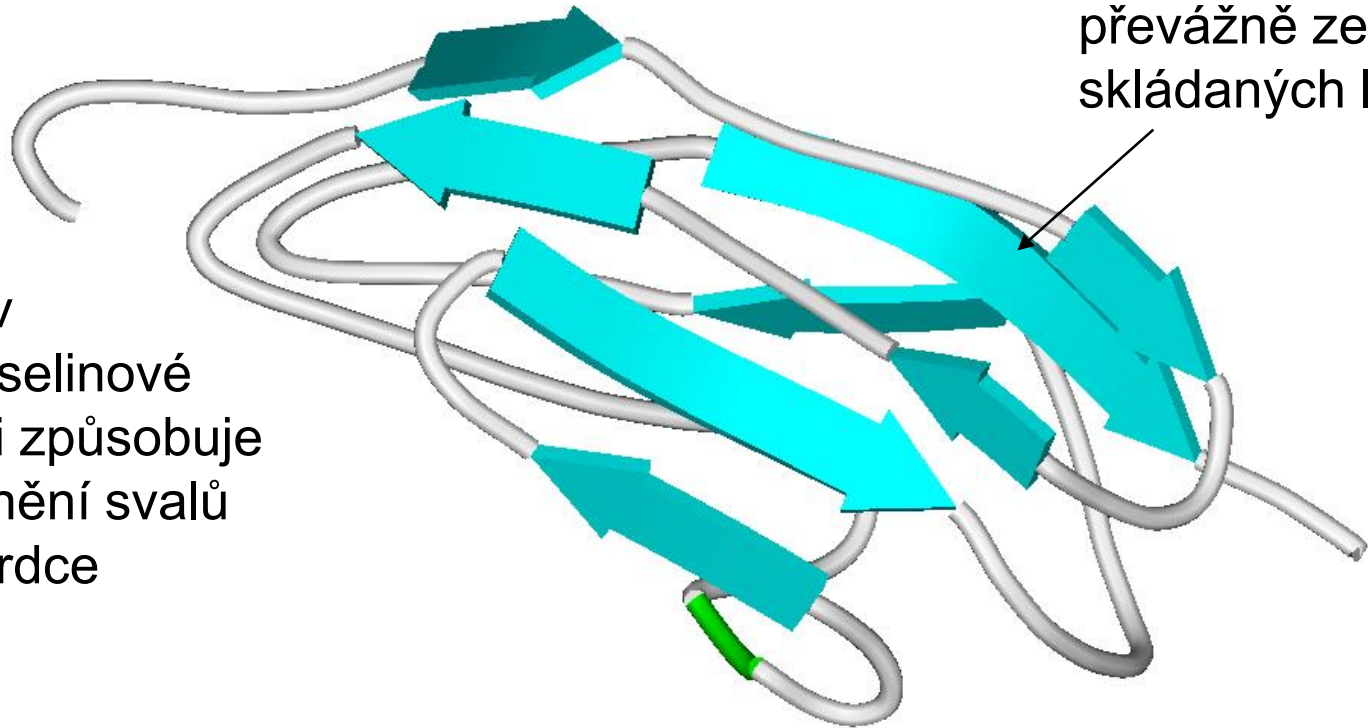


schematické značení
skládaného listu 29

Titin

největší známý polypeptidový řetězec, spolu s aktinem a myosinem ve svalech obratlovců

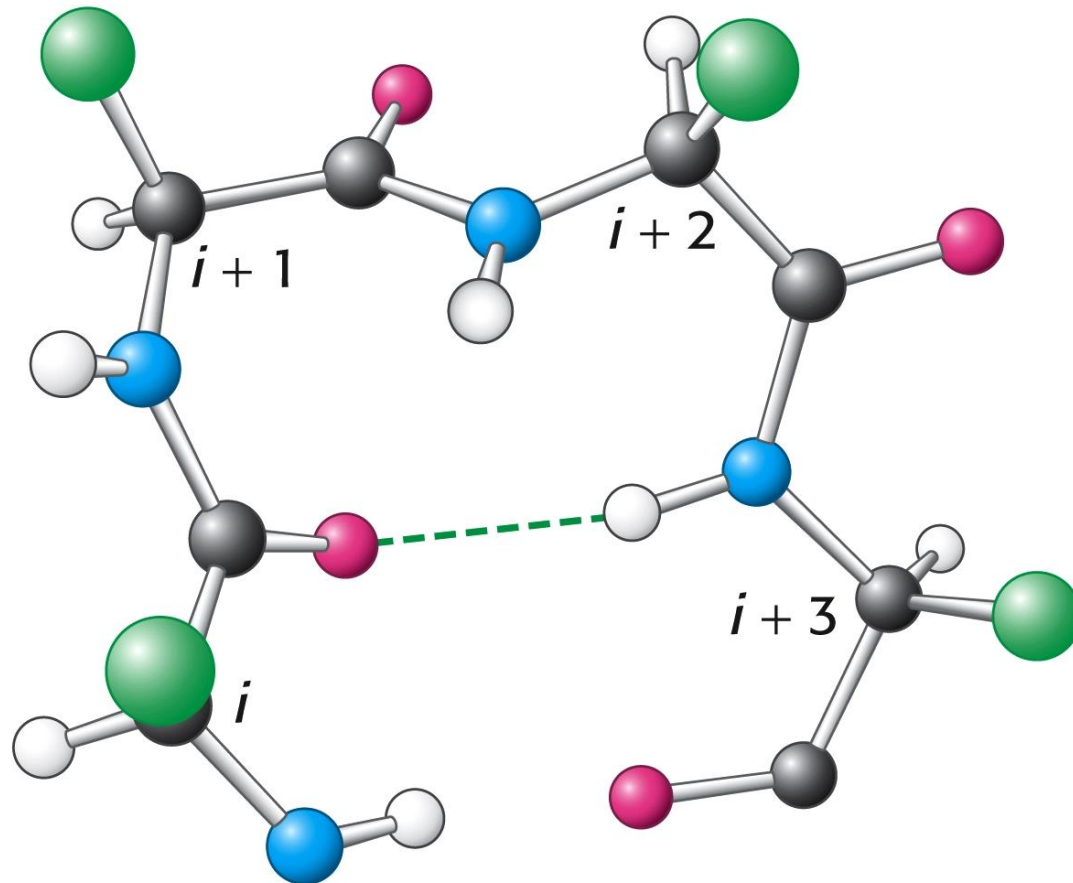
skládá se převážně ze skládaných listů



mutace v aminokyselinové sekvenci způsobuje onemocnění svalů včetně srdce

funkce ještě není úplně prozkoumaná – zřejmě kontroluje činnost aktinu a myosinu, prodlužování a zkracování sarkomerů

