

# Funkce proteinů

Lubomír Janda

# Co potřebujeme k tomu, abychom mohli studovat funkci proteinů?

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

# Metody studia funkce proteinů

Cíl	Metoda
Dostatek znalostí o proteinu	Bioinformatika (analýza proteinu, práce s literaturou)
Funkční protein	Exprese a purifikace proteinů
Zviditelnění proteinu	SDS-PAGE/Western blot/ fluorescenční a elektronová mikroskopie/detekce aktivity enzymu na gelu/MALDI/2D-PAGE
Kvalita proteinu	CD spektroskopie/měření turbidity/DLS
Hledání interakčního partnera	Dvojhybridní kvasinkový systém/vrstevní značení/ imunoprecipitace/TAP tag technologie/ substrátová specificita/
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 <sup>2+</sup> centers)	C–N hydrolysis in proline amides	P–F hydrolysis in diisopropyl fluorophosphate
aminopeptidase	metallohydrolase (two Zn <sup>2+</sup> centers)	C–N hydrolysis in amides	P–O hydrolysis in bis- <i>p</i> -nitrophenylphosphate
pyruvate kinase	metalloenzyme (Mn <sup>2+</sup> , K <sup>+</sup> , Mg <sup>2+</sup> centers)	phosphoryl transfer from phosphoenolpyruvate	sulfuryl transfer from sulfoenolpyruvate; also phosphoryl transfer to fluoride, hydroxylamine, or $\alpha$ -hydroxycarboxylic acids
<i>o</i> -succinylbenzoate synthase	metalloenzyme (Mn <sup>2+</sup> 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 $\Delta^9$ 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-oxoglutarate-dependant)	oxidative ring expansion of the five-membered ring to a six-membered, hydroxylation of a methyl group	one of the two normal activities
lipase, esterase	serine hydrolase	ester hydrolysis	$\beta$ -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 <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (OEt) <sub>2</sub> ), dimerization of Si(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> OCH <sub>3</sub>
pepsin	aspartate hydrolase	amide hydrolysis	sulfite hydrolysis
asparaginase	Thr-Lys-Asp triad	C–N hydrolysis in asparagine to give aspartate	C $\equiv$ N hydrolysis in $\beta$ -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 $\beta$ of serine to tetrahydropteroylglutamate	threonine retroaldol reaction, decarboxylation of aminomalonate, 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.

## Systematická klasifikace enzymů dle enzymové komise (EC):

- EC x. y. z. p. čtyřciferný kód (Enzyme commission)
- Příklad: Alkoholdehydrogenasa, EC 1.1.1.1
- Systematický název: Alkohol:NAD<sup>+</sup> oxidoreduktasa
- 1. oxidoreduktasy (oxidačně-redukční reakce)
- 1. 1 Působí na CH-OH skupinu donoru
- 1. 1. 1 Akceptor NAD<sup>+</sup> nebo NADP<sup>+</sup>
- 1. 1. 1. 1 (pořadí enzymu v podpodtřídě)



Skupina	Katalyzovaná reakce	Typická reakce	Příklady enzymů s triviálními názvy
EC1.x.x.x <i>Oxidoreduktázy</i>	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

# 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

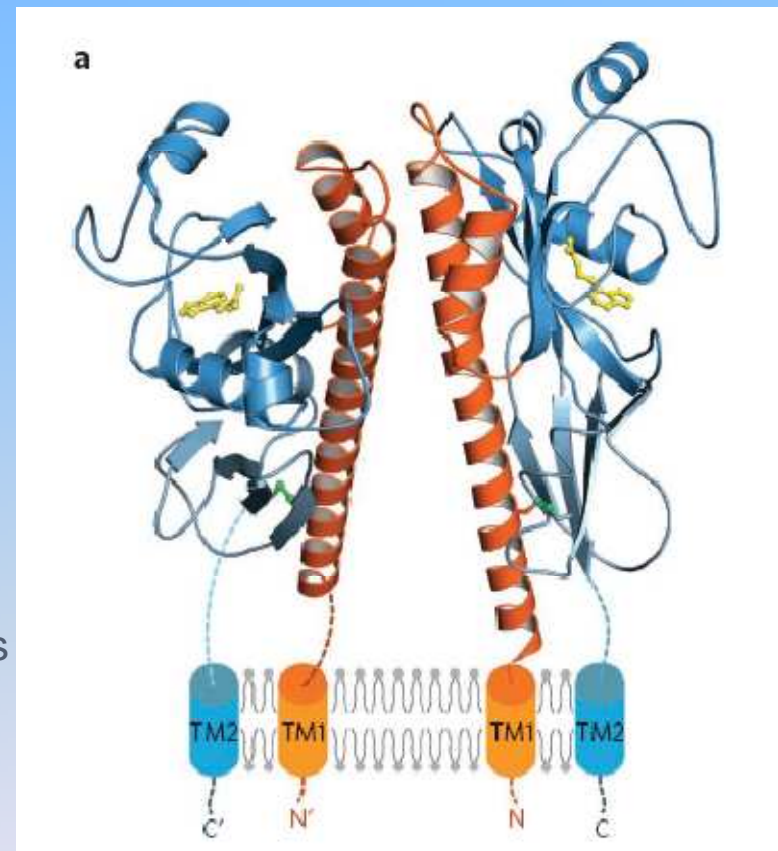
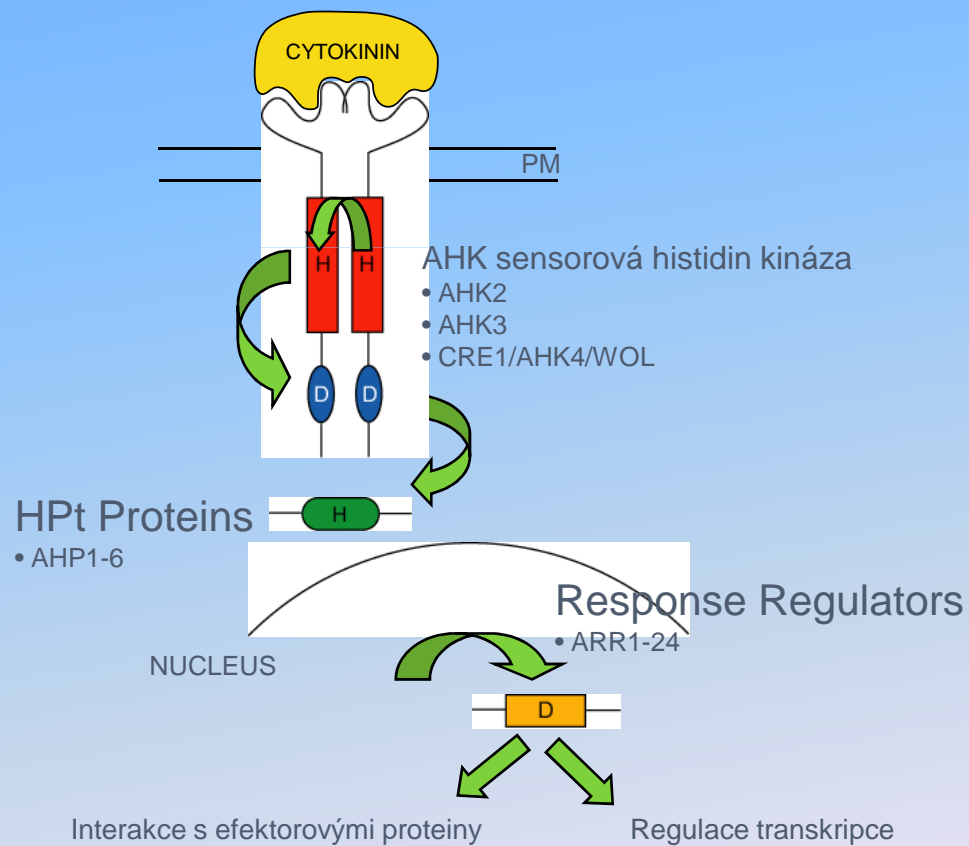
II. Protein-interakce s ligandem

III. Protein-interakce s dalším proteinem nebo DNA

IV. Zásobní.

# Signalizace u více-komponentního systému

Současný model cytokininové signalizace přes více-komponentní systém u rostliny *Arabidopsis thaliana*



# 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

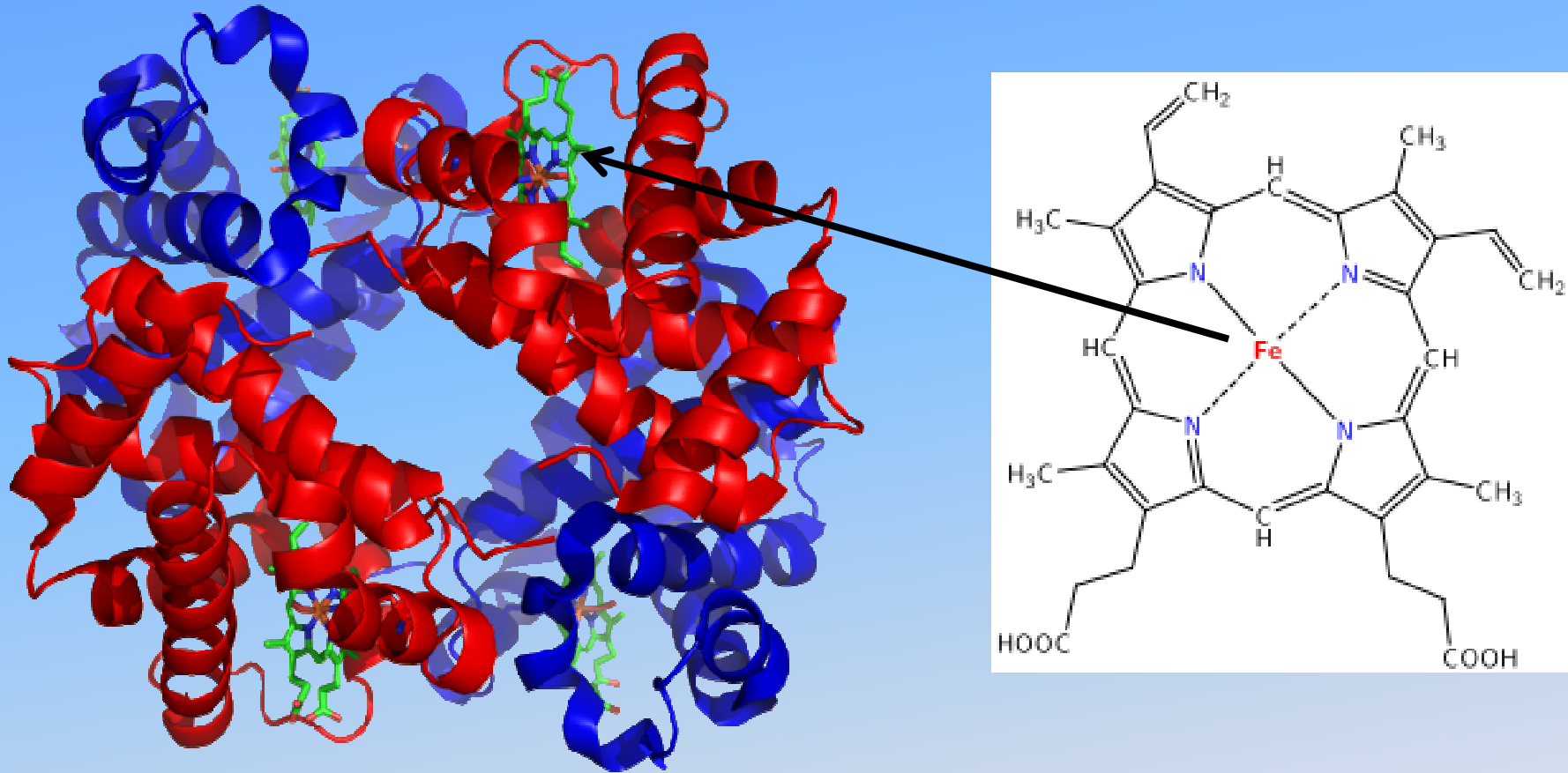
I. Enzymy

II. Protein-interakce s ligandem

III. Protein-interakce s dalším proteinem nebo DNA

IV. Zásobní.

# Hemoglobin a jeho funkce v transportu kyslíku



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

# 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

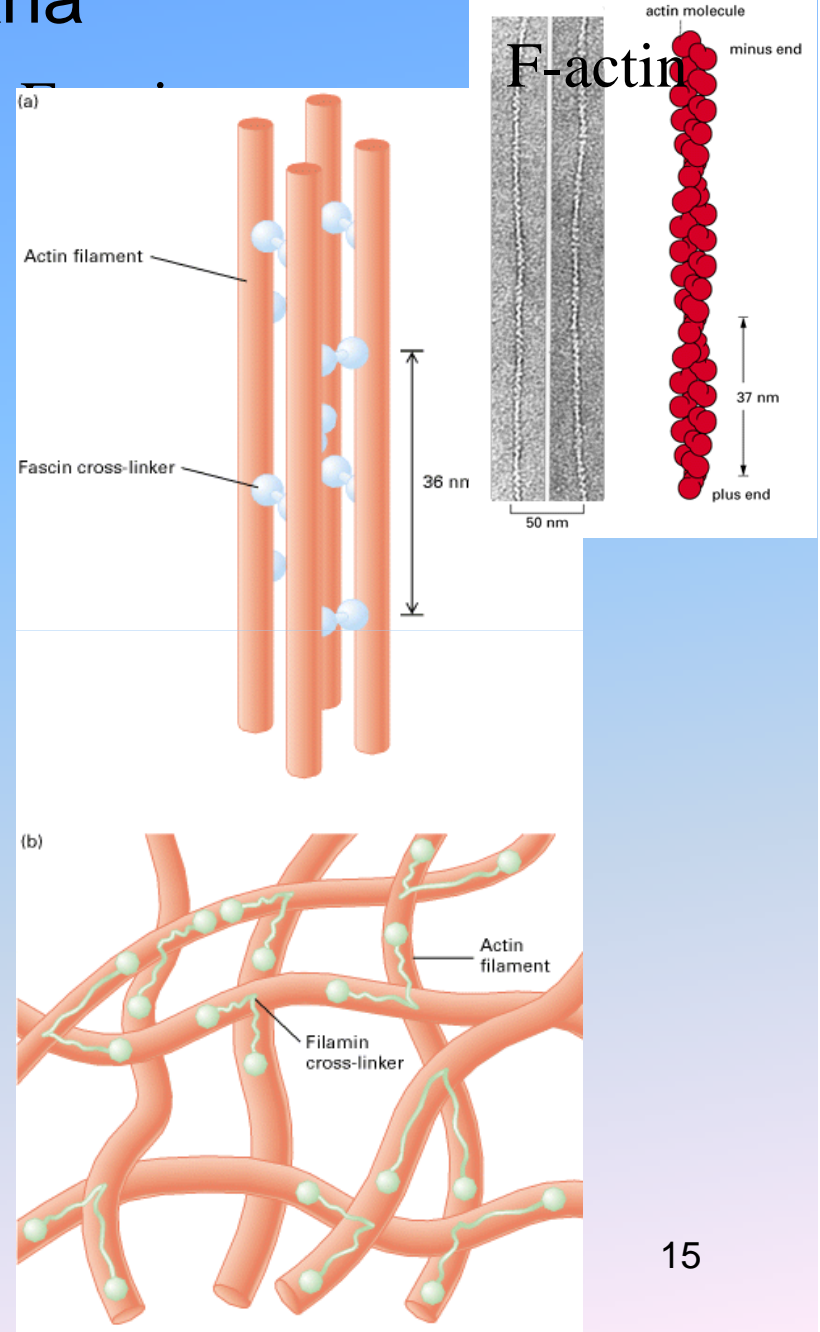
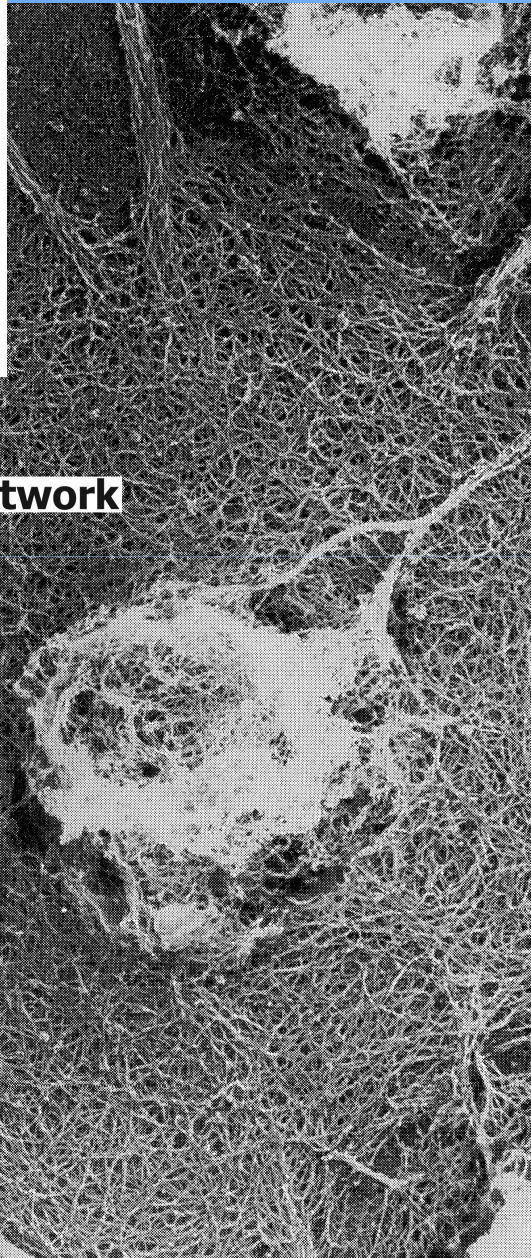
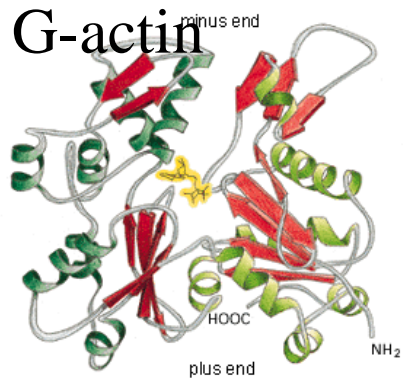
II. Protein-interakce s ligandem

III. Protein-interakce s dalším proteinem nebo DNA

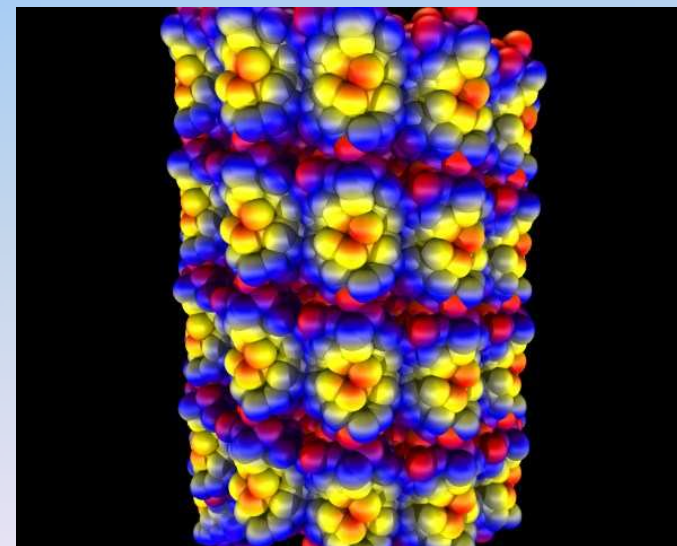
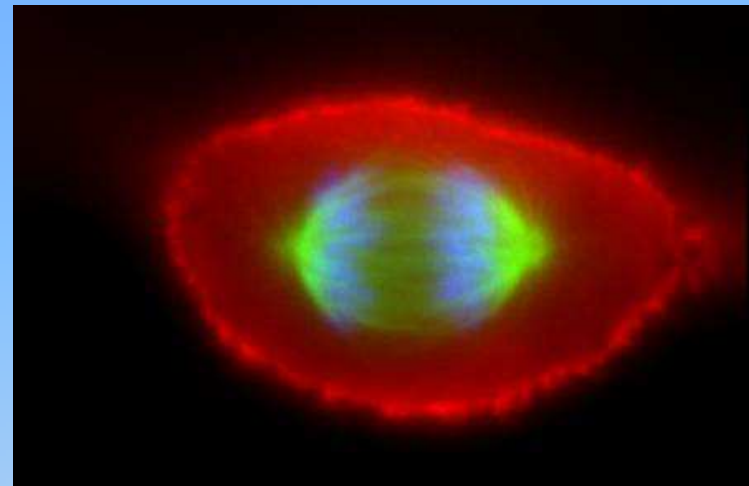
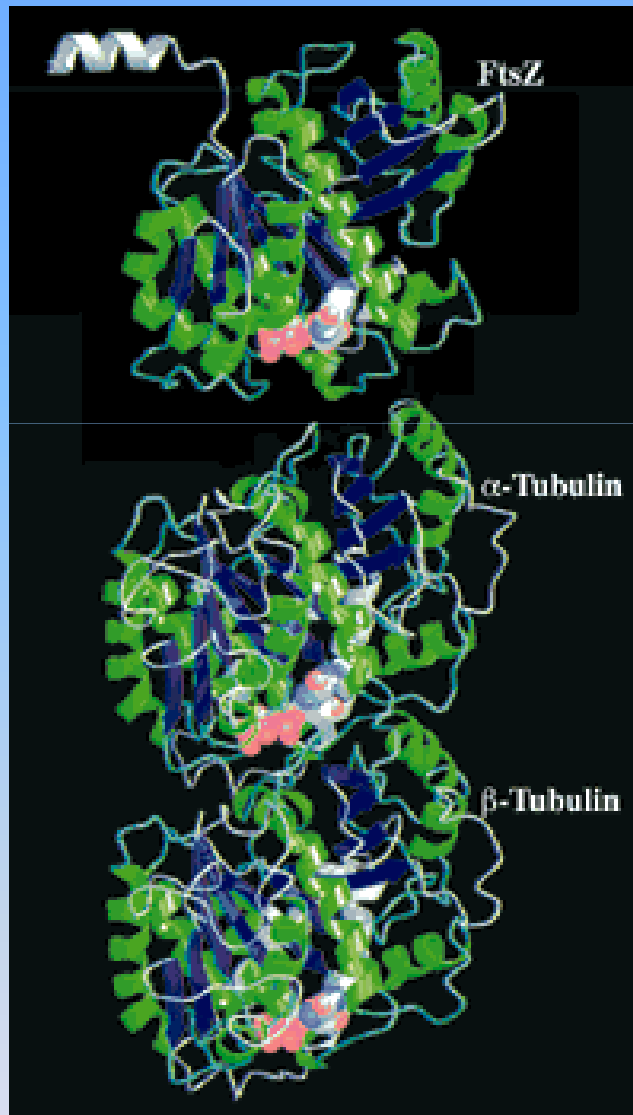
IV. Zásobní.



