

Funkce proteinů

Lubomír Janda

Funkce proteinů

- I. —● 1. Enzymatická/enzymy/katalýza
- II. —● 2. Receptorová/signalizace/
- 3. Převážná/transportní/vazba-transport
- III. —● 4. Strukturní/zpevňovací/strukturní komponenty/
- 5. Aktivní pohyb/kontrakční/motor-proteiny
- 6. Hormonální/hormony/regulace
- 7. Obranná/specializovaná/imunitní systém/transkripční regulace
- IV. —● 8. Zásobní

I. Enzymy

II. Protein-interakce s ligandem

III. Protein-interakce s dalším proteinem nebo DNA

IV. Zásobní – zdroj energie, uhlíku nebo dusíku.

Postranslační modifikace proteinů.

- Fosforylace (S,T,Y,H,D,K,R)
- Glykosylace (pentosy, deoxyhexosy, hexosaminy, hexosy, N-acetylhexosaminy, kyselina sialová)
- Mastnými kyselinami (myristoylace, stearoylace, farnesylace, palmitoylace, geranylgeranylace, kyselina lipoová).
- Nitrosylace (C)
- Oxidace (C) – disulfidové můstky
- Methylace, formylace, acetylace
- Deamidace (Q,N)/carboxylace (E/D) -p
- Biotinylace
- Pyroglutamová kyselina (QQ) -p

Chemická stabilita fosforylovaných aminokyselin

+ ,stabilní fosfoaminokyseliny;

– , labilní fosfoaminokyseliny.

Fosfoaminokyseliny	Stabilita - prostředí	
	Kyselé	Zásadité
O-fosfát		
Fosfoserine	+	–
Fosfothreonine	+	±
Fosfotyrosine	+	+
N-fosfát		
Fosfoarginine	–	–
Fosfohistidine	–	+
Fosfolysin	–	+
Acyl-fosfát		
Fosfát kyseliny asparagové	–	–

Klumpp, S.; Krieglstein, J. *Eur. J. Biochem.* **2002**, 269, 1067.

Funkce proteinů

- I. —● 1. Enzymatická/enzymy/katalýza
- II. —● 2. Receptorová/signalizace/
- 3. Převážná/transportní/vazba-transport
- III. —● 4. Strukturní/zpevňovací/strukturní komponenty/
- 5. Aktivní pohyb/kontrakční/motor-proteiny
- 6. Hormonální/hormony/regulace
- 7. Obranná/specializovaná/imunitní systém/transkripční regulace
- IV. —● 8. Zásobní

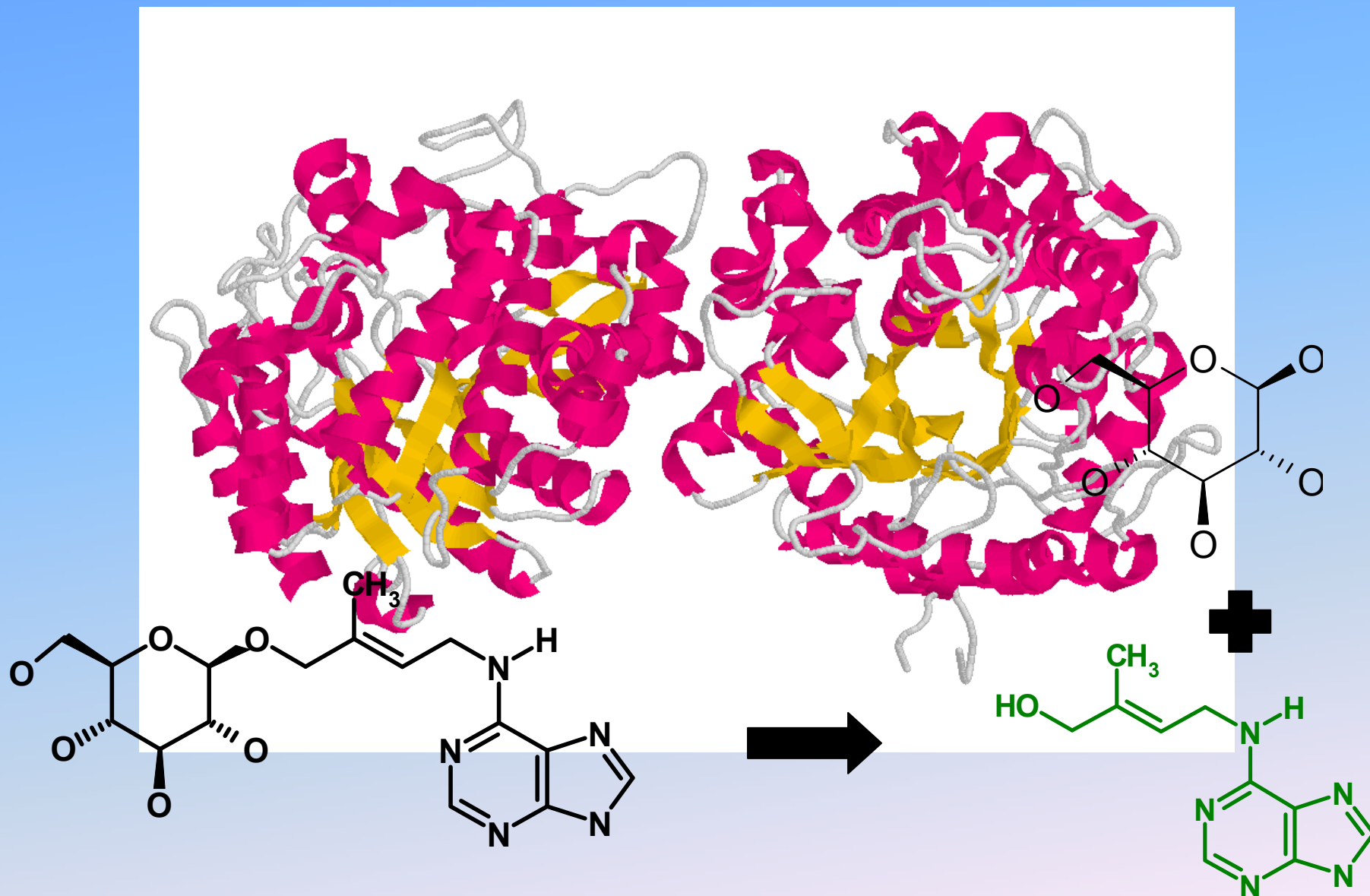
I. Enzymy

II. Protein-interakce s ligandem

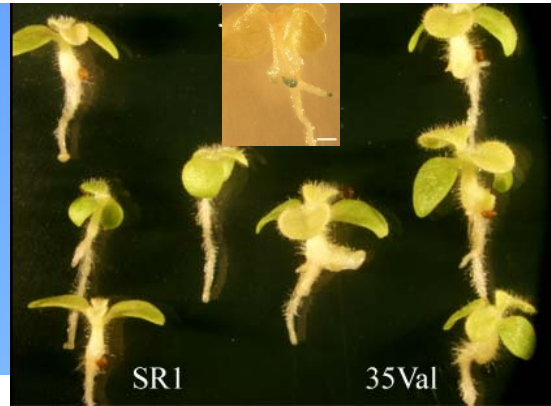
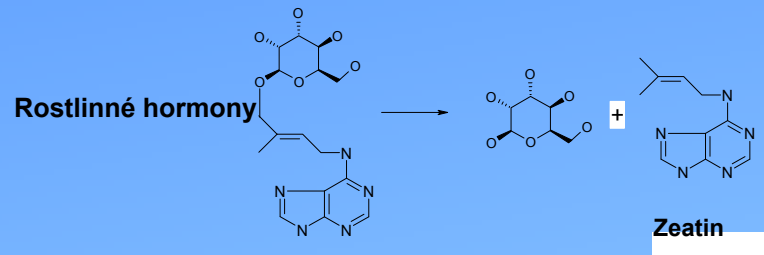
III. Protein-interakce s dalším proteinem nebo DNA

IV. Zásobní – zdroj energie, uhlíku nebo dusíku.

β -glukosidáza Zm-p60.1



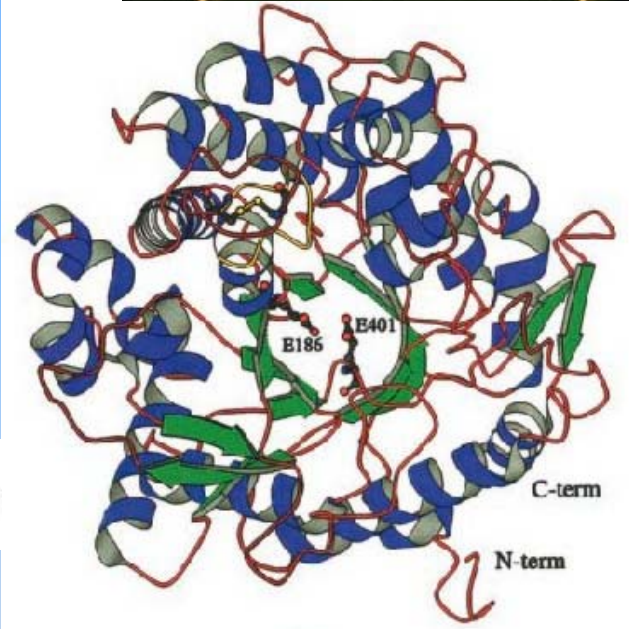
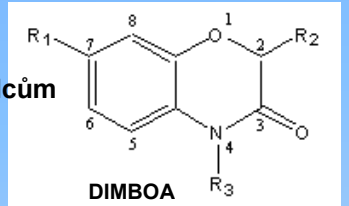
Cytokininy



Obranné látky

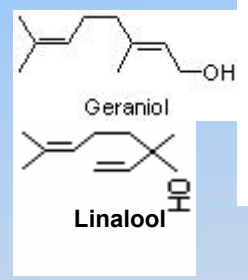
R1=OCH3; R2=R3= OH

S účinkem proti škůdcům



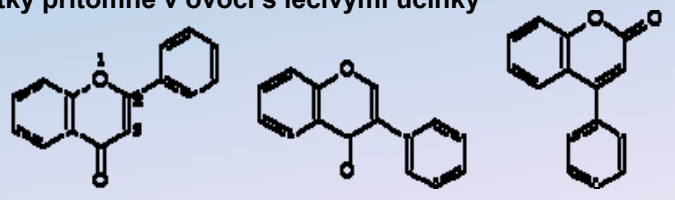
Terpeny

Látky tvořící aroma vína a ovocných extraktů



Flavonoidy

Látky přítomné v ovoci s léčivými účinky



Quercetin, Naringenin, Daidzein, Resveratrol, Luteolin



Nová metoda pro studium kinetických parametrů vzácných glukozidů

Velmi rychlá procedura
(doba měření 3s)
Citlivost 100 nM glukóza
Malá spotřeba vzorku
(reakční objem 150 μL)

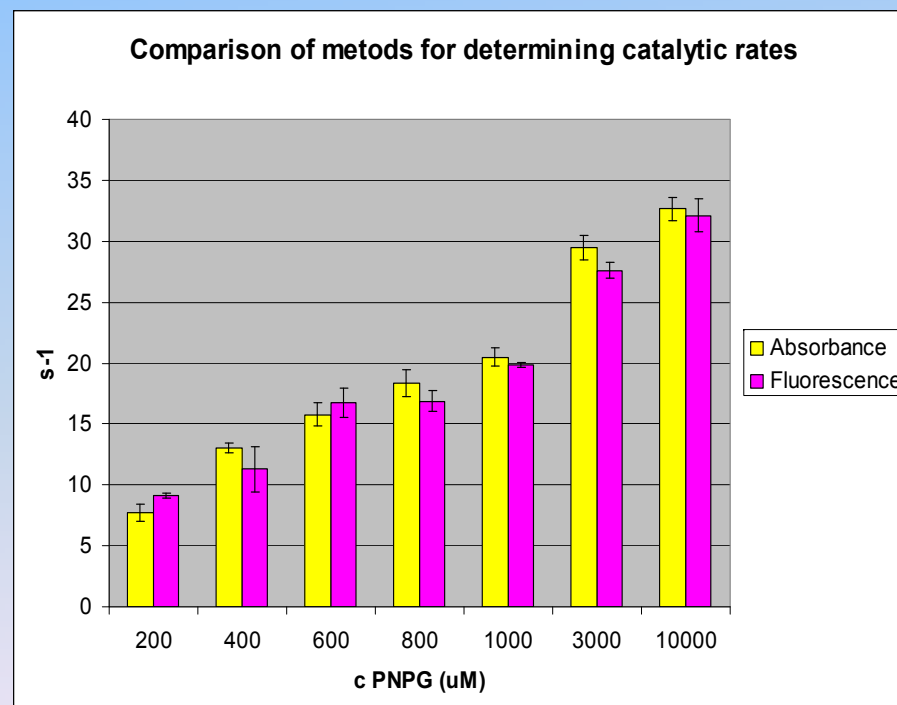
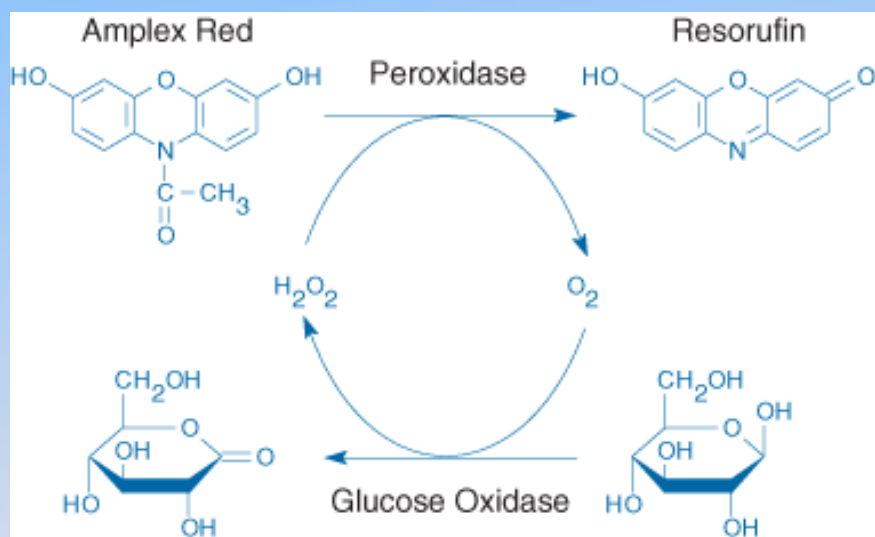
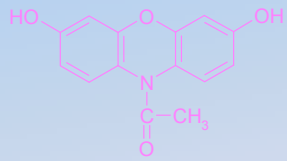
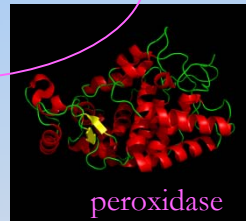
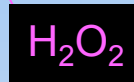
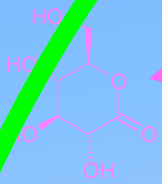
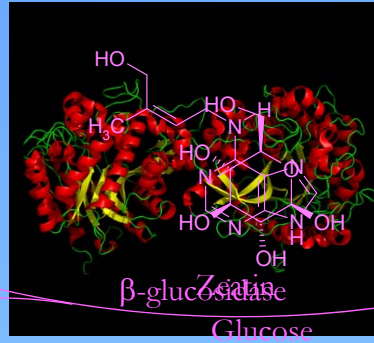
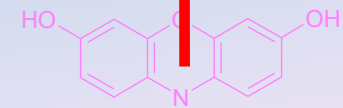


Schéma metody



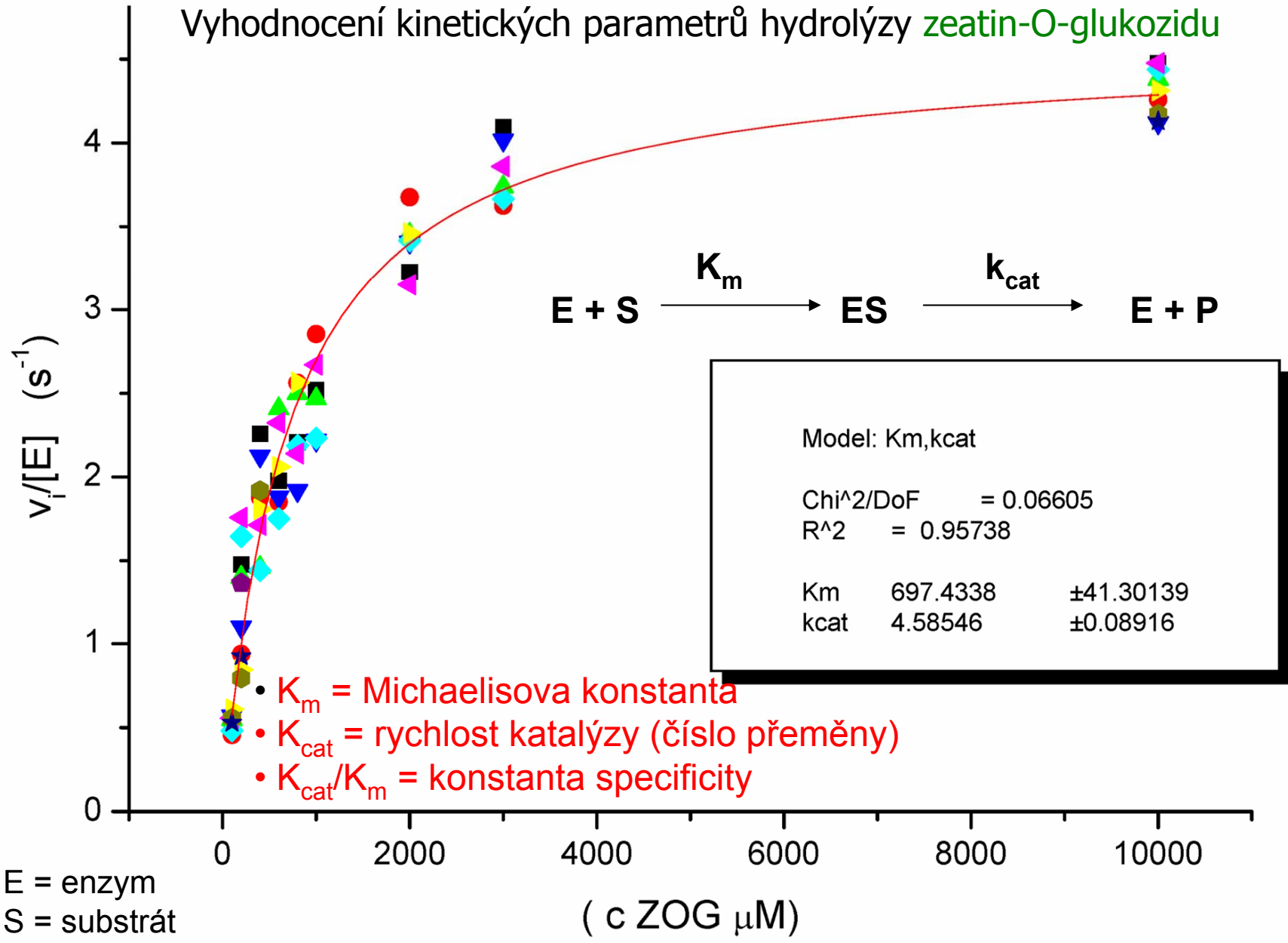
Amplex Ultra Red

Fluorimeter



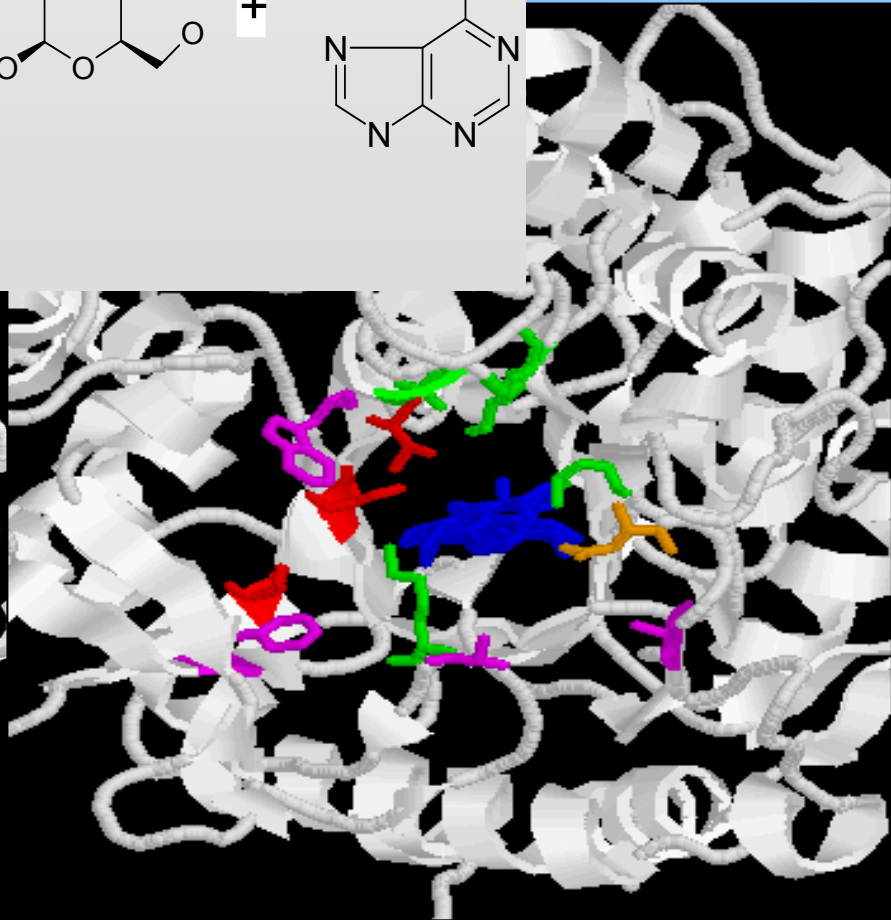
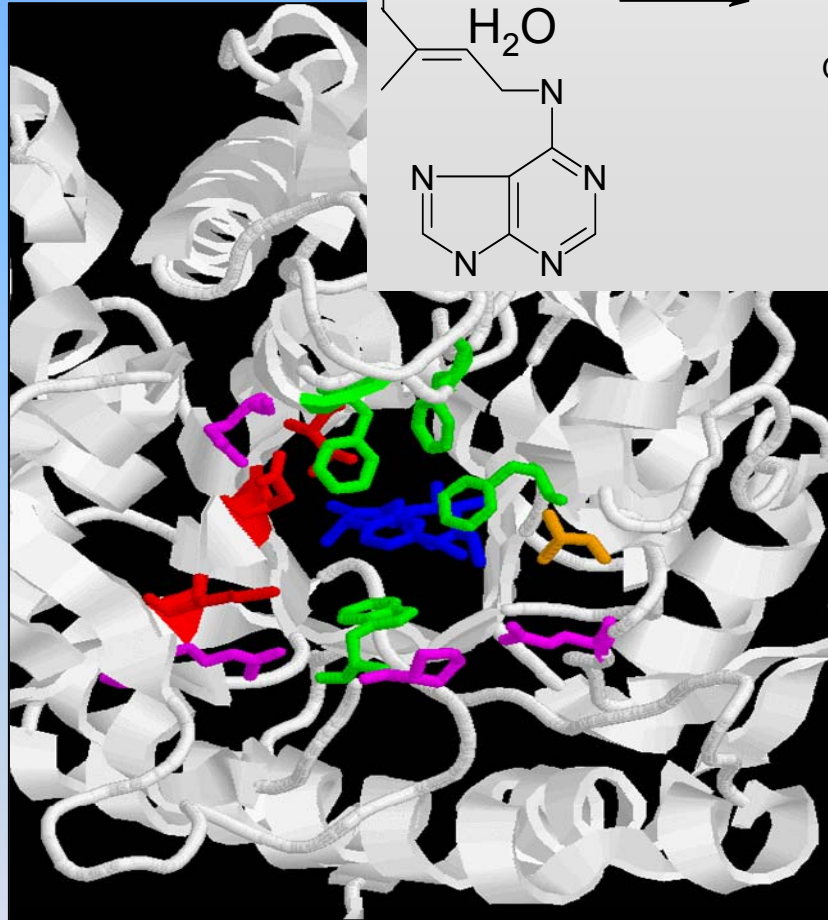
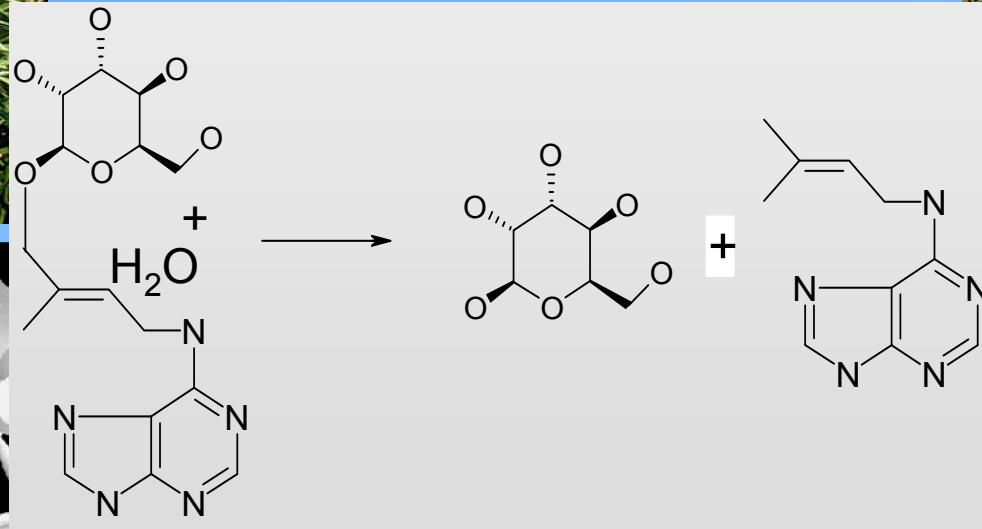
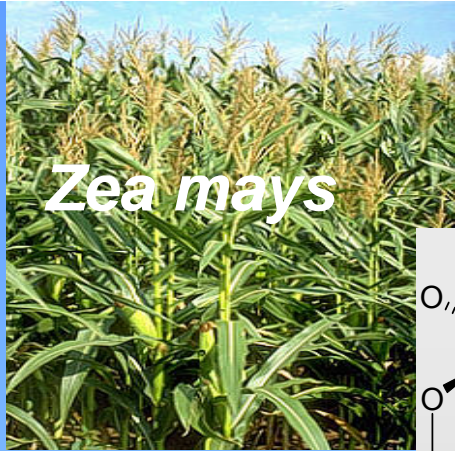
Resorufin