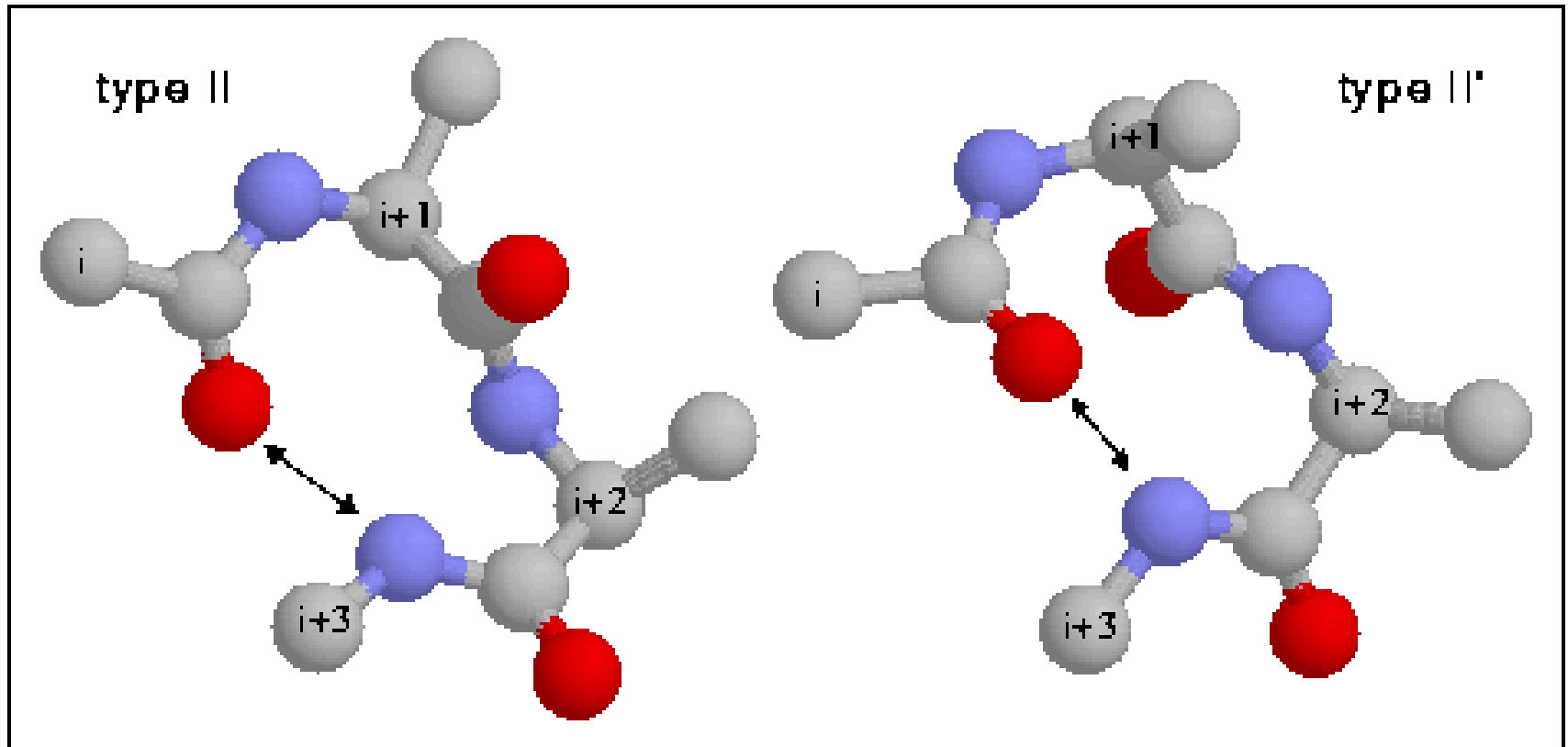
Otočení, vlásenka



H- můstek

<http://quizlet.com/15083412/biochem-lecture-7-flash-cards/>

β - otočení



<http://e106.life.nctu.edu.tw/~hw Huang/dssp/type2turn.gif>

Supersekundární struktury

- Globulární proteiny: - kombinace α -helix and β -listu

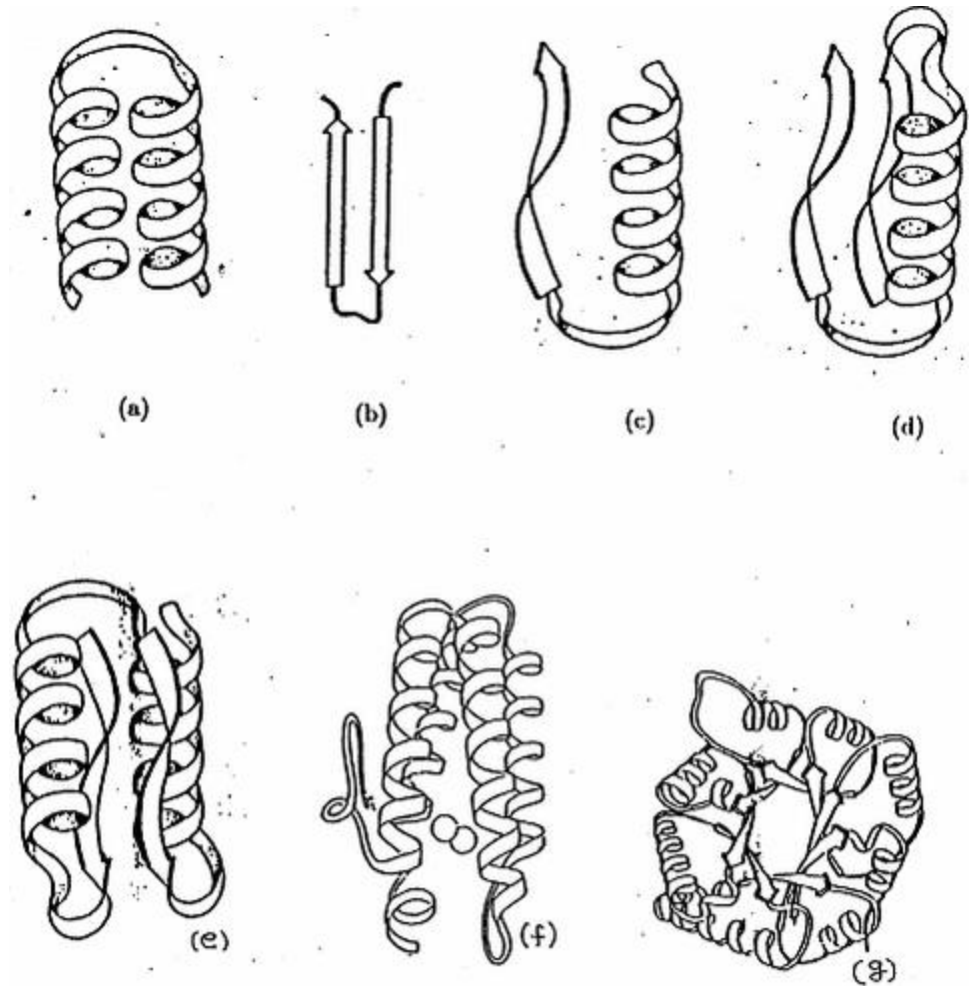


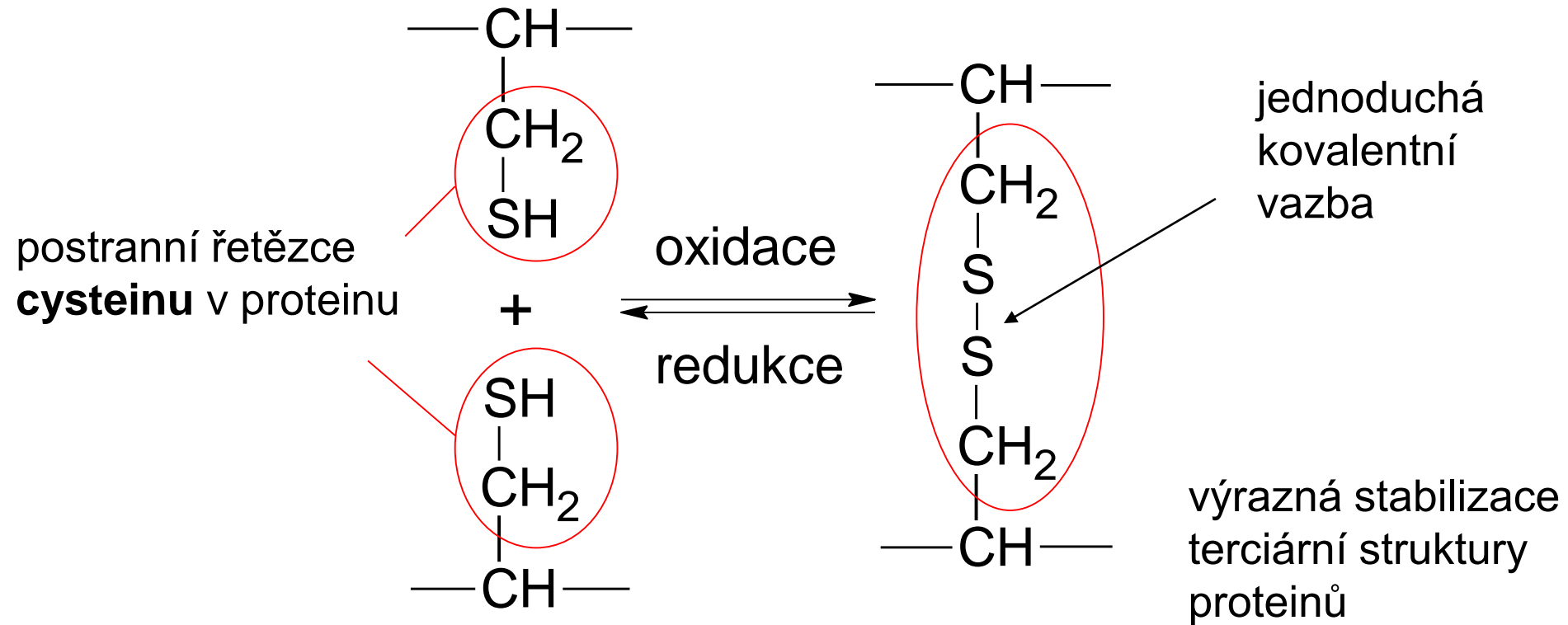
Fig 2.14 Some of the commonly occurring folding motifs in proteins.

(a) $\alpha\alpha$, (b) $\beta\beta$, (c) $\alpha\beta$, (d) $\beta\alpha\beta$, (e) $\beta\alpha\beta\alpha$, (f) α_4 (four helix bundle motif), (g) $(\alpha\beta)_8$

3) Terciární struktura

- uspořádání sekundárních struktur v prostoru
- *skládání proteinů v prostoru ovlivňují především interakce postranních řetězců aminokyselin*
- sekundární struktury nejsou spojeny kovalentně
- stabilizují je: **H-můstky, elektrostatické interakce (iontové síly, dipól-dipól), van der Waalsovy interakce, disulfidové vazby, hydrofobní interakce**

Disulfidový můstek a vznik cystinu



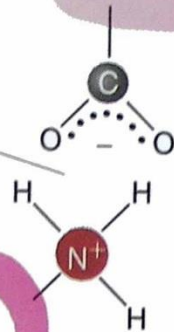
SH skupina se oxiduje a redukuje tak jiné látky, např. H_2O_2 – boj proti oxidativnímu stresu (glutathion)



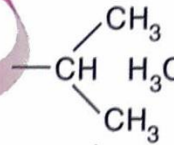
Interakce terciární struktury

polypeptidový řetězec

solný můstek



hydrofobní interakce

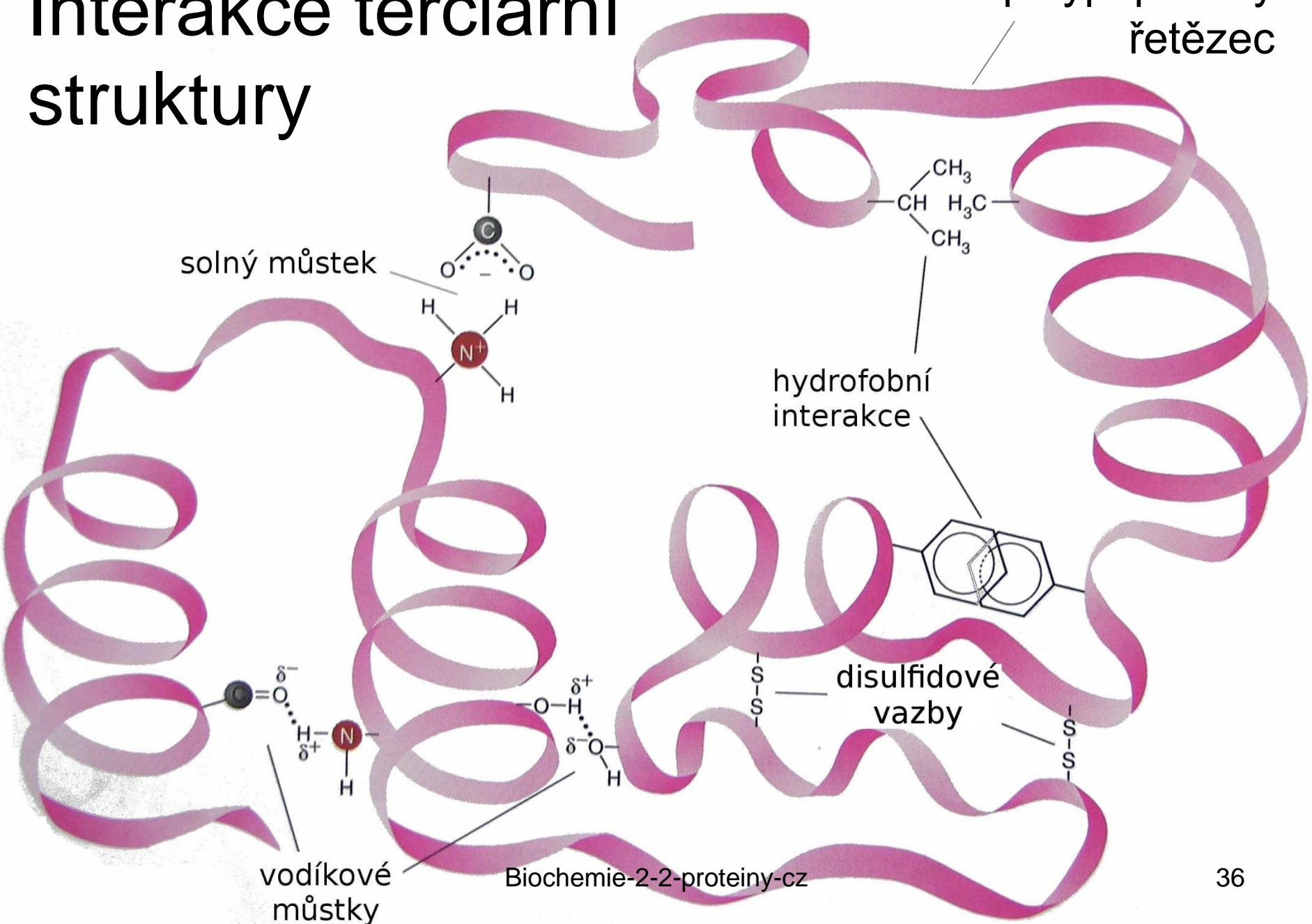


disulfidové vazby



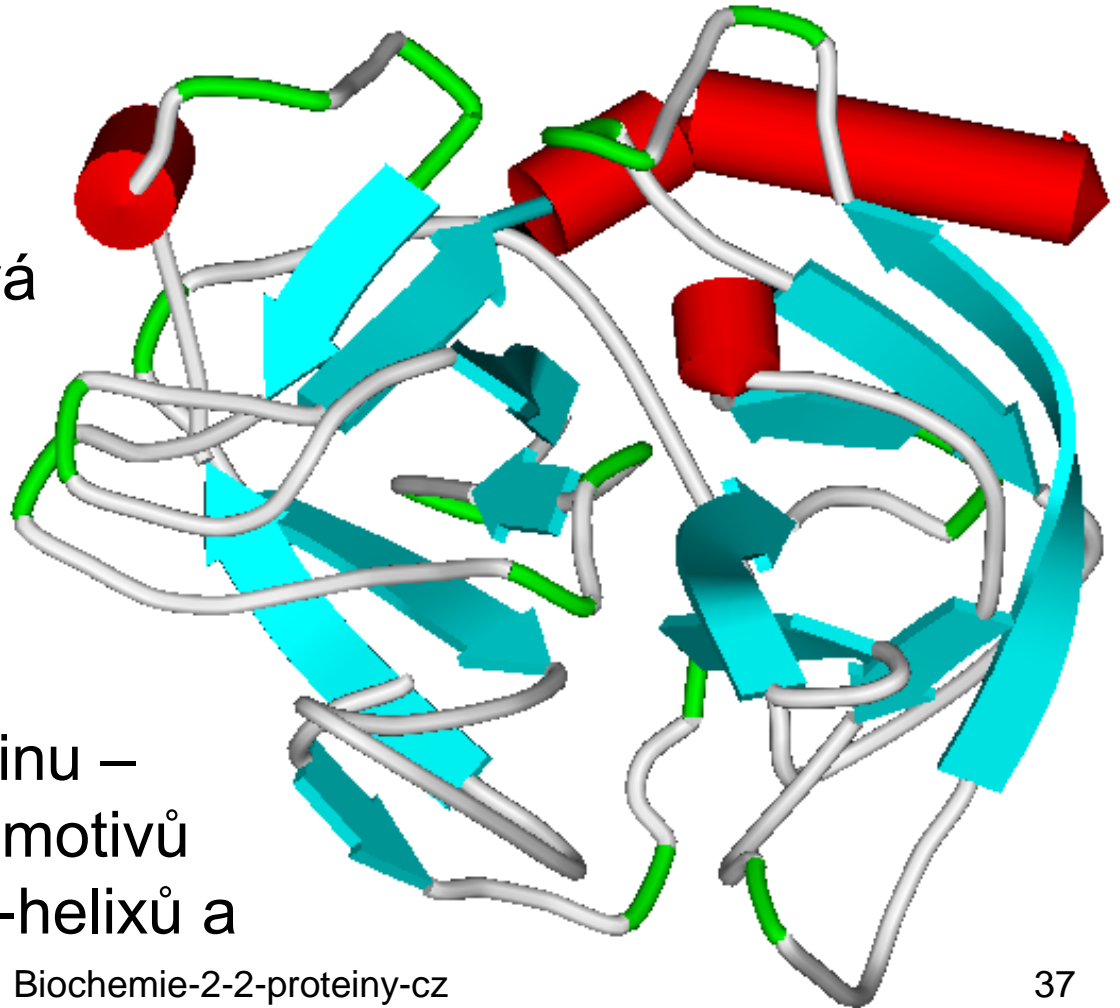
vodíkové můstky

Biochemie-2-2-proteiny-cz



Trypsin

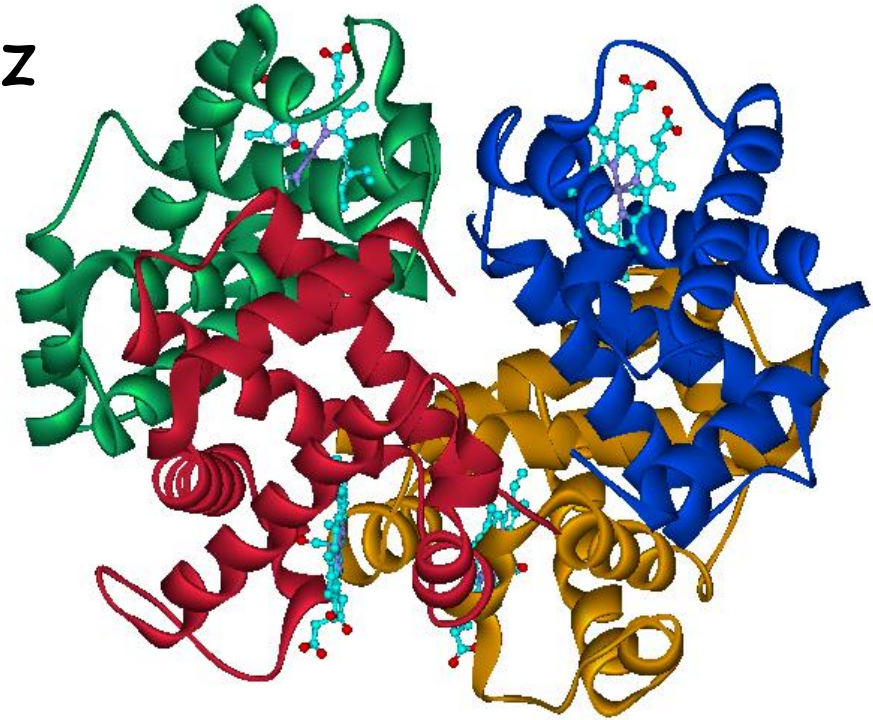
pankreatický enzym
štěpící bílkoviny, které
už částečně natrávila
kyselina chlorovodíková
a pepsin v žaludku



terciární struktura trypsinu –
prostorové uspořádání motivů
sekundární struktury: α -helixů a
skládaných listů

4) Kvartérní struktura

- většina proteinů se skládá z více než jednoho polypeptidového řetězce
- uspořádání řetězců v prostoru - **kvartérní struktura**



Proteiny se zpravidla skládají tak, že hydrofobní zbytky aminokyselin jsou uzavřené uvnitř a hydrofilní části jsou na povrchu proteinu. Záleží však na prostředí, ve kterém se protein nachází (vodný roztok, membrána ...).