# Aktinová vlákna



# Tubulinová vlákna

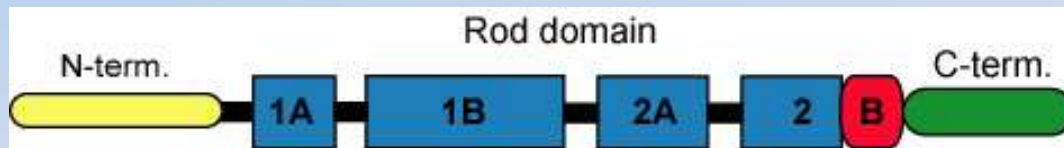
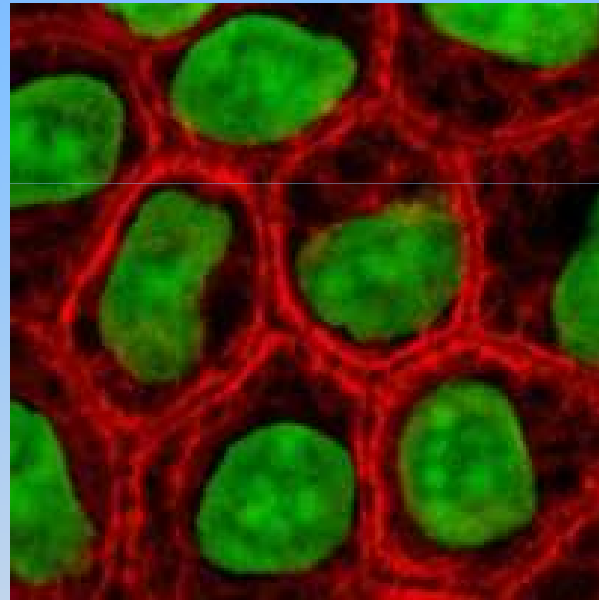




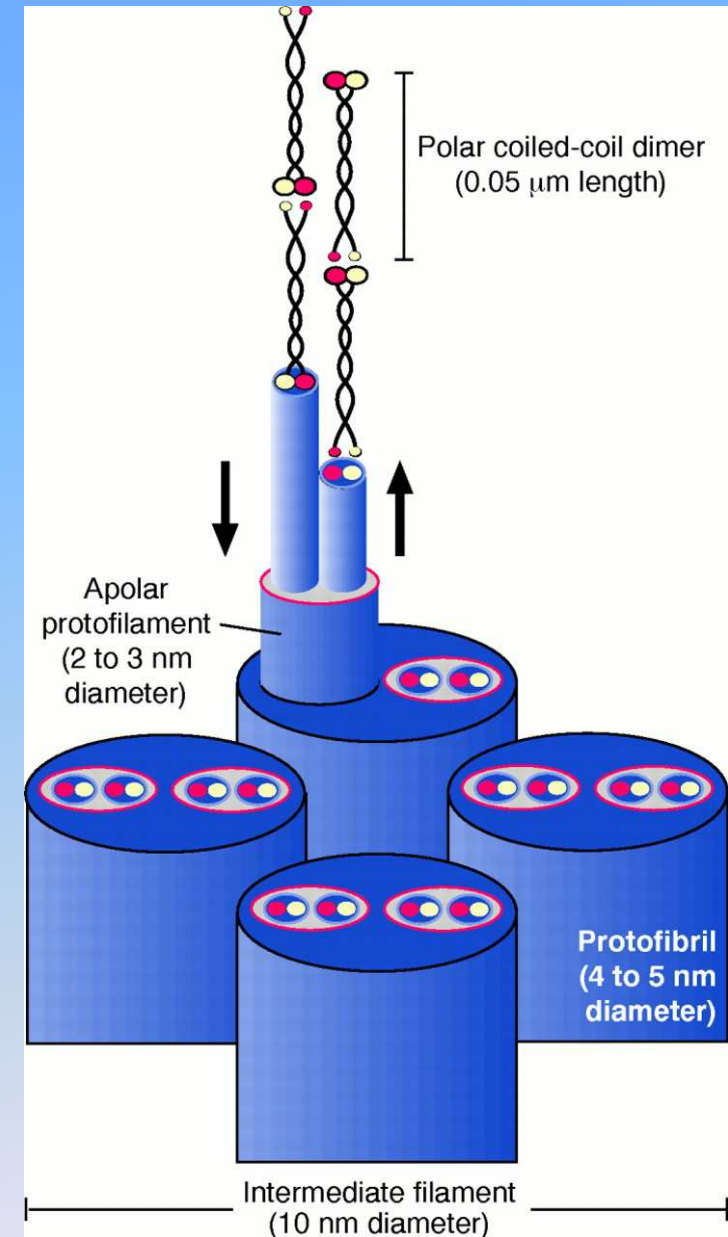
# Intermediární filamenta

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

**Keratin** v epiteliálních buňkách - obarven červeně



Vimentin



# 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

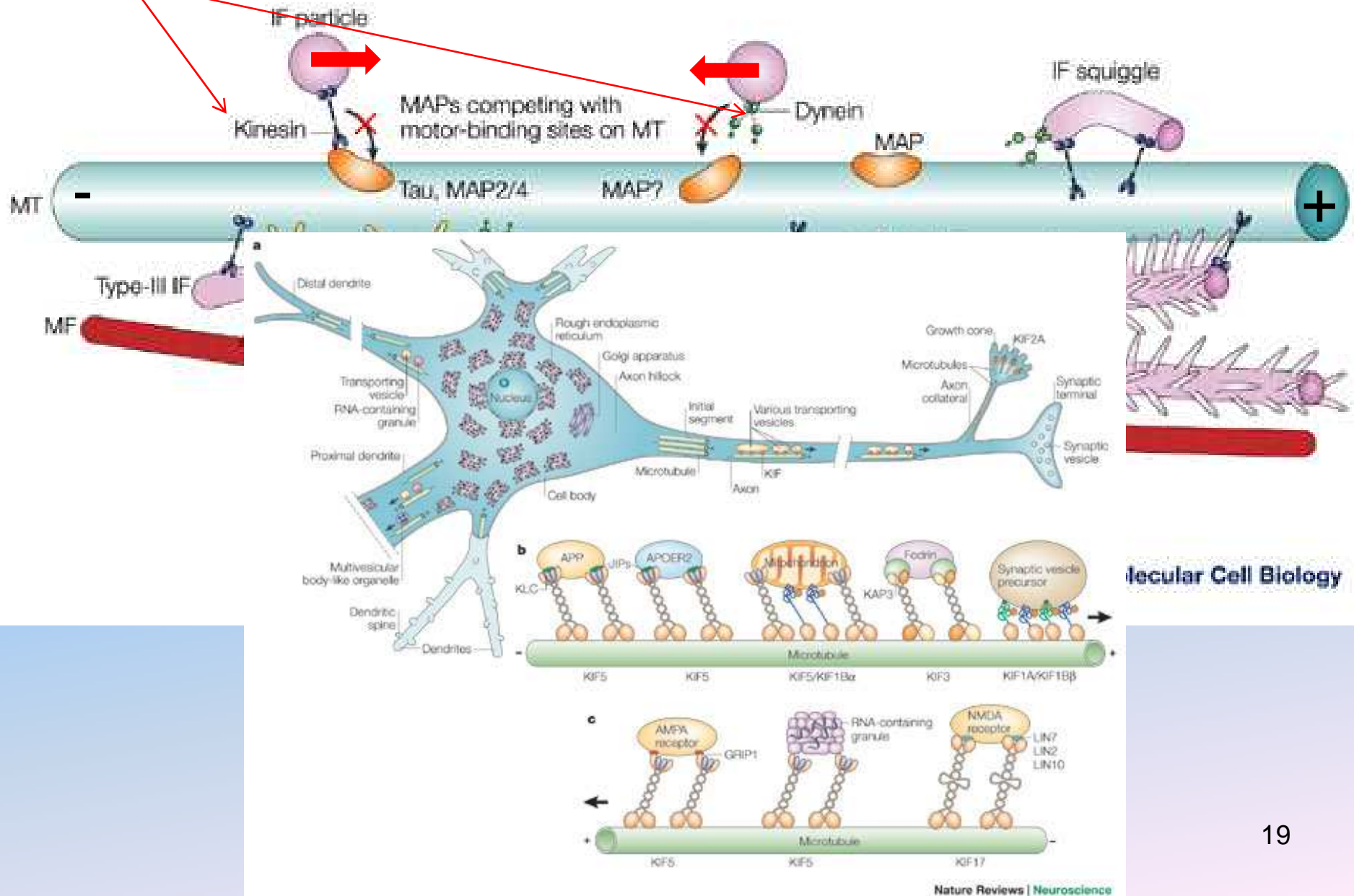
II. Protein-interakce s ligandem

III. Protein-interakce s dalším proteinem nebo DNA

IV. Zásobní.

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

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



# 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

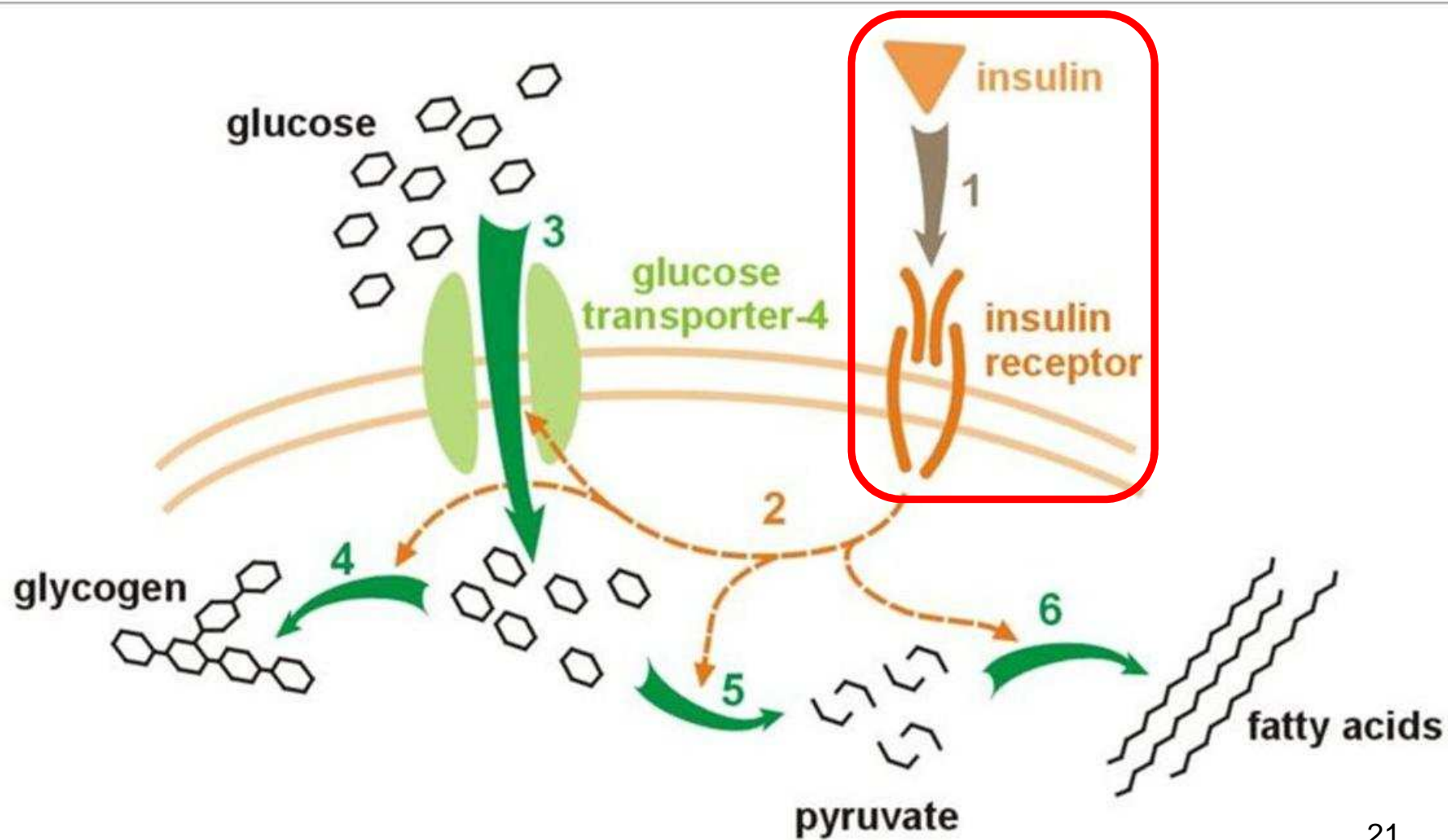
I. Enzymy

II. Protein-interakce s ligandem

III. Protein-interakce s dalším proteinem nebo DNA

IV. Zásobní

## Hormonální/hormony/regulace



# 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

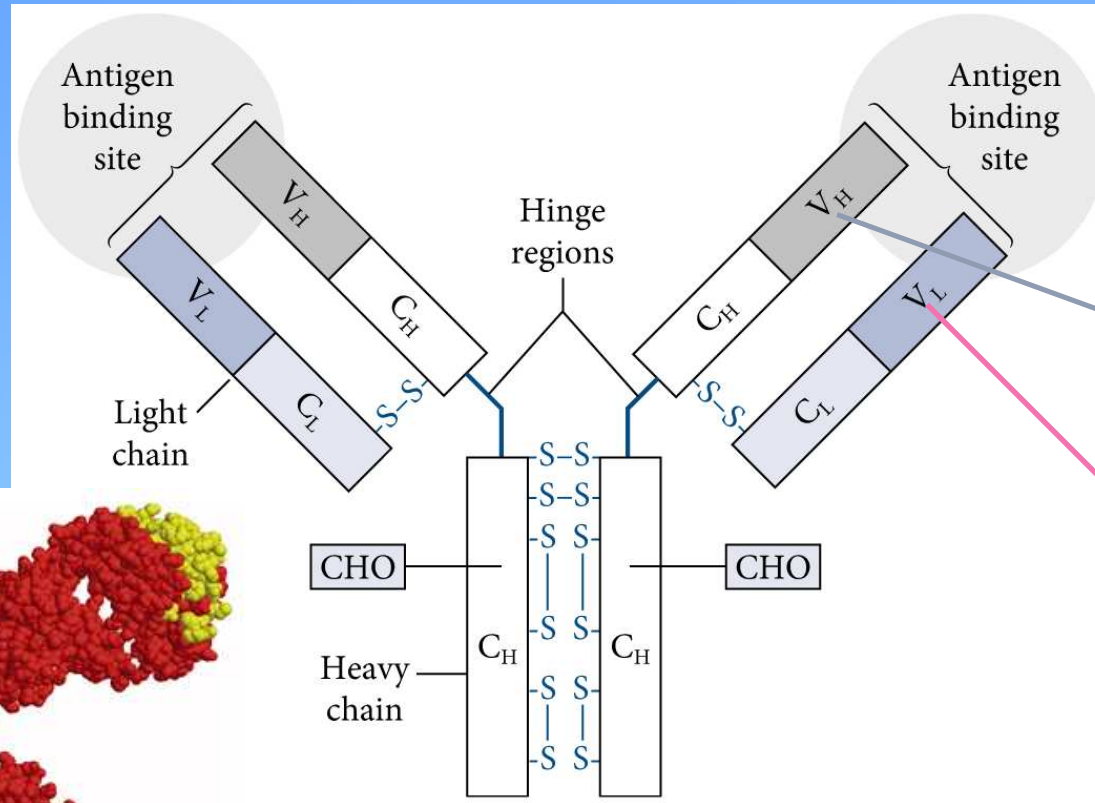
II. Protein-interakce s ligandem

III. Protein-interakce s dalším proteinem nebo DNA

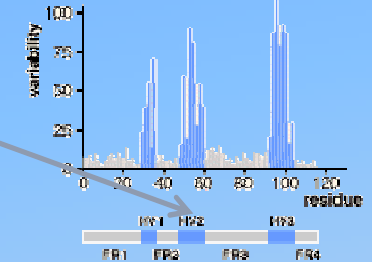
IV. Zásobní .



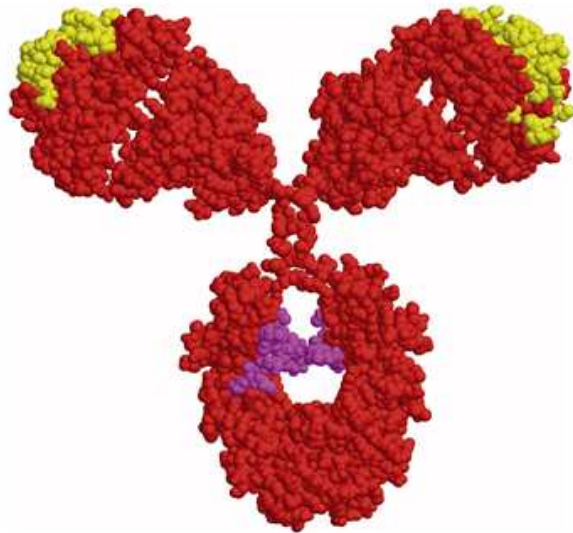
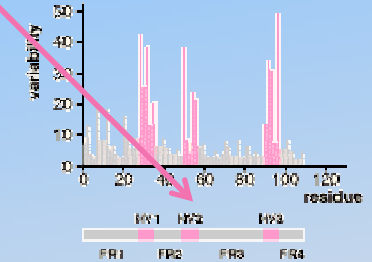
# Struktura protilátek



Heavy-chain V region



Light-chain V region



Protilátky hrají klíčovou roli v adaptivní imunní odpovědi obratlovců při rozpoznávání vazebného antigenu, přítomného na povrchu virů, bakterií a jiných infekčních agens.

# Funkce proteinů

- I. —● 1. Enzymatická/enzymy/katalýza
- II. —● 2. Receptorová/signalizace/
- III. —● 3. Převážná/transportní/vazba-transport
- 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

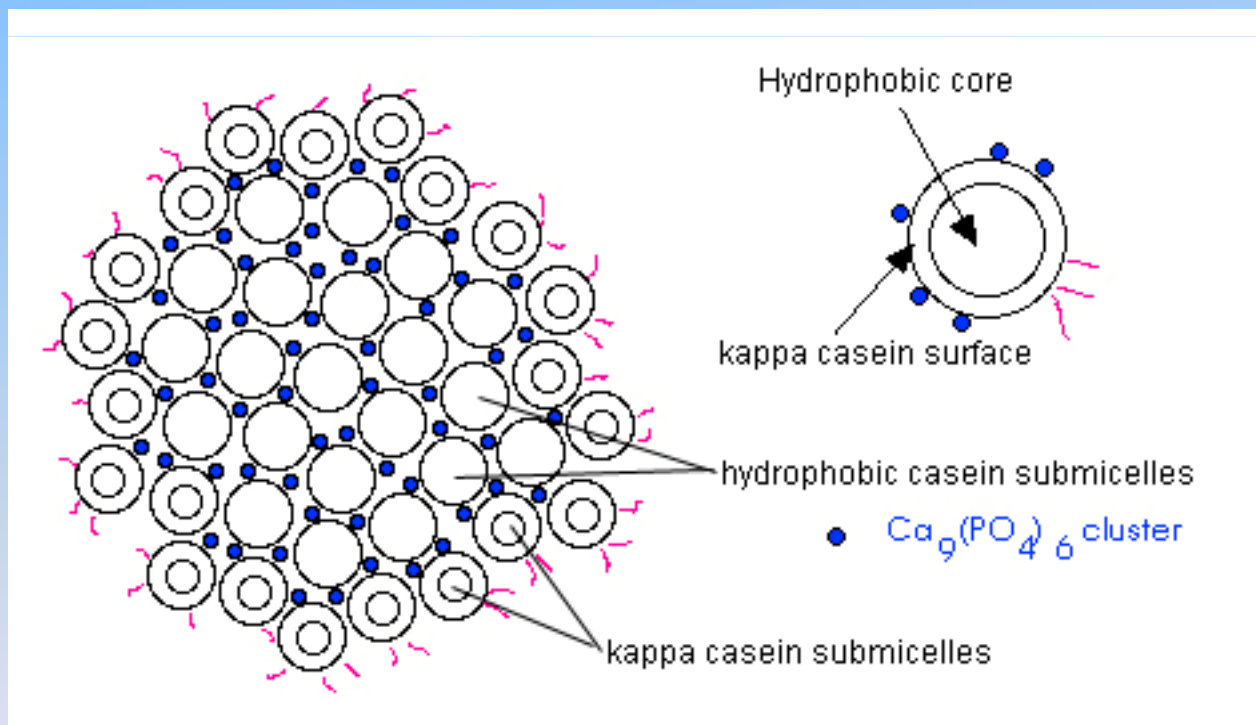
III. Protein-interakce s dalším proteinem nebo DNA

IV. Zásobní – (zdroj energie, uhlíku nebo dusíku vzácněji).



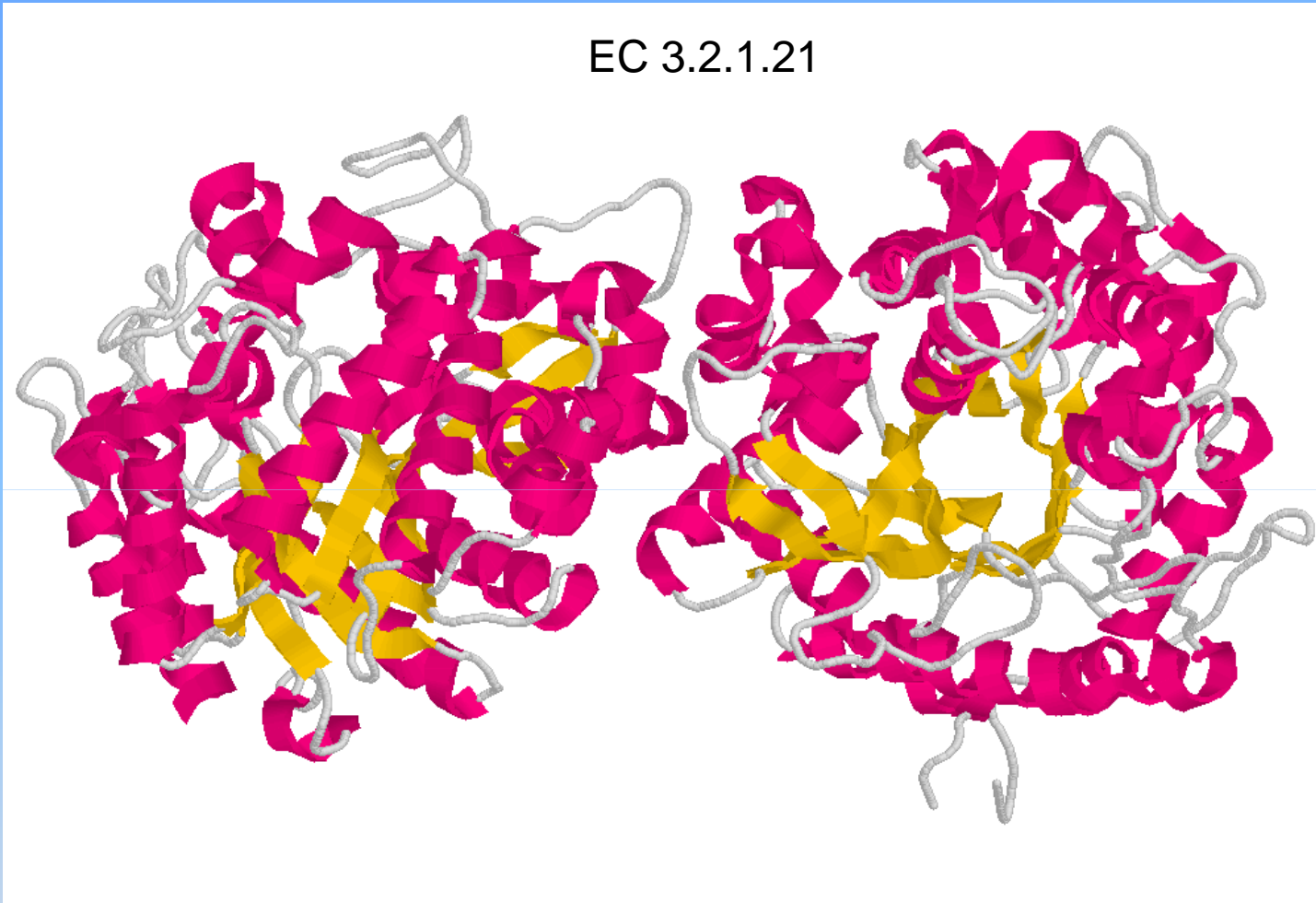
# Kasein – funkce zásobní

- 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.

