

Proteíny

Proteíny

Proteíny sú polymérne reťazce zložené z monomérov, ktoré sa nazývajú aminokyseliny. Proteíny sú esenciálnou časťou každého biologického systému a participujú na každom procese v bunke. Spolu s nukleovými kyselinami, lipidmi a cukrami vytvárajú skupinu biopolymérov, ktoré podmieňujú existenciu živých systémov.

Niekoľko historických údajov

Slovo proteín (z gr. *prota* – primárna dôležitosť) prvýkrát použil Jacob Berzelius v roku 1838.

Prvý sekvenovaný proteín (určenie poradia aminokyselín v polypeptidovom reťazci) – **inzulín** – Frederick Sanger (Nobelova cena za chémiu 1958).

Prvá 3-D štruktúra proteínu - **myoglobín a hemoglobín** (1958) - Max Perutz a John Kendrew (Nobelova cena za chémiu 1962).

Funkcie a význam proteínov

Enzýmy - biokatalyzátory mnohých chemických reakcií v biologických systémoch

Transportné proteíny - prenos nevyhnutných látok pre zachovanie života vnútri biologického organizmu (myoglobín, hemoglobín, sérový albumín)

Proteíny plniace obrannú funkciu (imunoglobulíny)

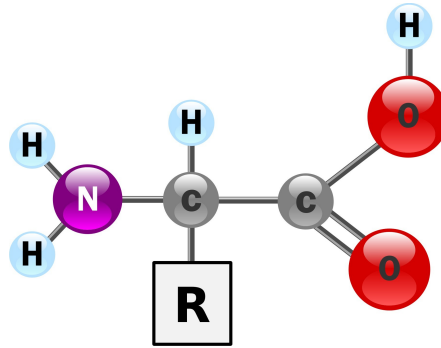
Hormóny - riadiace a regulačné molekuly (inzulín, somatotropín, rastové hormóny)

Štruktúrne proteíny (kolagén, elastín)

Proteíny slúžiace ako receptory vonkajších signálov (chemických, elektrických)

Aminokyseliny

Aminokyseliny sú organické molekuly, ktoré obsahujú amínovú a karboxylovú skupinu. V štruktúre proteínov sa nachádzajú α -aminokyseliny, v ktorých sú $-\text{NH}_2$ a $-\text{COOH}$ skupiny naviazané na jeden atóm uhlíka (C_α -atóm).



Všeobecný vzorec α -aminokyseliny (prevzaté z Wikipédie)

Konfigurácia okolo C_α atómu je v aminokyselinách nachádzajúcich sa v proteínoch L- konfigurácia.

Aminokyseliny sú v polypeptidovom reťazci spojené prostredníctvom peptidovej väzby.

Bočné aminokyselinové reťazce sú rozdelené do troch kategórií: nepolárne, polárne bez náboja, polárne s nábojom.

Chemická štruktúra a vlastnosti aminokyselín

aminokyseliny	symbol	štruktúra *	pK ₁ (COOH)	pK ₂ (NH ₂)	pK R skupiny
aminokyseliny s alifatickou R-skupinou					
Glycín	Gly - G	$\begin{array}{c} \text{H}-\text{CH}-\text{COOH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$	2.4	9.8	
Alanín	Ala - A	$\begin{array}{c} \text{CH}_3-\text{CH}-\text{COOH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$	2.4	9.9	
Valín	Val - V	$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C} \\ \\ \text{H}_3\text{C}-\text{CH}-\text{CH}-\text{COOH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$	2.2	9.7	
Leucín	Leu - L	$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C} \\ \\ \text{H}_3\text{C}-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COOH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$	2.3	9.7	
Isoleucín	Ile - I	$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C} \\ \\ \text{H}_3\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{CH}-\text{COOH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$	2.3	9.8	

