

Funkce proteinů

Lubomír Janda

Co potřebujeme k tomu, abychom mohli studovat funkci proteinů?

- Dostatek informací
- Vhodné metody
- Počítat s postranslační modifikací
- Nespokojit se s již publikovanými informacemi
- Počítat s existencí více-funkčních proteinů

Funkce proteinů

I. Enzymy

II. Protein-interakce s ligandem

III. Protein-interakce s dalším proteinem nebo DNA

IV. Zásobní – zdroj energie, uhlíku nebo dusíku.

- I. ● 1. Enzymatická/enzymy/katalýza
- II. ● 2. Receptorová/signalizace/
- III. ● 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

Metody studia funkce proteinů

Cíl

Metoda

Dostatek znalostí o proteinu
Funkční protein
Zviditelnění proteinu

Bioinformatika (analýza proteinu, práce s literaturou)
Expres a purifikace proteinů
SDS-PAGE/Western blot/ fluorescenční a
elektronová mikroskopie/detekce aktivity enzymu na
gelu/MALDI/2D-PAGE

Kvalita proteinu
Hledání interakčního partnera

CD spektroskopie/měření turbidity/DLS
Substrátová specifita/Dvojhybridní kvasinkový
systém/vrstevní značení/imunoprecipitace/TAP tag
technologie

Kvantifikace interakce

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

Detailní popis interakce

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

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.

Table 1: Selected examples of catalytic promiscuity in a single enzyme.

Enzyme	Enzyme class	Normal activity	Promiscuous activity
proline aminopeptidase	metallohydrolase (two Mn ²⁺ centers)	C–N hydrolysis in proline amides	P–F hydrolysis in diisopropyl fluorophosphate
aminopeptidase	metallohydrolase (two Zn ²⁺ centers)	C–N hydrolysis in amides	P–O hydrolysis in bis- <i>p</i> -nitrophenylphosphate
pyruvate kinase	metalloenzyme (Mn ²⁺ , K ⁺ , Mg ²⁺ centers)	phosphoryl transfer from phosphoenolpyruvate	sulfuryl transfer from sulfoenolpyruvate; also phosphoryl transfer to fluoride, hydroxylamine, or α -hydroxycarboxylic acids
<i>o</i> -succinylbenzoate synthase	metalloenzyme (Mn ²⁺ center)	dehydration of 2-hydroxy-6-succinyl-2,4-cyclohexadiene carboxylate	racemization of <i>N</i> -acylamino acids
methane monooxygenase	non-heme diiron	hydroxylation of methane	epoxidation, <i>N</i> -oxide formation, dehalogenation, desaturation of benzylic substrates
plant steroyl acyl carrier protein Δ^9 desaturase	non-heme diiron	desaturation of the C9–C10 link in stearic acid to give oleic acid	sulfoxidation of 9-thia or 10-thia analogues of stearate and the hydroxylation of 9-fluoro analogues
cephalosporin C synthase	metalloenzyme (non-heme Fe center, 2-oxo-glutarate-dependant)	oxidative ring expansion of the five-membered ring to a six-membered, hydroxylation of a methyl group	ester hydrolysis
lipase, esterase	serine hydrolase	ester hydrolysis	β -lactam hydrolysis
lipase, chymotrypsin	serine hydrolase	triglyceride or peptide hydrolysis	aldol addition or Michael addition
subtilisin	serine hydrolase	peptide hydrolysis	sulfonamide hydrolysis
lipase, trypsin	serine esterase	triglyceride or peptide hydrolysis	oligomerization of (Si(CH ₃) ₂ (OEt) ₂), dimerization of Si(CH ₃) ₃ OCH ₃
pepsin	aspartate hydrolase	amide hydrolysis	sulfite hydrolysis
asparaginase	Thr-Lys-Asp triad	C–N hydrolysis in asparagine to give aspartate	C≡N hydrolysis in β -cyanoalanine to give aspartate
epoxide hydrolase	Asp-His-Asp triad	hydrolysis of epoxides with inversion of configuration	hydrolysis of epoxides with retention of configuration
oxynitrilase	Ser-His-Asp triad	addition of cyanide to aldehydes	addition of cyanide to imines
aldolase catalytic antibody	Lys	aldol reaction	Kemp elimination
serine hydroxymethyltransferase	pyridoxal-dependent	transfer of C β of serine to tetrahydropteroylglutamate	threonine retroaldol reaction, decarboxylation of aminomalonnate, racemization of alanine, transamination of alanine and pyruvate
pyruvate decarboxylase	thiamine-dependent	decarboxylation of pyruvate	acyloin condensation of acetaldehyde and benzaldehyde

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

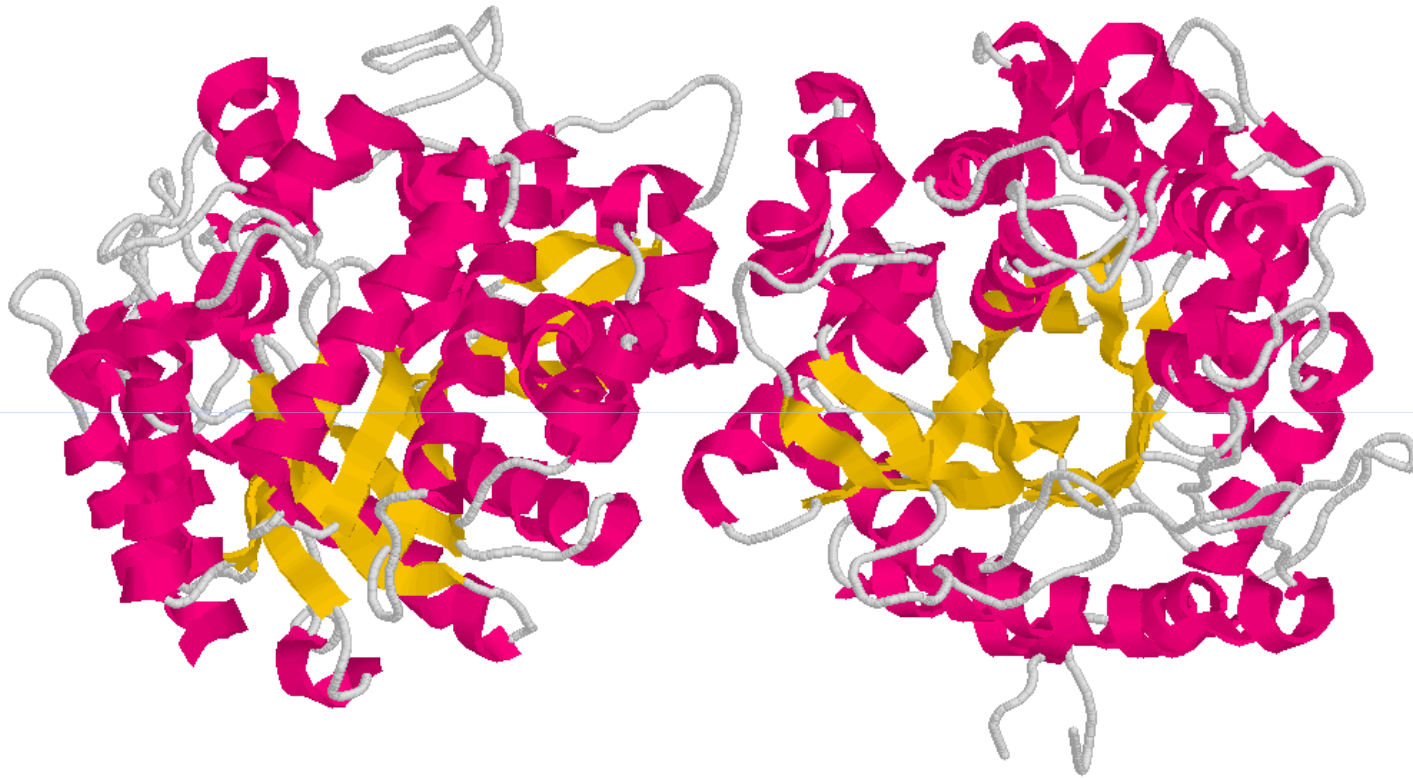
III. Protein-interakce s dalším proteinem nebo DNA

IV. Zásobní – zdroj energie, uhlíku nebo dusíku.

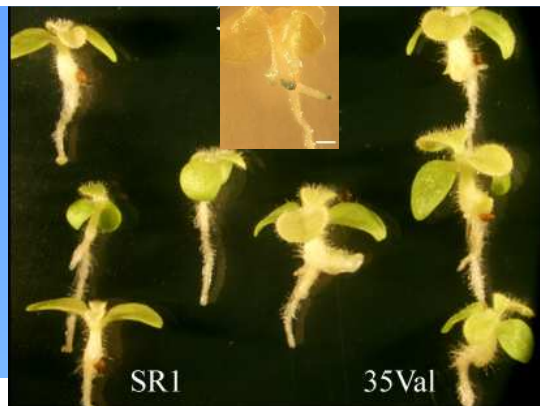
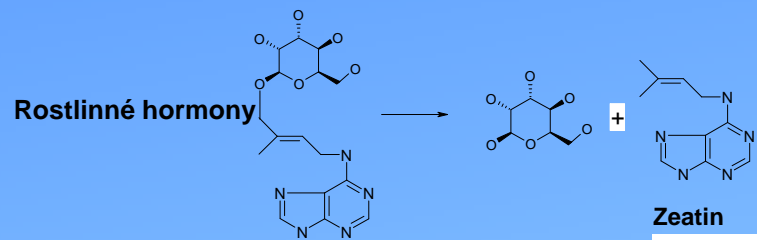
Skupina	Katalyzovaná reakce	Typická reakce	Příklady enzymů s triviálními názvy
EC1.x.x.x <i>Oxidoreduktázy</i>	Katalyzují reakci oxidační/redukční; přenáší atom H nebo O z jedné sloučeniny na druhou.	$AH + B \rightarrow A + BH$ (redukce) $A + O \rightarrow AO$ (oxidace)	Dehydrogenázy/ oxidázy
EC2.x.x.x <i>Transferázy</i>	Přenáší funkční skupinu z jedné sloučeniny na druhou. Skupina může být methyl-, acyl-, amino- nebo fosfátová skupina	$AB + C \rightarrow A + BC$	Transamináza/ kináza
EC3.x.x.x <i>Hydrolázy</i>	Vytváří hydrolýzou ze substrátu dva produkty.	$AB + H_2O \rightarrow AOH + BH$	Lipáza, amyláza, peptidáza
EC4.x.x.x <i>Lyázy</i>	Nehydrolytické přidání a nebo odstranění skupiny ze substrátu. C-C, C-N, C-O or C-S mohou být štěpeny	$RCOCOOH \rightarrow RCOH + CO_2$	Dekarboxyláza
EC5.x.x.x <i>Isomerázy</i>	Přeskupení uvnitř molekuly – isomerizace.	$AB \rightarrow BA$	Isomeráza/mutáza
EC6.x.x.x <i>Ligázy</i>	Spojení dvou molekul spolu pomocí syntézy vazeb C-O, C-S, C-N or C-C s paralelním uvolněním ATP	$X + Y + ATP \rightarrow XY + ADP + Pi$	Syntetáza

β -glukosidáza Zm-p60.1

EC 3.2.1.21



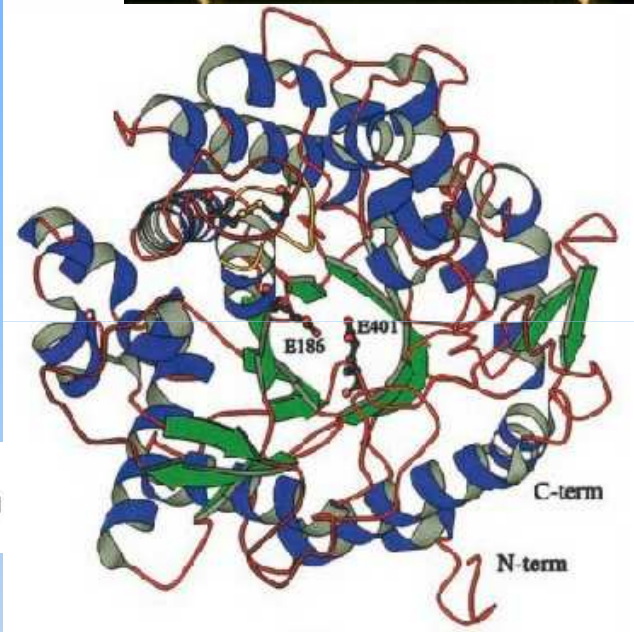
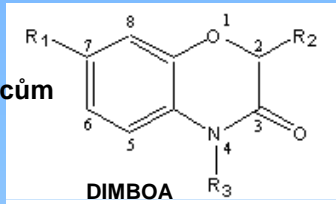
Cytokininy



Obranné látky

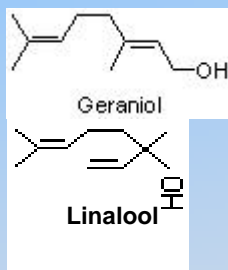
R1=OCH3; R2=R3= OH

S účinkem proti škůdcům



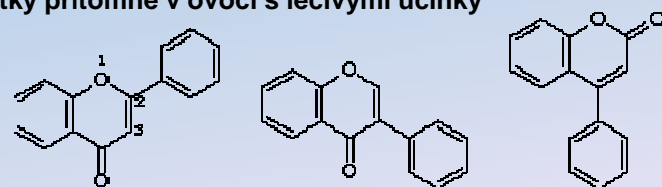
Terpeny

Látky tvořící aroma vína a ovocných extraktů



Flavonoidy

Látky přítomné v ovoci s léčivými účinky

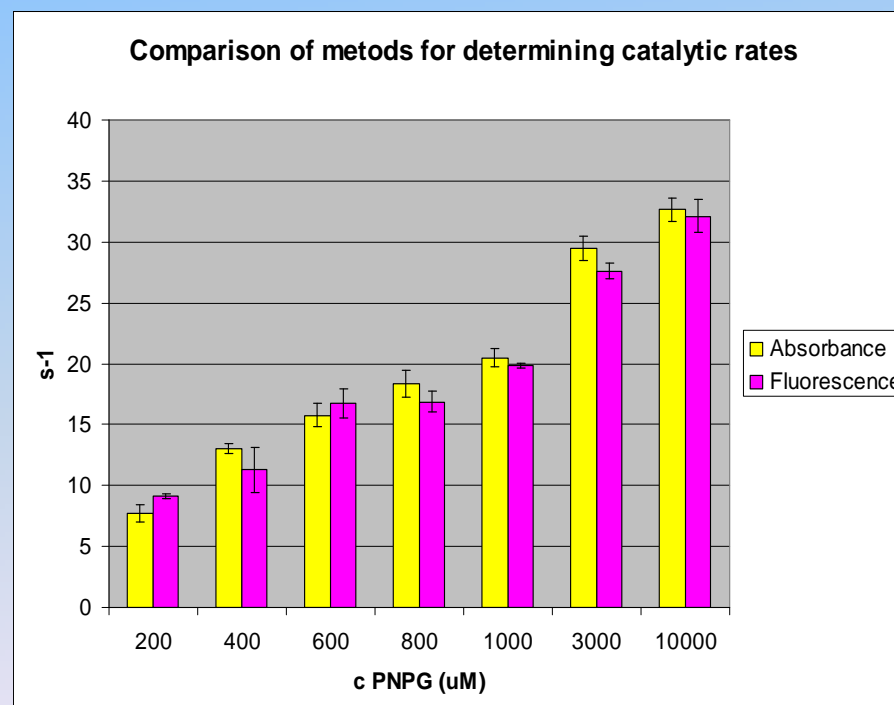
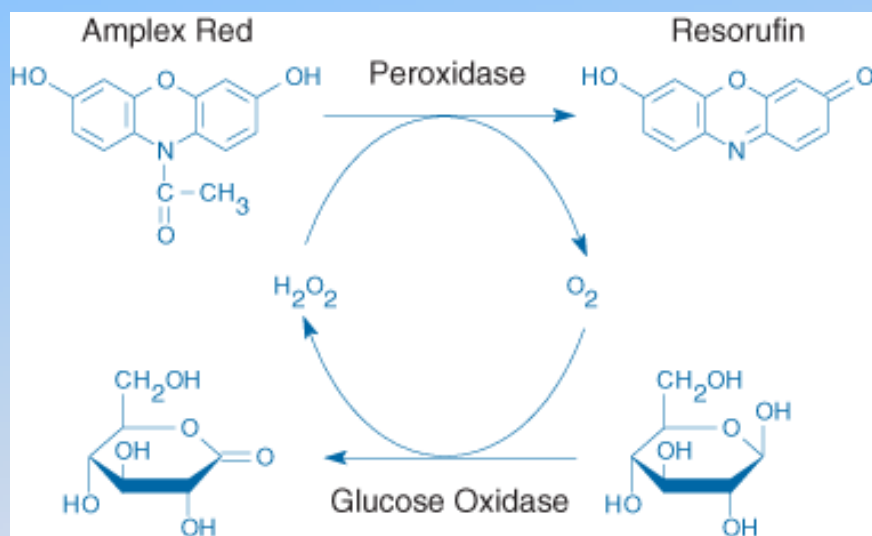


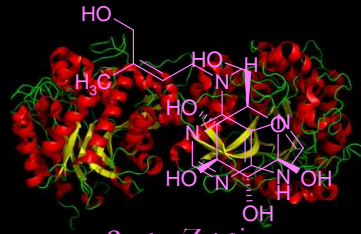
Quercetin, Naringenin, Daidzein, Resveratrol, Luteolin



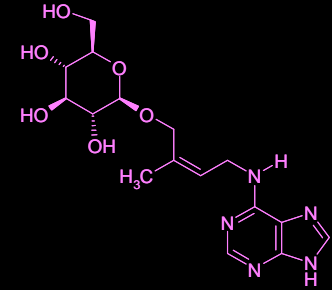
Nová metoda pro studium kinetických parametrů vzácných glukozidů

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

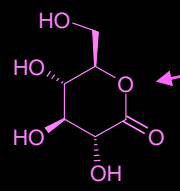




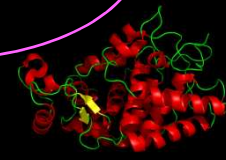
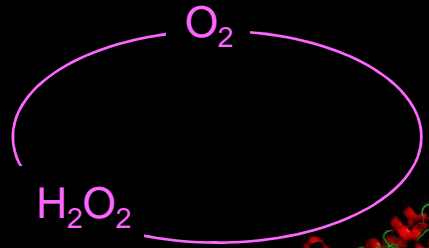
β -glucosidase
Glucose



Zeatin-O-glucoside



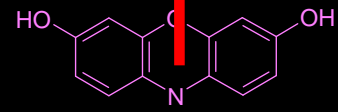
glucoseoxidase



peroxidase

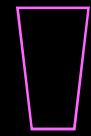


Amplex Ultra Red

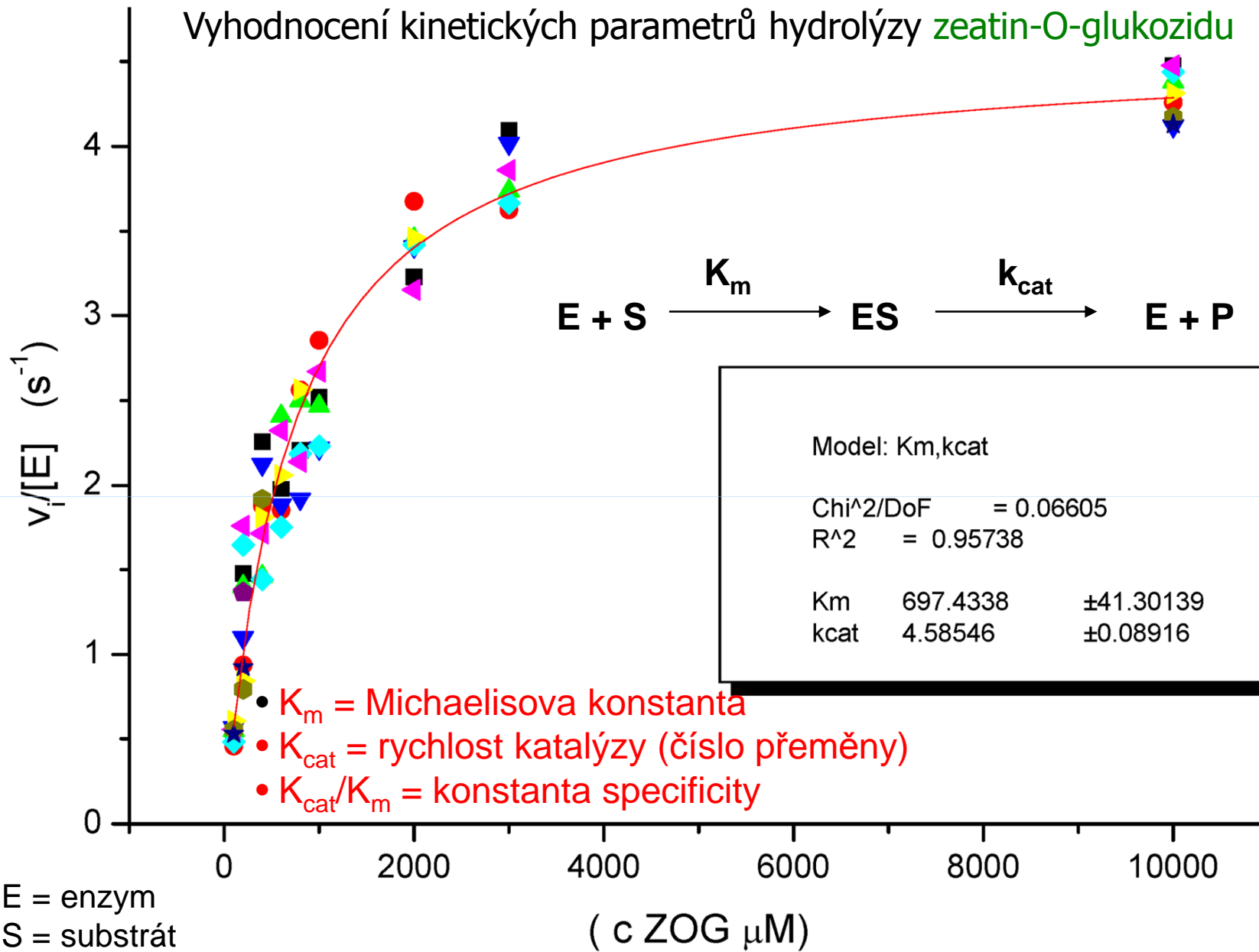


Resorufin

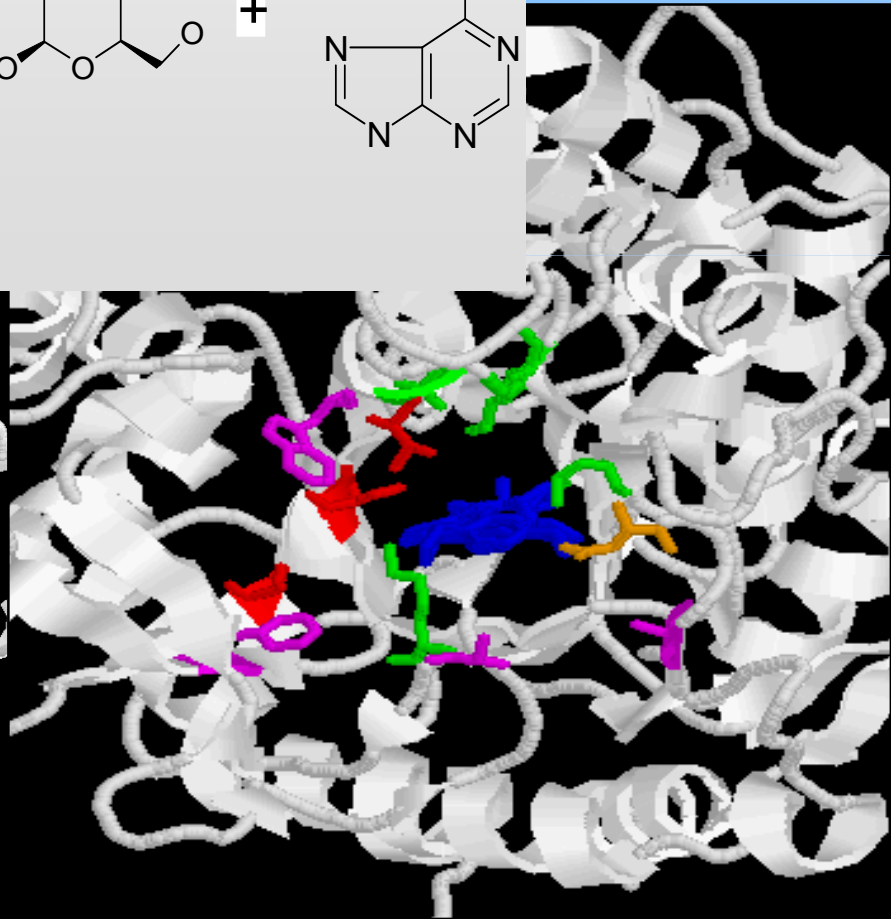
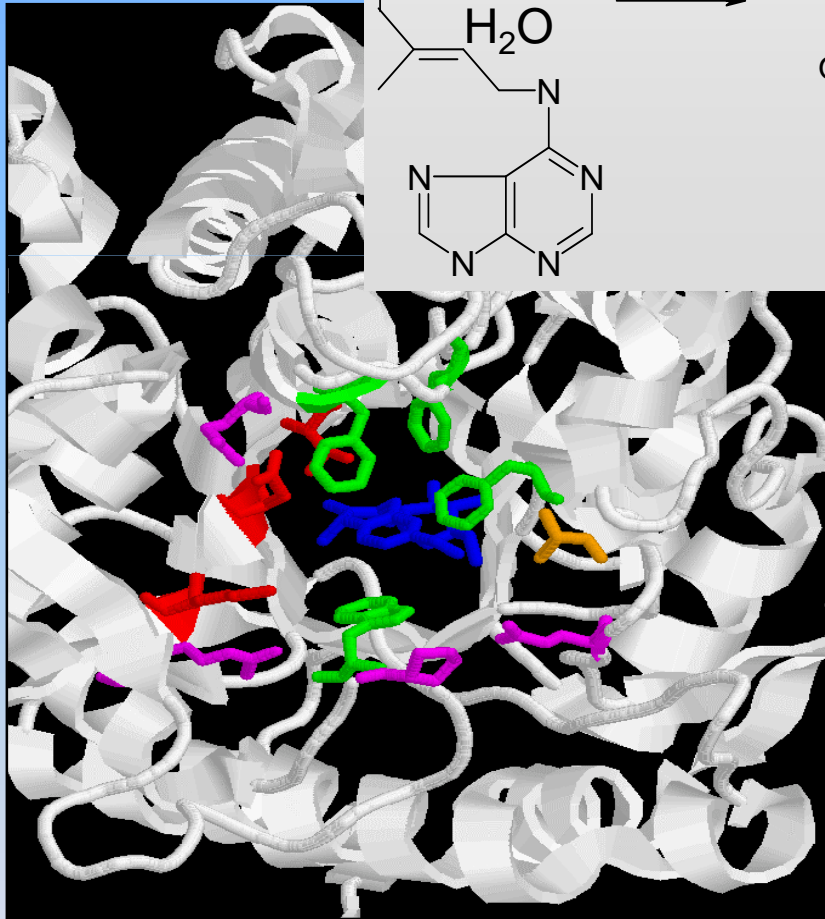
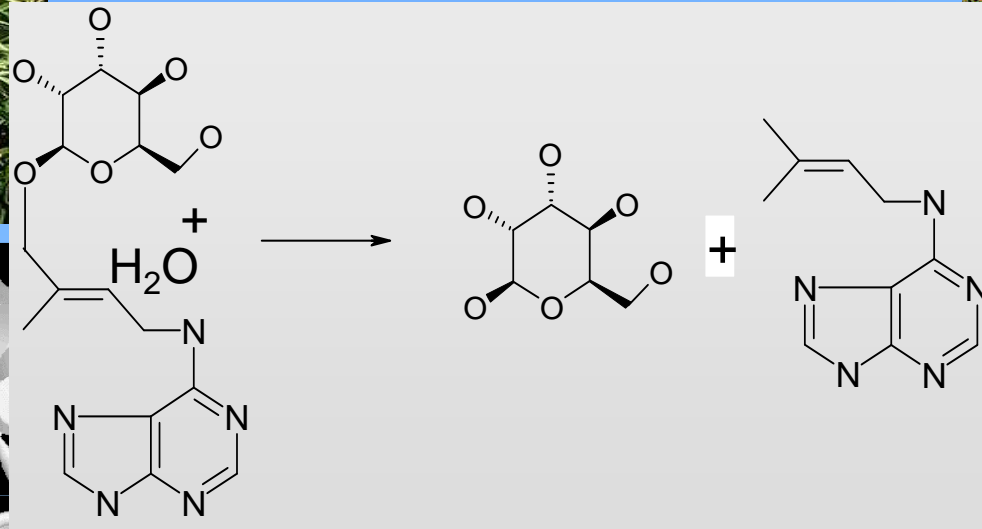
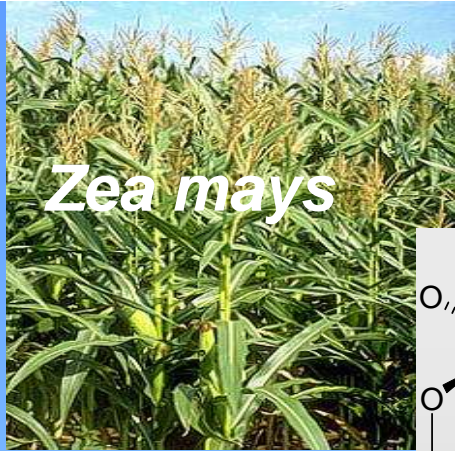
Fluorimeter