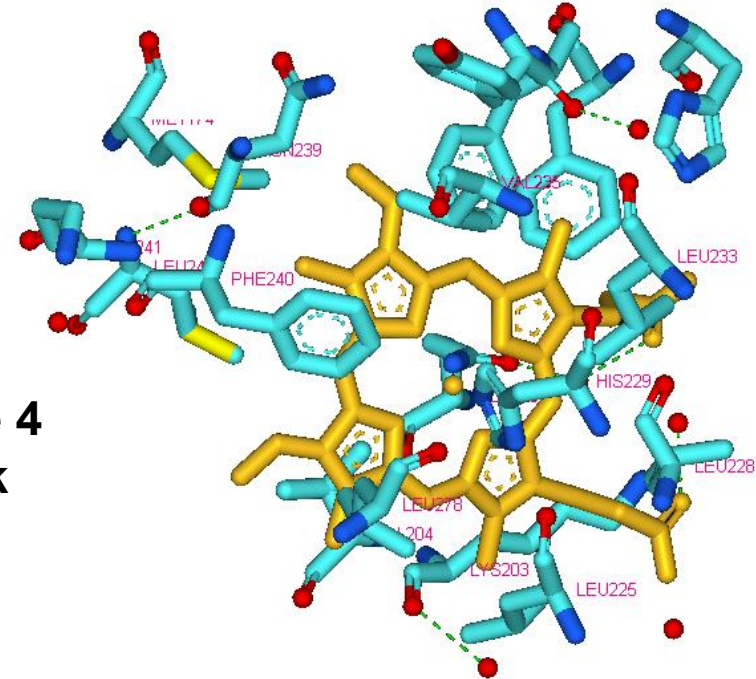
Hemoglobin – přenašeč O₂ a CO₂

β - podjednotky

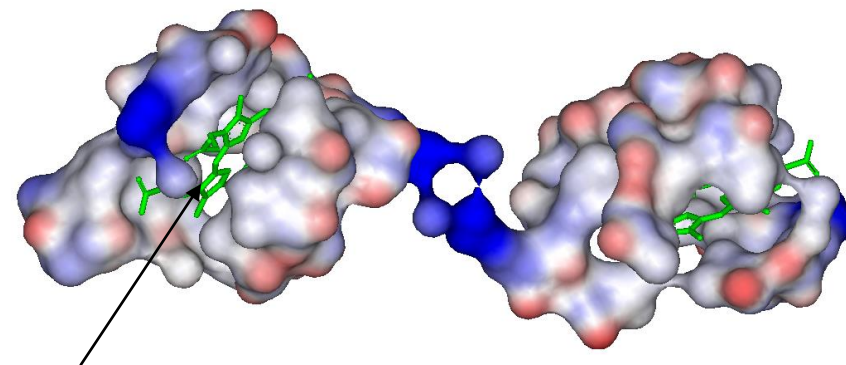
hemové skupiny
s atomy Fe

skládá se ze 4
podjednotek

α - podjednotky



každá obsahuje 1 hemovou skupinu

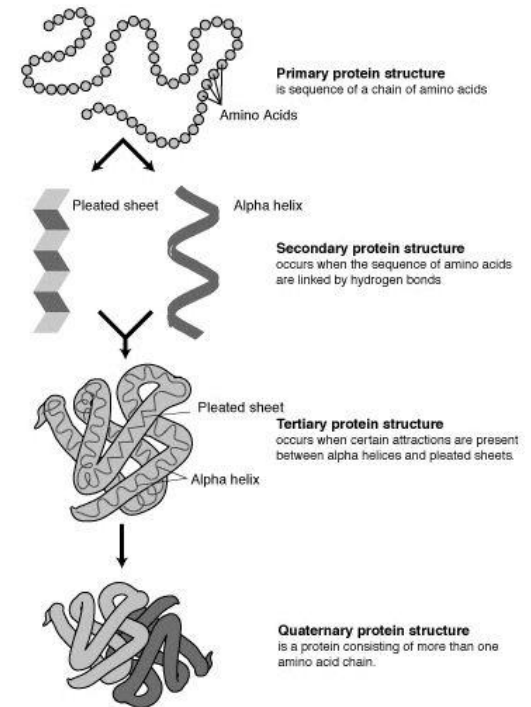


Biochemie-2-2-proteiny-4
hem je uzavřen uvnitř podjednotky,
v hydrofobním prostředí

Shrnutí: struktura a funkce proteinů

Proteiny jsou nejvšestrannějšími makromolekulami v živých systémech a mají klíčové funkce v podstatě ve všech biologických procesech

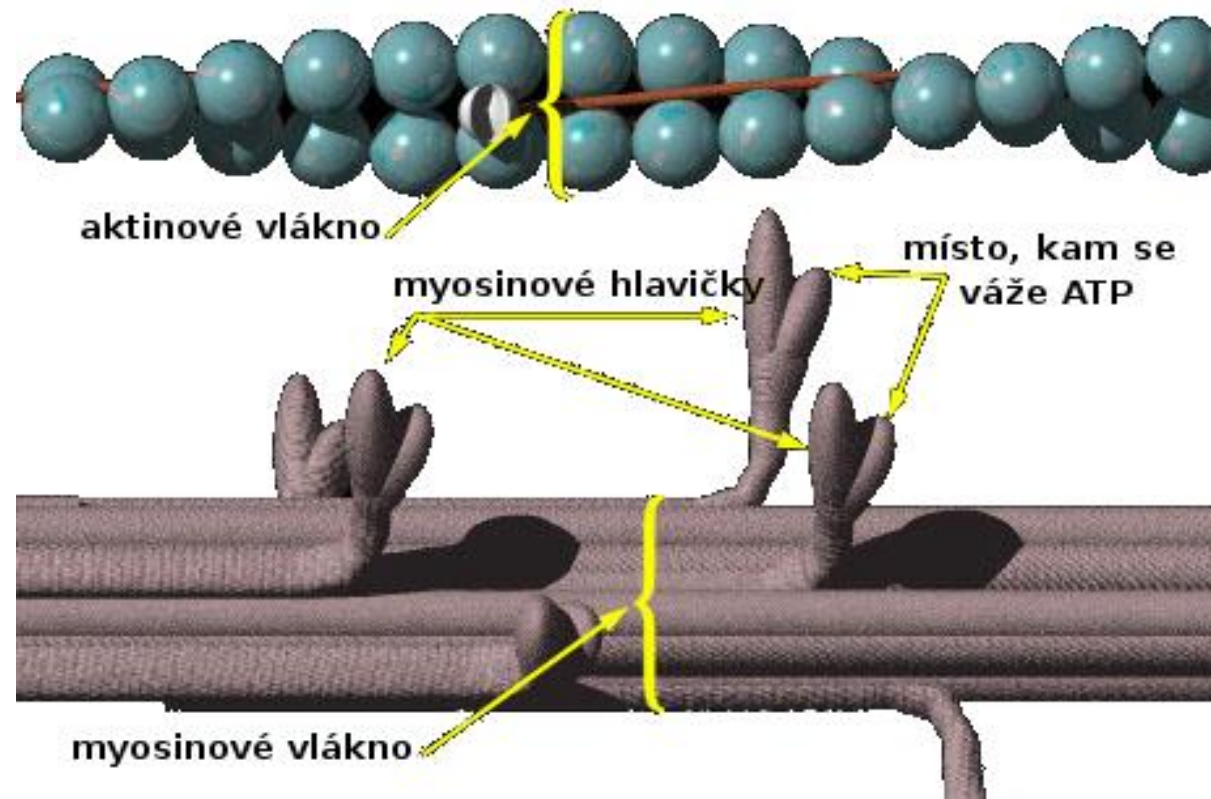
- 3.1 Proteiny se skládají z 21 AMK
- 3.2 Primární struktura: aminokyseliny spojené peptidovou vazbou tvoří polypeptidový řetězec
- 3.3 Sekundární struktura: polypeptidové řetězce se sbalují do pravidelných struktur jako alfa helix, beta list, & obraty & smyčky
- 3.4 Terciární struktura: ve vodě rozpustné proteiny se sbalují do kompaktních struktur s nepolárním jádrem
- 3.5 Kvartérní struktura: polypeptidové řetězce se mohou seskupovat do více jednotkových struktur
- 3.6 Sekvence aminokyselin v proteinu určuje jeho trojrozměrnou strukturu



<http://www.brighthub.com/science/genetics/articles/21915.aspx>

Proteiny jako proměnlivé struktury

- každý protein má určitou prostorovou strukturu (z ní plyne jeho funkce)
- struktura není neměnná – po navázání nějaké látky (ligandu) se může prostorové uspořádání pozměnit
- př.: hemoglobin, princip svalového stahu a mnoha enzymatických reakcí



Skupiny proteinů

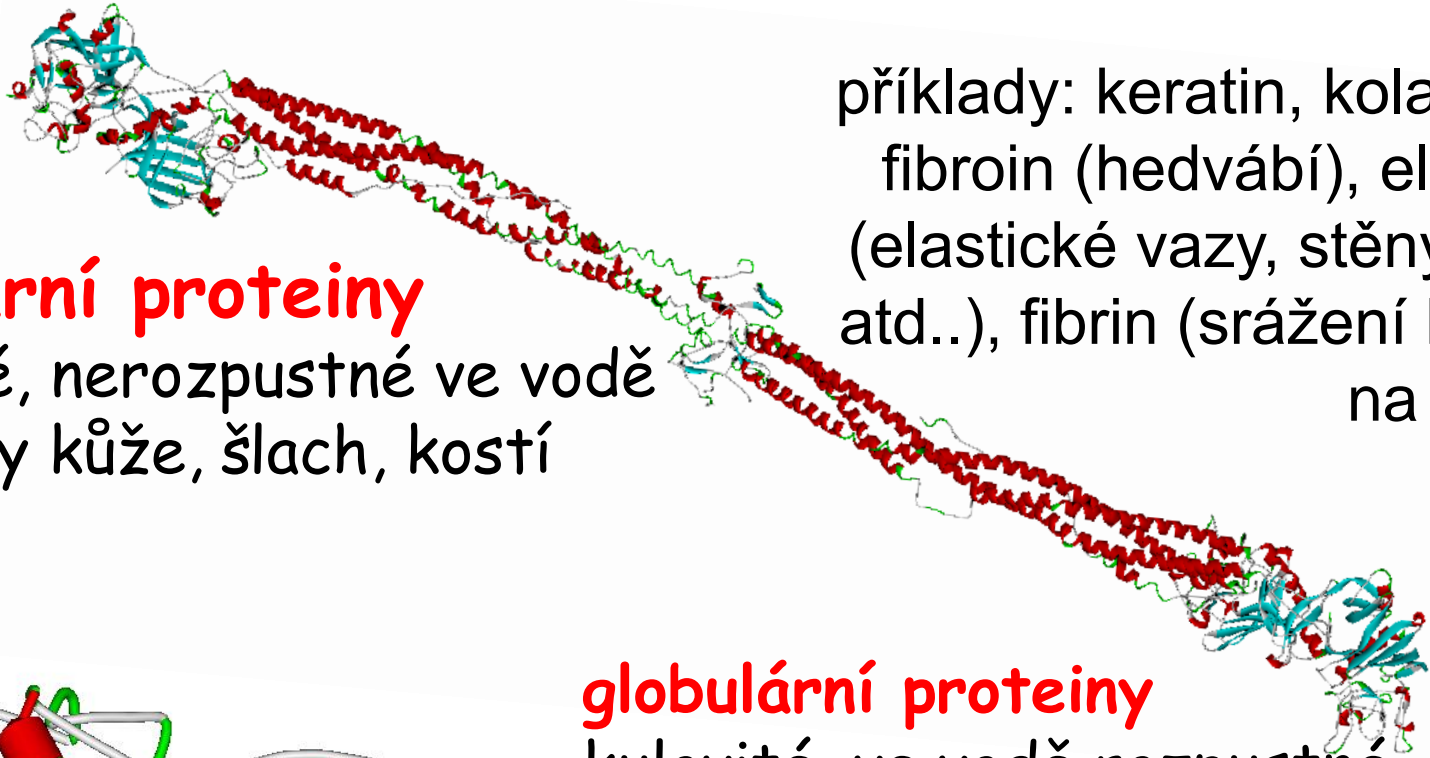
- proteiny jsou velká skupina látek
- rozdělujeme je do mnoha skupin podle různých hledisek:
 - podle **tvaru** (globulární a fibrilární)
 - podle **složení** (jednoduché a složené)
 - podle **funkce** (strukturní, regulační, zásobní, signální, receptorové, enzymy a mnoho a mnoho dalších)

Vlákno nebo klubko

fibrilární proteiny

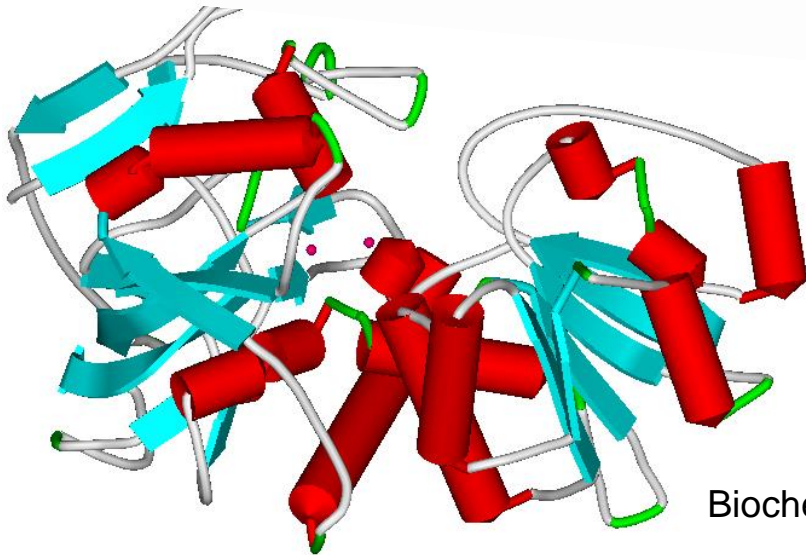
vláknité, nerozpustné ve vodě
proteiny kůže, šlach, kostí

příklady: keratin, kolagen,
fibroin (hedvábí), elastin
(elastické vazy, stěny plic
atd..), fibrin (srážení krve,
na obr.)



globulární proteiny

kulovité, ve vodě rozpustné
enzymy, transportní proteiny,
receptory, imunoglobuliny
příklady: hemoglobin, titin, trypsin,
alkohol dehydrogenáza (na obr.),
aktin, myosin