Vyhodnocení kinetických parametrů hydrolýzy zeatin-O-glukozidu

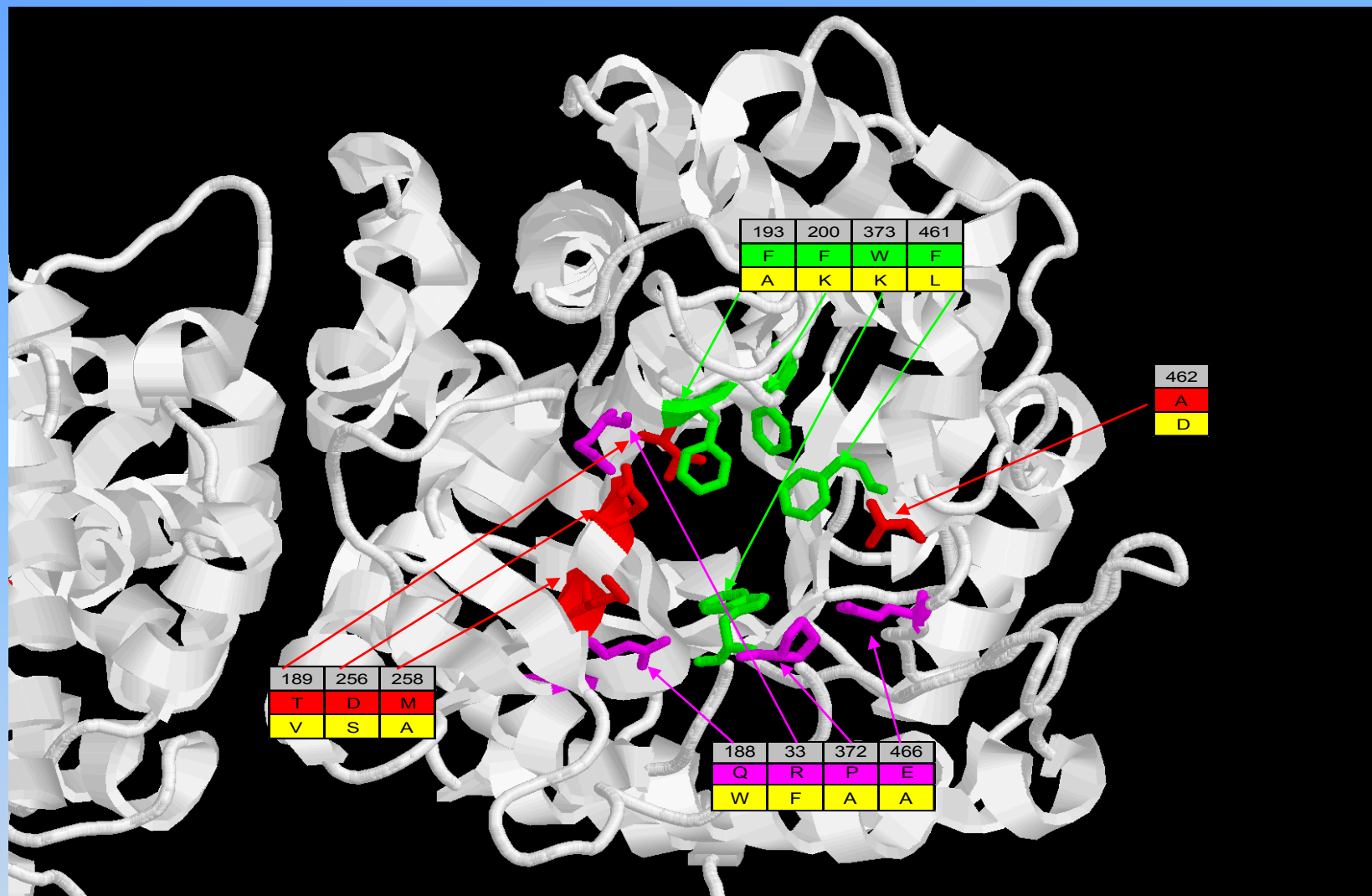


- K_m = Michaelisova konstanta
- K_{cat} = rychlost katalýzy (číslo přeměny)
- K_{cat}/K_m = konstanta specificity

E = enzym
 S = substrát
 ES = enzyme-substrát komplex (přechodný stav)
 P = produkt



Návrh mutageneze



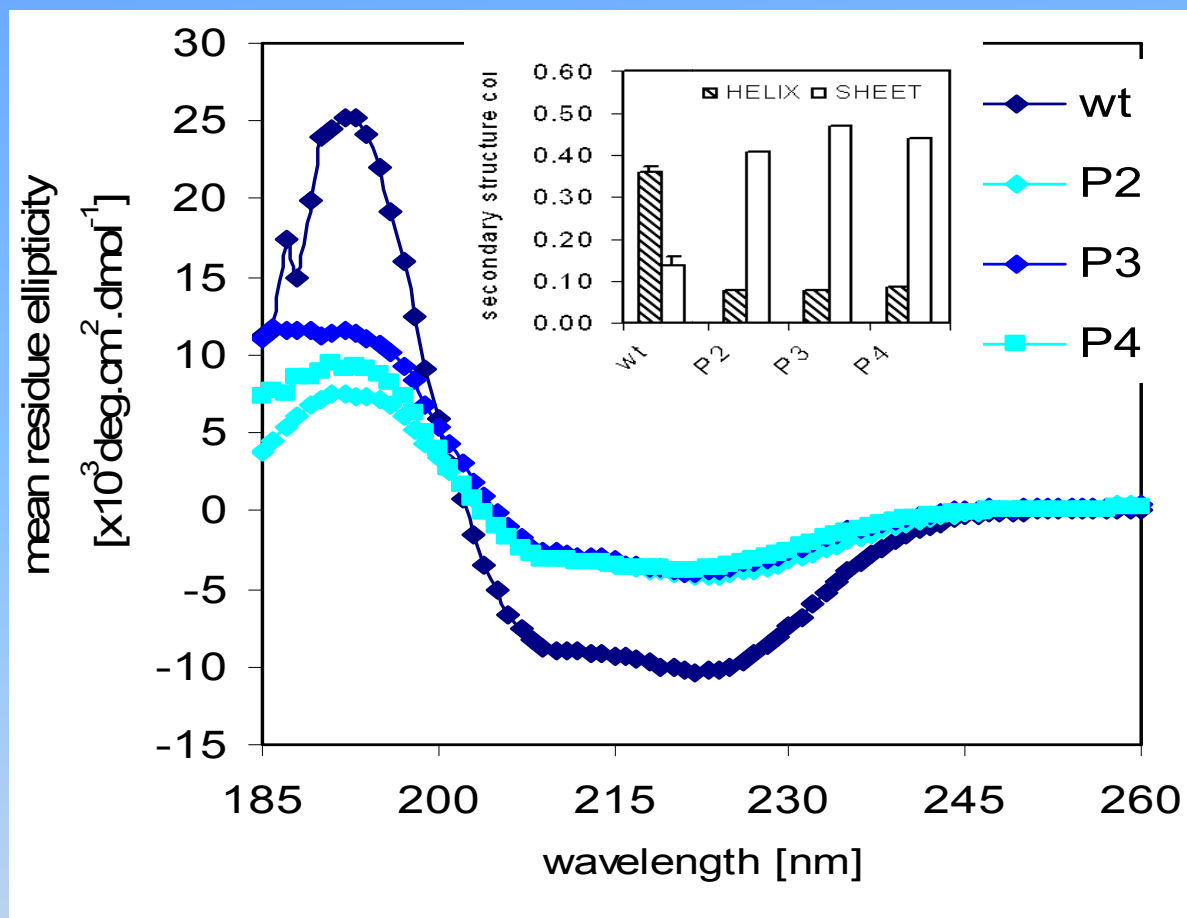
P2 (F193A, F200K, W373K, F461L)

P3 (F193A, F200K, W373K, F461L, T189V, D256S, M258A, A462D)

P4 (F193A, F200K, W373K, F461L, T189V, D256S, M258A, A462D, Q188W, R331F, P372A, E466A)

F193A, F200K, W373K, F461L

Vícenásobná mutantní analýza enzymu



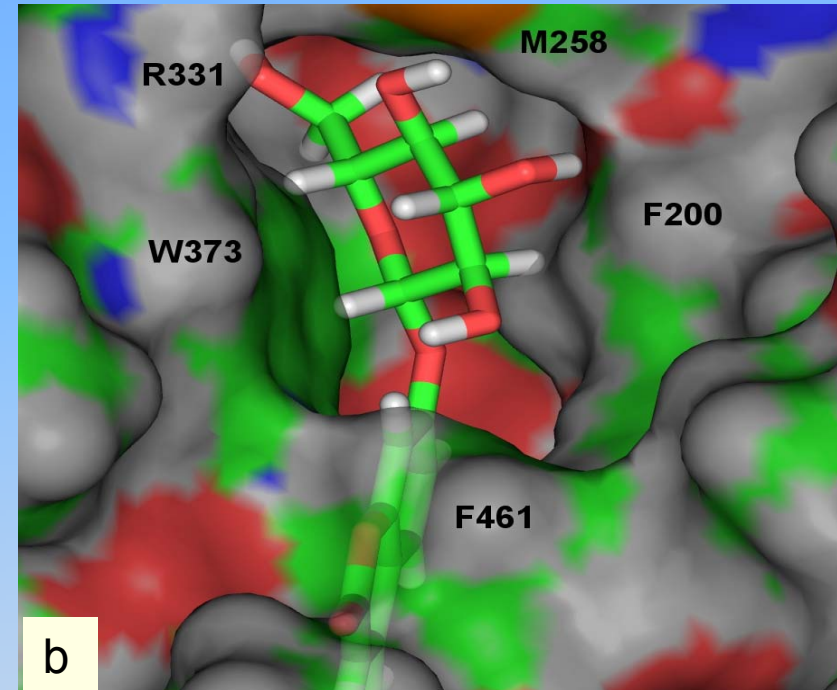
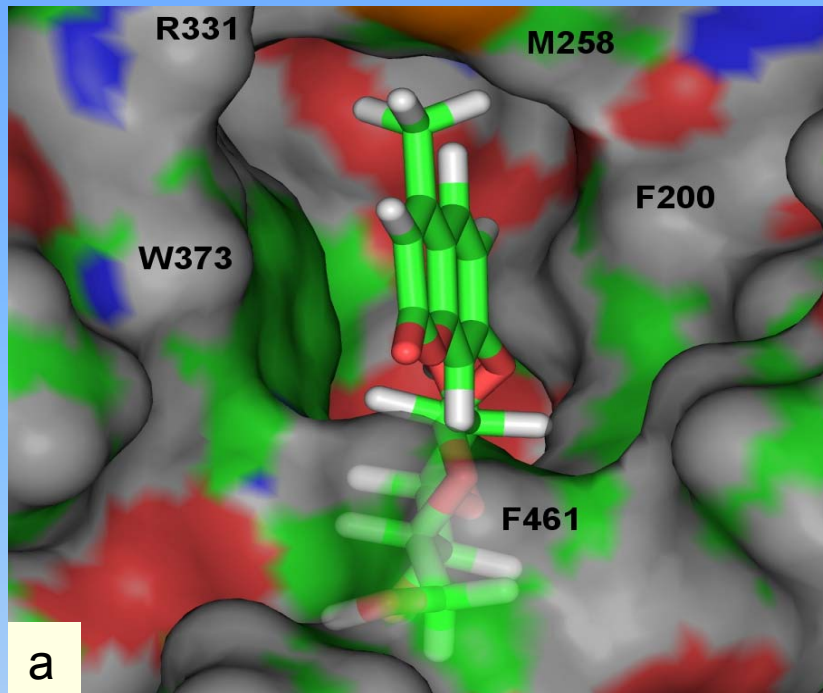
Vzdálená-UV spektra cirkulárního dichroismu divokého typu a jeho mutant P2, P3 and P4.

P2 (F193A, F200K, W373K, F461L)

P3 (F193A, F200K, W373K, F461L, T189V, D256S, M258A, A462D)

P4 (F193A, F200K, W373K, F461L, F189V, D256S, M258A, A462D, Q188W, R331F, P372A, E466A)

Molekulární modelování enzym-substrát komplexu



Pohled do aktivního místa mutantu F193A (a) s produktivní a (b) ne-produktivní vazbou substrátu (v tomto případě se jedná o MUG).

Kinetické parametry původní β -glukosidázy a jejích mutantů

Enzyme	<i>pNPGlc</i>			relative efficiency	
	K_m	k_{cat}	k_{cat}/K_m		
WT	0.68 ± 0.03	42.80 ± 0.56	63.0	100.0	This work
F200K	3.50 ± 0.22	2.43 ± 0.05	0.7	1.1	This work
W373K	2.10 ± 0.21	0.63 ± 0.02	0.3	0.5	This work
F461L	0.65 ± 0.05	49.27 ± 1.15	75.8	120.3	This work

F193A	0.045 ± 0.0035	0.22 ± 0.003	4.9	7.8	This work
F193V	0	0	0	0	Verdoucq et al. 2003
F193I	1.76 ± 0.06	0.84	0.48	1	Zouhar et al. 2001
F193Y	1.29 ± 0.01	17.3	13.6	21.5	Zouhar et al. 2001
F193W	1.61 ± 0.17	31	19.5	30.9	Zouhar et al. 2001

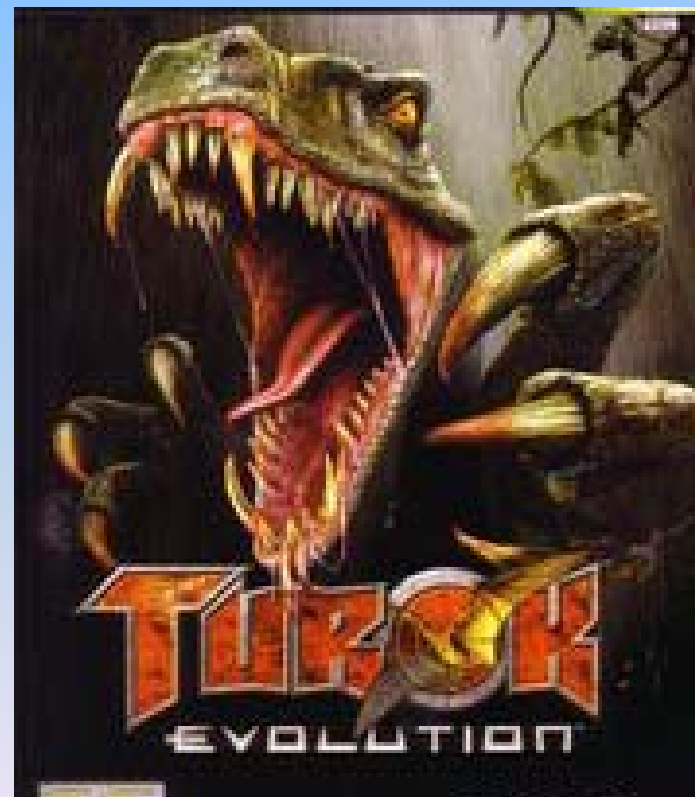
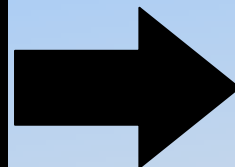
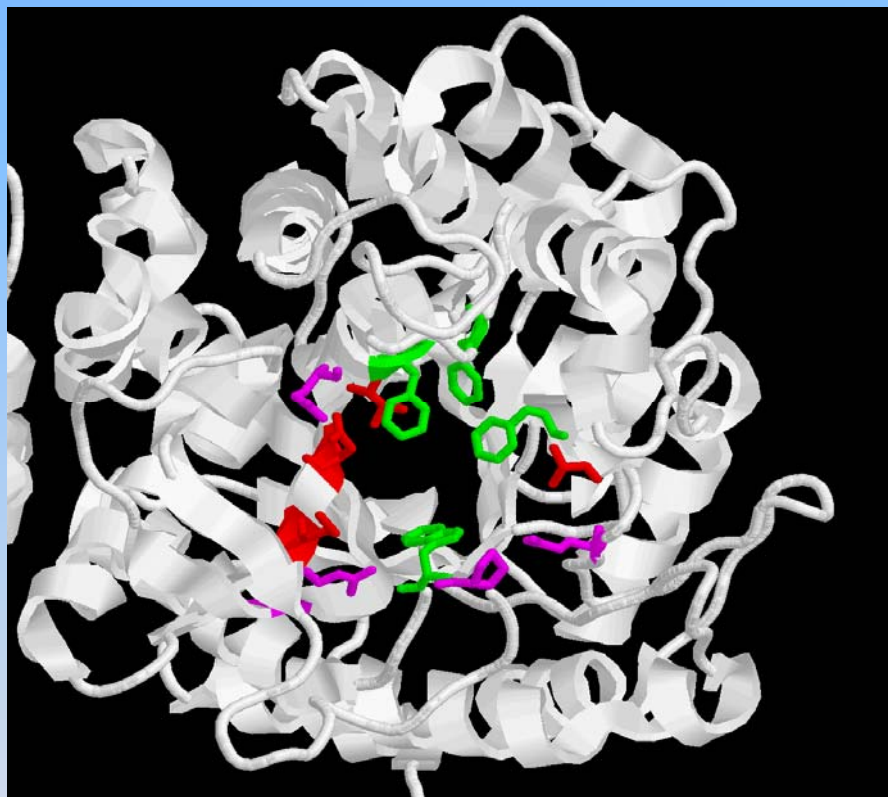
Enzyme	<i>MUG</i>			relative efficiency	
	K_m	k_{cat}	k_{cat}/K_m		
WT	0.148 ± 0.013	53.60 ± 1.09	362.16	100.000	This work
F200K	1.510 ± 0.101	1.87 ± 0.05	1.24	0.342	This work
W373K	1.736 ± 0.125	0.22 ± 0.01	0.127	0.035	This work
F461L	0.164 ± 0.019	70.88 ± 2.16	432.19	119.337	This work

F193A	0.120 ± 0.012	1.29 ± 0.04	10.75	2.968	This work
F193V	0.23 ± 0.1	3.4 ± 0.8	14.8	4.1	Verdoucq et al. 2003
F193I	1.23 ± 0.08	23.2 ± 0.86	18.9	5.2	Rotrekl et al, unpublished result
F193Y	1.22 ± 0.24	68.4 ± 4.9	56.1	15.5	Rotrekl et al, unpublished result
F193W	1.34 ± 0.015	34 ± 1.78	25.4	7.0	Rotrekl et al, unpublished result

Řízená evoluce – vícenásobné mutanty

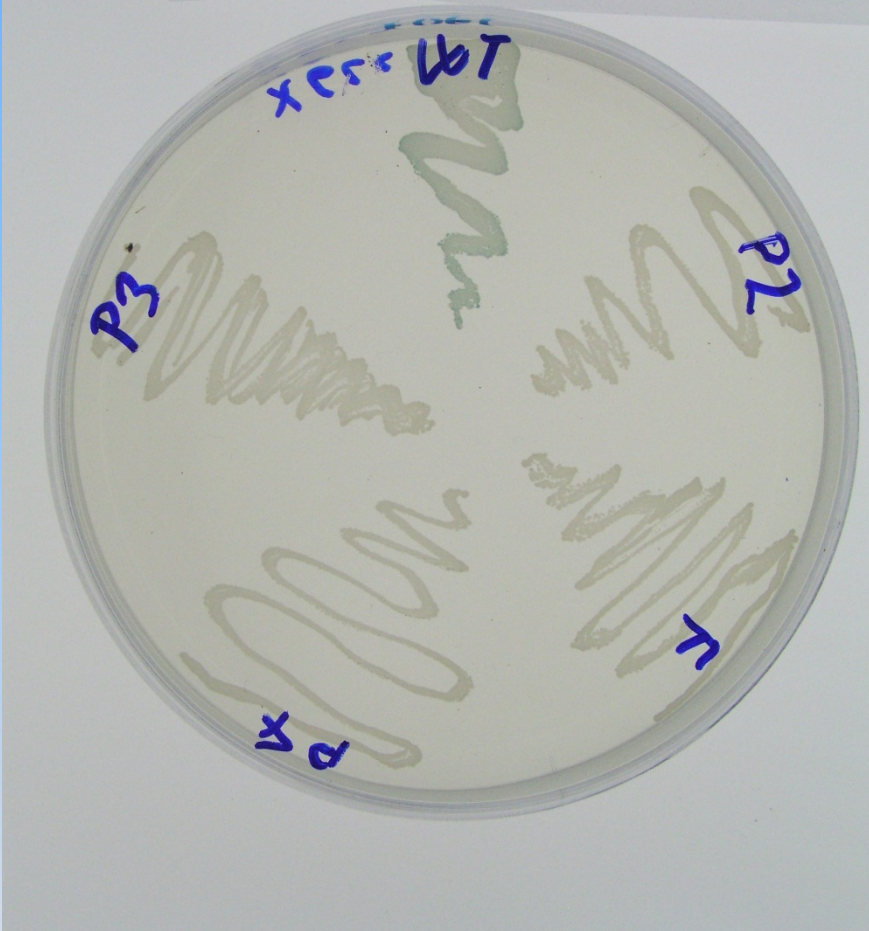
Studium změn stability a substrátové specifity

Pokus o obnovení struktury a funkce některých mutovaných enzymů



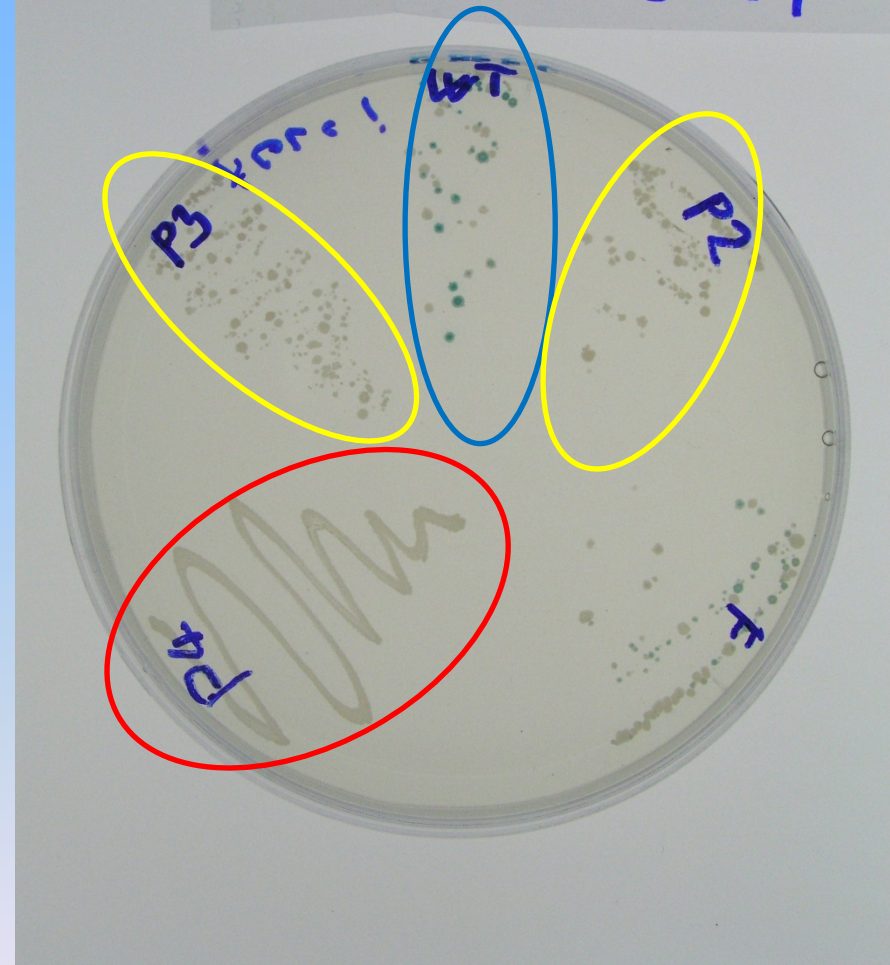
E. coli neindukované

X-GLC



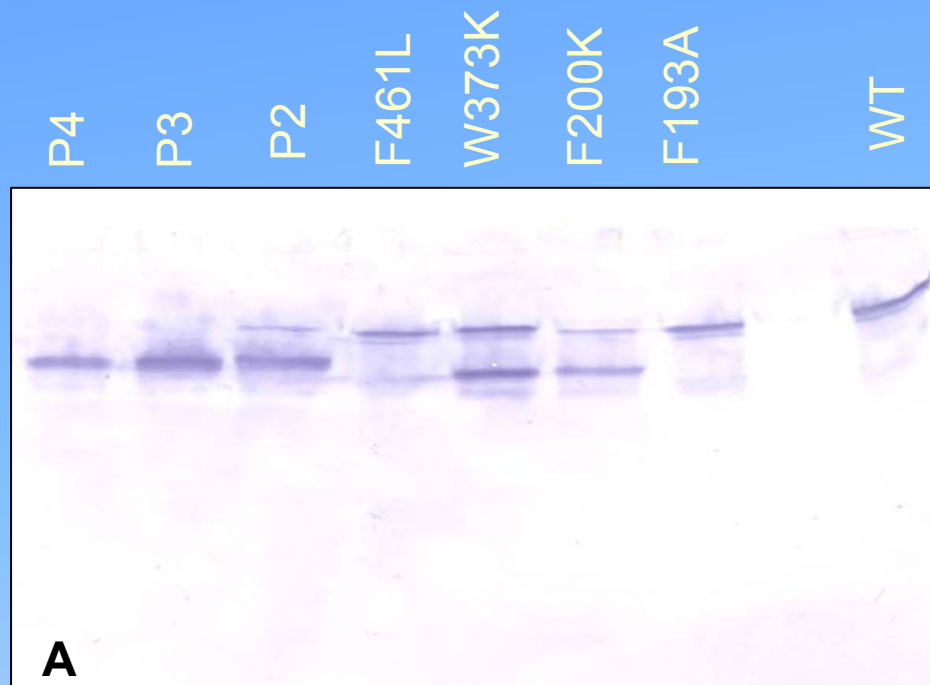
E. coli indukované

X-GLC i



IPTG 100uM

Detekce aktivity enzymu na gelu



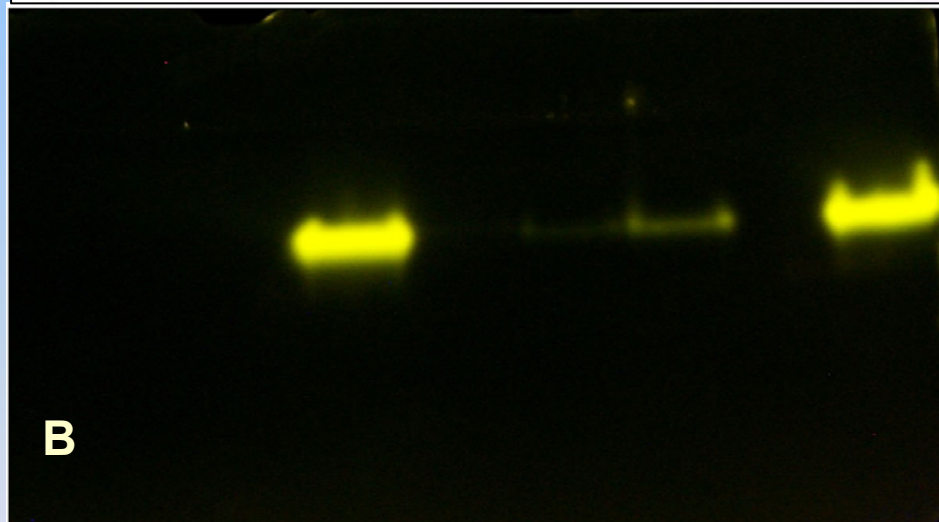
← Dimer – modifikace?

← Monomer – nemodifikovaný?

Divoky typ a mutanty byly analyzovány na dvou paralelních gelech **10% nativním PAGE**.

První gel (**A**) byl barven pomocí Coomassie modře.

Druhý gel (**B**) byl barven pomocí fluorogenního substrátu 4-methylumbelliferyl- β -D-glukosidu.