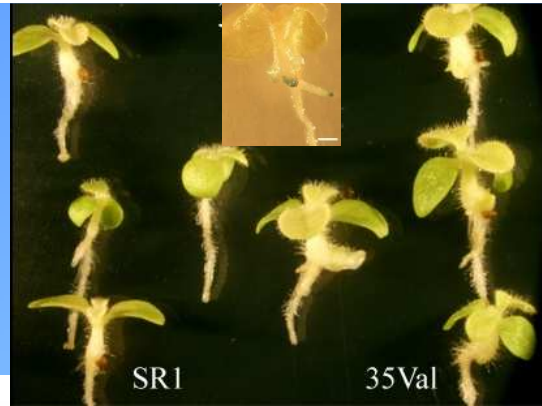
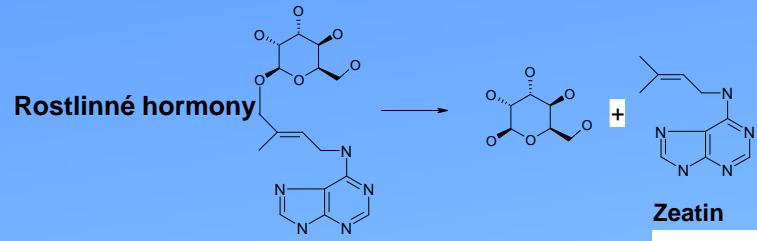


# $\beta$ -glukosidáza Zm-p60.1

EC 3.2.1.21



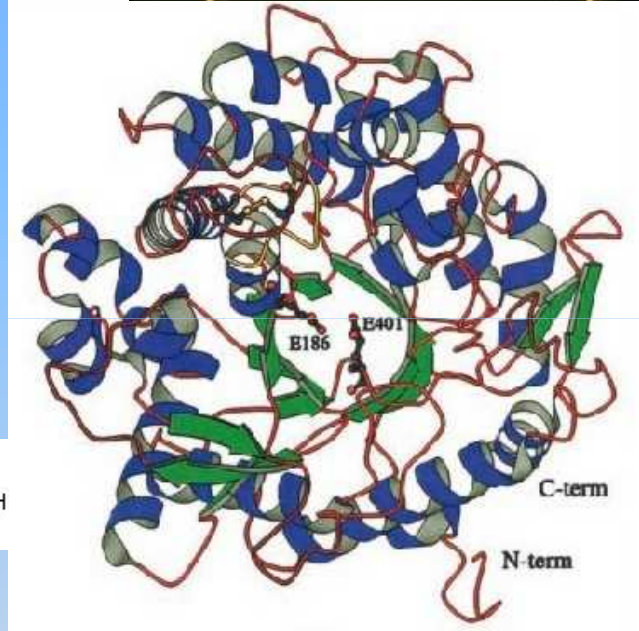
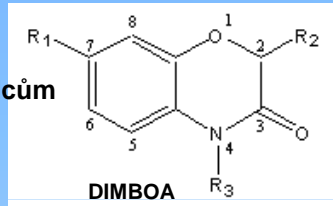
# Cytokininy



# Obranné látky

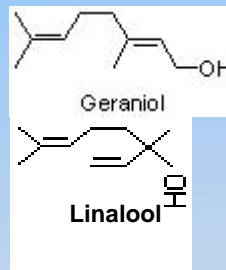
R1=OCH3; R2=R3= OH

S účinkem proti škůdcům



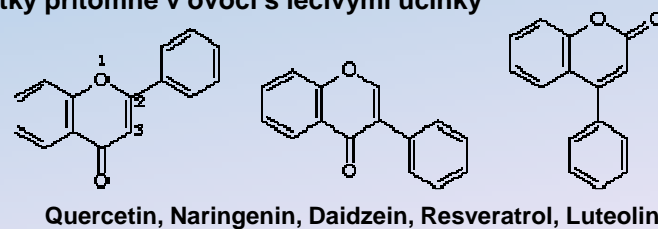
# Terpeny

Látky tvořící aroma vína a ovocných extraktů



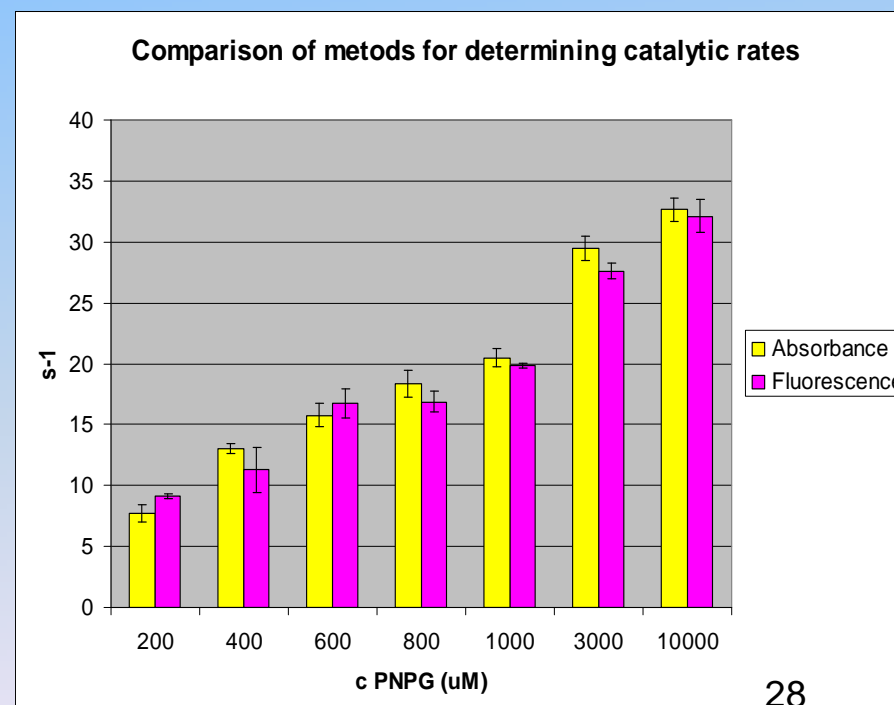
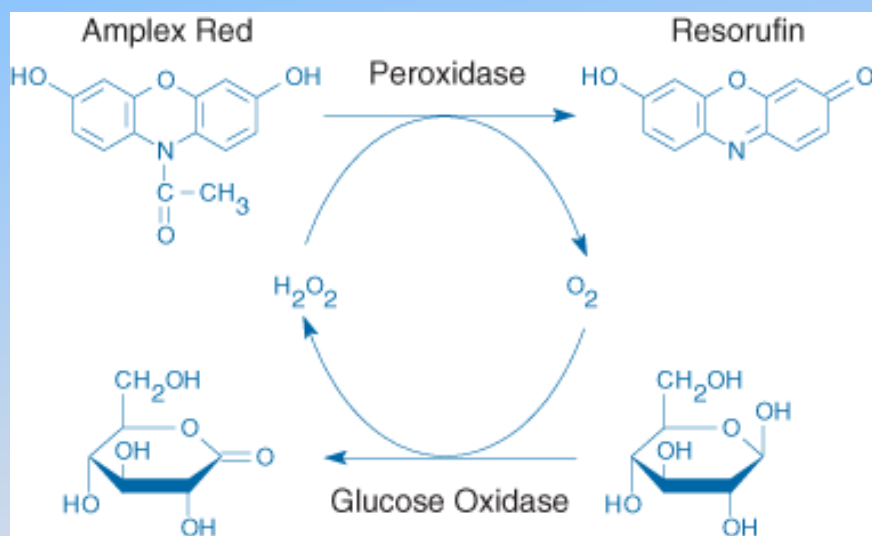
# Flavonoidy

Látky přítomné v ovoci s léčivými účinky

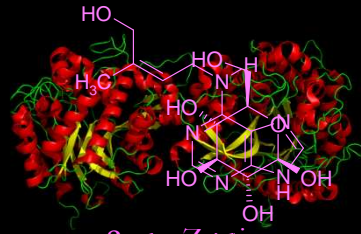


# Nová metoda pro studium kinetických parametrů vzácných glukozidů

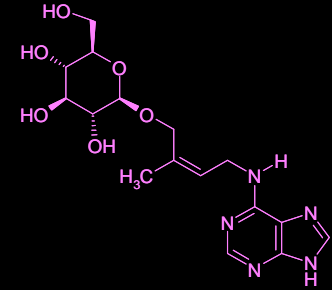
Velmi rychlá procedura  
(doba měření 3s)  
Citlivost 100 nM glukóza  
Malá spotřeba vzorku  
(reakční objem 150  $\mu\text{L}$ )



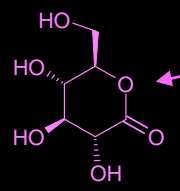
28



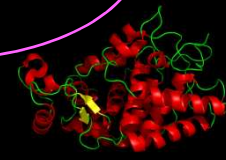
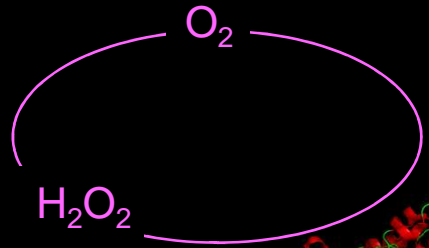
$\beta$ -glucosidase  
Glucose



Zeatin-O-glucoside



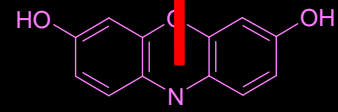
glucoseoxidase



peroxidase

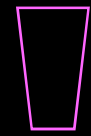


Amplex Ultra Red

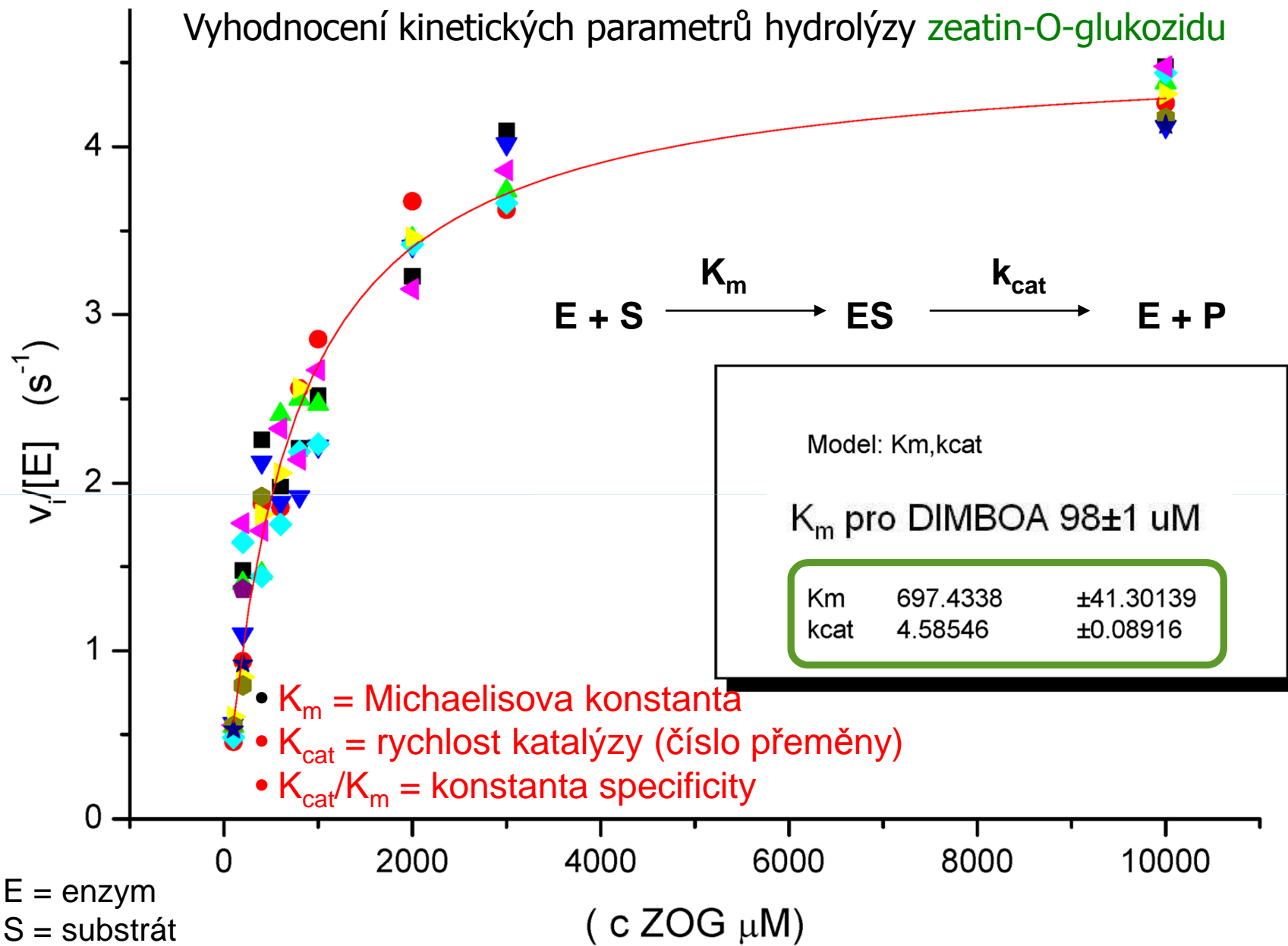


Resorufin

Fluorimeter



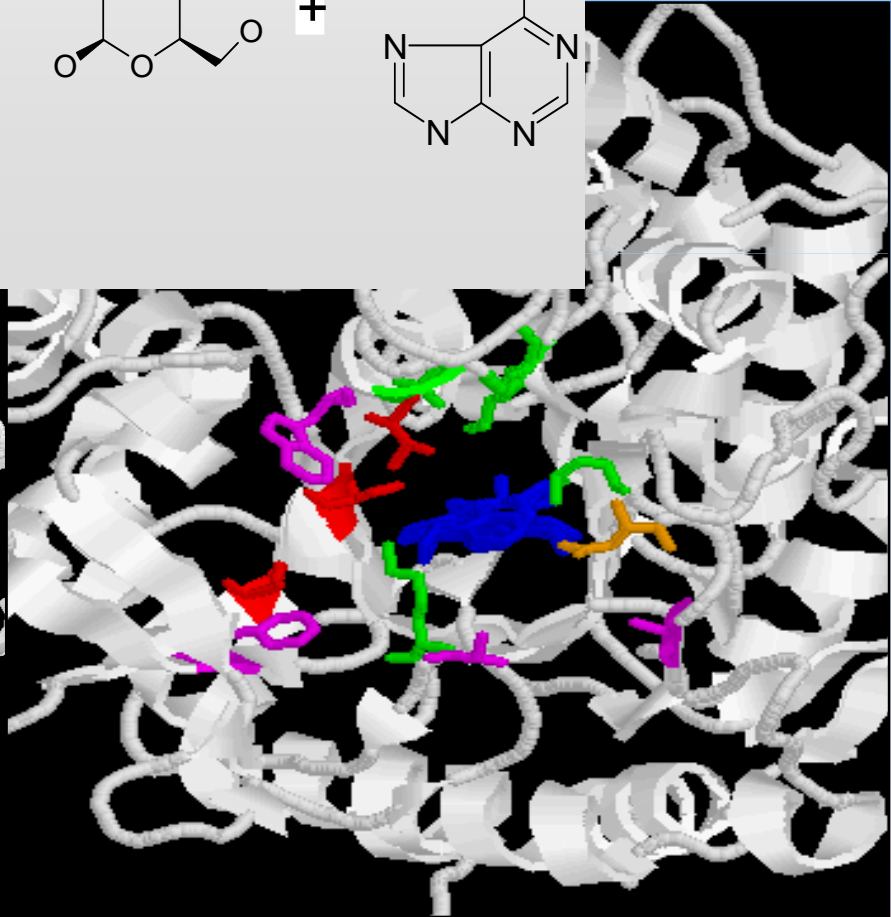
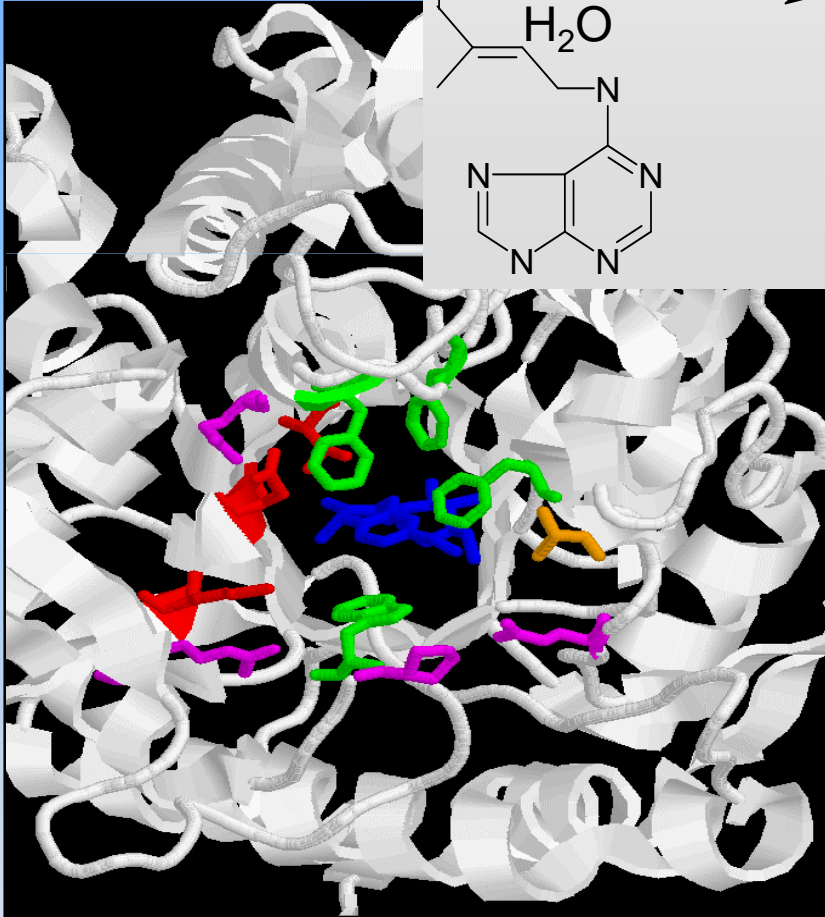
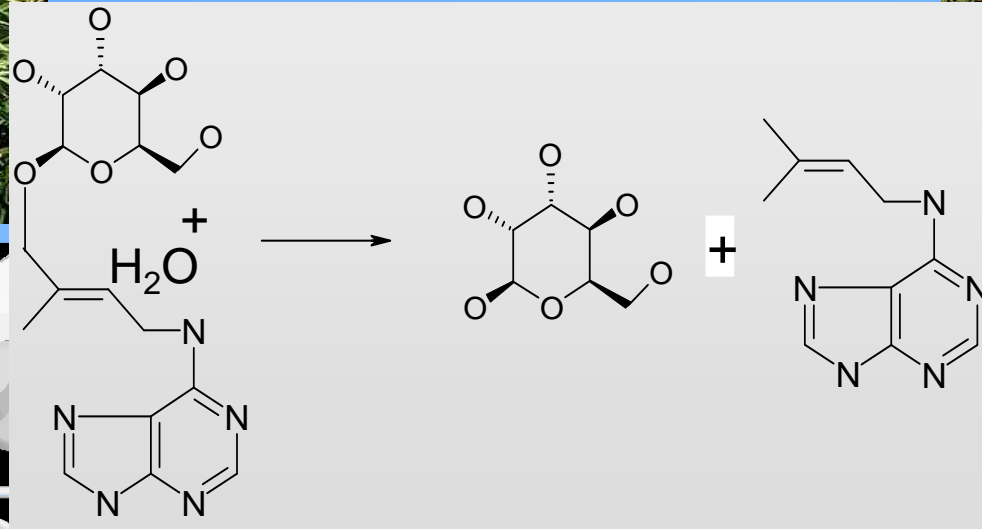
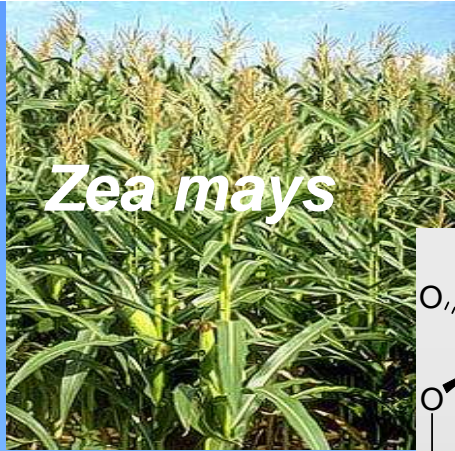
Vyhodnocení kinetických parametrů hydrolýzy zeatin-O-glukozidu



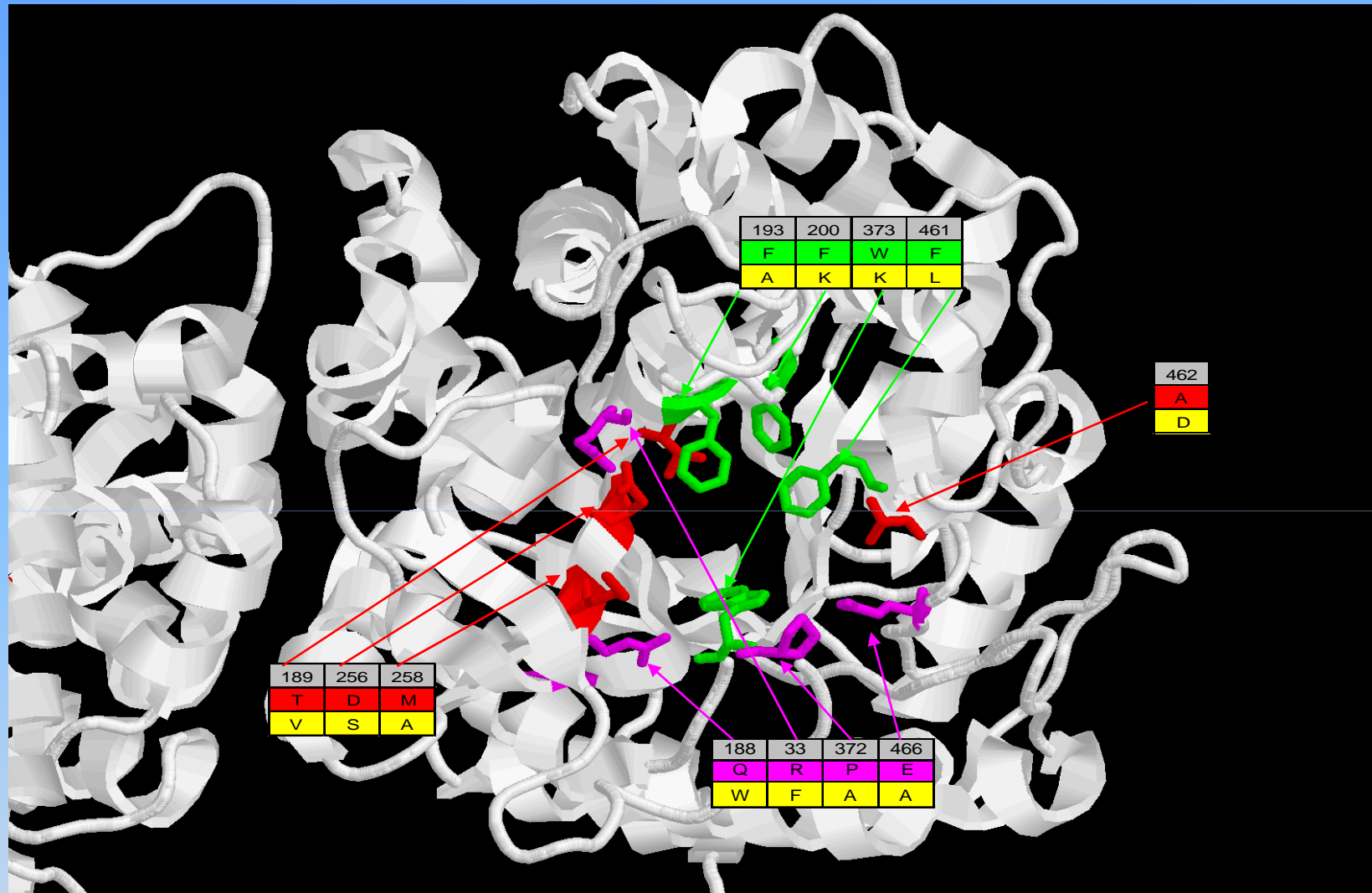
- $K_m$  = Michaelisova konstanta
- $K_{cat}$  = rychlost katalýzy (číslo přeměny)
- $K_{cat}/K_m$  = konstanta specificity