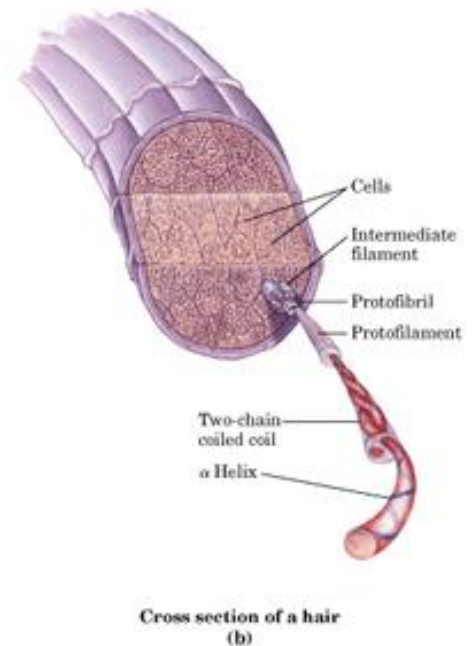


Vláknité a globulární proteiny

- **VLÁKNITÉ** - Vysoký podíl sekundárních struktur (α -helix, β -list)
 - dlouhé tyčovité, ploché molekuly,
 - Nerozpustné ve vodě, fyzikálně tuhé, keratin (kůže, vlasy, nehty)
 - α -keratin, kolagen, fibroin (hedvábí)
 - **STRUKTURÁLNÍ, OCHRANNÁ FUNKCE**
- **GLOBULÁRNÍ**
 - kompaktní sférické molekuly, většinou ve vodě rozpustné,
 - **DYNAMICKÁ funkce: ENZYMY, imunoglobuliny, TRANSPORT**
 - dutiny, štěrby - komplementární k **LIGANDU**
 - Hemoglobin

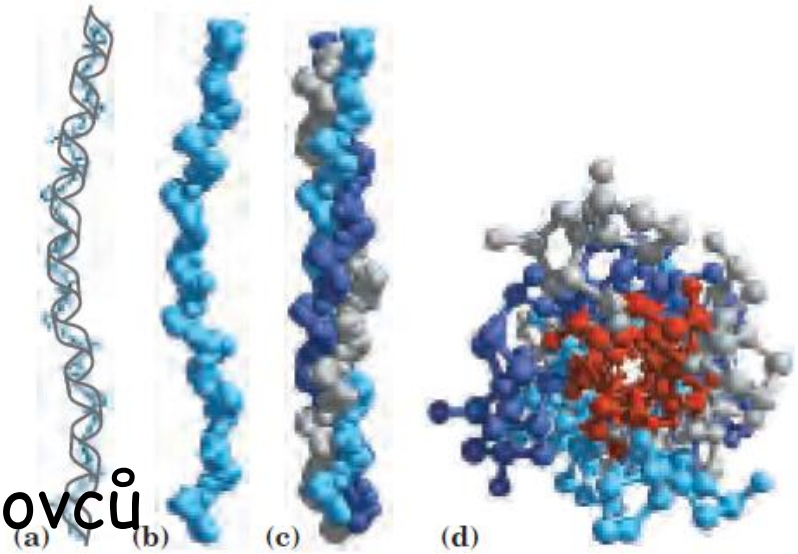
α -keratin

- Vlasy, vlna, kůže, nehty
- α -helikální polypeptidy
- 3 α helicalní řetězce - levotočivá superhelikální struktura - protofibrila
- Microfibrila
- Macrifibrila
- AA- ne prolin, Ala, Leu; vnější zbytky - ve vodě nerozpustné; tvrdý keratin - disulfid (oxidace)...



<http://dwiputranto.files.wordpress.com/2008/06/picture2.png>

Kolagen



- Hojně se vyskytující u obratlovců
- Buňky pojivové tkáně, sekretován do extracelulární matrix
- Výskyt: kůže, kosti, šlachy, krevní cévy
- 3 levotočivé šroubovice, zatočené kolem sebe → pravotočivá superhelix
- AA - 30% glycin, 30% prolin, 4-hydroxyprolin
- ER hydroxylace Pro a Lys
- Opakování tripletů: Gly-X-Y (X,Y často Pro, Hydro-Pro), Y - hydroxy-Lys

Proteiny jednoduché a složené

- proteiny jsou biologicky aktivní jen ve svém nativním stavu mohou být a) jednoduché, b) složené

a) makromolekula tvořená jen polypeptidovým řetězcem (v nativní konformaci)

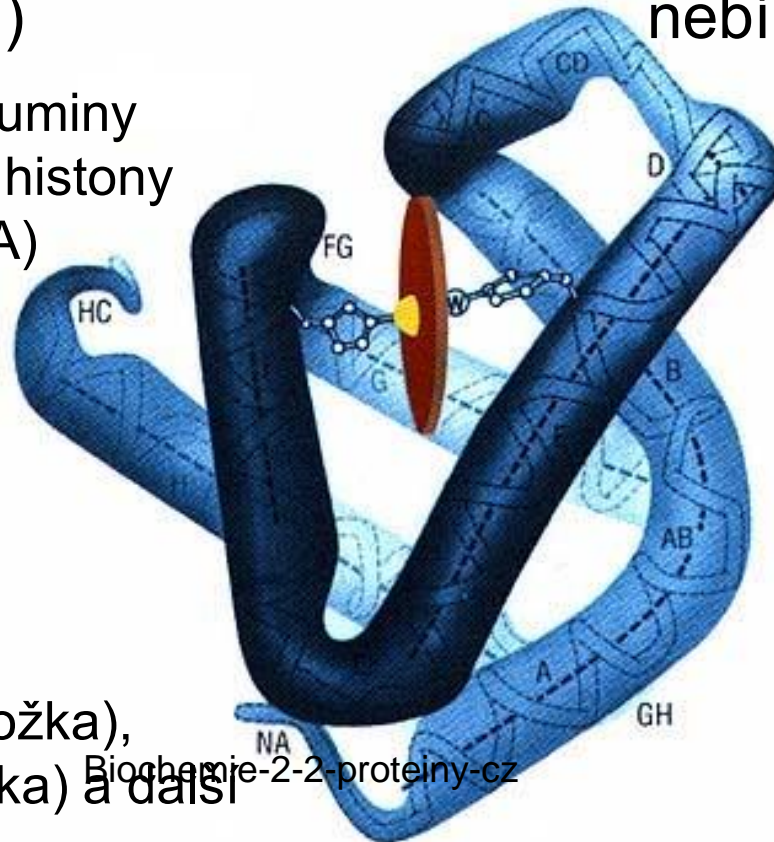
př.: fibrilární proteiny, albuminy (proteiny krevního séra), histony (v jádře se vážou na DNA)

př. složených proteinů:
glykoproteiny (cukerná složka),
lipoproteiny (lipidová složka) a další

b) protein má 2 složky: polypeptidový řetězec a nebilkovinnou složku

transferin – přenáší v těle atomy železa (nebilkovinná složka)

myoglobin
skladování kyslíku ve svalech



K čemu slouží proteiny v organismech? (rozdělení dle funkce)

Proteiny zastávají mnoho a mnoho rozdílných rolí:

1) biokatalyzátory (enzymy) - pepsin, trypsin a další trávicí enzymy, DNA-polymeráza (syntéza DNA), alkohol dehydrogenáza (odbourávání alkoholu)

2) strukturní proteiny - mechanická podpora buněk a tkání; př.: keratin (vlasy), elastin a kolagen (vlákna ve šlachách a vazivu), aktin (plasmatická membrána buněk)



Další funkce proteinů

3) transportní proteiny - přenášejí po těle různé látky př.: hemoglobin, transferin, albuminy (v krevním séru přenos lipidů), cytochrom c (přenos elektrony v dýchacím řetězci)



4) pohybové proteiny - např. myosin, ale i další (kinesin pohybuje organelami v buňkách)

Další funkce proteinů

5) zásobní proteiny - ferritin ukládá Fe v játrech, ovalbumin (zásoba aminokyselin ve vaječném bílku), kasein (zásoba aminokyselin pro novorozence v mléce)



6) signální proteiny - některé hormony (např. insulin) a růstové faktory jsou proteiny



7) receptory - rhodopsin v oční sliznici a mnoho dalších receptorů v membránách buněk

8) proteinové jedy - např. bakterie *Vibrio cholerae* syntetizuje protein → toxin způsobující cholera, nebo hadí jedy

Konformace proteinů 3D struktury

- **Konformace proteinů** (kovalentní vazby, volná rotace, neomezený počet konformací)
- Každý protein má specifickou chemickou nebo strukturální funkci, z čehož plyne, že má každý **jedinečnou 3D strukturu**

- **Prostorové uspořádání atomů v proteinu, rotace kolem jednoduchých vazeb, termodynamicky stabilnější, nižší Gibsonova volná energie**

- **Nativní proteiny**

- Proteiny jsou stabilizovány různými **SLABÝMI** interakcemi
- **Hydrofóbní interakce** jsou nejčastější - globulární formy rozpustnějších proteinů
- **Vodíkové vazby a iontové vazby** využívají různorodé struktury - termodynamicky stabilnější

Pět tezí o 3D struktuře proteinů

1. 3D struktura je dána sekvencí aminokyselin
2. Funkce proteinů závisí na jejich struktuře
3. Izolovaný protein zaujímá 1 nebo malé množství stabilních strukturních forem
4. Nejdůležitější síly – nekovalentní interakce
5. Běžné strukturní vzory

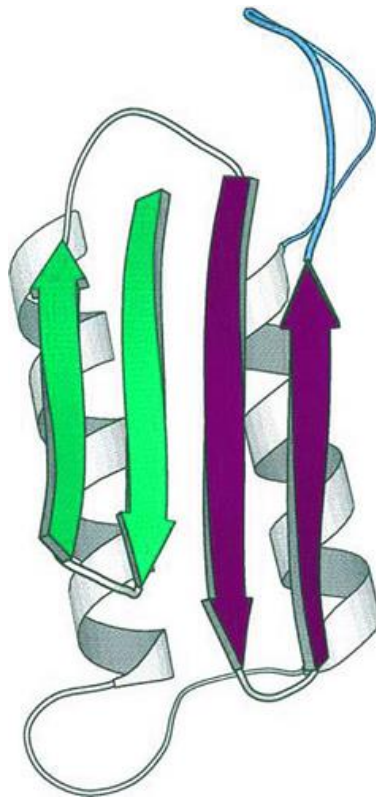
Každý protein má svou 3D strukturu, která odráží jeho funkci.

Alternativní konformace: kontext

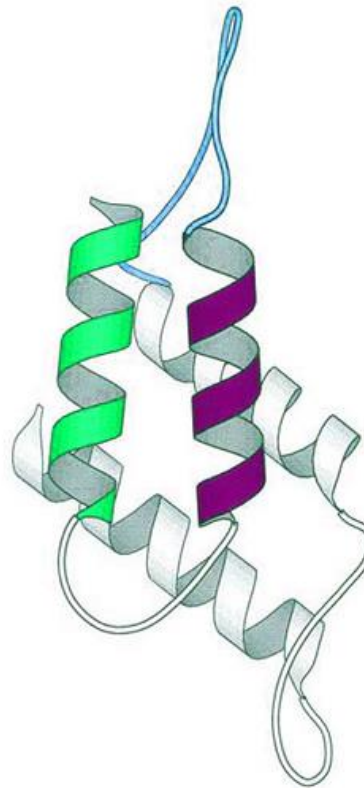
Terciární interakce (mezi vzdálenými zbytky) obliňují sekundární strukturu