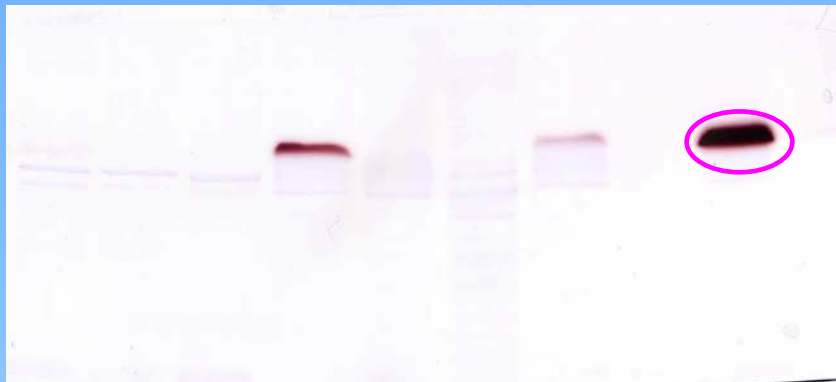
Je to dimer?????

Dimerová forma 120 kDa

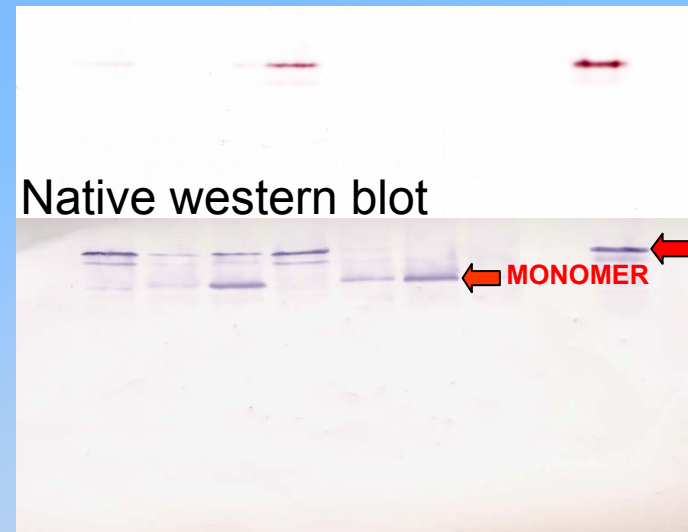
Monomerní forma 60 kDa

Activity in gel staining

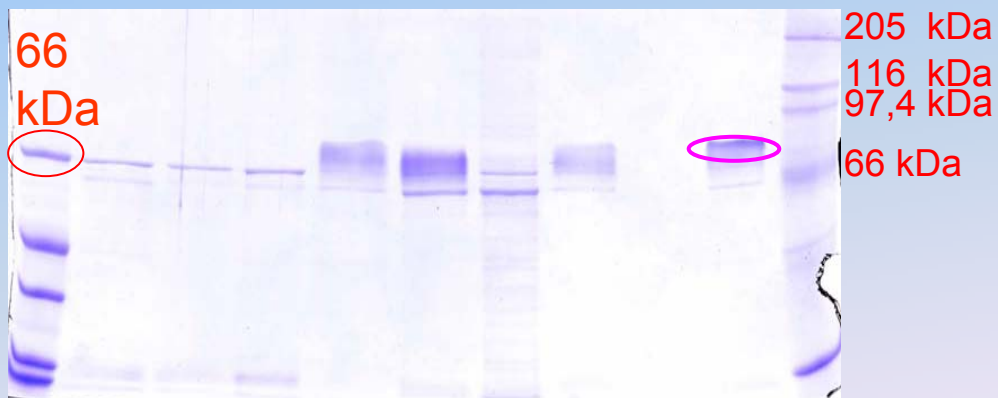
10% SDS PAGE



10% NATIVE PAGE



10 % SDS PAGE - CB staining



Srovnání rostlinných beta-glukosidáz

maize

Dhurrinase

Avena

oat

Secale

Prunus

amygdalin

Costus

Furost. glyc.26-O-b-gluc Costus

Arab. thal. 6-P-beta galact.

Arab. thal. put b-glucosid

Arab. thal. b-glucosid 1

Arab. thal. b-glucosid 2

Arab. thal. b-glucosid 3

Arab. thal. b-glucosid like prot

Arab. thal. amygdalin like prot

Arab. thal. b-glucosid 4

Arab. thal. b-glucosid 5

Ar thal hydr.O-glycosyl comp.

Arab. thal. 6-P-beta galact

Arab. thal. amygdalin like prot

LLENGIPEYV TIFHWDVPQA LEEKYGGFLD KSHKSIVED

LLENGIPEYI TIFHWDTPQA LVEAYGGFLD E...RIIKD

LIENGIKPYI TLFHWDTPQA LADKYNDFLD R...RIVKD

LIENGIKPYI TLFHWDTPQA LADEYKDFLD R...RIVKD

LIRHGIVPYV TIWHWDTPQA LEDKYGGFLD K...QIVND

LKSNDIEPLV TLFHWDVPQA LEEKYGGVLS P...RIVDD

ILRNGLKPFV TIYHWDLPQA LEDEYGGFLS P...NIVDH

LLKNGIRPMV TLFHWDVPQA LEDSYKGFERS S...EIVND

LLKNGIRPMV TLFHWDVPQA LEDSYKGFERS S...EIVND

LLSKGIKPPFA TIFHWDTPQD LEDAYGGFRG A...EIVND

LLSKGIKPPFA TIFHWDTPQD LEDAYGGFRG A...EIVND

LLSKGIKPPFA TIFHWDTPQS LEDAYGGFFG A...EIVND

LLSKGIKPPFA TIFHWDTPQS LEDAYGGFLG A...EIVND

LLSKGIKPPFA TMFHWDTPQA LEDAYGGFRG A...EIVND

LISKGVKPFV TLFHWDLPDA LENAYGGLLG D...EFVND

LISNGIRPLV TLFHWDTPQA LEDEYGGFLN P...QIVKD

LVANGIEPSM TLYHWDHPQS LEDEYGGFLS P...QIVED

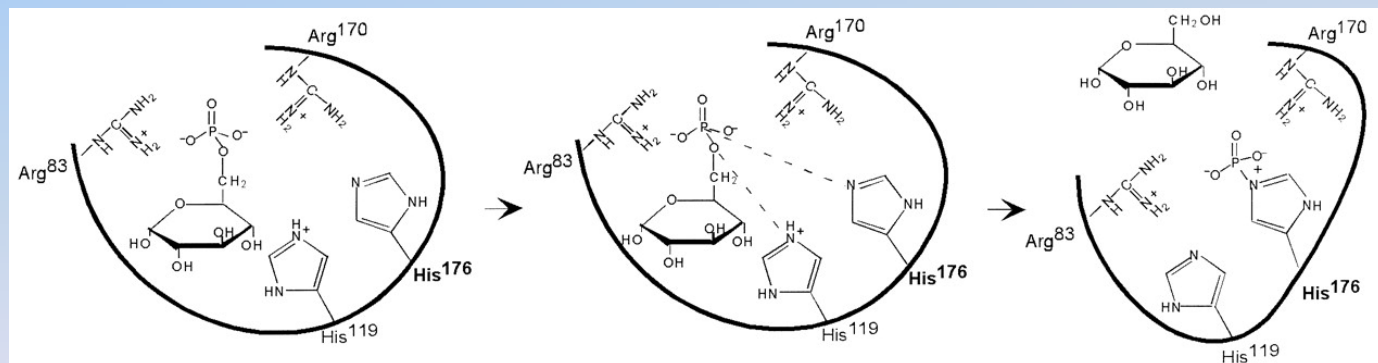
LIANGIQPSV TLYHWDHPQA LEDEYGGFLN P...QIIED

LIENGIKPFV TIYHWDIPQA LDDEYGSFSL P...RIIDD

LLANEITPLV TIFHWDIPQD LEDEYGGFLS E...QIIDD

LLAKGIEPYV TLYHWDLPQA LHDRYLGWLN P...QIIND

Předpokládaná úloha of Arg83, His119, Arg170, a His176 při G6Pázovém reakčním mechanismu



Ghosh, A. et al. J. Biol. Chem. 2002;277:32837-32842

Funkce proteinů

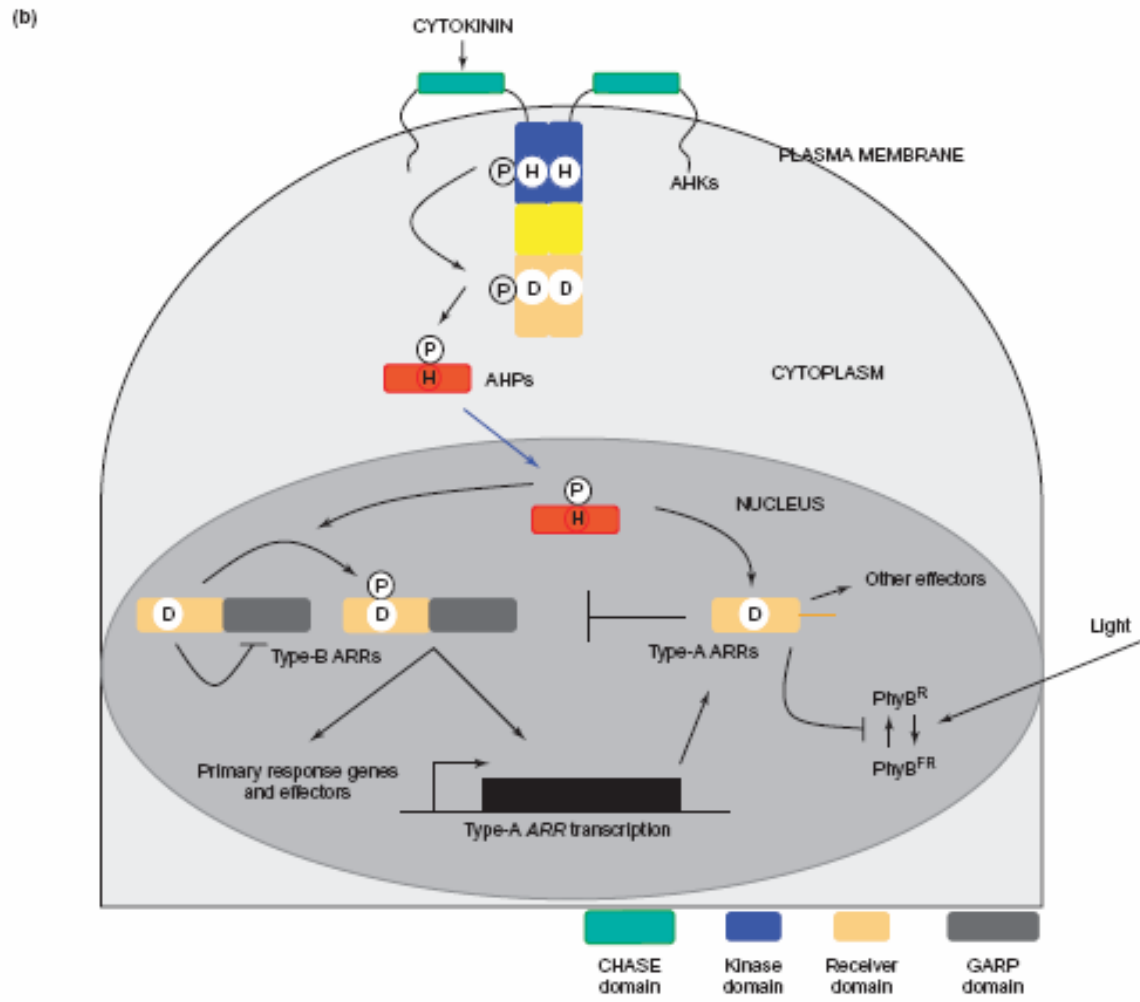
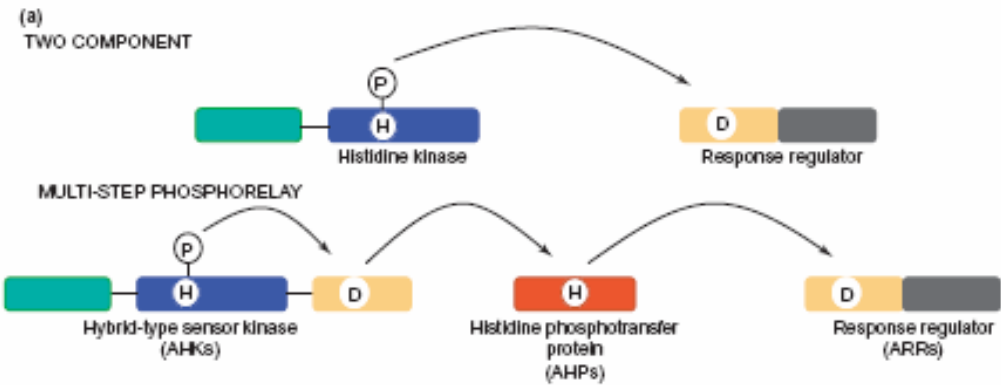
- I. —● 1. Enzymatická/enzymy/katalýza
- II. —● 2. Receptorová/signalizace/
- 3. Přepravní/transportní/vazba-transport
- III. —● 4. Strukturní/zpevňovací/strukturní komponenty/
5. Aktivní pohyb/kontrakční/motor-proteiny
6. Hormonální/hormony/regulace
7. Obranná/specializovaná/imunitní systém/transkripční regulace
- IV. —● 8. Zásobní

I. Enzymy

II. Protein-interakce s ligandem

III. Protein-interakce s dalším proteinem nebo DNA

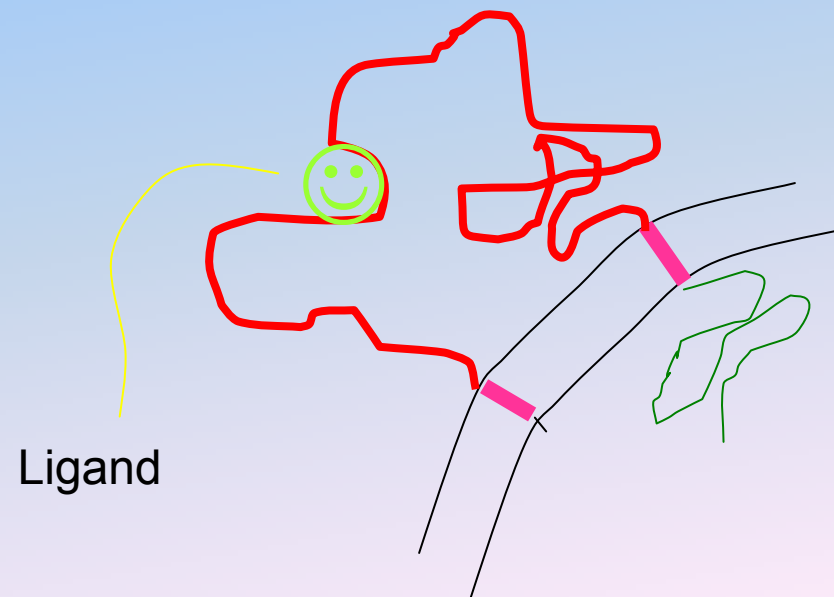
IV. Zásobní – zdroj energie, uhlíku nebo dusíku.



Extracelulární doména SexA



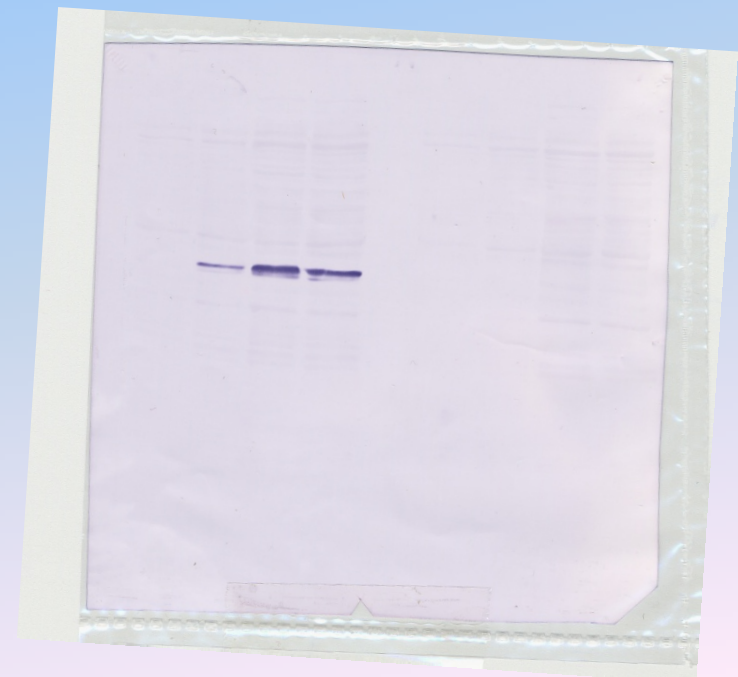
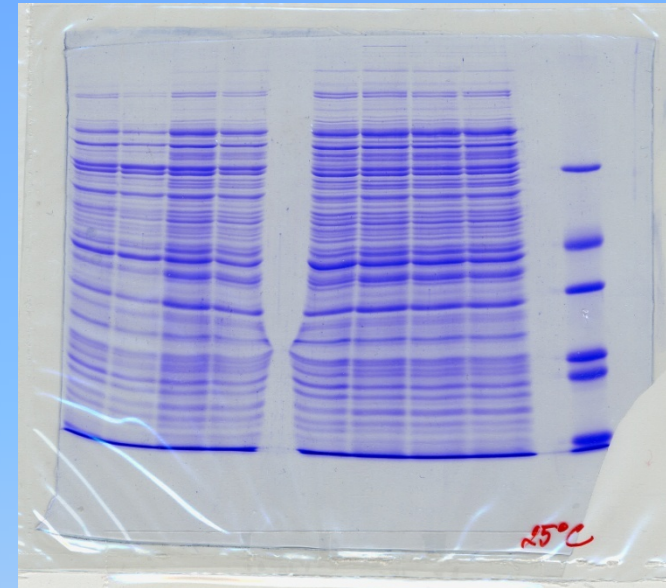
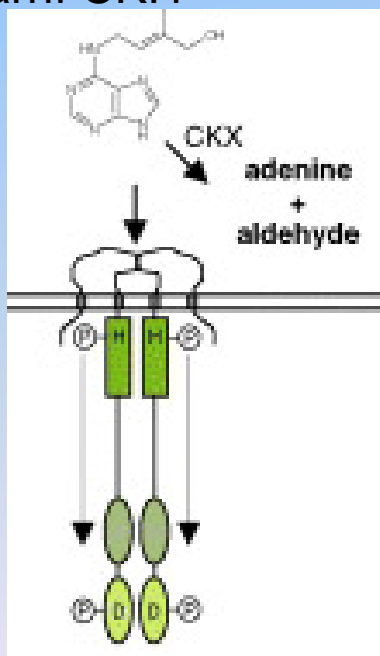
SNWRTTLENLVKEVASFTEDLRTSLVSEIENIGKFTYAKTNLSTIGLARVIDSYITNNDTGFTEIQTQIAP
LLFVAYSTILQVSQVSYISRDGLMFSYIAESNTSVAVFANSSSNSSRGDYTWYTQTVDQLTGRLNGN
STKSQSLDVTHDWFQAAQSNNYTTAFVGTSLGGEDNETLIQSVVSLYSKKGLVSLGFPVKLTLEVL
NSLNLHGEELYMWTKDGTVLVREGSLNDSFFISNGSICFGRESNSLWSQCIPENCSSSGYEVEIKRL
RYQAFCSVIEVSGVPLRYTLMFPNKGGATRIKHQAEKAKY



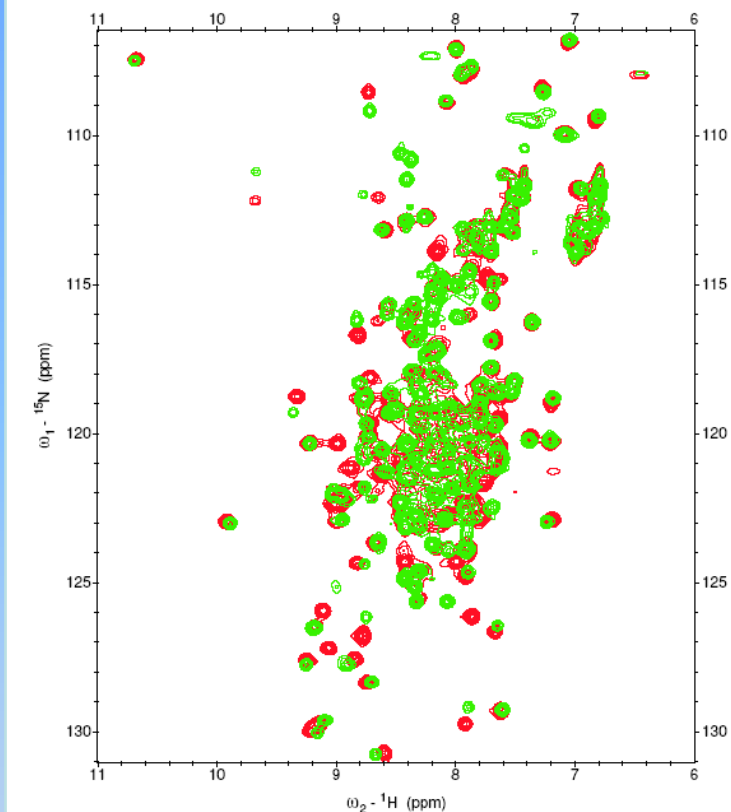
- Vazba radioaktivně značených cytokininů na NC membránu, na kterou jsou přeneseny elektroforeticky dělené proteiny z *E.coli* exprimující CKI1 “CHASE” doménu.
- *trans-zeatin*, *cis-zeatin*, *N⁶benzyladenin*, *meta-topolin* nevážou extracelulární CKI1 doménu.

CHASE domain

Cyclases/histidine kinases associated sensory extracellular domain

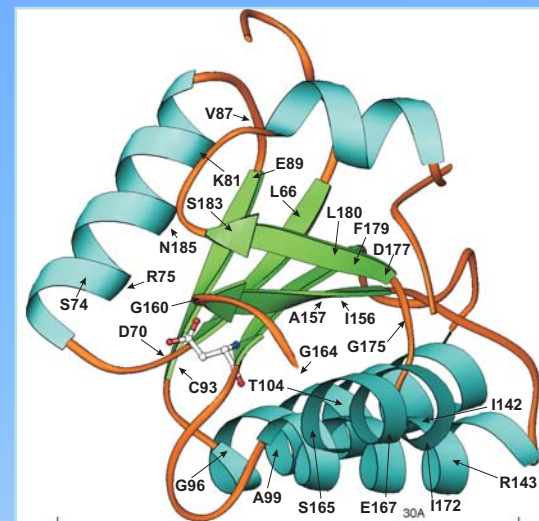


^{15}N -HSQC spectra



Červeně: samotný protein

Zeleně: protein + BeF_x



```

MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMASTD
SESETRVKSVRGRKPIGNPEDEQETS
KPSDDEFRLRGKRVLVVDNFISRKVA
TGKLKKMGVSEVQCDSGKEALRLVTE
GLTQREEQGSVDKLPFDYIFMDCQMP
EMDGYEATREIRKVEKSGRTPIIAVSG
HDPGSEEARETIQAGMDAFLDKSLNQ
LANVIREIESKRHLEHHHHHHH
    
```

0.5 mM CKI1 RD byla inkubována s 15 mM MgCl_2 , 3 mM NaF, a s 0.6 mM BeCl_2

Funkce proteinů

- I. —● 1. Enzymatická/enzymy/katalýza
- II. —● 2. Receptorová/signalizace/
- III. —● 3. Přepavní/transportní/vazba-transport
 - Strukturní/zpevňovací/strukturní komponenty/
 - 1. Aktivní pohyb/kontrakční/motor-proteiny
 - 2. Hormonální/hormony/regulace
 - 3. Obranná/specializovaná/imunitní systém/transkripční regulace
- IV. —● 4. Zásobní

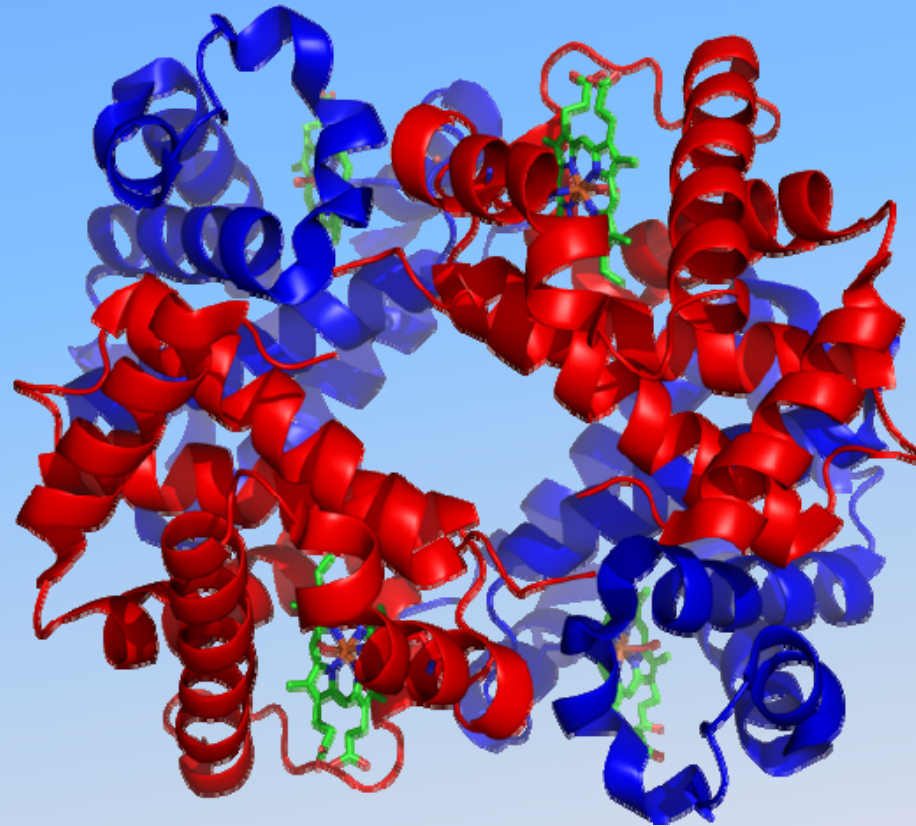
I. Enzymy

II. Protein-interakce s ligandem

III. Protein-interakce s dalším proteinem nebo DNA

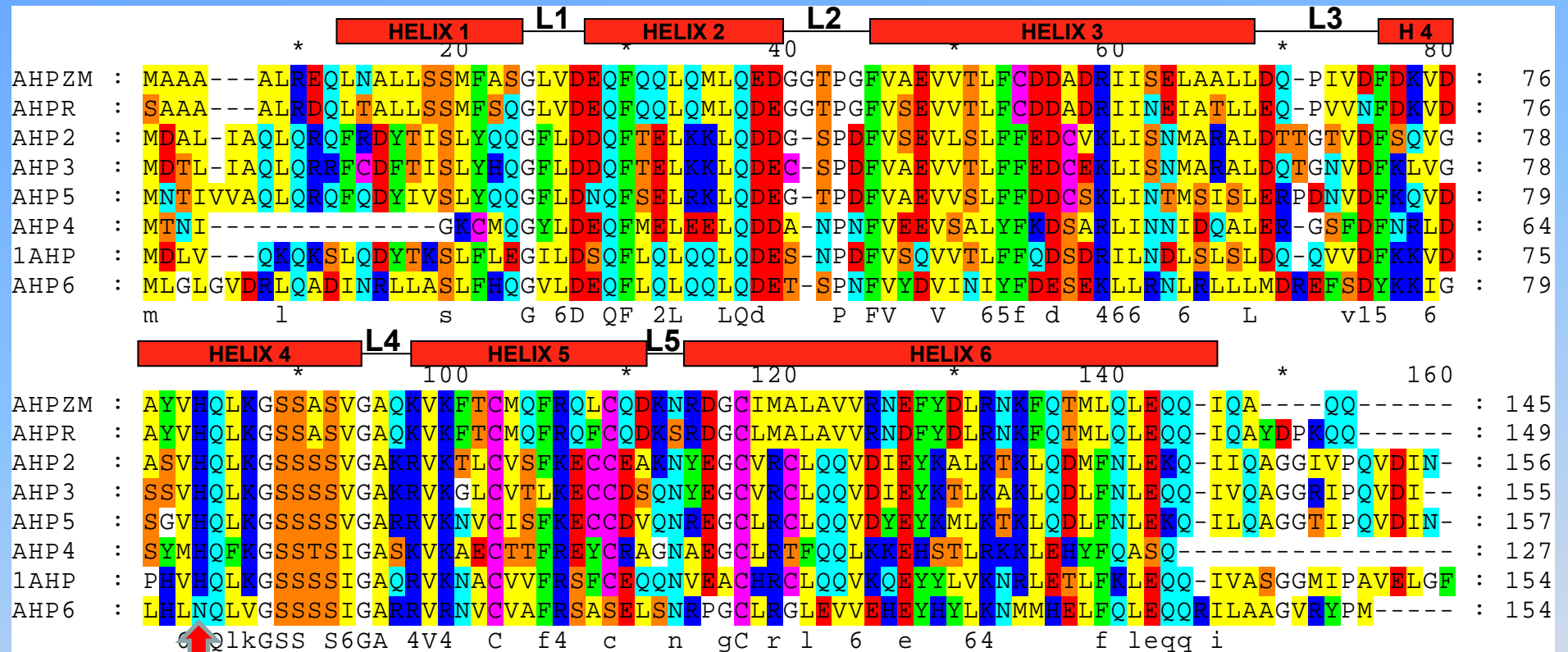
IV. Zásobní – zdroj energie, uhlíku nebo dusíku.