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)**

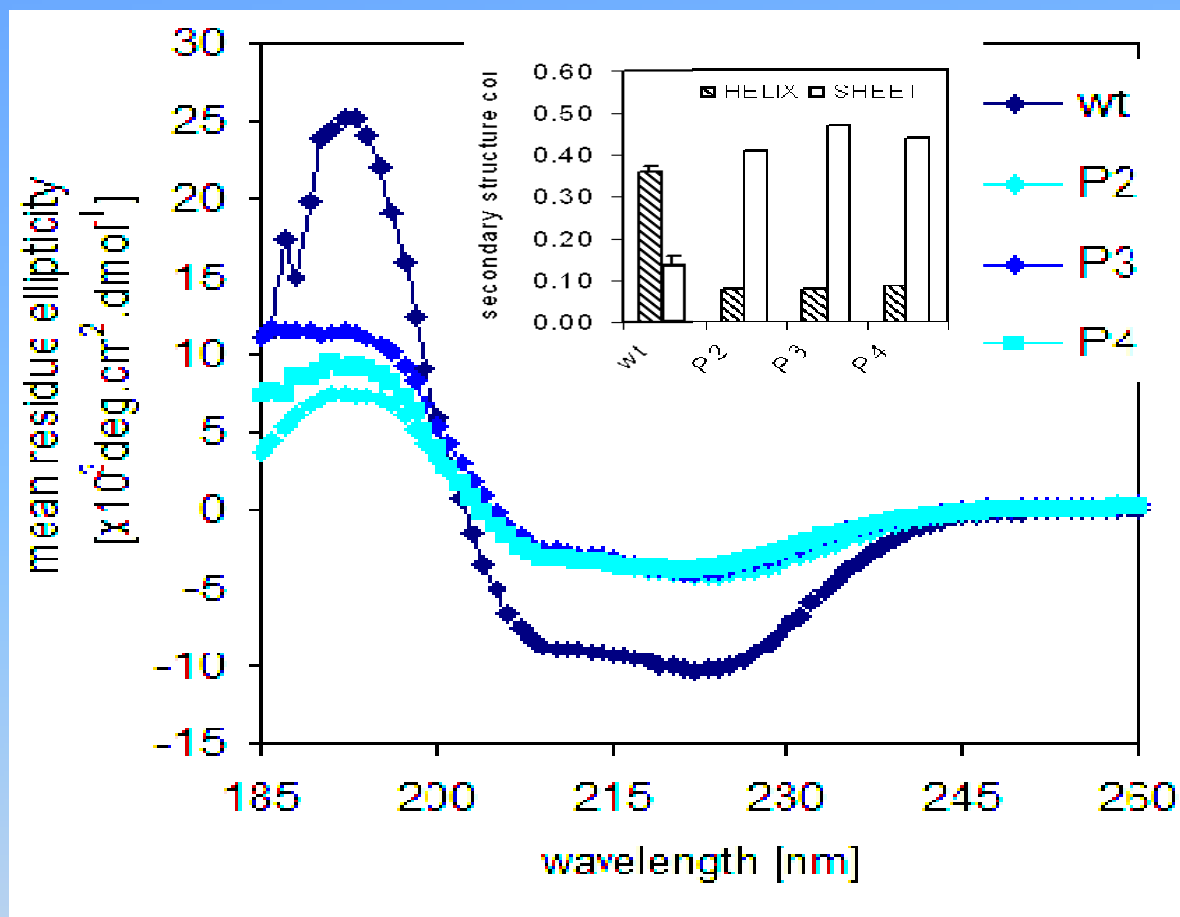
**P4 (F193A, F200K, W373K, F461L, T189V, D256S, M258A, A462D, Q188W, R331F, P372A, E466A )**

**F193A, F200K, W373K, F461L**

32



# Vícenásobná mutantní analýza enzymu



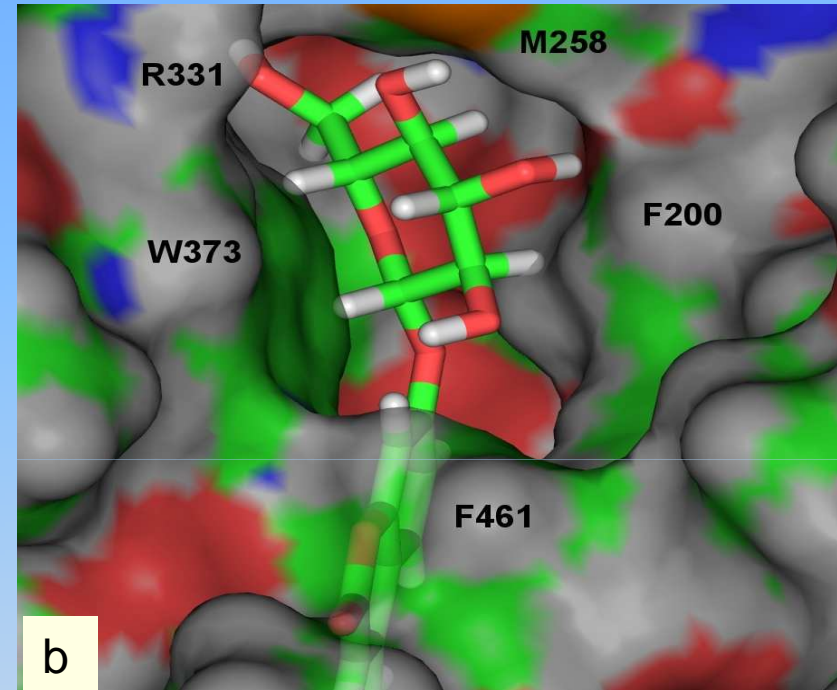
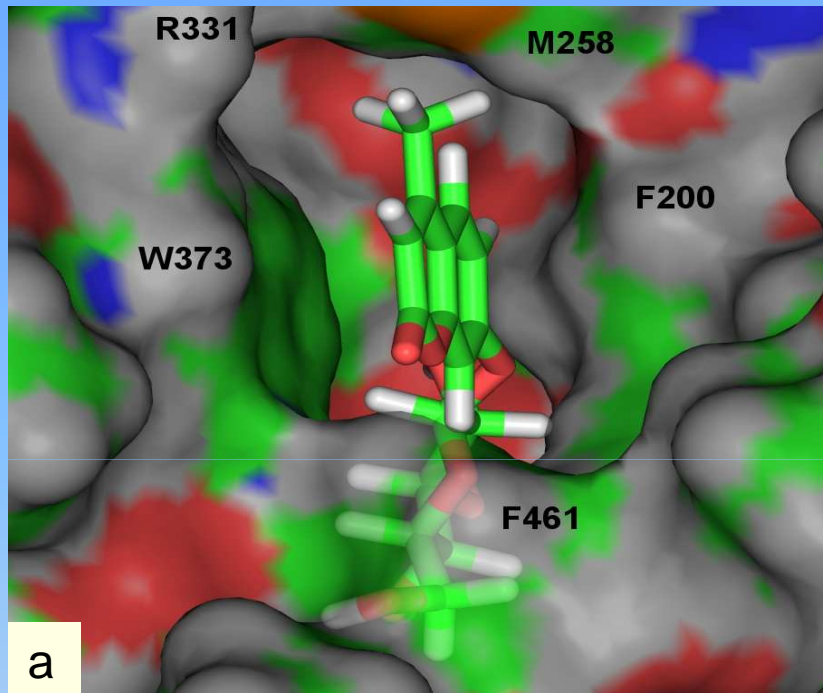
**Vzdálená-UV spektra cirkulárního dichroismu divokého typu a jeho mutant P2, P3 and P4.**

**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 )<sup>33</sup>**

# Molekulární modelování enzym-substrát komplexu



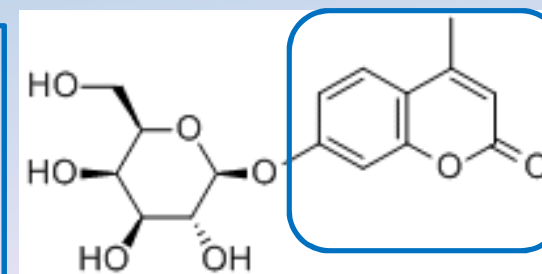
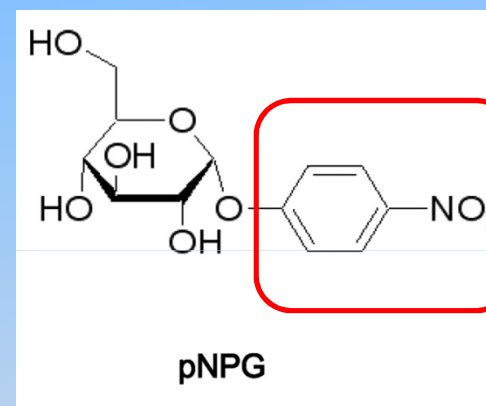
Pohled do aktivního místa mutantu F193A (a) s **produktivní** a (b) **ne-produktivní** vazbou substrátu (v tomto případě se jedná o MUG).

# Kinetické parametry původní $\beta$ -glukosidázy a jejích mutantů

Enzyme	<i>pNPGlc</i>			relative efficiency	
	$K_m$	$k_{cat}$	$k_{cat}/K_m$		
WT	$0.68 \pm 0.03$	$42.80 \pm 0.56$	63.0	100.0	This work
F200K	$3.50 \pm 0.22$	$2.43 \pm 0.05$	0.7	1.1	This work
W373K	$2.10 \pm 0.21$	$0.63 \pm 0.02$	0.3	0.5	This work
F461L	$0.65 \pm 0.05$	$49.27 \pm 1.15$	75.8	120.3	This work
F193A	$0.045 \pm 0.0035$	$0.22 \pm 0.003$	4.9	7.8	This work
F193V	0	0	0	0	Verdoucq et al. 2003
F193I	$1.76 \pm 0.06$	0.84	0.48	1	Zouhar et al. 2001
F193Y	$1.29 \pm 0.01$	17.3	13.6	21.5	Zouhar et al. 2001
F193W	$1.61 \pm 0.17$	31	19.5	30.9	Zouhar et al. 2001

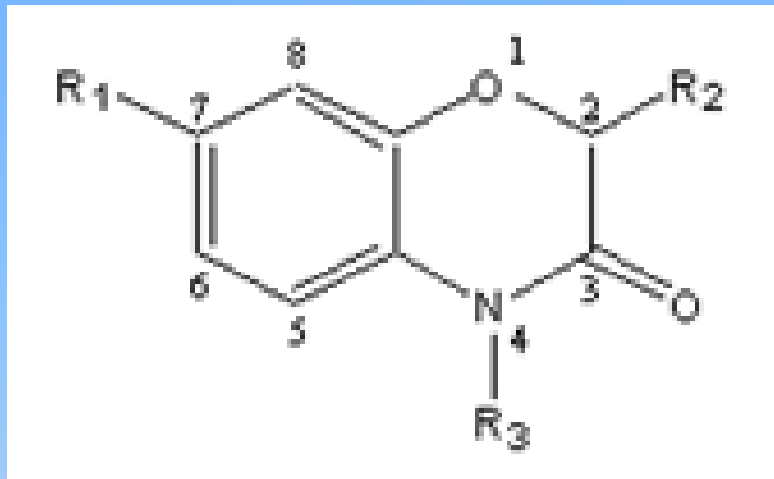
Enzyme	<i>MUG</i>			relative efficiency	
	$K_m$	$k_{cat}$	$k_{cat}/K_m$		
WT	$0.148 \pm 0.013$	$53.60 \pm 1.09$	362.16	100.000	This work
F200K	$1.510 \pm 0.101$	$1.87 \pm 0.05$	1.24	0.342	This work
W373K	$1.736 \pm 0.125$	$0.22 \pm 0.01$	0.127	0.035	This work
F461L	$0.164 \pm 0.019$	$70.88 \pm 2.16$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

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



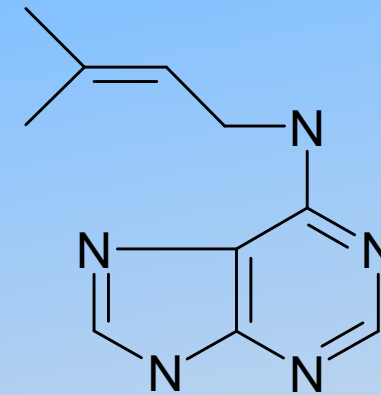
**MUG**

# DIMBOA



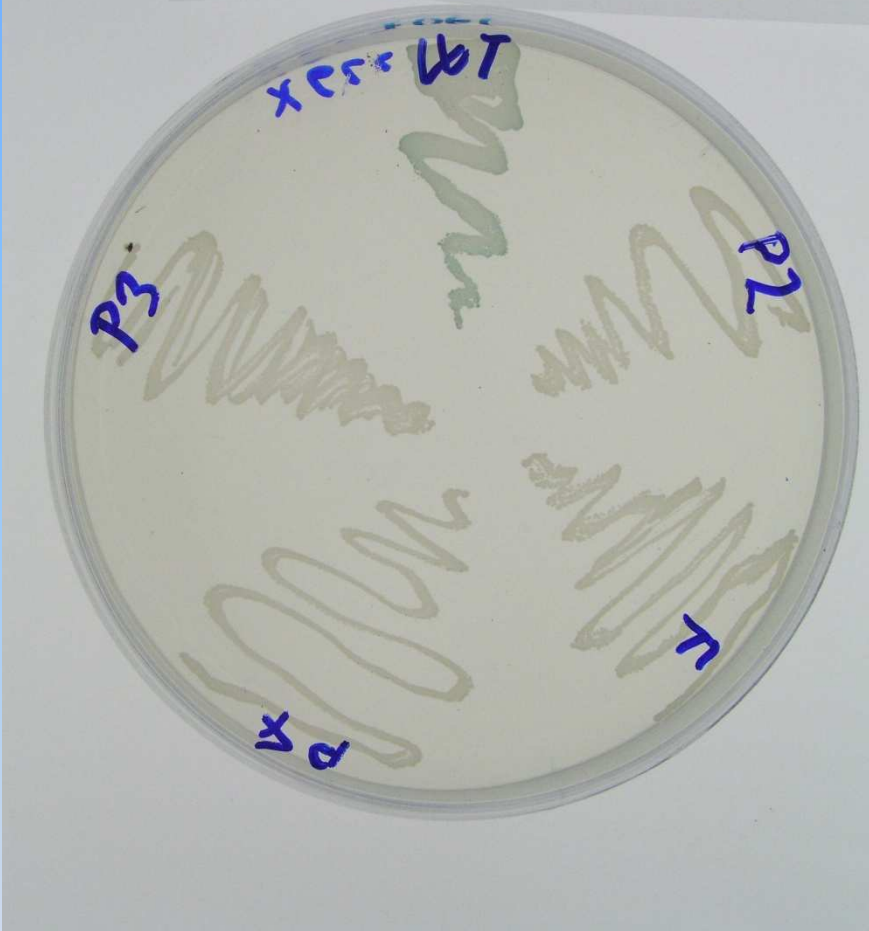
?

# Cytokinin



*E. coli* neindukované

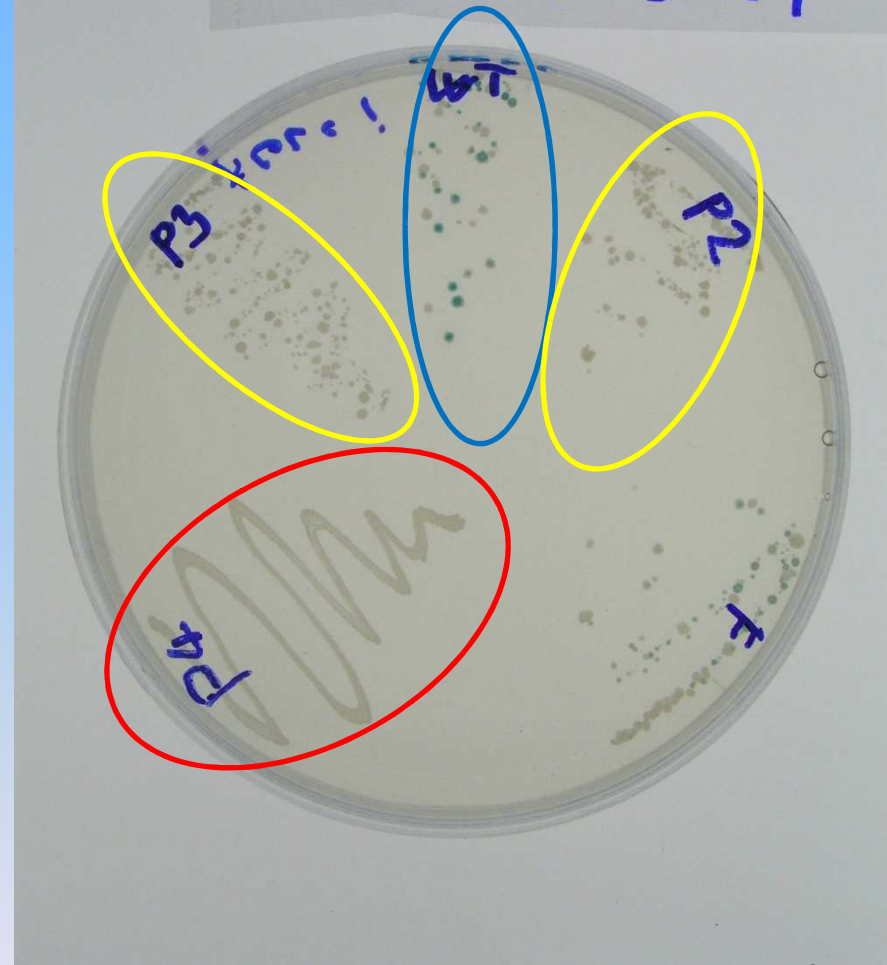
X-GLC



-

*E. coli* indukované

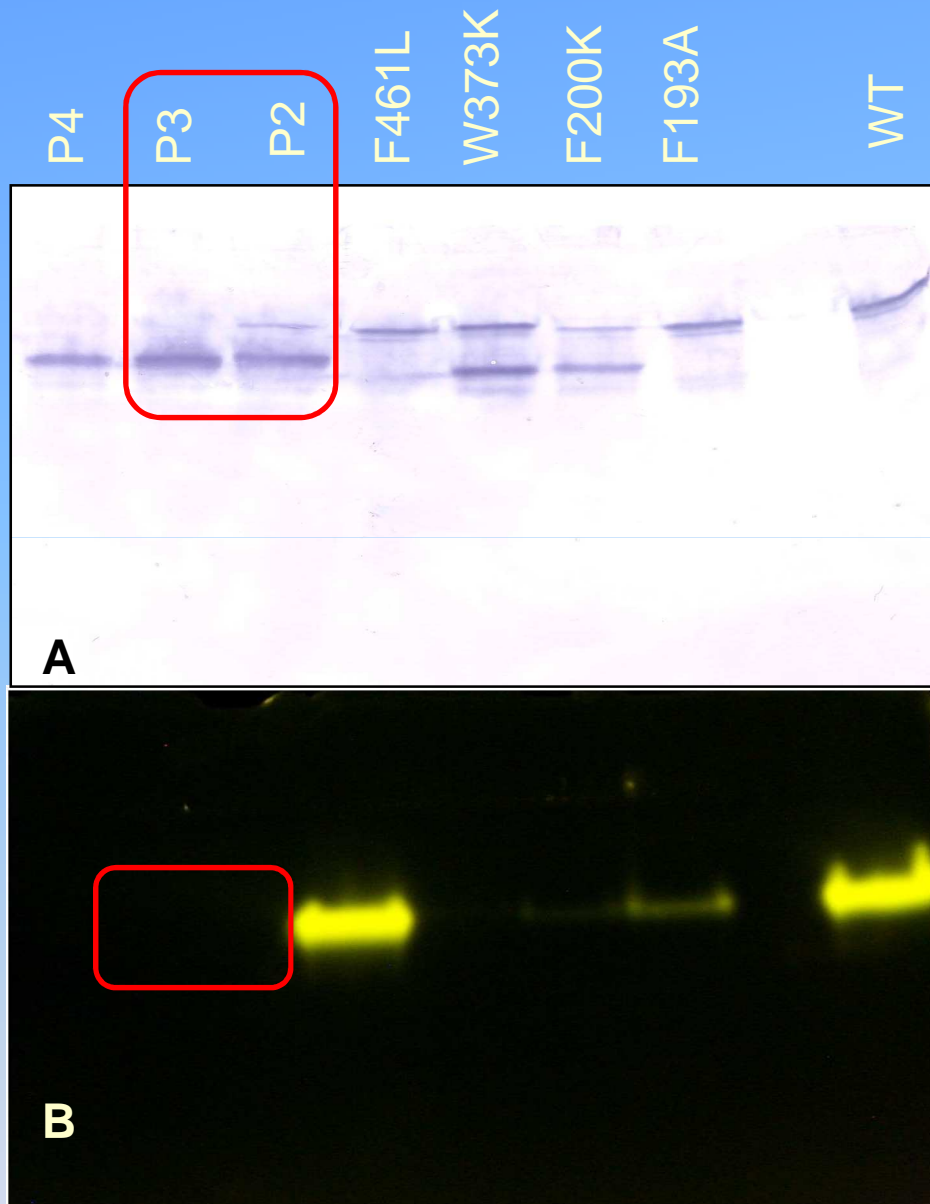
X-GLC i



IPTG 100uM

37

# Detekce aktivity enzymu na gelu



← Dimer – modifikace?

← Monomer – nemodifikovaný?

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

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

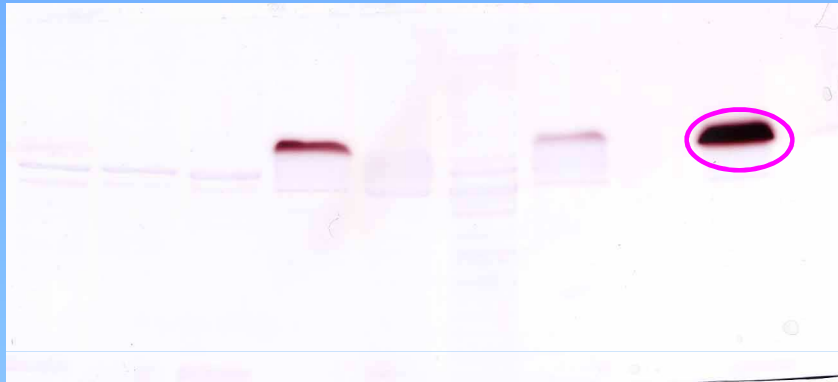
Druhý gel (**B**) byl barven pomocí fluorogenního substrátu **4-methylumbelliferyl- $\beta$ -D-glukosidu**.

# Je to dimer?????

## Stanovení aktivity enzymu na gelu

Dimerová forma	120 kDa
Monomerní forma	60 kDa

10% SDS PAGE

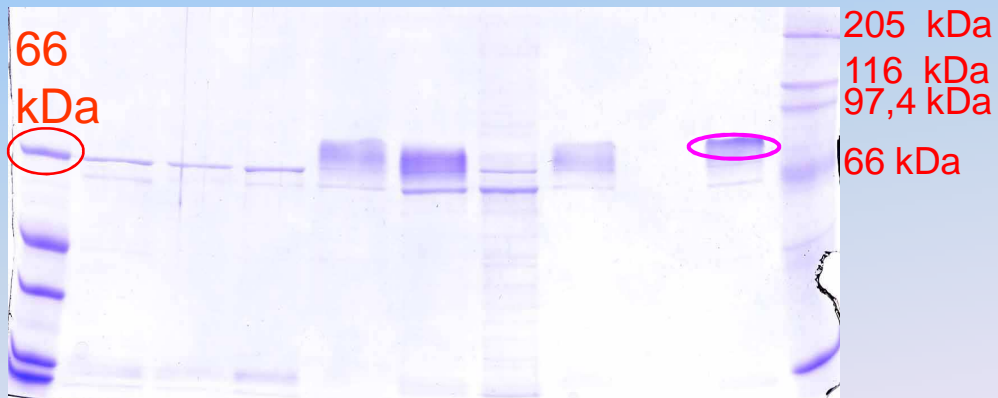


10% NATIVE PAGE



Native western blot

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

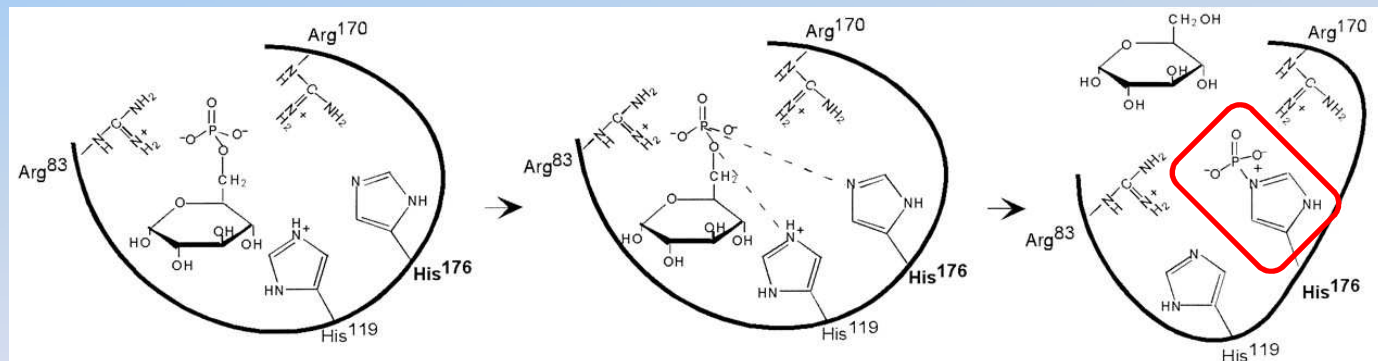
Ar thal hydr.O-glycosyl comp.