Stejná sekvence

beta list



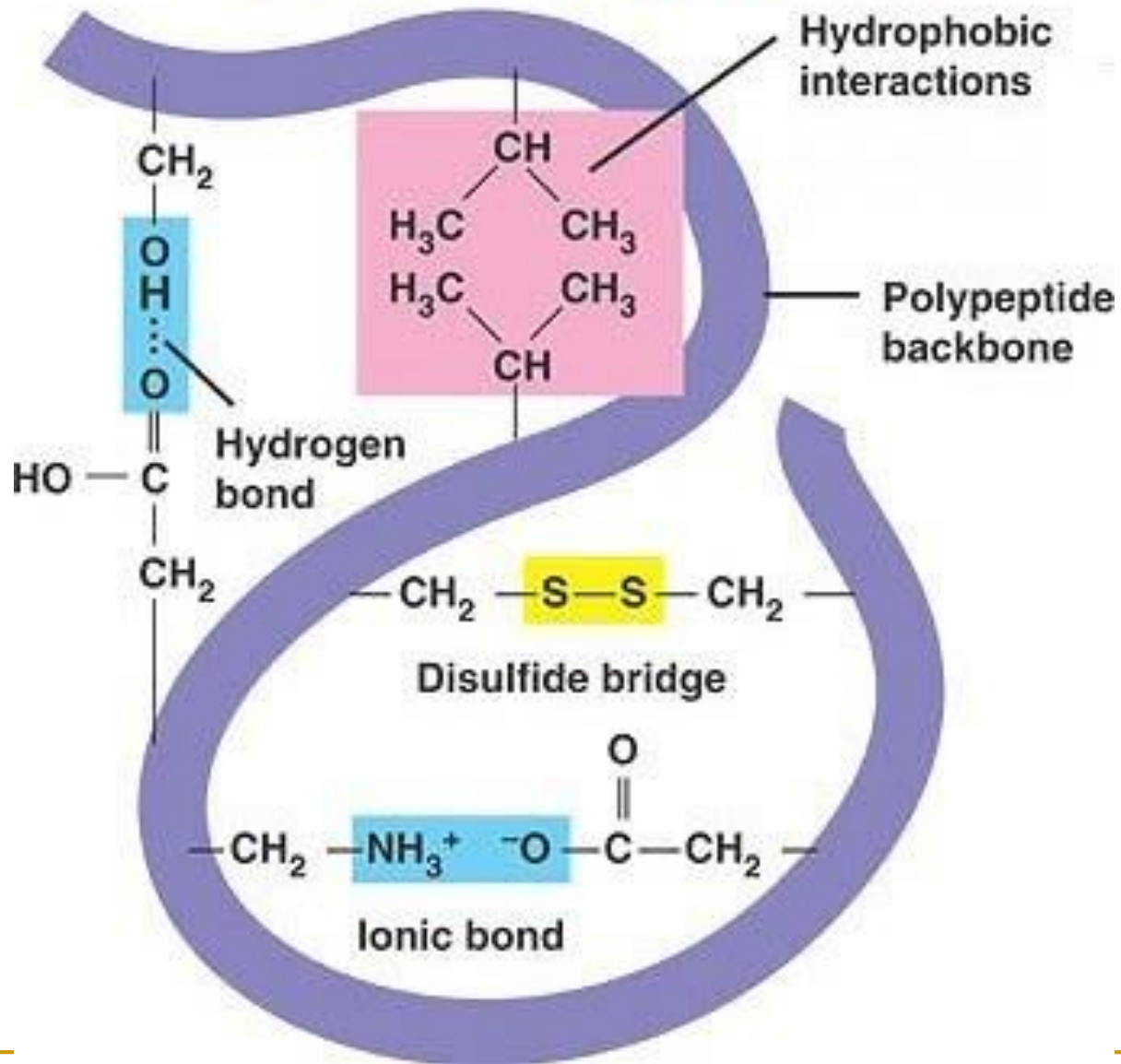
alfa helix



Interakce stabilizující terciární strukturu

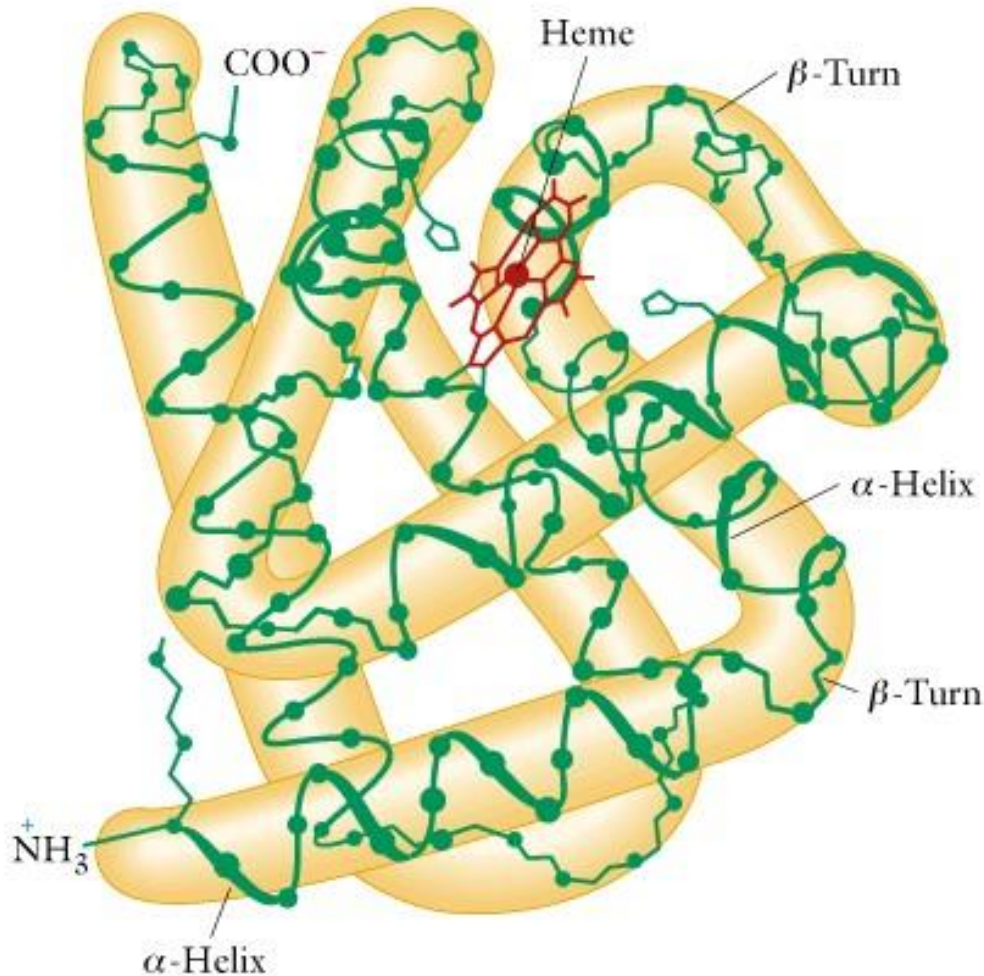
- Hydrofóbní interakce (hydrofóbní postranní řetězce – blízkost, vyloučení vody, sbalování globulárních proteinů)
- Elektrostatické interakce mezi iontovými skupinami
- Vodíkové vazby
- Kovalentní vazby (disulfidické můstky)

TERTIARY STRUCTURE



https://kimberlybiochemist.files.wordpress.com/2013/03/tertiary_structure.jpg

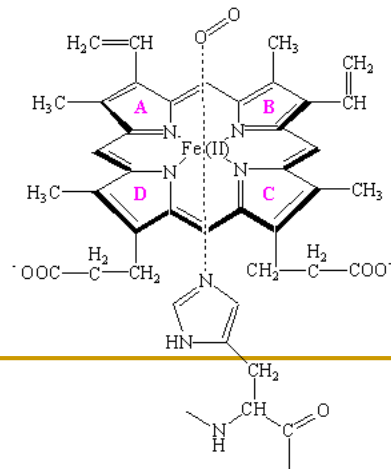
Tertiární struktura, myoglobin, schématicky



Převládá α -helix,
celkem = 8 helix
(75% hlavního řetězce)

Prostetická (pomocná)
skupina pro vazbu O_2

Hemová skupina je
protoporphyrin IX,
& centrální atom železa

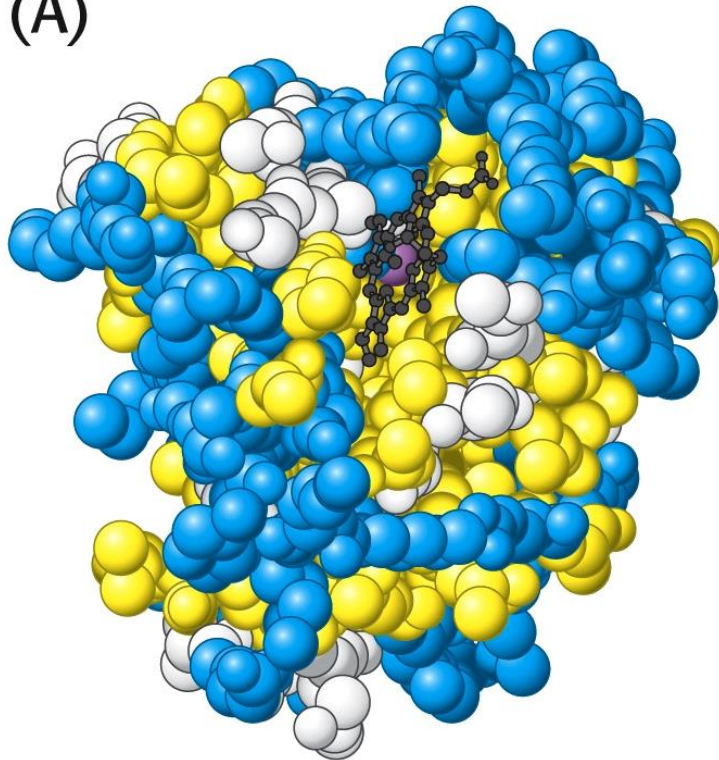


<http://plaza.ufl.edu/tmullins/BCH3023/images/CH20/F2012.jpg>

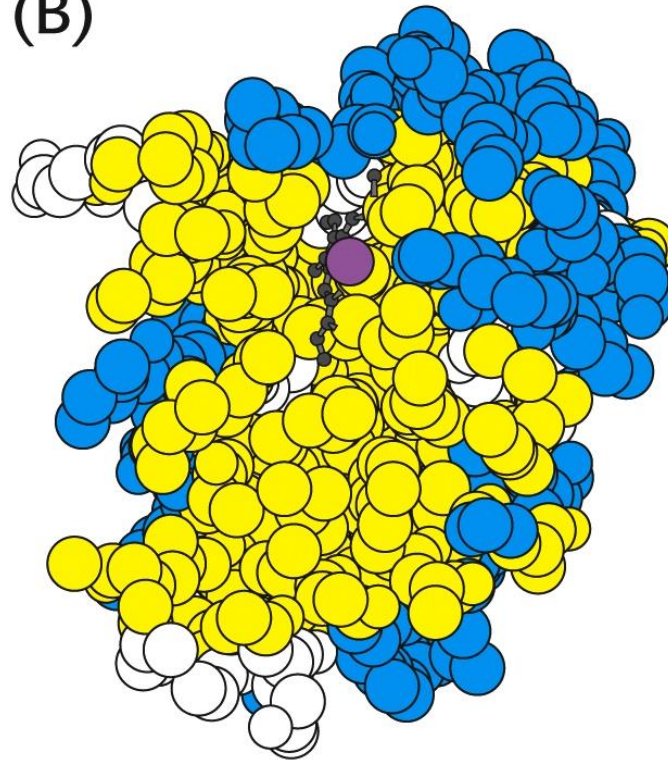
<http://chemed.chem.purdue.edu/genchem/topicreview/bp/1/biochem/graphics/13.gif>

Zastoupení AMK v myoglobinu

(A)



(B)



Povrch, hlavně nabité AMK.

Uvnitř, hlavně hydrofóbní AMK

Žluté: hydrofóbní AMK

Modré: nabité AMK

Bílé: ostatní AMK

<http://1.bp.blogspot.com/->

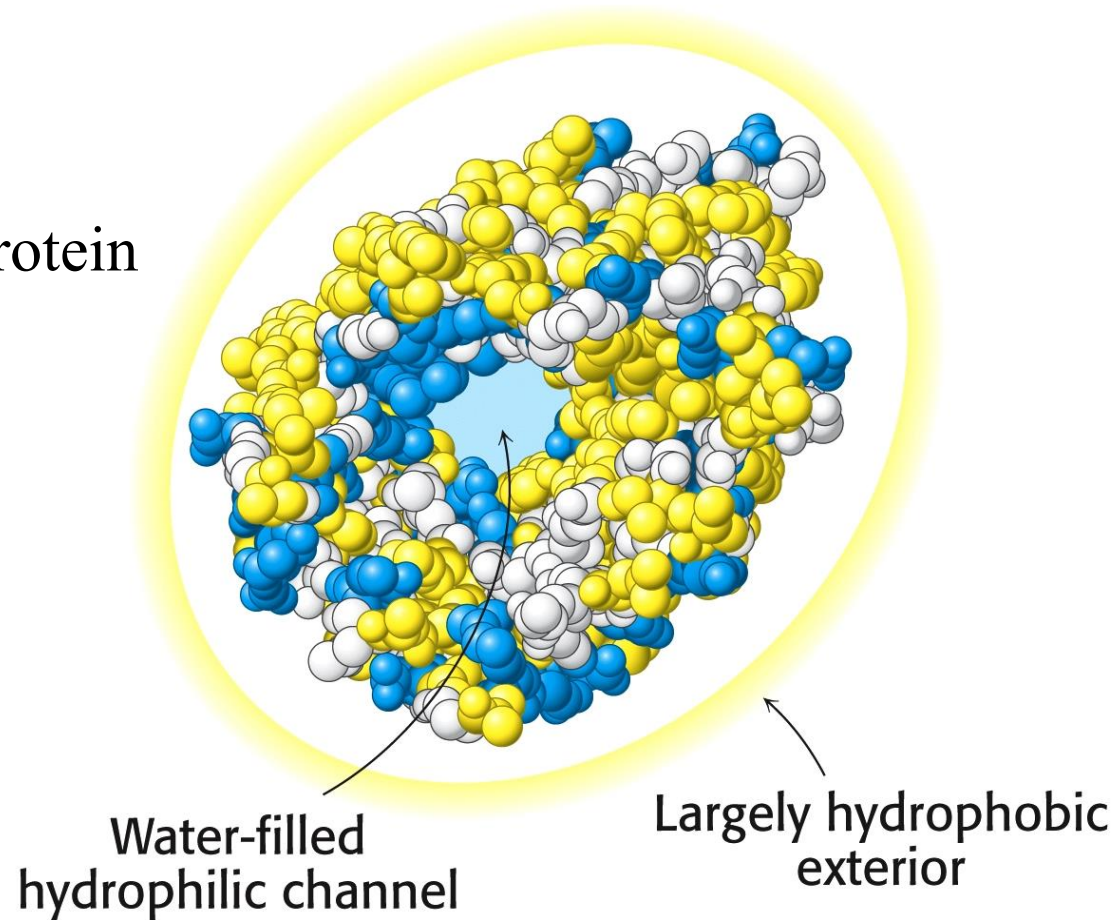
[jJqoNdNExQQ/TeaJAIOcZoI/AA](http://1.bp.blogspot.com/-jJqoNdNExQQ/TeaJAIOcZoI/AA)

[AAAAAAAF0/cJj-](http://1.bp.blogspot.com/-AAAAAAAF0/cJj-)

[4wQkD5k/s1600/figure+1.jpg](http://1.bp.blogspot.com/-4wQkD5k/s1600/figure+1.jpg)

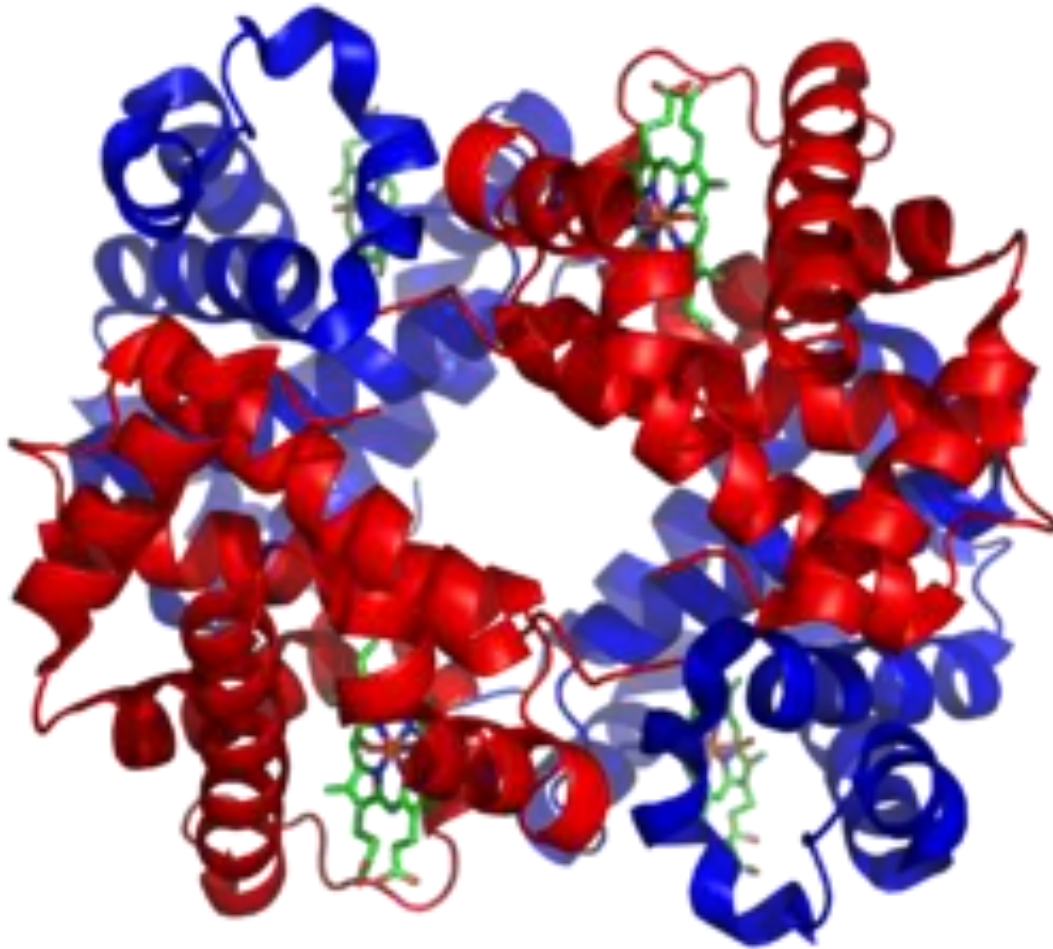
Porin: “naruby”

