

Předmět:  
KBB/BB1P; KBB/BUBIO

# Proteiny

Cíl přednášky: seznámit posluchače se strukturou a funkcí proteinů v buňce

Klíčová slova: peptidová vazba, konformace, ligand, vazebné místo, Michaelisova konstanta, allosterické enzymy

Obrázky v následující prezentaci jsou převzaty z níže uvedené knihy výlučně k výukovým účelům.

The illustrations in following lecture are taken from Alberts et al. *Molecular Biology of the Cell*, 5th Edition (Garland Science 2008) only and exclusively for the educational purposes.

Alberts • Johnson • Lewis • Raff • Roberts •  
Walter  
***Molecular Biology of the Cell***  
Fifth Edition

Copyright © Garland Science 2008

# Proteiny

- proteiny se skládají z **20–23 proteinogenních aminokyselin**
- tvoří většinu suché hmotnosti buňky
- proteiny jsou jednak **stavebními kameny** buňky, jednak obstarávají většinu **buněčných funkcí** (např. enzymy, kanály a pumpy v membránách, přenašeče signálů, molekulové stroje posouvající organely v cytoplazmě, dále jsou to protilátky, jedy, hormony, elastická vlákna atd.)
- podobně jako v základní chemii reaktivita molekuly je daná její strukturou, také u proteinů jejich funkce (tedy chemická reaktivita s okolím) souvisí úzce a jednoznačně s jejich strukturou – **chemická struktura proteinu určuje jeho reaktivitu a tedy i funkci**

# Některé funkce proteinů

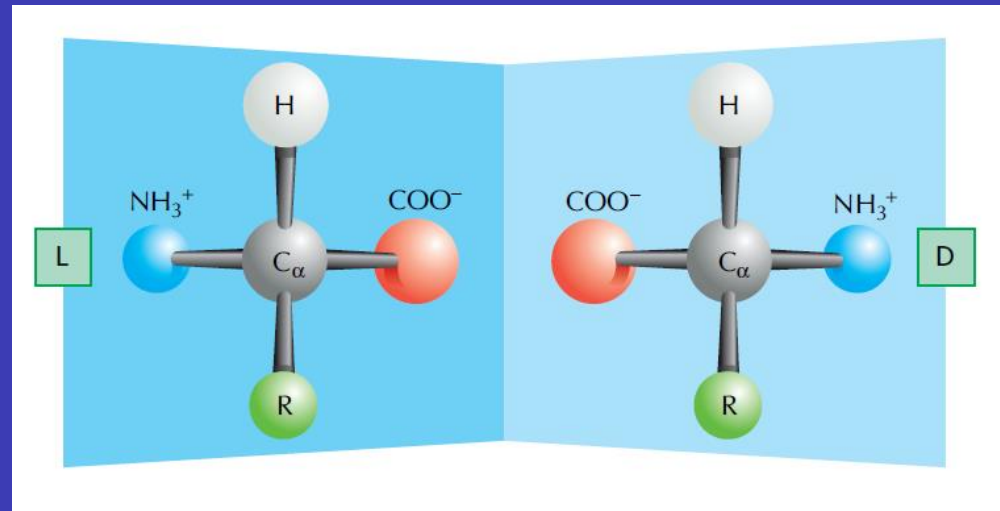
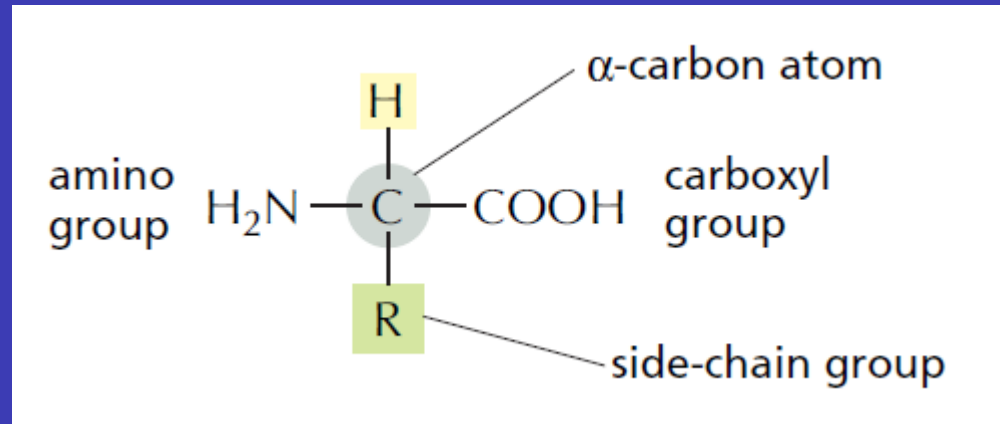
- **katalytická** (enzymy) např. pepsin, DNA-polymeráza, kinázy
- **strukturní** např. kolagen, elastin, tubulin, aktin
- **transportní** např. hemoglobin, přenašeče, pumpy, kanály
- **pohybová** např. myosin, kinesin, dynein
- **zásobní** např. ferritin, ovalbumin, kasein
- **signální** např. inzulín, růstové faktory
- **receptorová** např. rhodopsin, membránové receptory
- **regulační** např. transkripční faktory
- **další funkce** protimrazové proteiny ryb, zelený fluorescenční protein medúz, adhezní proteiny mušlí atd.

# Aminokyseliny

základní stavební jednotky proteinů

## $\alpha$ -L-aminokyseliny

obsahují karboxylovou skupinu (-COOH) a aminoskupinu (-NH<sub>2</sub>) na uhlíku v pozici  $\alpha$



# Proteinogenní aminokyseliny

AMINO ACID				SIDE CHAIN			
Aspartic acid	Asp	D	negative	Alanine	Ala	A	nonpolar
Glutamic acid	Glu	E	negative	Glycine	Gly	G	nonpolar
Arginine	Arg	R	positive	Valine	Val	V	nonpolar
Lysine	Lys	K	positive	Leucine	Leu	L	nonpolar
Histidine	His	H	positive	Isoleucine	Ile	I	nonpolar
Asparagine	Asn	N	uncharged polar	Proline	Pro	P	nonpolar
Glutamine	Gln	Q	uncharged polar	Phenylalanine	Phe	F	nonpolar
Serine	Ser	S	uncharged polar	Methionine	Met	M	nonpolar
Threonine	Thr	T	uncharged polar	Tryptophan	Trp	W	nonpolar
Tyrosine	Tyr	Y	uncharged polar	Cysteine	Cys	C	nonpolar

┌————— POLAR AMINO ACIDS —————┐
┌————— NONPOLAR AMINO ACIDS —┐

21. aminokyselina: **selenocystein** (Sec) - nahrazuje Cys v lidském enzymu glutathionperoxidáza

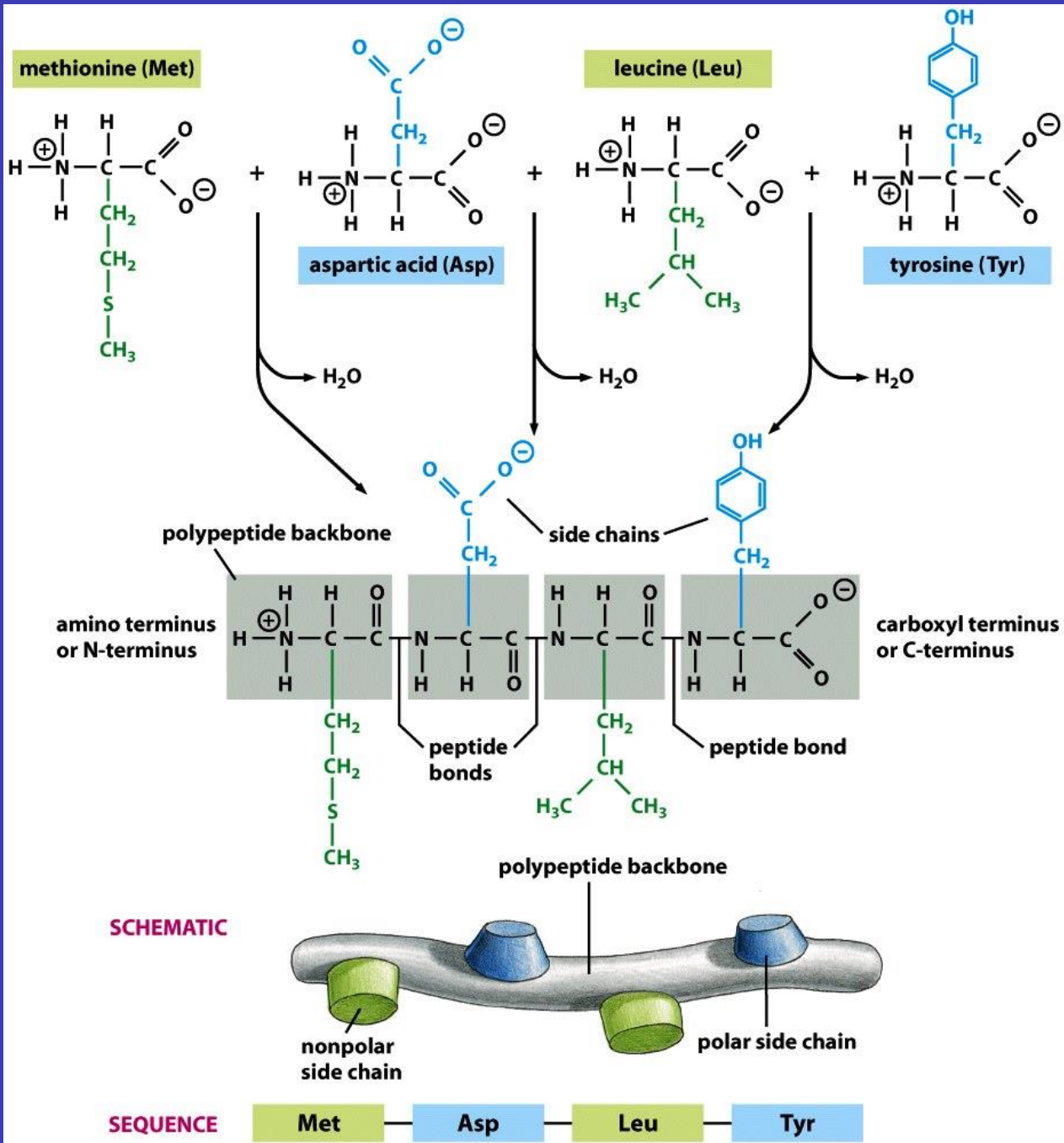
22. aminokyselina: **pyrolysin** (Pyl) – vyskytuje se zejména u prokaryot

23. aminokyselina: **N-formylmethionin** (fMet) – hraje roli při iniciaci prokaryotické translace