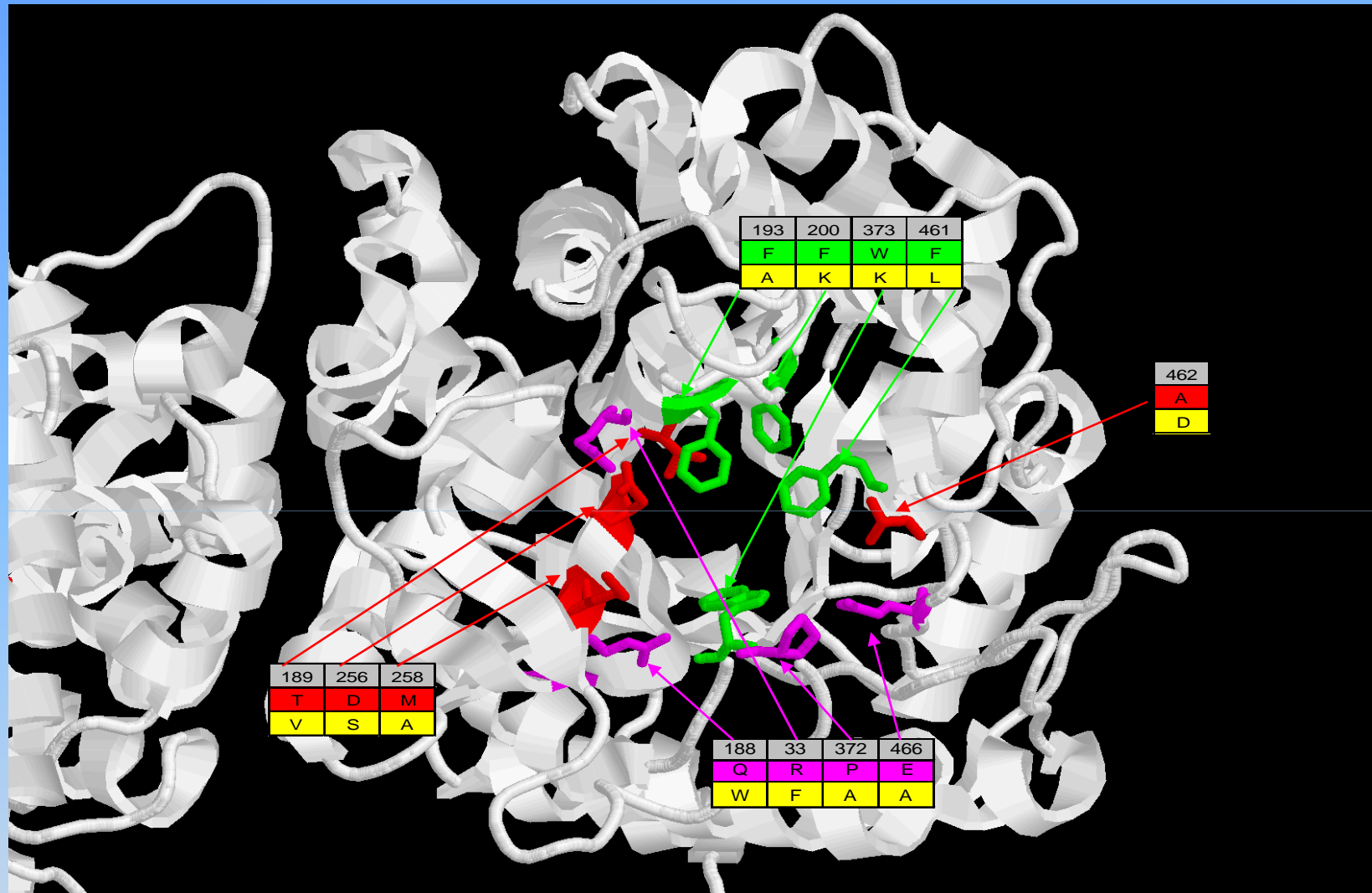
Vyhodnocení kinetických parametrů hydrolýzy zeatin-O-glukozidu



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



Návrh mutageneze



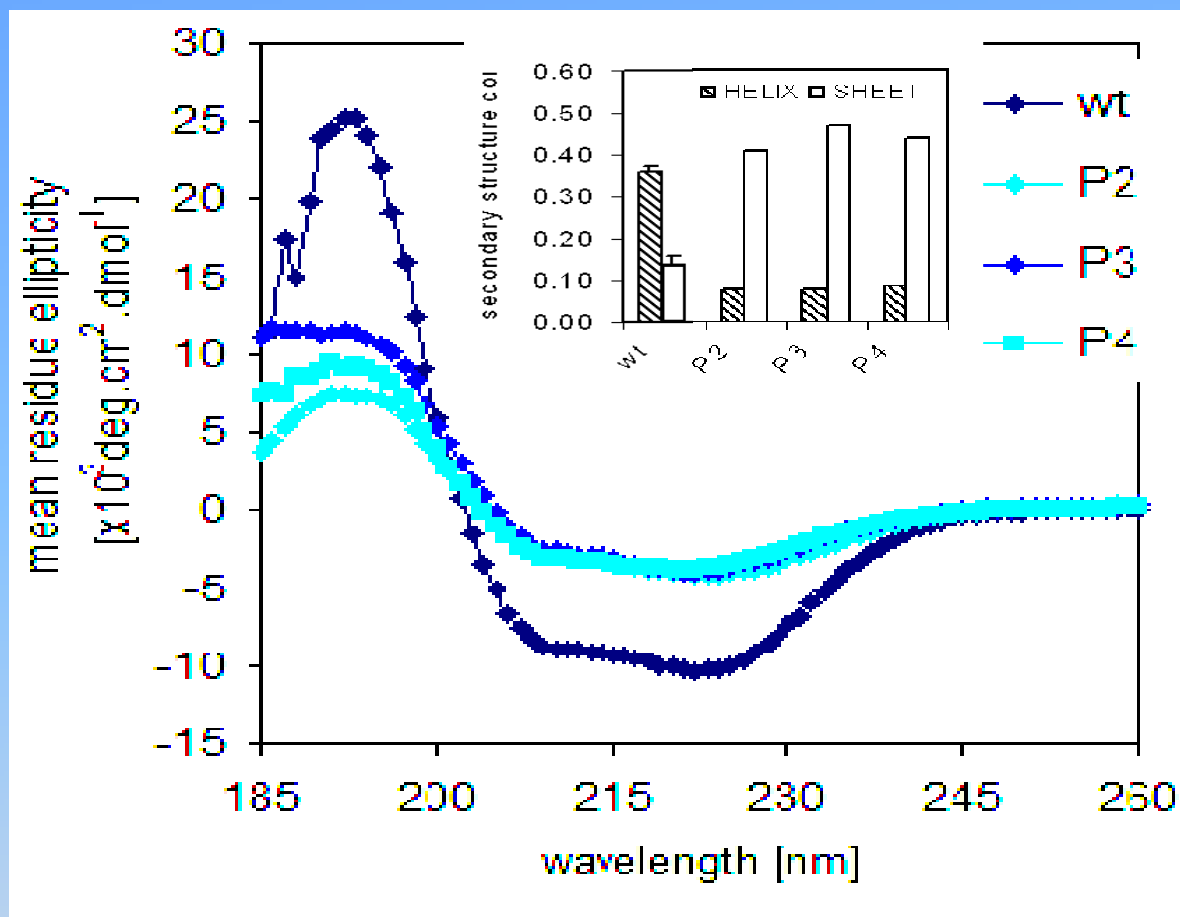
P2 (F193A, F200K, W373K, F461L)

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



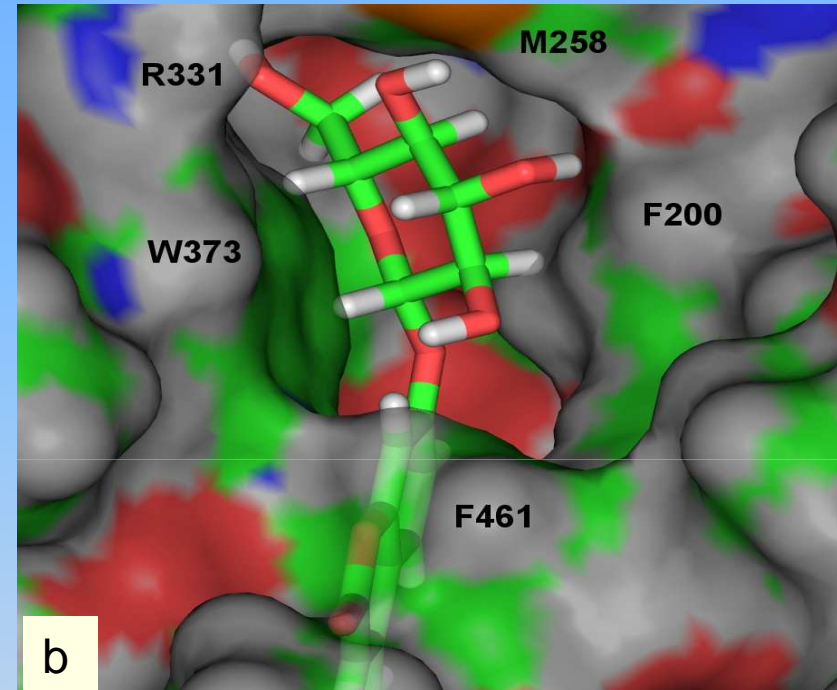
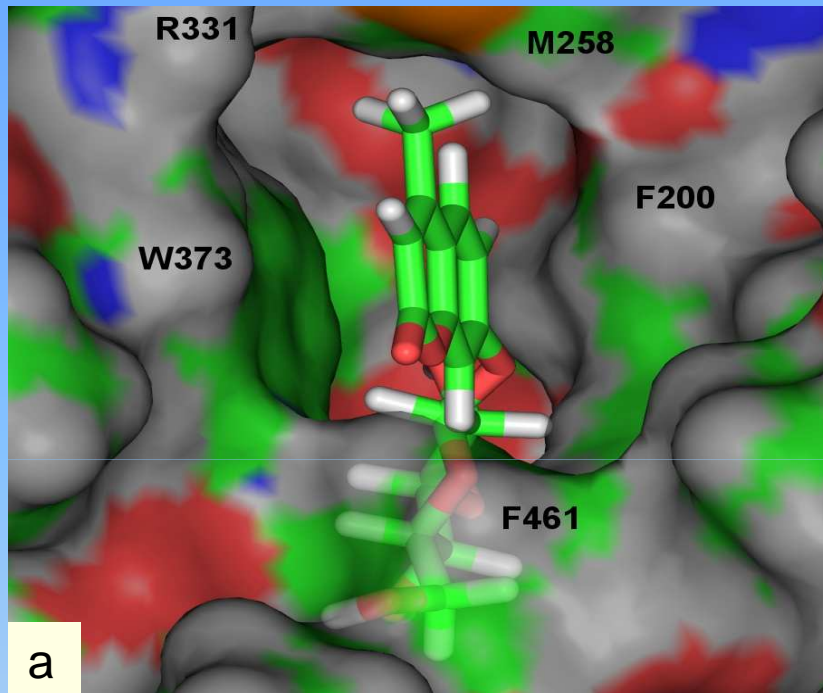
Vzdálená-UV spektra cirkulárního dichroismu divokého typu a jeho mutant P2, P3 and P4.

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



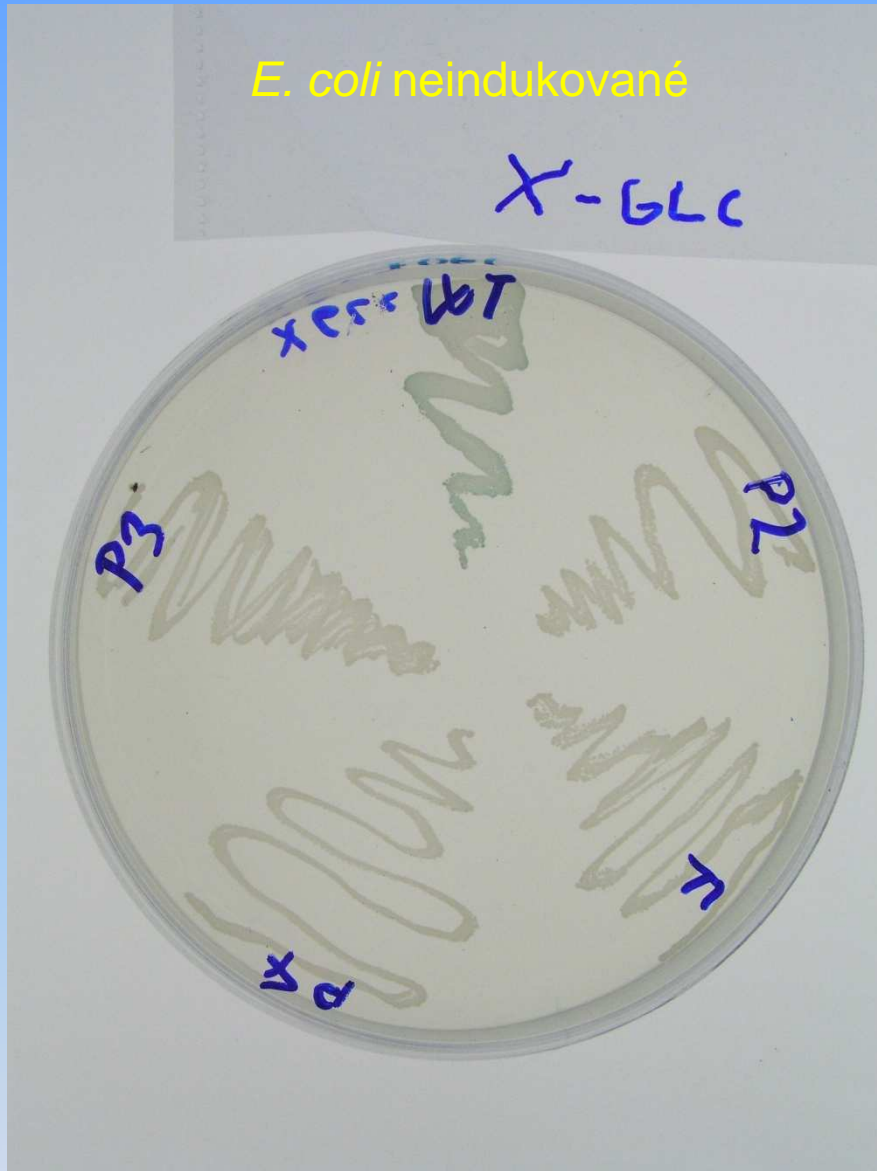
Pohled do aktivního místa mutantu F193A (a) s produktivní a (b) ne-produktivní vazbou substrátu (v tomto případě se jedná o MUG).

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
			<i>MUG</i>		
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

E. coli neindukované

X-GLC



-

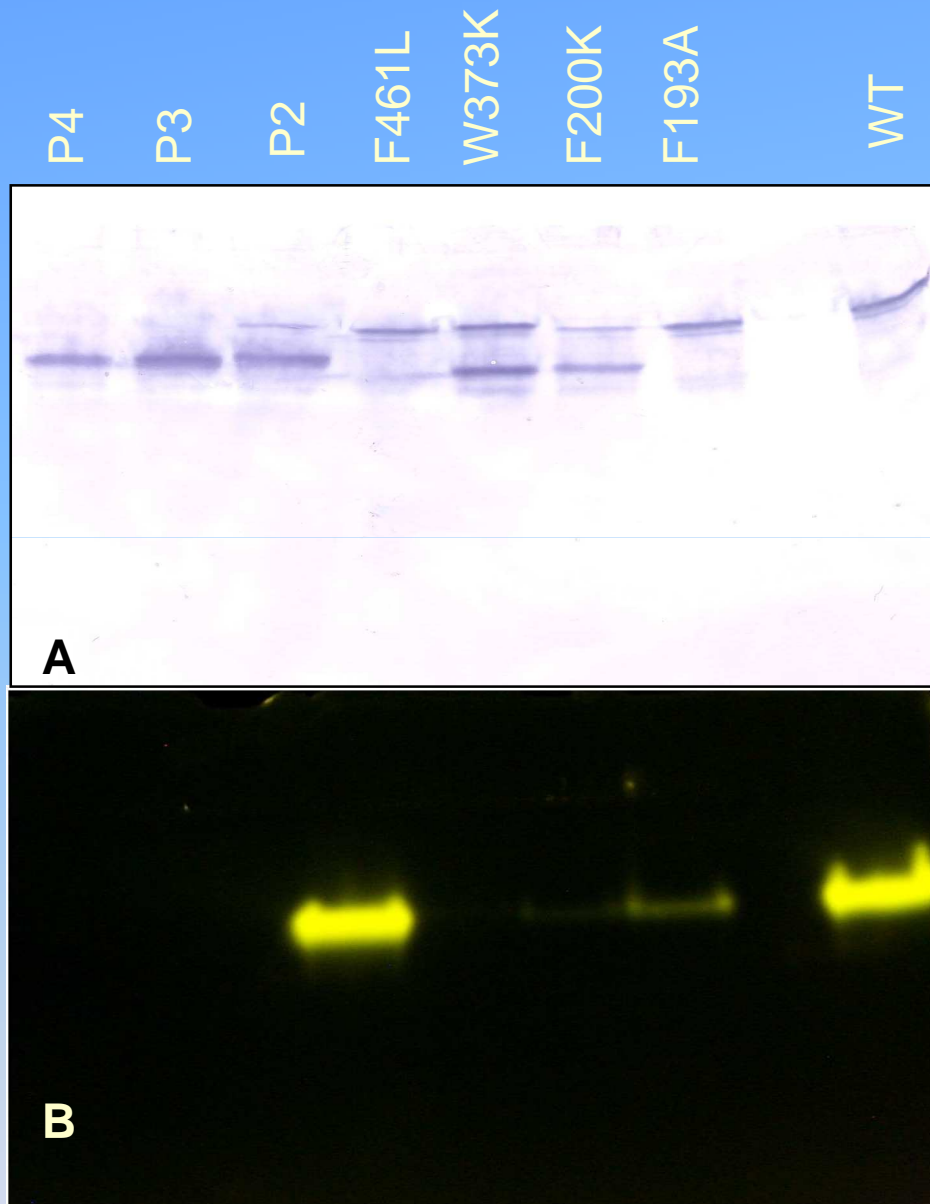
E. coli indukované

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 Commassie modře.

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

Je to dimer?????

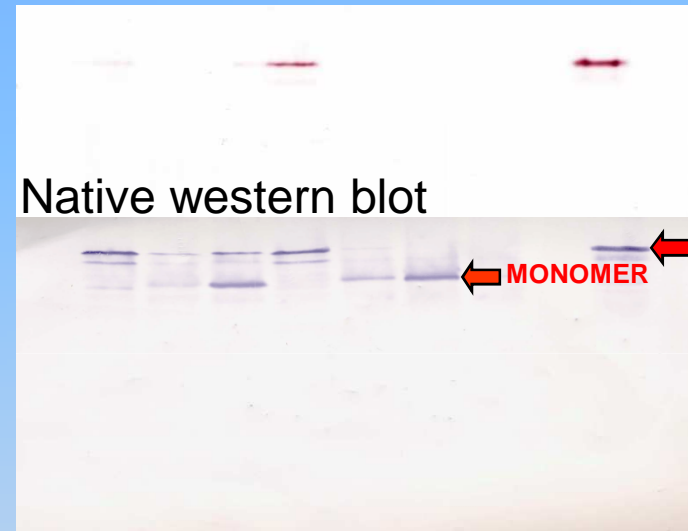
Dimerová forma 120 kDa
Monomerní forma 60 kDa

Activity in gel staining

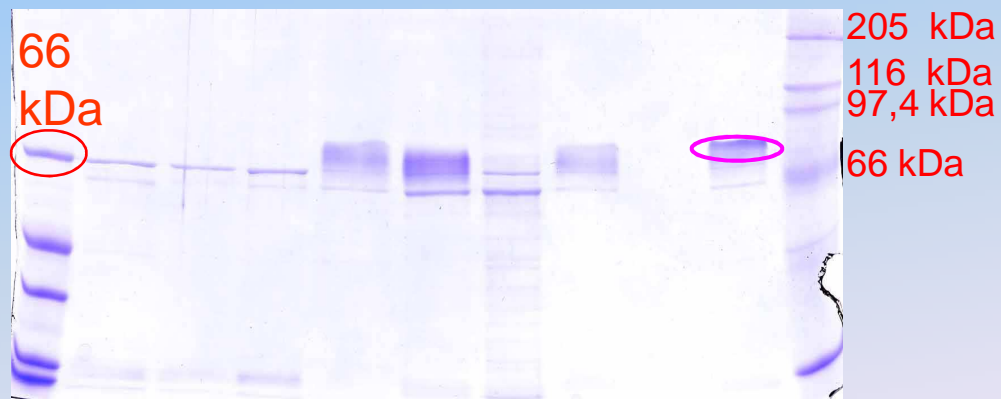
10% SDS PAGE



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

LENGIEPYV TIFHWDVPQA LEEKYGGFLD KSHKSIVED

LENGIEPYI TIFHWDTPQA LVEAYGGFLD E...RIIKD

LIENGIKPYI TLFHWDTPQA LADKYNDFLD R...RIVKD

LIENGIKPYI TLFHWDTPQA LADEYKDFLD R...RIVKD

LIRHGIVPYV TIWHWDTPQA LEDKYGGFLD K...QIVND

LKSN DIEPLV TLFHWDVPQA LEEKYGGVLS P...RIVDD

ILRNGLKPFV TIYHWDLPQA LEDEYGGFLS P...NIVDH

LLKNGIRPMV TLFHWDVPQA LEDSYKGFERS S...EIVND

LLKNGIRPMV TLFHWDVPQA LEDSYKGFERS S...EIVND

LLSKGIKPFA TIFHWDTPQD LEDAYGGFRG A...EIVND

LLSKGIKPFA TIFHWDTPQD LEDAYGGFRG A...EIVND

LLSKGIKPFA TIFHWDTPQS LEDAYGGFFG A...EIVND

LLSKGIKPFA TIFHWDTPQS LEDAYGGFLG A...EIVND

LLSKGIKPFA TMFHWDTPQA LEDAYGGFRG A...EIVND

LISKGVKPFV TLFHWDLPDA LENAYGGLLG D...EFVND

LISNGIRPLV TLFHWDTPQA LEDEYGGFLN P...QIVKD

LVANGIEPSM TLYHWDHPQS LEDEYGGFLS P...QIVED

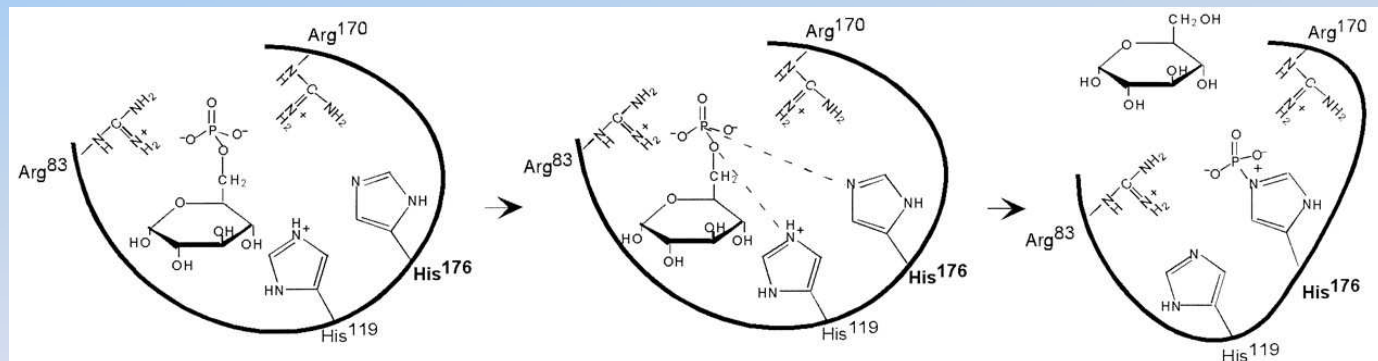
LIANGIQPSV TLYHWDHPQA LEDEYGGFLN P...QIIED