Membránový protein



<http://1.bp.blogspot.com/-mhX100TP-tQ/TeaJMY8YehI/AAAAAAAAAAG A/VjqbcKLtjMo/s1600/figure+4.jpg>

Kvartérní struktura, tetramer



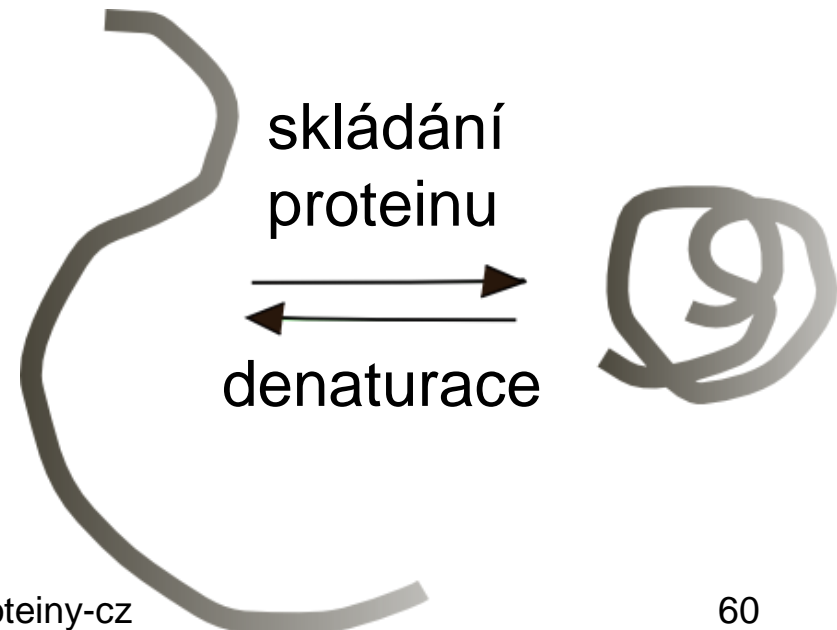
Lidský
hemoglobin,
Dvě alfa (červeně)
Dvě beta (žlutě)
Podjednotky,
4 hemové skupiny

Denaturace ~ ztráta prostorového uspořádání

ztráta nativní konformace - postupné narušení vazeb kvartérní, terciární a sekundární struktury (H-můstky, Van der Waalsovy a hydrofobní interakce, disulfidové vazby, ...)

porušení nekovalentních vazeb

peptidové vazby zůstanou zachovány (zbude neuspořádaný polypeptidový řetězec)



Denaturace

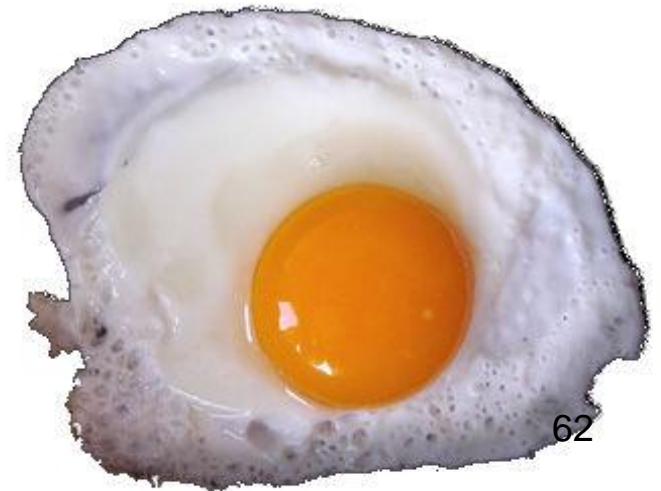
Denaturovaný protein ztrácí svoji biologickou aktivitu!!

- **nevratná** - protein se nemůže složit do své nativní konformace, jeho prostorové uspořádání je úplně narušené
- v roztoku pak dojde k agregaci molekul denaturovaných proteinů (důsledek narušení vyšších struktur) - vzniká sraženina

denaturační činidla: teplota
těžké kovy, soli
silné kyseliny a báze
některá organická rozpouštědla
redukční činidla (močovina)
a další

Využití denaturace

- vaření - vaření napomáhá trávení proteinů - narušuje prostorové uspořádání proteinů, trávicí enzymy pak mohou snadněji štěpit peptidové vazby v základním řetězci
- výzkum



vratná denaturace - vysolování

- není denaturace
- nenarušuje se kvartérní, terciární, sekundární ani primární struktura
- vratné
- způsobeno přidavkem některých solí - rozpouštějí se ve vodě, 'vychytávají' molekuly H_2O , které předtím rozpouštěly molekuly proteinu
- ten se vysráží z roztoku ve formě svého krystalu - základní metoda izolace proteinů

Denaturace a sbalování proteinů

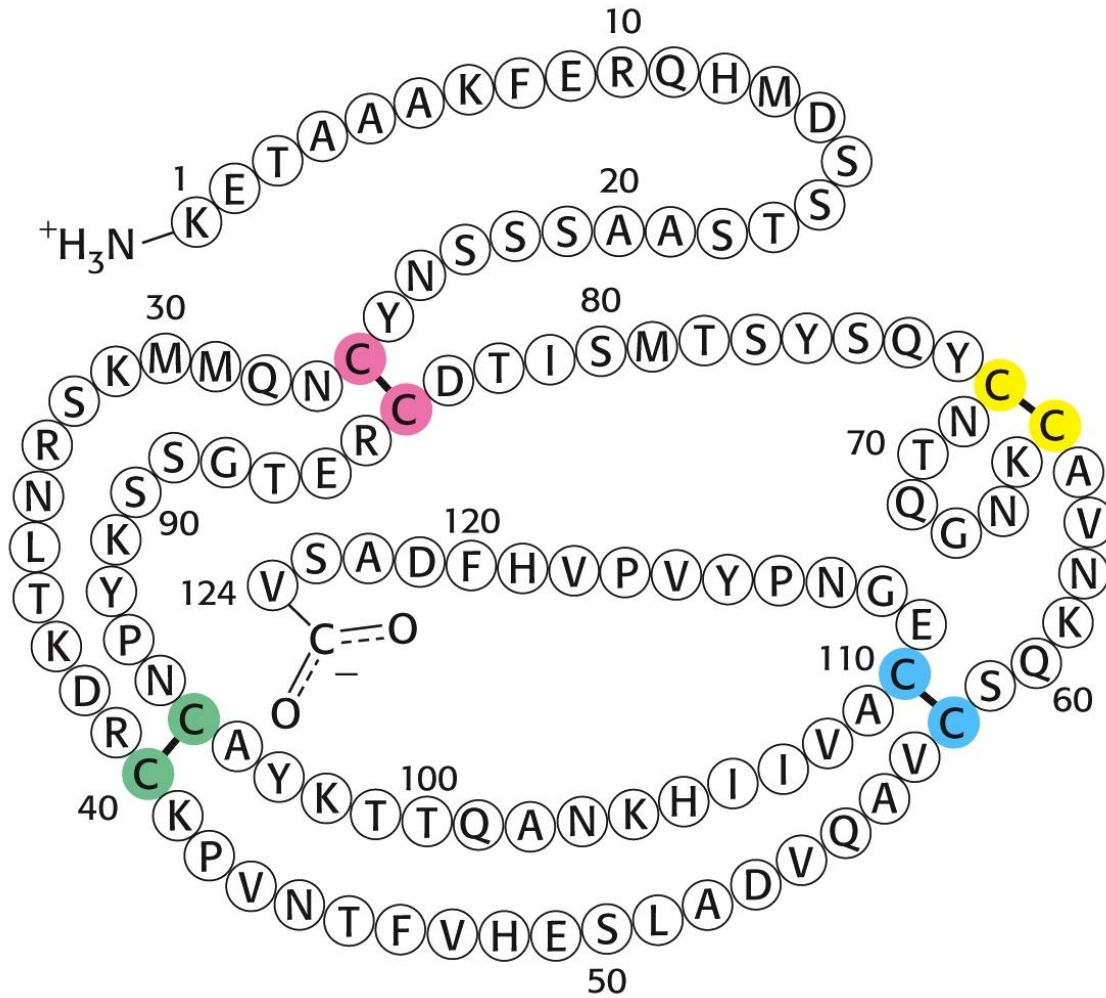
- Denaturace - ztráta 3D struktury
- - částečně sbalený stav
- Fyzikální podmínky - T, teplo, mechanický stres (pěna - vaječný bílek)
- Chemické podmínky:
 - extrémní pH (silné kyseliny a zásady),
 - Organická rozpouštědla (alkoholy, aceton),
 - Určitě roztoky - močovina, chlorid guanidinu,
 - detergenty
 - Koncentrace soli, těžké kovy (Pb, Hg-anémie)
 - Šetrné ošetření - ne kovalentní vazby

- Nemusí být ekvivalentní

Sekvence aminokyselin ovlivňuje 3D strukturu

Bovinní ribonukleasa, 1950, C. Anfinsenova práce

Denaturace &
renaturace

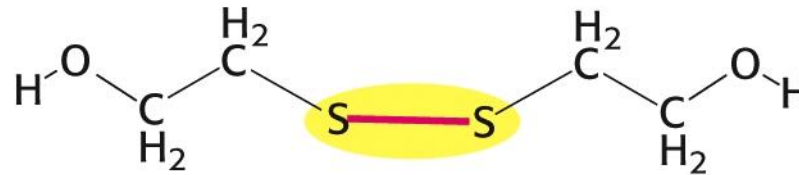
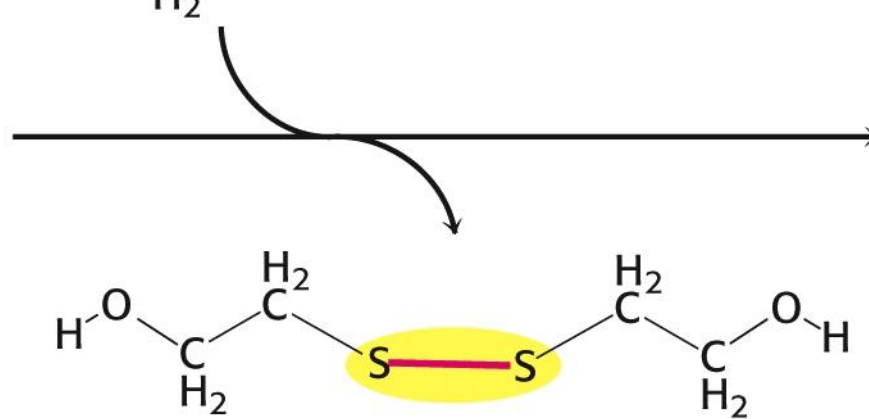
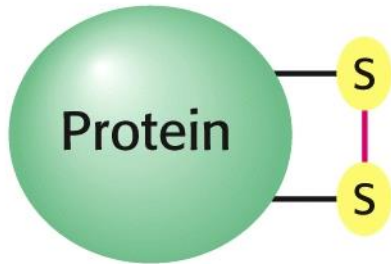
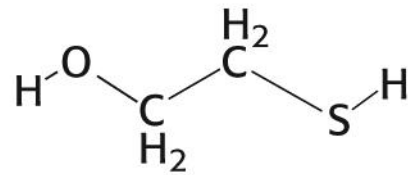