Hemoglobin a jeho funkce v transportu kyslíku



- $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{H}_2\text{CO}_3 \rightarrow \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$

Proteiny AHP z *Arabidopsis thaliana*



AHP1 17.6 kDa
 AHP2 17.4 kDa
 AHP3 17.5 kDa

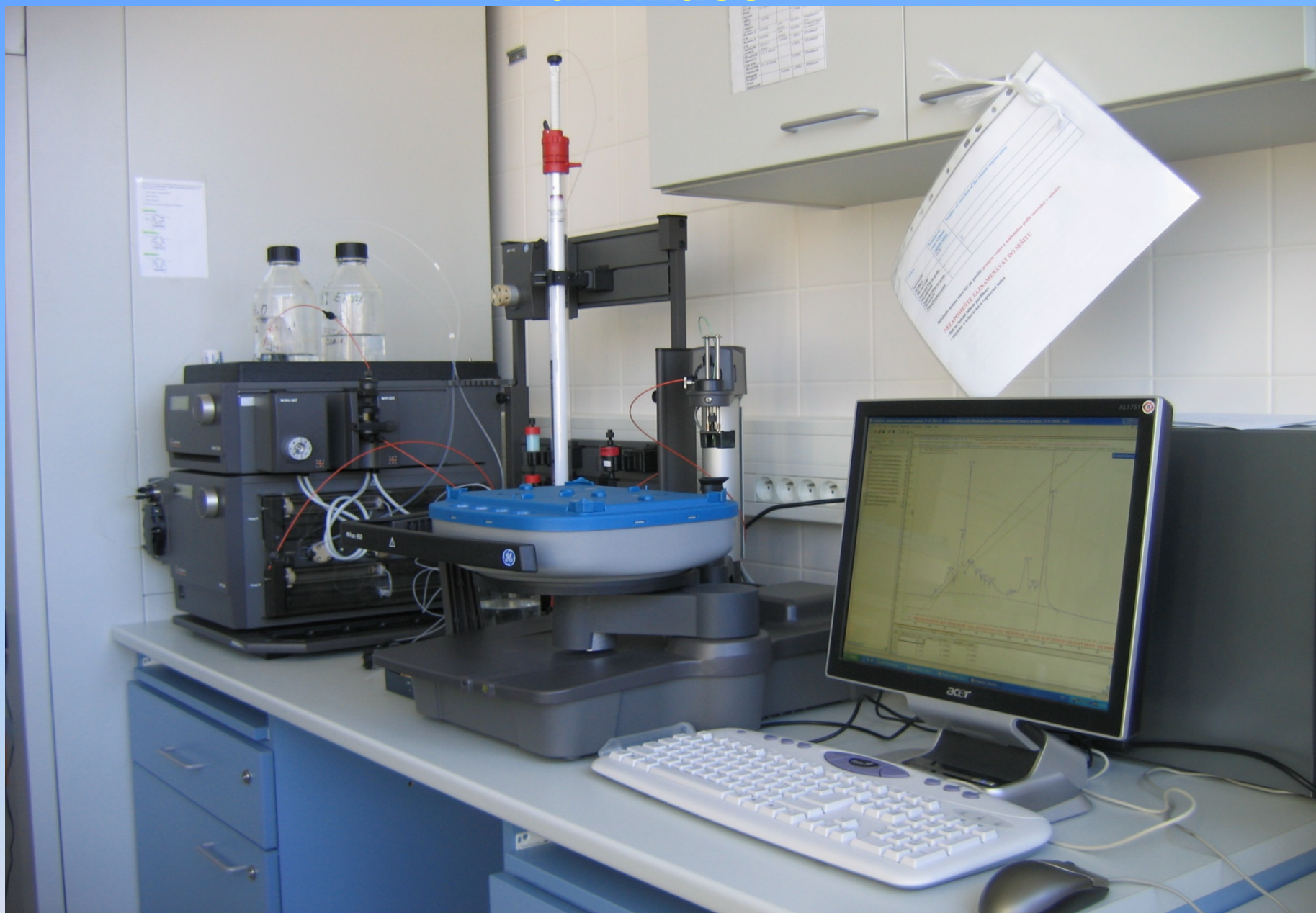
AHP4 14.7 kDa
 AHP5 17.9 kDa
 AHP6 17.8 kDa

Podobnost AHP proteinů se pohybuje mezi 60-80%

Výsledky exprese AHP proteinů v *E. coli*

Procenta proteinu AHP v rozpustné formě						
<i>t(°C)</i> <i>růst/indukce</i>	AHP1	AHP2	AHP3	AHP4	AHP5	AHP6
37°C/28°C	8 %	85 %	100%	0	76 %	0
37°C/22°C	82 %	73 %	100%	0	81 %	51 %
22°C/22°C	71 %	78 %	100%	30 %	81 %	73 %

Purifikace



Výsledky purifikace AHP5 proteinu

1. Afinitní chromatografie– His trap kolona

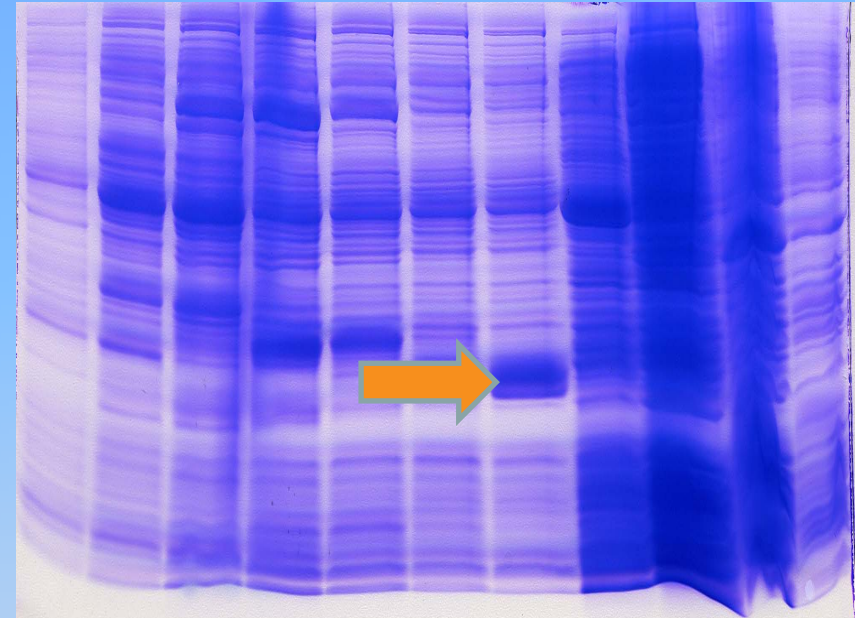
50 mM Tris pH7,9
0,5M NaCl

500 mM
imidazol

5CV

20 mM
imidazol

Čistota:
4,5%

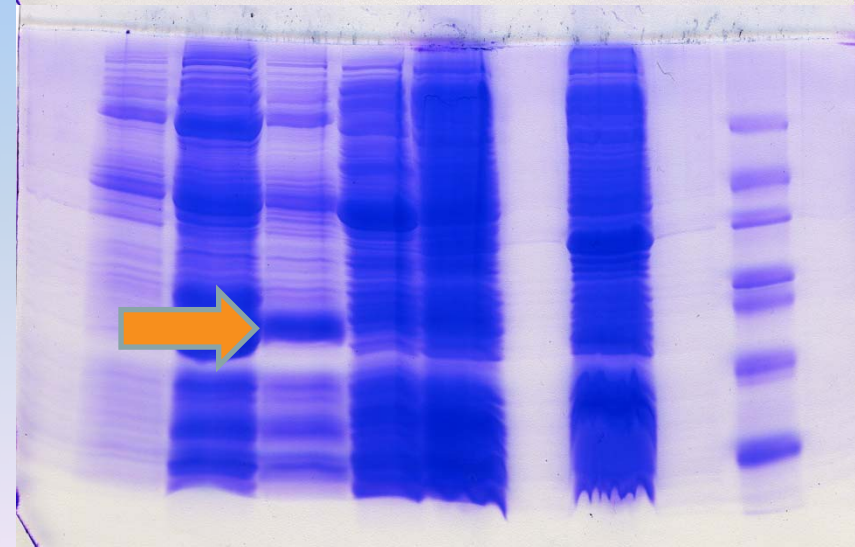


50 mM Tris pH7,9
0,5M NaCl

500 mM
imidazol

20 mM
imidazol

Čistota:
15%



Výsledky purifikace AHP5 proteinu

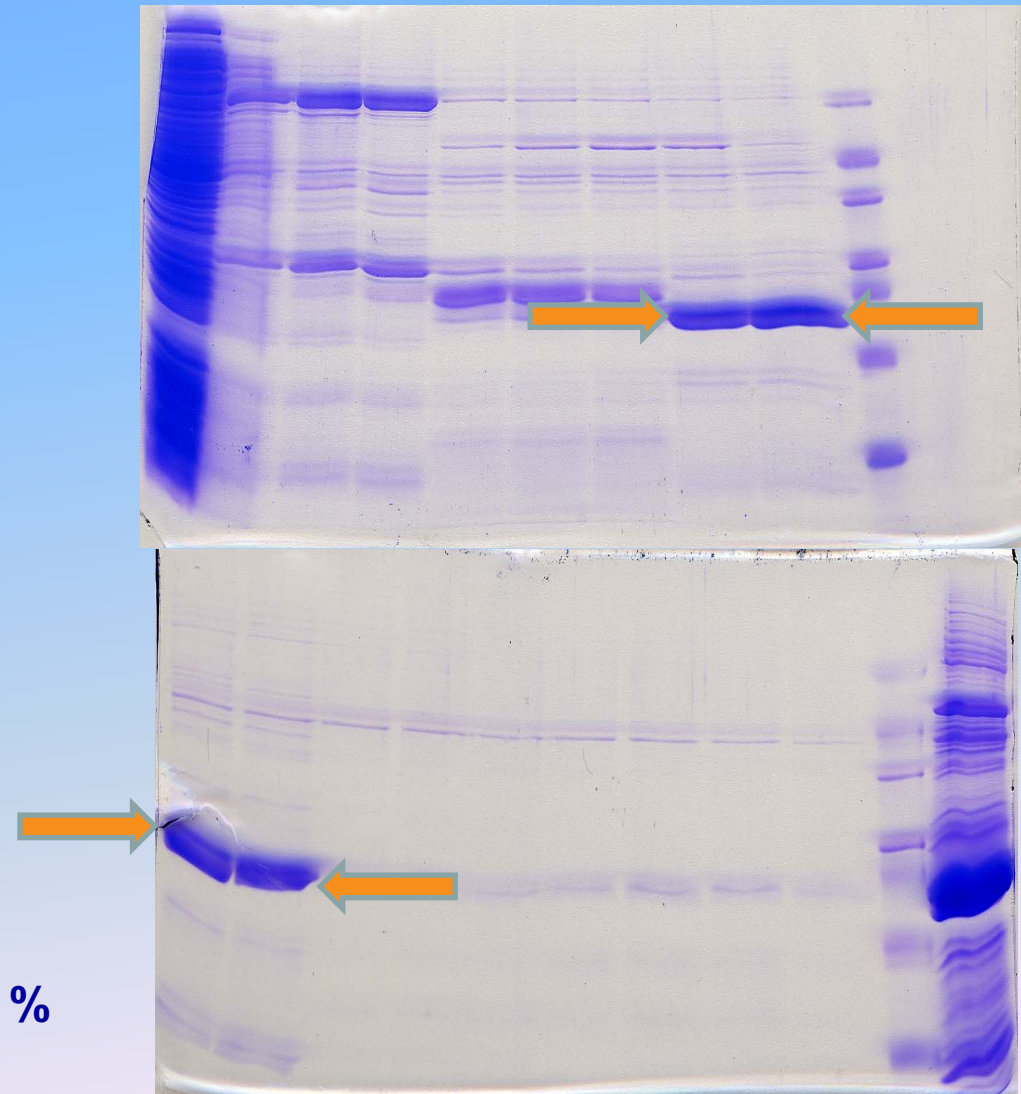
1 . Afinitní chromatografie– His trap kolona

50 mM Tris pH7,9
300mM NaCl,
10% glycerol,
3,5 mM mercapthoethanol

500 mM
imidazol

20 CV

20 mM
imidazol



Čistota: 78 %

Funkce proteinů

- I. —● 1. Enzymatická/enzymy/katalýza
- II. —● 2. Receptorová/signalizace/
- 3. Převážná/transportní/vazba-transport
- III. —● • Strukturní/zpevňovací/strukturní komponenty/
 - 1. Aktivní pohyb/kontrakční/motor-proteiny
 - 2. Hormonální/hormony/regulace
 - 3. Obranná/specializovaná/imunitní systém/transkripční regulace
- IV. —● 4. Zásobní

I. Enzymy

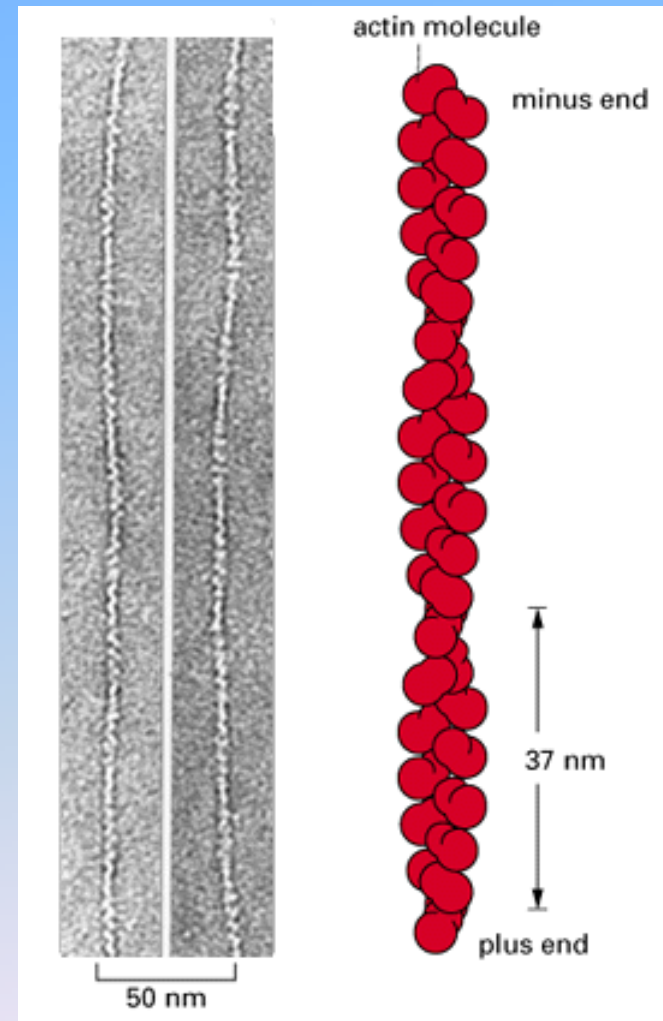
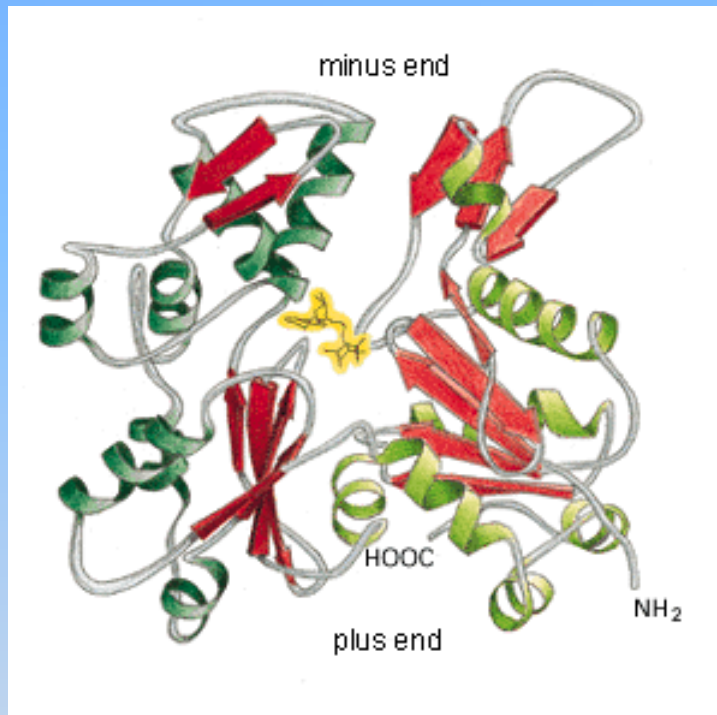
II. Protein-interakce s ligandem

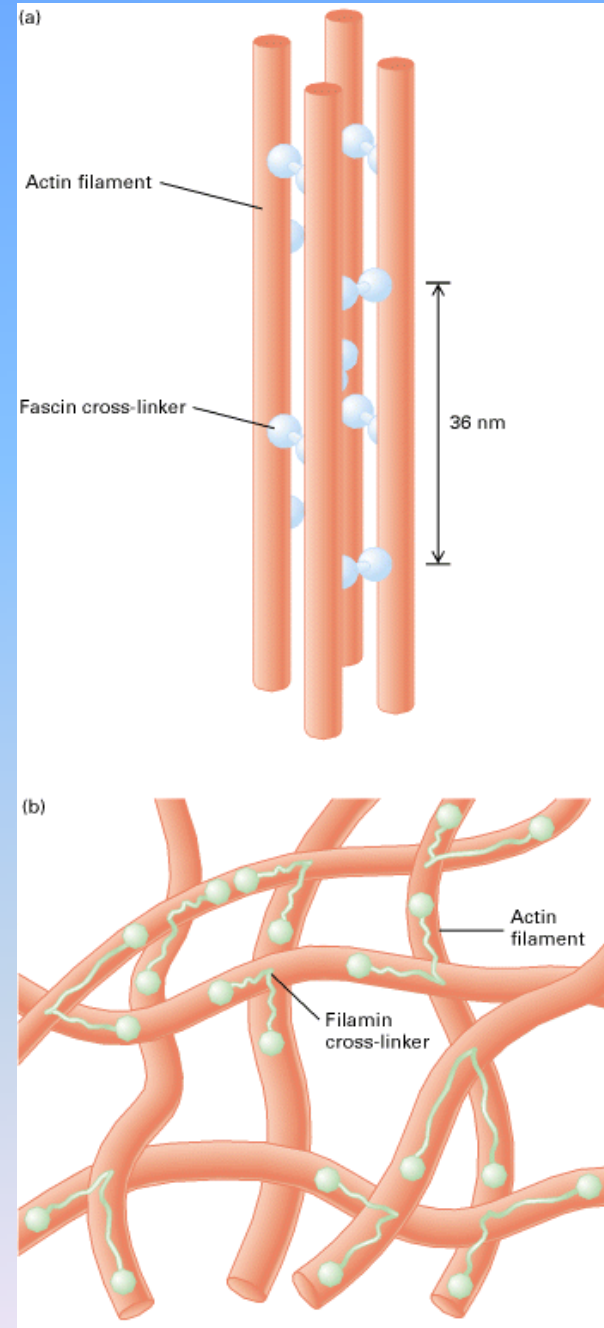
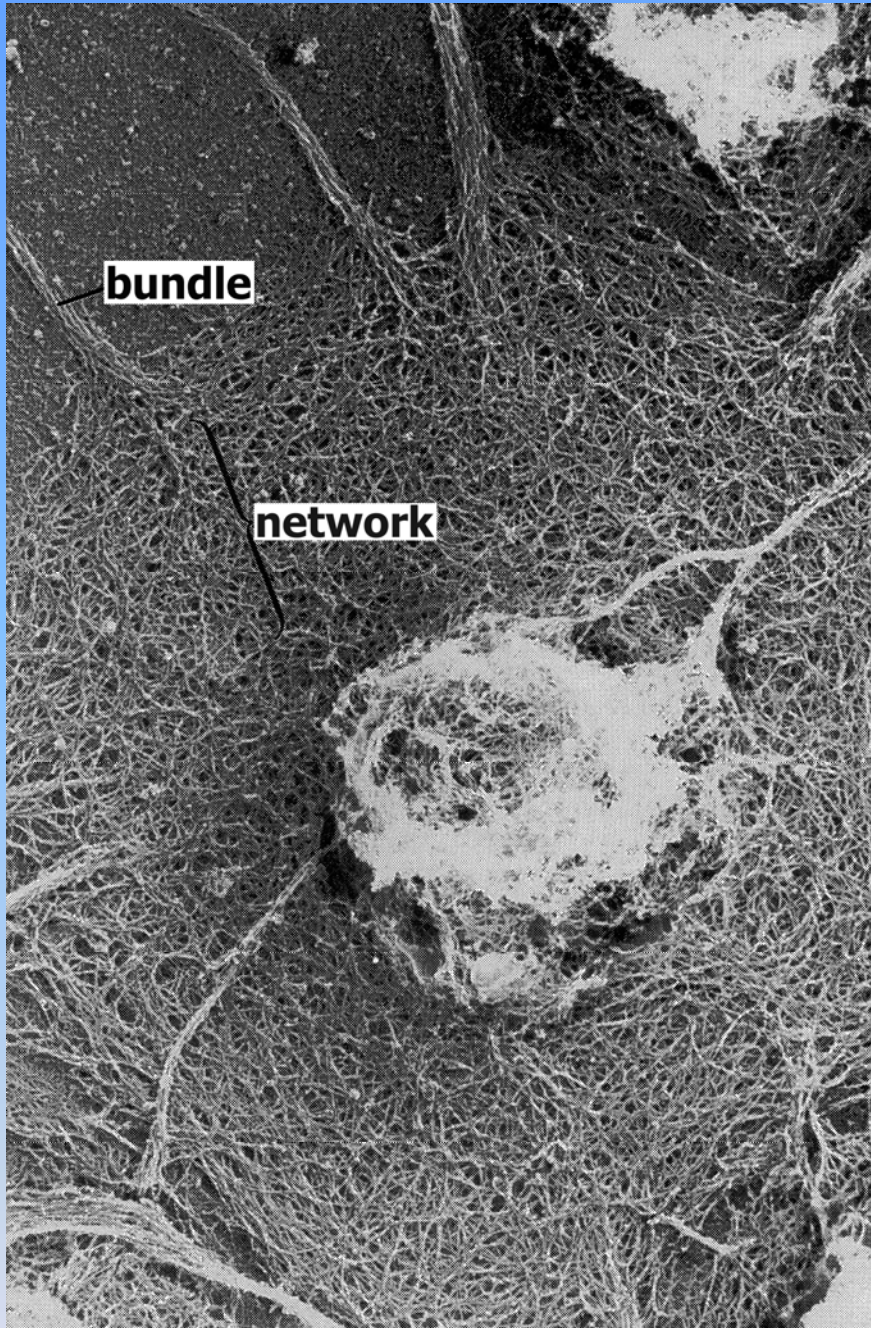
III. Protein-interakce s dalším proteinem nebo DNA

IV. Zásobní – zdroj energie, uhlíku nebo dusíku.

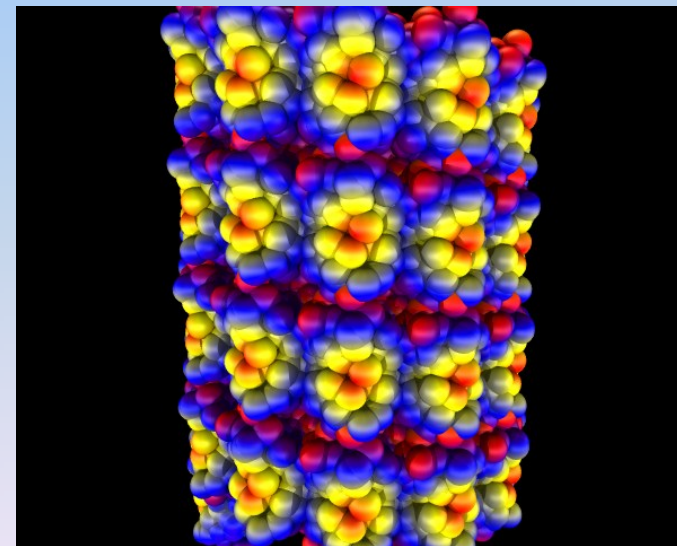
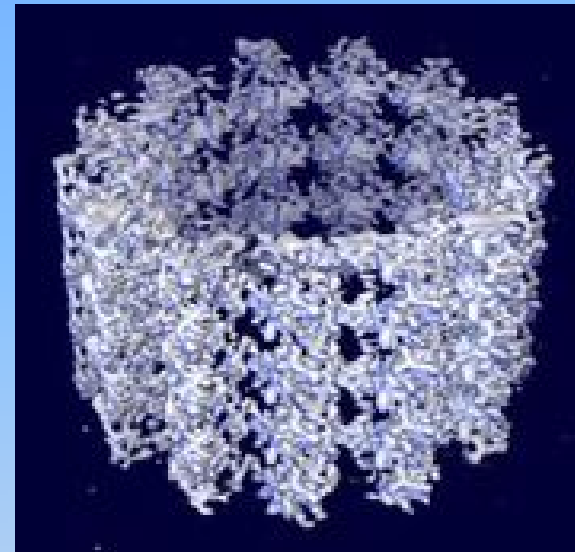
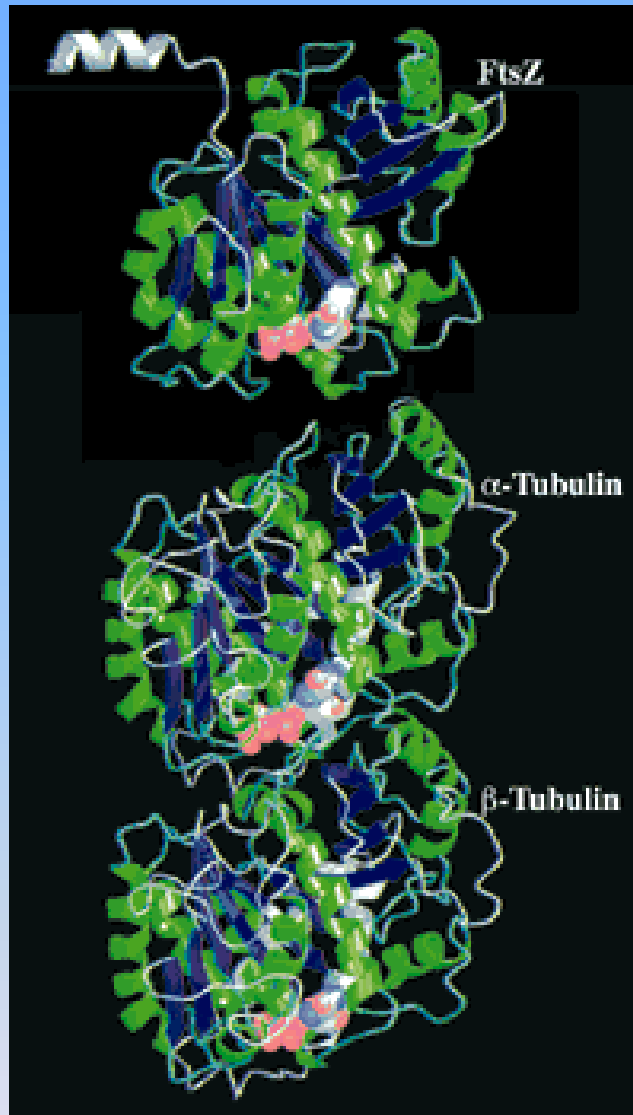
F-actin