LIENGIKPFV TIYHWDIPQA LDDEYGSFLS P...RIIDD

LLANEITPLV TIFHWDIPQD LEDEYGGFLS E...QIIDD

LLAKGIEPYV TLYHWDLPQA LHDRYLGWLN P...QIIND

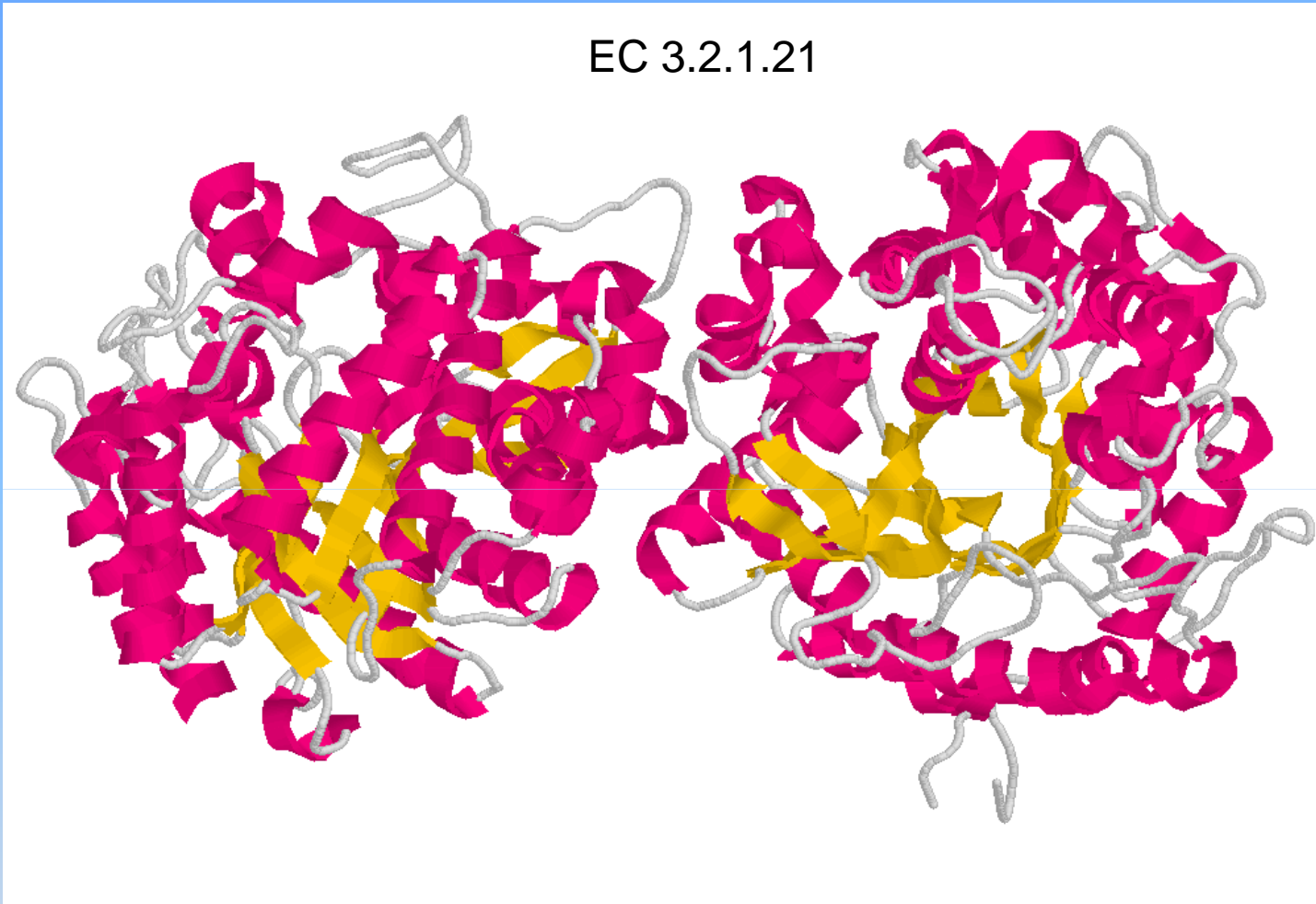
Předpokládaná úloha of Arg83, His119, Arg170, a His176 při G6Pázovém reakčním mechanismu



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

β -glukosidáza Zm-p60.1

EC 3.2.1.21



EC 3.1.3.?

Funkce proteinů

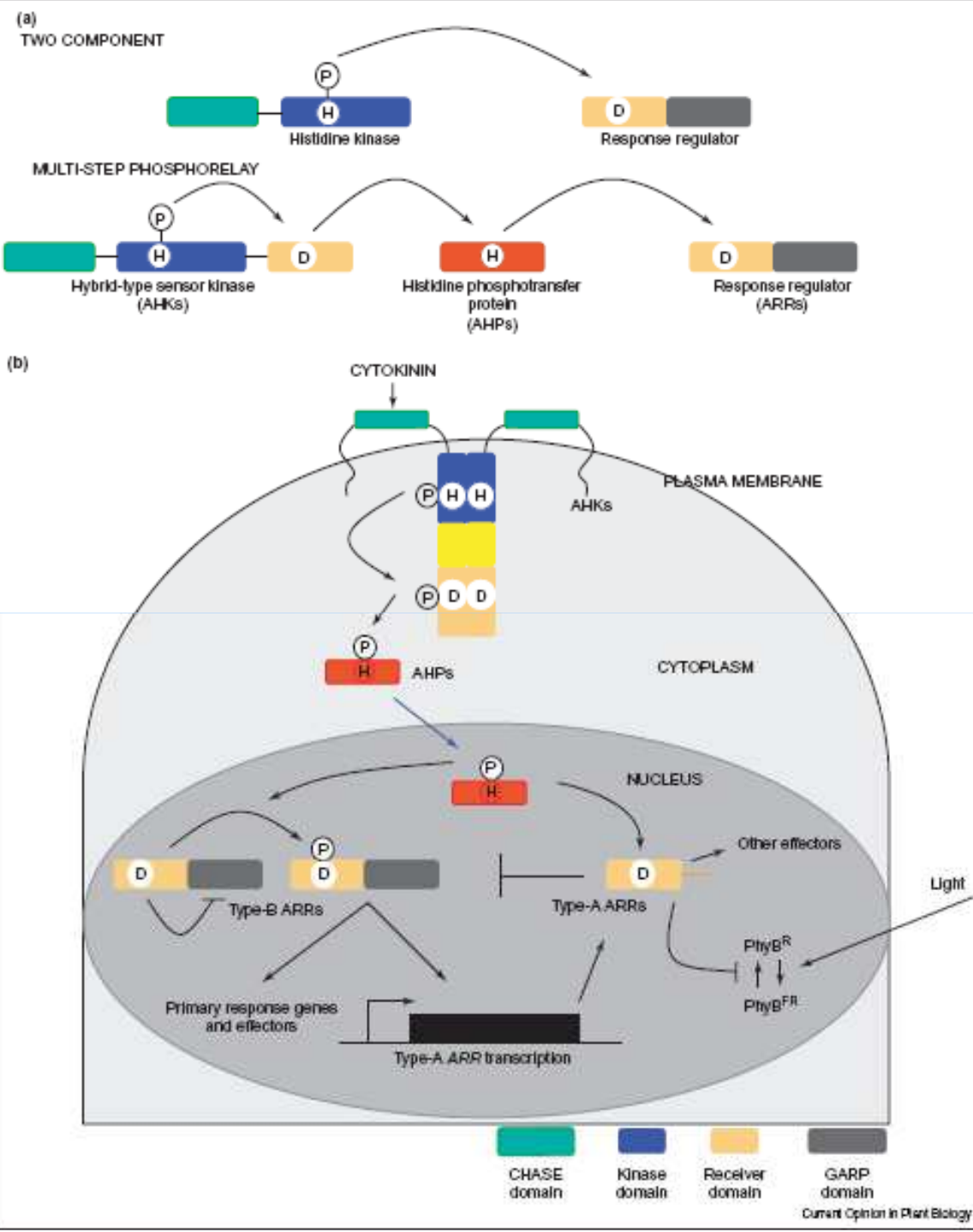
- I.  1. Enzymatická/enzymy/katalýza
- II.  2. Receptorová/signalizace/
- III.  3. Přepravní/transportní/vazba-transport
- III.  4. Strukturní/zpevňovací/strukturní komponenty/
- 5. Aktivní pohyb/kontrakční/motor-proteiny
- 6. Hormonální/hormony/regulace
- 7. Obranná/specializovaná/imunitní systém/transkripční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

I. Enzymy

II. Protein-interakce s ligandem

III. Protein-interakce s dalším proteinem nebo DNA

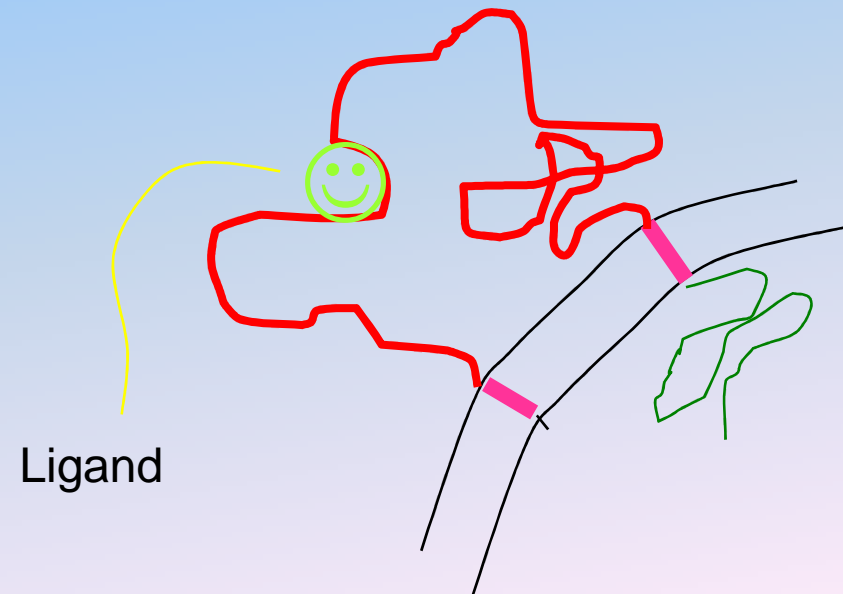
IV. Zásobní – zdroj energie, uhlíku nebo dusíku.



Extracelulární doména CKI_{EX}



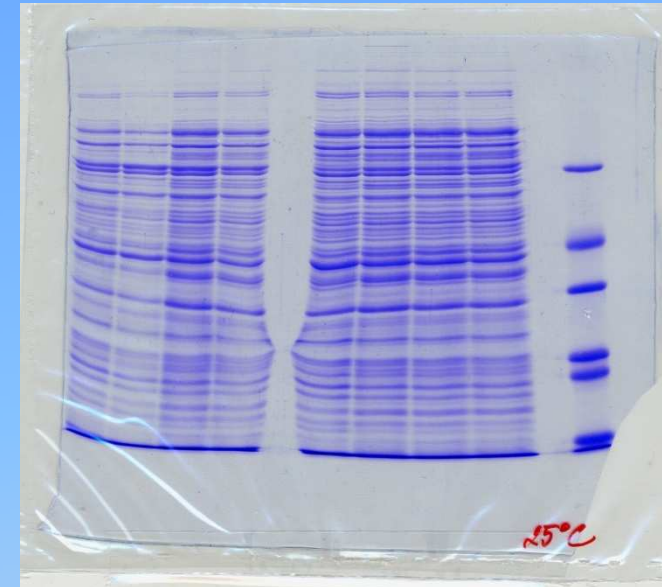
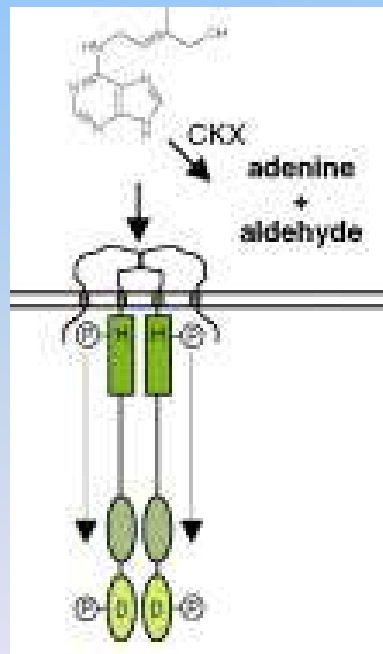
SNWRTTTENLVKEVASFTEDLRTSLVSEIENIGKFTYAKTNLSTIGLARVIDSYITNNDTGFTETIQTQIAP
LLFVAYSTILQVSQVSYISRDGLMFSYIAESNTSVAVFANSSSNSSRGDYTWYTQTVDQLTGRLNGNS
TKSQSLDVTHDWFQAAQSNNYTAFVGTSLGGEDNETLIQSVVSLYSKKGLVSLGFPVKTLTEVLNS
LNLHGEELYMWTKDGTVLVREGSLNDSFFISNGSICFGRESNSLWSQCIPENCSSSGYEVEIKRLRY
QAFCSVIEVSGVPLRYTLMFPNKGGATRIKHQAEEKAKY

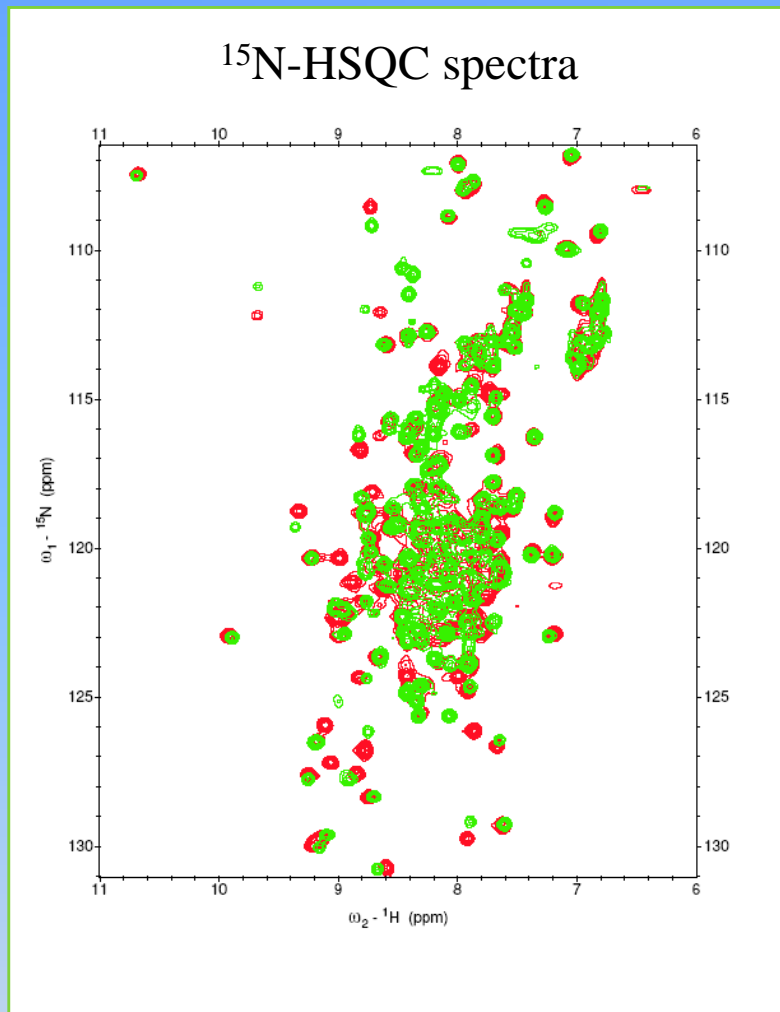


- Vazba radioaktivně značených cytokininů na NC membránu, na kterou jsou přeneseny elektroforeticky dělené proteiny z *E.coli* exprimující CKI1 “CHASE” doménu.
- *trans-zeatin*, *cis-zeatin*, *N*⁶*benzyladenin*, *meta-topolin* nevážou extracelulární CKI1 doménu.

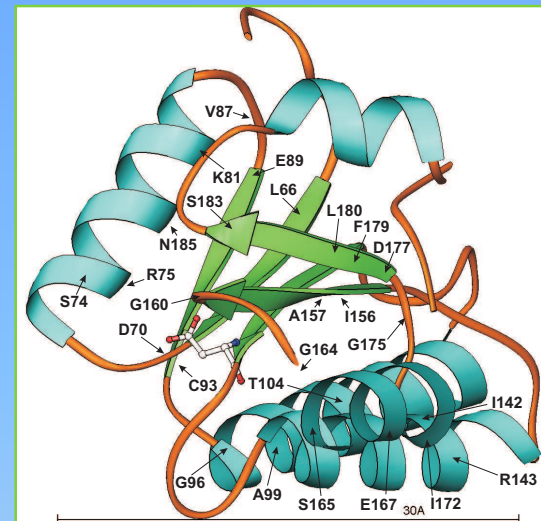
CHASE domain

Cyclases/histidine kinases associated sensory extracellular domain





Červeně: samotný protein
 Zeleně: protein + BeF_x



MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMASTD
 SESETRVKSVRGRKPIGNPEDEQETS
 KPSDDEFLRGKRVLVVDNFI**SR**KVAT
GKLK**K**MG**V**SE**V**Q**C**DS**G**KE**A**LRLV**T**E
 GLTQREEQGSVDKLPFDYIFMDCQMP
 EMDGYEATRE**IR**KVEKSGRTPI**IA**V**S****G**
 HDP**G**SE**E**ARE**T**IQA**G**MD**A**FLDK**S**LNQ
 LANVIREIESKRHLEHHHHHH

0.5 mM CKI1 RD byla inkubována s 15 mM
 MgCl₂, 3 mM NaF, a s 0.6 mM BeCl₂

Blanka Pekárová

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

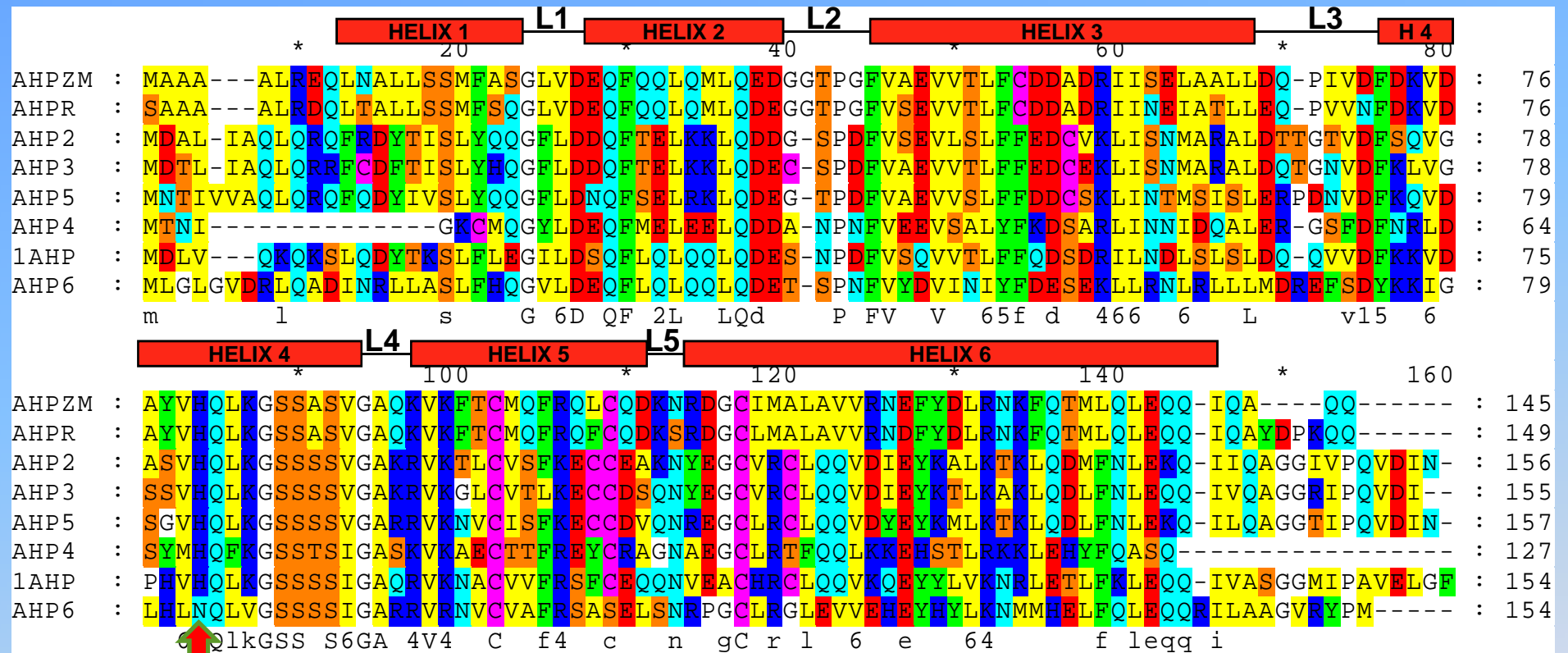
I. Enzymy

II. Protein-interakce s ligandem

III. Protein-interakce s dalším proteinem nebo DNA

IV. Zásobní – zdroj energie, uhlíku nebo dusíku.

Proteiny AHP z *Arabidopsis thaliana*



AHP1 17.6 kDa
 AHP2 17.4 kDa
 AHP3 17.5 kDa

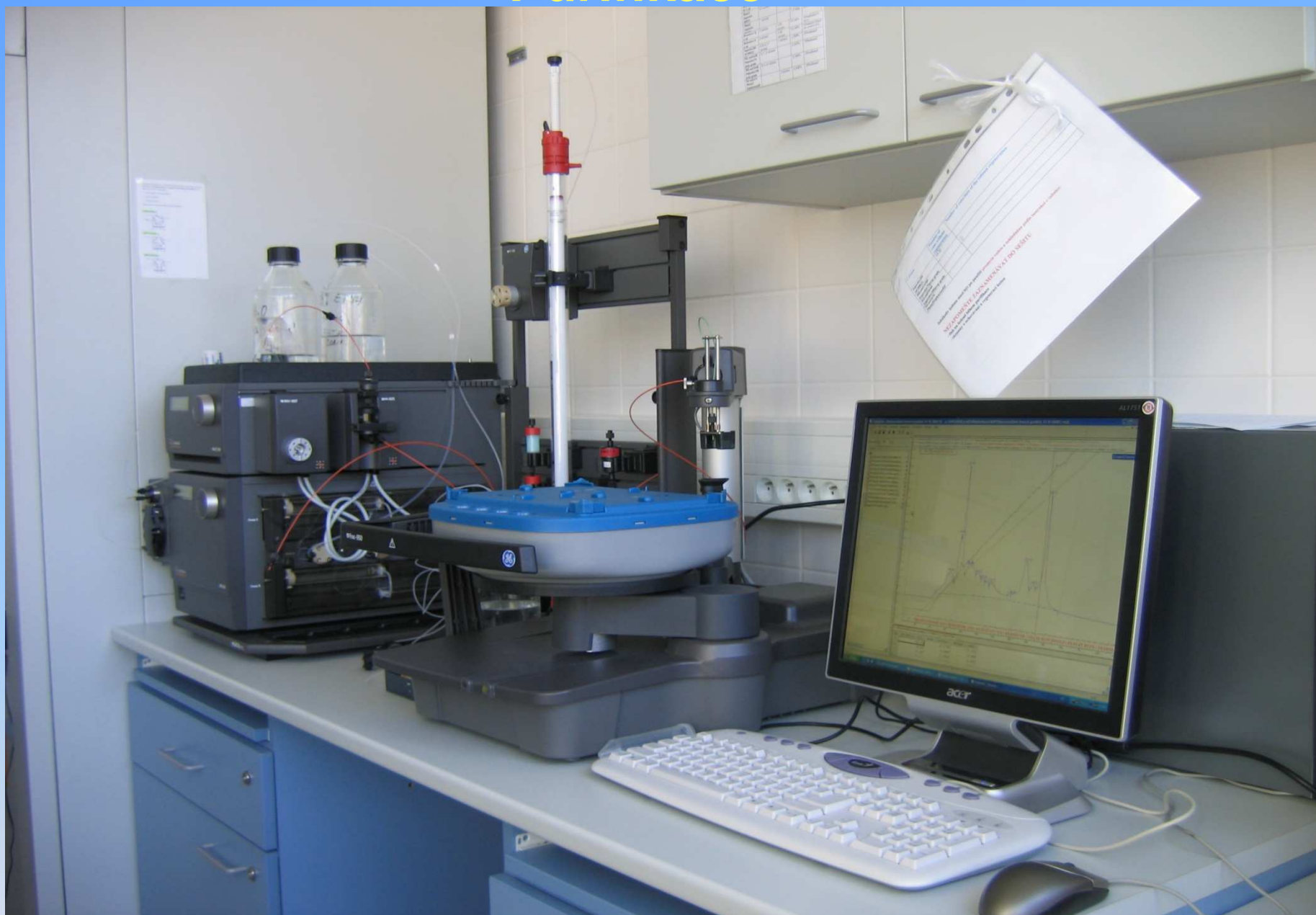
AHP4 14.7 kDa
 AHP5 17.9 kDa
 AHP6 17.8 kDa