# Primární struktura proteinů

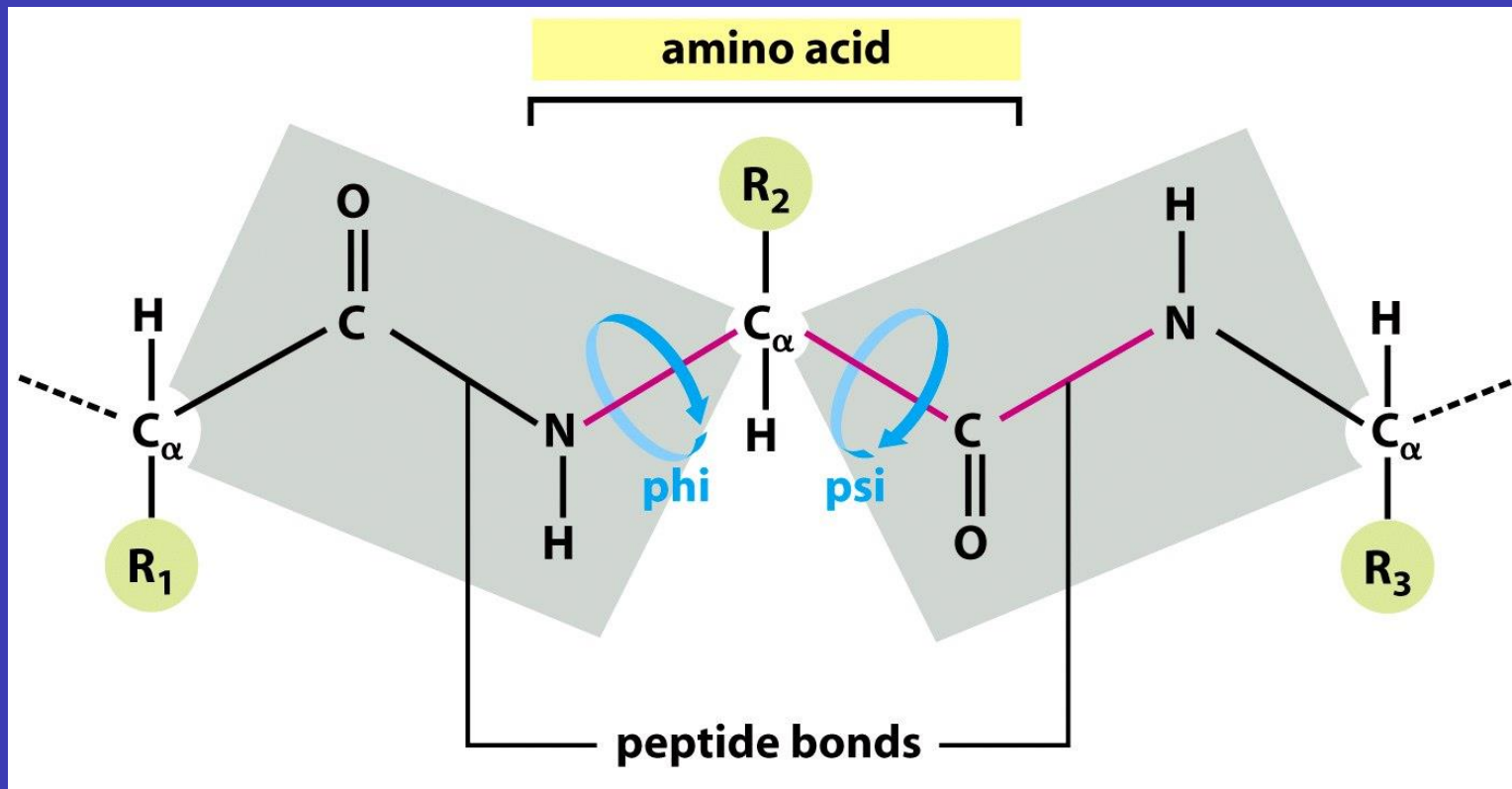
- proteiny vznikají spojováním aminokyselin prostřednictvím kovalentní vazby, tzv. **peptidové vazby** (reakce **-NH<sub>2</sub>** skupiny jedné aminokyseliny s **-COOH** skupinou druhé za uvolnění vody) a jsou tedy tvořeny řadou aminokyselin
- **pořadí aminokyselin** v proteinu se nazývá **primární struktura** a z ní vyplývá to, jak se protein poskládá dále do vyšších struktur
- primární struktura se skládá z **polypeptidové kostry** (opakující se řetěz peptidových vazeb) a z **postranních řetězců** (ty jsou polární/nepolární, záporné/kladné atd.)
- primární struktura proteinu **odpovídá genetické informaci** v nukleové kyselině



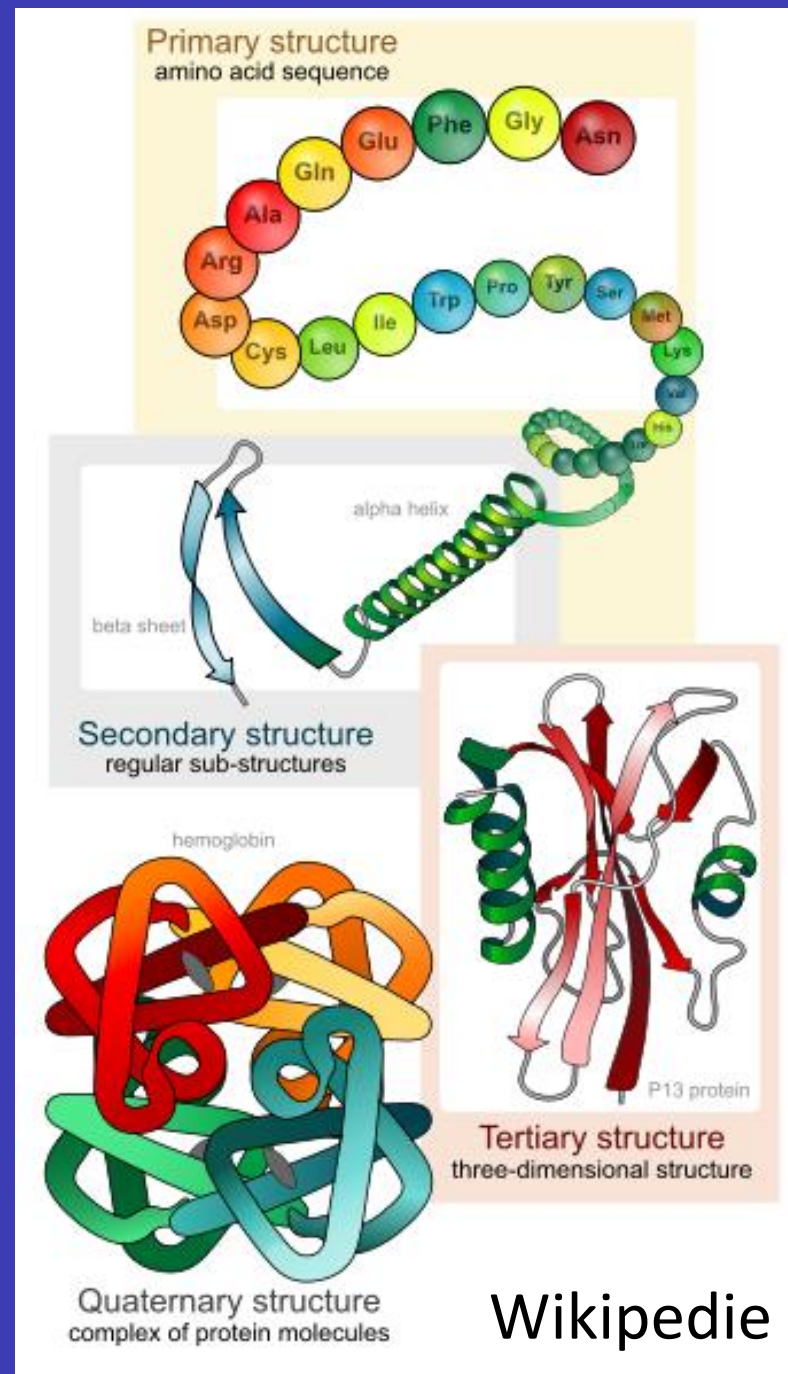


# Konformace molekul

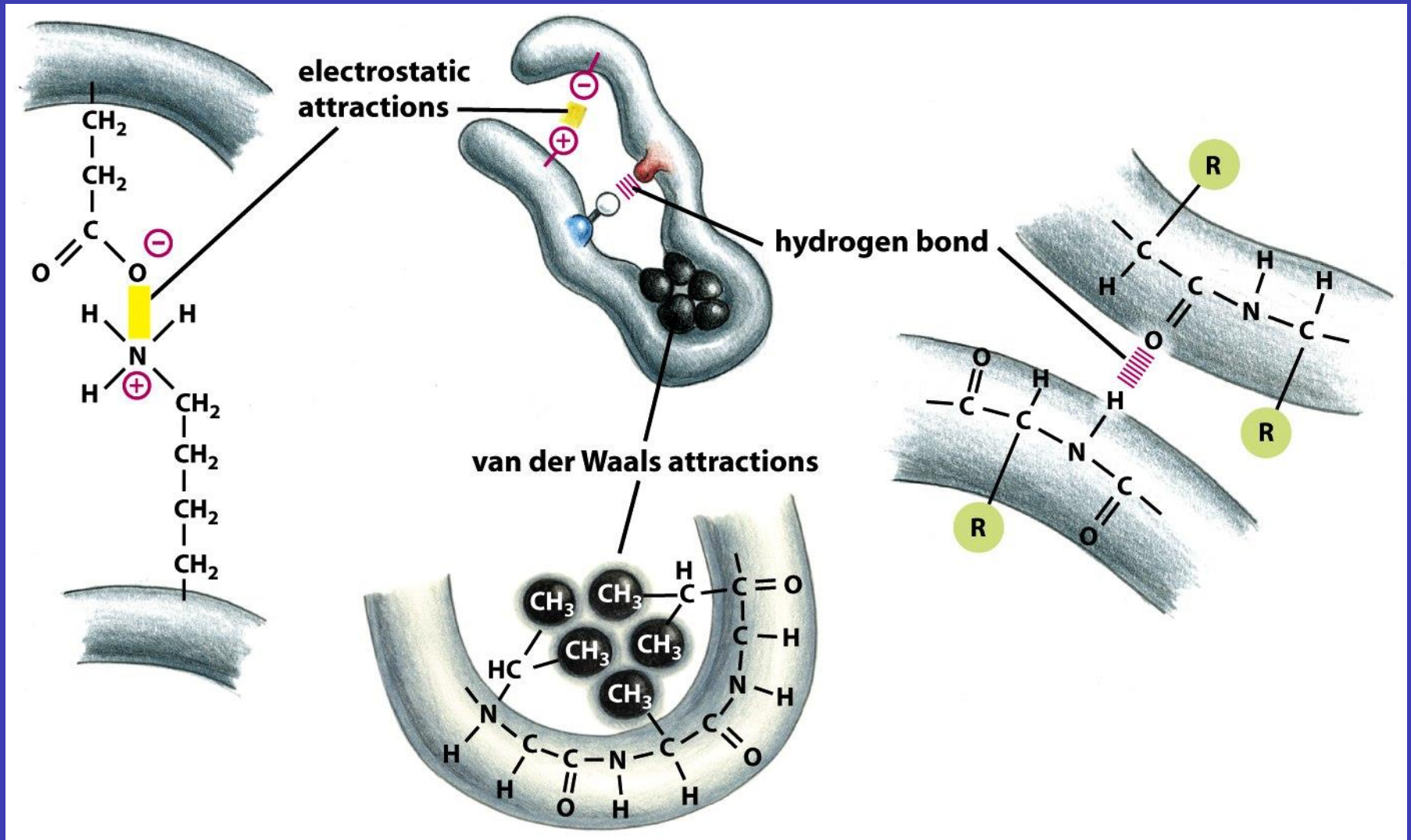
kolem otáčivých (tj. **jednoduchých**) chemických vazeb se mohou atomy různě **otáčet** a měnit tak prostorové uspořádání molekuly, **aniž by bylo změněno její chemické složení** – těmto změnám se říká **změny konformace**

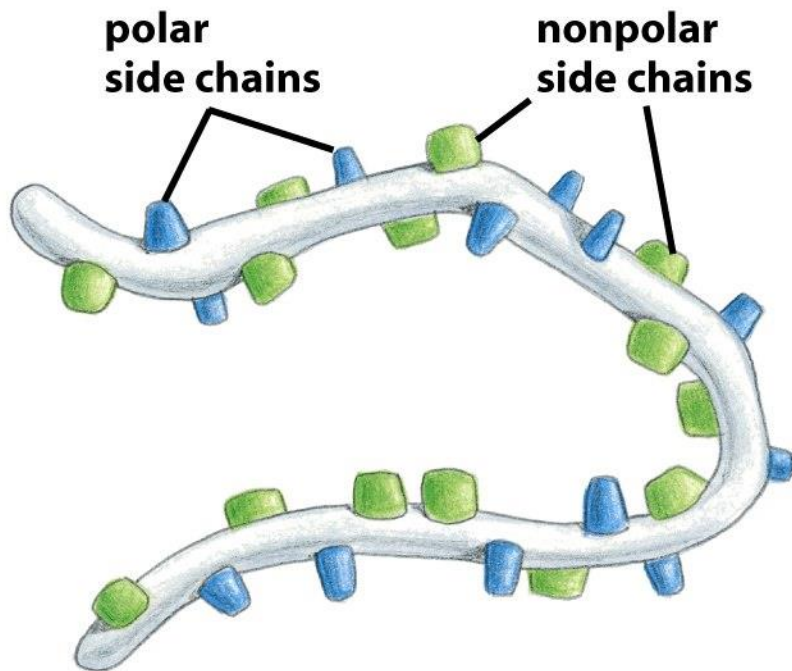


primární struktura proteinů je určena sekvencí aminokyselin a definuje jejich chemické složení, další strukturní uspořádání (sekundární, terciární) jsou takové konformace, které si vynucují **nekovalentní vazby (interakce)** mezi různými částmi řetězce