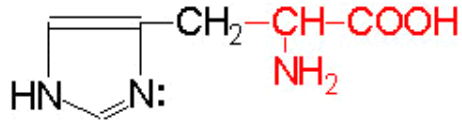
Chemická štruktúra a vlastnosti aminokyselín

aminokyseliny	symbol	štruktúra *	pK ₁ (COOH)	pK ₂ (NH ₂)	pK R skupina
nearomatické aminokyseliny s hydroxylovými R-skupinami					
Serín	Ser - S	$\text{HO}-\text{CH}_2-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{COOH}$	2.2	9.2	~13
Threonín	Thr - T	$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C} \\ \\ \text{HO}-\text{CH}-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{COOH} \end{array}$	2.1	9.1	~13
aminokyseliny s R-skupinami obsahujúcimi síru					
Cysteín	Cys - C	$\text{HS}-\text{CH}_2-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{COOH}$	1.9	10.8	8.3
Metionín	Met-M	$\text{H}_3\text{C}-\text{S}-(\text{CH}_2)_2-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{COOH}$	2.1	9.3	

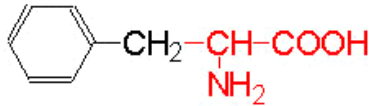
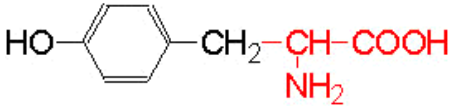
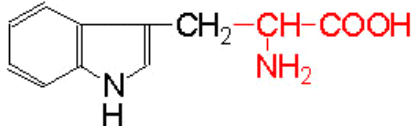
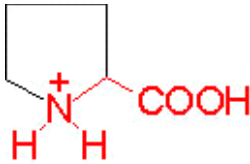
Chemická štruktúra a vlastnosti aminokyselín

aminokyseliny	symbol	štruktúra*	pK ₁ (COOH)	pK ₂ (NH ₂)	pK R skupina
kyslé aminokyseliny a ich amidy					
Kyselina asparagová	Asp - D	$\text{HOOC}-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{COOH}$	2.0	9.9	3.9
Asparagín	Asn - N	$\text{H}_2\text{N}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{COOH}$	2.1	8.8	
Kyselina glutamová	Glu - E	$\text{HOOC}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{COOH}$	2.1	9.5	4.1
Glutamín	Gln - Q	$\text{H}_2\text{N}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{COOH}$	2.2	9.1	

Chemická štruktúra a vlastnosti aminokyselín

aminokyseliny	symbol	štruktúra*	pK ₁ (COOH)	pK ₂ (NH ₂)	pK R skupina
zásadité aminokyseliny					
Arginín	Arg - R	$ \begin{array}{c} \text{HN}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COOH} \\ \qquad \qquad \qquad \\ \text{C}=\text{NH} \qquad \qquad \text{NH}_2 \\ \\ \text{NH}_2 \end{array} $	1.8	9.0	12.5
Lyzín	Lys - K	$ \text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_4-\text{CH}-\text{COOH} \\ \\ \text{NH}_2 $	2.2	9.2	10.8
Histidín	His - H		1.8	9.2	6.0