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

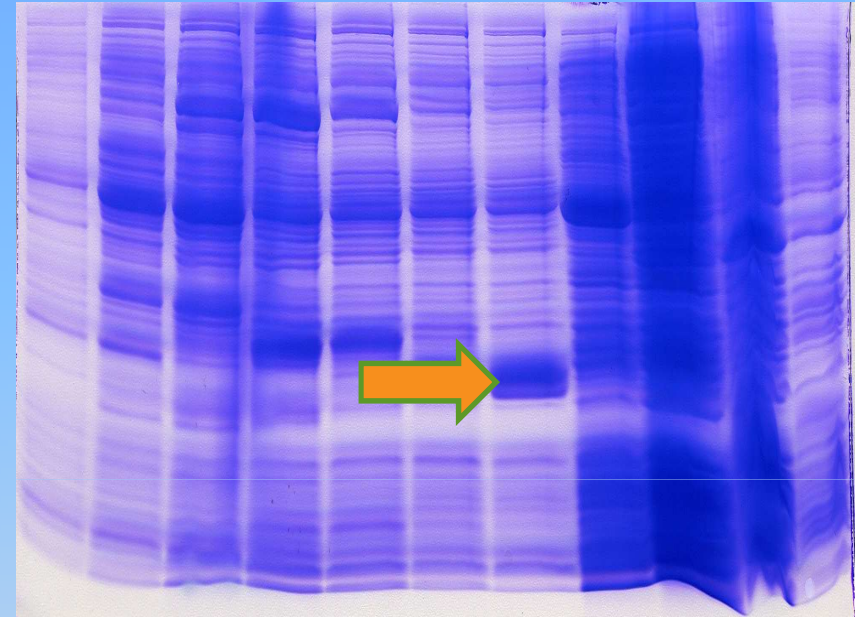
50 mM Tris pH7,9
0,5M NaCl

500 mM
imidazol

5CV

20 mM
imidazol

Čistota:
4,5%

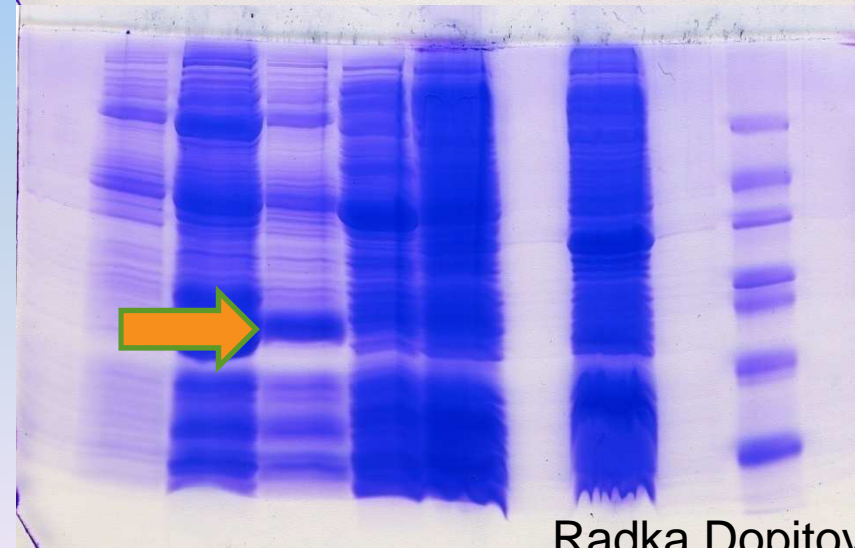


50 mM Tris pH7,9
0,5M NaCl

500 mM
imidazol

Čistota:
15%

20 mM
imidazol

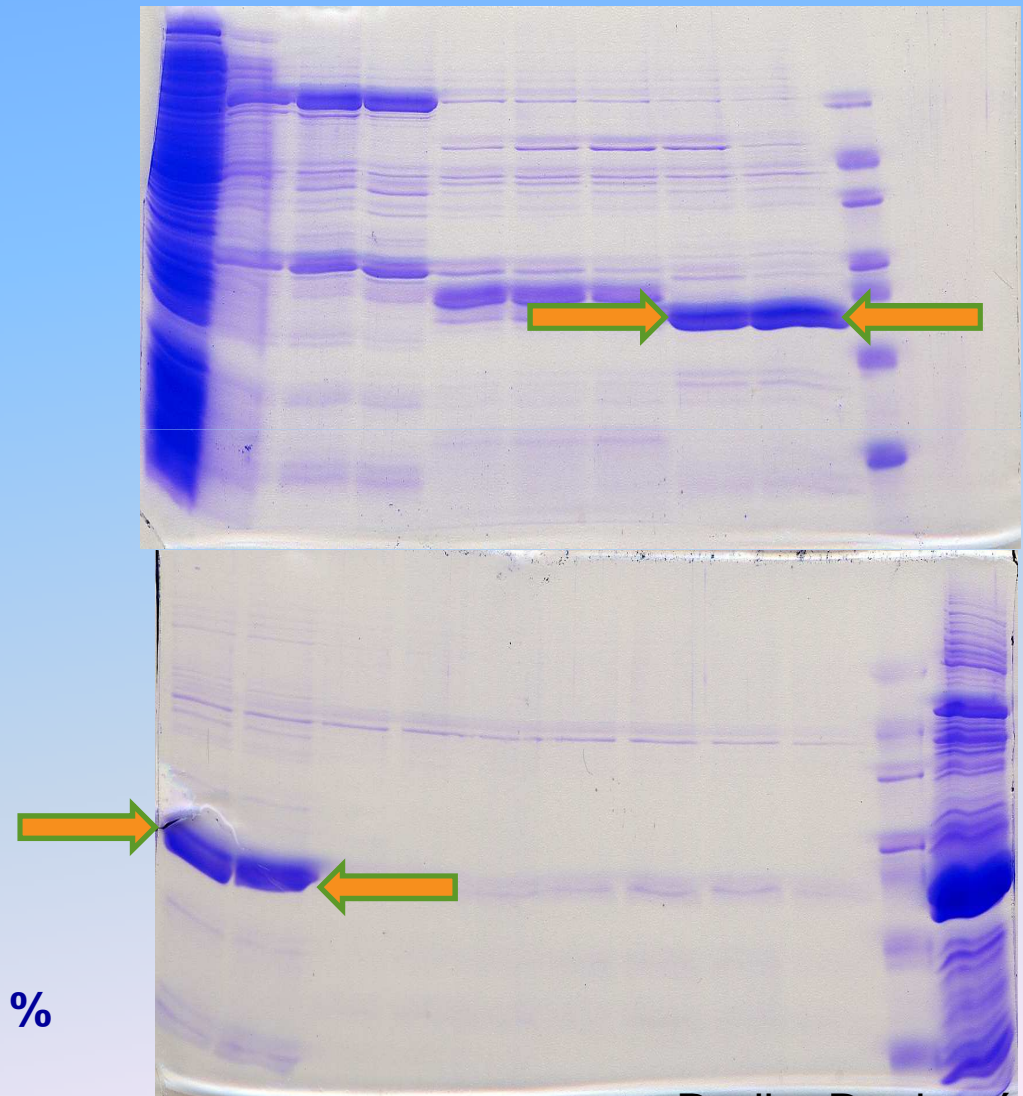
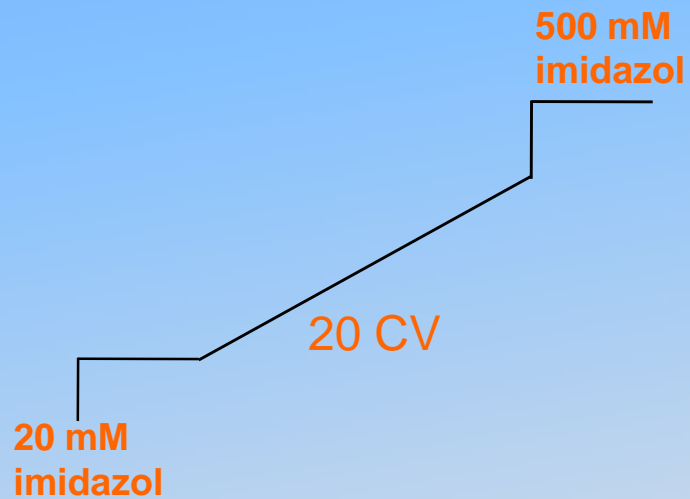


Radka Dopitová

Výsledky purifikace AHP5 proteinu

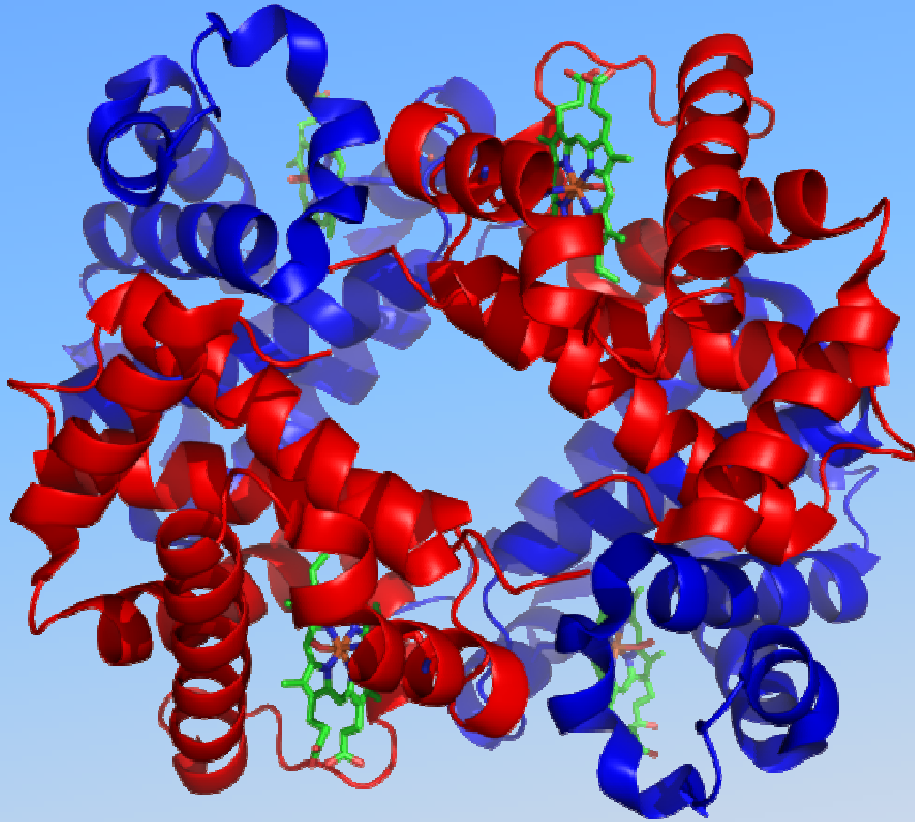
1 . Afinitní chromatografie– His trap kolona

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

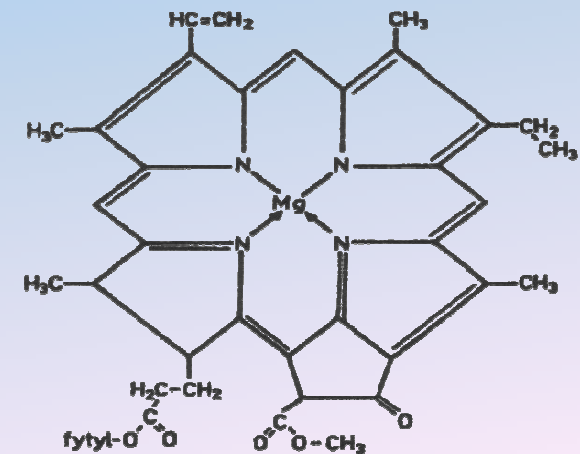
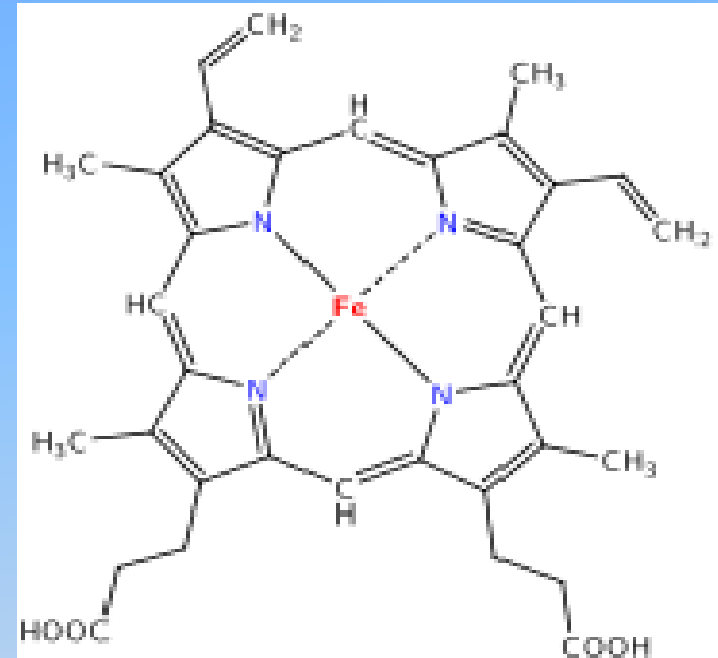


Čistota: 78 %

Hemoglobin a jeho funkce v transportu kyslíku



Běžný hemoglobin dospělého člověka (HbA) se skládá ze 4 podjednotek, dvou alfa (α) a dvou beta (β). Každá podjednotka je tvořena bílkovinnou částí – globinem a prostetickou (nebílkovinnou) částí – hemem

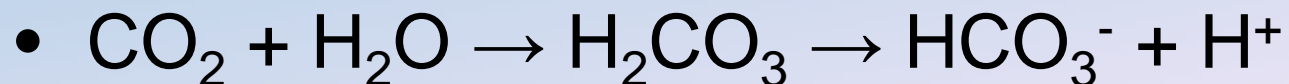


Hlavní funkcí hemoglobinu je přenos kyslíku z plic do tkání a zpětný odvod oxidu uhličitého z tkání do plic.

Každý ze 4 Fe^{2+} iontů hemu reverzibilně (vratně) váže molekulu kyslíku. Schopnost navázání O_2 a ztráta CO_2 na železnatém ionu je úměrný parciálnímu tlaku dýchacích plynů.

Parciální tlak kyslíku v plicních alveolách je asi 13–15 kPa a ve venózní krvi ve tkáních je > 5 kPa (hypoxie pod 3,5 kPa).

Bohrův efekt je soubor jevů vycházející ze skutečnosti, že oxyhemoglobin je silnější kyselina ($\text{pK}_A=6,2$), než deoxyhemoglobin ($\text{pK}_A=7,8$).¹ Ve tkáních vlivem buněčného dýchání vzniká větší množství oxidu uhličitého, který reaguje s vodou (za přítomnosti karbonát-dehydrogenasy) na kyselinu uhličitou. Kyselina uhličitá dále disociuje na hydrogenuhličitanový anion a vodíkový kation (proton). Tím se snižuje pH v tkáních (= roste počet H^+ iontů).



Expozice Hb oxidu uhelnatému

Při otravě oxidem uhelnatým (CO) vzniká karboxylhemoglobin

Expozice Hb nitrosloučeninám

Nitrosloučeniny (např. ředidla, dusičnany v potravě nebo v pitné vodě) způsobují oxidaci Fe^{2+} na Fe^{3+} a vzniká tak modrý methemoglobin.

Expozice Hb glukóze

Glykovaný hemoglobin (HbA_{1c}) vzniká neenzymovou glykací bílkovinného části hemoglobinu na aminokyselinách N-terminálním valinu a lysinových zbytcích.

Expozice Hb ve vysoké nadmořské výšce

Pro přenos kyslíku je důležitý jeho parciální tlak ve vdechovaném vzduchu (normálně 21 kPa ve vzduchu, 13 kPa v alveolách). Klesne-li tlak O_2 pod kritickou hodnotu 3,5 kPa, dojde k hypoxii a následně k poruchám funkce mozku.

Srpková anémie

Srpková anémie je jedna z dědičných chorob, při níž je na 6. pozici v β -řetězci valin místo glutamové kyseliny (vzniká HbS). HbS má oproti HbA rigidní tvar, a tudíž nemůže dobře procházet skrz úzké kapiláry, které následně ucpává. Srpkovitá anémie postihuje převážně černošskou populaci, protože nositelé jsou chráněni proti nebezpečným formám malárie.

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

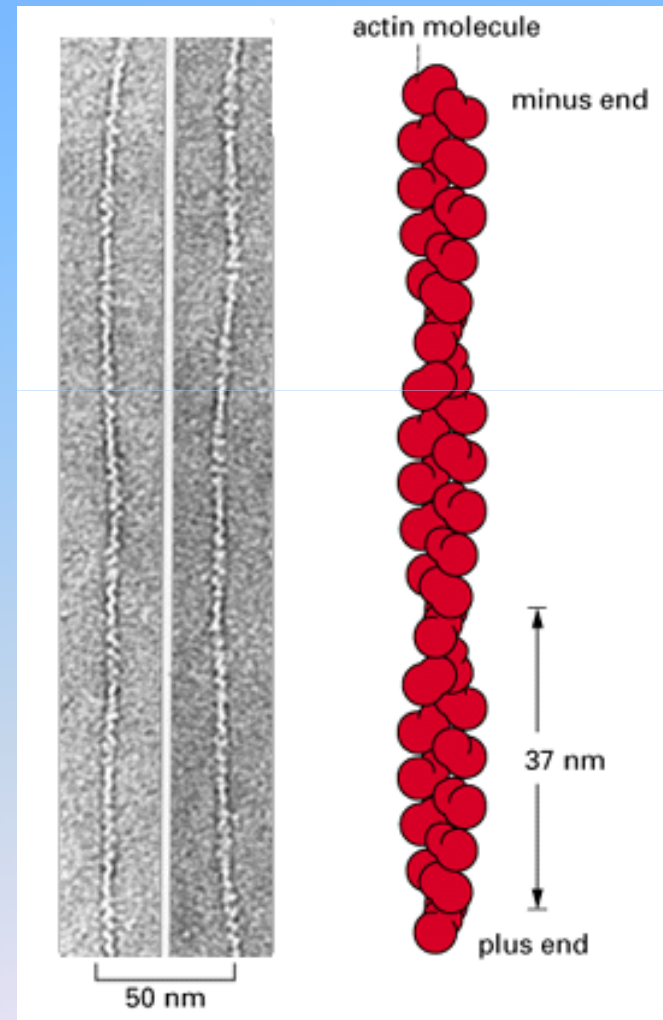
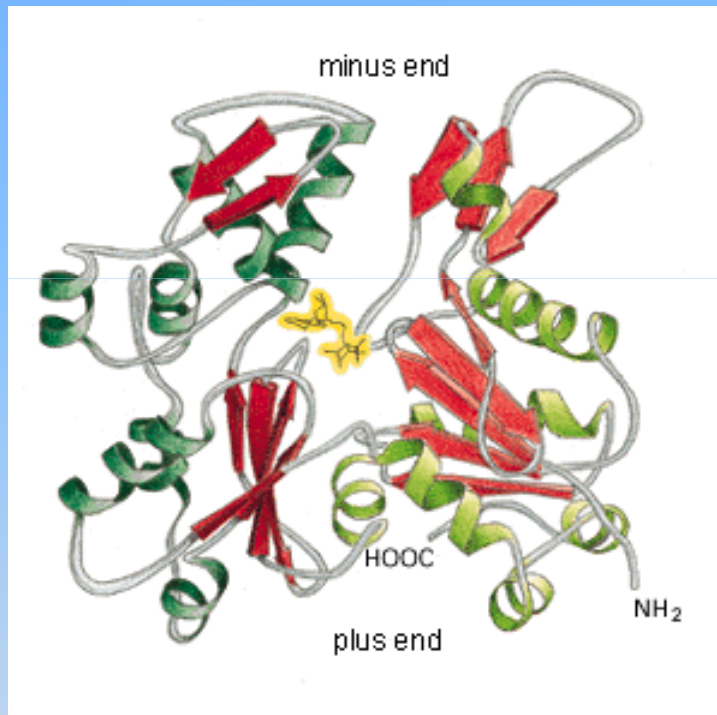
II. Protein-interakce s ligandem

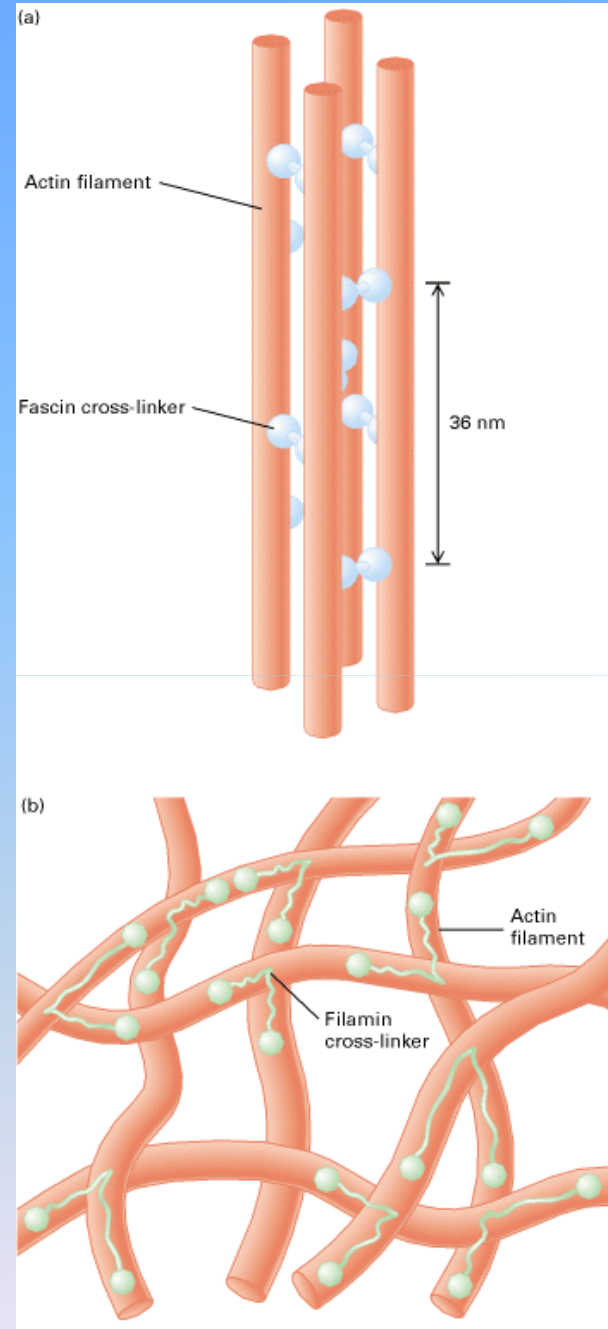
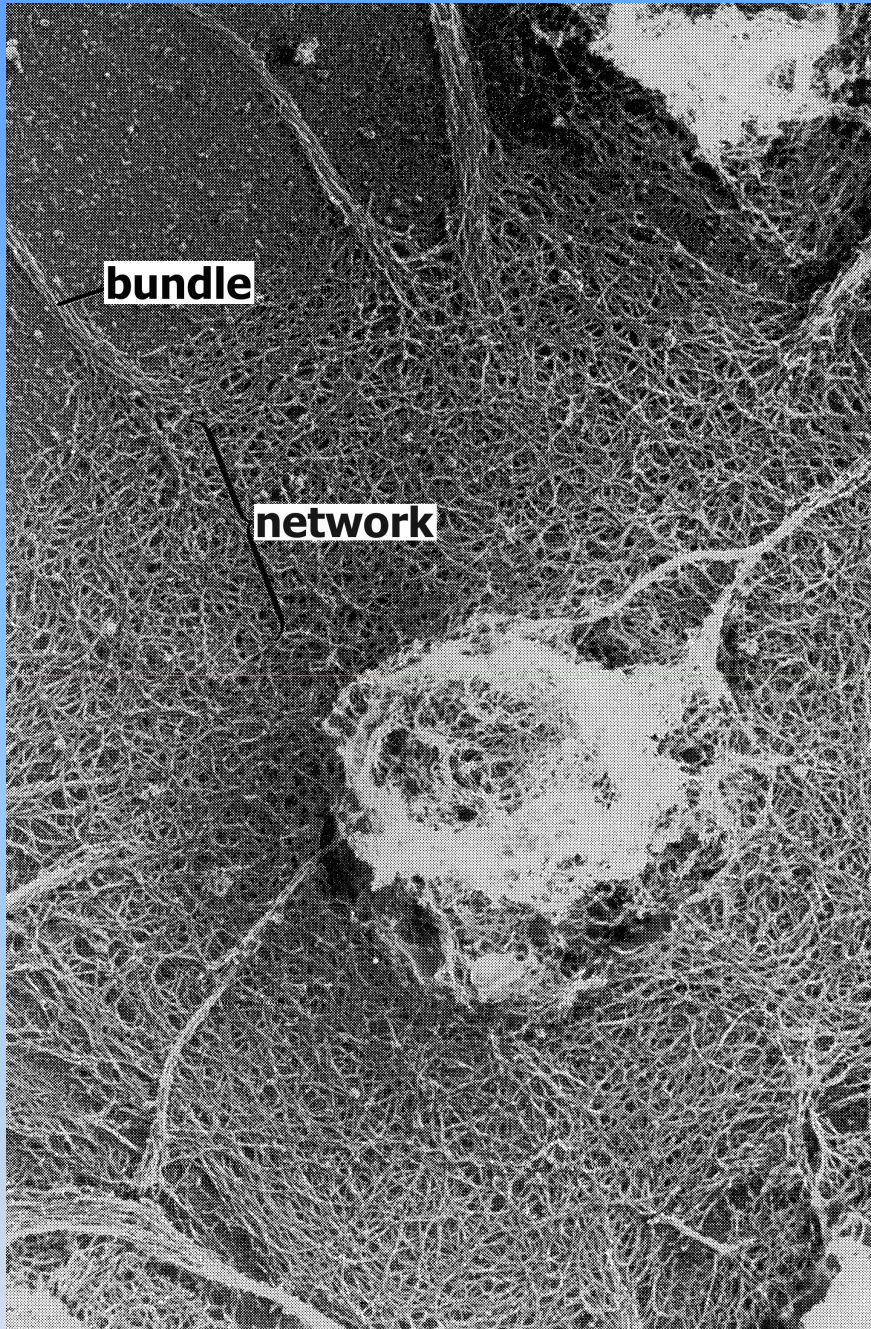
III. Protein-interakce s dalším proteinem nebo DNA