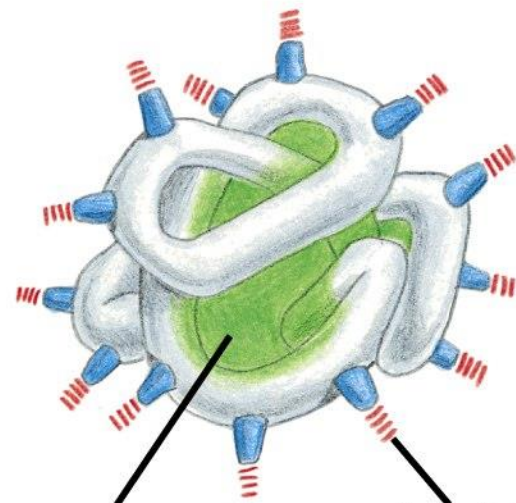


# Nekovalentní vazby v proteinech

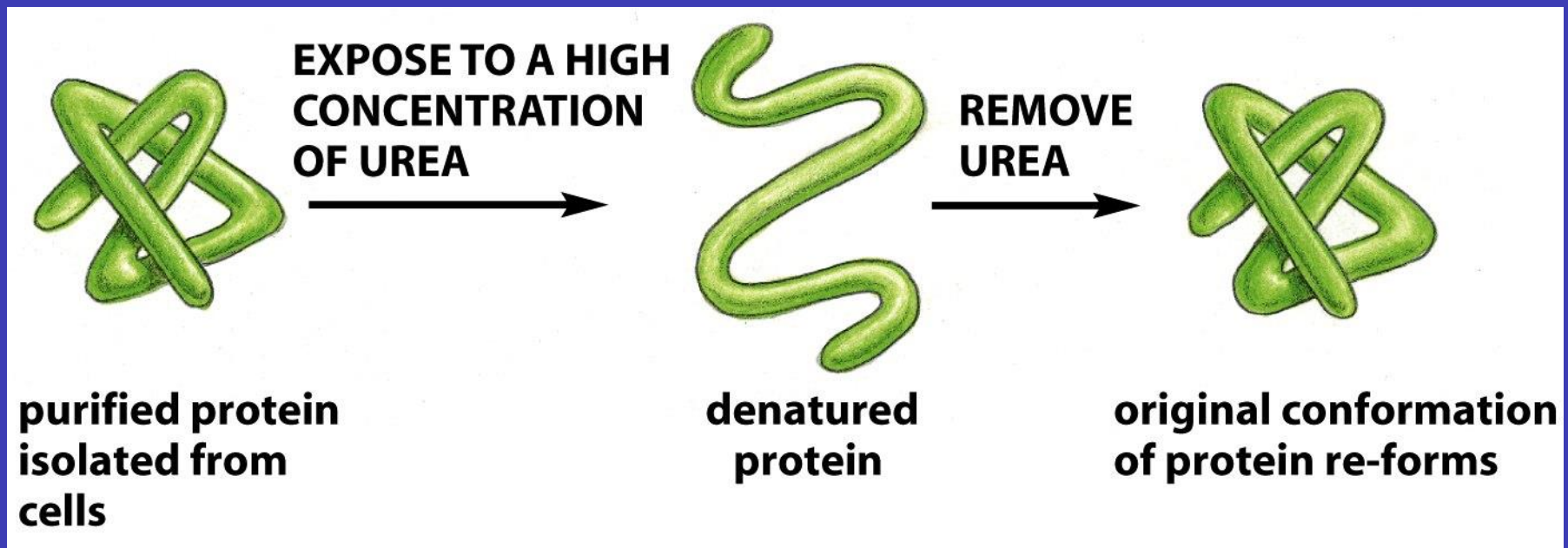




**unfolded polypeptide**



**folded conformation in aqueous environment**

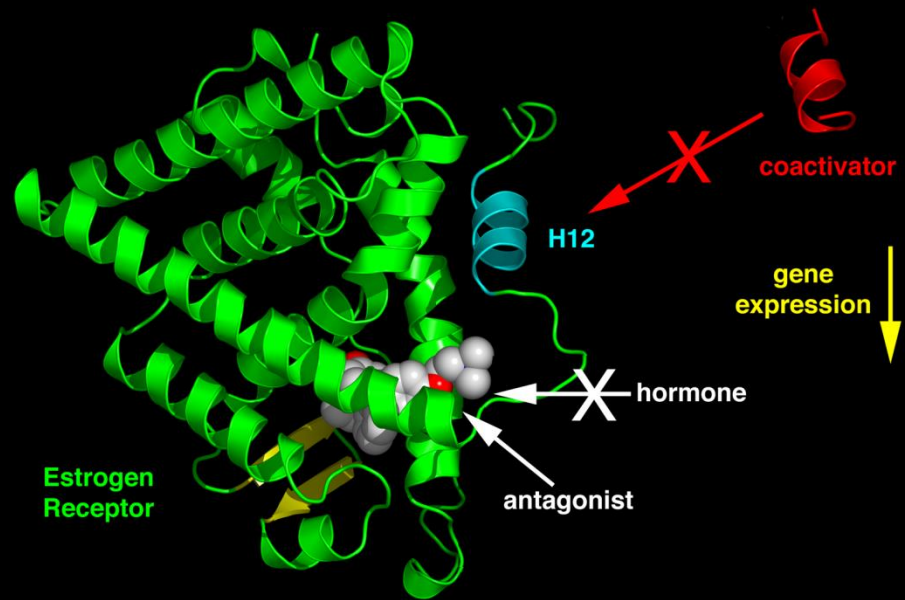
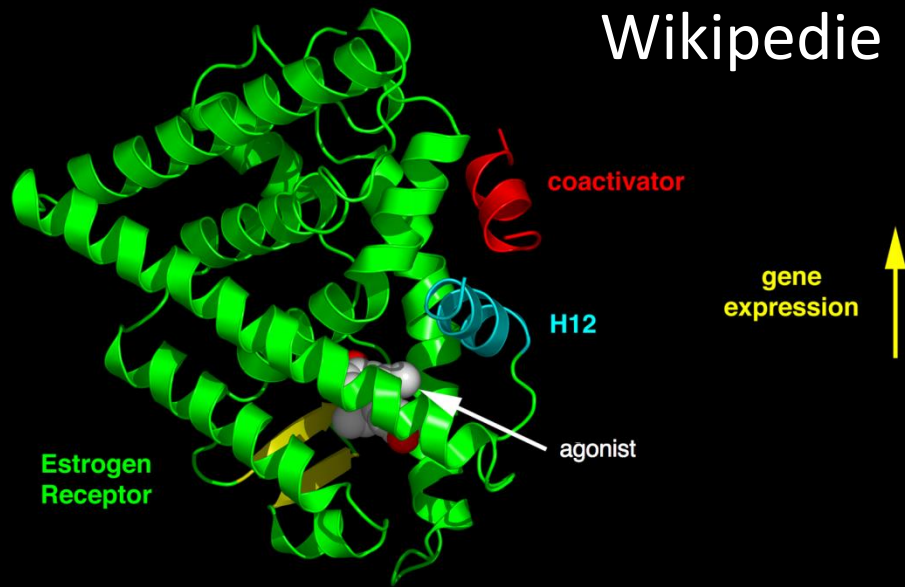


- některé rozpouštědla (např. močovina při vysoké koncentraci) přerušují nekovalentní vazby v proteinu a tím rozplétá jeho přirozenou konformaci – **denaturace**
- po odstranění močoviny se protein spontánně vrátí zpět do své původní konformace – **renaturace**
- důkaz o tom, že informace o trojrozměrné struktuře proteinu je obsažena v pořadí aminokyselin

# Konformace proteinů v buňce

- v buňce bývá konformace proteinů udržována tzv. **chaperony**, které chrání (zejména nově syntetizované proteiny) před nežádoucími interakcemi v přeplněné cytoplasmě
- ačkoli mají proteiny přirozenou konformaci, danou pořadím aminokyselin, v buňce **během interakcí s jinými molekulami** mohou svou **konformaci měnit** – tyto změny konformace mají **klíčový význam pro funkci proteinu** (např. protein inhibují nebo aktivují)
- příkladem může být funkce tzv. jaderných receptorů, které regulují transkripci na základě vazby ligandu

Wikipedie



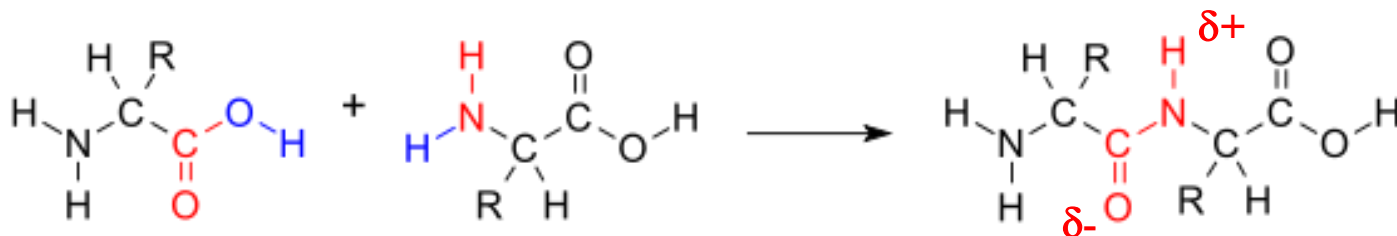
klíčová změna konformace, která po navázání *agonisty* umožní vazbu koaktivátoru a následný transport estrogenního receptoru do jádra, kde spouští přepis určitých genů

po vazbě *antagonisty* je konformace taková, že se koaktivátor vázat nemůže a přepis genů je utlumen