4 disulfidické vazby
124 AMK

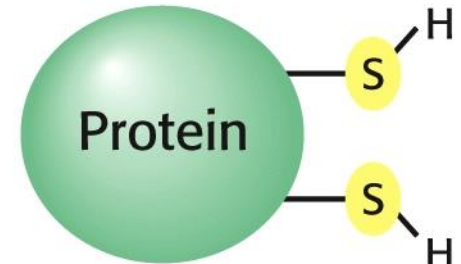
Redukce disulfidické vazby

beta-mercaptoethanol, redukovaný

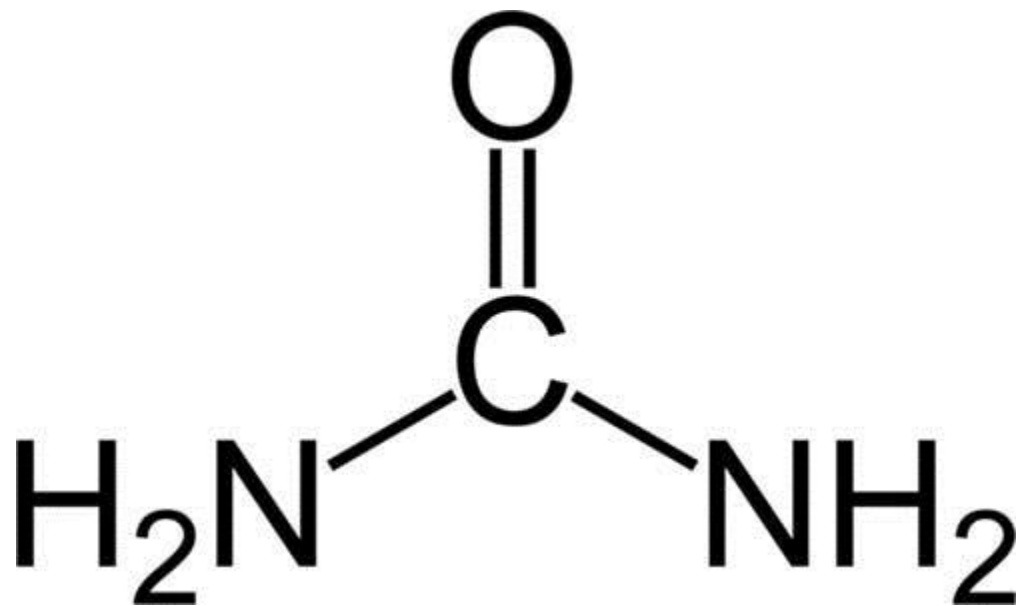
Excess



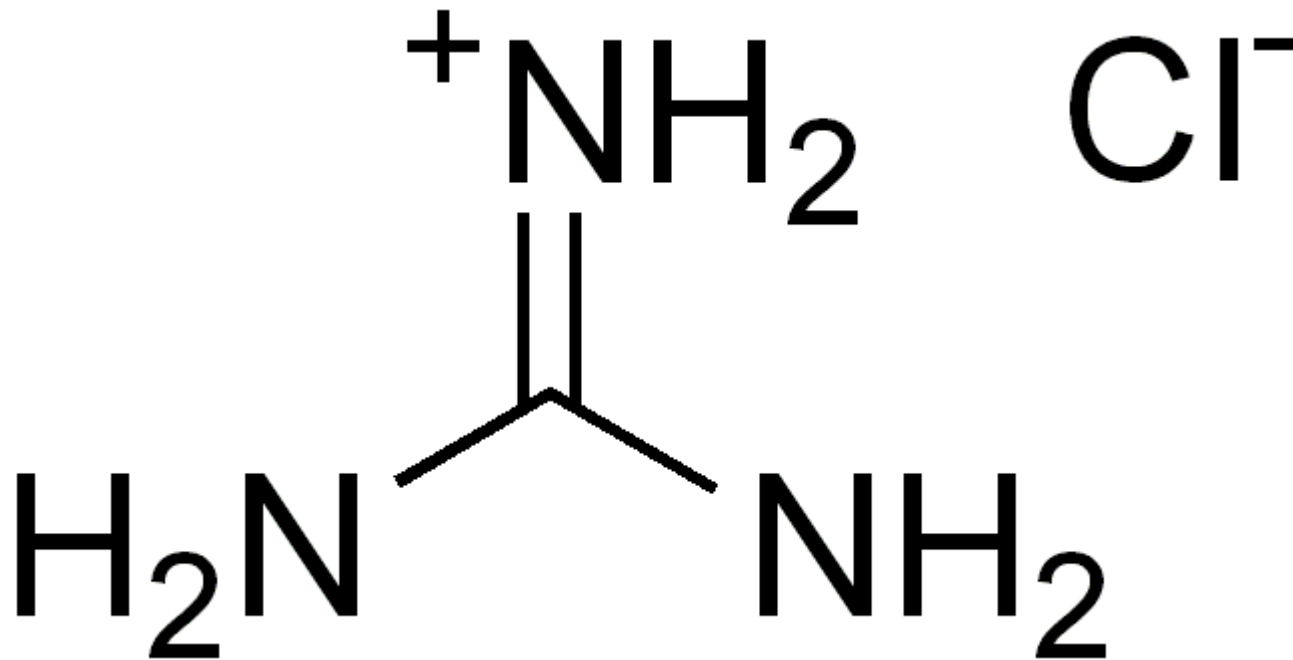
oxidovaný



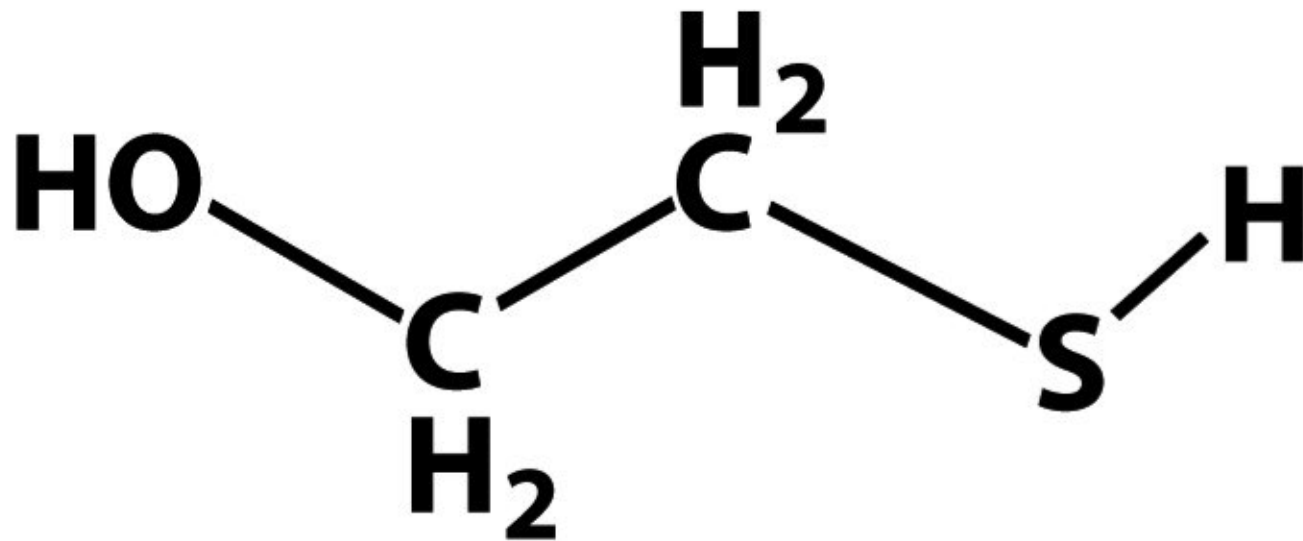
Denaturační činidlo, močovina



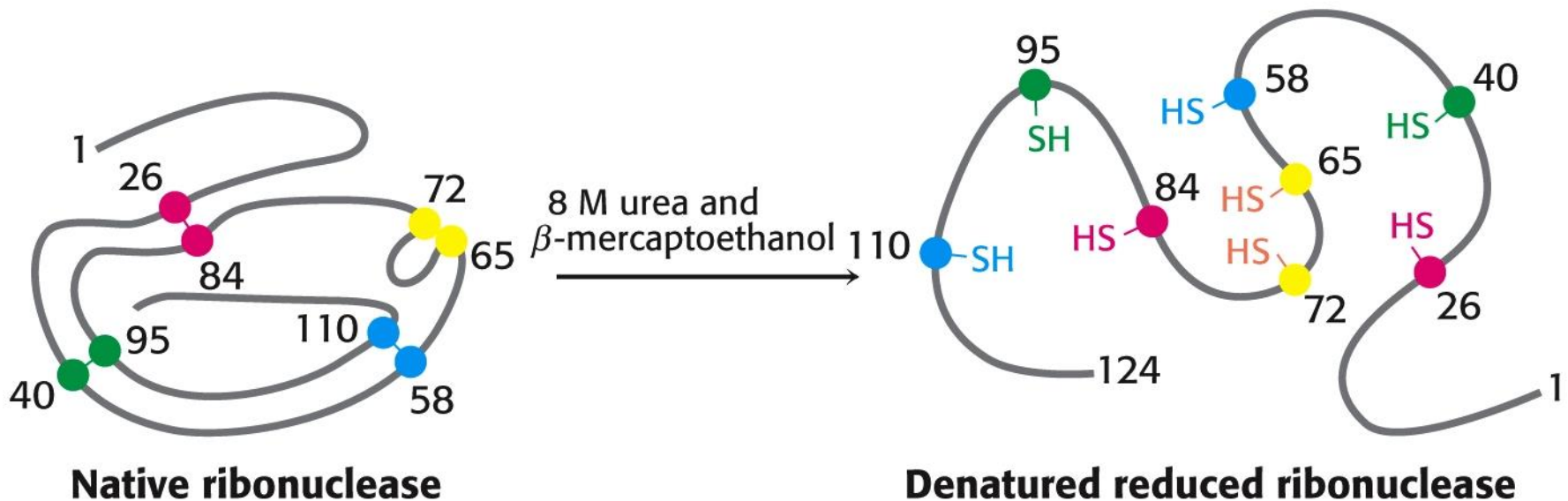
Denaturační činidlo, chlorid guanidinu



Denaturační činidlo, beta mercaptoethanol



Ribonuclease: reduction & denaturation



Patologické důsledky porušení konformace proteinů

- Prions
- Alzheimer disease
- Beta-Thalasseмии

- A prion in the Scrapie form (PrPSc) is an infectious agent composed of protein in a misfolded form.

■ Základ prionové teorie

- Nervové buňky savců obsahují tzv. prionové bílkoviny (v angl. literatuře je častá zkratka PrP, případně PrPC pro zdravou buněčnou bílkovinu). Má se za to, že tyto prionové bílkoviny hrají významnou úlohu při odpočinku a spánku.
- Prion (PrP^{Sc}) představuje vadnou formu této normální bílkoviny, od které se odlišuje rozdílnou konformací (prostorovým uspořádáním). Důsledkem této změny konformace je mimořádná odolnost vůči různým fyzikálním vlivům, prakticky absolutní odolnost proti štěpným enzymům odklízejícím vadné bílkoviny a schopnost navazovat se na zdravé formy prionových bílkovin a konvertovat je na svoji vadnou formu. Následkem je, že se v buňce hromadí rostoucí chuchvalce propojených vadných molekul prionové bílkoviny, kterých se buňka nedokáže zbavit, posléze je zcela zaplněna a uhynie.
- Předchozí část teorie je obecně přijímána. Navazující část je sice přijímána většinou odborníků, nicméně ne absolutně. Ta předpokládá možnost přenosu prionových onemocnění potravou nejen mezi jedinci jednoho druhu (což je též obecně přijímáno – v případě nemoci kuru se to má za dostatečně podložené), ale i mezi jedinci různých druhů, zejména pak se zdůrazňuje přenos ovce (scrapie) – kráva (bovinní spongiformní encefalopatie) a kráva (BSE) – člověk (nová varianta CJD). Zde mají někteří vědci výhrady a nepovažují tuto část teorie za dostatečně prokázanou.[
- K přenosům mezi druhy existuje několik předpokládaných obecností:
- šance na přenos mezi druhy je přímo úměrná podobnosti prionových bílkovin obou druhů
- největší šance na přenos skýtá konzumace mozku či jiných vysoce inervovaných tkání
- masožravci jsou obecně odolnější proti přenosu než býložravci.

Posttranslační modifikace proteinů

- Po syntéze proteinu je často k molekule připojena nebílkovinná složka.
- Některá OH skupina postranního řetězce (Ser, Thr...) je fosforylována.
 - Přes dusík (Asn) nebo kyslík (Ser, Thr) je připojen oligosacharid (glykoproteiny)
- Je připojen acyl mastné kyseliny (lipoprotein), nebo isotrenová skupina (zakotvení proteinu v membráně)
- Je připojena prostetická skupina nutná pro katalytickou funkci (organická molekula, iont kovu ...)
- Částečná proteolýza (inzulin, zymogeny (pepsinogen, chymotrypsinogen ..., virové proteiny)

Zajímavé linky:

3D modely proteinů

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

např. enzym aldolasa

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/mmdb/mmdbsrv.cgi?uid=69559>

Nutné je mít nainstalován plug-in modul Cn3D:

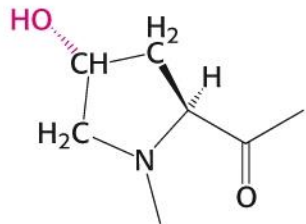
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/CN3D/cn3d.shtml>

Aplikace umožňující porovnávat sekvence proteinů

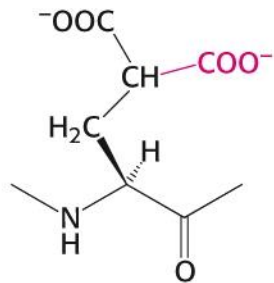
<http://www.jalview.org/examples/applets.html>

<http://www.wehi.edu.au/education/wehitv/>

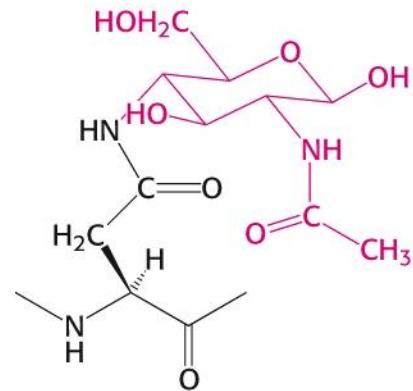
Konečné úpravy: kovalentní modifikace



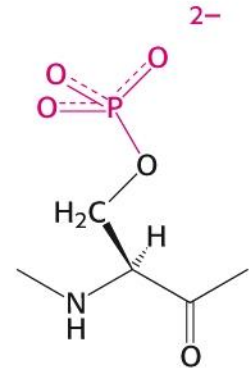
Hydroxyproline



γ-Carboxyglutamate



Carbohydrate-asparagine adduct

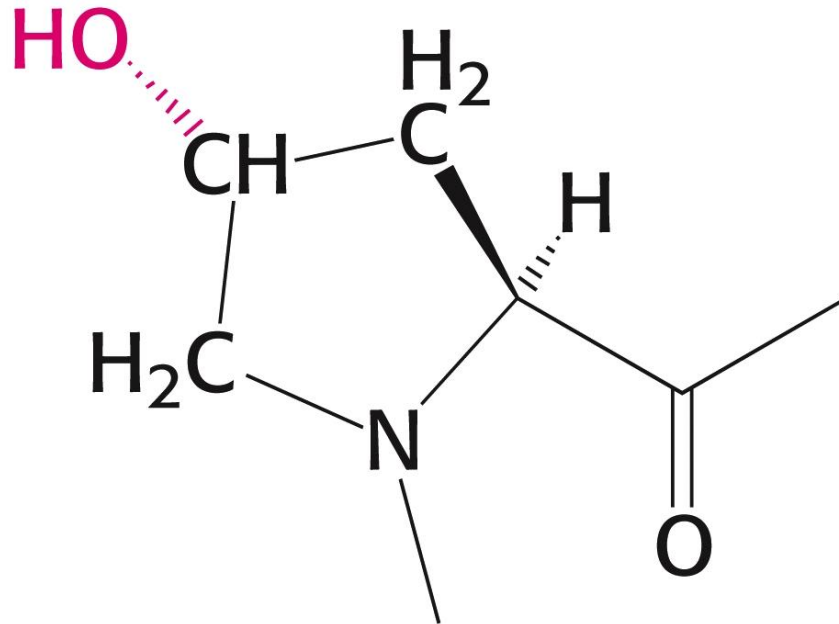


Phosphoserine

Pozměnění funkce po modifikaci AK

Hydroxyprolin

Hydroxylace prolinu



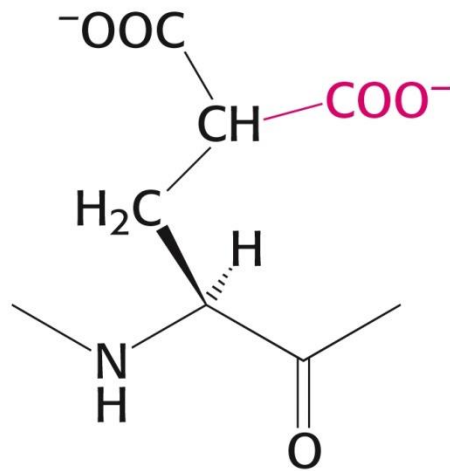
Hydroxyproline

stabilizuje vlákna kolagenu v kostí a pojivové tkáni.