IV. Zásobní – zdroj energie, uhlíku nebo dusíku.

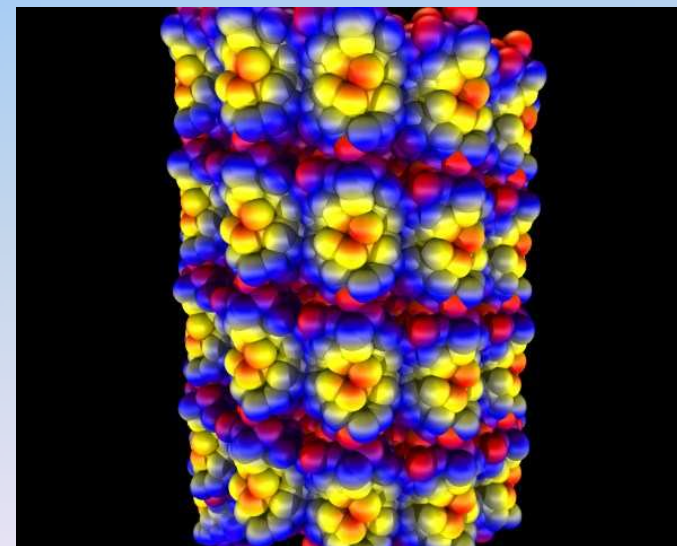
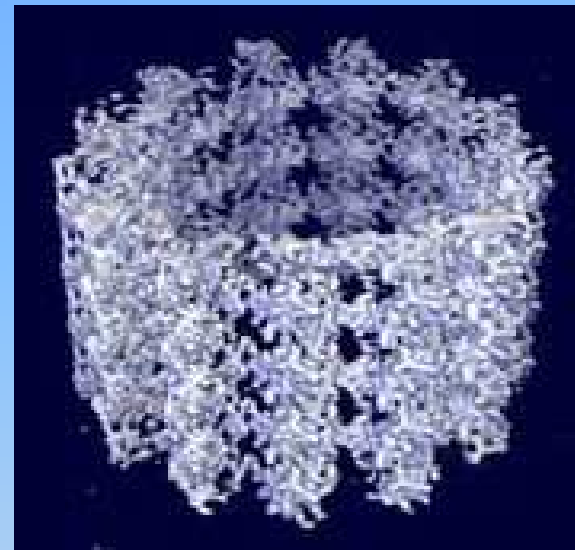
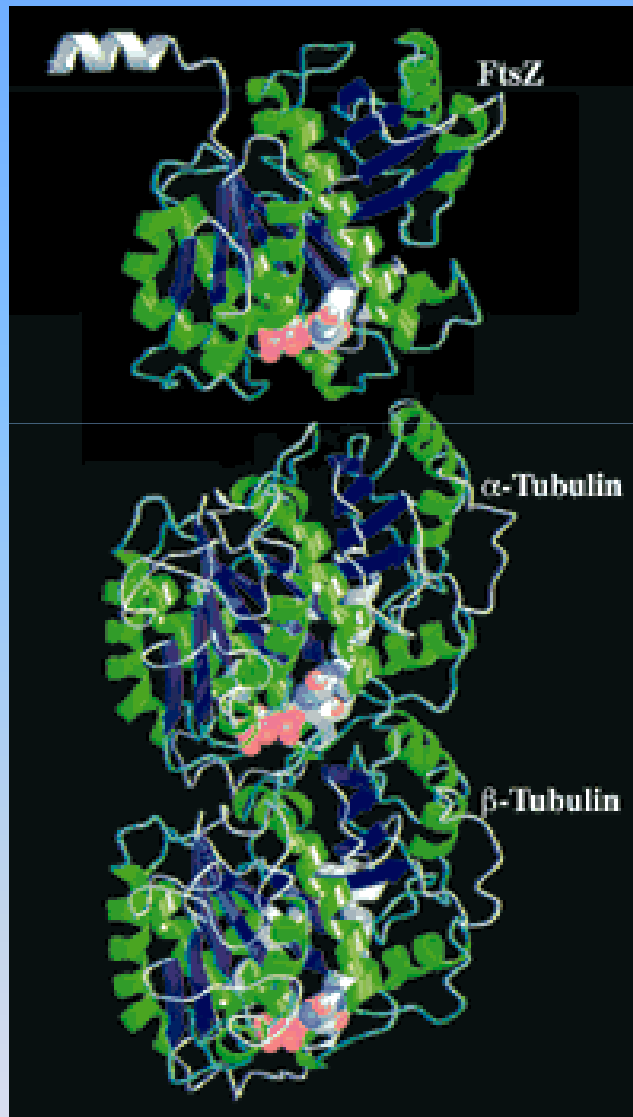
F-actin

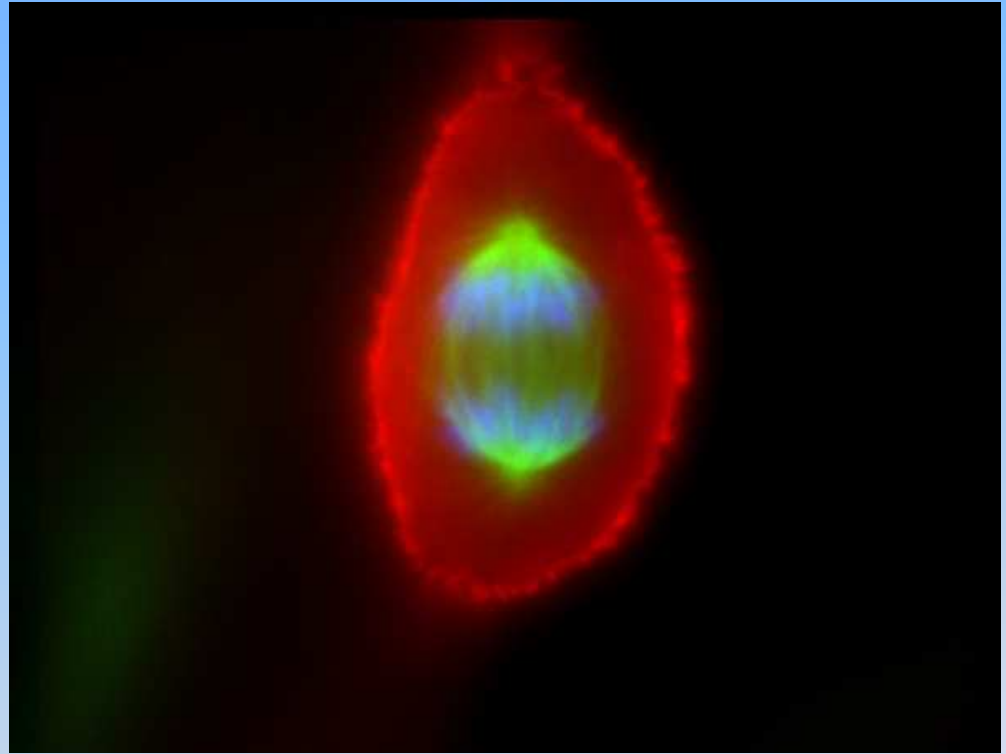
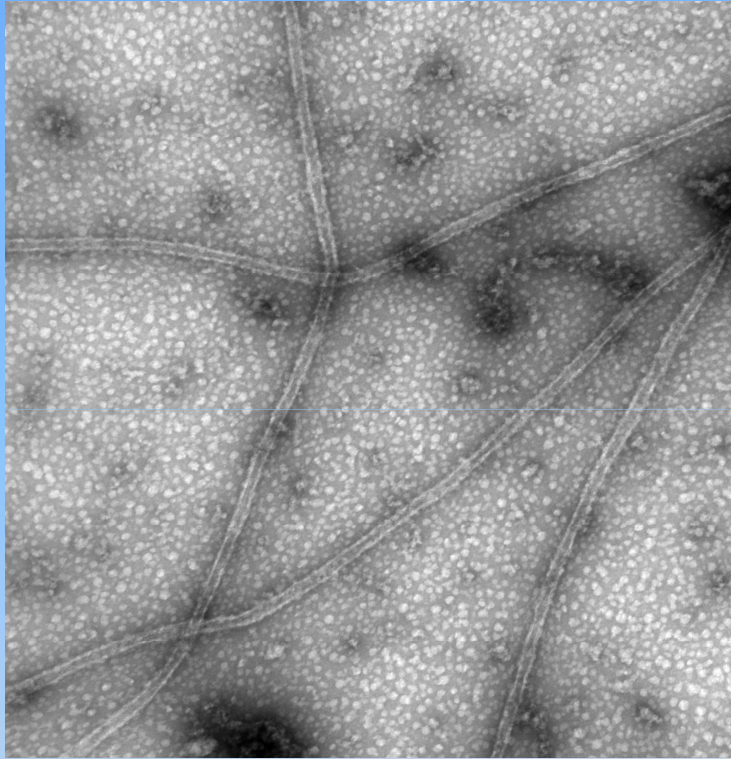
G-actin





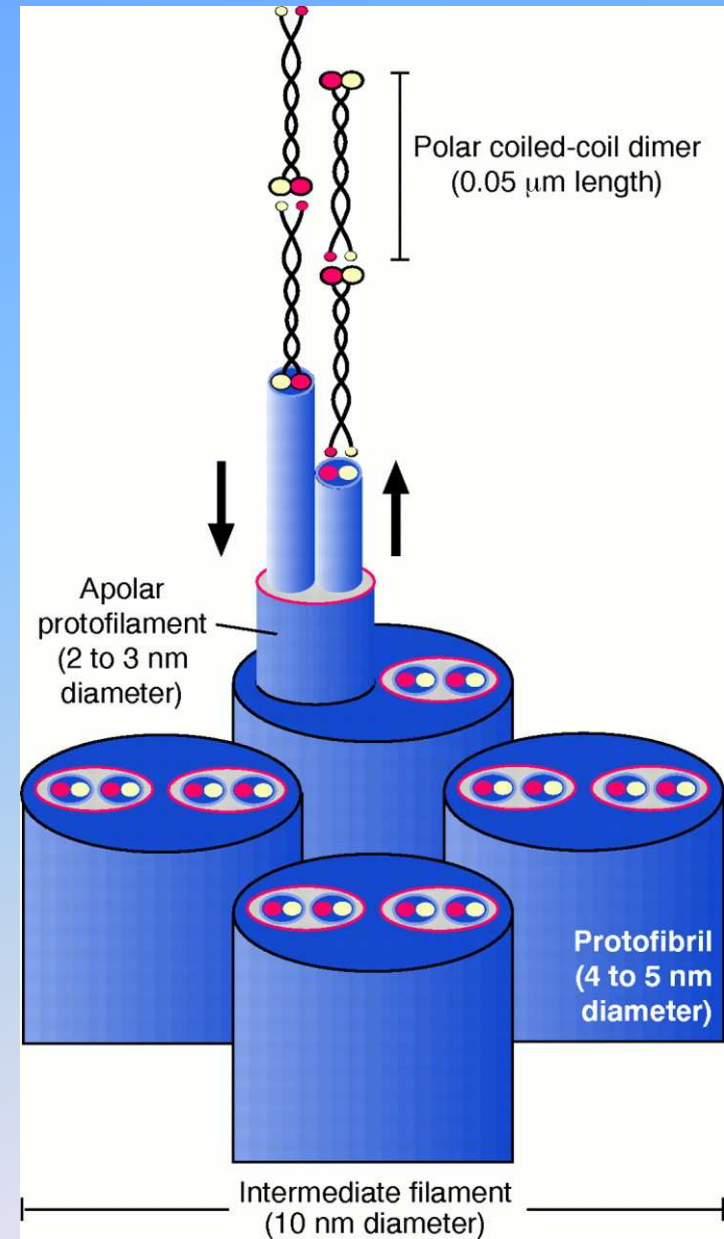
Tubulin - filamenta



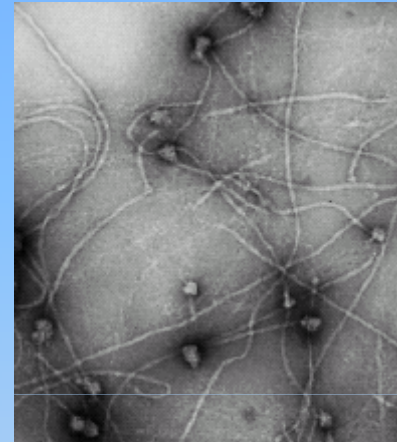
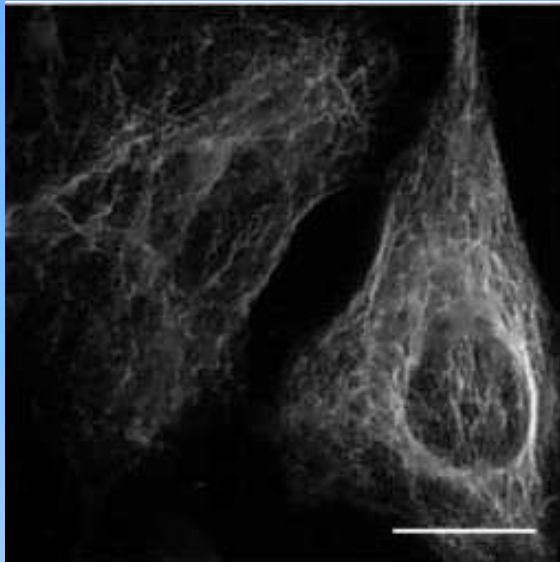


Organizace skládání IF

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



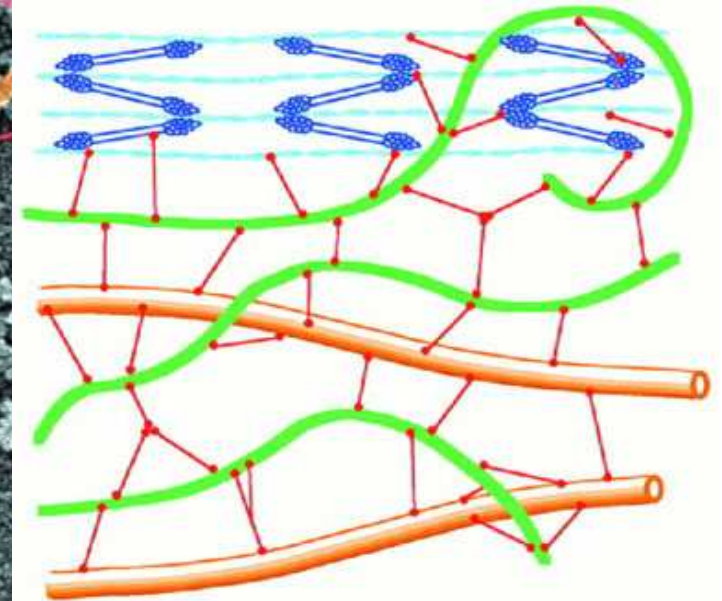
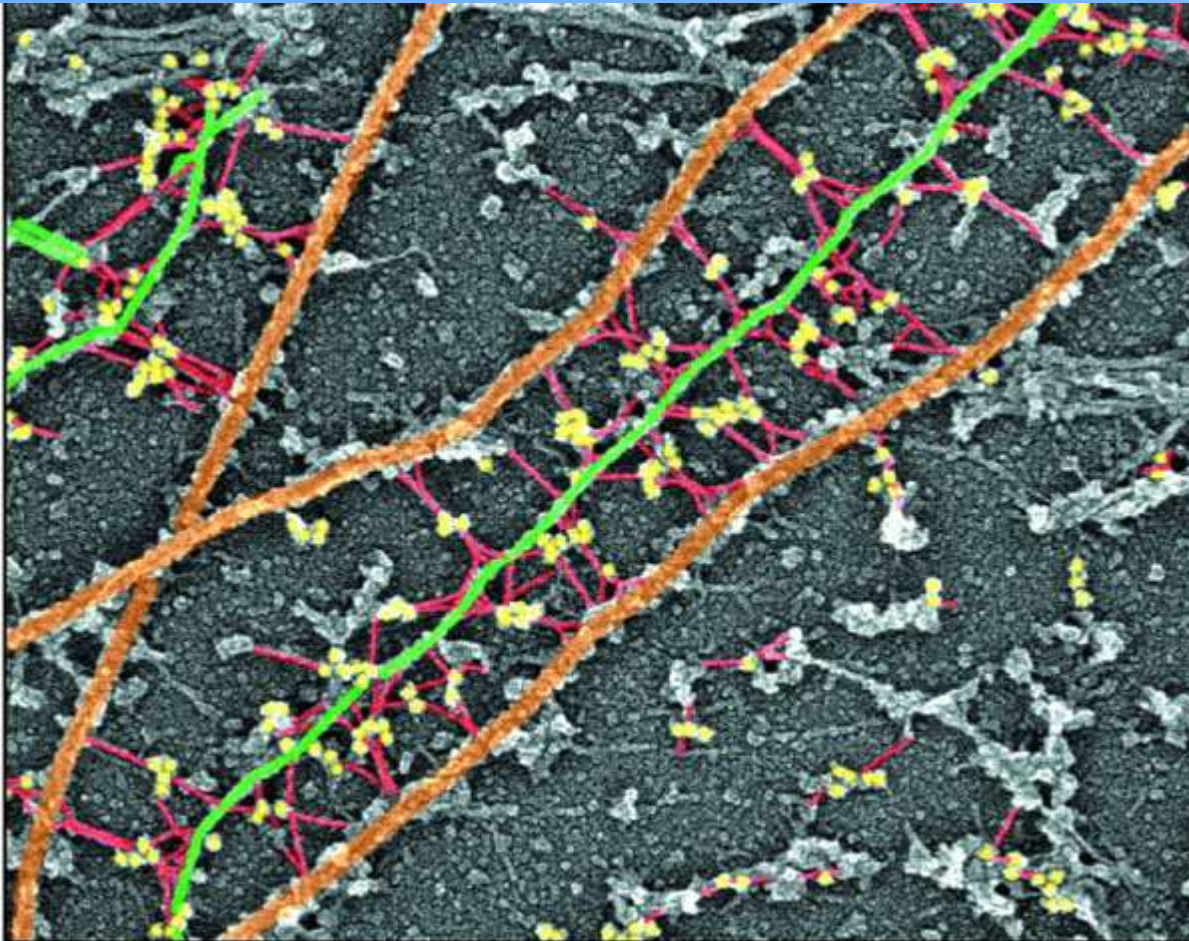
Intermediární filamenta: Vimentin



Deficiencie Plektinu způsobuje Epidermolysis bullosa

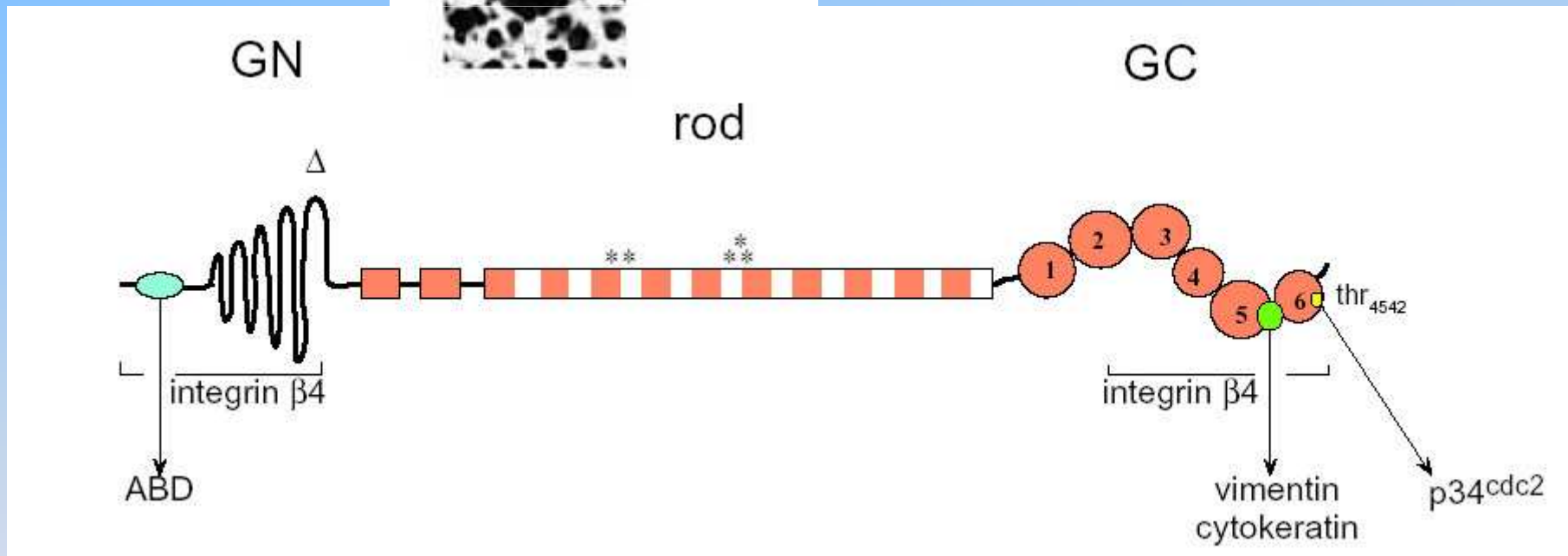
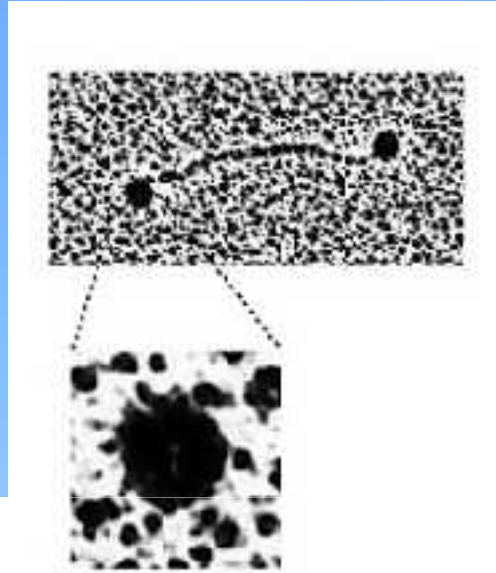


Cytoskeleton



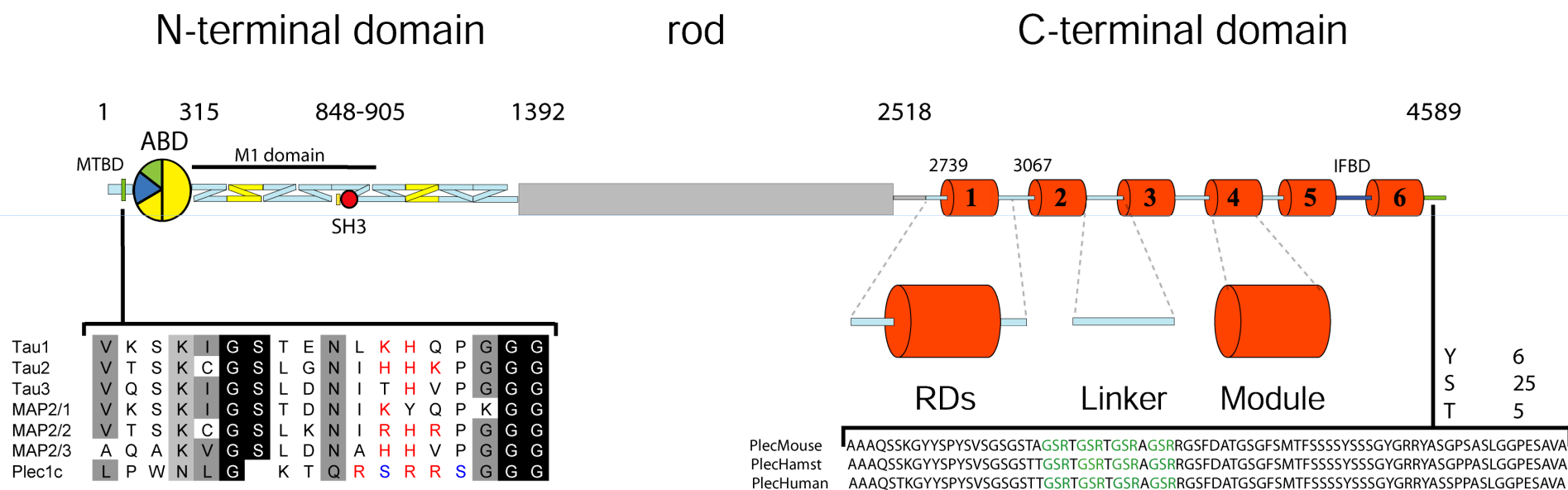
-  Plectin
-  Intermediate filaments
-  Microtubules
-  Actin filaments
-  Myosin filaments

Plectin



Analýza Plakinové domény Plektinu.