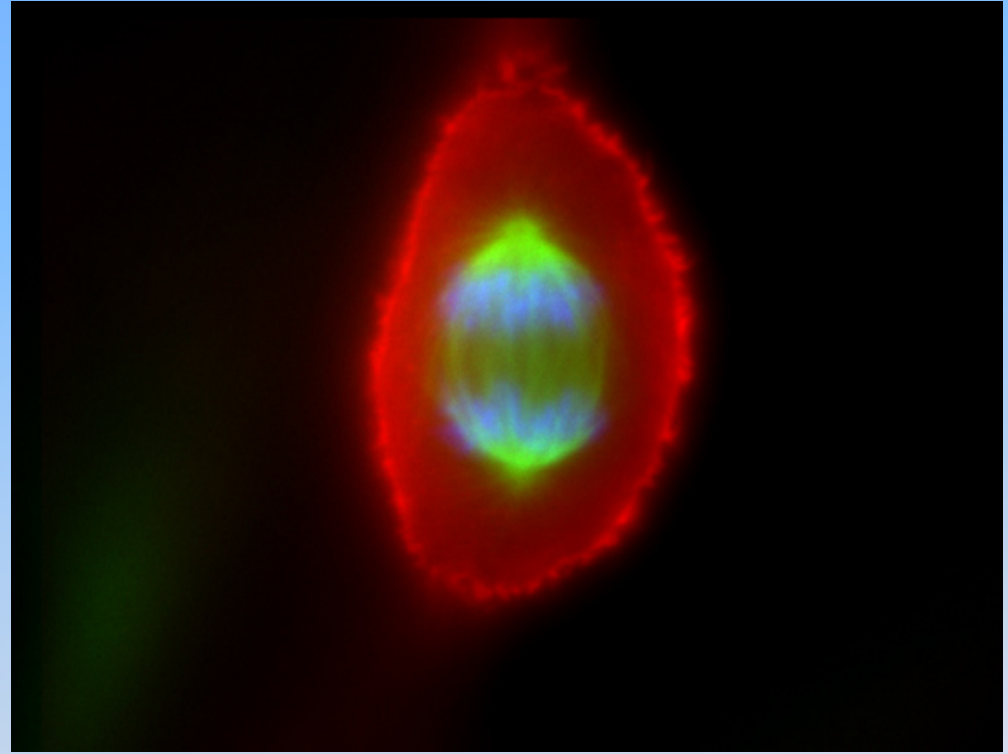
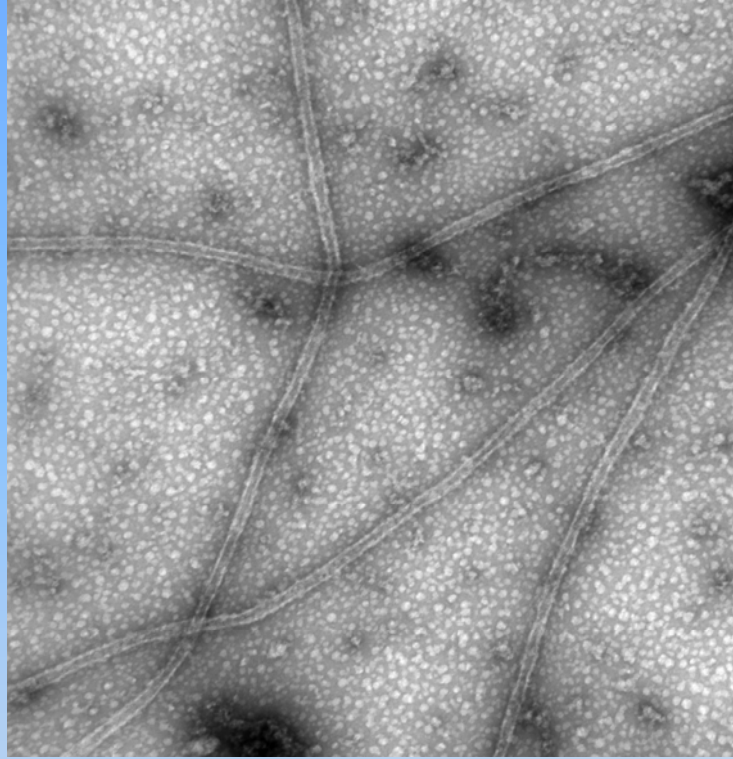
G-actin





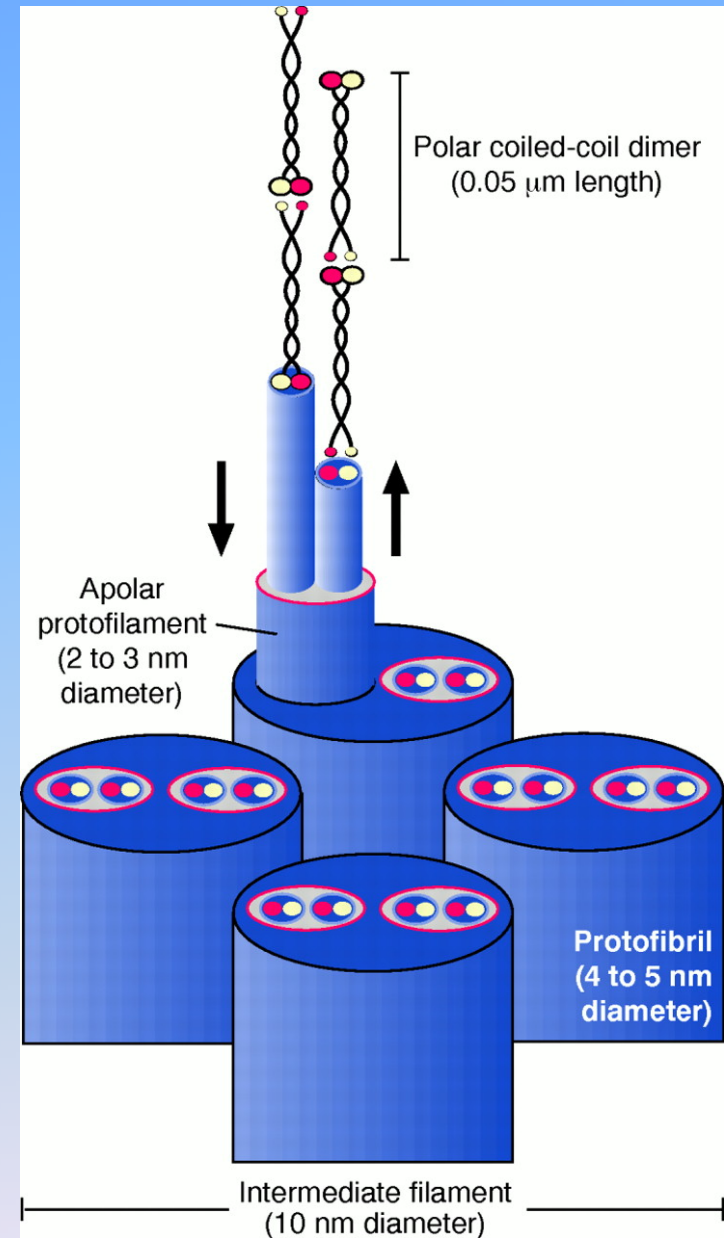
Tubulin - filamenta



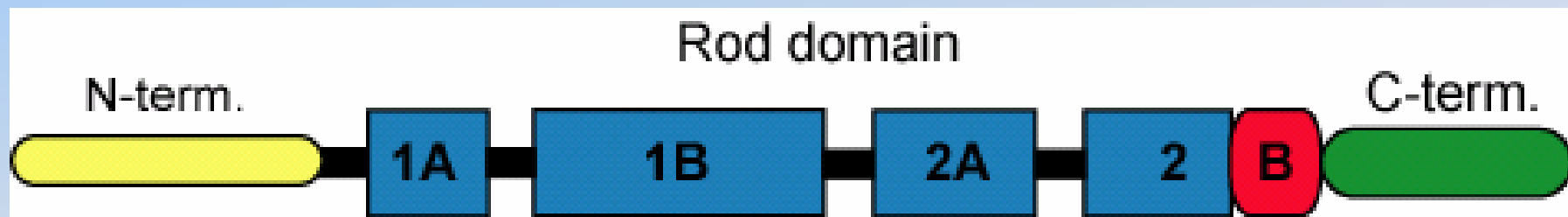
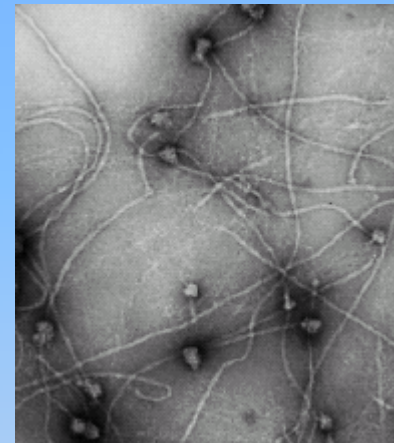
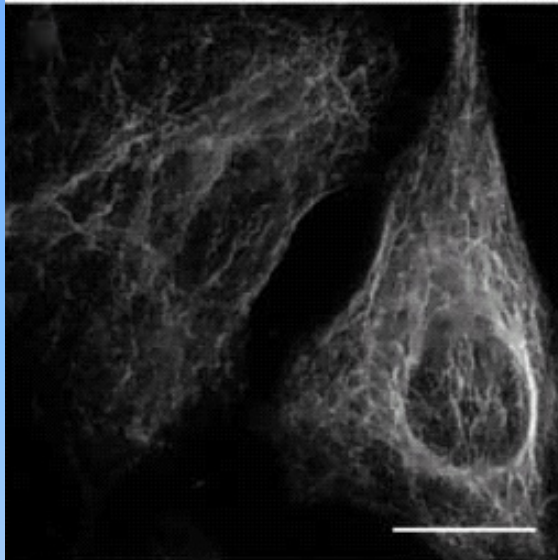


Organizace skládání IF

- dimer
- antiparalelní tetramer
- protofilamenta
- dvojice protofilament laterálně asociují do protofibrilů.
- čtyři protofibrily vytvářejí spolu filamenta



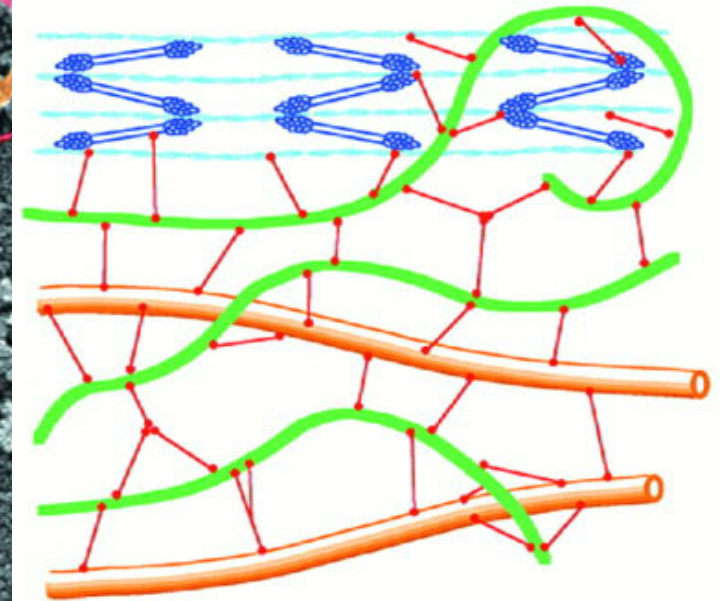
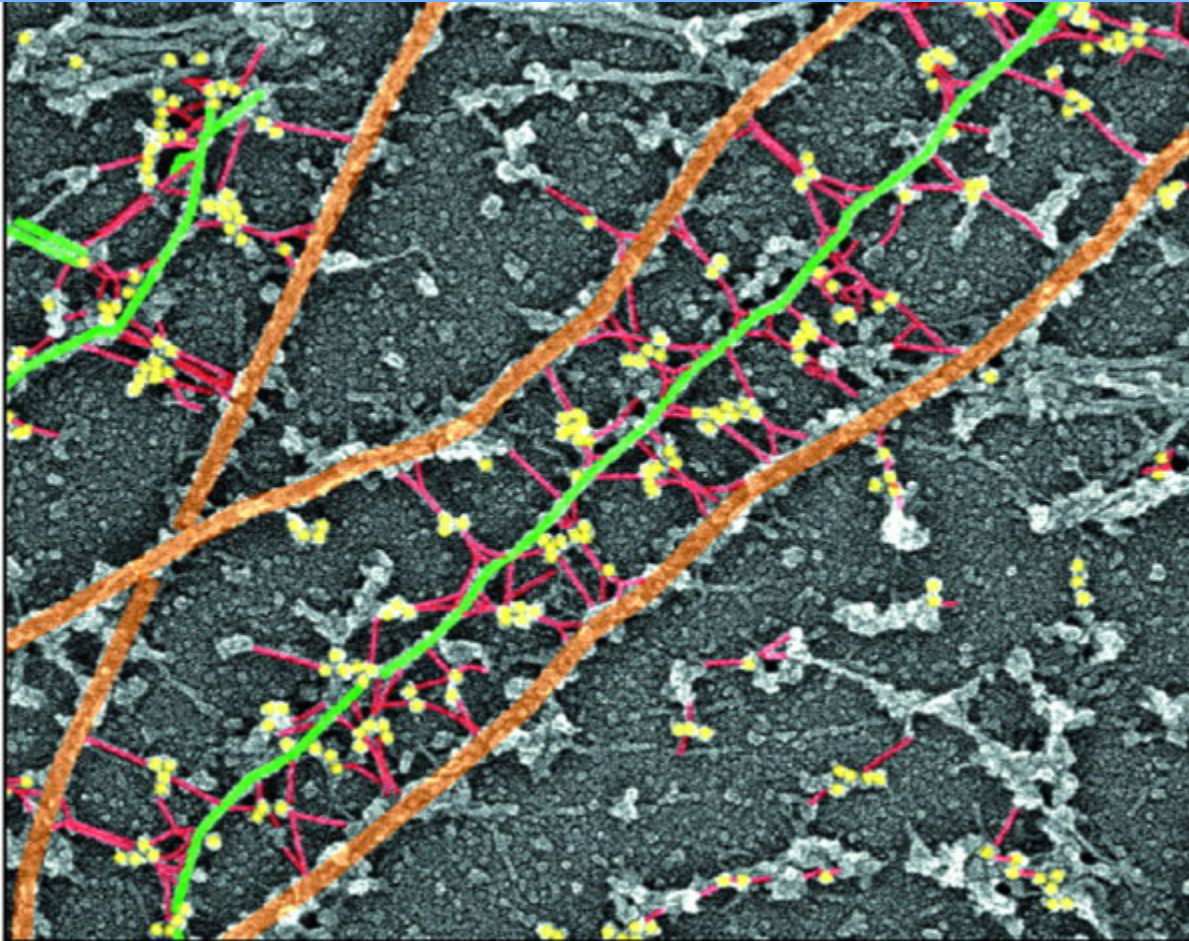
Intermediární filamenta: Vimentin



Deficiencie Plektinu způsobuje Epidermolysis bullosa

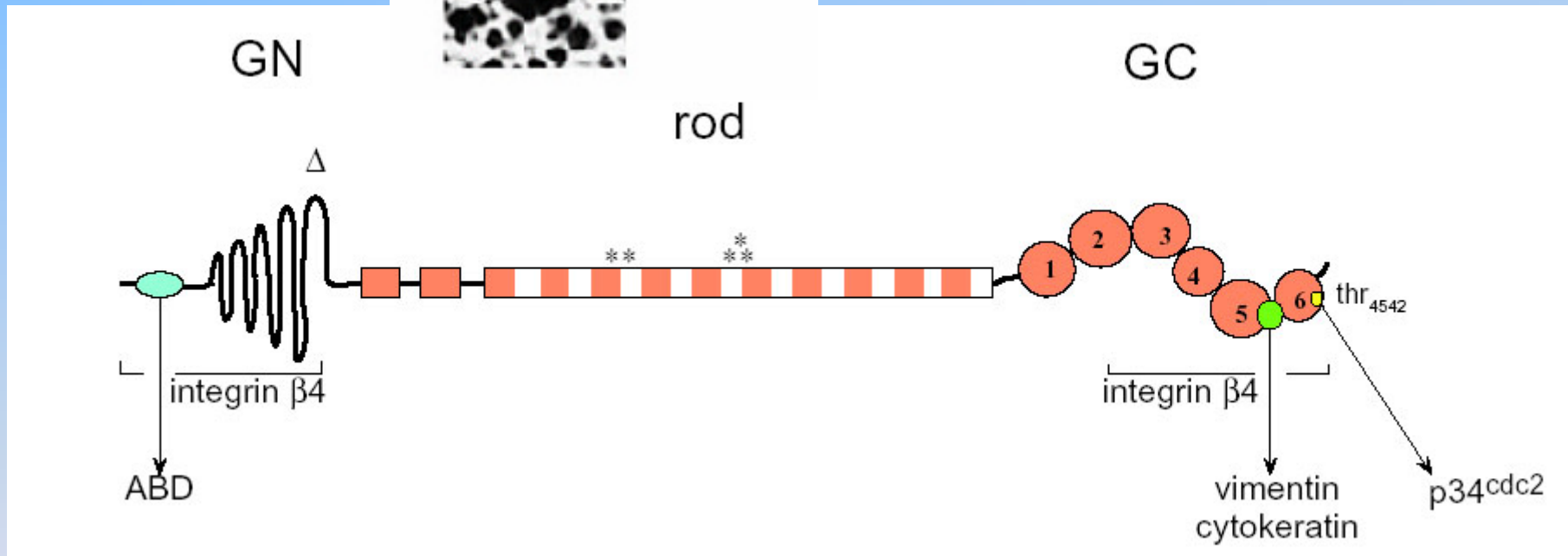
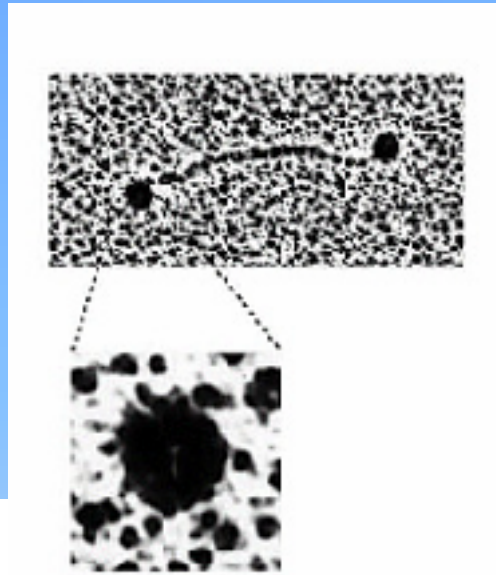


Cytoskeleton



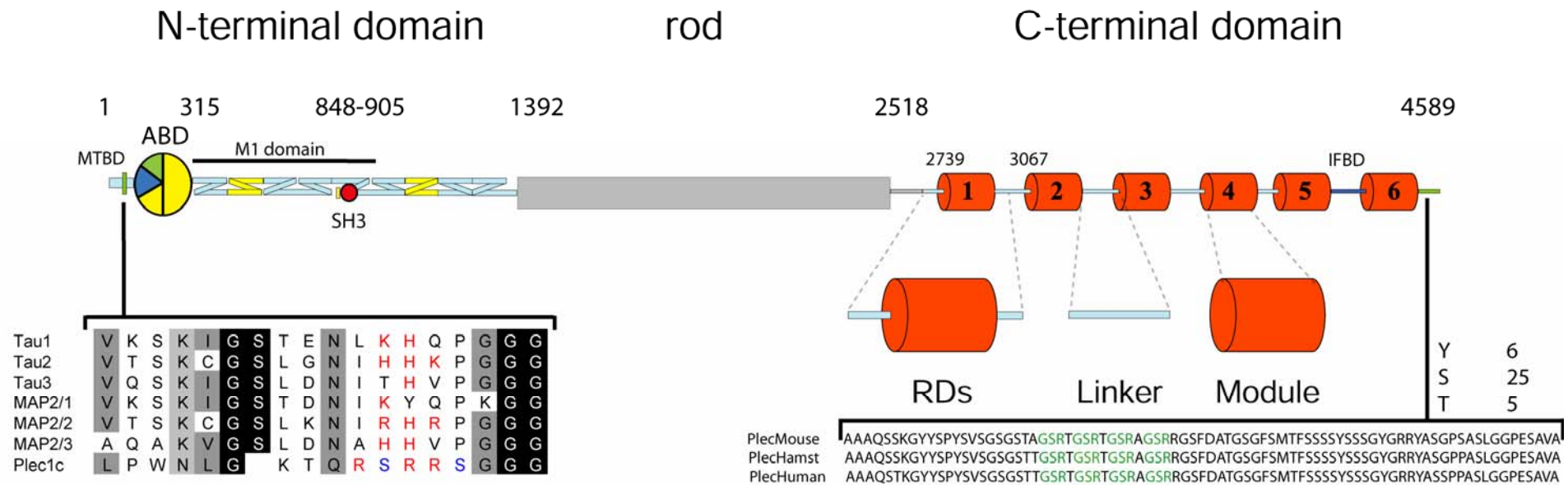
-  Plectin
-  Intermediate filaments
-  Microtubules
-  Actin filaments
-  Myosin filaments

Plectin



Analýza Plakinové domény Plektinu.