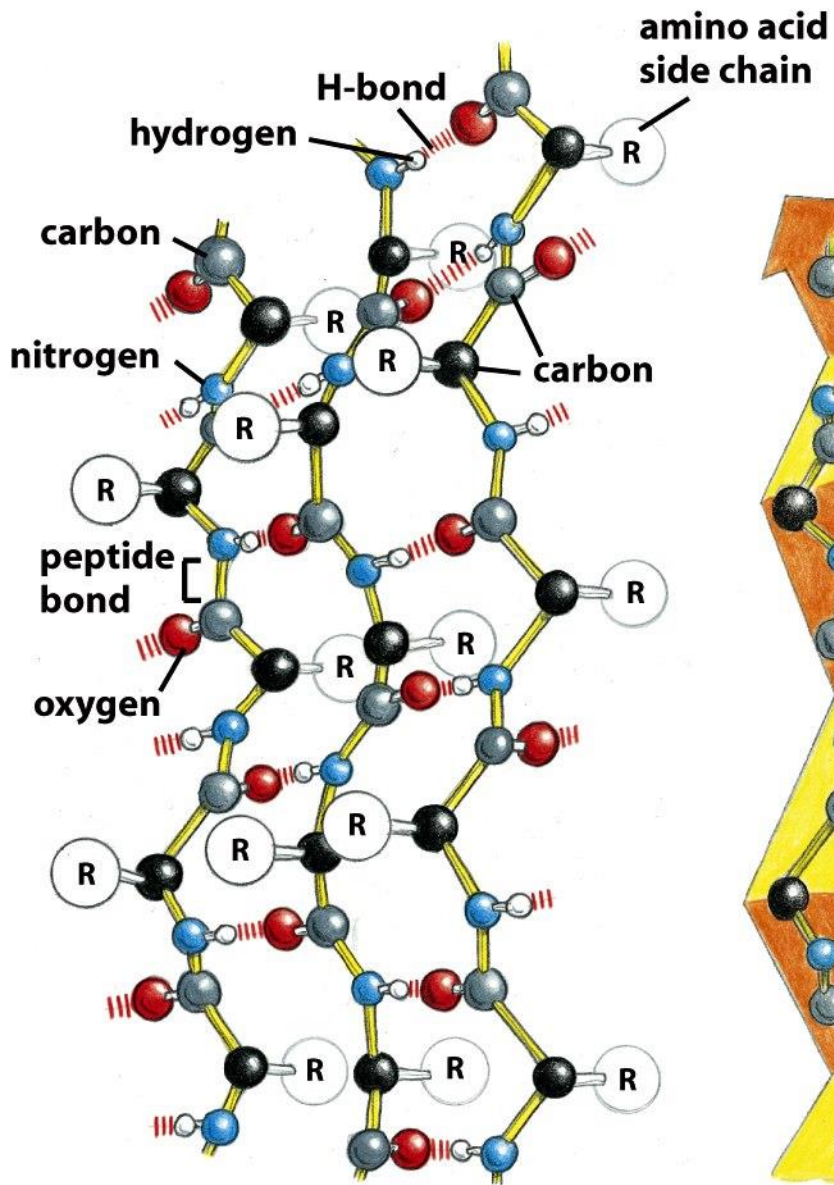


# Sekundární struktura proteinů

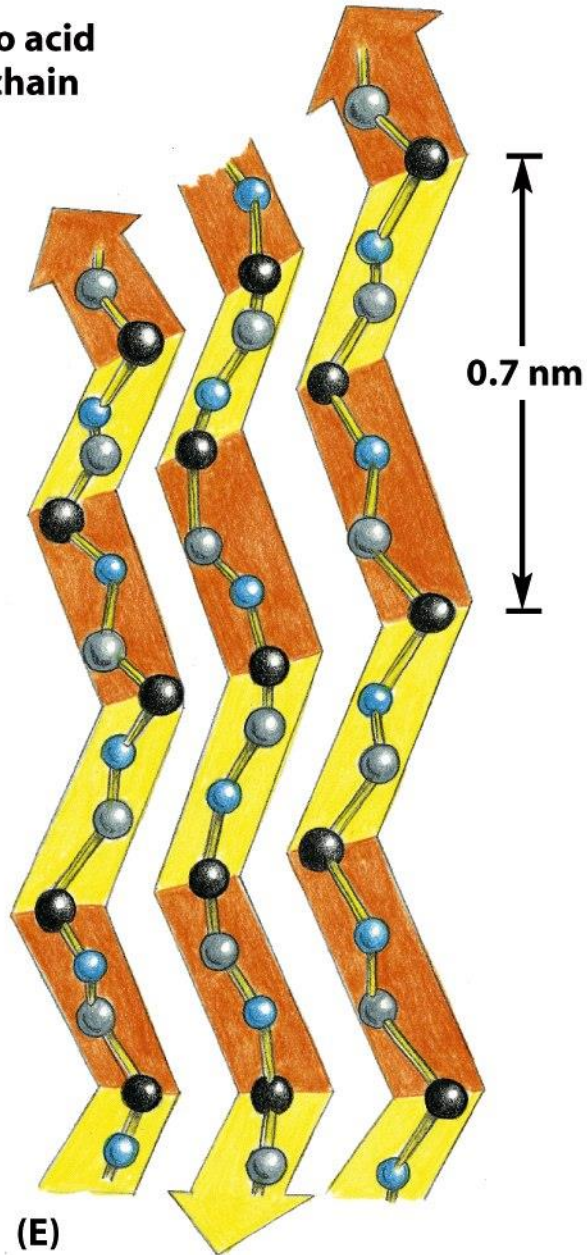
- dá se říci, že sekundární struktura proteinů vyplývá z takových **nekovalentních interakcí**, které působí **lokálně** mezi sobě **blízkými atomy**
- různé části nově syntetizovaného proteinu se nejčastěji složí do jedné ze dvou základních struktur:  **$\alpha$ -šroubovice** ( *$\alpha$ -helix*) nebo  **$\beta$ -struktury** (*struktura  $\beta$ -skládaného listu*)
- tyto dvě struktury jsou nejběžnější proto, že vycházejí z **vodíkových můstků mezi** skupinami **N-H** a **C=O** obsaženými hojně v proteinech ve formě peptidové vazby





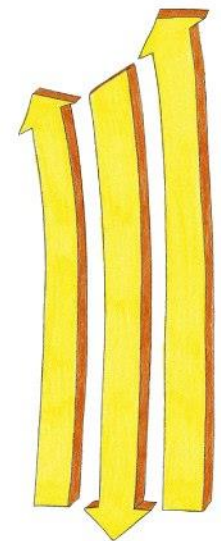


(D)



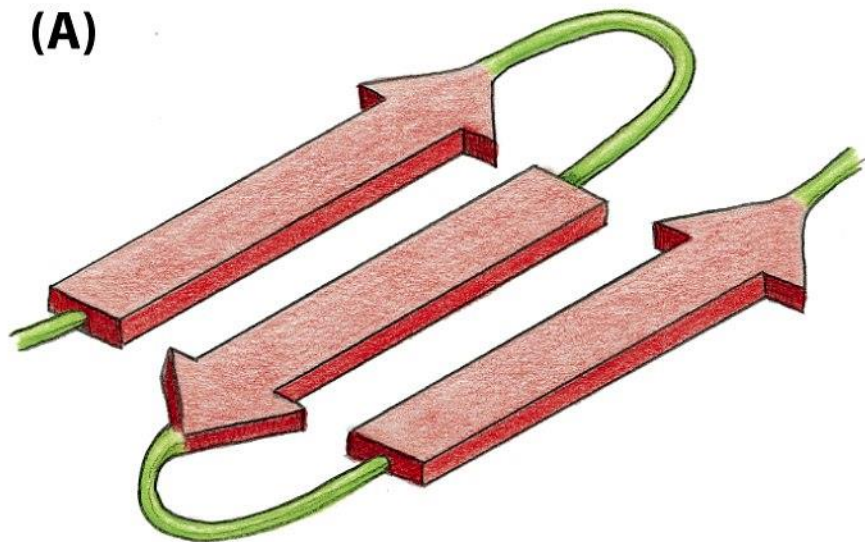
(E)

**β sheet**



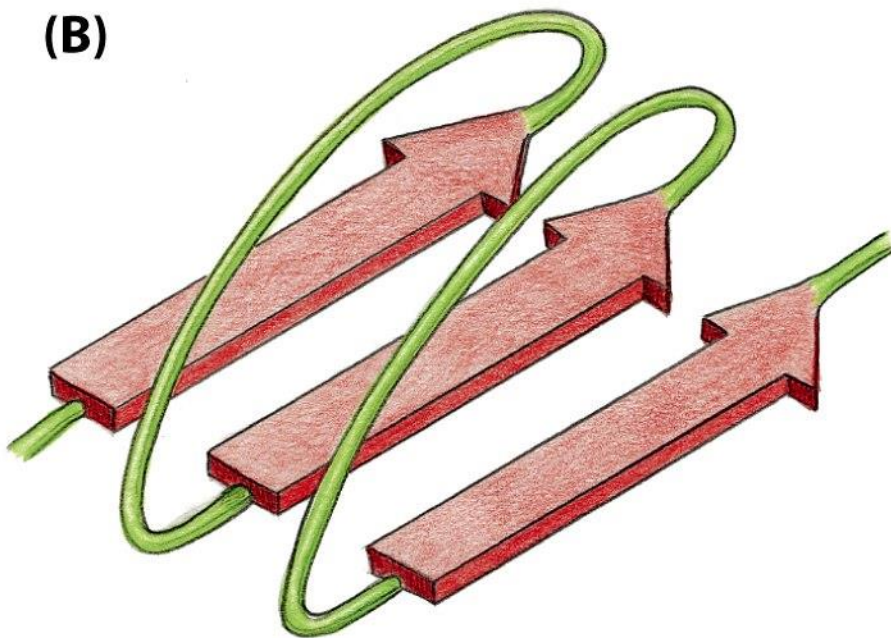
(F)

(A)



antiparalelní  $\beta$ -list

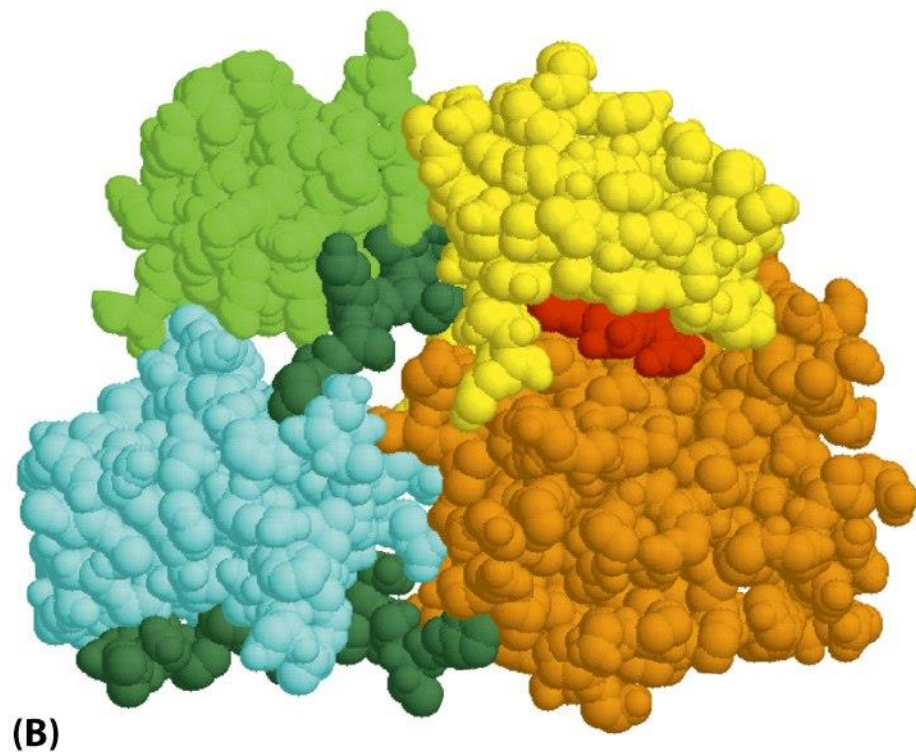
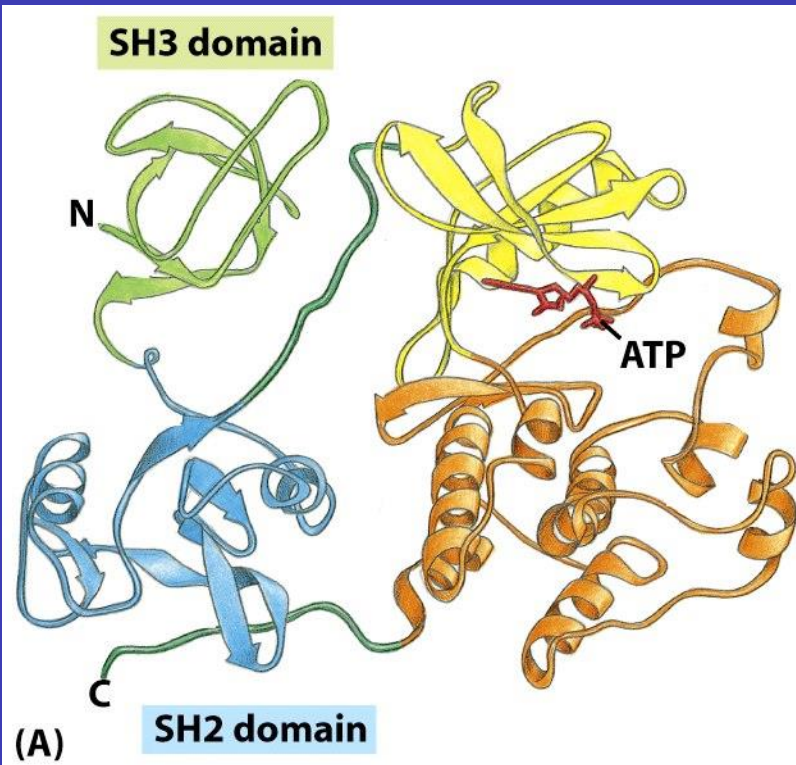
(B)