Kurděje: vitamin C nedostatek, vede k nedostatečná hydroxylace

gamma-karboxyglutamat

Karboxylace glutamate v bílkovinách

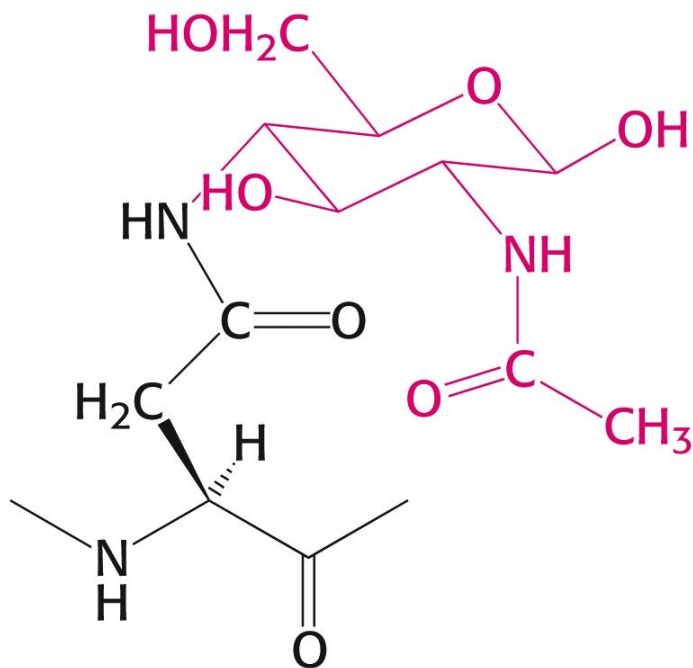


γ -Carboxyglutamate

karboxylace
glutamát v
protrombinový
(srážení bílkovin)

vitamín K
nedostatek vede k
nedostatečná
karboxylace, a
krvácení

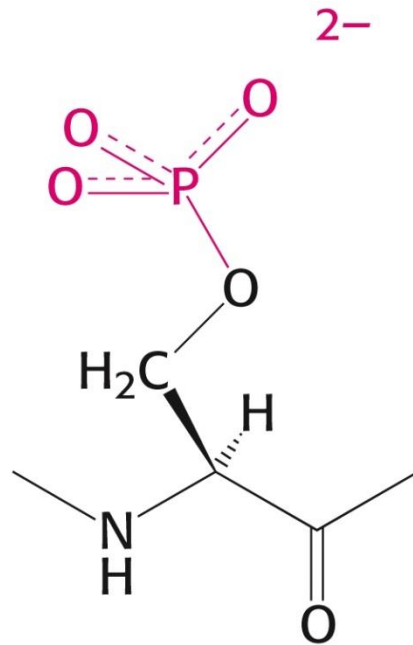
Modifikace cukry - asparagin



**Carbohydrate-asparagine
adduct**

Přídavek cukrů
dělá bílkoviny
více hydrofilní,
a interaktivní
s jinými proteiny

Fosforylace serinu, threoninu, & tyrosinu



Phosphoserine

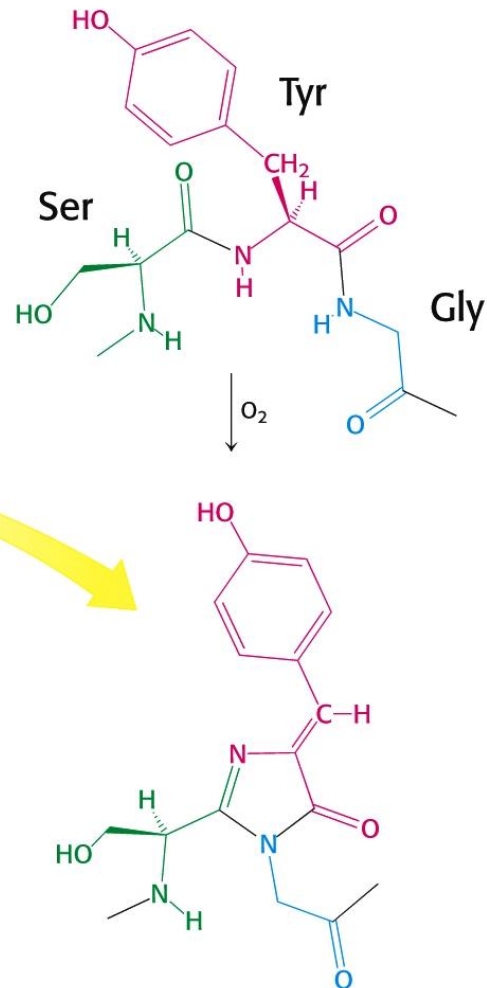
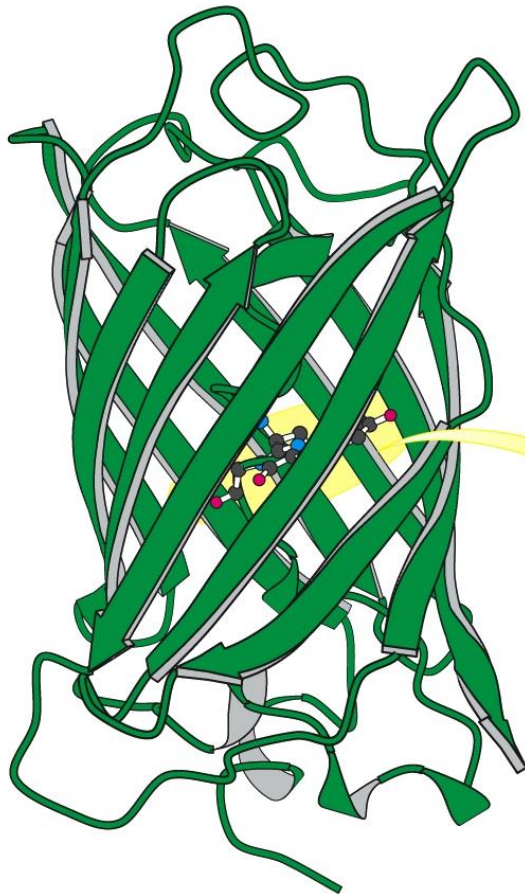
-hormony,
a růstové faktory

fosforylace je
reverzibilní, a tím působí jako,
reverzibilní spínače pro
regulaci buněčné
procesy

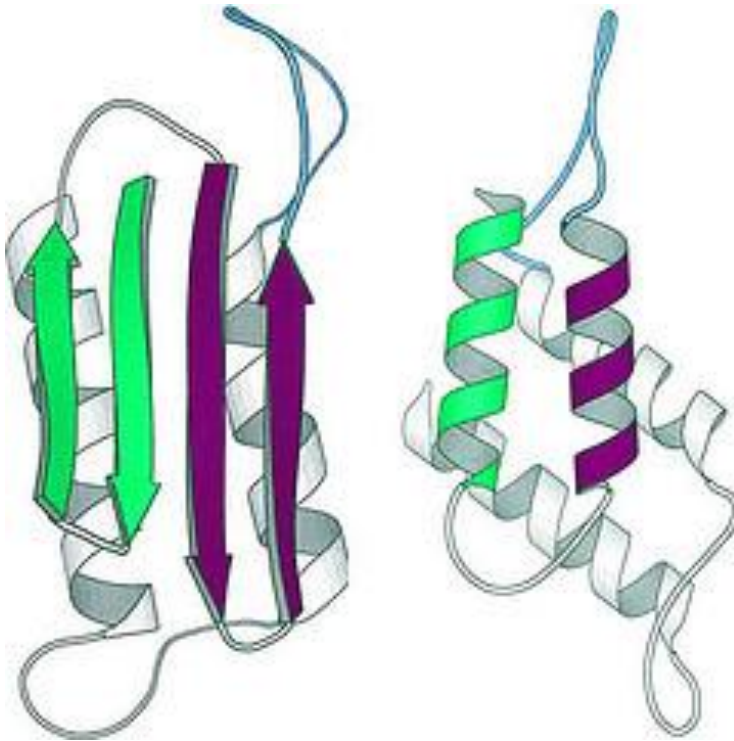
Green fluorescent protein (GFP)

Internal rearrangement and oxidation of Ser-Tyr-Gly; fluorescence

(A)



Denaturace a folding proteinů



- Denaturace je změna 3D struktury proteinu vedoucí ke ztrátě jeho biologické aktivity. Je možná renaturace (refolding), což je důkazem, že správná 3D konformace řetězce je dána jeho primární strukturou.
- Konformace prionového proteinu: vlevo nezdravá, vpravo zdravá
- Aby při syntéze některých proteinů bylo dosaženo vysokého výtěžku správně sbalených molekul je nutný tzv. asistovaný folding, kdy je správné sbalení podporováno skupinou specializovaných proteinů (enzymů) zvaných chaperony.

Skládání proteinů

- Molecular chaperones- correct folding
- HSP70

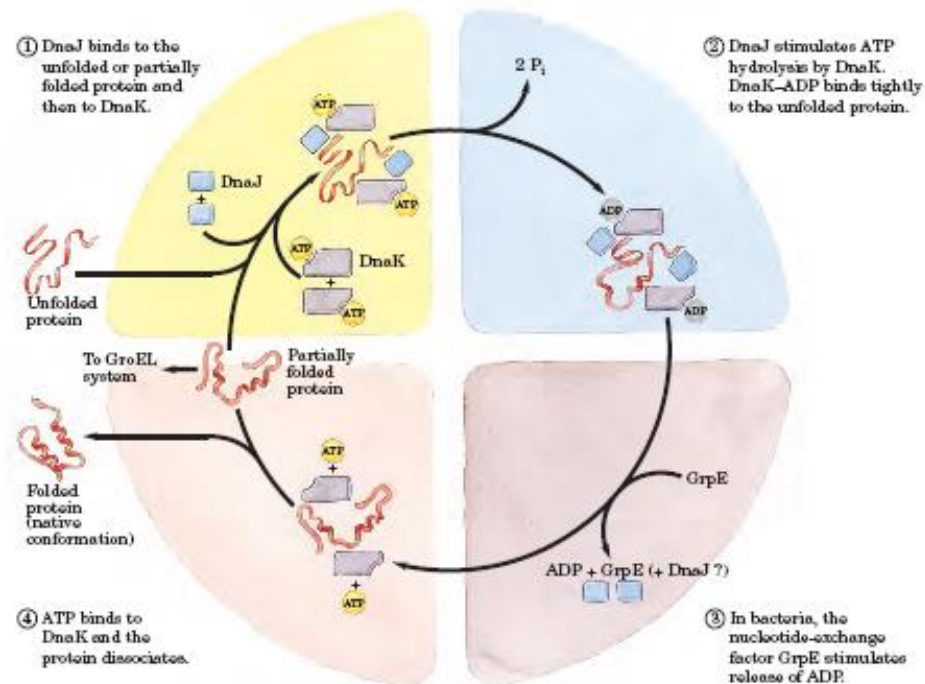


FIGURE 4-30 Chaperones in protein folding. The cyclic pathway by which chaperones bind and release polypeptides is illustrated for the *E. coli* chaperone proteins DnaK and DnaJ, homologs of the eukaryotic chaperones Hsp70 and Hsp40. The chaperones do not actively promote the folding of the substrate protein, but instead prevent aggregation of unfolded peptides. For a population of polypeptides, some

fraction of the polypeptides released at the end of the cycle are in the native conformation. The remainder are rebound by DnaK or are diverted to the chaperonin system (GroEL; see Fig. 4-31). In bacteria, a protein called GrpE interacts transiently with DnaK late in the cycle (step ③), promoting dissociation of ADP and possibly DnaJ. No eukaryotic analog of GrpE is known.

Chaperon

- je speciální protein, který v buňce pomáhá skládat většinu bílkovin do jejich správného prostorového uspořádání. Tím tedy těmto proteinům umožňují vykonávat jejich funkci v buňce. Chaperony se vyskytují jak v eukaryotických buňkách, tak i u bakterií a v mitochondriích.^[1]
- Chaperony jsou strážci, kteří kontrolují a zabezpečují správnou prostorovou strukturu proteinů a brání vzniku nesprávných vazeb. Chaperony hsp60 dokonce umí špatně sbalené proteiny opět rozbalit.
- Je známo, že funkce bílkovin obecně není dána pouze jejich primární strukturou, ale z velké části také terciární strukturou. Právě složení do této terciární struktury je kontrolováno z velké části chaperony. V podstatě se jedná o dosažení optimální prostorové organizace molekuly proteinu. Chaperon však není součástí výsledného proteinu, nýbrž se po vykonání své činnosti opět odpojí.
- Jak molekulové chaperony fungují, není zatím dostatečně dobře známo, ale některé z nich jsou ATPázy, které se váží k proteinům, a tím umožňují jejich uvolnění za vzniku energie v podobě ATP. K významným molekulárním chaperonům patří tzv. proteiny tepelného šoku (heat shock proteiny).