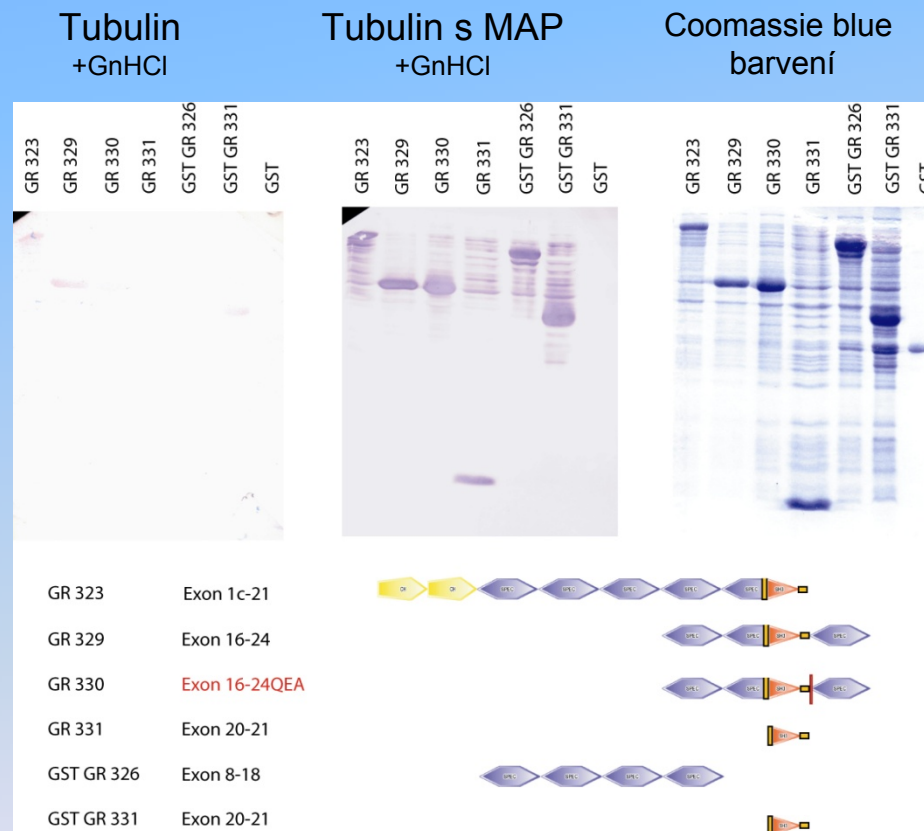
Plectin



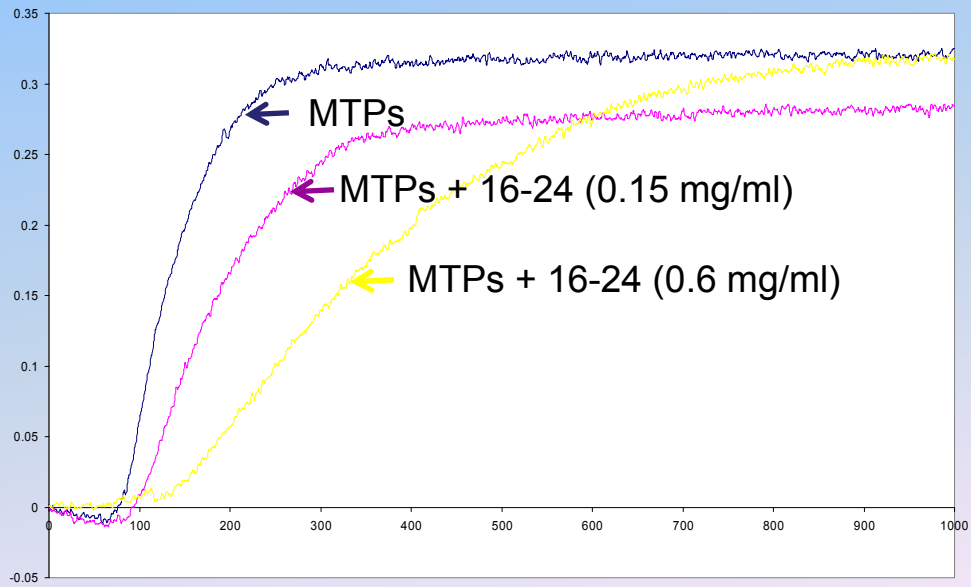
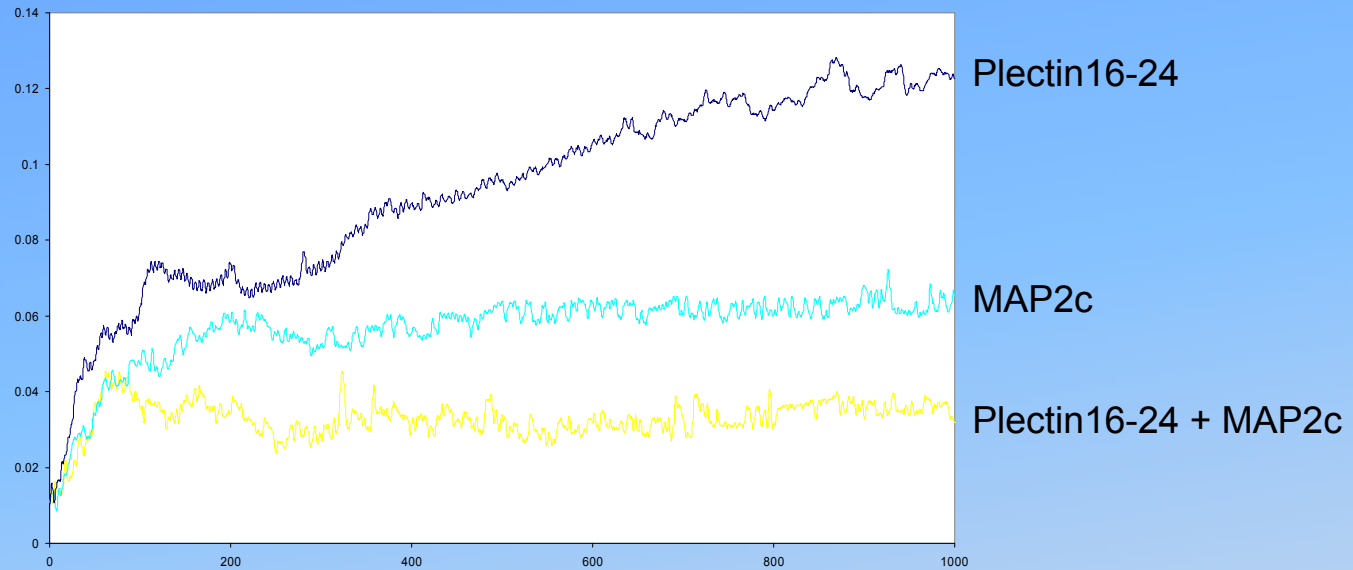
Kd of Plectin (Ex 1-24) for actin 320 nM (Ex 2-8) 25uM
 Kd of Plectin (R5) for vimentin (IF) 100 nM
 Kd of Plectin (Ex 2-8) for integrin beta 4 170 nM

 Kd for microtubules in case of MAP2 1-3 uM

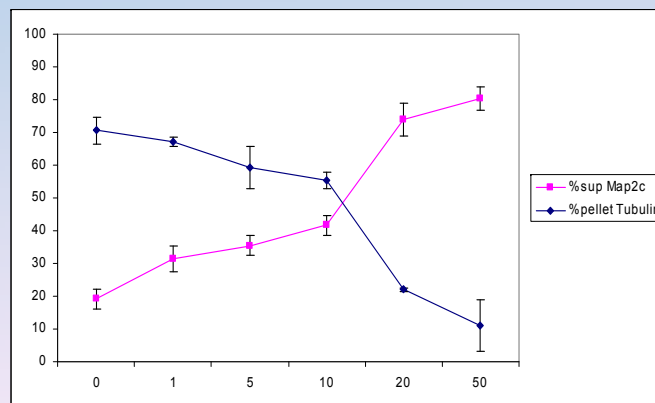
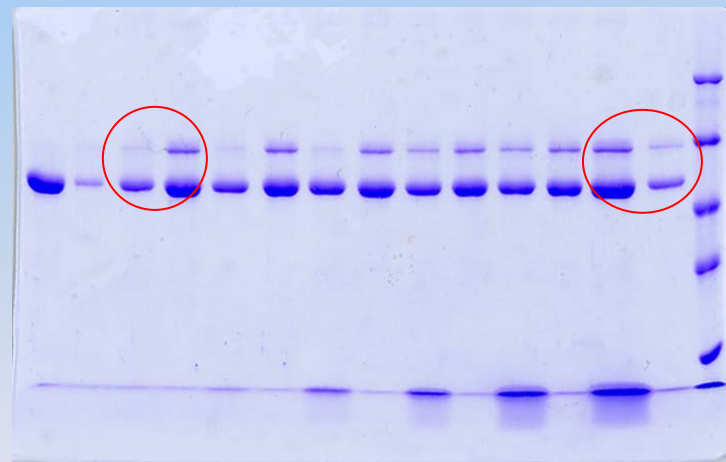
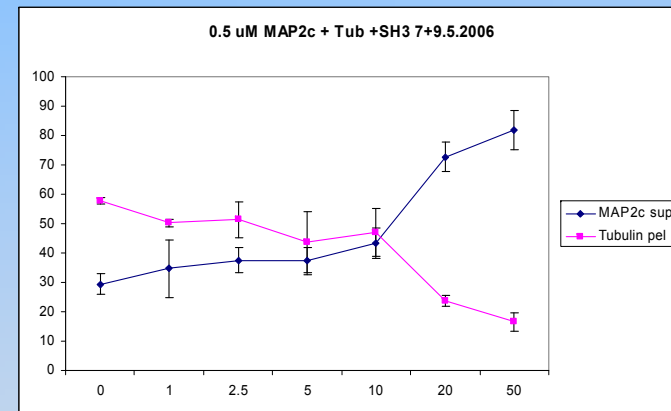
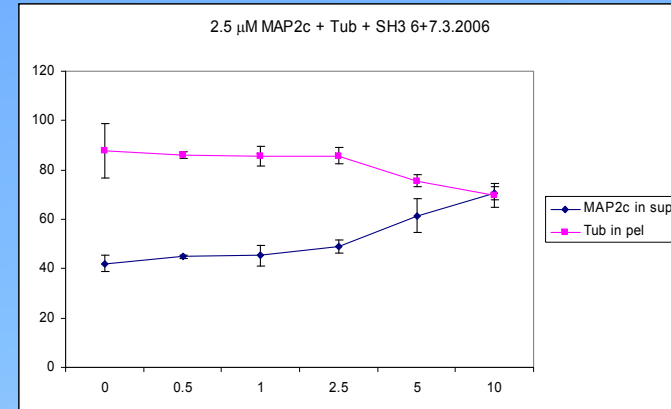
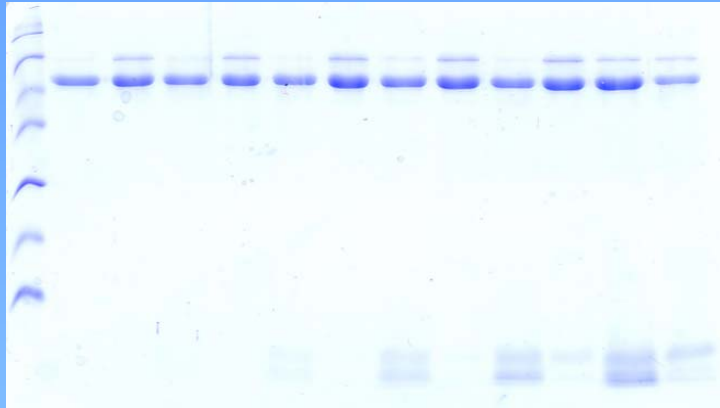
Vrstevné značení (overlay assay) plektinových konstruktů s tubulinem a s/bez MAPs (microtubule associated proteins)



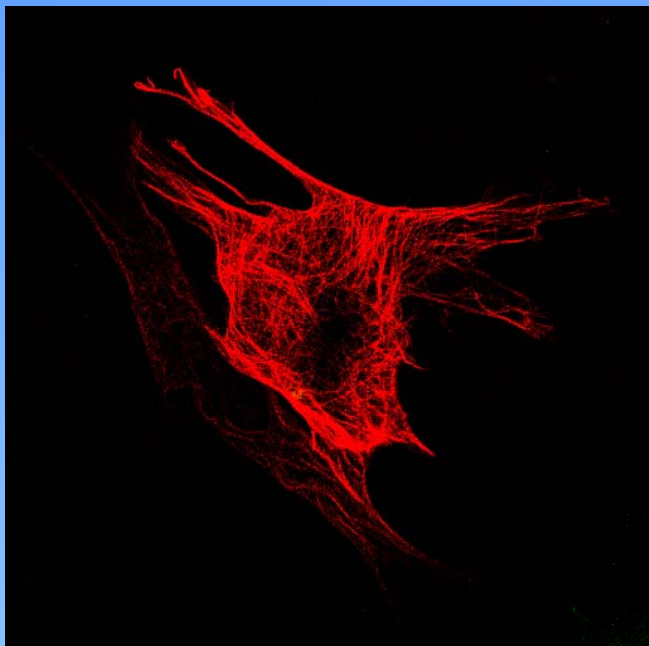
Měření turbidity



Kosedimentace MAPs s mikrotubuly za přítomnosti plektinu



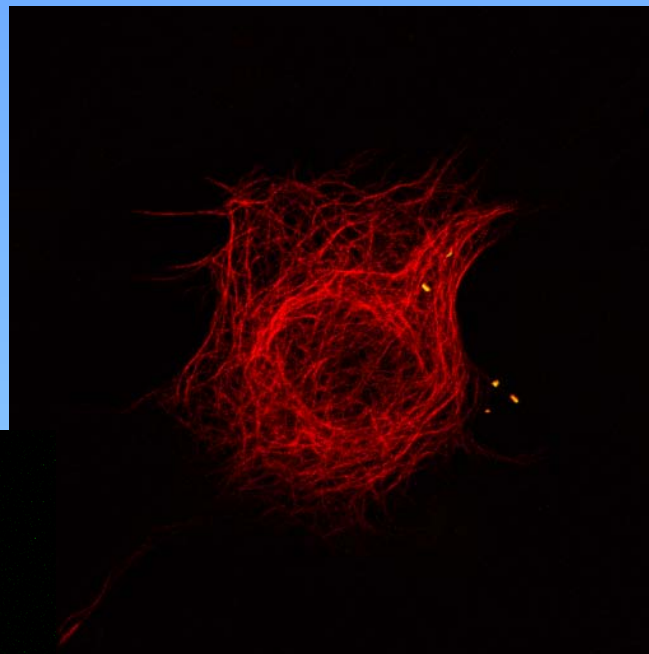
MAP2c +/+



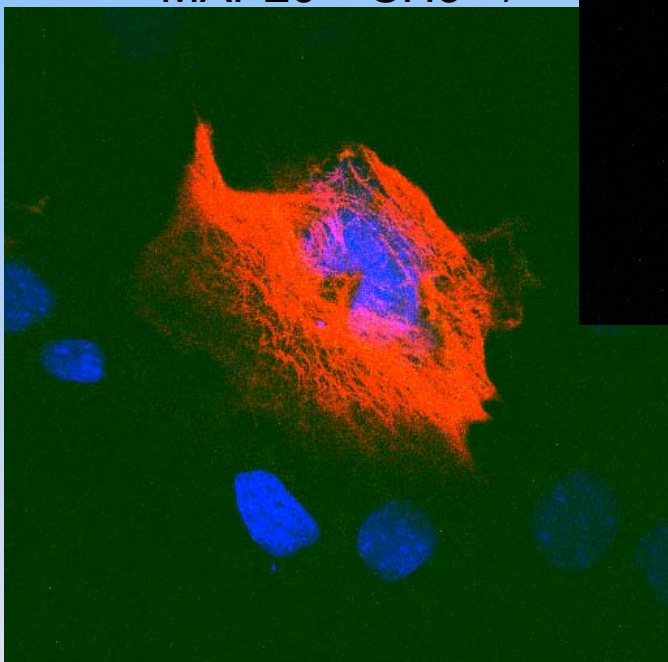
Fluorescenční
mikroskopie

SH3 +/+

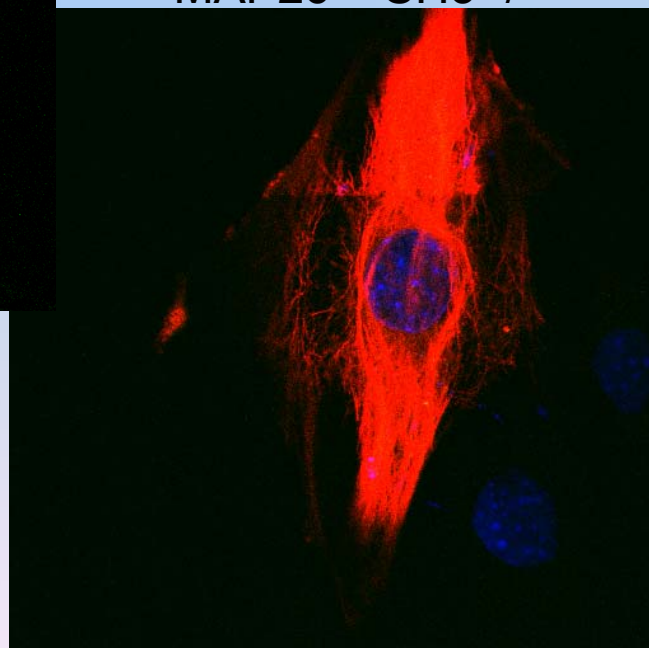
MAP2c -/-



MAP2c + SH3 +/+



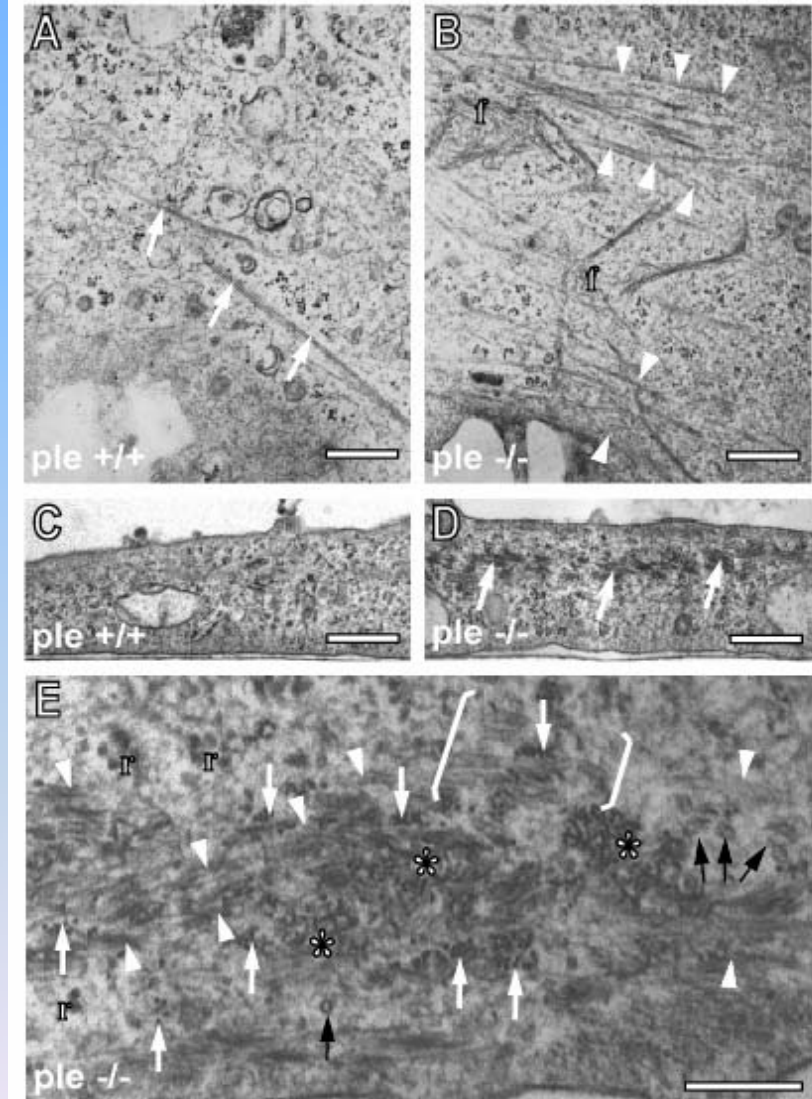
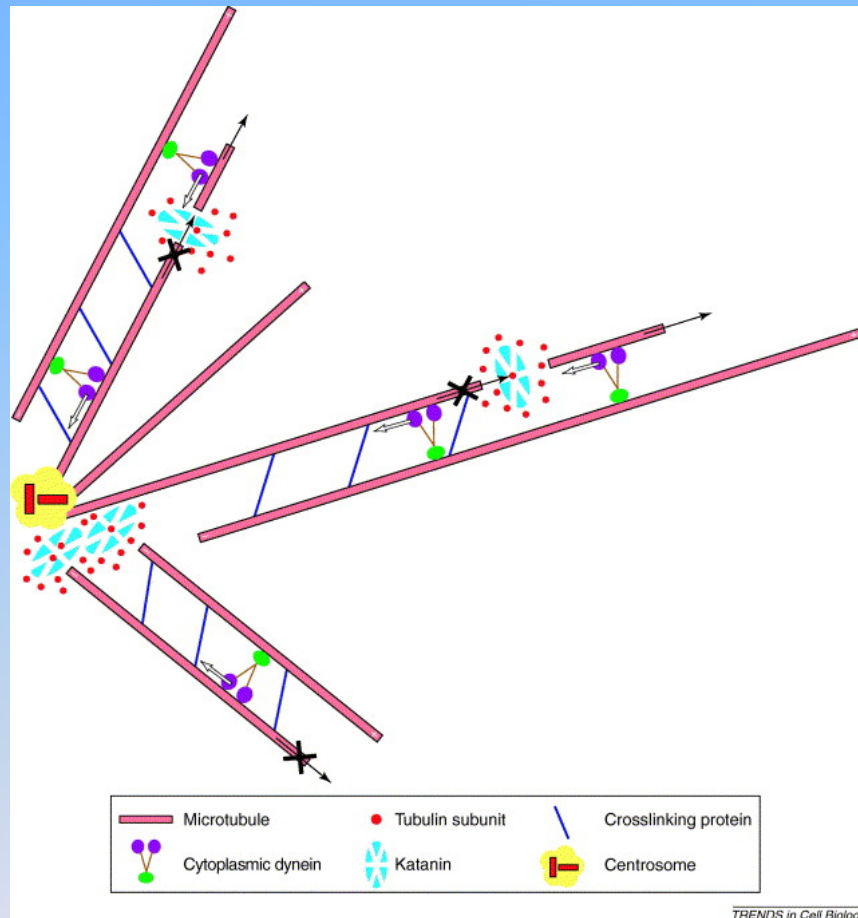
MAP2c + SH3 -/-



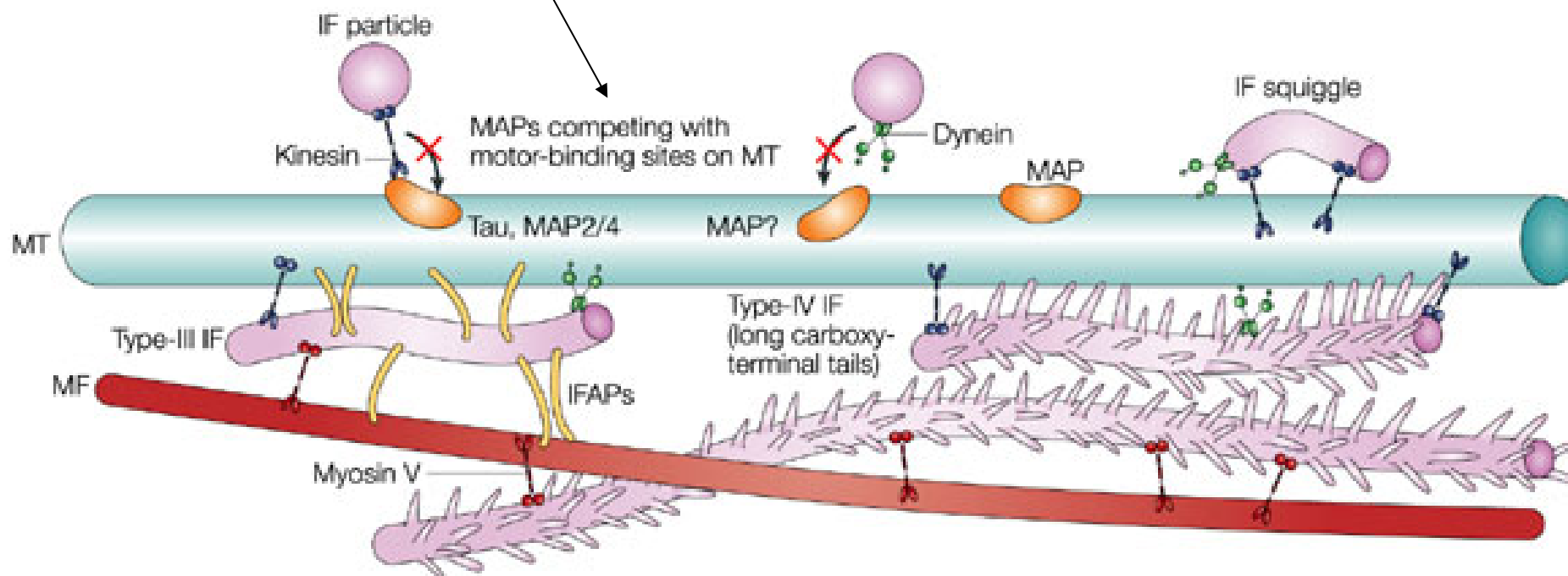
Fibroblasty

Vrství se keratinocyty, kterým chybí Plektin, vytvářejí zvláštní oblasti s nahloučenými mikrotubuly, které jsou stabilizovány proti depolymerizaci.

(Walko et al, 2008?)

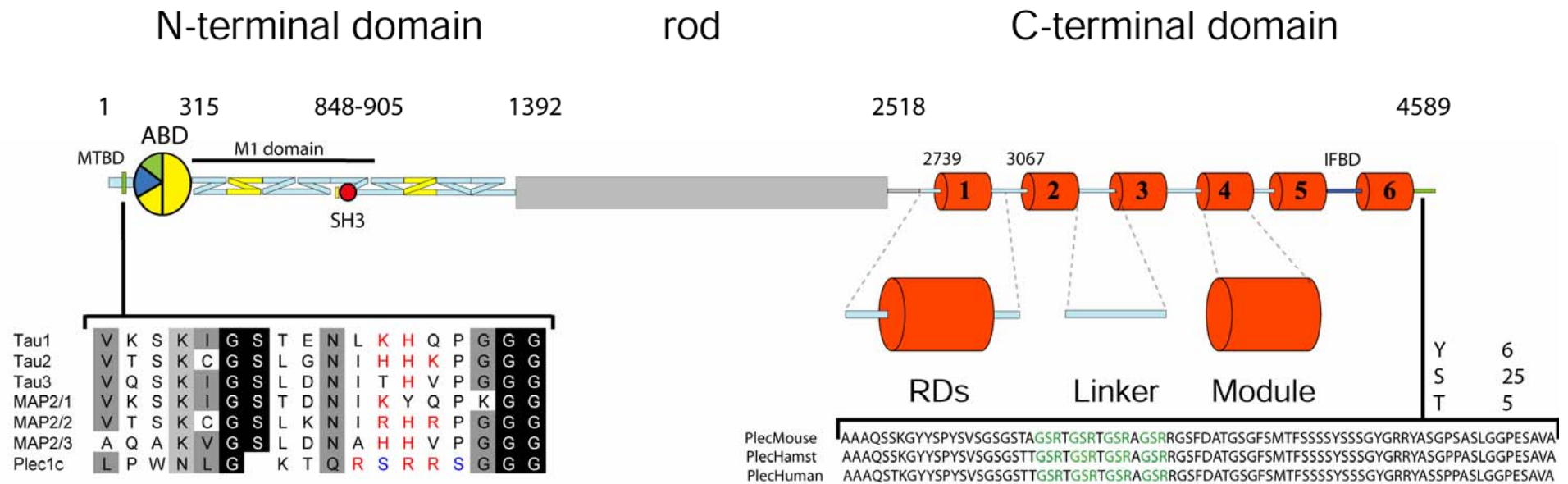


MAP – mikrotubul asociovaný protein redukuje frekvenci se kterou mohou molekulární motory interagovat s mikrotubulární mřížkou a frekvenci se kterou katanin může tvořit hexamery, které rozkládají mikrotubuly.