paralelní  $\beta$ -list

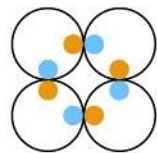
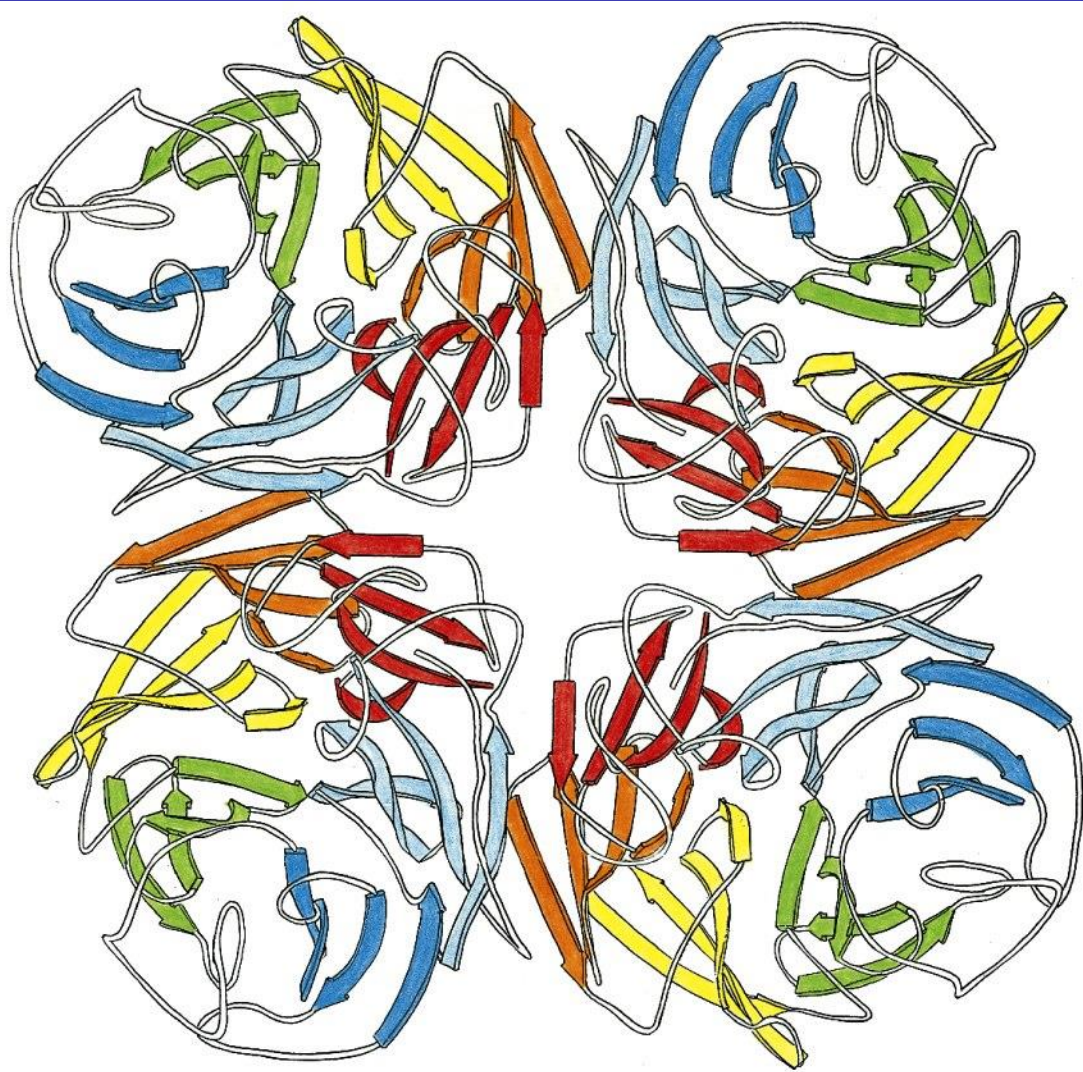
# Terciární struktura proteinů

- představuje **trojrozměrnou konformaci** polypeptidového řetězce
- na rozdíl od sekundární struktury se terciární struktura proteinů vytváří **nekovalentními interakcemi** mezi **vzdálenými atomy** tak, že se řetězec proteinu **stočí** a **přiblíží** prostorově jinému, v pořadí aminokyselin i velmi vzdálenému místu
- funkčními a strukturními jednotkami terciární struktury proteinu jsou tzv. **proteinové domény** (50-350 AA), které v principu mohou existovat, vyvíjet se a fungovat bez ohledu na zbytek proteinu



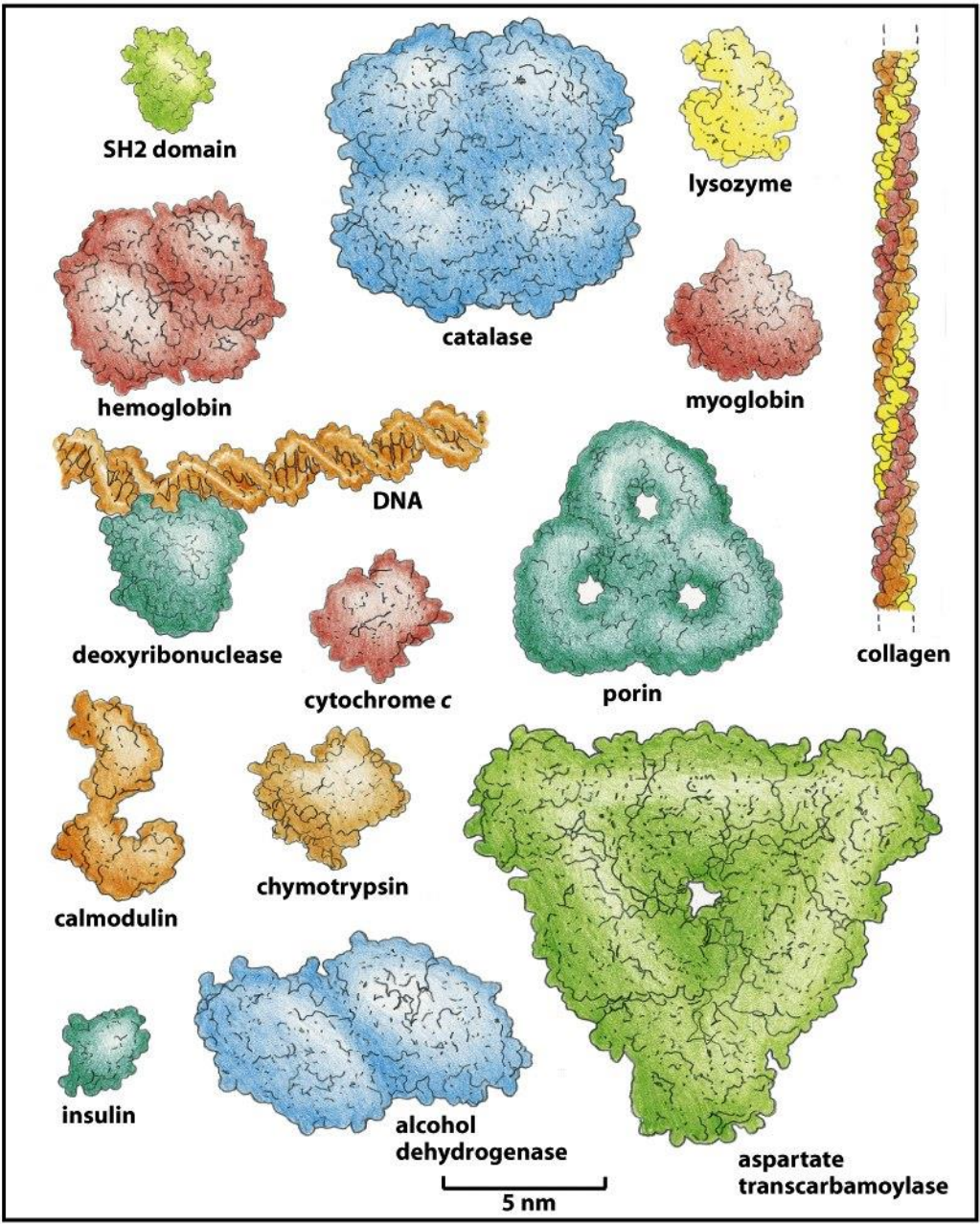
# Kvartévní struktura proteinů

- protein může obsahovat různá místa (**vazebná místa**), kde se vážou **nekovalentními vazbami** jiné (malé i velké) molekuly, např. jiné proteiny
- jsou-li takto spojeny dva či více polypeptidových řetězců (proteinů) dohromady, mluvíme o **kvartévní struktuře proteinů (komplexu dvou či více proteinů)**
- každý polypeptidový řetězec (protein) v takové struktuře se nazývá **podjednotkou**
- více podjednotek – dimery, trimery, tetramery...
- stejné podjednotky – **homodimery** (např. AR-AR), rozdílné podjednotky – **heterodimery** (např. TR-RXR)



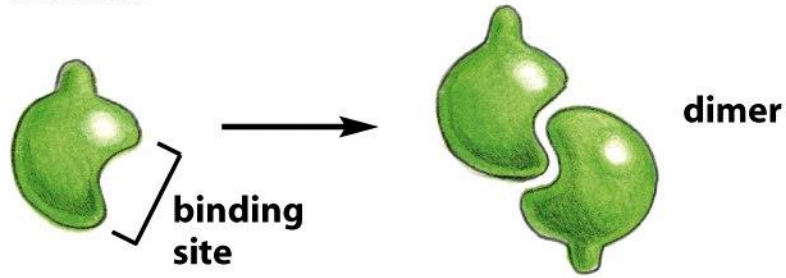
**tetramer of neuraminidase protein**



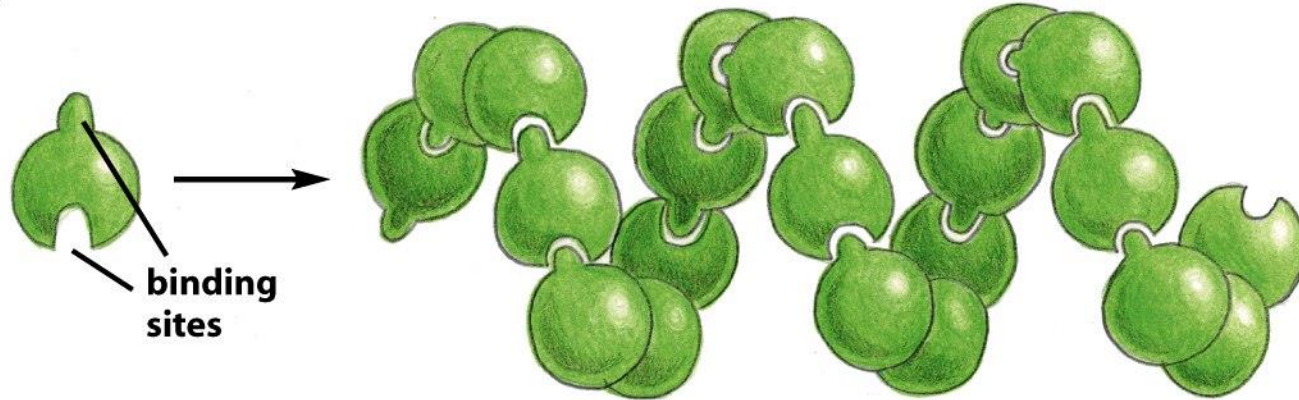


(A) free subunits

assembled structures

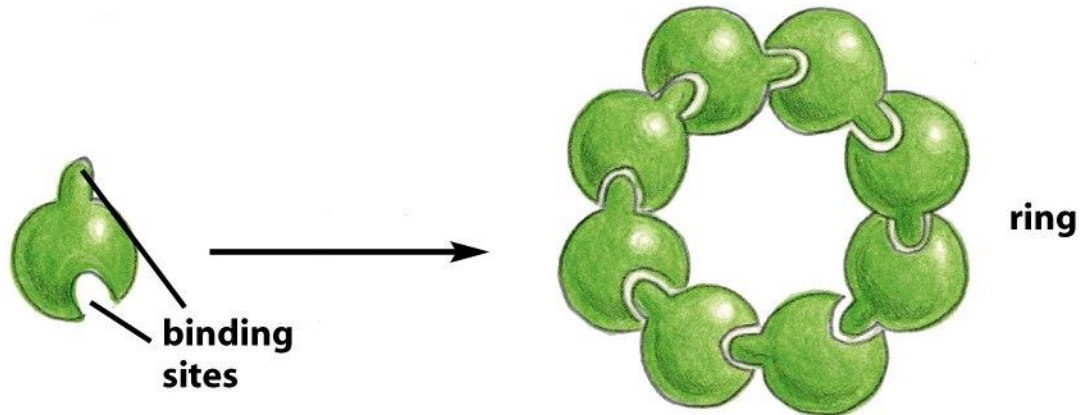


(B)