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	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

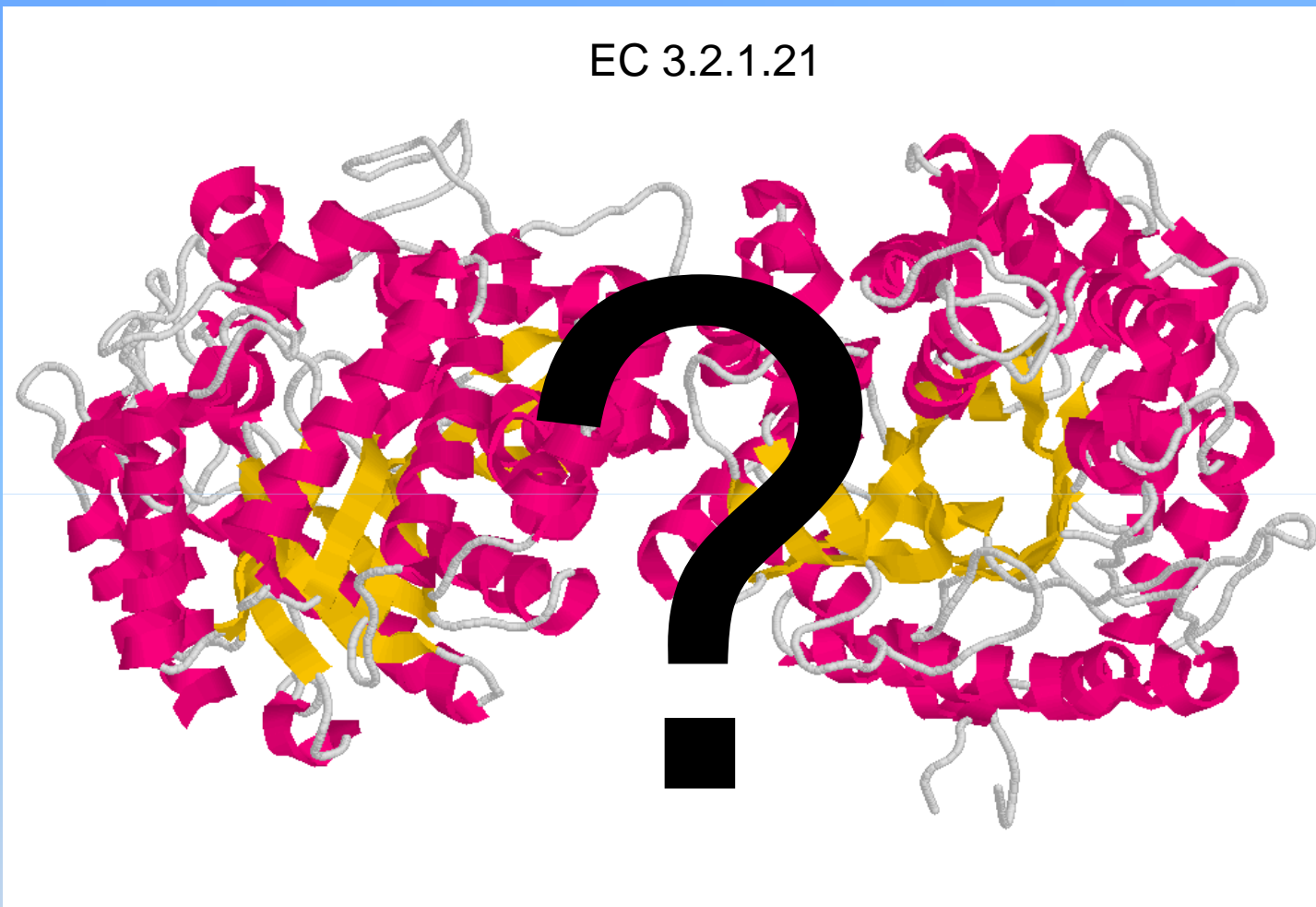


Ghosh, A. et al. J. Biol. Chem. 2002;277:32837-32842



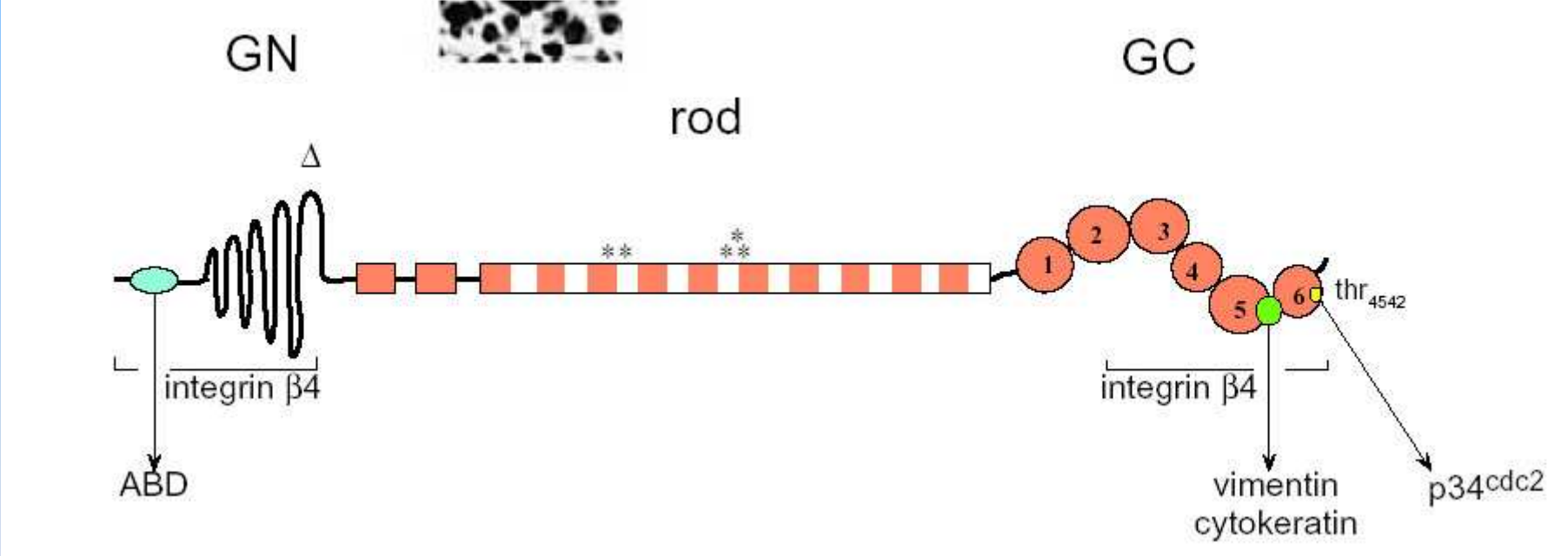
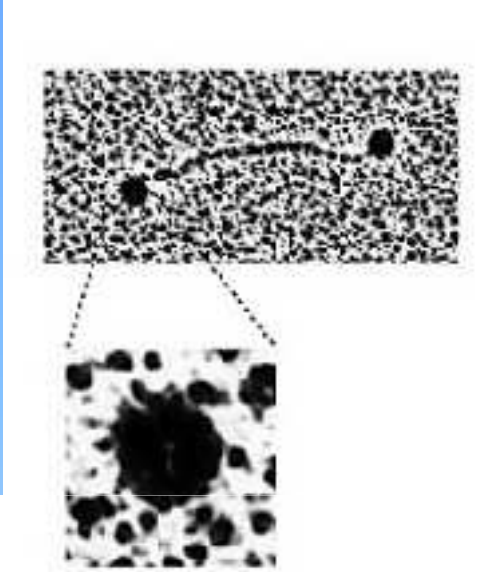
# $\beta$ -glukosidáza Zm-p60.1

EC 3.2.1.21

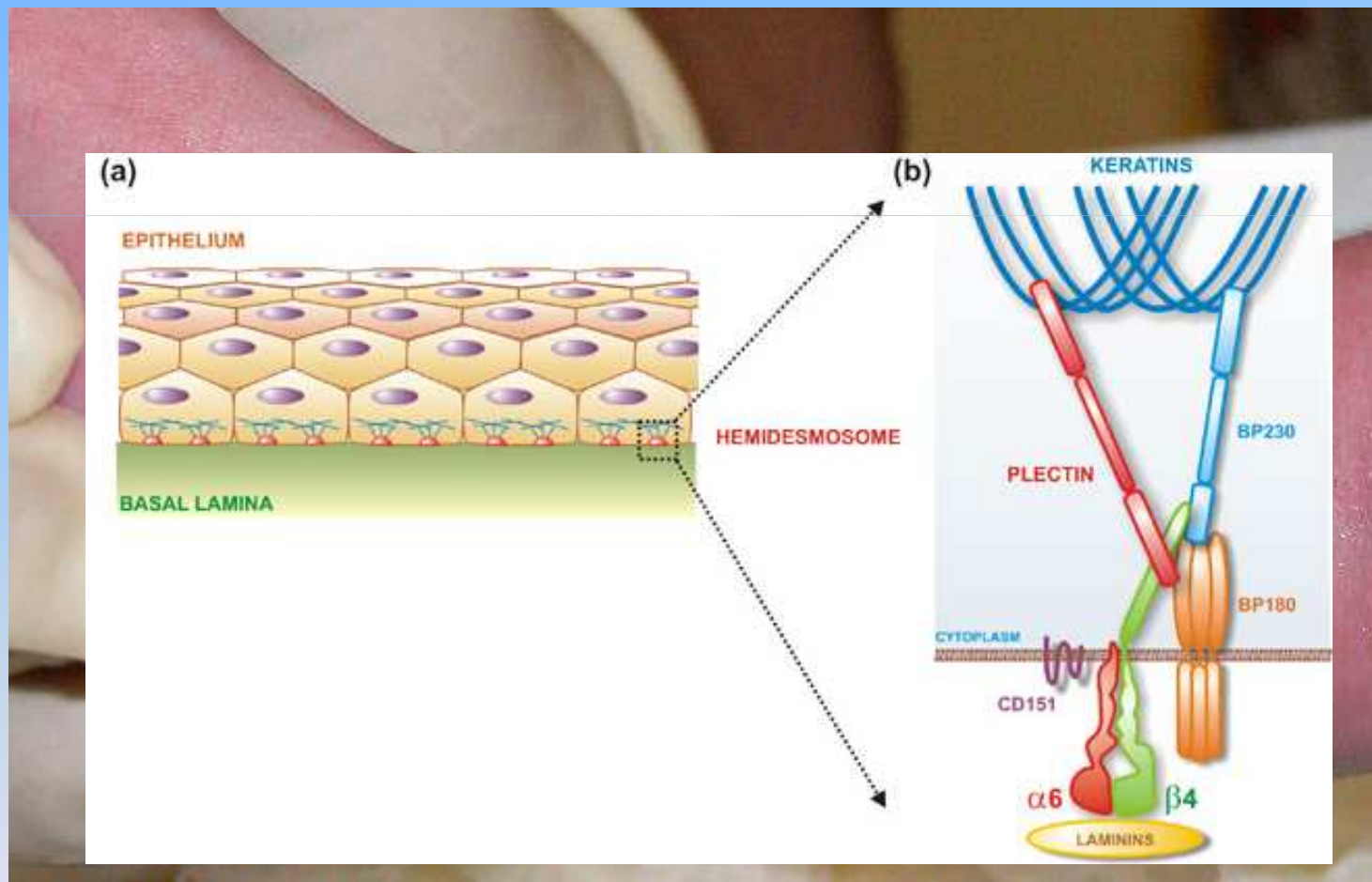


EC 3.1.3.?

# Plectin

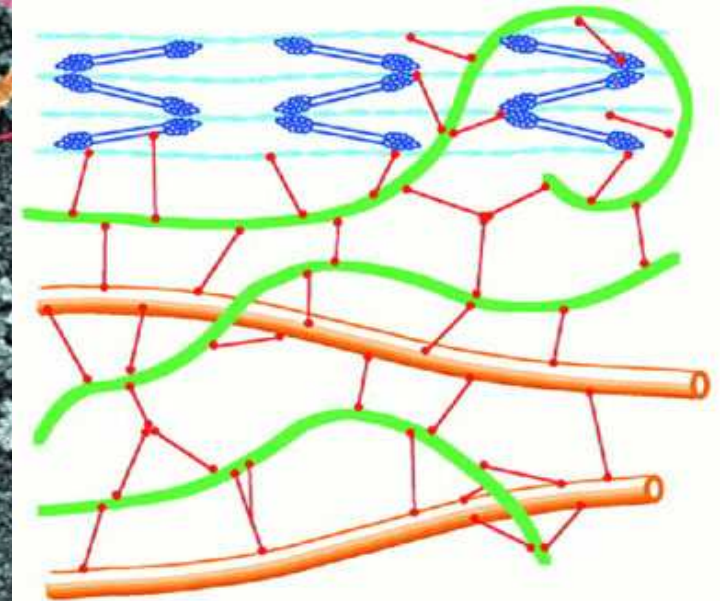
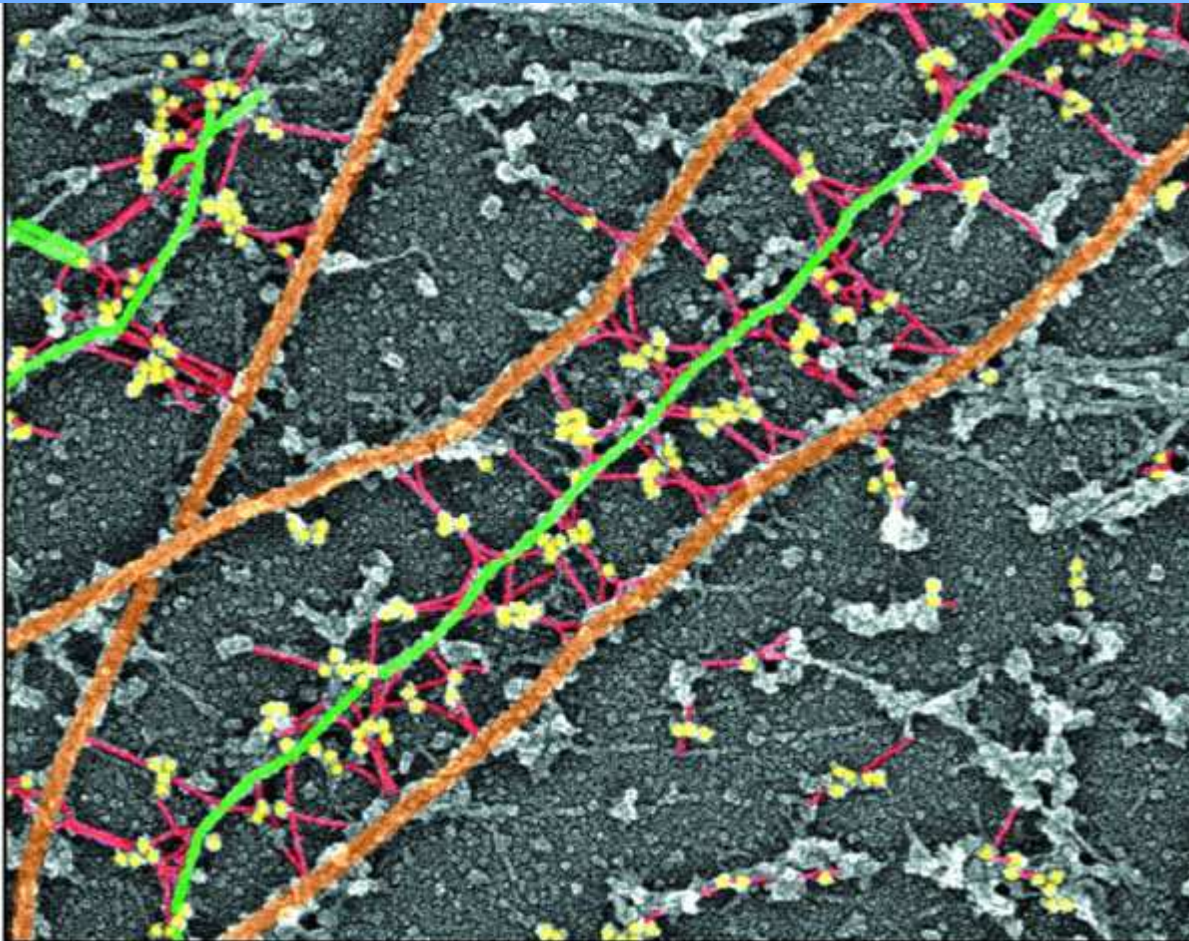


# Deficience Plektinu způsobuje geneticky vázanou nemoc Epidermolysis bullosa





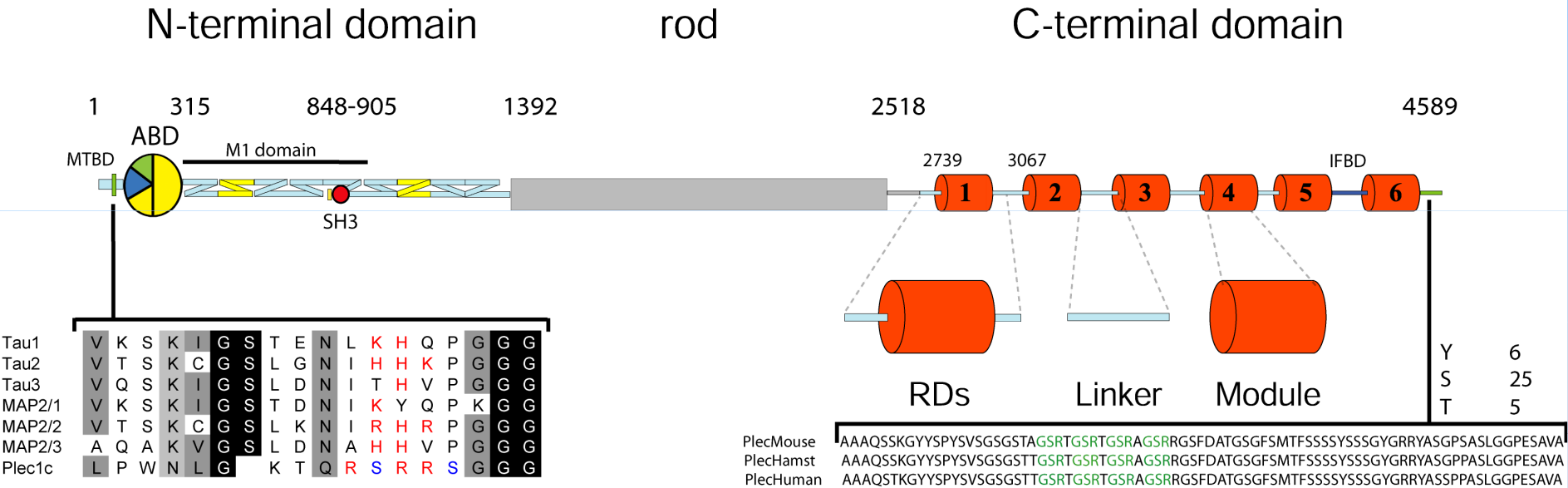
# Cytoskeleton



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

# Analýza Plakinové domény Plektinu.

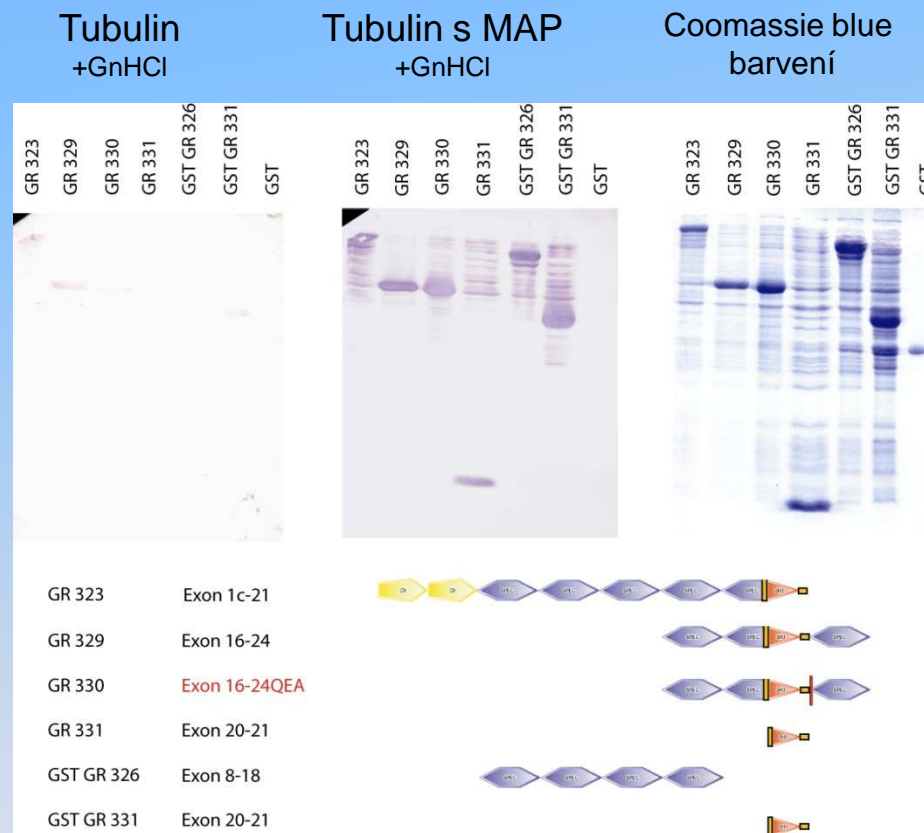
## Plectin



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

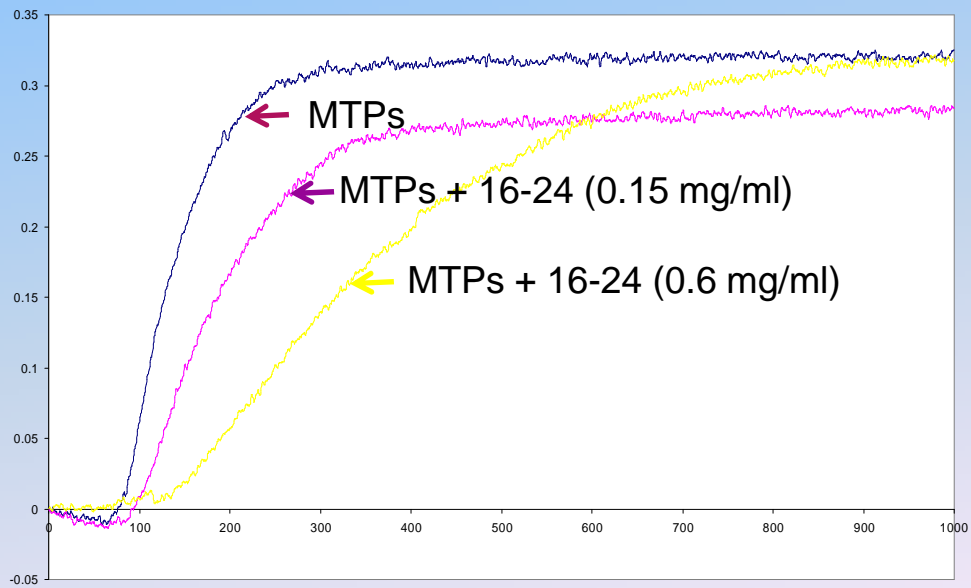
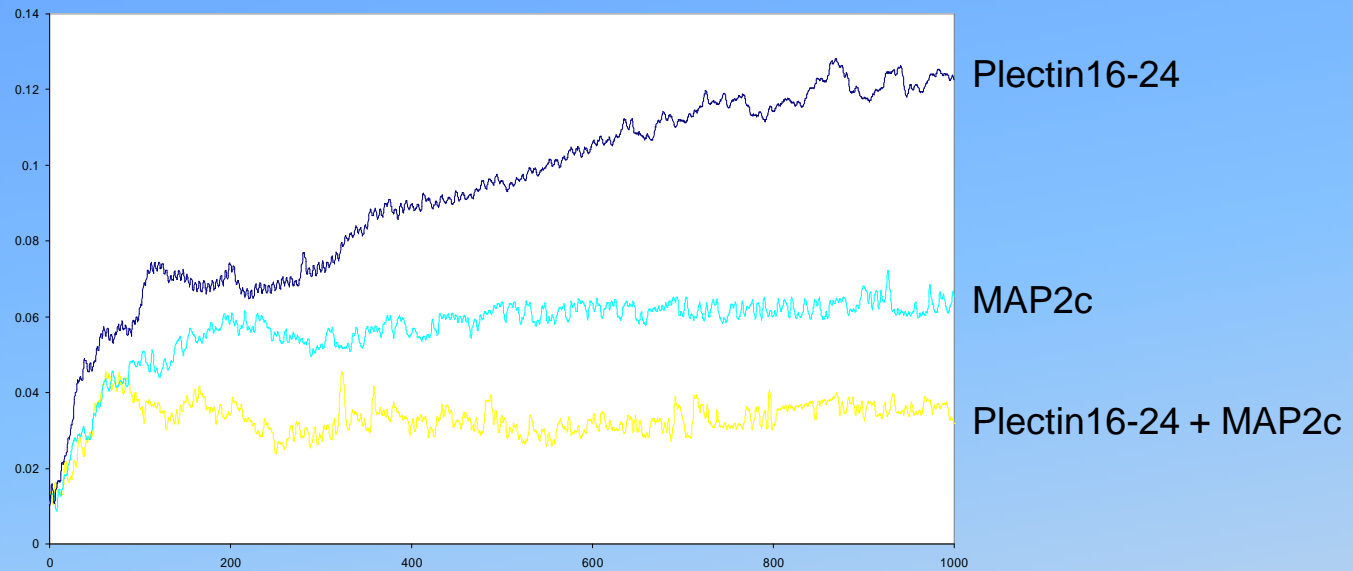
PlecMouse AAAQSSKGYSPYSVSGSGSTAGSRTGSRTGSRAAGSRRGSDATGSGFSMTFSSSSYSSSGYGRRYASGPSASLGGPESAVA  
 PlecHamst AAAQSSKGYSPYSVSGSGSTTGSRTGSRTGSRAAGSRRGSDATGSGFSMTFSSSSYSSSGYGRRYASGPPASLGGPESAVA  
 PlecHuman AAAQSTKGYSPYSVSGSGSTTGSRTGSRTGSRAAGSRRGSDATGSGFSMTFSSSSYSSSGYGRRYASPPASLGGPESAVA