Analýza IF domény Plektinu - bioinformatika

Plectin



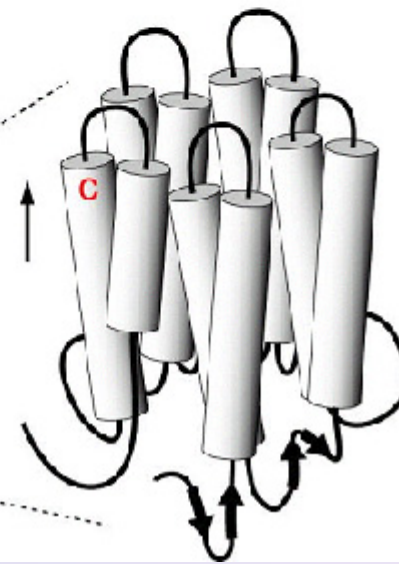
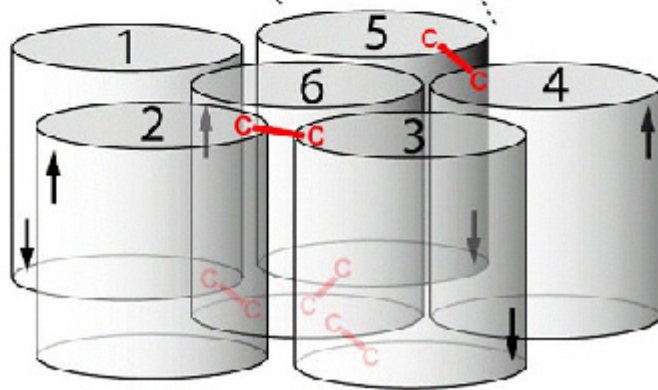
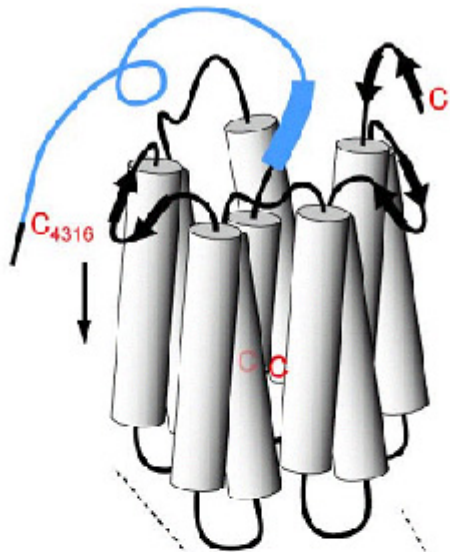
Kd of Plectin (Ex 1-24) for actin 320 nM (Ex 2-8) 25uM

Kd of Plectin (R5) for vimentin (IF) 100 nM

Kd of Plectin (Ex 2-8) for integrin beta 4 170 nM

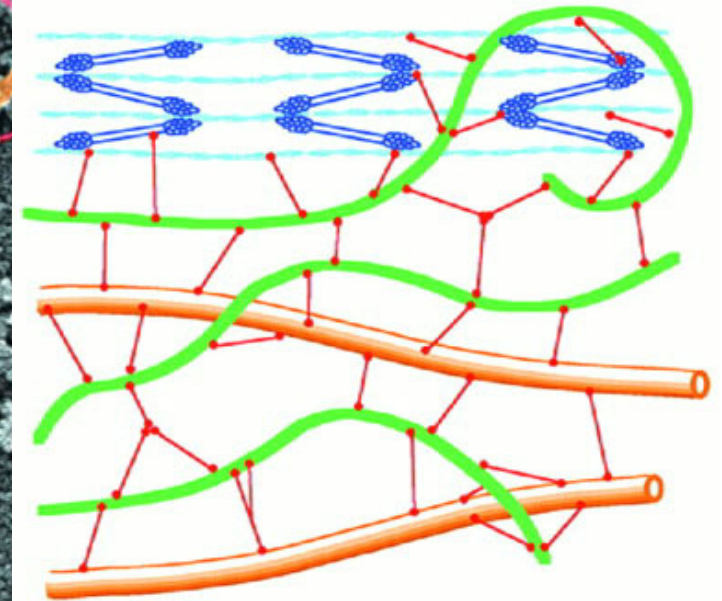
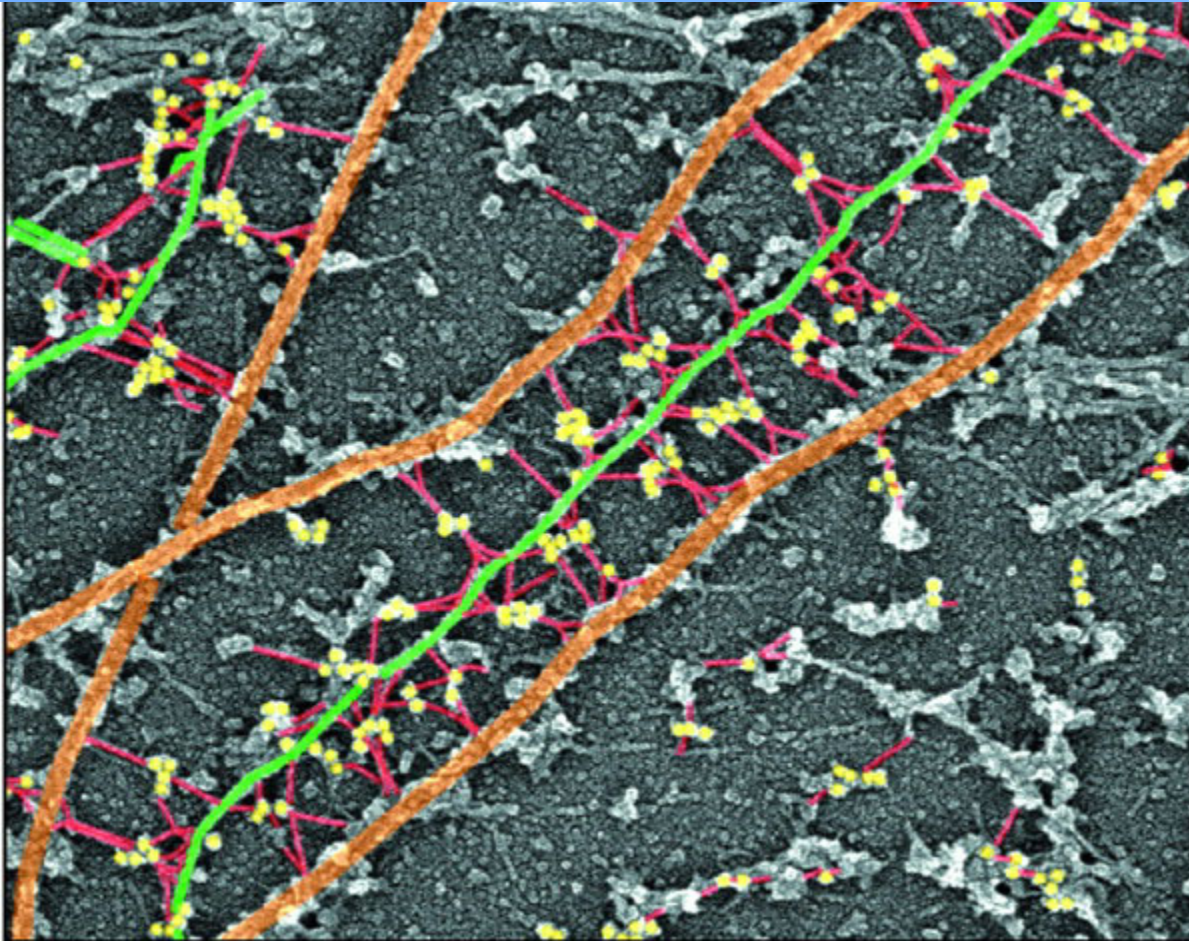
Kd for microtubules in case of MAP2 1-3 uM

C-koncová doména Plektinu



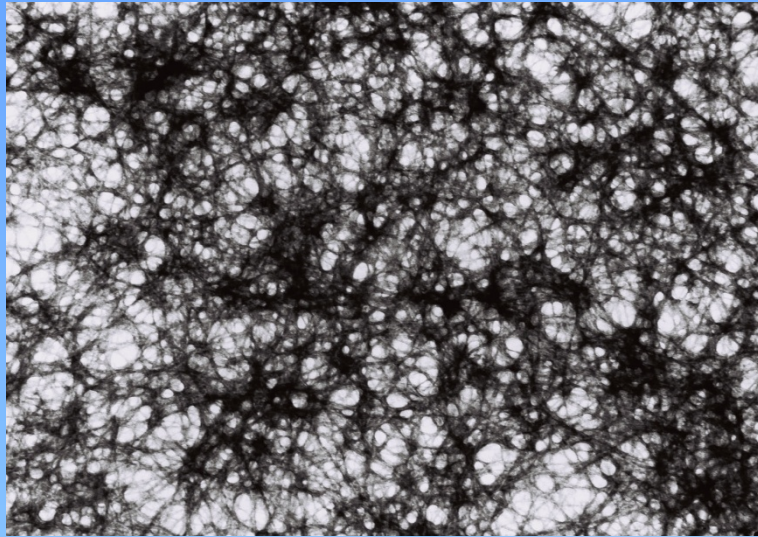
- šest modulů C-koncové domény Plektinu, které jsou spojeny méně konzervativním spojovací sekvencí
- modul samotný je tvořen 38 aminokyselinami (2x19) opakovaně pět krát.

Cytoskeleton

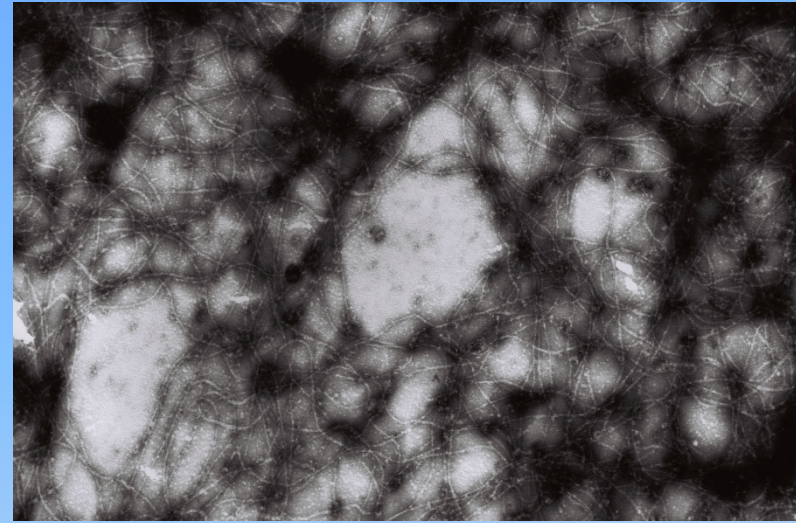


-  Plectin
-  Intermediate filaments
-  Microtubules
-  Actin filaments
-  Myosin filaments

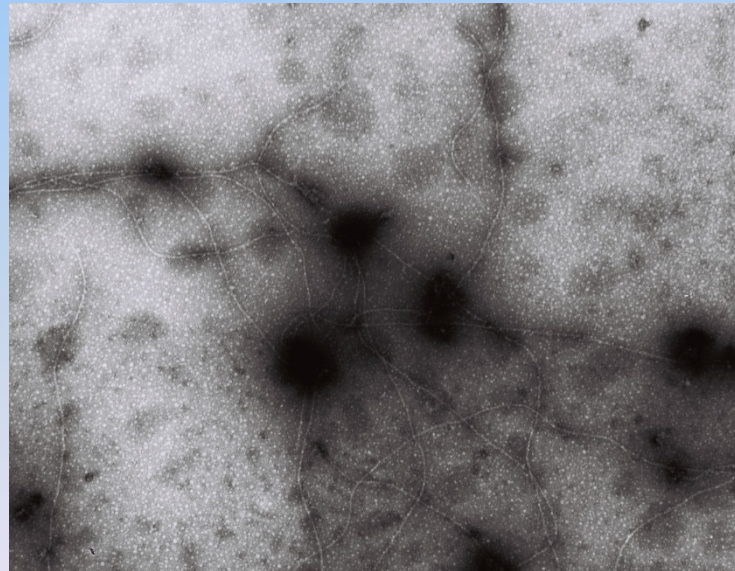
Electronová mikroskopie: Vimentin+R5/ 1000:1



Electronová mikroskopie : Vimentin+R5/ 100:1

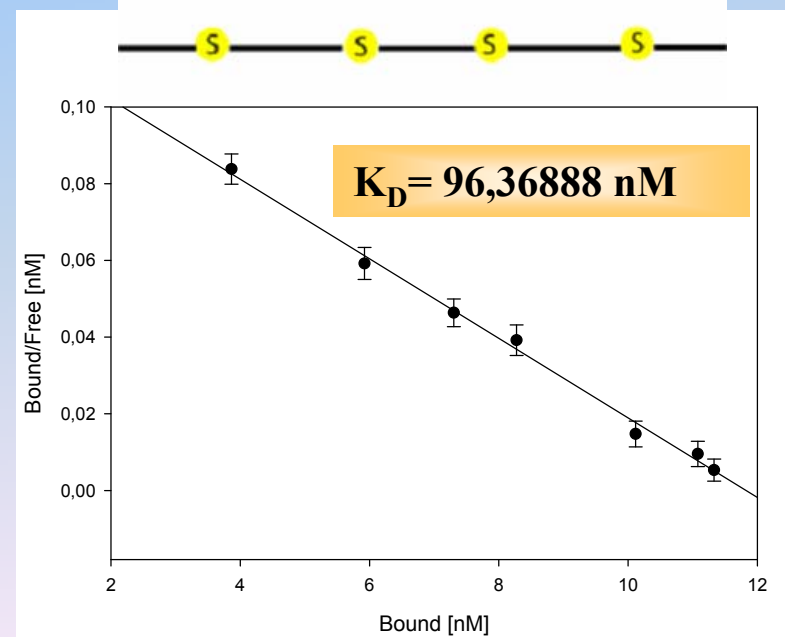
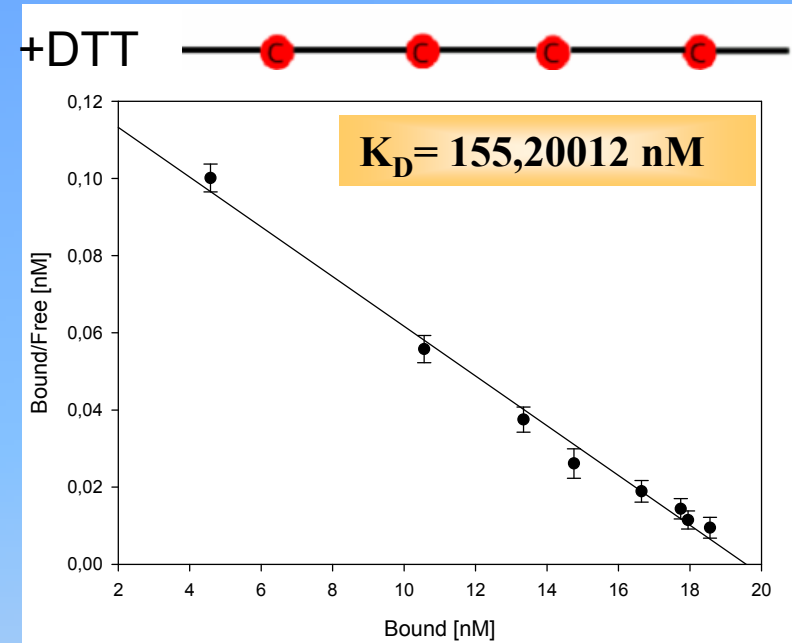
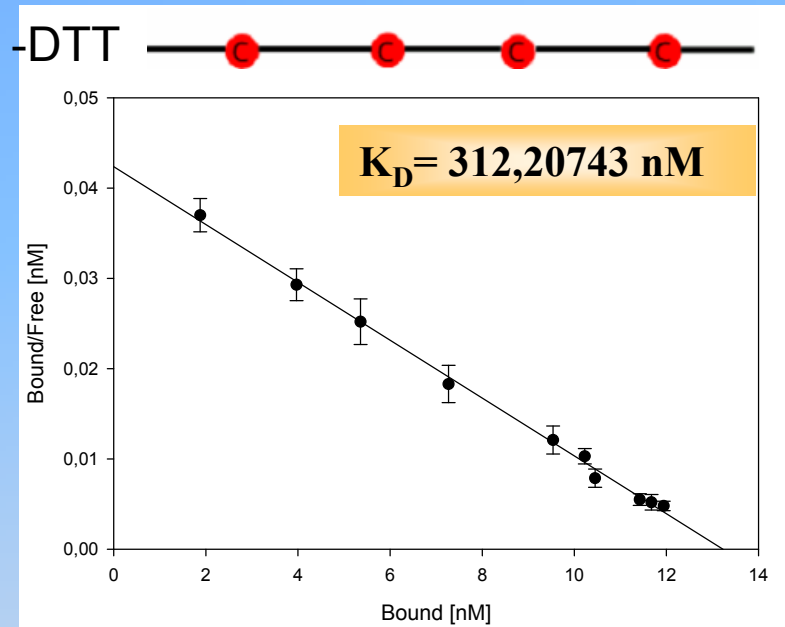


Electronová mikroskopie : Vimentin+R5/ 1:1

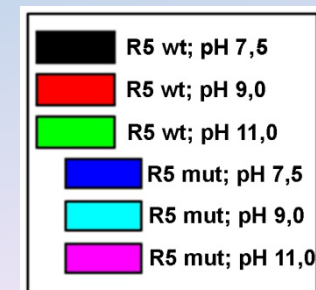
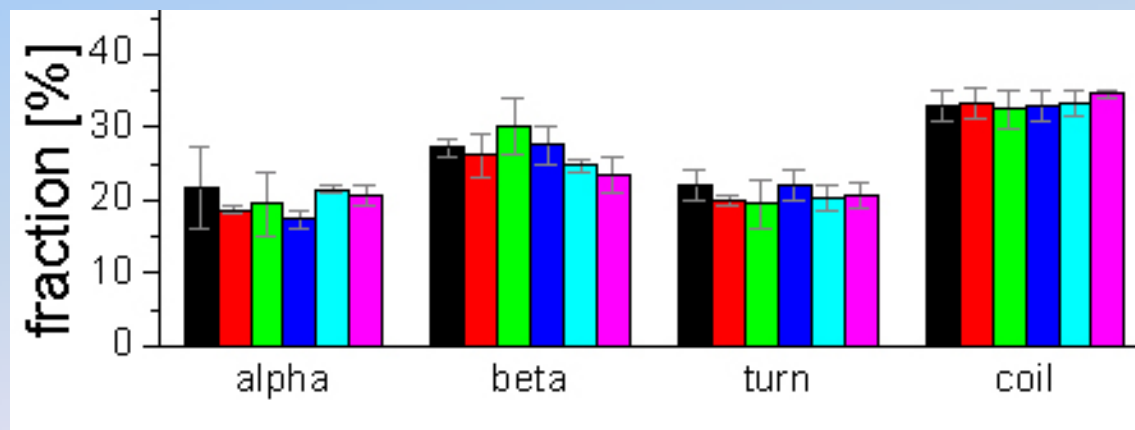
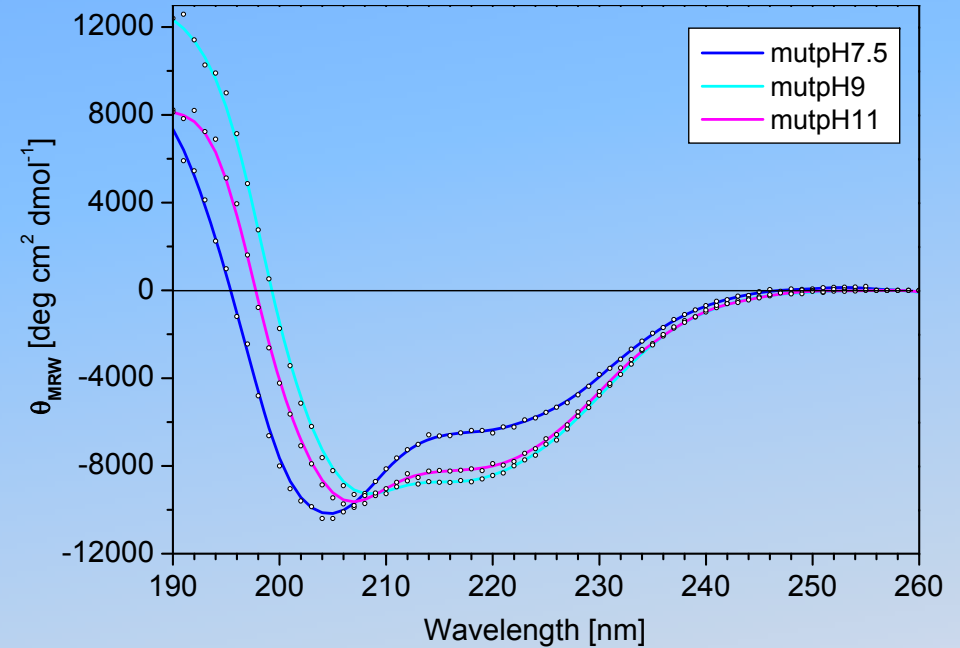
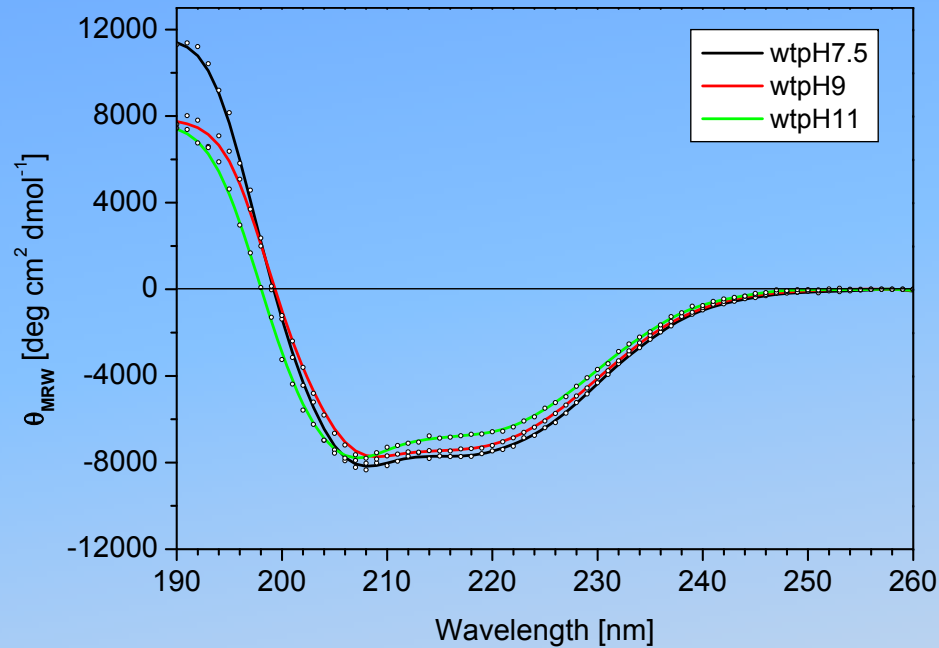


Značení Europiem: R5wt

5

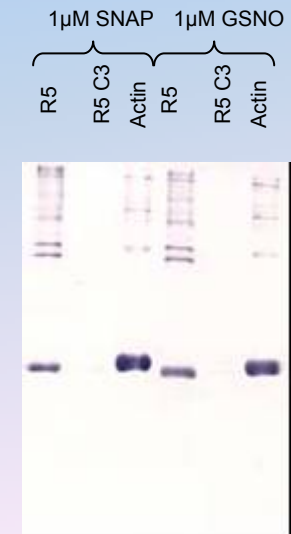
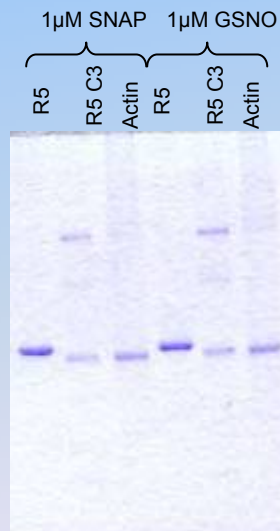
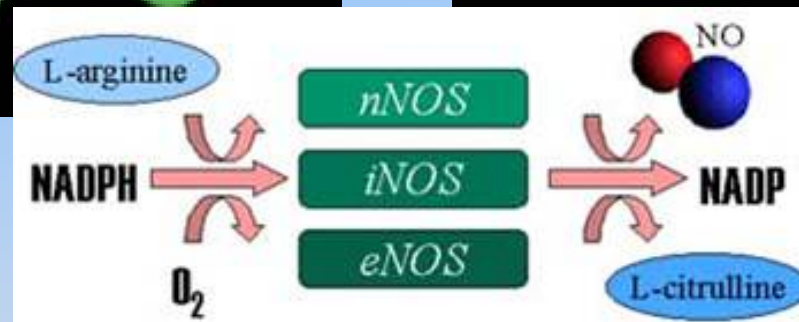
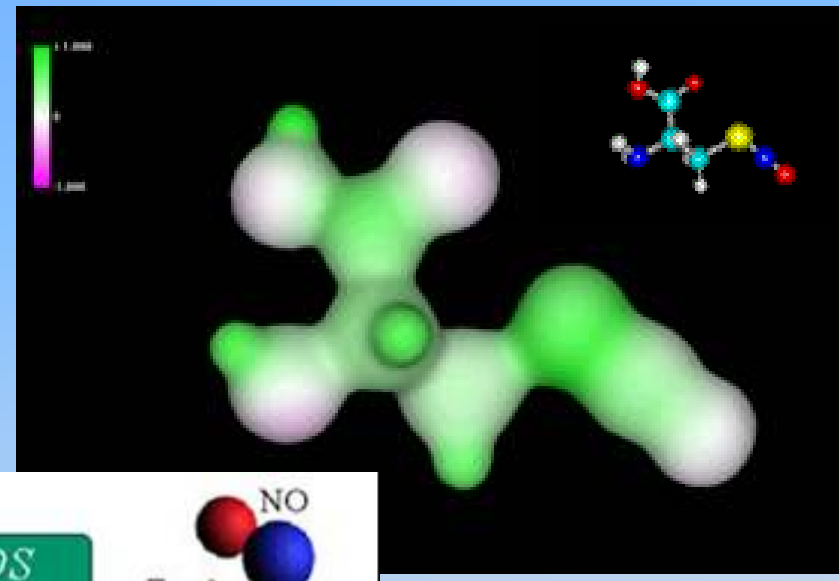
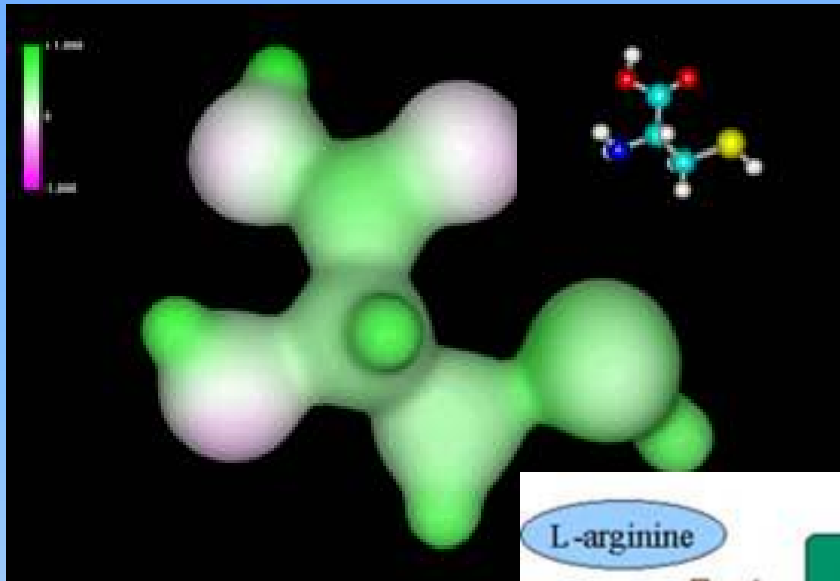


CD spektroskopie: R5wt a R5mutant v různém pH sekundární struktura



Nitrosylace NO

(konzervativni sekvence: -2: G,S,T,C,Y,N,Q; -1: K,R,H,D,E; 0: C; +1: D,E)



Předpokládaná úloha oxidantů pro stabilizaci struktury

(1) Během evoluce se zvýšila potřeba pro stabilní buněčný skelet, který by ovšem měl mít zachované dynamické vlastnosti.

Tuto úlohu by mohl obstarat cystein, který může za oxidačních podmínek vytvářet mezi sebou kovalentní vazbu (disulfidový můstek je $>30 - 90$ krát silnější než iontová síla nebo vazba vodíkových můstků).

(2) Cysteiny jsou v uvnitř buňky v redukovaném stavu. Přesto není neobvyklé najít disulfidové můstky odolné k redukujícím činidlům jako je DTT nebo cysteiny citlivé na nitrosylaci. Pokud je přítomen takový radikál, jako je peroxynitrit, thiolové skupiny jsou přednostně oxidovány (10^3 až 10^6 krát více než nukleové kyseliny a další aminokyseliny). Také reakce peroxynitritu je velice rychlá (rychlostní konstanta je 10^{-3} M^{-1} , což je 1 000 krát rychleji než při reakci s H_2O_2).

(3) Peroxynitrite je vytvářen z NO, což je produkt nitrid oxid syntázy, která katalyzuje reakci argininu na citrulin a oxid dusnatý (NO). Tento produkt se může dále oxidovat za vzniku peroxynitritu – velice silného radikálu.).

Neurální NOS je součástí utrophin/dystrophin-vázaného glycoprotein complex, který je součástí sarkolemy u svalových buněk.

Peroxynitrit is 70 krát více solubilní v nepolárním prostředí a 90% jeho reakce s O₂ se odehrává na membráně. Proto tedy vysoce reaktivní oxidační činidlo jako je peroxynitrit, který se vytváří v aktivně pracujících svalech může v místní oblasti velice efektivně vést k uvnitř i vně molekuly tvořených disulfidových můstků přes oxidaci cysteinů v plektinu i v příbuzných spojnicích kostry buňky.