helix

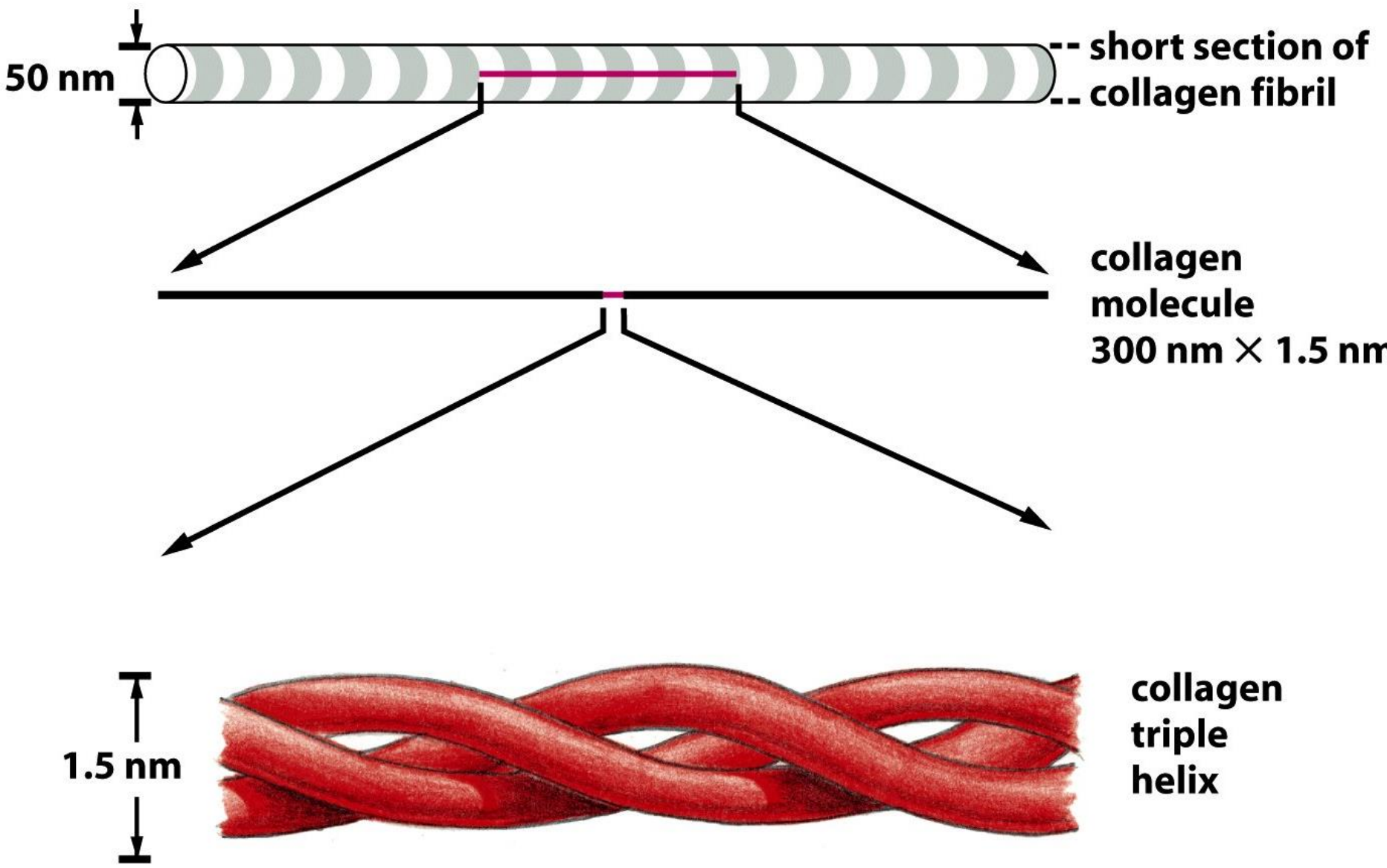
(C)



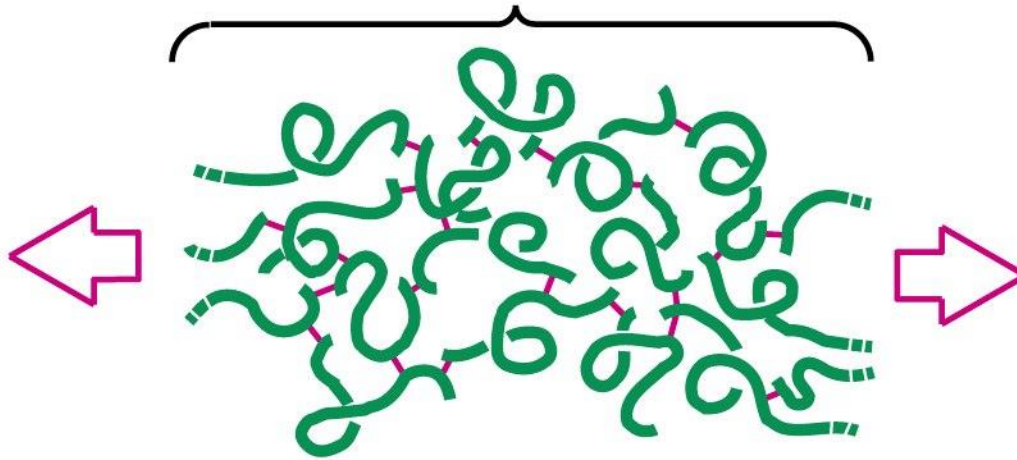
ring

# Globulární a fibrilární proteiny

- proteiny se mohou skládat do kompaktního, kulovitěho tvaru s nepravidelným povrchem – **globulární proteiny (většina enzymů)** nebo do podélných vláken – **fibrilární proteiny**
- fibrilární proteiny jsou součástí *intermediárních filament cytoskeletu* (**keratin**), jiné se často nacházejí vně buňky v tzv. *extracelulární matrix*, která udržuje soudržnost buněk při vzniku tkání – buňky je vylučují do okolí, kde se tyto proteiny spojují do listů nebo do vláken (**kolagen, elastin**)
- kolagen zodpovídá za **pevnost a soudržnost**, elastin zase svou **pružností** umožňuje kůži, tepnám, plicím atd. změnu tvaru bez roztržení



**elastic fiber**

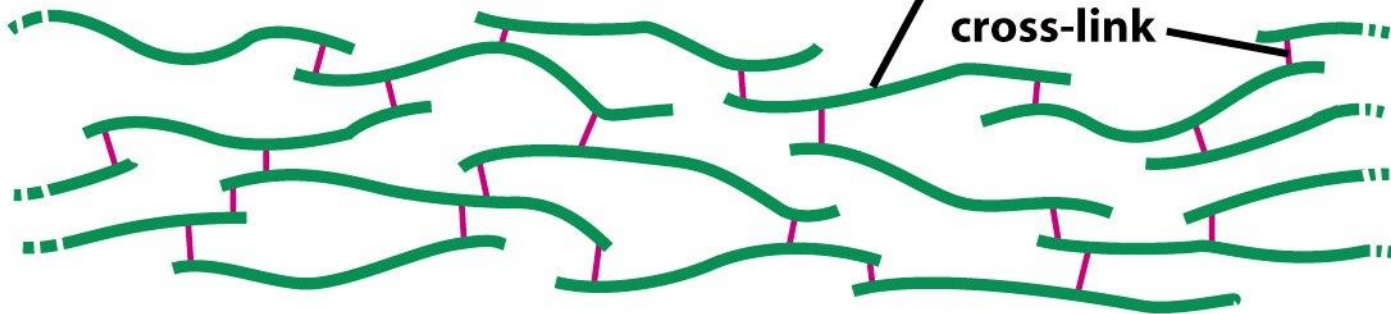


**STRETCH**

**RELAX**

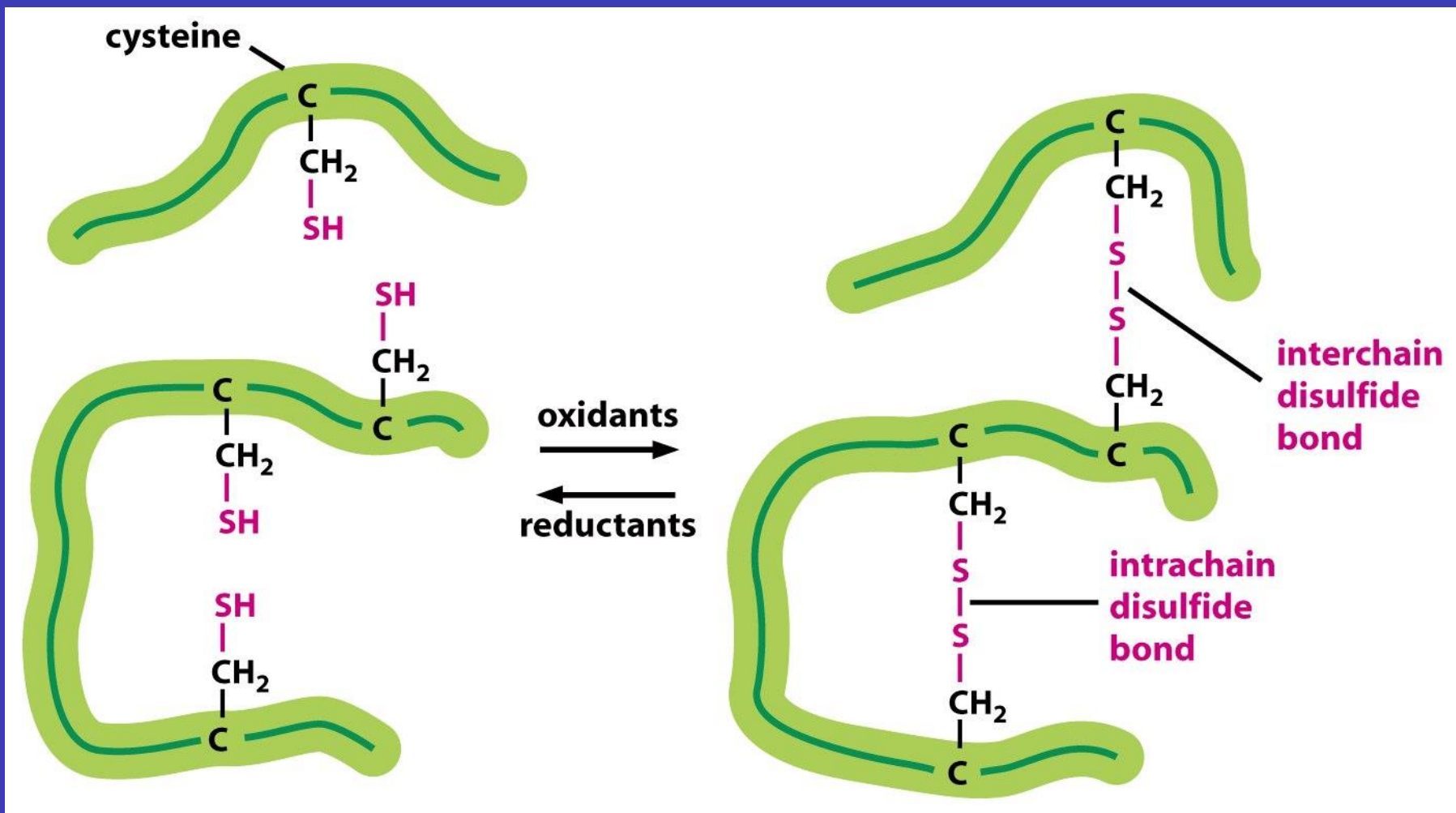
**single elastin molecule**

**cross-link**



# Kovalentní zesíťování proteinů

- ačkoli drtivou většinu interakcí uvnitř konformace proteinu tvoří nekovalentní vazby, zejména v případě extracelulárních proteinů můžeme najít i mnohem silnější, totiž **kovalentní vazbu**, která **stabilizuje konformaci proteinů** (může spojovat i více proteinů v rámci kvartérní struktury)
- touto kovalentní vazbou jsou **disulfidové můstky**, které vznikají oxidací dvou  $-SH$  skupin za vzniku skupiny  $-S-S-$
- ke vzniku těchto vazeb dochází v endoplasmatickém retikulu – v cytoplazmě jsou samovolně redukovány zpět na  $SH$  skupiny – stabilní jsou naopak mimo buňku