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

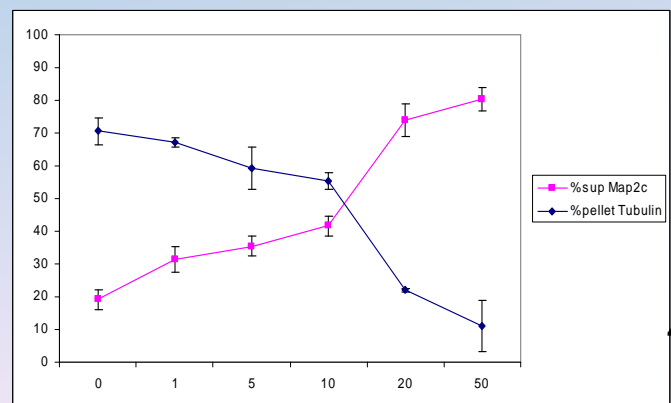
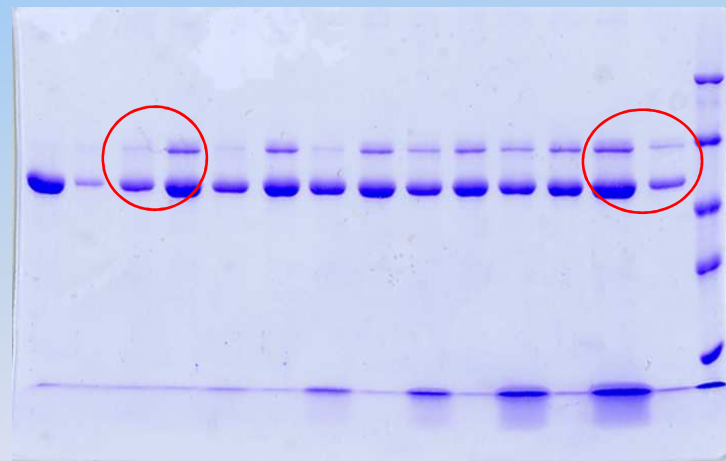
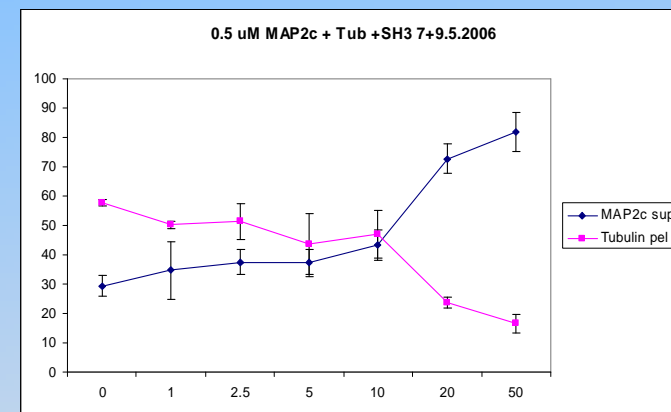
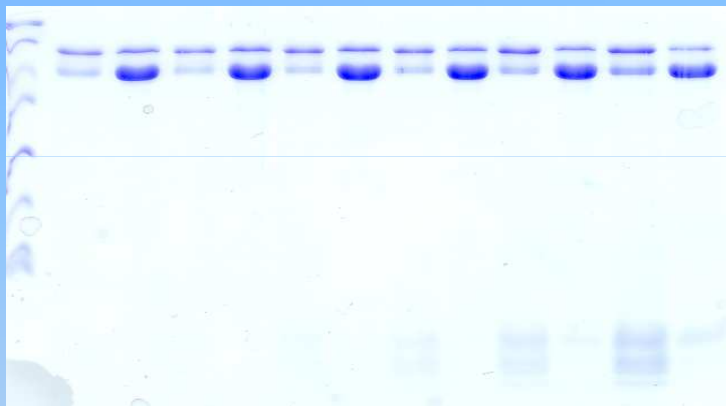
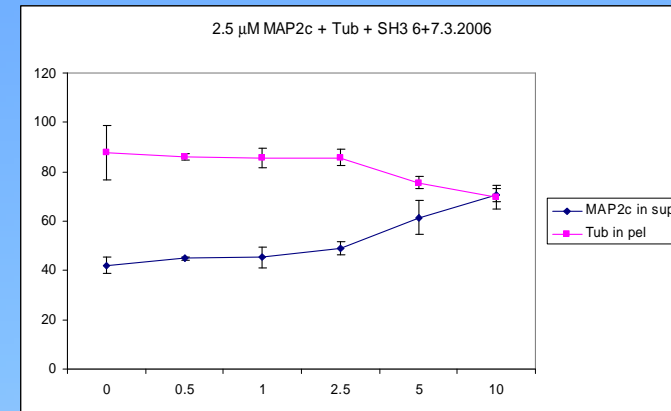
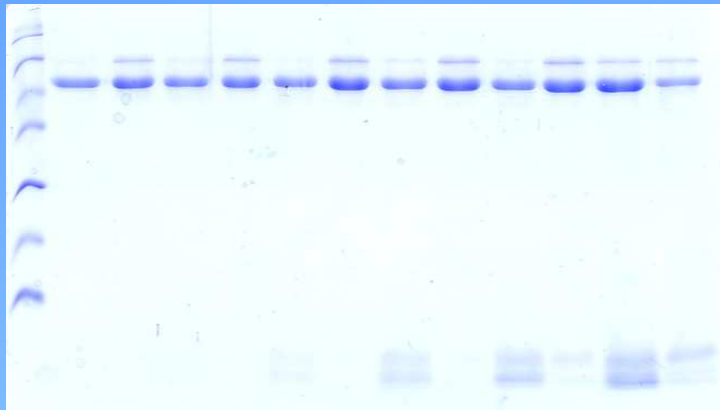




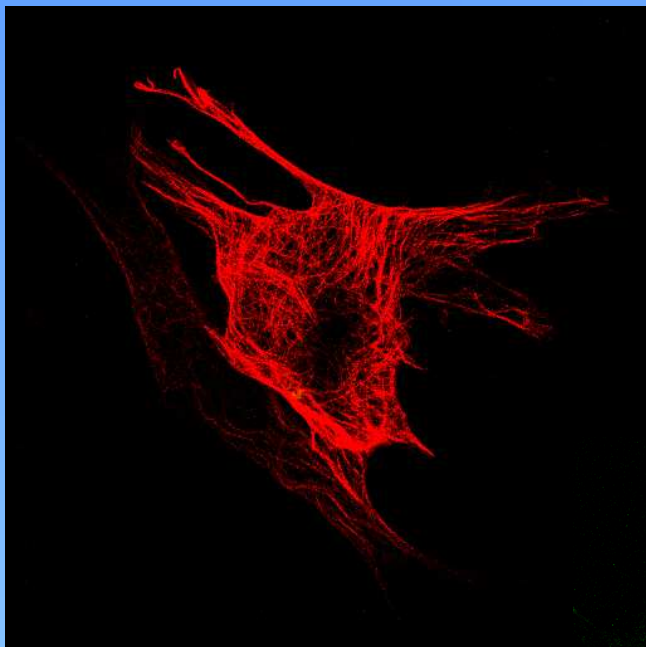
# Měření turbidity



# Kosedimentace MAPs s mikrotubuly za přítomnosti plektinu



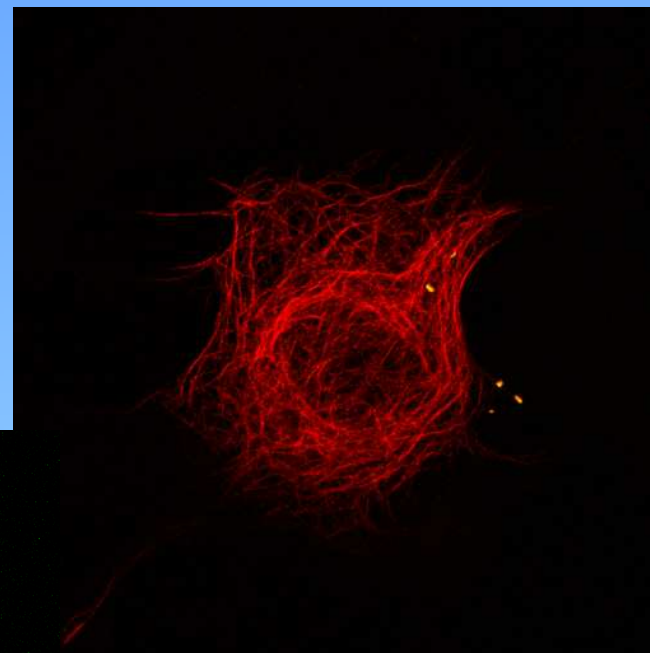
MAP2c +/+



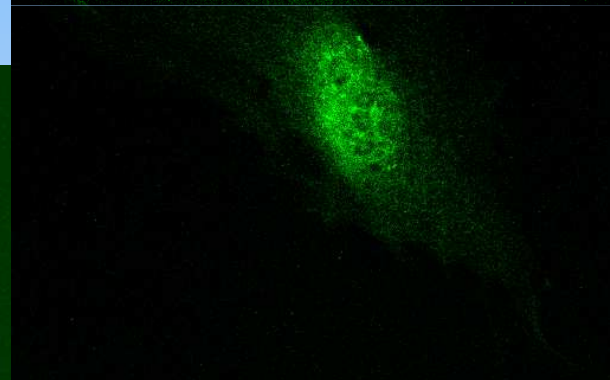
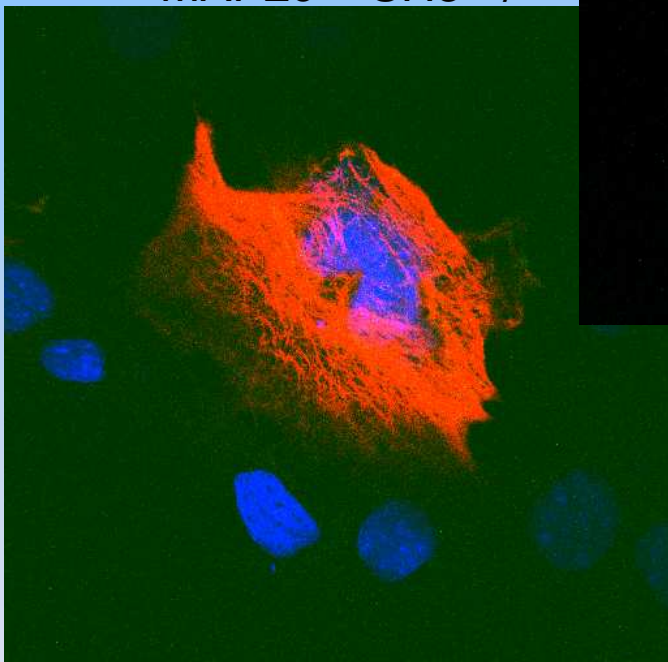
Fluorescenční  
mikroskopie

SH3 +/+

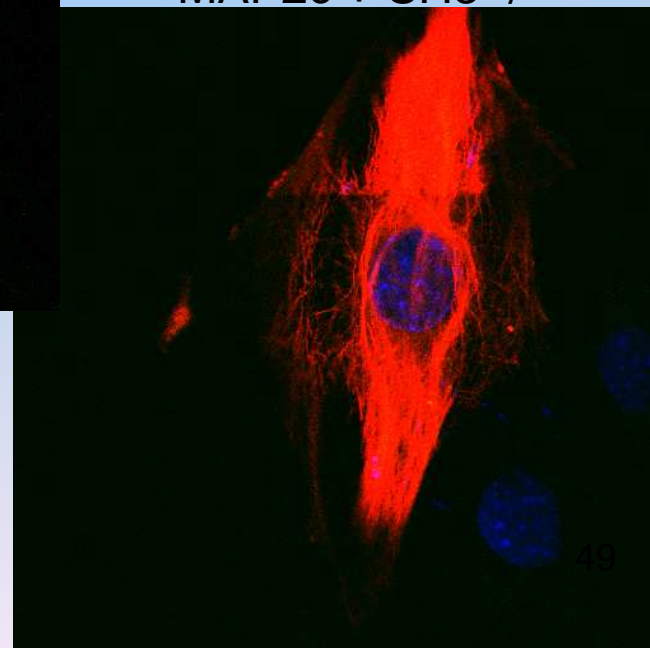
MAP2c -/-



MAP2c + SH3 +/+

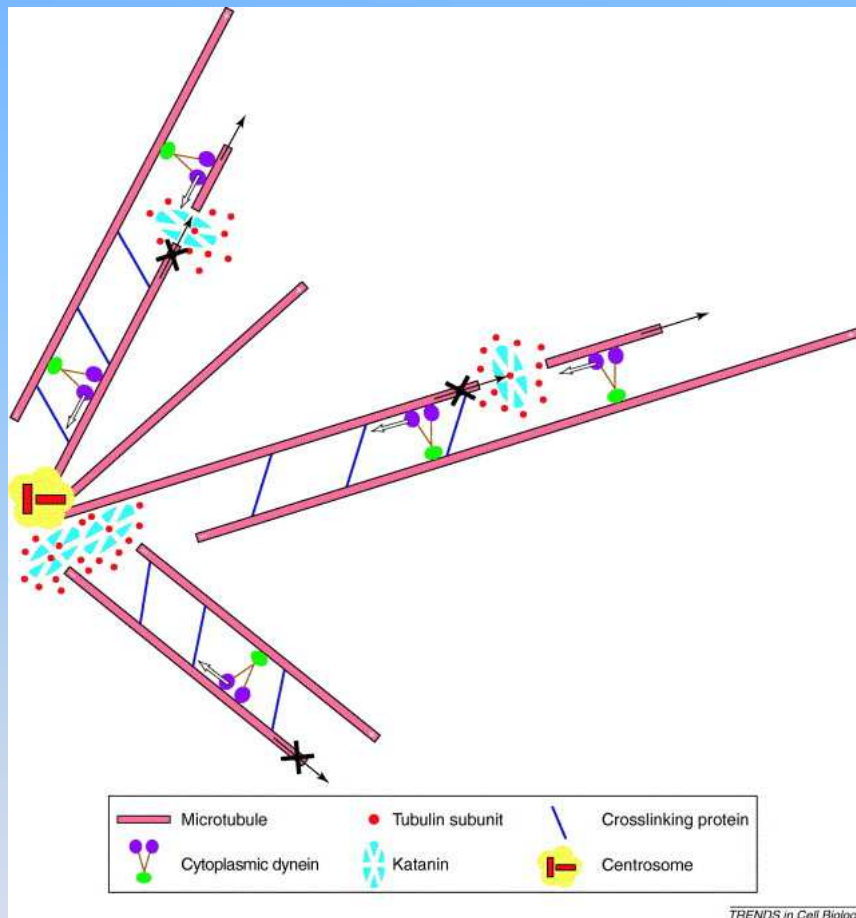


MAP2c + SH3 -/-

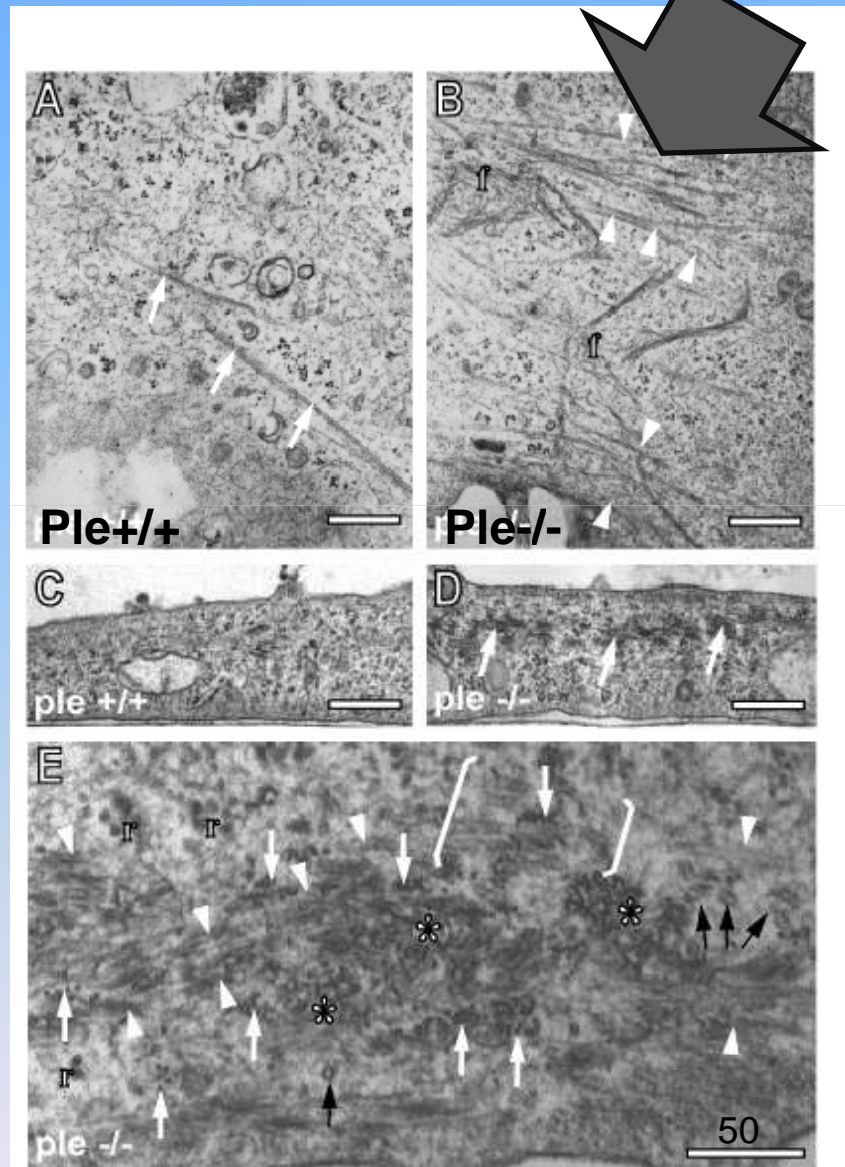


Fibroblasty

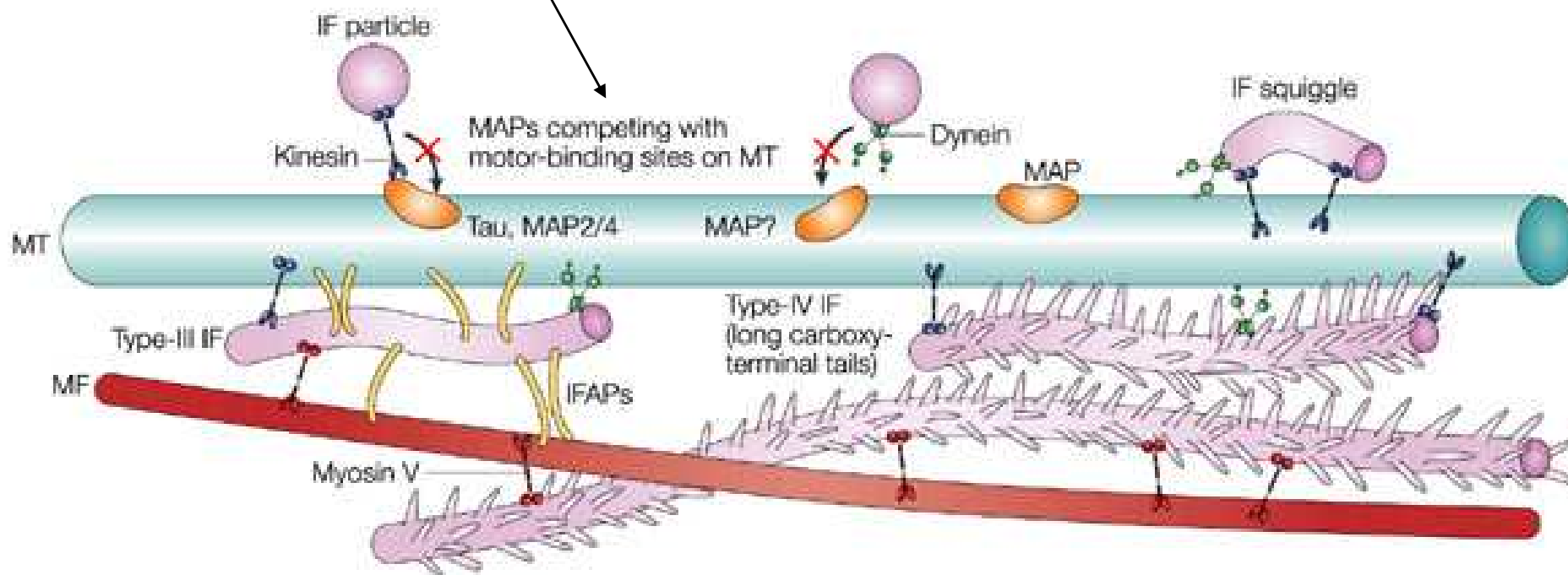
Vrstvící se keratinocyty, kterým chybí Plektin, vytvářejí zvláštní oblasti s nahloučenými mikrotubuly, které jsou stabilizovány proti depolymerizaci.