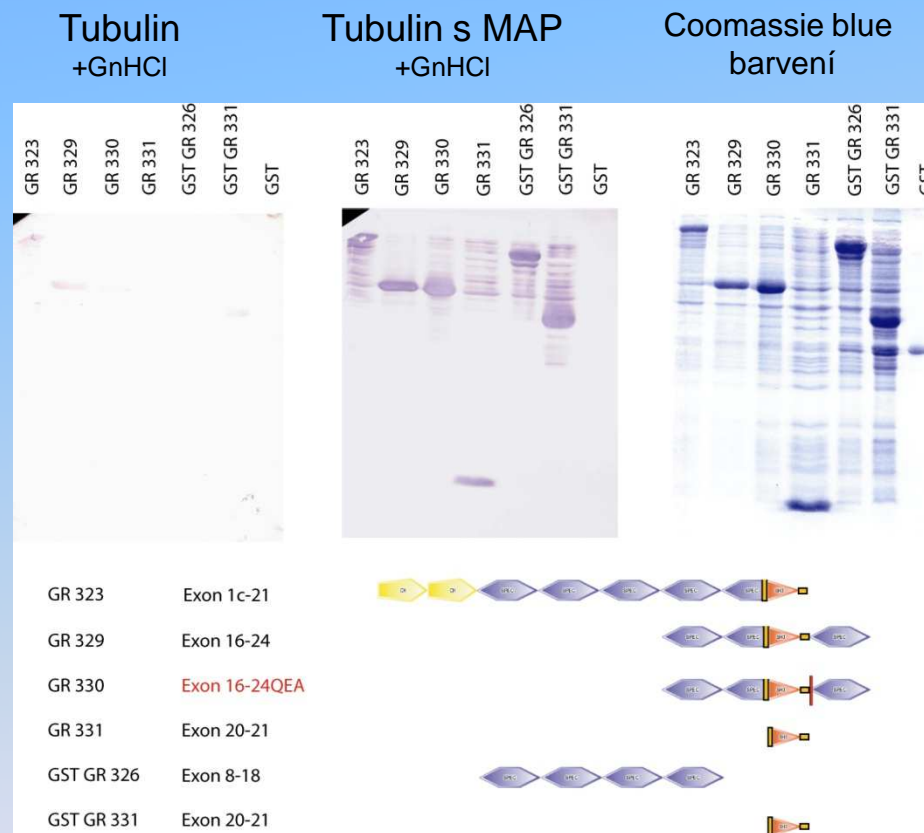
Plectin



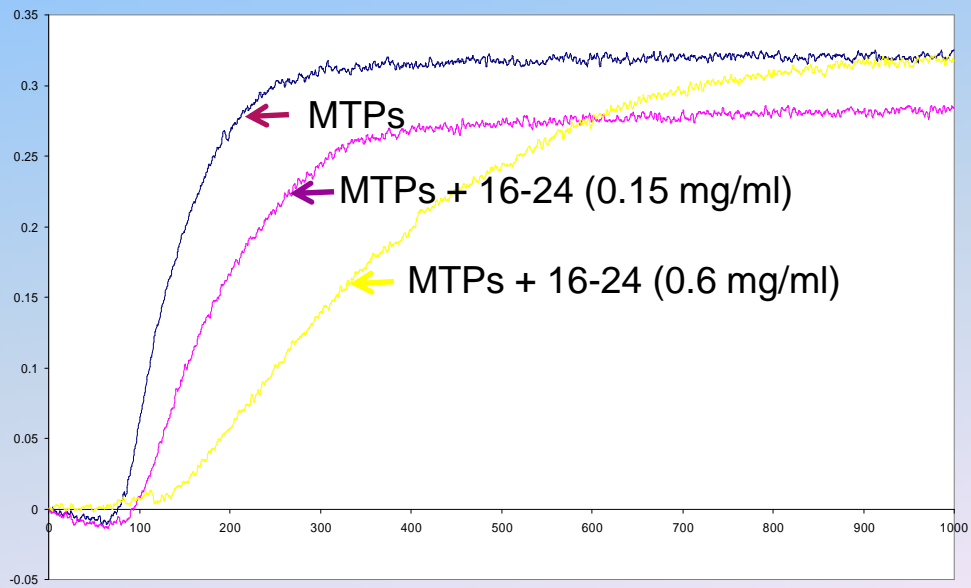
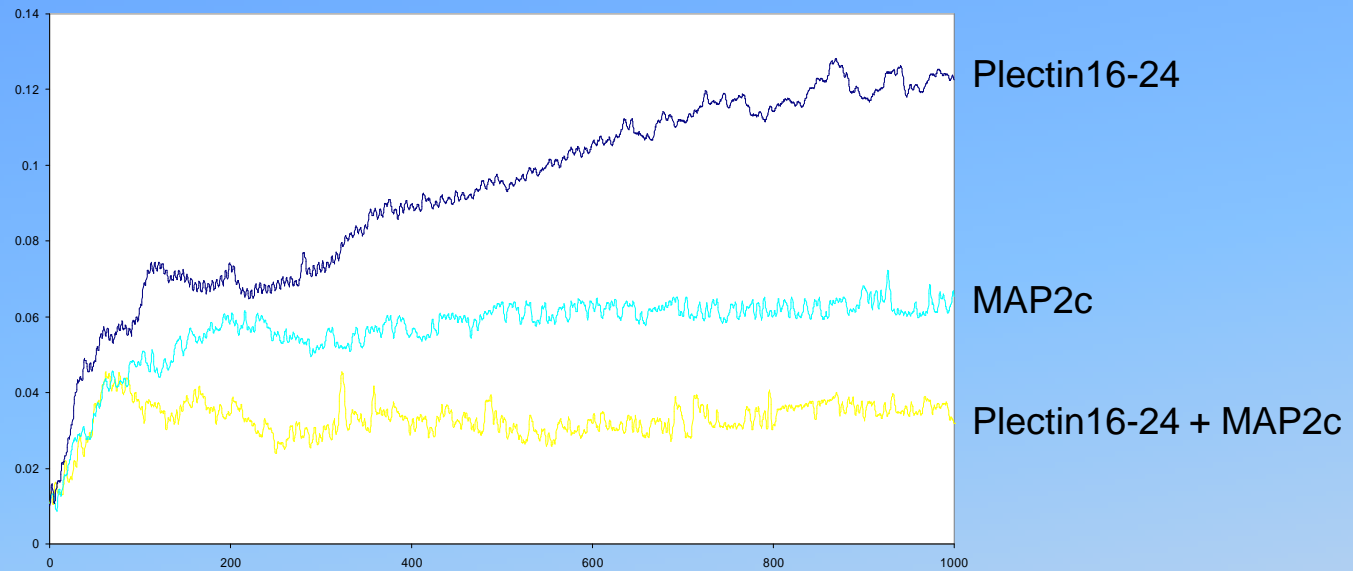
Kd of Plectin (Ex 1-24) for actin 320 nM (Ex 2-8) 25uM
 Kd of Plectin (R5) for vimentin (IF) 100 nM
 Kd of Plectin (Ex 2-8) for integrin beta 4 170 nM

 Kd for microtubules in case of MAP2 1-3 uM

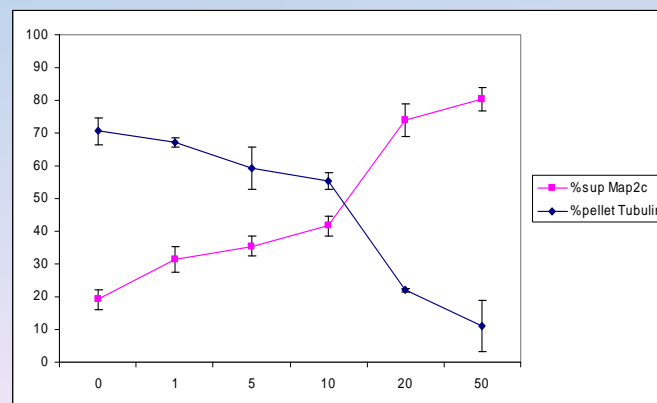
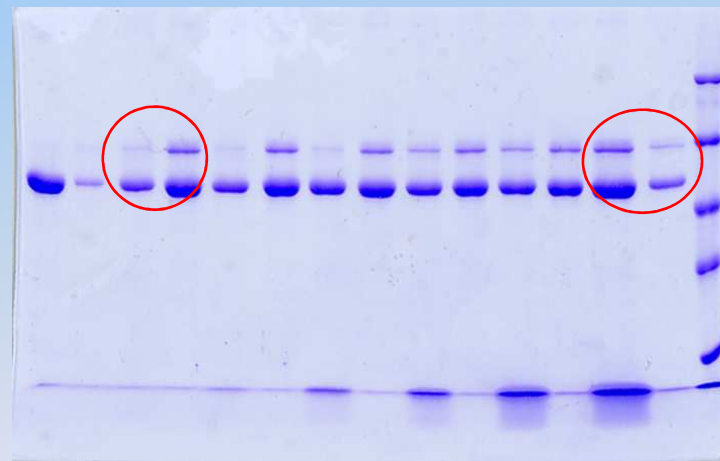
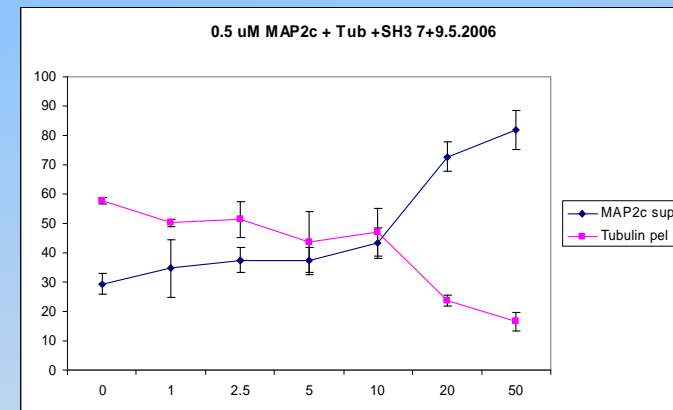
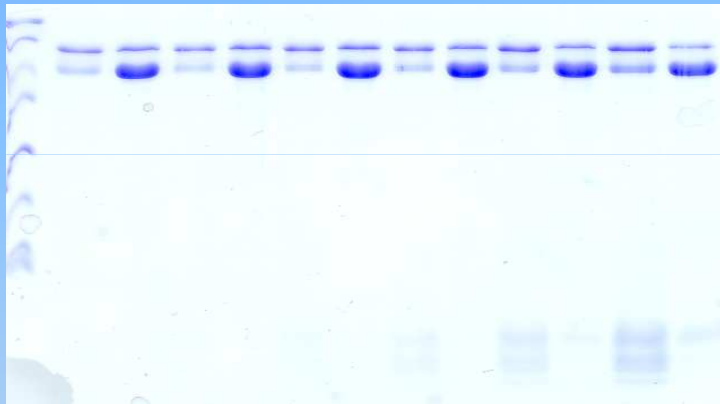
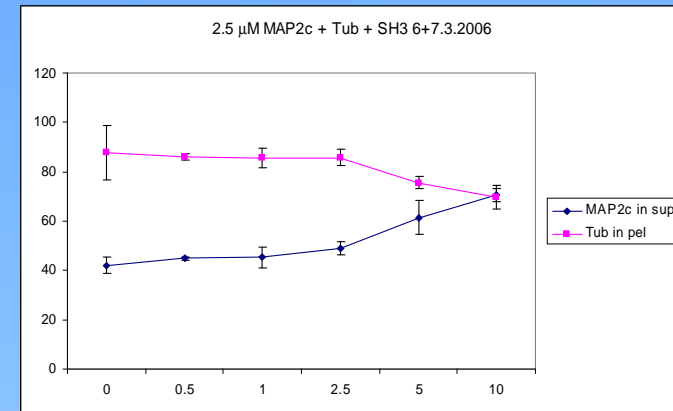
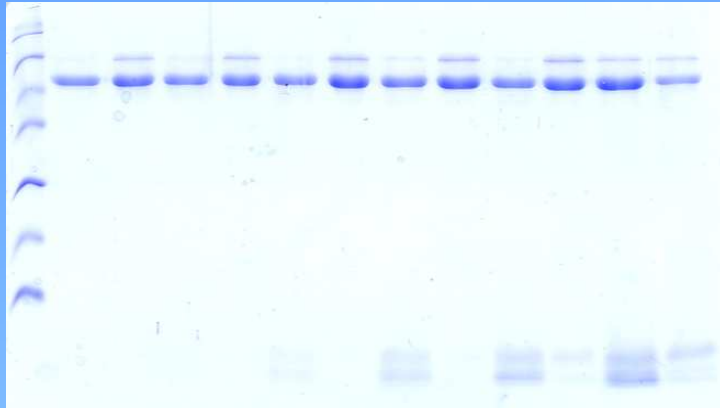
Vrstevné značení (overlay assay) plektinových konstruktů s tubulinem a s/bez MAPs (microtubule associated proteins)



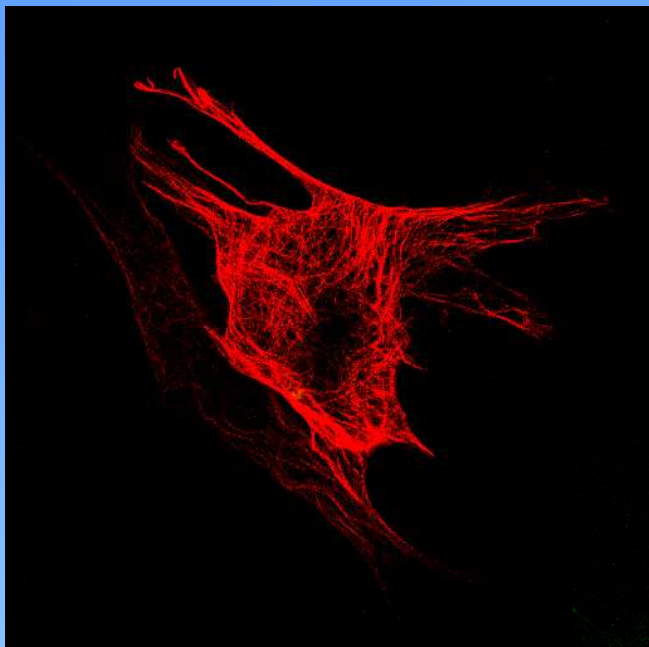
Měření turbidity



Kosedimentace MAPs s mikrotubuly za přítomnosti plektinu



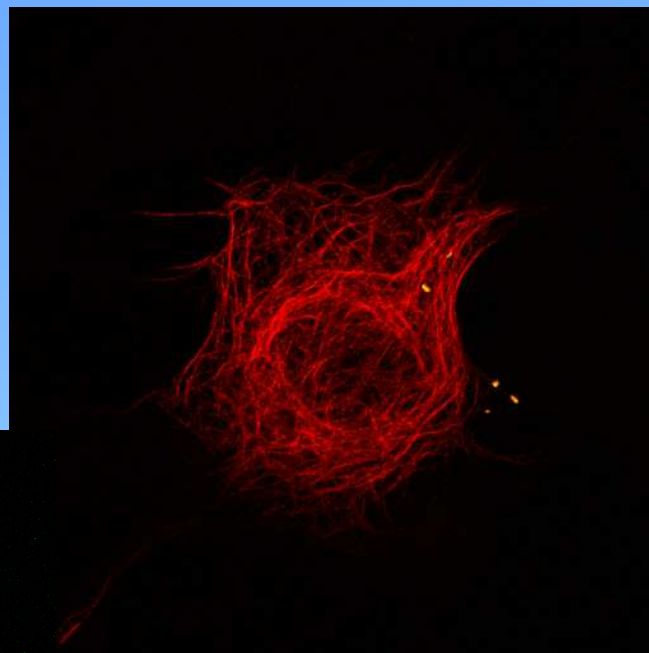
MAP2c +/+



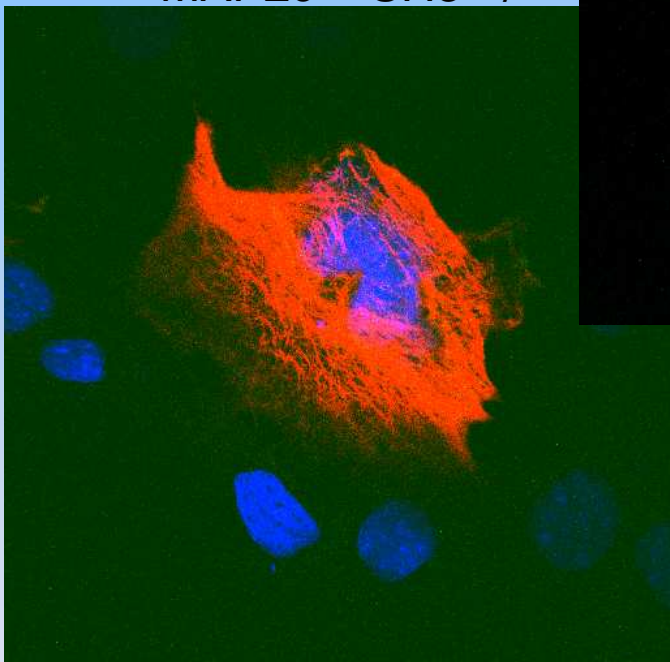
Fluorescenční
mikroskopie

SH3 +/+

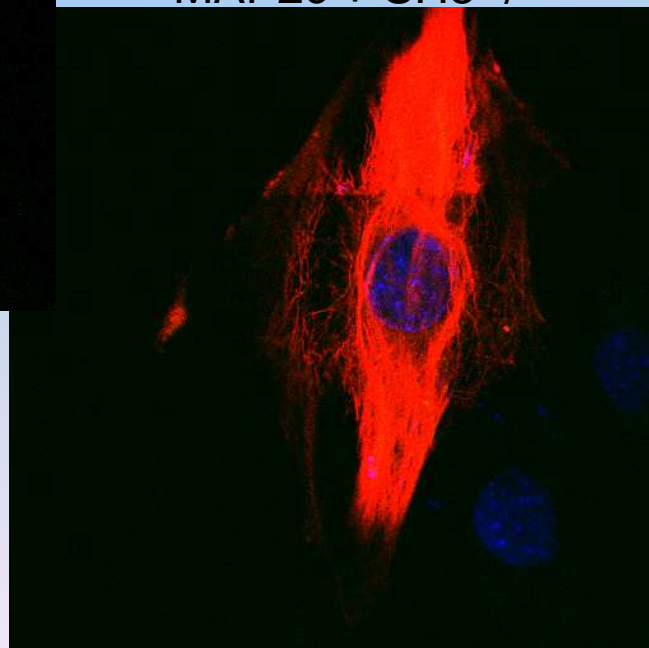
MAP2c -/-



MAP2c + SH3 +/+

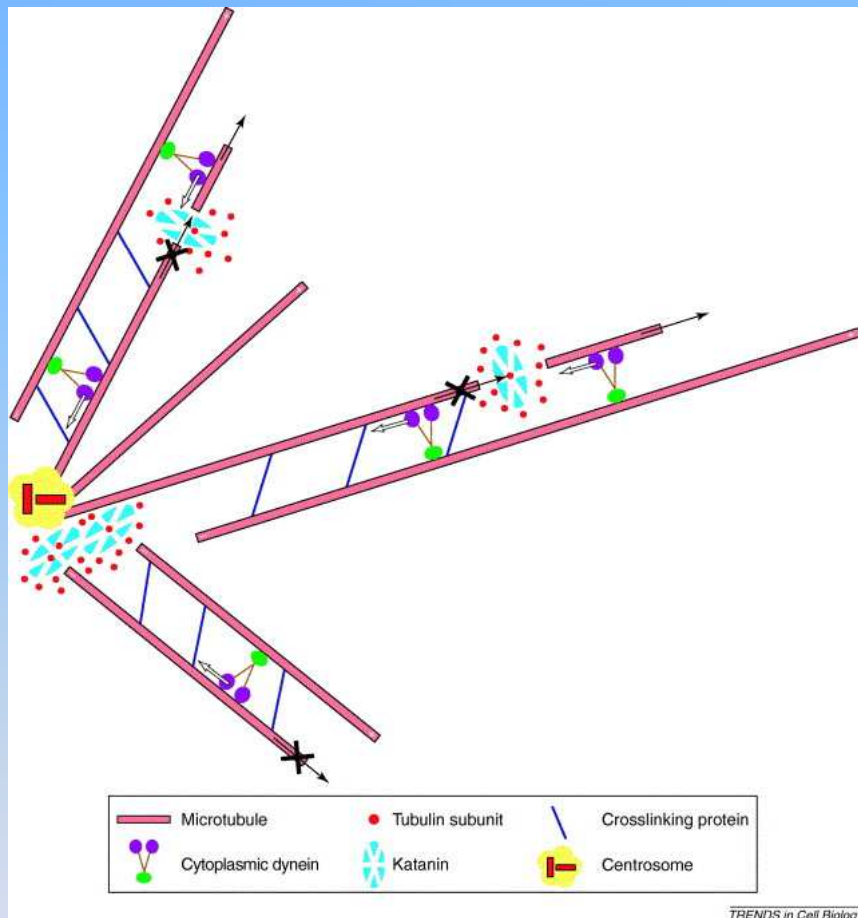


MAP2c + SH3 -/-

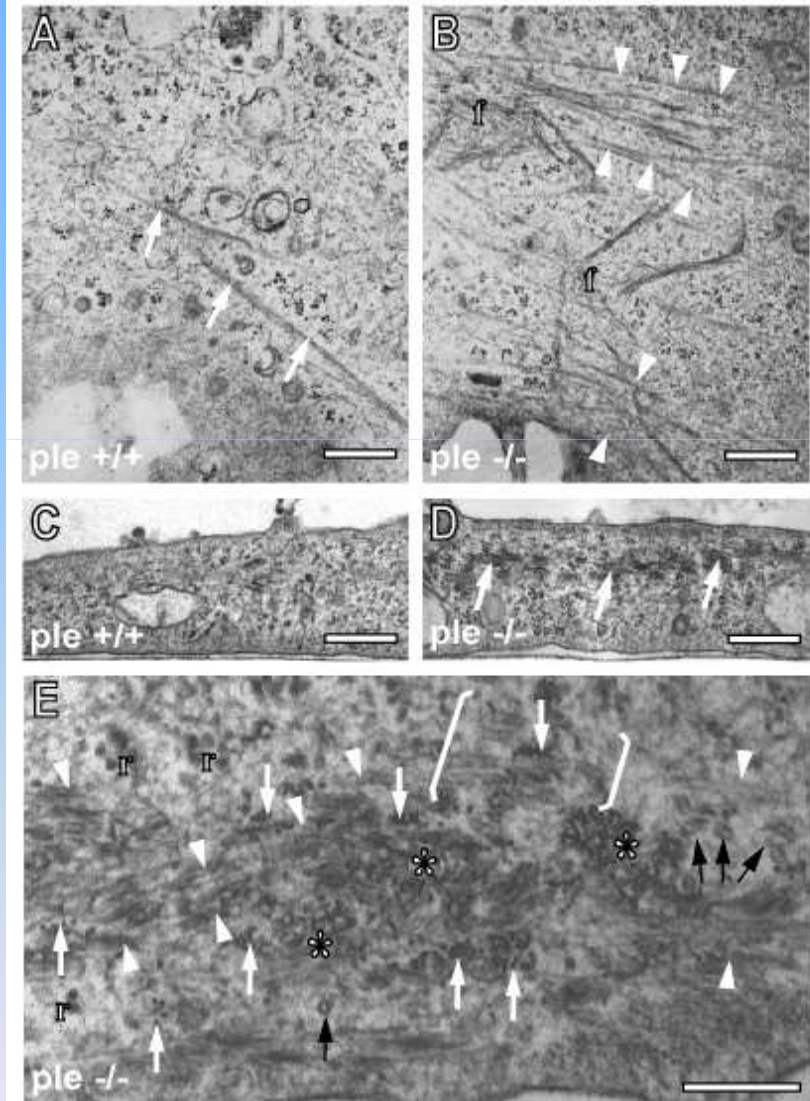


Fibroblasty

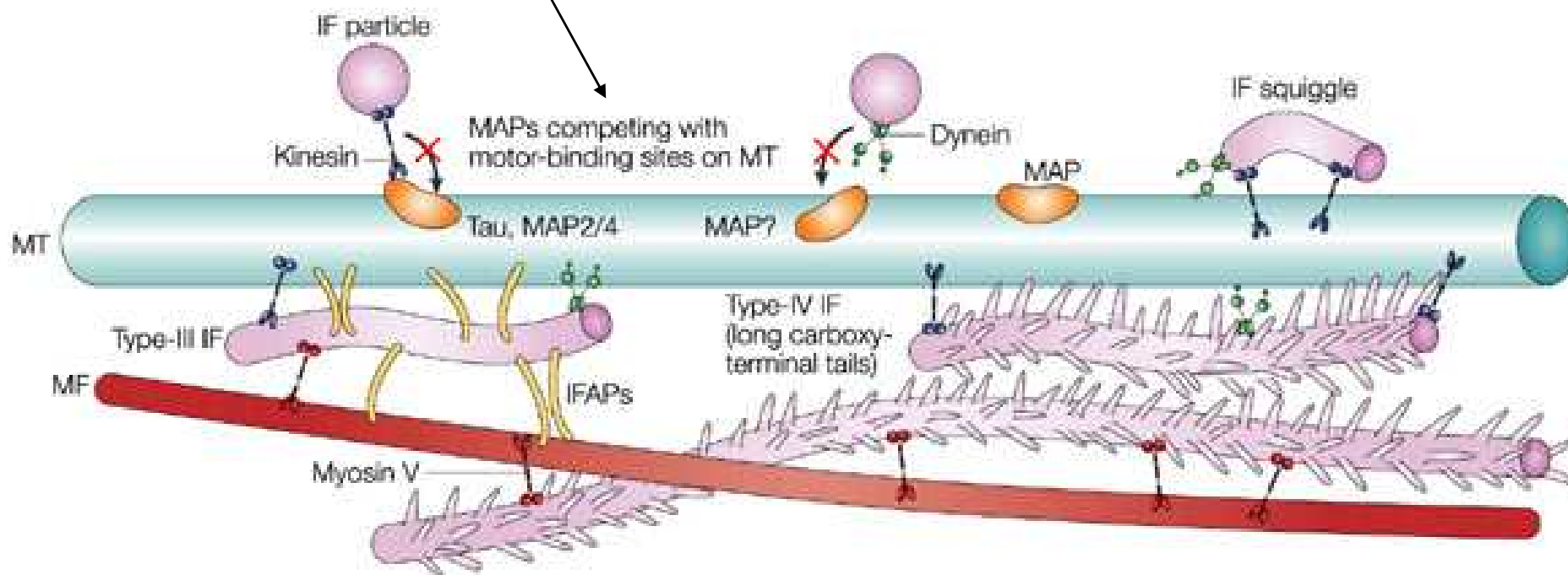
Vrstvící se keratinocyty, kterým chybí Plektin, vytvářejí zvláštní oblasti s nahloučenými mikrotubuly, které jsou stabilizovány proti depolymerizaci.



(Walko et al, 2008?)



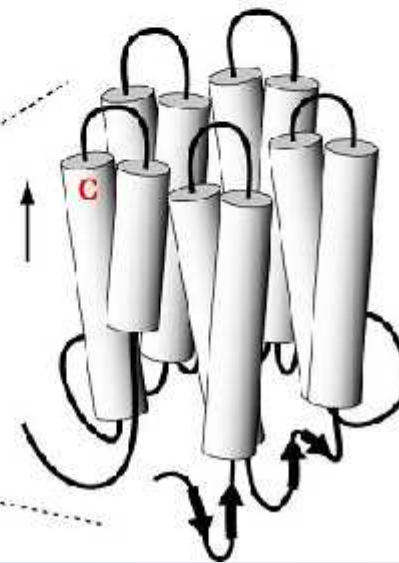
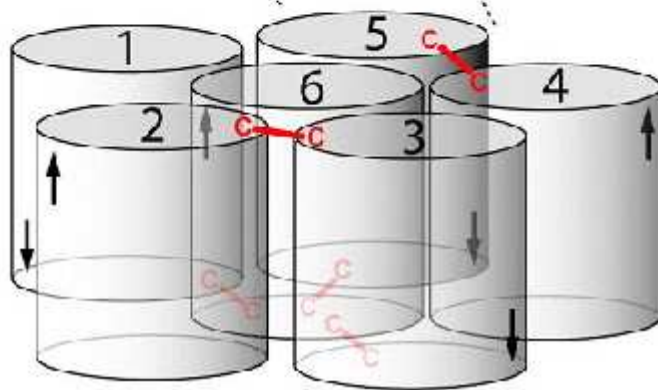
MAP – mikrotubul asociovaný protein redukuje frekvenci se kterou mohou molekulární motory interagovat s mikrotubulární mřížkou a frekvenci se kterou katanin může tvořit hexamery, které rozkládají mikrotubuly.