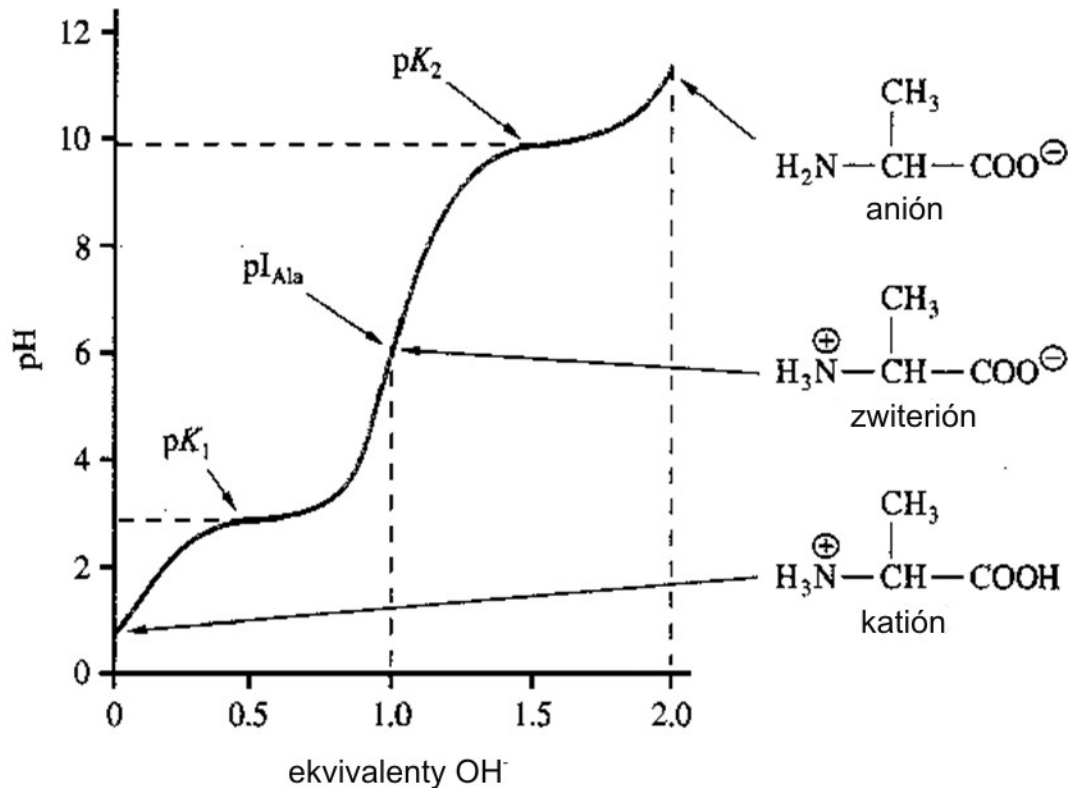
Chemická štruktúra a vlastnosti aminokyselín

aminokyseliny	symbol	štruktúra*	pK ₁ (COOH)	pK ₂ (NH ₂)	pK R skupina
aminokyseliny s aromatickými kruhmi					
Fenylalanín	Phe - F		2.2	9.2	
Tyrozín	Tyr - Y		2.2	9.1	10.1
Tryptofán	Trp-W		2.4	9.4	
Imino kyseliny					
Prolín	Pro - P		2.0	10.6	

Ionizačné formy aminokyselín

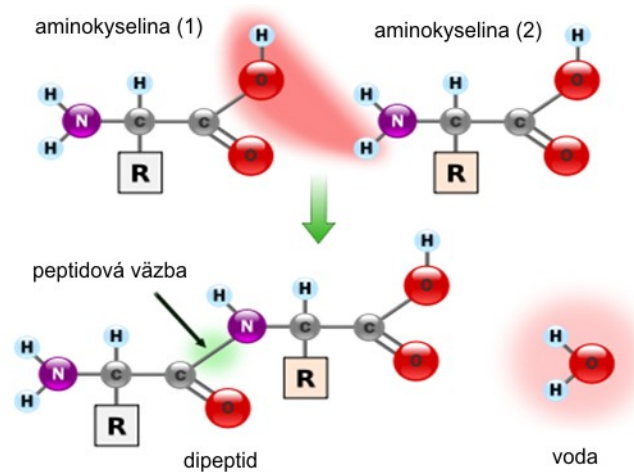
Vlastnosti proteínov závisia aj od ionizačného stavu bočných reťazcov aminokyselín. Tento ionizačný (nábojový) stav je funkciou pH.

Nábojové formy aminokyseliny alvcín

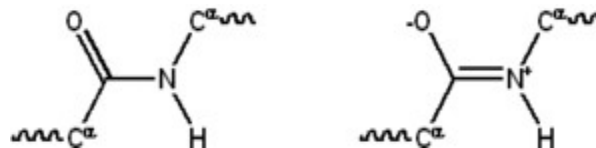


Peptidová väzba

Väzba spájajúca dve susedné aminokyseliny v polypeptidovom reťazci sa nazýva peptidová väzba.