(Walko et al, 2008)

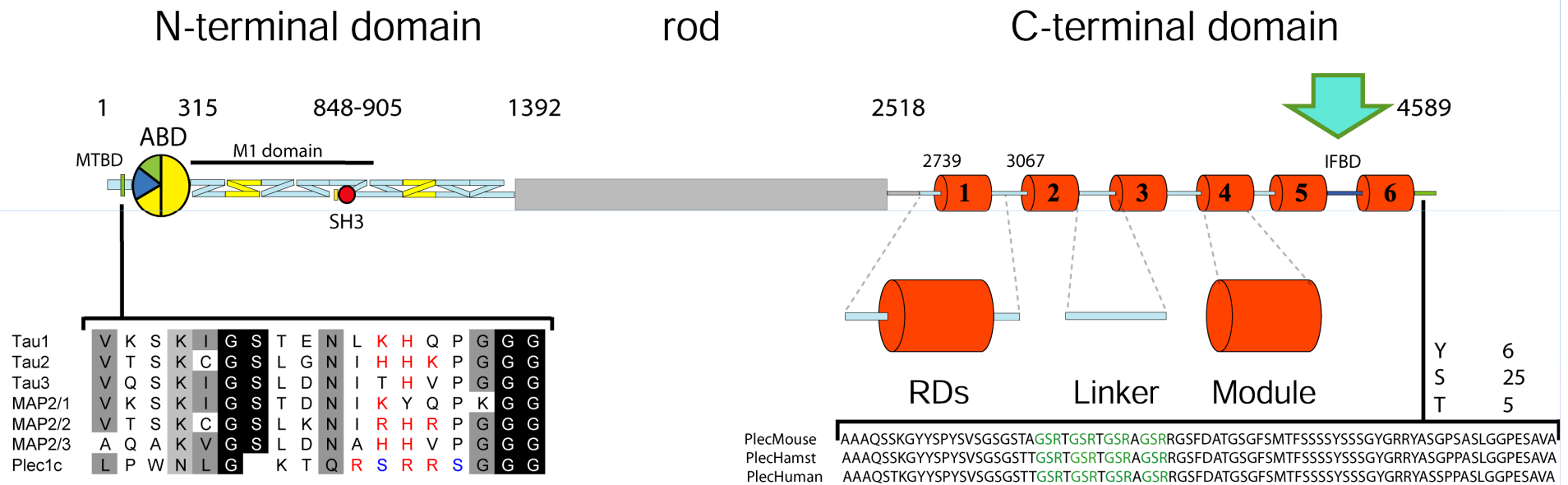


MAP – mikrotubul asociovaný protein redukuje frekvenci se kterou mohou molekulární motory interagovat s mikrotubulární mřížkou a frekvenci se kterou katanin může tvořit hexamery, které rozkládají mikrotubuly.



# Analýza IF domény Plektinu - bioinformatika

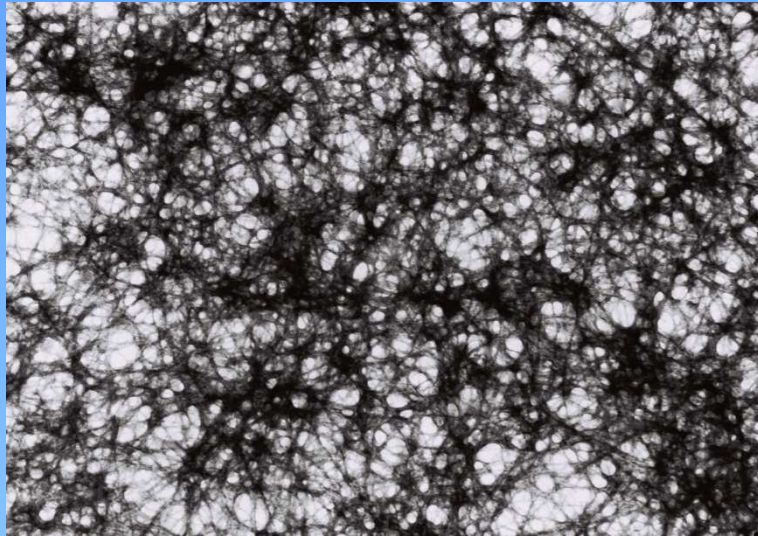
## Plectin



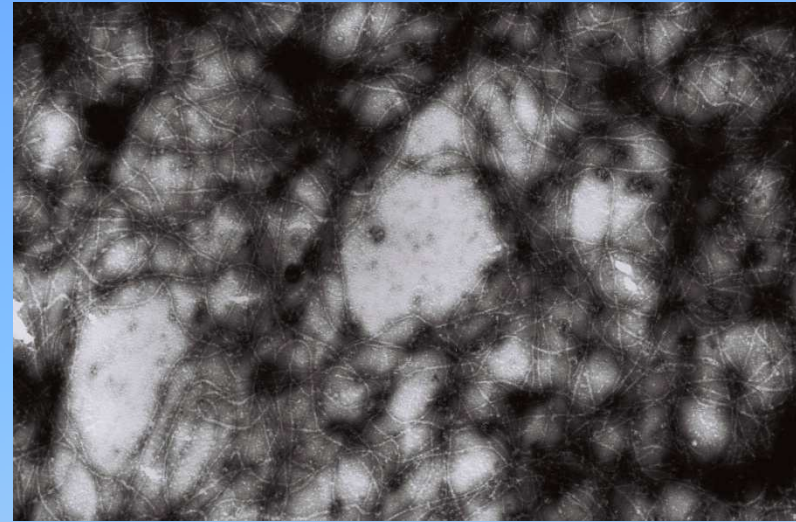
Kd of Plectin (Ex 1-24) for actin      320 nM      (Ex 2-8) 25uM  
 Kd of Plectin (R5) for vimentin (IF)      100 nM  
 Kd of Plectin (Ex 2-8) for integrin beta 4      170 nM  
 Kd for microtubules in case of MAP2      1-3 uM



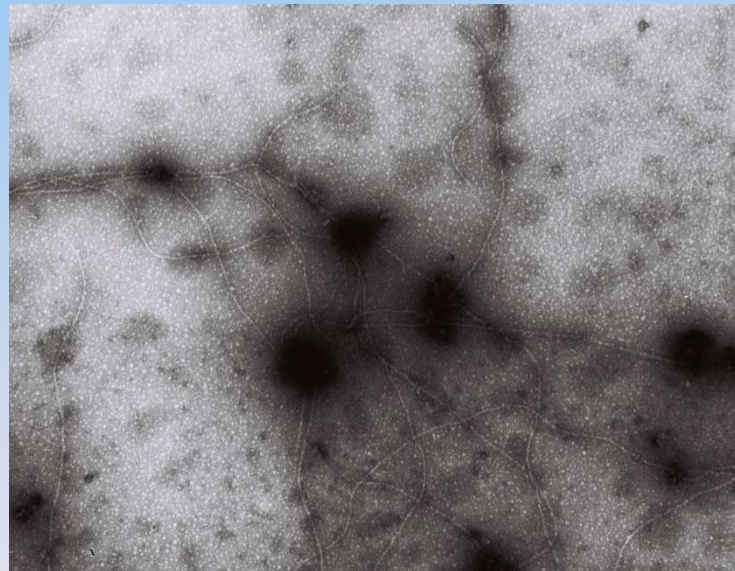
**Electronová mikroskopie: Vimentin+R5/ 1000:1**



**Electronová mikroskopie : Vimentin+R5/ 100:1**

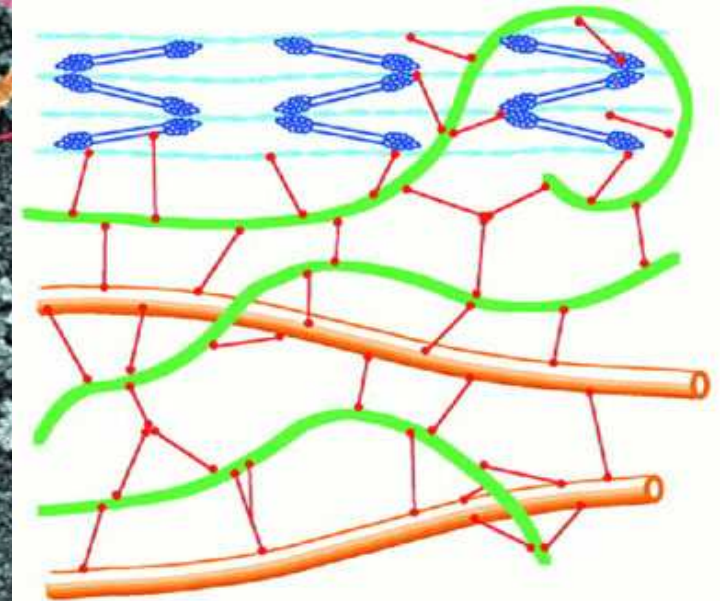
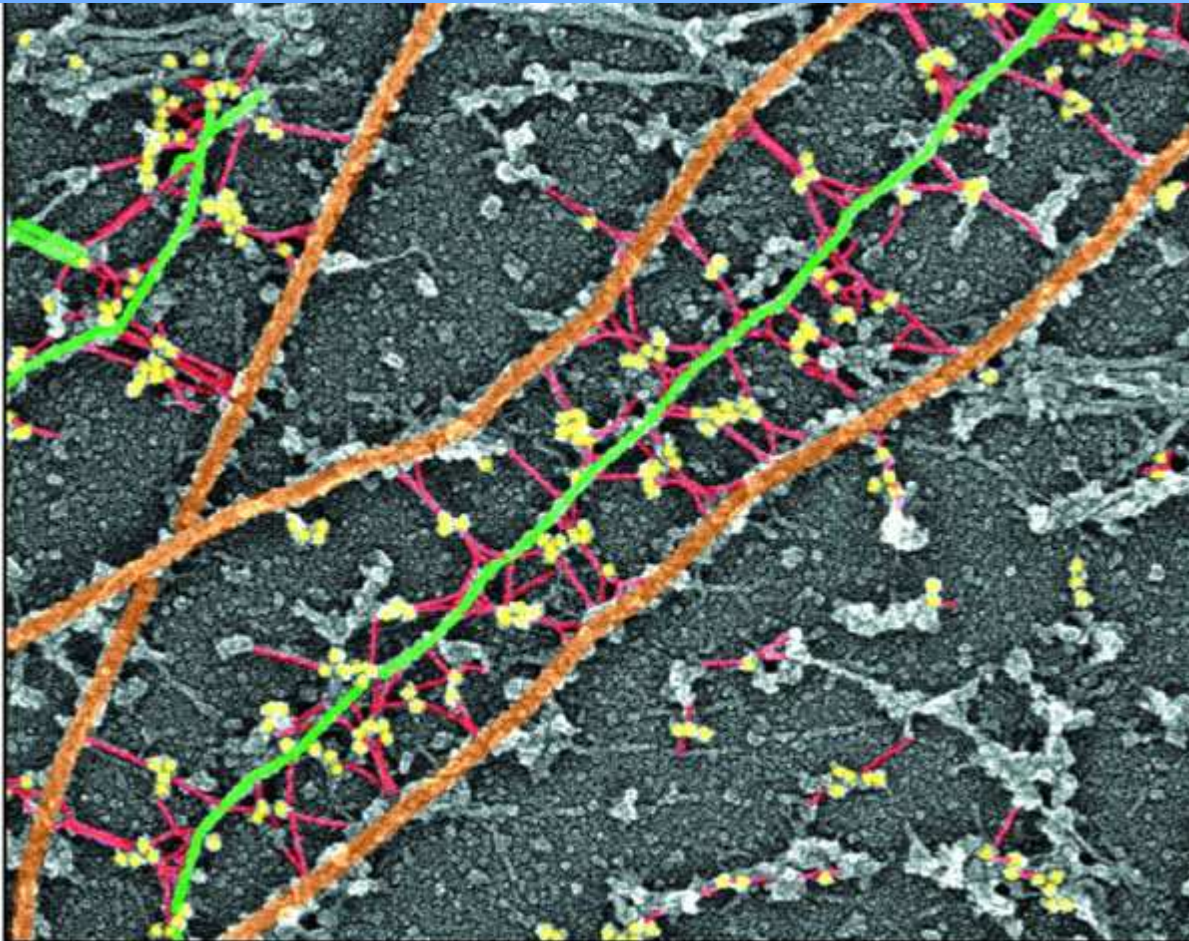


**Electronová mikroskopie : Vimentin+R5/ 1:1**





# Cytoskeleton

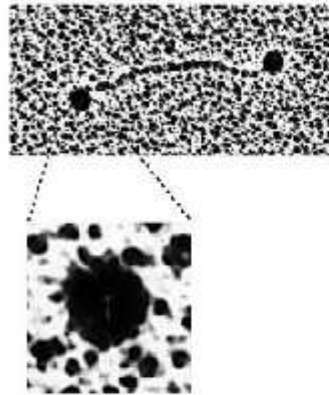


-  Plectin
-  Intermediate filaments
-  Microtubules
-  Actin filaments
-  Myosin filaments

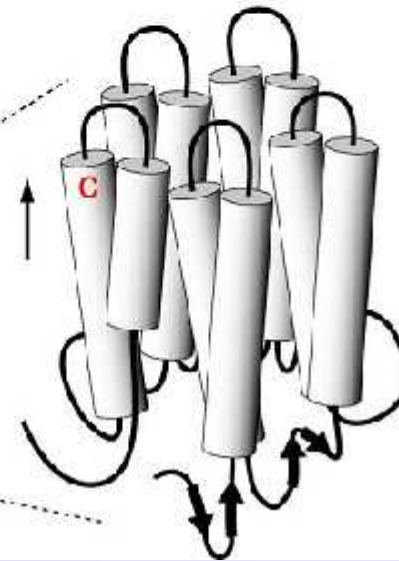
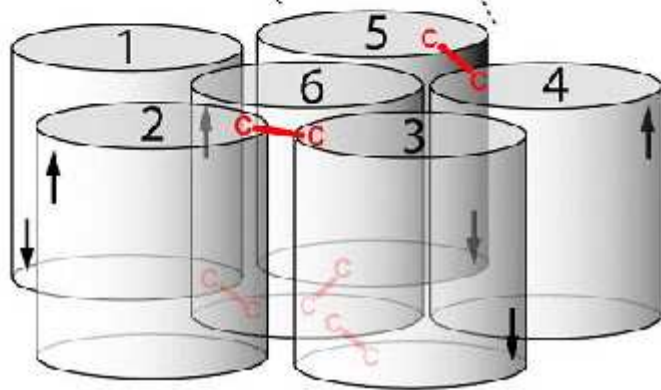




# C-koncová doména Plektinu

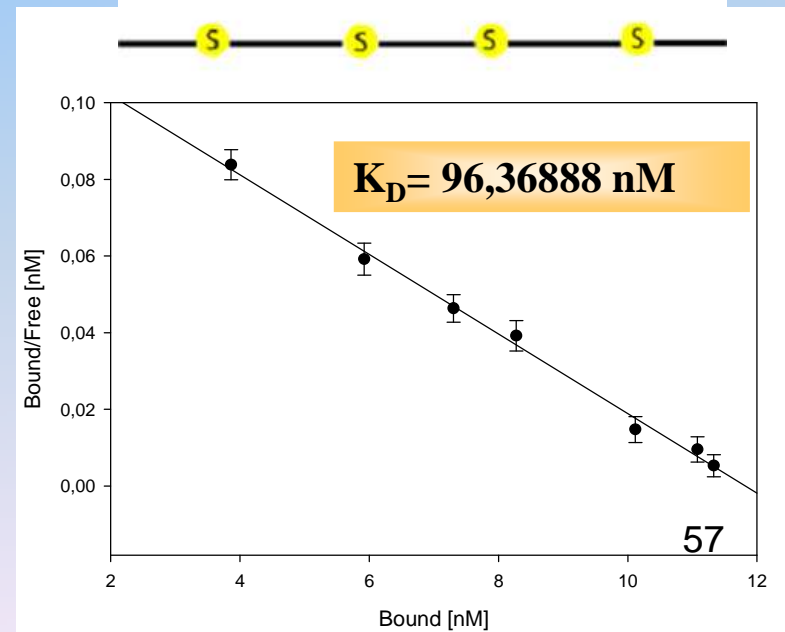
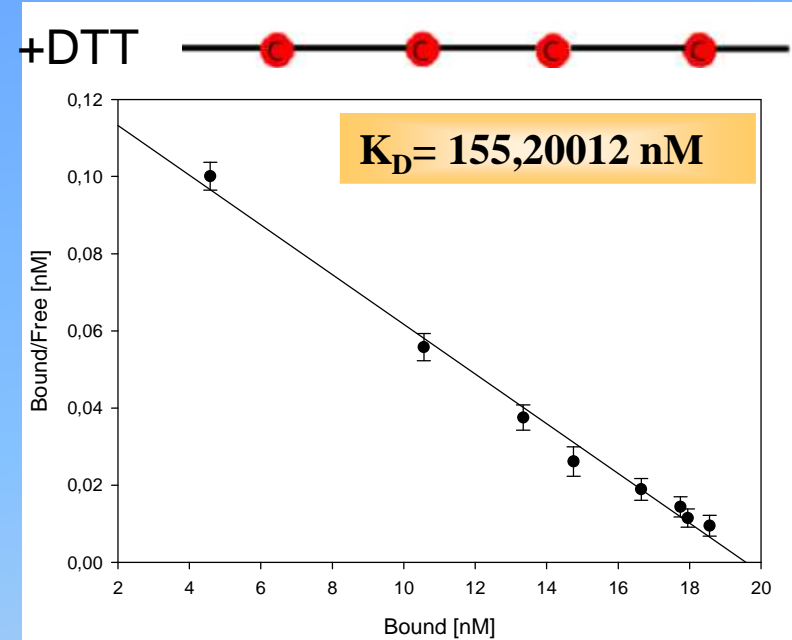
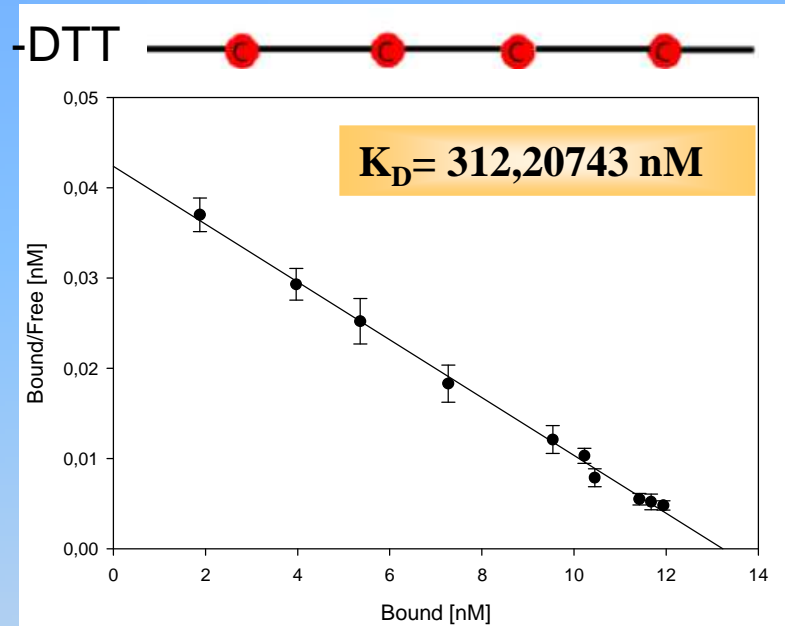


- šest modulů C-koncové domény Plektinu, které jsou spojeny méně konzervativním spojovací sekvencí
- modul samotný je tvořen 38 aminokyselinami (2x19) opakovaně pět krát.



# Značení Europiem: R5wt

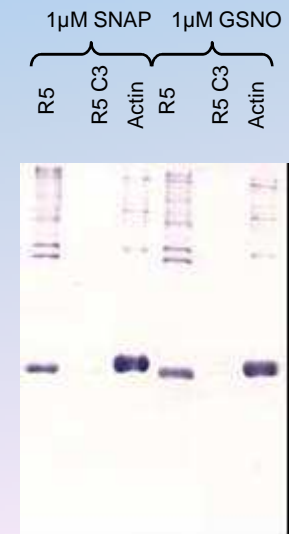
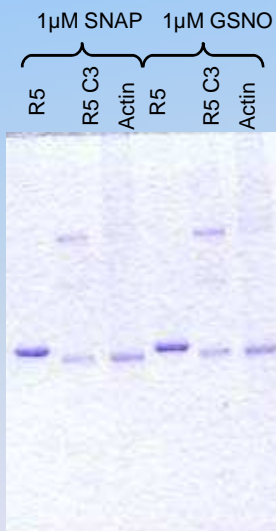
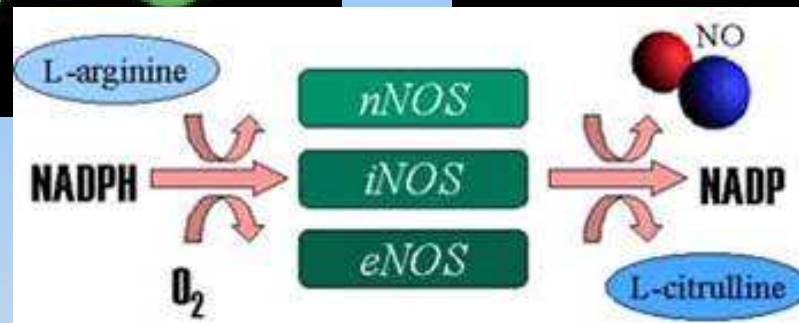
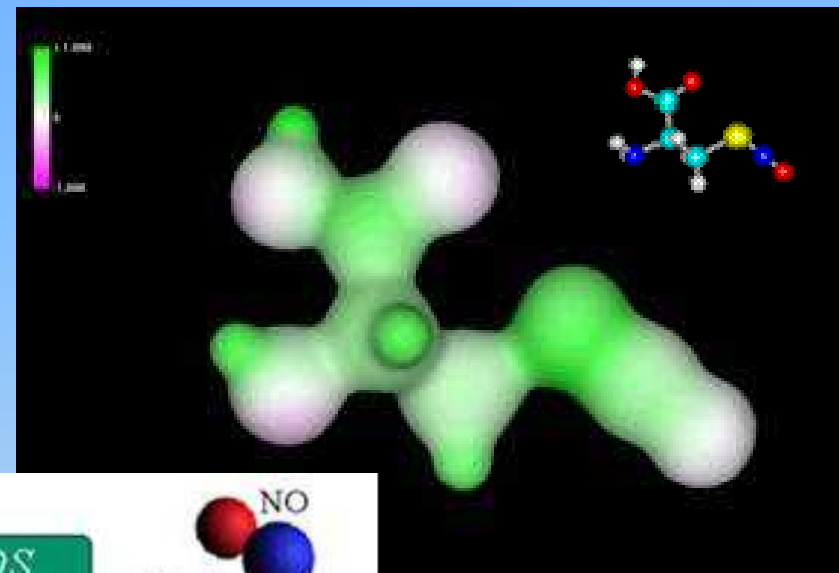
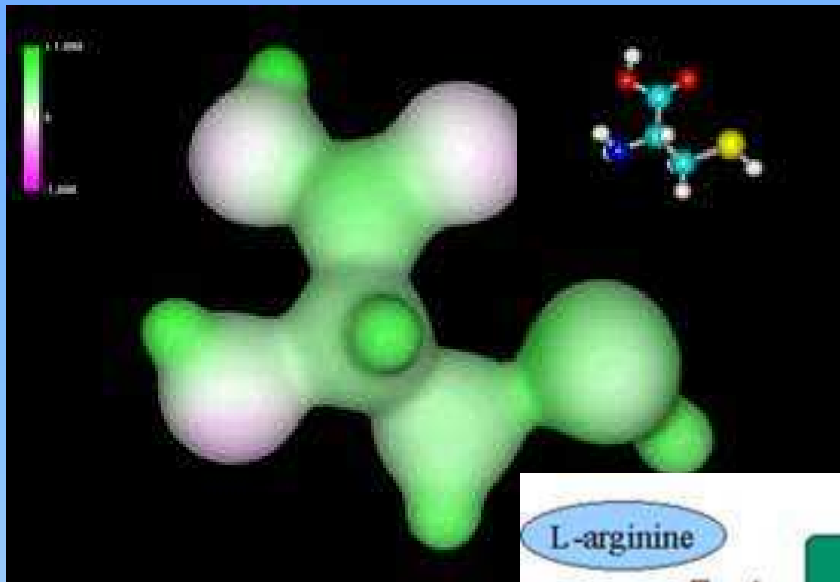
5