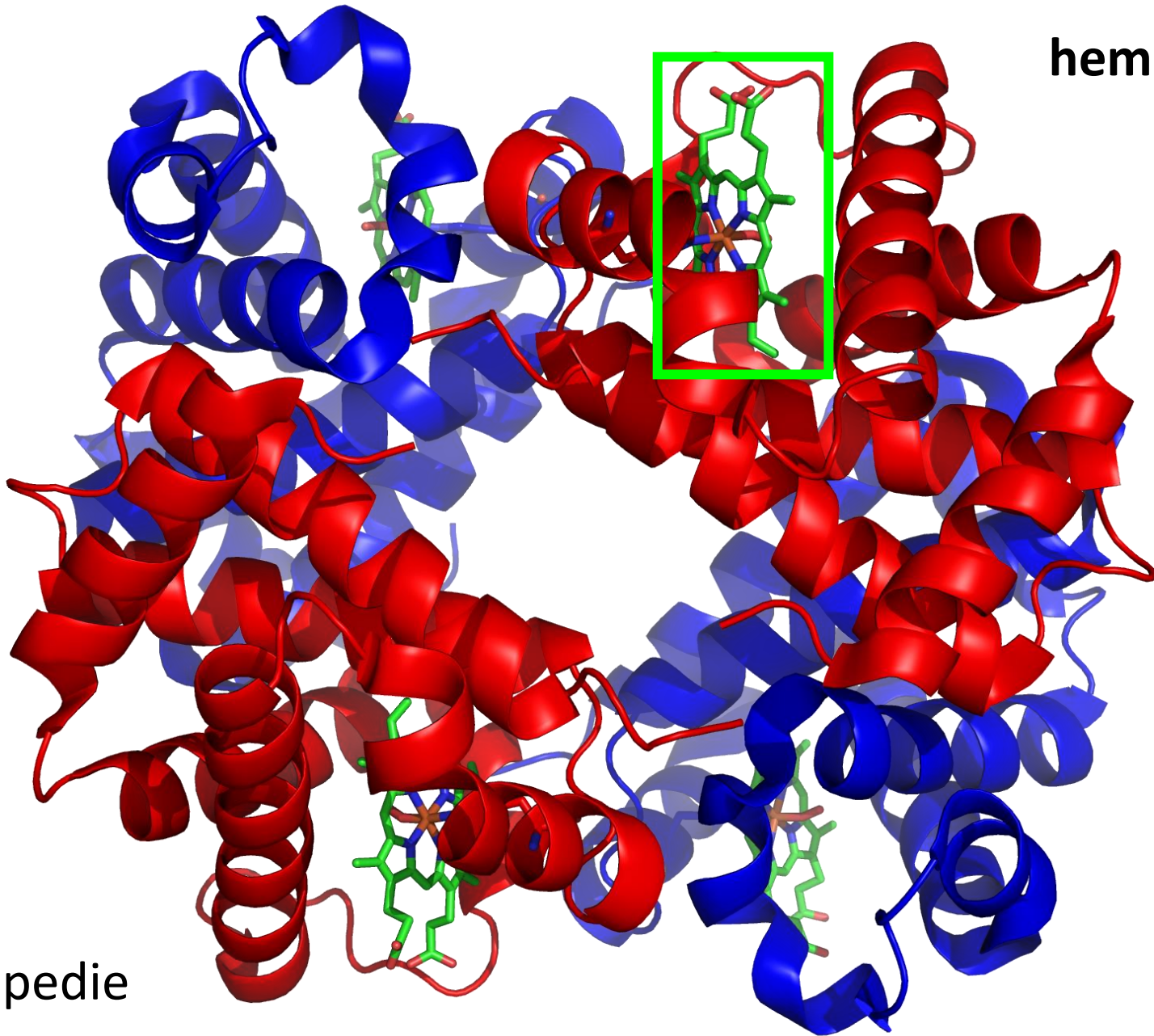


# Bílkovinná a nebílkovinná část proteinů

- mnohé proteiny obsahují kromě řetězce aminokyselin, spojených peptidovými vazbami, i **nebílkovinnou část**, která jim umožňuje vykonávat specifickou funkci (např. vázat kyslík a transportovat ho do tkání pomocí **hemu** v proteinu **hemoglobinu**)
- v případě **enzymů** se nebílkovinná část proteinu nazývá **kofaktor** a bílkovinná složka **apoenzym**
- apoenzym s navázaným kofaktorem vytváří funkční enzym – **holoenzym**
- kovalentně vázán kofaktor k apoenzymu – **prostetická skupina**, volně disociovatelný kofaktor – **koenzym**



hemoglobin

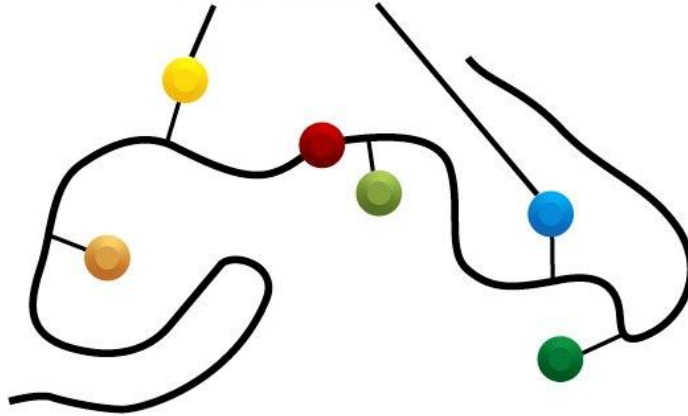


Wikipedie

# Ligand a vazebné místo

- biologické vlastnosti molekuly proteinu závisí na její **schopnosti fyzikální interakce** s jinými molekulami
- konformace proteinů umožňuje vytvářet v proteinu tzv. **vazebná místa**, která připomínají štěrbinu zámku, do něhož může padnout jen konkrétní klíč nebo několik málo klíčů a těmto „klíčům“ se obecně říká **ligandy**
- vazba ligandu do vazebného místa je vysoce specifická a je zprostředkována **nekovalentními interakcemi** (vodíkové můstky, elektrostatické interakce, van der Waalsovy síly, hydrofobní interakce)
- pevnost vazby ligandu ve vazebném místě určuje – jako u každé chemické reakce – **rovnovážná konstanta**

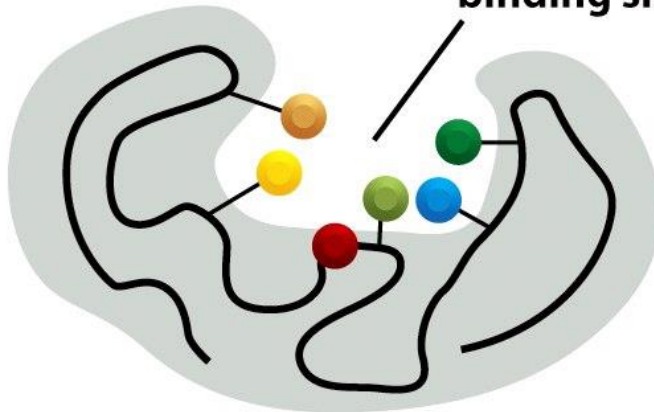
amino acid side chains



unfolded protein

FOLDING

binding site



folded protein



1



dissociation rate = dissociation rate constant  $\times$  concentration of AB

$$\text{dissociation rate} = k_{\text{off}} [\text{AB}]$$

2



association rate = association rate constant  $\times$  concentration of A  $\times$  concentration of B

$$\text{association rate} = k_{\text{on}} [\text{A}] [\text{B}]$$

3

**AT EQUILIBRIUM:**

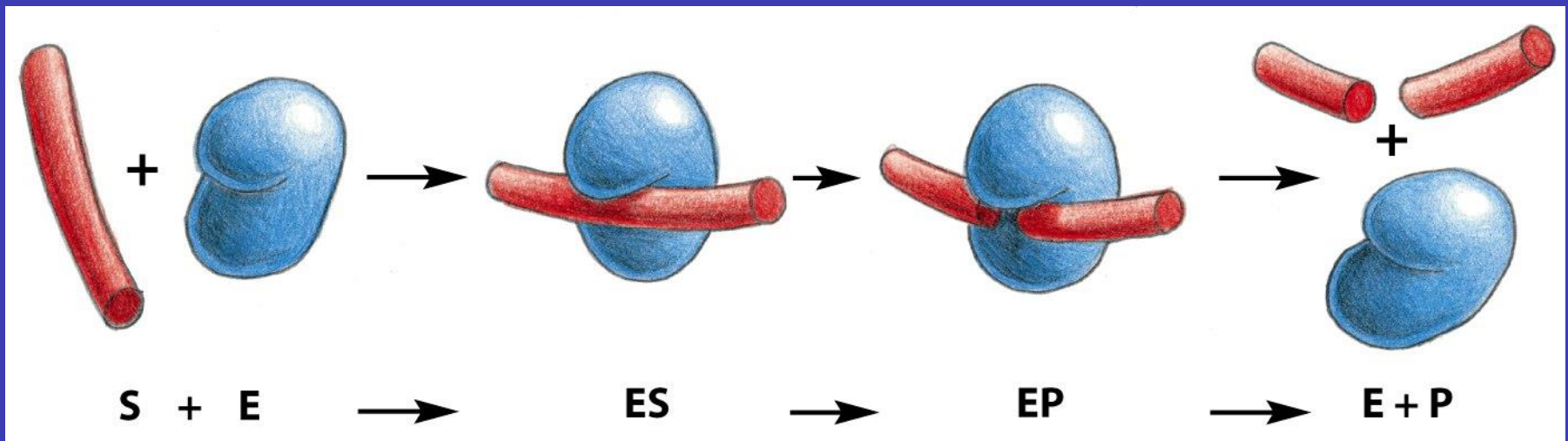
association rate = dissociation rate

$$k_{\text{on}} [\text{A}] [\text{B}] = k_{\text{off}} [\text{AB}]$$

$$\frac{[\text{AB}]}{[\text{A}][\text{B}]} = \frac{k_{\text{on}}}{k_{\text{off}}} = K = \text{equilibrium constant}$$

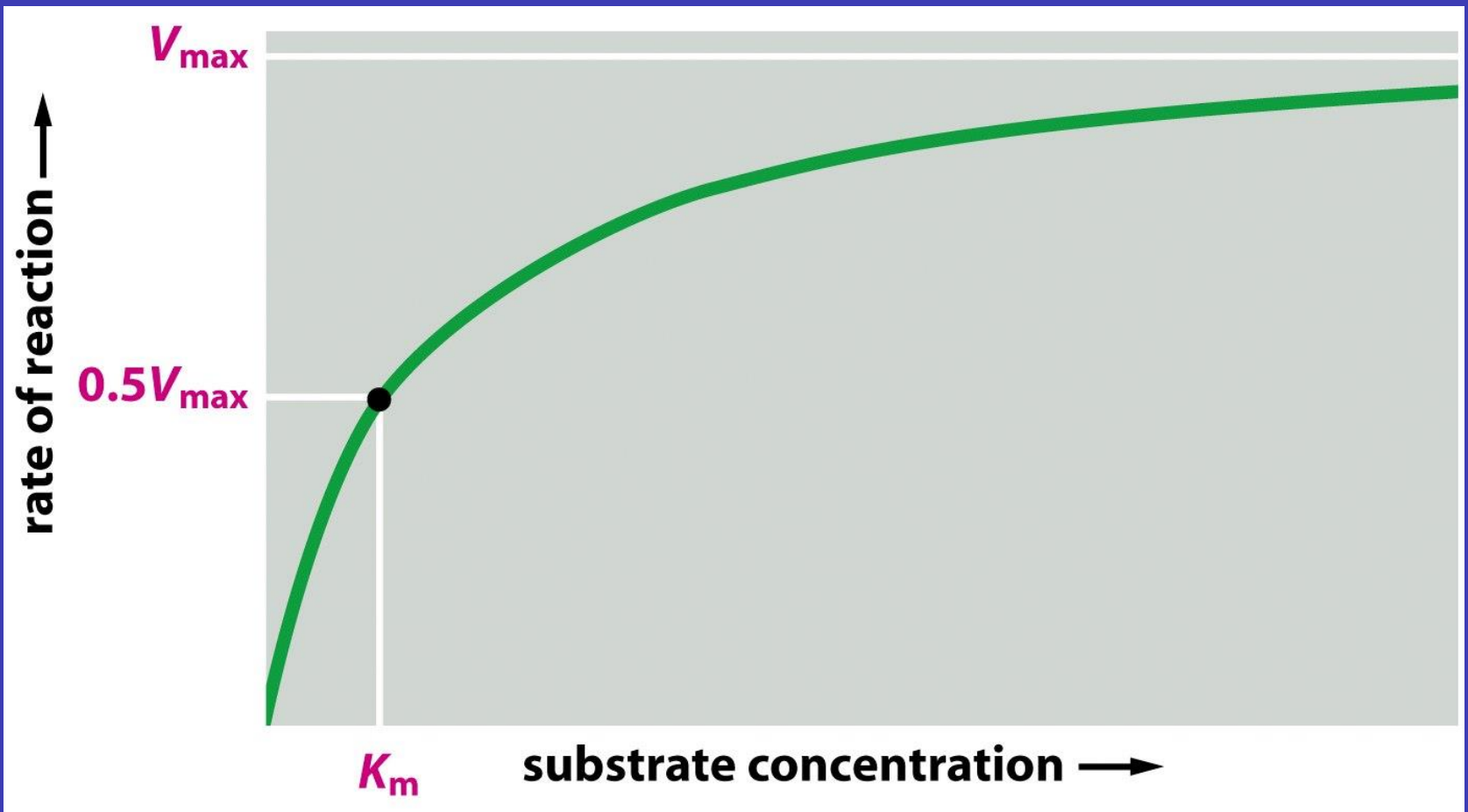
# Enzymy a aktivní místo

- v případě enzymů se vazebné místo pro jejich **substrát** (čili molekulu, kterou zpracovávají v katalyzované chemické reakci) nazývá **aktivní místo** – nejde tu totiž jenom o vazbu, ale i o následnou intervenci enzymu, která **snižuje aktivační energii** a **umožňuje průběh reakce**