			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	
Phc-1/1	2837	Q I A G	L	L	L	K	P	T	N	E	K	L	S	V	Y	T	A	L	Q	R	Q	L	L	S	P	S	T	A	L	I	L	L	E	A	S	A	A	S	O	F
Phc-1/2	2870		L	L	D	P	V	T	N	R	R	L	T	V	N	E	A	V	K	E	Q	V	V	Q	P	E	L	H	H	K	L	L	S	A	E	R	A	V	T	S
Phc-1/3	2917		Y	K	D	P	Y	T	Q	E	Q	I	S	L	F	Q	A	N	K	K	S	L	I	V	R	D	H	S	I	R	L	L	E	A	Q	I	A	T	S	
Phc-1/4	2923		I	I	D	P	F	T	S	H	R	L	V	P	V	D	V	A	Y	Q	R	S	Y	F	D	E	E	S	N	R	V	L	A	D	P	S	D	T	K	S
Phc-1/5	2925		F	F	D	F	H	T	H	E	H	L	T	Y	L	Q	L	L	E	R	G	V	S	D	P	E	T	S	L	R	L	L	L	P	L					
Phc-2/1	3180	V I A G	V	W	L	E	E	A	Q	Q	K	L	S	I	Y	E	A	L	R	R	D	L	L	Q	P	E	V	A	Y	A	L	L	E	A	Q	A	S	T	O	H
Phc-2/2	3207		I	I	D	P	A	T	S	A	R	L	T	V	D	E	A	V	R	A	Q	L	V	Q	P	E	S	H	E	K	L	L	S	A	E	K	A	V	T	S
Phc-2/3	3240		Y	R	D	P	Y	S	Q	H	R	V	S	L	F	Q	A	L	K	K	Q	L	I	P	R	E	Q	S	L	R	L	L	D	A	Q	L	S	T	O	S
Phc-2/4	3283		I	V	D	P	S	S	H	R	V	P	L	D	V	A	Y	Q	R	S	Y	L	D	K	E	T	H	R	A	L	T	S	P	R	D	S	A	R	V	
Phc-2/5	3281		Y	L	D	P	S	T	R	E	P	Y	T	S	Q	L	Q	Q	R	G	R	S	D	D	L	T	S	L	S	L	L	L	P	L						
Phc-3/1	3426	G L A G	I	Y	L	E	D	S	K	E	K	V	T	I	Y	E	A	N	R	R	S	L	L	R	A	S	T	A	T	L	L	L	E	A	Q	A	A	T	O	F
Phc-3/2	3936		L	Y	D	P	Y	S	N	Q	R	L	Y	V	H	E	A	V	K	A	Q	L	V	Q	P	E	L	H	E	K	L	L	S	A	E	K	A	V	T	S
Phc-3/3	3970		Y	K	D	P	Y	S	Q	S	T	L	S	L	F	Q	A	N	K	K	Q	L	V	L	R	P	H	A	I	R	L	L	E	A	Q	I	A	T	O	S
Phc-3/4	3914		I	I	D	P	Y	S	Q	H	R	L	V	P	V	A	Y	Q	R	S	Y	F	D	E	E	S	N	R	V	L	A	D	P	S	D	T	K	S		
Phc-3/5	3923		F	F	D	F	H	T	H	E	H	L	T	Y	L	Q	L	L	E	R	G	V	S	D	P	E	T	S	L	R	L	L	P	L						
Phc-4/1	3931	S V A G	V	Y	L	F	Q	S	R	Q	T	L	T	I	V	Q	A	L	K	K	L	L	S	A	E	V	A	S	L	L	L	E	A	Q	A	A	T	O	F	
Phc-4/2	3970		L	L	D	P	Y	S	Q	E	R	L	T	V	D	E	A	V	K	K	Q	L	V	Q	P	E	L	H	D	R	L	L	S	A	E	K	A	V	T	S
Phc-4/3	3911		Y	R	D	P	Y	T	Q	E	R	L	S	L	F	Q	A	N	K	K	S	L	I	P	A	S	E	A	L	R	L	L	D	A	Q	L	A	T	O	S
Phc-4/4	3946		I	V	D	P	R	L	S	P	H	L	P	L	E	V	A	Y	Q	R	S	Y	L	H	K	D	T	H	D	Q	L	S	E	P	S	E	-	V	R	S
Phc-4/5	3920		Y	Y	D	P	S	T	D	E	R	L	S	Y	T	Q	L	L	E	R	G	R	S	D	D	H	S	Q	Q	N	L	L	P	L						
Phc-5/1	4034	G I A G	V	F	V	D	A	T	K	E	R	L	S	V	Y	Q	A	N	K	K	Q	I	I	S	P	Q	T	A	F	E	L	L	E	A	Q	A	A	T	O	Y
Phc-5/2	4116		V	I	D	P	I	S	K	L	K	L	T	V	K	E	A	V	K	K	S	I	V	S	P	F	K	D	K	L	L	E	A	S	K	A	V	T	S	
Phc-5/3	4154		Y	K	D	P	Y	S	K	L	I	S	L	F	Q	A	N	K	K	L	L	I	L	K	D	H	S	I	R	L	L	E	A	Q	I	A	T	O	S	
Phc-5/4	4182		I	I	D	P	S	S	H	R	L	V	P	V	A	Y	Q	R	S	Y	F	D	E	E	S	N	R	V	L	A	D	P	S	D	T	K	S			
Phc-5/5	4220		F	F	D	F	H	T	H	E	H	L	T	Y	L	Q	L	L	E	R	G	V	S	D	P	E	T	S	L	R	L	L	P	L						
Phc-6/1	4419	F V A G	I	L	D	T	S	T	L	E	K	V	S	I	T	E	A	N	H	R	M	L	V	D	N	I	T	S	Q	R	L	L	E	A	Q	A	A	T	O	S
Phc-6/2	4431		I	I	D	P	E	T	S	E	R	F	P	V	T	E	A	V	K	K	L	V	D	K	I	S	V	D	R	I	R	L	A	R	K	A	F	G	S	
Phc-6/3	4420		F	I	D	P	R	T	K	T	K	S	N	S	A	L	S	A	L	K	K	S	W	L	Y	S	A	S	Q	R	F	L	E	V	Q	Y	L	T	O	S
Phc-6/4	4637		L	I	E	F	D	T	Q	R	V	S	L	D	S	A	L	Q	R	S	T	V	D	A	R	T	A	Q	K	L	S	D	V	S	A	Y	S	K	Y	
Phc-6/5	4670		L	T	S	P	K	T	K	L	K	I	S	Y	K	D	A	L	R	S	N	V	S	S	E	T	S	L	R	L	E	A								
Cons. 80%			I	h	p	-	-	s	t	p	p	s	h	-	p	A	h	t	p	t	i	s	-	t	-	h	-	t	h	-	p	t	p	h	-	-	t	e		

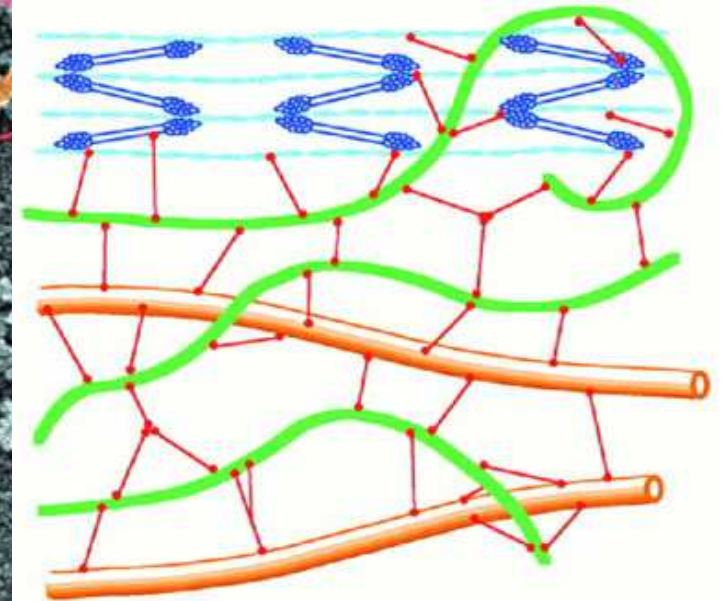
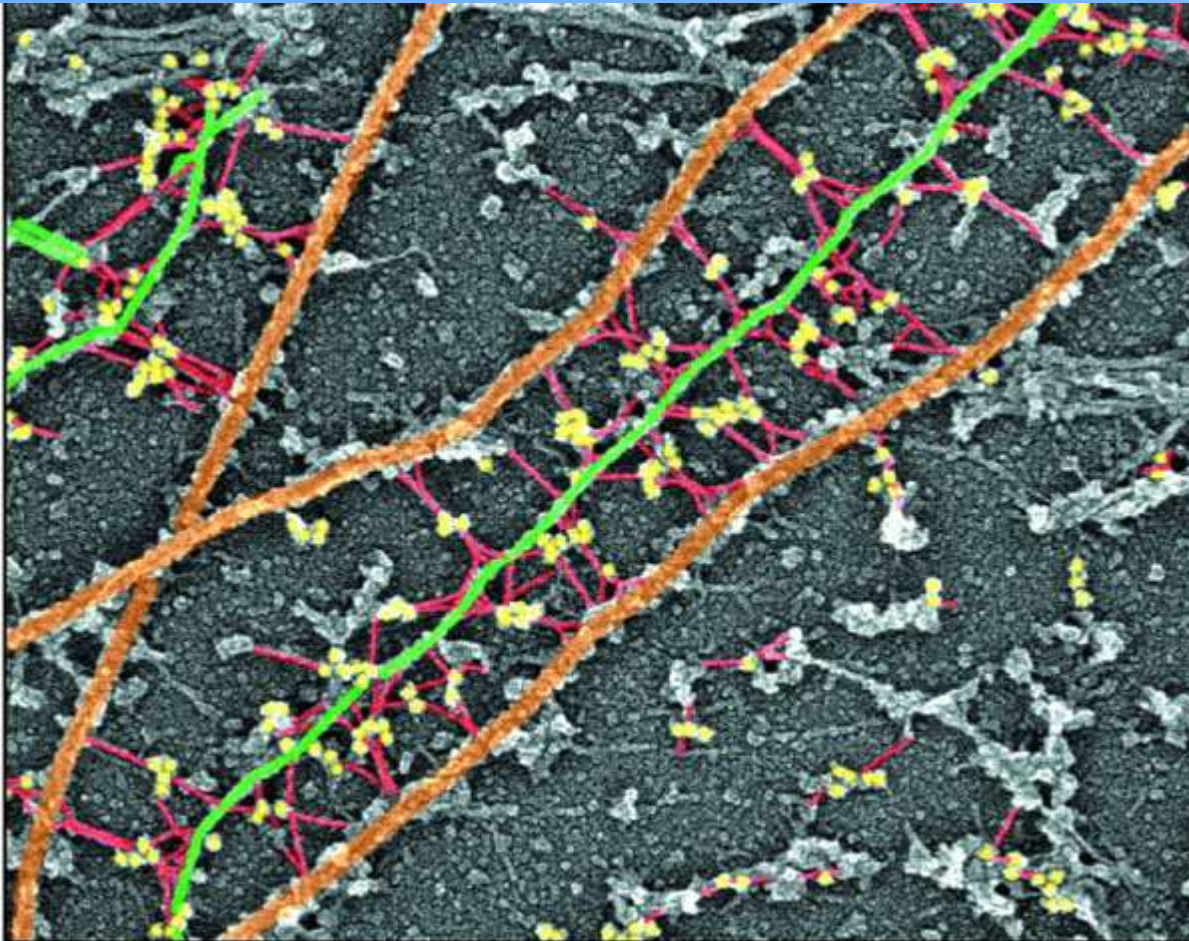
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33								
Art-1	4		K	A	D	A	A	T	S	-	-	F	L	R	-	-	A	A	R	S	N	L	-	-	D	K	A	L	D	S	L	R	N	S	-	V	D	I	N	T	G		
Art-2	48		N	Q	N	S	L	N	S	-	-	L	H	L	-	-	A	S	R	S	S	H	V	-	-	R	M	V	V	S	L	L	H	K	S	-	I	I	L	S	T	T	
Art-3	73		T	K	K	S	N	T	A	-	-	L	H	I	-	-	A	A	L	A	Q	H	-	-	E	V	V	K	F	L	L	N	Y	S	-	A	N	Q	N	V	A		
Art-4	108		S	Q	K	S	F	T	P	-	-	L	Y	M	-	-	A	A	Q	Q	N	H	L	-	-	E	V	V	K	F	L	L	N	Y	S	-	T	K	O	K			
Art-5	141		T	E	D	S	F	T	P	-	-	L	A	V	-	-	A	L	Q	Q	H	E	-	-	N	V	V	A	H	L	I	N	Y	S	-	A	N	K	O	K			
Art-6	170		Y	R	L	F	A	-	-	-	-	L	H	I	-	-	A	A	R	H	D	D	T	-	-	R	T	A	A	V	L	L	Q	N	D	-	P	H	P	D	V	L	
Art-7	203		S	K	T	S	F	T	P	-	-	L	H	I	-	-	A	A	H	Y	E	N	L	-	-	N	V	A	Q	L	L	L	N	R	S	-	A	S	V	N	F	T	
Art-8	236		P	Q	N	S	I	T	P	-	-	L	H	I	-	-	A	A	S	R	R	Q	N	V	-	-	I	S	V	R	L	L	D	R	S	-	A	Q	I	N	E	T	K
Art-9	266		T	K	D	E	L	T	P	-	-	L	H	G	-	-	A	A	S	R	S	H	V	-	-	R	I	S	E	I	L	L	D	H	S	-	A	P	I	Q	A	K	
Art-10	308		T	K	N	S	L	S	P	-	-	I	H	M	-	-	A	A	Q	Q	D	H	L	-	-	D	G	V	N	L	L	L	Q	Y	D	-	A	E	I	D	D	I	
Art-11	326		T	L	D	H	L	T	P	-	-	L	H	V	-	-	A	A	H	G	S	H	-	-	R	V	A	K	V	L	L	D	K	S	-	A	K	P	N	S	R		
Art-12	366		A	L	N	S	F	T	P	-	-	L	H	I	-	-	A	A	G	K	N	H	V	-	-	R	V	M	E	L	L	K	T	S	-	A	S	I	D	A	V		
Art-13	401		T	E	S	Q	L	T	P	-	-	L	H	V	-	-	A	S	F	M	S	H	L	-	-	P	I	V	K	H	L	L	Q	R	S	-	A	S	P	H	V	S	
Art-14	434		N	V	R	V	E	T	P	-	-	L	H	M	-	-	A	A	S	R	A	G	H	T	-	-	E	V	A	K	Y	L	L	Q	N	K	-	A	K	V	N	A	K
Art-15	487		A	K	D	D	Q	T	P	-	-	L	H	G	-	-	A	A	S	R	I	S	H	T	-	-	N	E	V	K	L	L	L	E	N	N	-	A	N	P	N	L	A
Art-16	500		T	T	A	Q	H	T	P	-	-	L	H	I	-	-	A	A	R	E	Q	H	V	-	-	E	T	V	L	A	L	L	E	K	E	-	A	S	Q	A	G	M	
Art-17	533		T	K	E	Q	F	T	P	-	-	L	H	V	-	-	A	A	K	Y	S	K	V	-	-	R	V	A	E	L	L	L	E	R	S	-	A	H	P	M	A	A	
Art-18	555		Q	K	N	S	L	T	P	-	-	L	H	V	-	-	A	V	H	H	N	N	L	-	-	D	I	V	E	L	L	L	F	R	S	-	S	S	P	H	S	P	
Art-19	586		A	M	N	S	Y	T	P	-	-	L	H	I	-	-	A	A	K	Q	M	Q	V	-	-	E	V	A	S	L	L	Q	Y	S	-	S	B	A	N	A	S		
Art-20	600		S	V	Q	S	Y	T	P	-	-	L	H	L	-	-	A	A	Q	E	S	H	A	-	-	E	V	A	L	L	L	S	K	Q	-	A	N	Q	N	L	S		
Art-21	605		N	K	S	S	L	T	P	-	-	L	H																														

C-koncová doména Plektinu



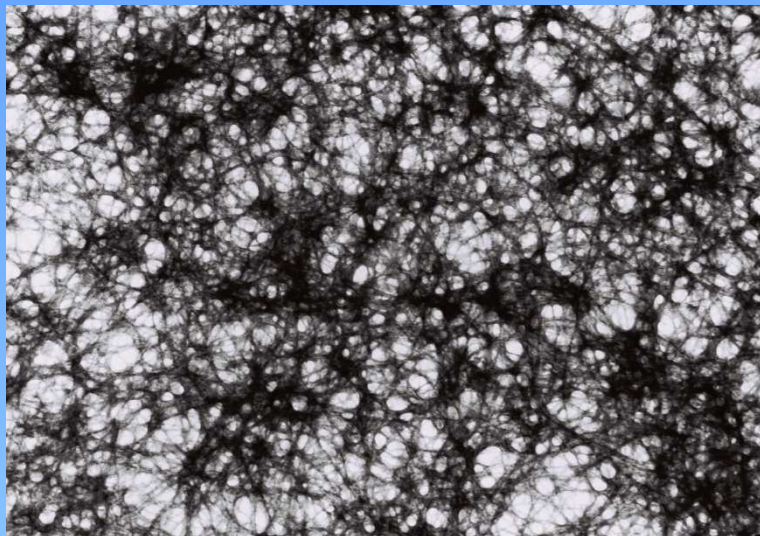
- šest modulů C-koncové domény Plektinu, které jsou spojeny méně konzervativním spojovací sekvencí
- modul samotný je tvořen 38 aminokyselinami (2x19) opakovaně pět krát.

Cytoskeleton

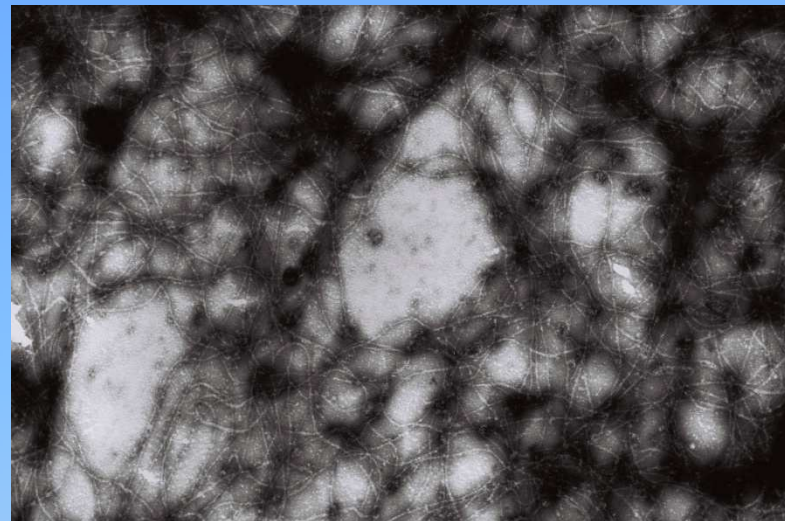


-  Plectin
-  Intermediate filaments
-  Microtubules
-  Actin filaments
-  Myosin filaments

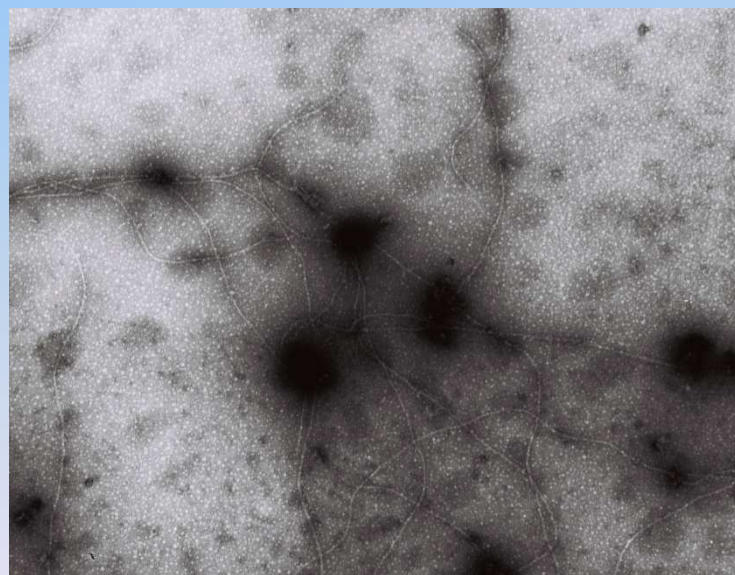
Electronová mikroskopie: Vimentin+R5/ 1000:1



Electronová mikroskopie : Vimentin+R5/ 100:1

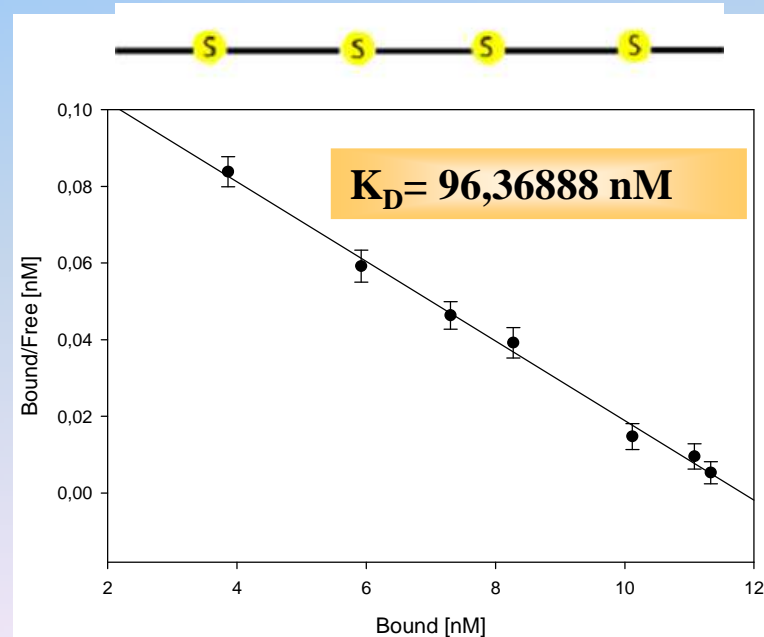
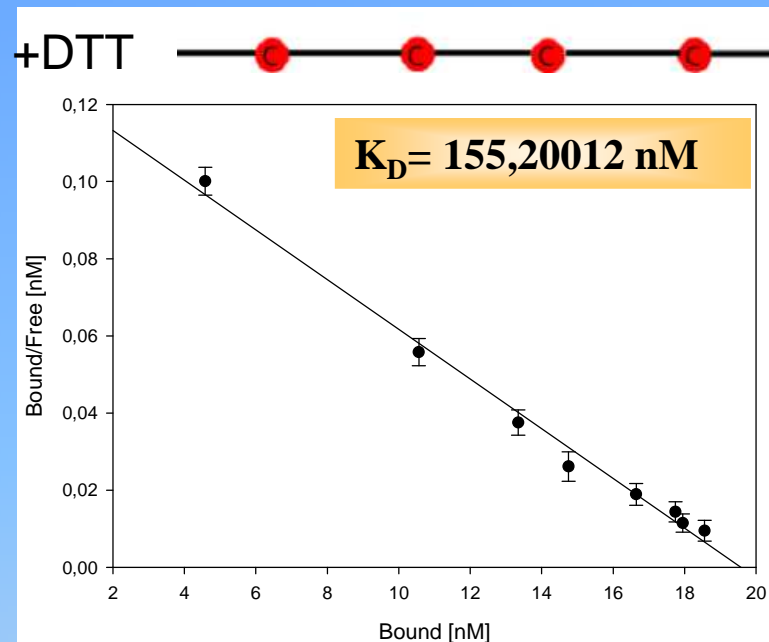
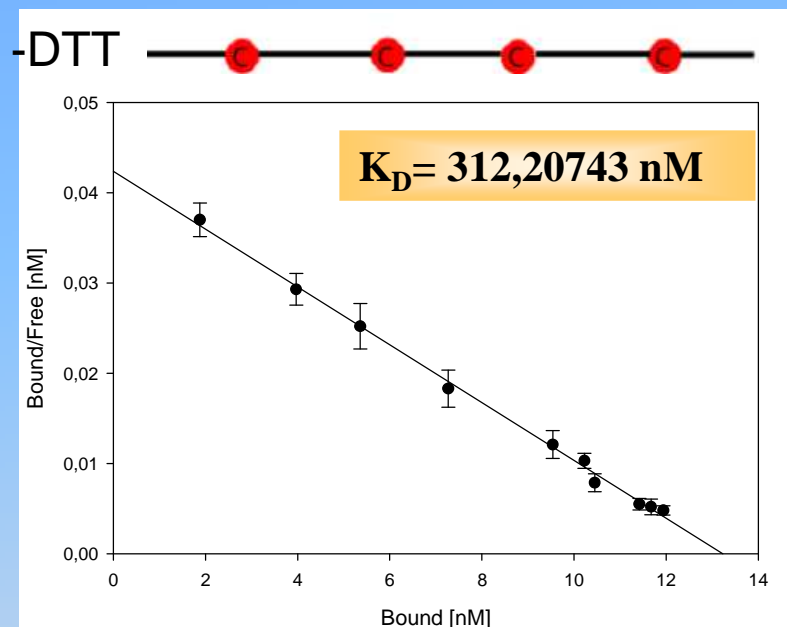