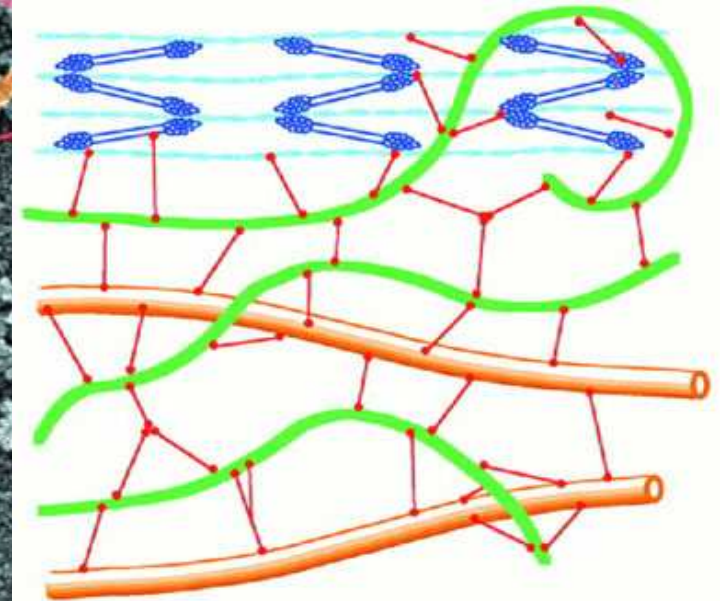
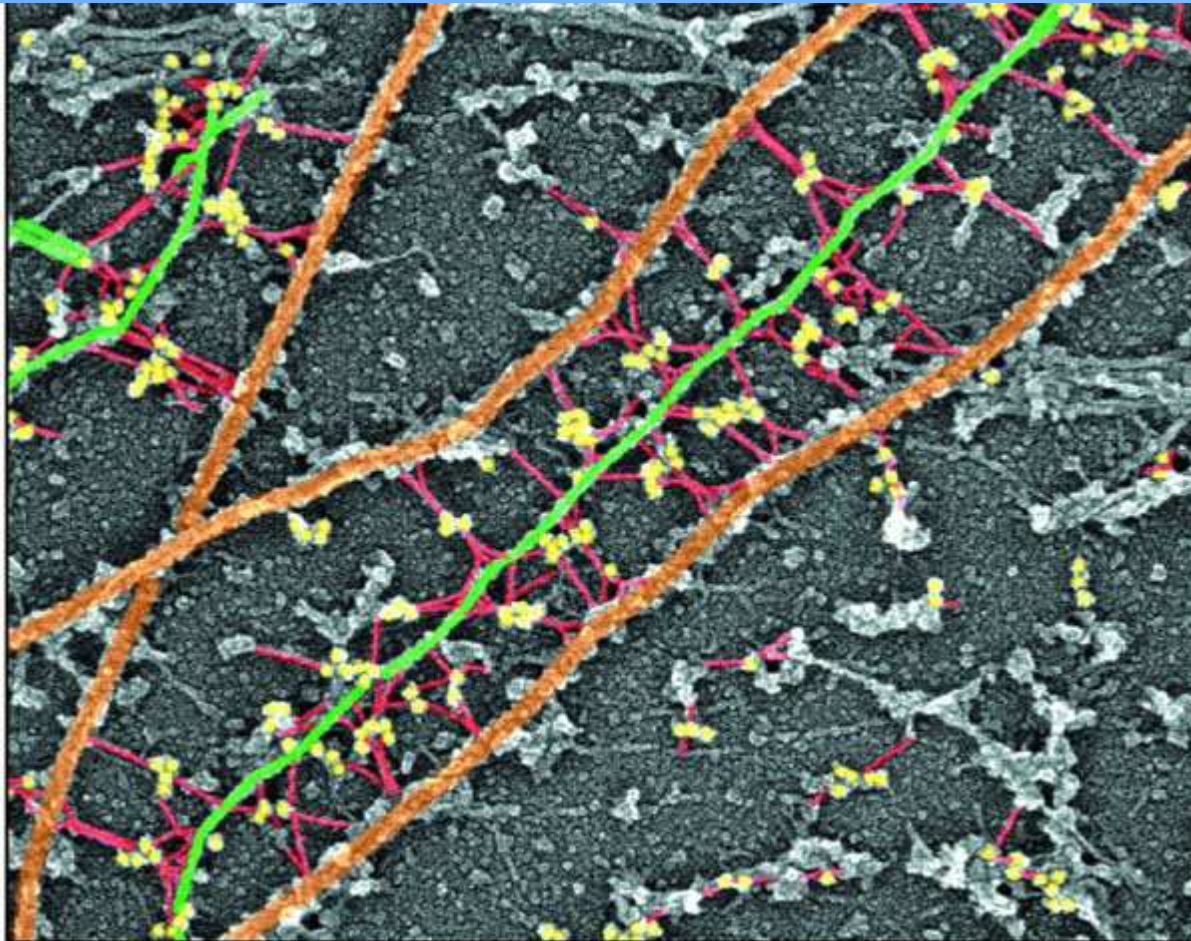
# Nitrosylace NO

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





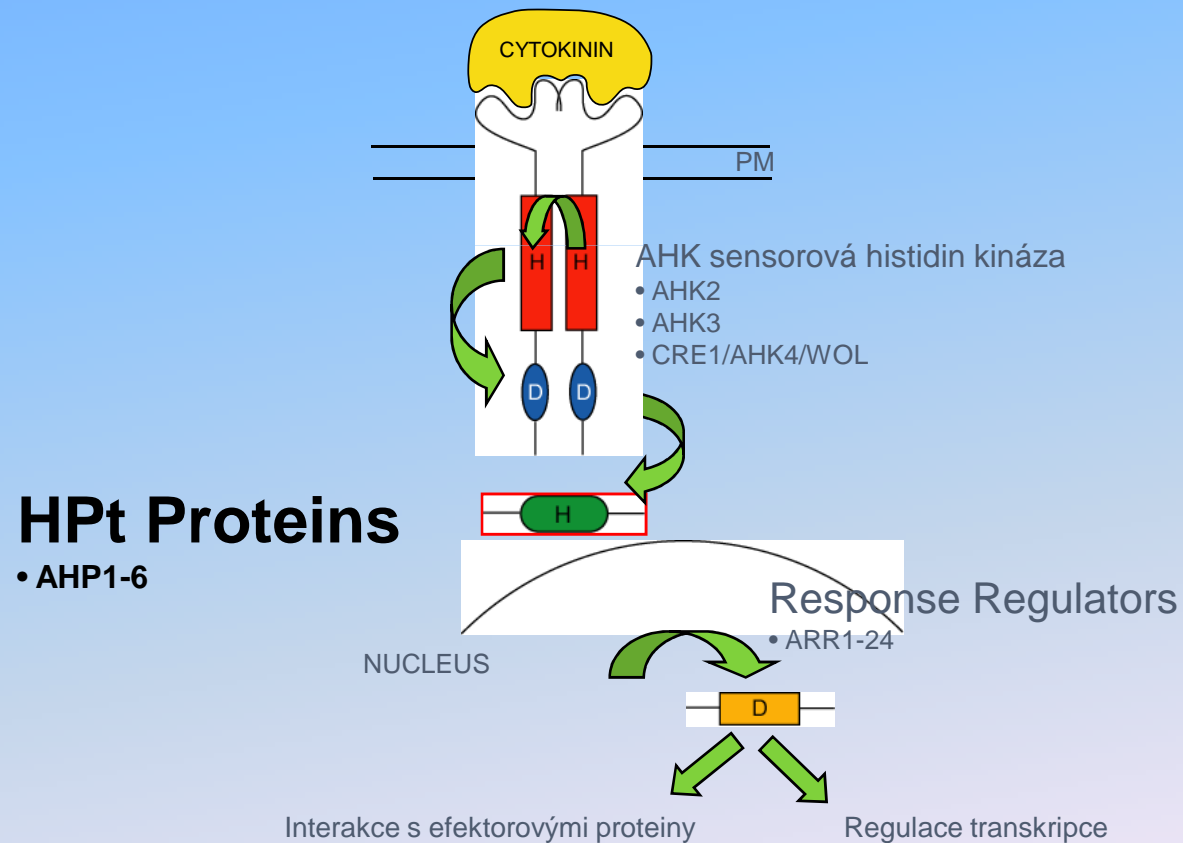
# Cytoskeleton



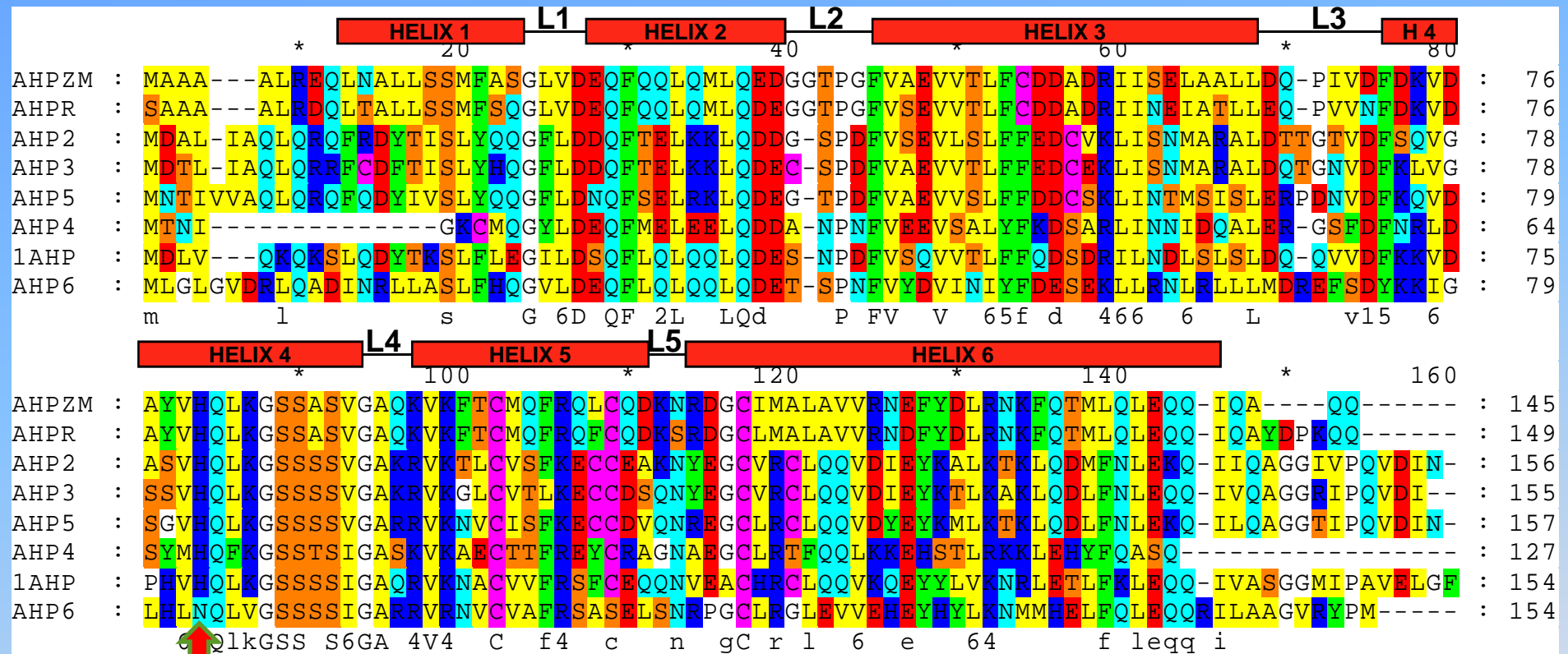
-  Plectin
-  Intermediate filaments
-  Microtubules
-  Actin filaments
-  Myosin filaments

# Signalizace u více-komponentního systému

Současný model cytokininové signalizace přes více-komponentní systém



# 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

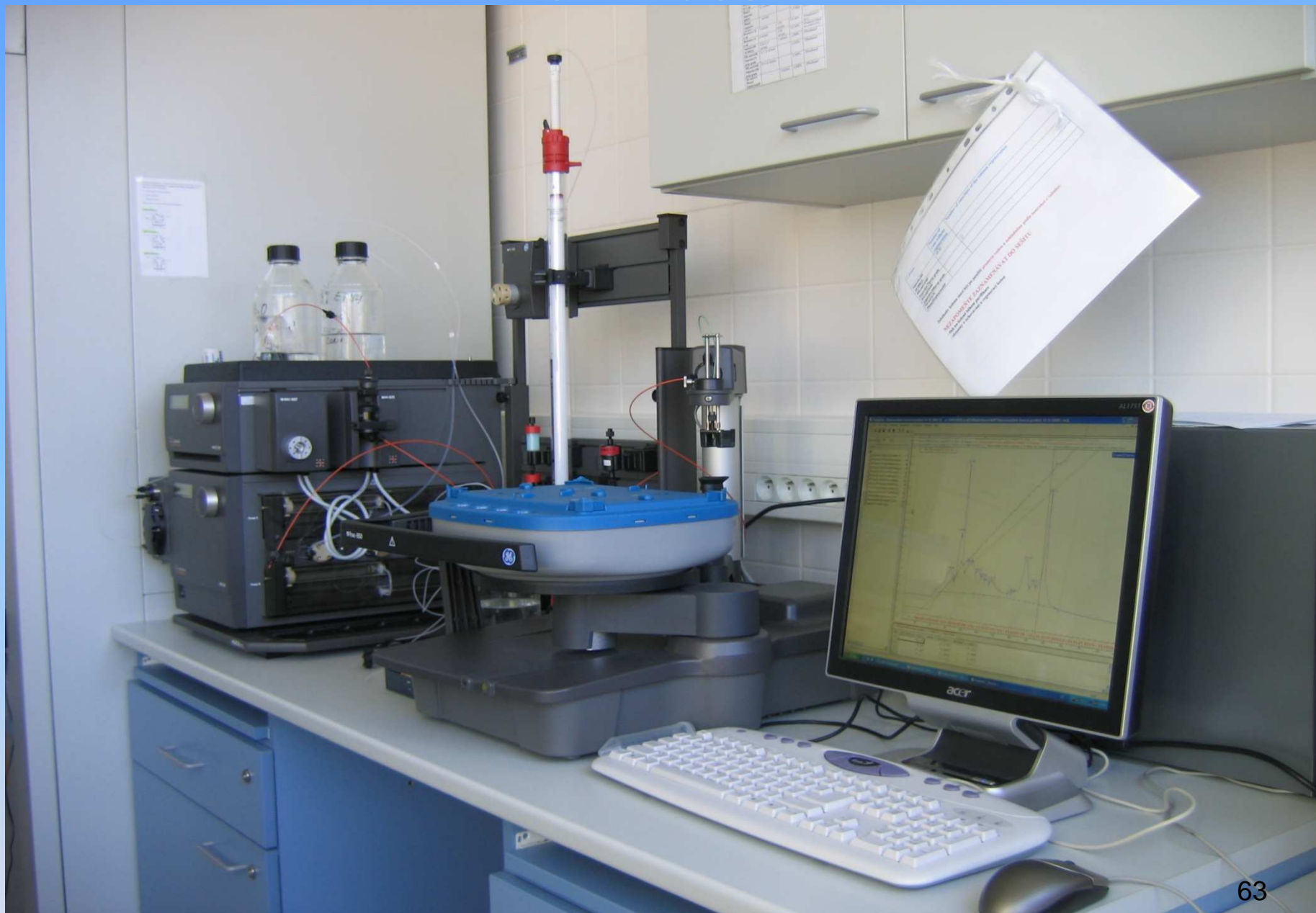
Podobnost AHP proteinů se pohybuje mezi 60-80%

## Výsledky exprese AHP proteinů v *E. coli*

Procenta proteinu AHP v rozpustné formě						
<i>t</i> (°C) <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

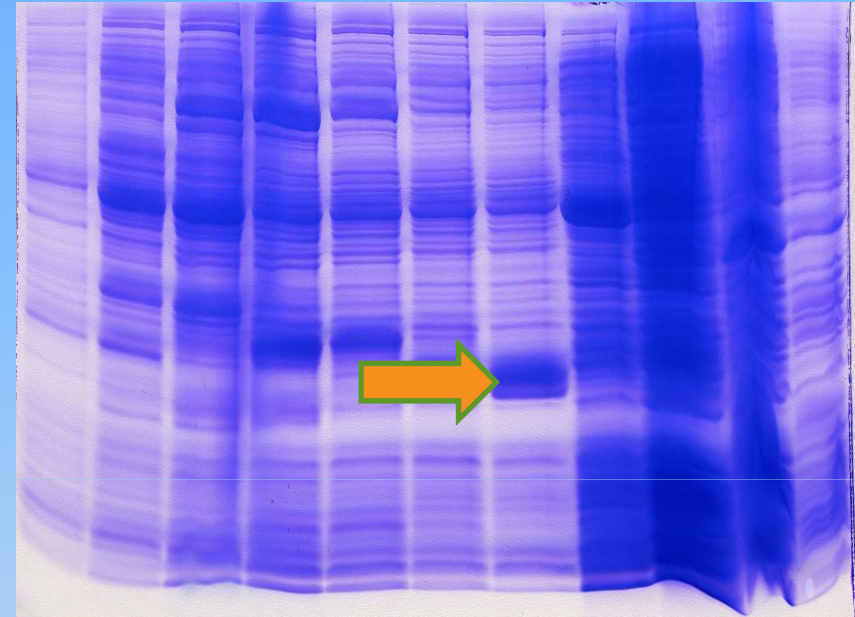
50 mM Tris pH7,9  
0,5M NaCl

500 mM  
imidazol

5CV

20 mM  
imidazol

Čistota:  
4,5%

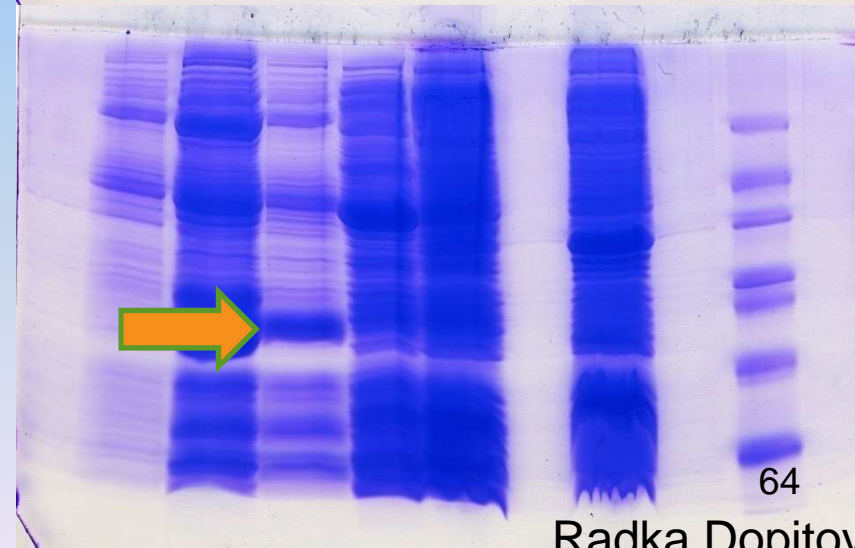


50 mM Tris pH7,9  
0,5M NaCl

500 mM  
imidazol

Čistota:  
15%

20 mM  
imidazol



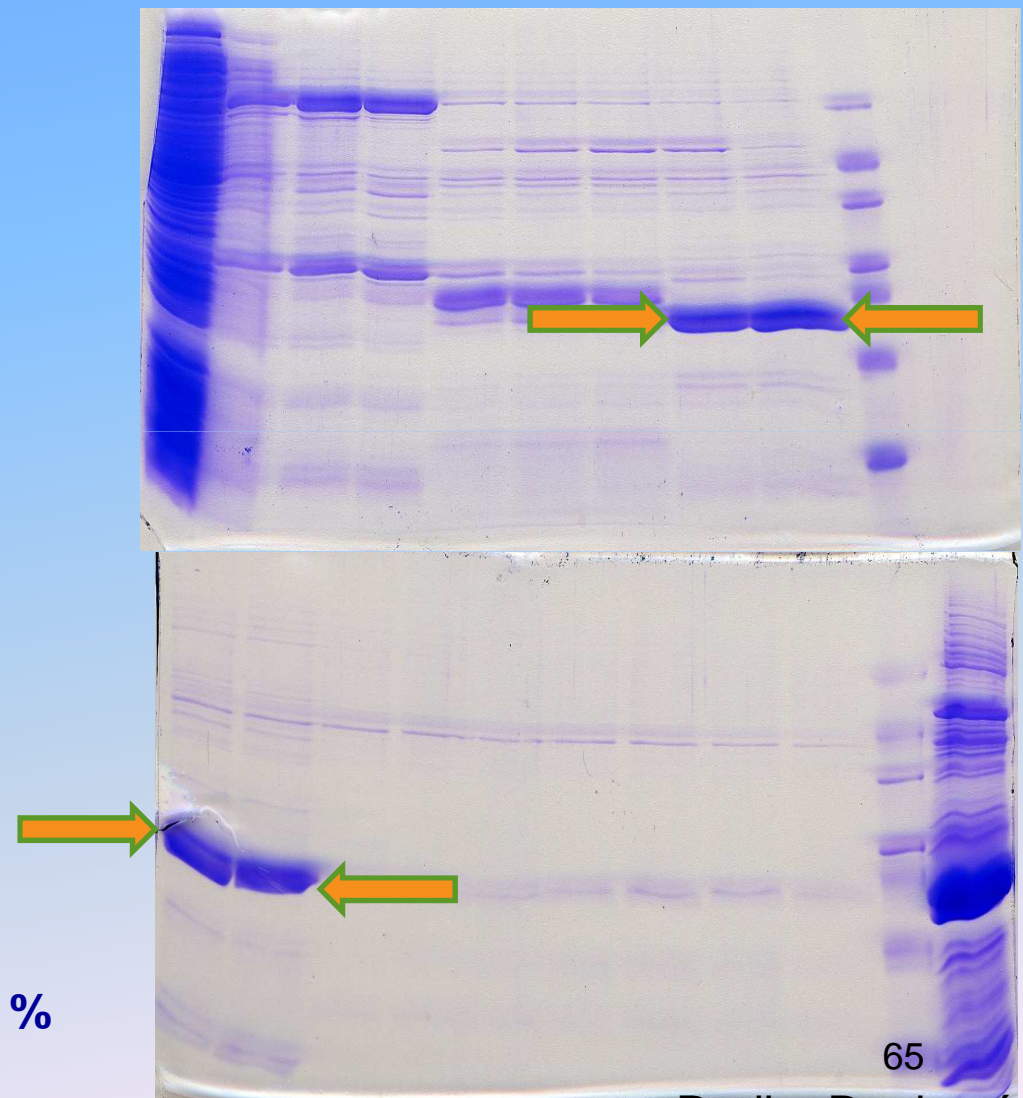
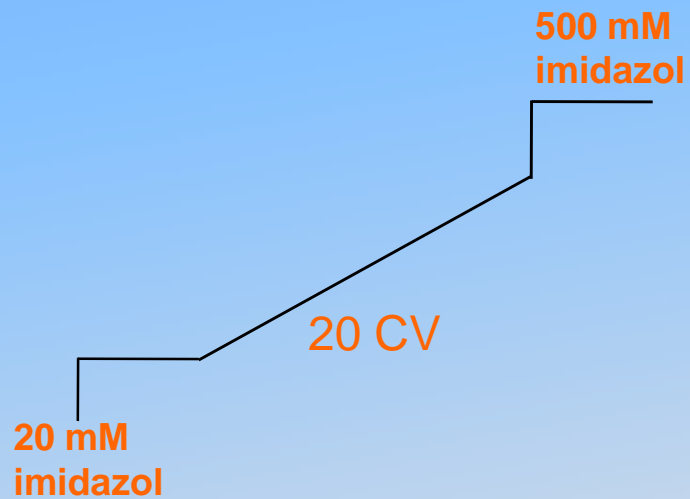
Radka Dopitová



# 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 %

# Metody studia funkce proteinů

Cíl	Metoda
Dostatek znalostí o proteinu	Bioinformatika (analýza proteinu, práce s literaturou)
Funkční protein	Exprese a purifikace proteinů
Zviditelnění proteinu	SDS-PAGE/Western blot/ fluorescenční a elektronová mikroskopie/detekce aktivity enzymu na gelu/MALDI/2D-PAGE
Kvalita proteinu	CD spektroskopie/měření turbidity/DLS
Hledání interakčního partnera	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.