# Účinnost enzymů

- když zvyšujeme koncentraci substrátu, dojdeme do stavu, kdy **všechny molekuly enzymu** jsou **obsazeny substrátem** a rychlost přeměny je maximální ( $v_{\max}$ )
- koncentrace substrátu nutná k tomu, aby enzym pracoval poloviční rychlostí ( $v_{\max}/2$ ) je **Michaelisova konstanta ( $K_m$ )** a charakterizuje vazbu enzym-substrát (čím **nižší  $K_m$** , tím **větší afinita** substrátu k enzymu a tím **pevnější vazba** mezi nimi)





# Regulace katalytické aktivity enzymů

- aktivita enzymů bývá **regulována**, a to buď **kladně** (zvyšuje se) nebo **záporně** (snižuje se) a může být realizována na mnoha úrovních (genová exprese, kompartmentace souborů enzymů, vazba regulačních molekul na enzym)
- příkladem **kladné regulace** může být situace, ve které **produkt** enzymatické aktivity, vznikající na jednom místě metabolismu, **aktivuje** tentýž enzym v jiné metabolické dráze
- příkladem **záporné regulace** je tzv. **zpětnovazebná inhibice**, u které se **produkt** reakce katalyzované daným enzymem váže na tento enzym a **zpomaluje** či zcela **zastavuje** jeho činnost

# Allosterické enzymy

- schopnost enzymů (proteinů) nabývat dvou **různých konformací**, jejichž **aktivita se liší**, se nazývá **allosterie** (allosterické proteiny jsou takové proteiny – a jsou to téměř všechny proteiny – které mají více stabilních konformací s různou aktivitou, přepínáním konformací pak lze regulovat funkci těchto proteinů)
- předpokladem je, že na povrchu enzymu se musí nacházet mimo aktivního místa (do něhož se váže substrát) i **jiné vazebné místo**, do něhož se váže **regulační molekula**, následkem čeho zpravidla dochází ke konformační změně enzymu
- typickým příkladem „přepnutí“ mezi konformacemi je **fosforylace** proteinů

**ACTIVE**



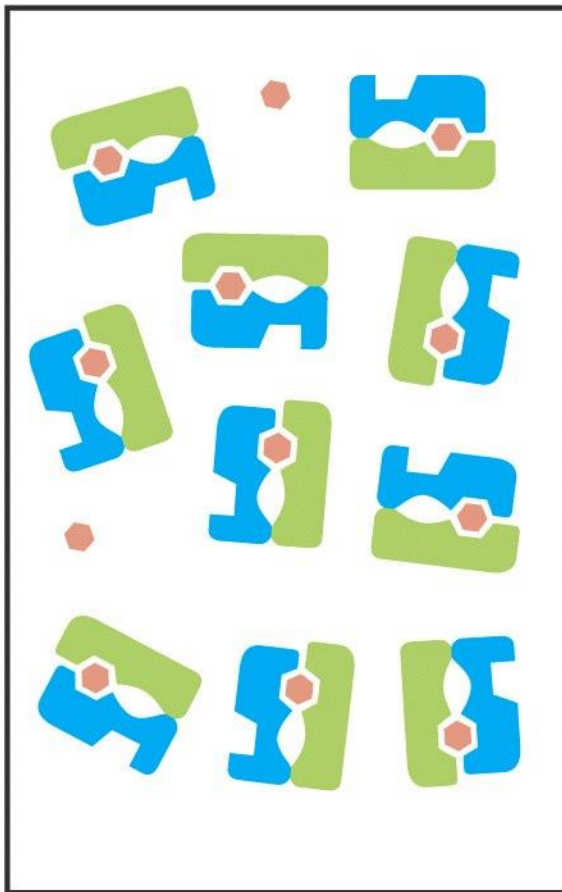
molecule X



glucose



**INACTIVE**

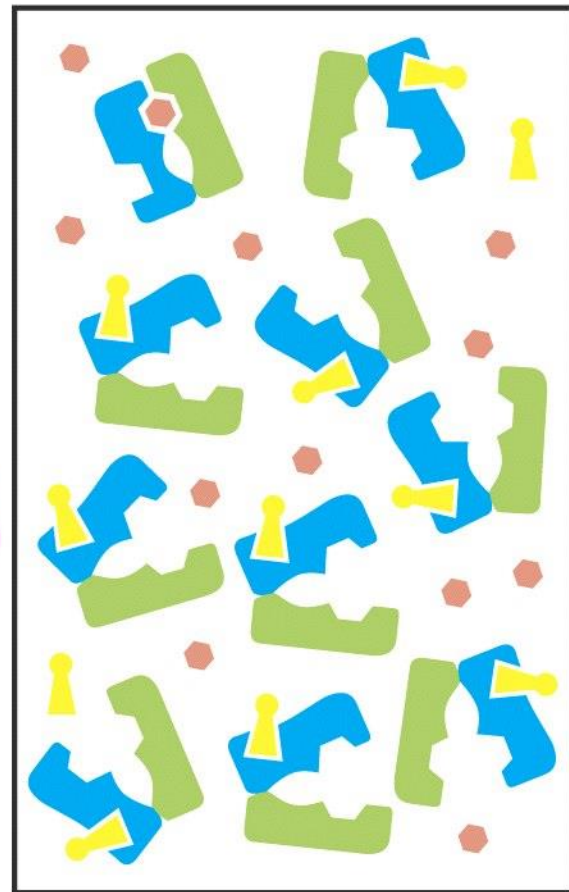


**100% active**

molecule X

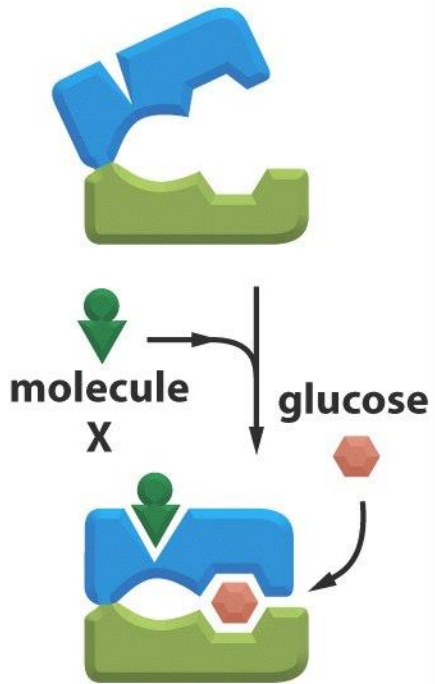


**negative regulation**

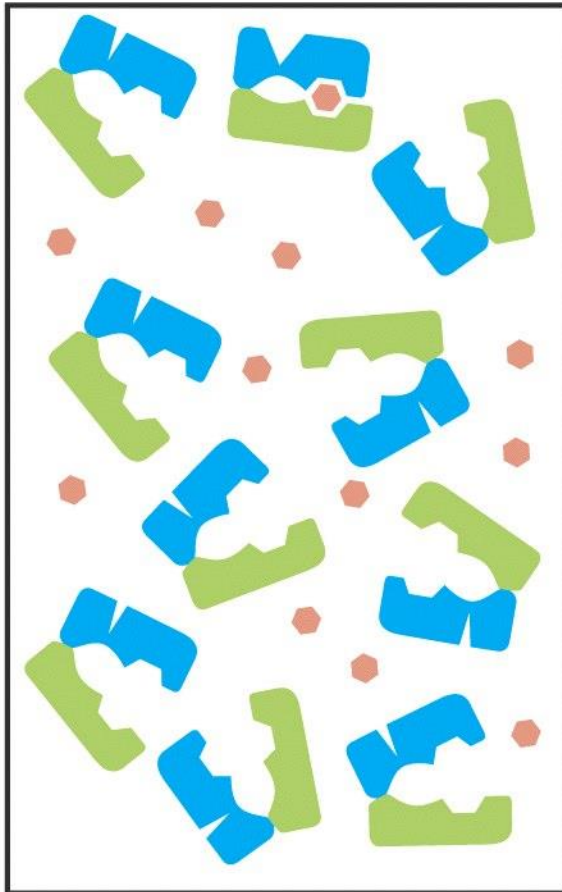


**10% active**

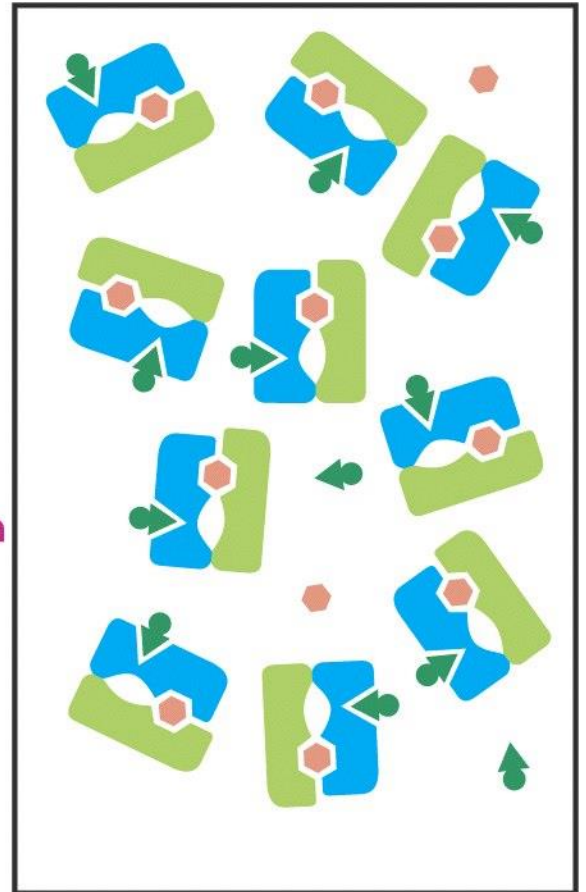
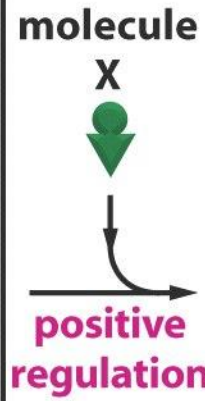
**INACTIVE**



**ACTIVE**



**10% active**



**100% active**

# Hlavní skupiny enzymů

**Table 3–1 Some Common Types of Enzymes**

ENZYME	REACTION CATALYZED
Hydrolases	general term for enzymes that catalyze a hydrolytic cleavage reaction; <i>nucleases</i> and <i>proteases</i> are more specific names for subclasses of these enzymes.
Nucleases	break down nucleic acids by hydrolyzing bonds between nucleotides.
Proteases	break down proteins by hydrolyzing bonds between amino acids.
Synthases	synthesize molecules in anabolic reactions by condensing two smaller molecules together.
Isomerases	catalyze the rearrangement of bonds within a single molecule.
Polymerases	catalyze polymerization reactions such as the synthesis of DNA and RNA.
Kinases	catalyze the addition of phosphate groups to molecules. Protein kinases are an important group of kinases that attach phosphate groups to proteins.
Phosphatases	catalyze the hydrolytic removal of a phosphate group from a molecule.
Oxido-Reductases	general name for enzymes that catalyze reactions in which one molecule is oxidized while the other is reduced. Enzymes of this type are often more specifically named either <i>oxidases</i> , <i>reductases</i> , or <i>dehydrogenases</i> .
ATPases	hydrolyze ATP. Many proteins with a wide range of roles have an energy-harnessing ATPase activity as part of their function, for example, motor proteins such as <i>myosin</i> and membrane transport proteins such as the <i>sodium–potassium pump</i> .

Enzyme names typically end in “-ase,” with the exception of some enzymes, such as pepsin, trypsin, thrombin and lysozyme that were discovered and named before the convention became generally accepted at the end of the nineteenth century. The common name of an enzyme usually indicates the substrate and the nature of the reaction catalyzed. For example, citrate synthase catalyzes the synthesis of citrate by a reaction between acetyl CoA and oxaloacetate.

# Motorové proteiny a proteinové stroje

- **motorové proteiny** využívají konformační změny k tomu, aby pohybovaly jinými molekulami
- aby pohyb probíhal jenom v jednom směru, je třeba zajistit, **aby alespoň jedna z konformačních změn byla nevratná** (třeba spojená s hydrolýzou ATP – krok „zpátky“ by vyžadoval syntézu ATP a tedy dodání energie, což nejde „samo“)
- proteiny spolu často vytvářejí velké komplexy, takto spolupracující soustava proteinů na konkrétním úkolu se nazývá **proteinový stroj** (takové „stroje“ obsluhují všechny komplexní děje v buňce jako je např. replikace DNA, syntéza a degradace proteinů atd.)