Funkce proteinů

- I. —● 1. Enzymatická/enzymy/katalýza
- II. —● 2. Receptorová/signalizace/
- 3. Převážná/transportní/vazba-transport
- III. —● 4. Strukturní/zpevňovací/strukturní komponenty/
- 5. Aktivní pohyb/kontrakční/motor-proteiny
- 6. Hormonální/hormony/regulace
- 7. Obranná/specializovaná/imunitní systém/transkripční regulace
- IV. —● 8. Zásobní

I. Enzymy

II. Protein-interakce s ligandem

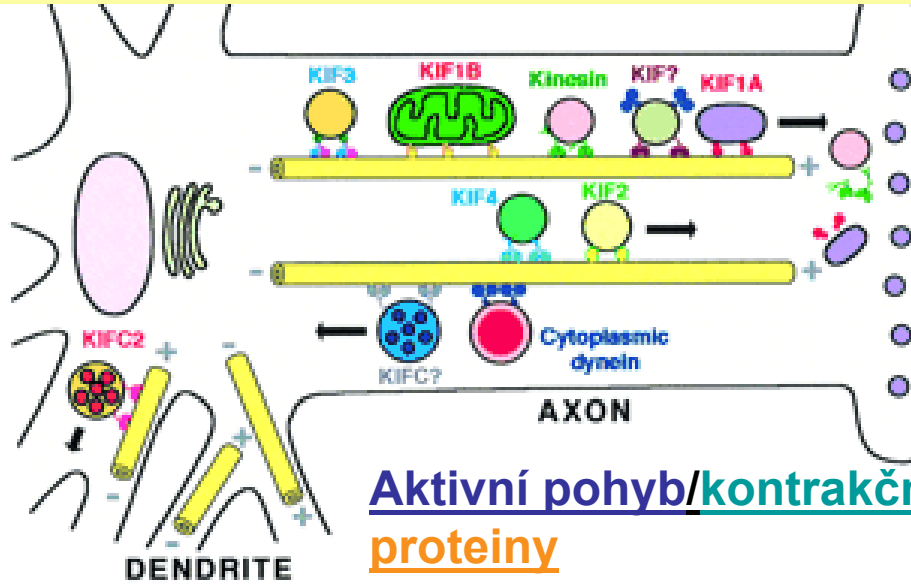
III. Protein-interakce s dalším proteinem nebo DNA

IV. Zásobní – zdroj energie, uhlíku nebo dusíku.

Kinesin se pohybuje striktně podél mikrotubulů směrem k periferii buňky (anterográdní směr).

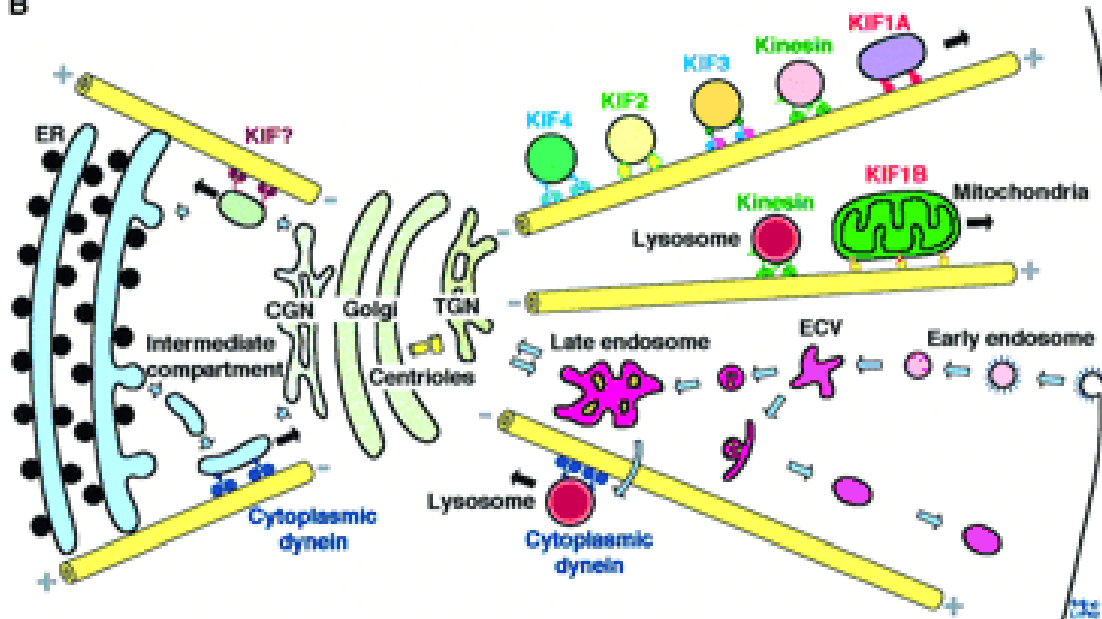
Dynein má tendenci se otáčet kolem mikrotubulů po povrchu směrem od periferie buňky (retrográdní směr).

A

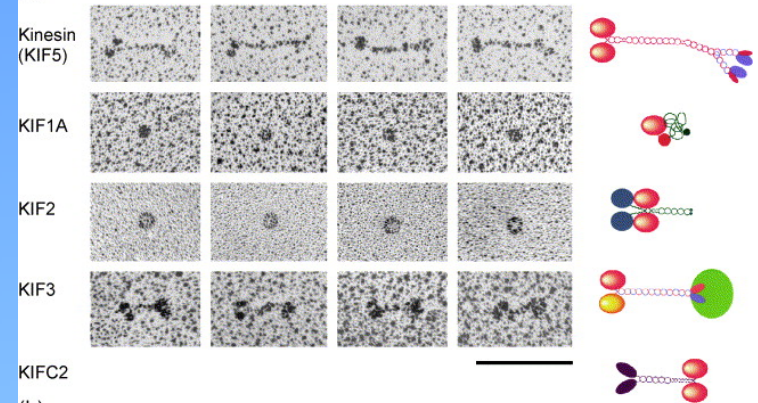


Aktivní pohyb/kontrakční/motor-proteiny

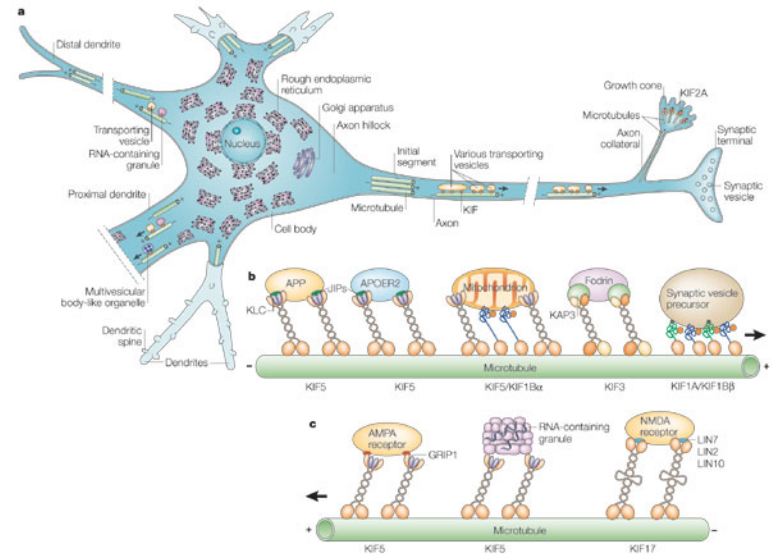
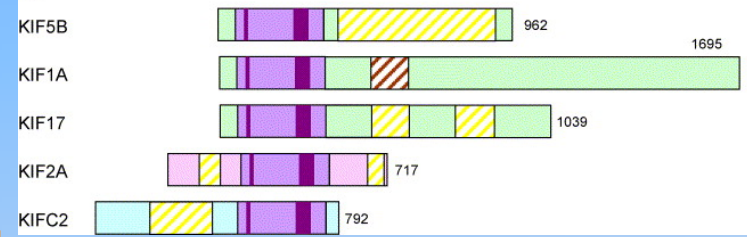
B



(a)



(b)



Funkce proteinů

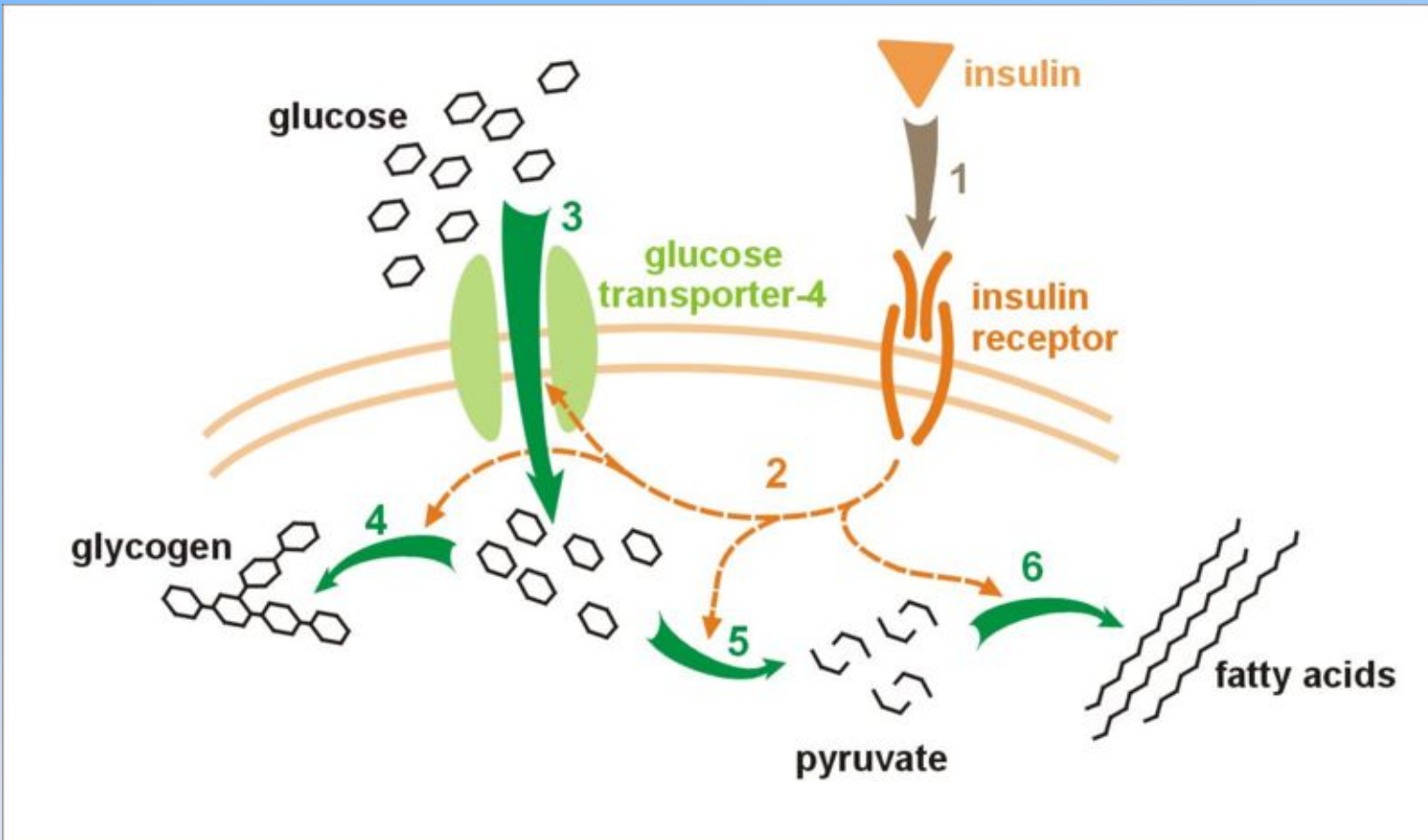
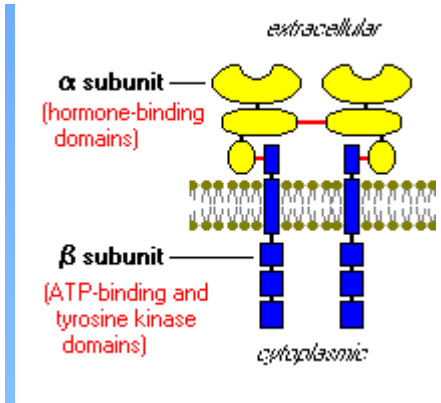
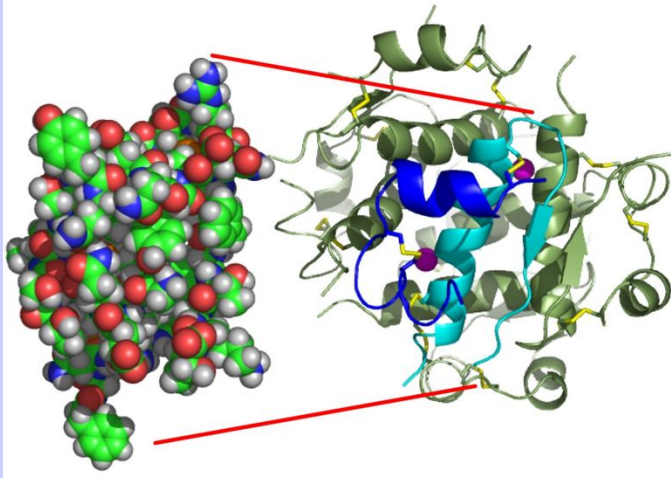
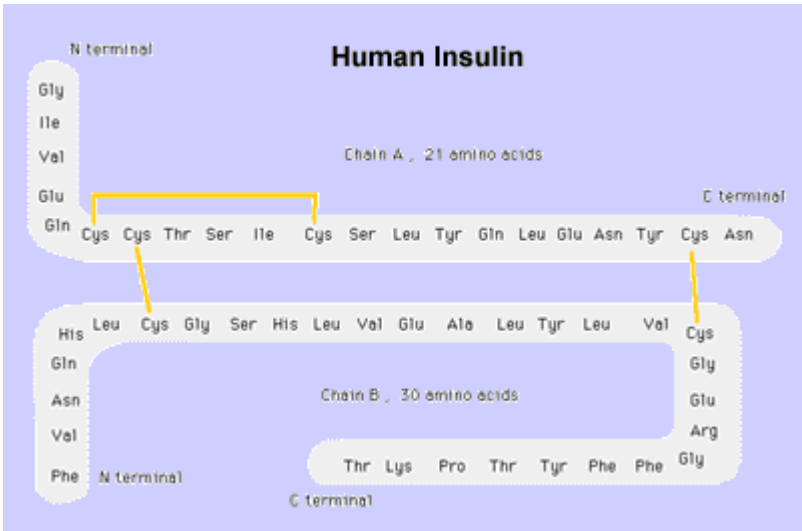
- I. —● 1. Enzymatická/enzymy/katalýza
- II. —● 2. Receptorová/signalizace/
- 3. Převážná/transportní/vazba-transport
- III. —● 4. Strukturní/zpevňovací/strukturní komponenty/
- 5. Aktivní pohyb/kontrakční/motor-proteiny
- 6. Hormonální/hormony/regulace
- 7. Obranná/specializovaná/imunitní systém/transkripční regulace
- IV. —● 8. Zásobní

I. Enzymy

II. Protein-interakce s ligandem

III. Protein-interakce s dalším proteinem nebo DNA

IV. Zásobní – zdroj energie, uhlíku nebo dusíku.



Funkce proteinů

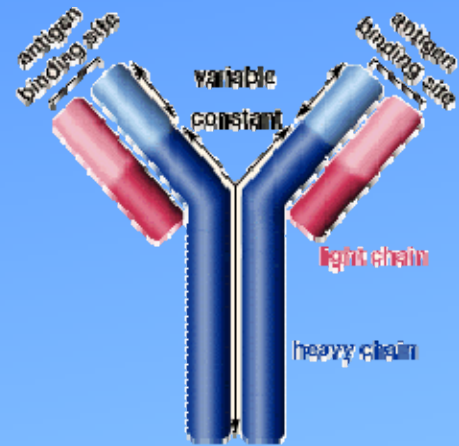
- I. —● 1. Enzymatická/enzymy/katalýza
- II. —● 2. Receptorová/signalizace/
- 3. Převážná/transportní/vazba-transport
- III. —● 4. Strukturní/zpevňovací/strukturní komponenty/
- 5. Aktivní pohyb/kontrakční/motor-proteiny
- 6. Hormonální/hormony/regulace
- 7. Obranná/specializovaná/imunitní systém/transkripční regulace
- IV. —● 8. Zásobní

I. Enzymy

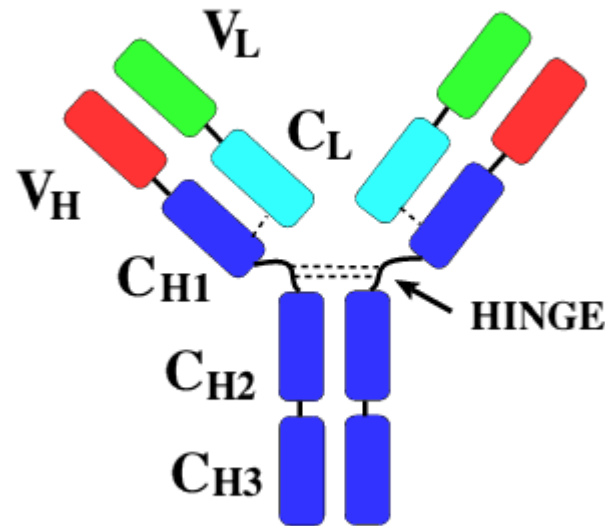
II. Protein-interakce s ligandem

III. Protein-interakce s dalším proteinem nebo DNA

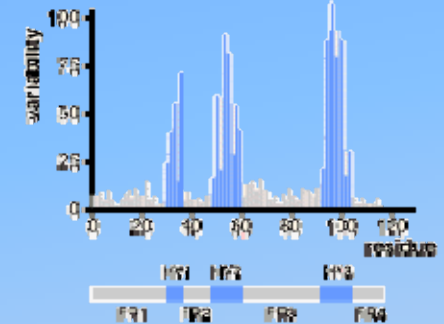
IV. Zásobní – zdroj energie, uhlíku nebo dusíku.



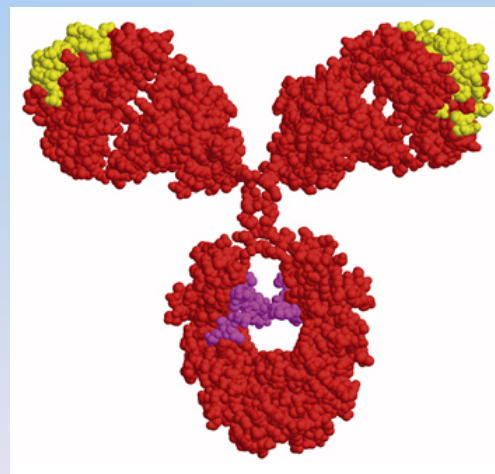
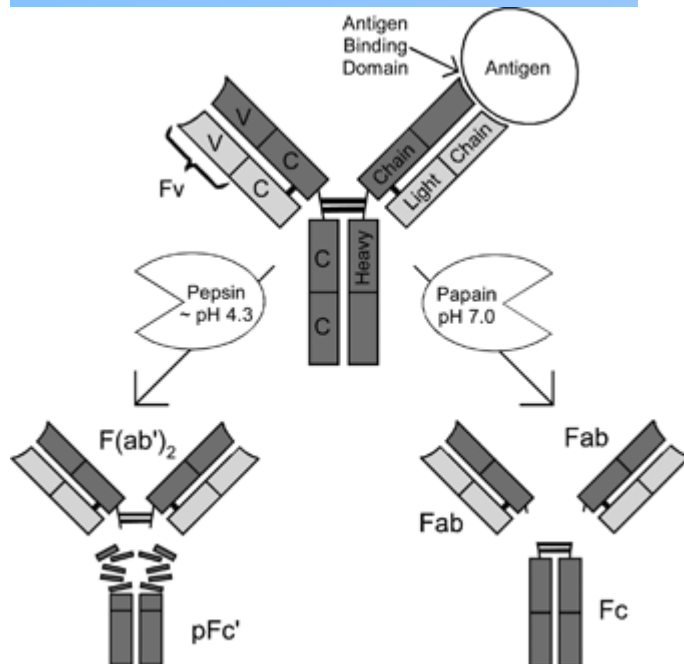
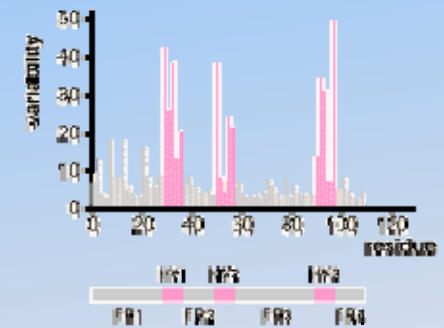
ANTIBODY DOMAIN STRUCTURE



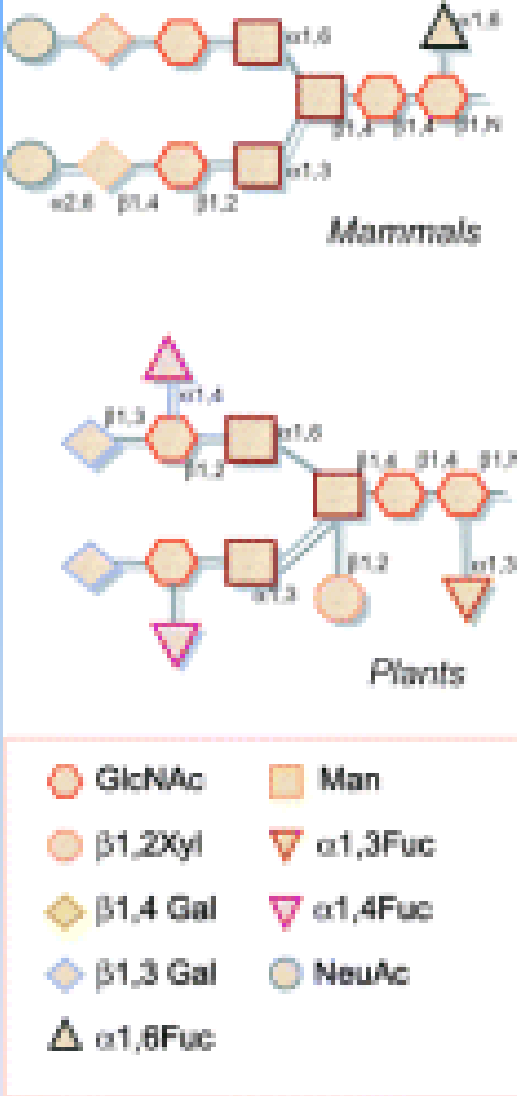
Heavy-chain V region



Light-chain V region



Glykosylace protilátek



Funkce proteinů

- I. —● 1. Enzymatická/enzymy/katalýza
- II. —● 2. Receptorová/signalizace/
- 3. Převážná/transportní/vazba-transport
- III. —● 4. Strukturní/zpevňovací/strukturní komponenty/
- 5. Aktivní pohyb/kontrakční/motor-proteiny
- 6. Hormonální/hormony/regulace
- 7. Obranná/specializovaná/imunitní systém/transkripční regulace
- IV. —● 8. Zásobní

I. Enzymy

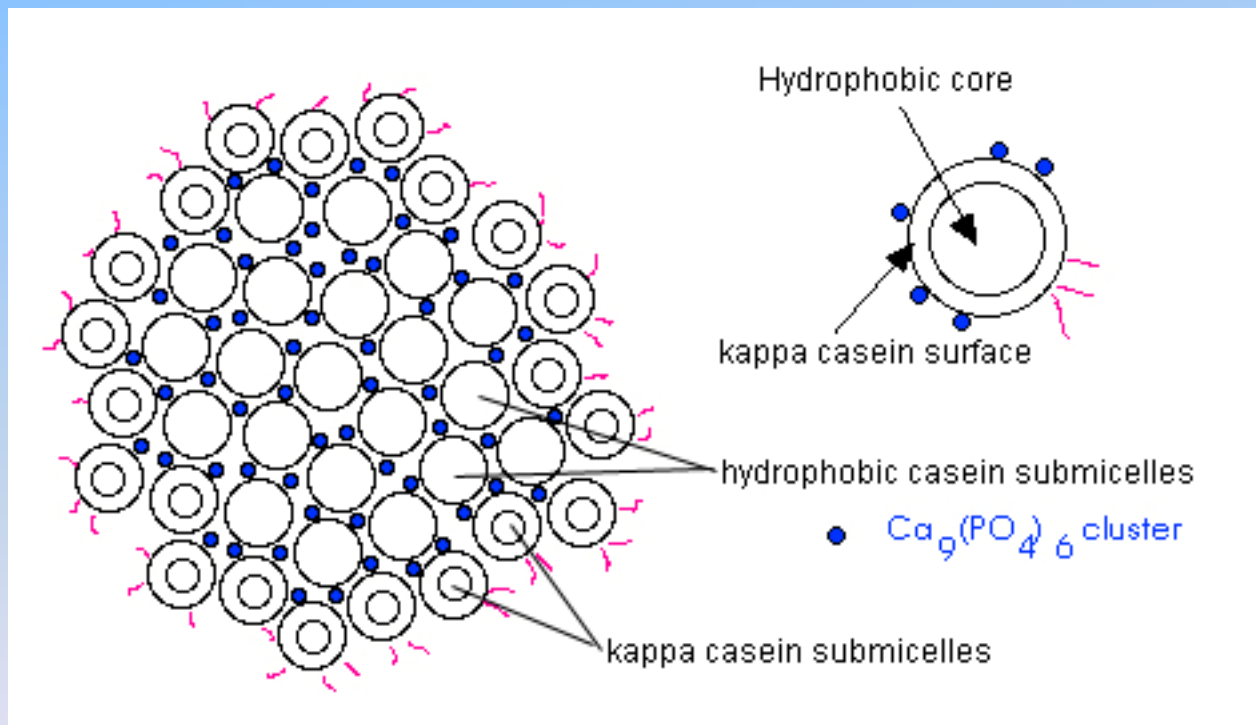
II. Protein-interakce s ligandem

III. Protein-interakce s dalším proteinem nebo DNA

IV. Zásobní – zdroj energie, uhlíku nebo dusíku.

Kasein – funkce zásobní?

- Tvoří 80% všech bílkovin mléka.
- Kasein obsahuje relativně vysoký podíl prolinu a hydrofobních aminokyselin.
- Struktura není stabilizována disulfidovými můstky.
- Vápník sám o sobě vytváří nerozpustný precipitát neschopný dalšího zpracování.
- Vysoký obsah vápníku je svým způsobem nebezpečný.



Metody studia funkce proteinů

Cíl

Dostatek znalostí o proteinu

Dostatek materiálu

Zviditelnění proteinu

Kvalita proteinu

Hledání interakčního partnera

Kvantifikace interakce

Detailní popis interakce

Metoda

Bioinformatika

Exprese a purifikace proteinů

SDS-PAGE/Western blot/ fluorescenční a elektronová mikroskopie/detekce aktivity enzymu na gelu/MALDI/2D-PAGE

CD spektroskopie/měření turbidity

Substrátová specificita/Dvojhybridní kvasinkový systém/vrstevní značení

Měření kinetických parametrů pomocí spřažených enzymových reakcí/radioaktivně značených látek/kosedimentace/

Krystalizace/NMR analýza/cílená mutageneze/řízená evoluce/modifikace proteinů (fosforylace, nitrosylace, glykosylace)/molekulární modelování proteinů.