Electronová mikroskopie : Vimentin+R5/ 1:1



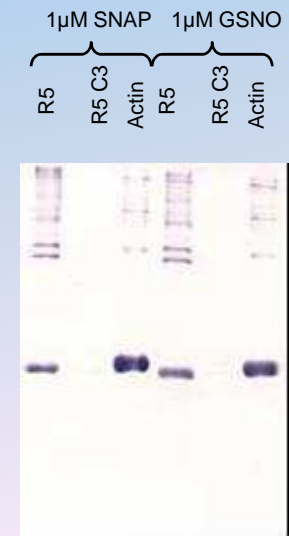
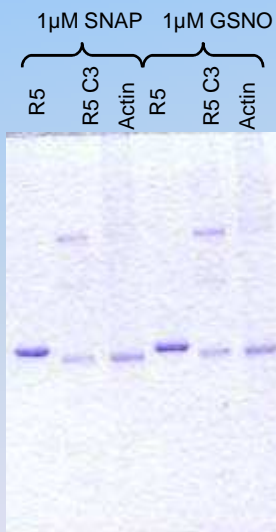
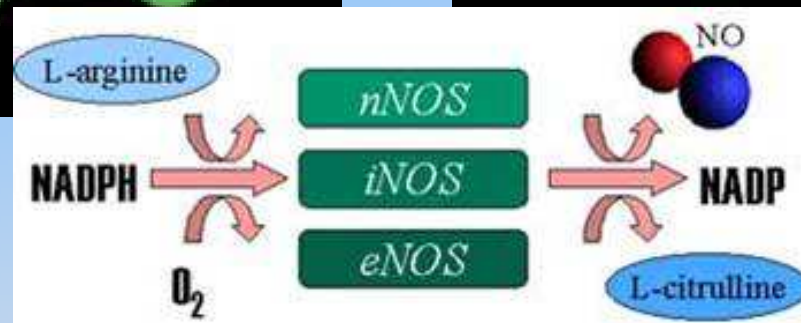
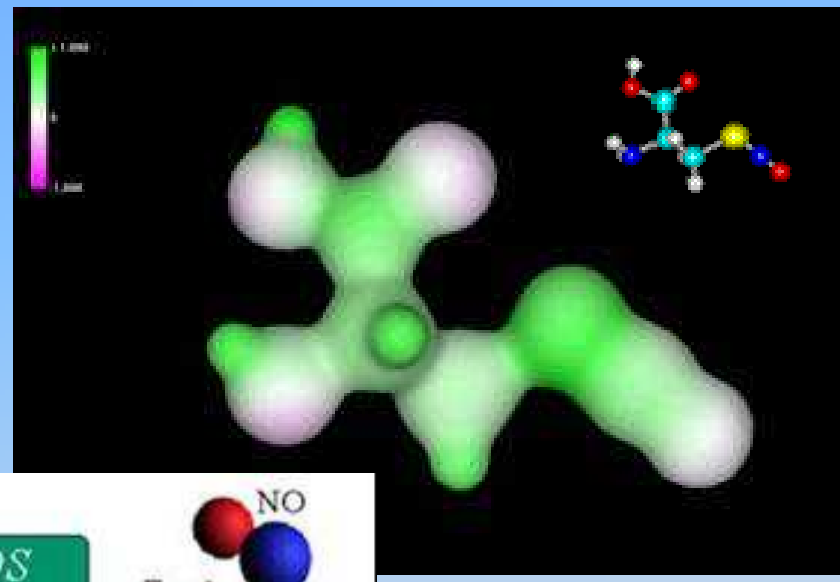
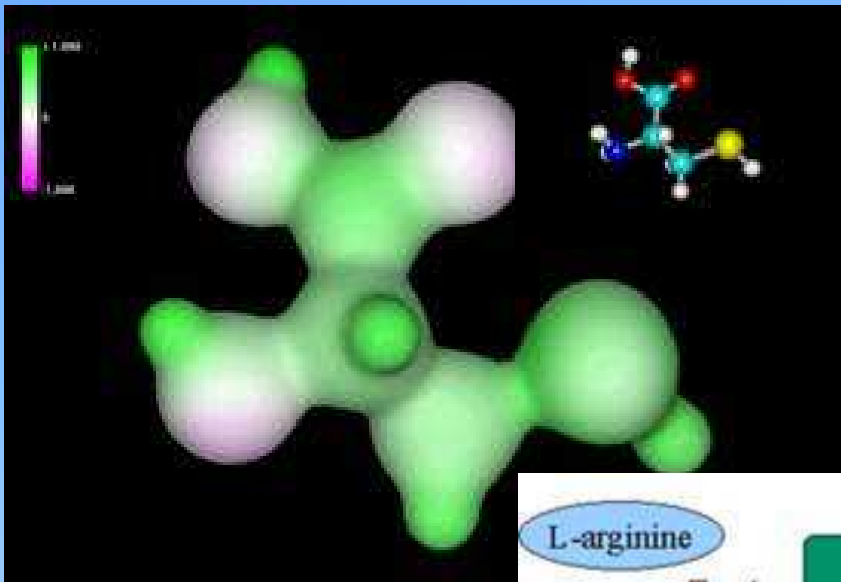
Značení Europiem: R5wt

5



Nitrosylace NO

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



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

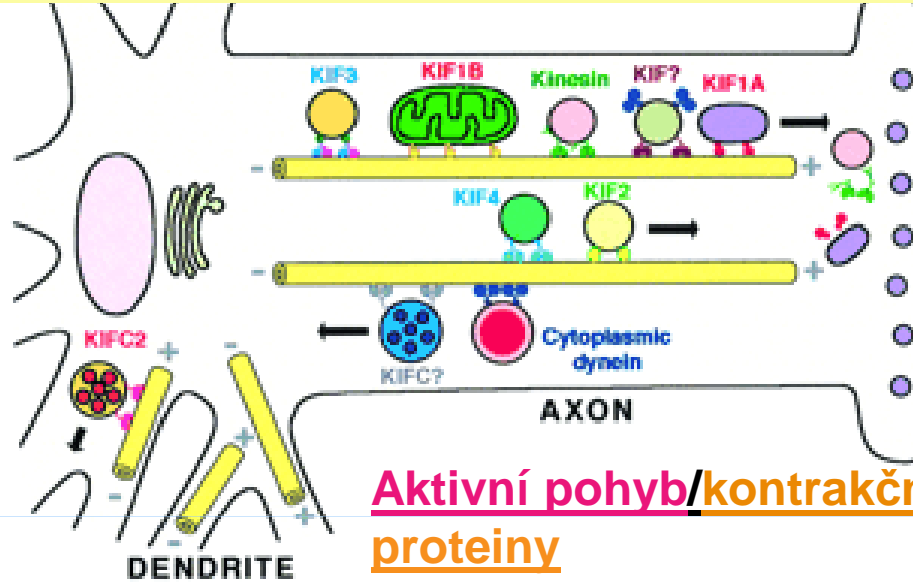
III. Protein-interakce s dalším proteinem nebo DNA

IV. Zásobní – zdroj energie, uhlíku nebo dusíku.

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

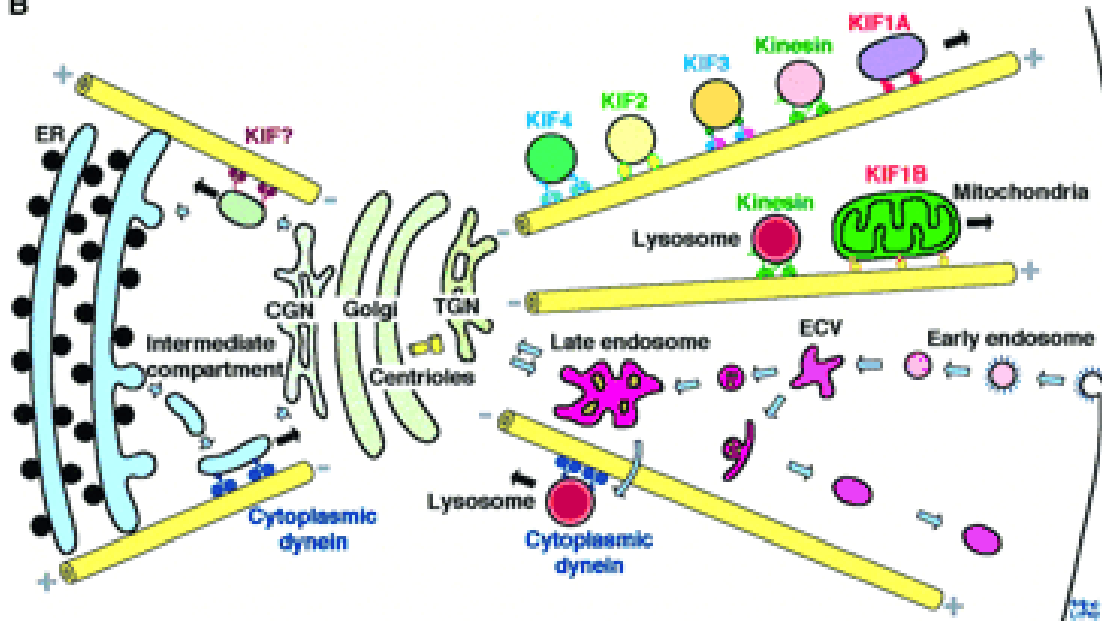
Dynein má tendenci se otáčet kolem mikrotubulů po povrchu směrem od periferie buňky (retrográdní směr).

A

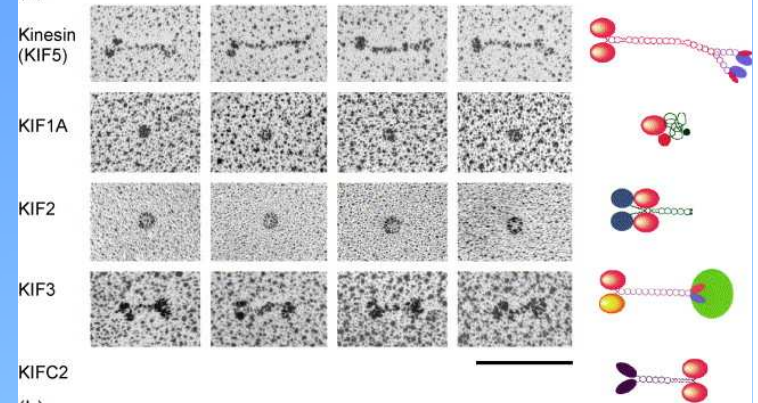


Aktivní pohyb/kontrakční/motor-proteiny

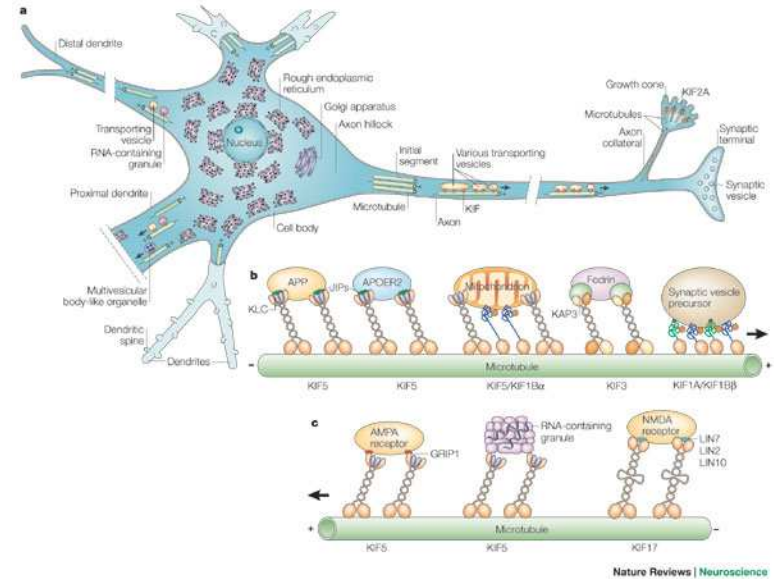
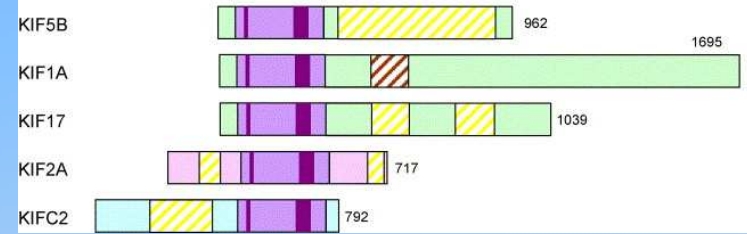
B



(a)



(b)



Funkce proteinů

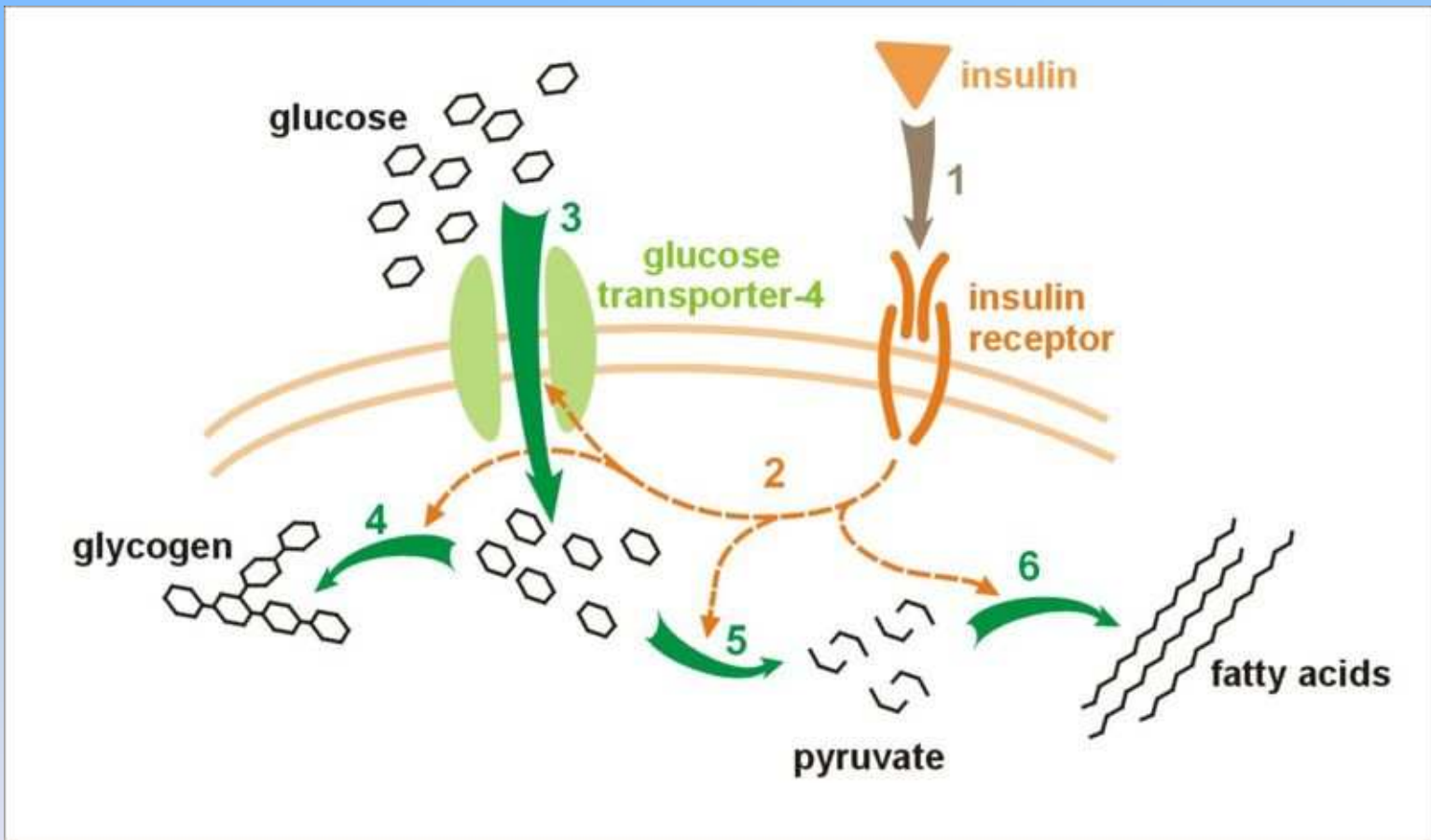
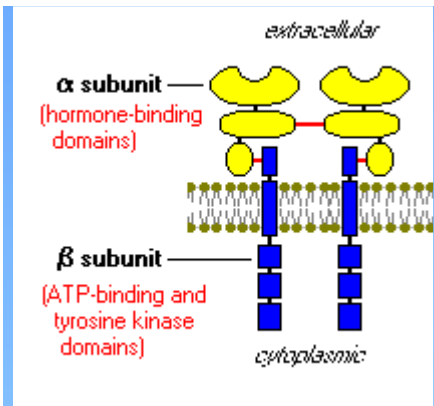
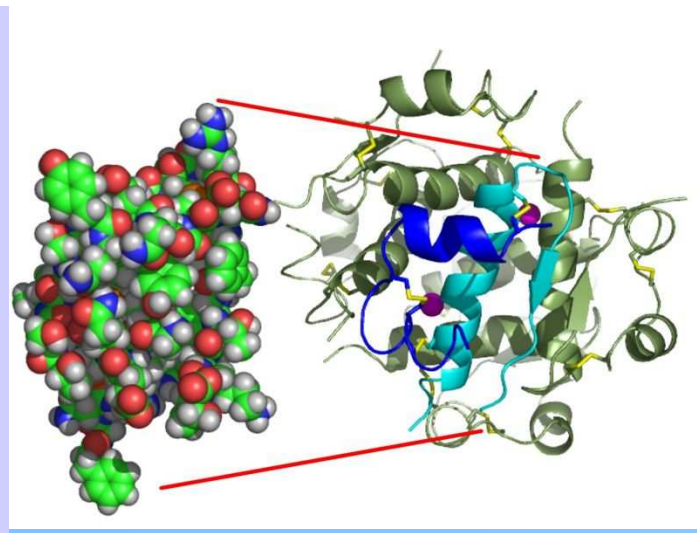
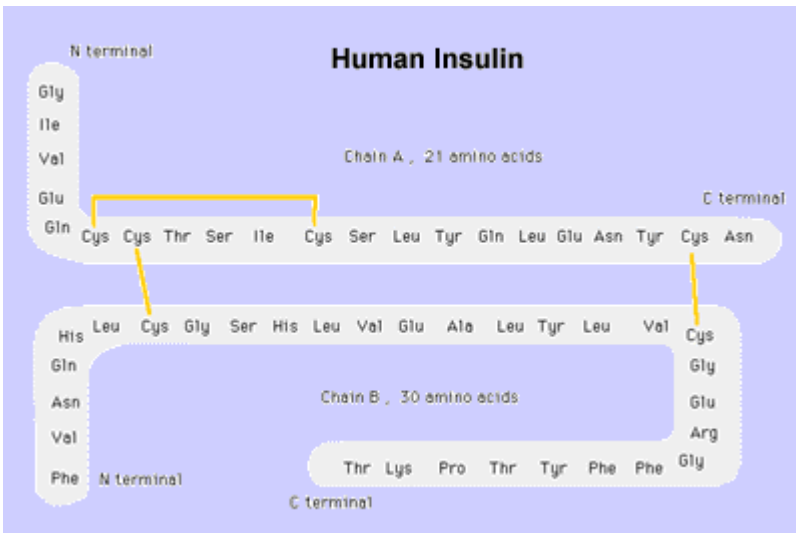
- I. —● 1. Enzymatická/enzymy/katalýza
- II. —● 2. Receptorová/signalizace/
- 3. Převážná/transportní/vazba-transport
- III. —● 4. Strukturní/zpevňovací/strukturní komponenty/
- 5. Aktivní pohyb/kontrakční/motor-proteiny
- 6. Hormonální/hormony/regulace
- 7. Obranná/specializovaná/imunitní systém/transkripční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

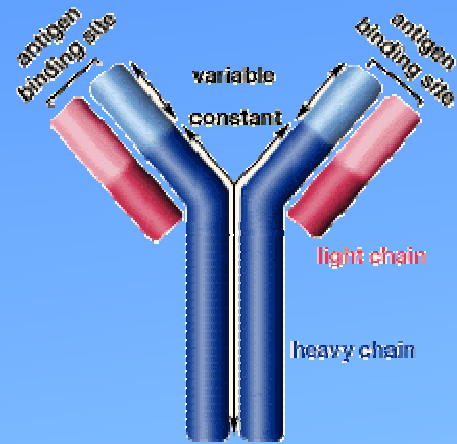
- I. —● 1. Enzymatická/enzymy/katalýza
- II. —● 2. Receptorová/signalizace/
- 3. Převážná/transportní/vazba-transport
- III. —● 4. Strukturní/zpevňovací/strukturní komponenty/
- 5. Aktivní pohyb/kontrakční/motor-proteiny
- 6. Hormonální/hormony/regulace
- 7. Obranná/specializovaná/imunitní systém/transkripční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

I. Enzymy

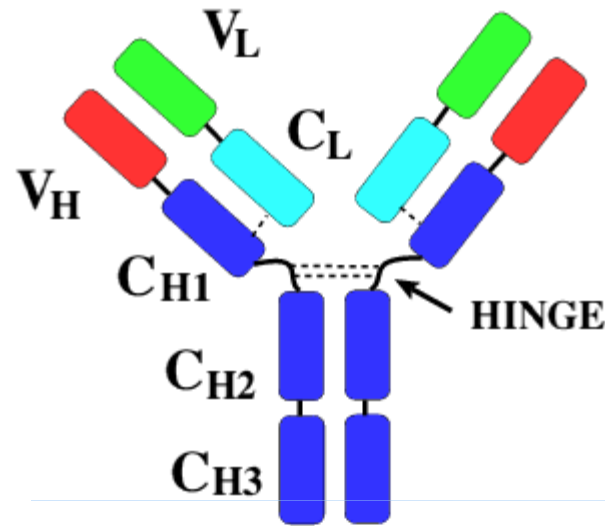
II. Protein-interakce s ligandem

III. Protein-interakce s dalším proteinem nebo DNA

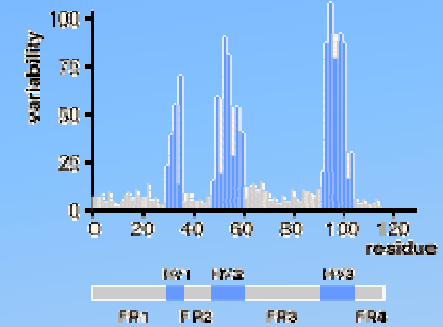
IV. Zásobní – zdroj energie, uhlíku nebo dusíku.



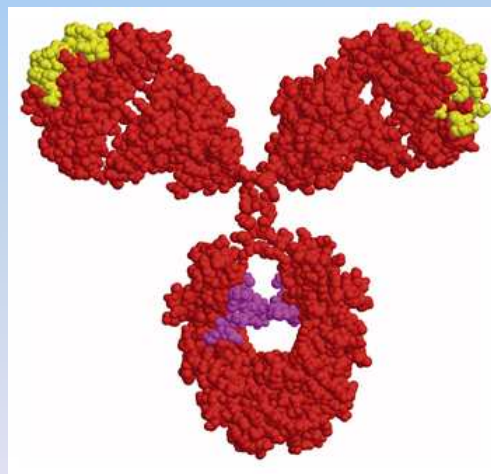
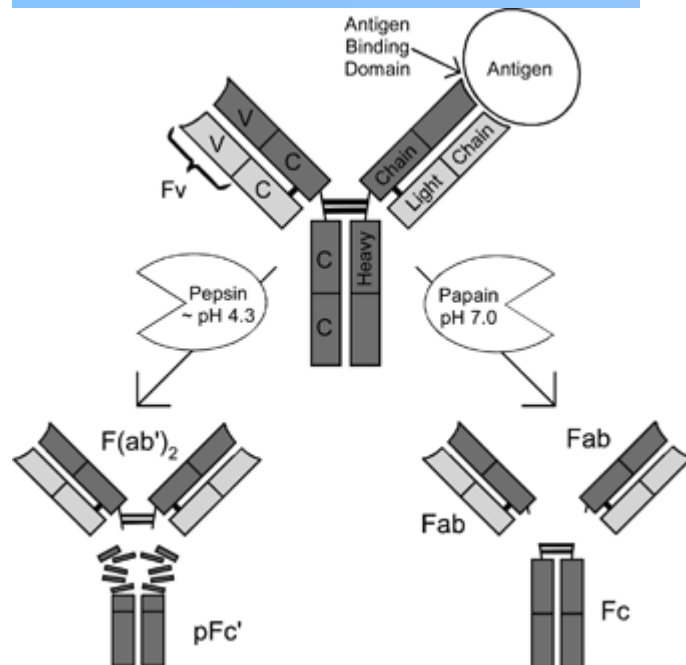
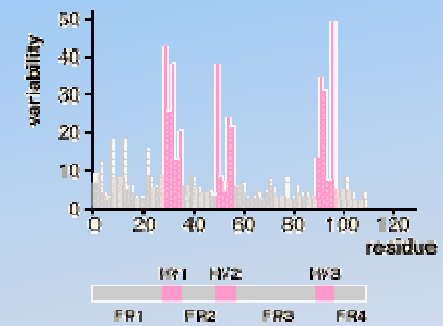
ANTIBODY DOMAIN STRUCTURE



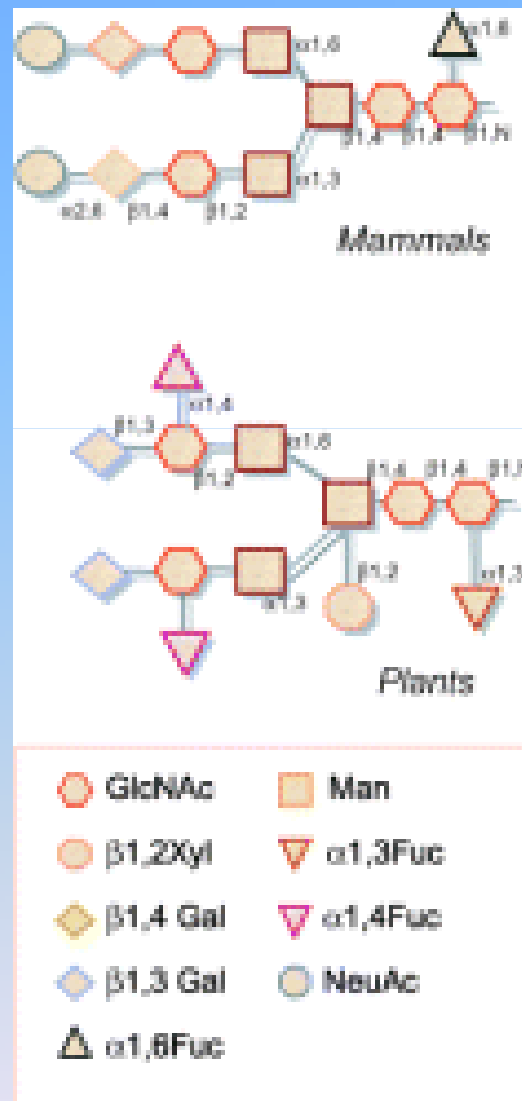
Heavy-chain V region



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.