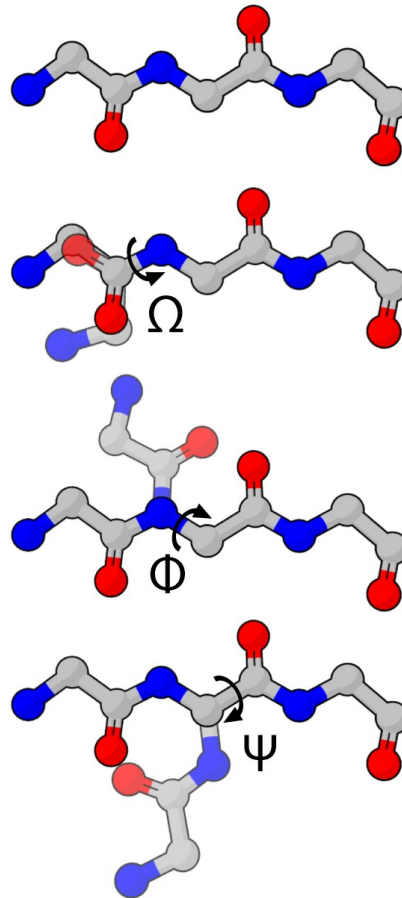
Rotácia okolo väzby C-N je znemožnená (atómy C=O, NH, C α_{i-1} , C α_i sa nachádzajú v jednej rovine). Je to spôsobené existenciou rezonančných foriem peptidovej väzby, čoho dôsledkom je čiastočne dvojitá väzba medzi atómami C a N.



Rezonančné formy peptidovej väzby (prevzaté z Wikipédie)

Geometria peptidovej väzby

Rotácie možné okolo väzieb C-C α (ψ), N- C α (Φ)- uhly týchto rotácií určujú štruktúru polypeptidového reťazca.



Polypeptidový reťazec

Polypeptidový reťazec sa v bunkách tvorí v ribozómoch (minoritne aj v mitochondriách). Poradie aminokyselín je určené poradím nukleotidov v mRNA, ktoré je určené poradím nukleotidov v DNA.

Centrálne dogma molekulovej biológie

Prenos informácie v smere:

DNA \Rightarrow RNA \Rightarrow proteín

Jedna aminokyselina je kódovaná tripletom nukleotidov.

počet možných variácií trinukleotidov - 64

počet aminokyselín - 20

Niektoré aminokyseliny sú kódované viacerými nukleotidovými tripletmi (degenerácia genetického kódu).

Štruktúry proteínov

primárna štruktúra

- poradie aminokyselín v polypeptidovom reťazci

sekundárna štruktúra

- lokálne 3-D „zbalenie“ (folding) polypeptidového reťazca
- najčastejšie sa vyskytujúce štruktúry:
 - α - závitnica,
 - β - skladaný list,
 - β - sľučka

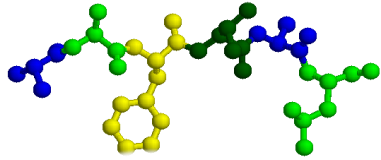
terciárna štruktúra

- celková 3-D štruktúra polypeptidu, zahŕňa v sebe vzájomné priestorové usporiadanie bočných reťazcov a geometriu usporiadania medzi vzdialenými časťami polypeptického reťazca

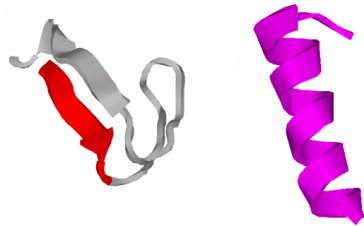
kvartérna štruktúra

- vzájomné usporiadanie viacerých polypeptidov v proteíne

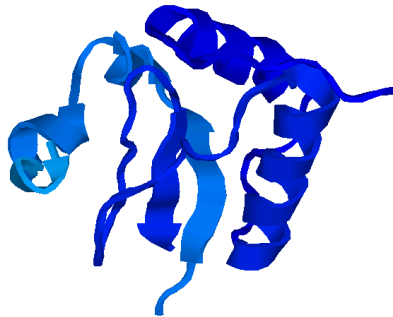
Schématické znázornenie hierarchie proteínových štruktúr



- primárna štruktúra



- sekundárna štruktúra



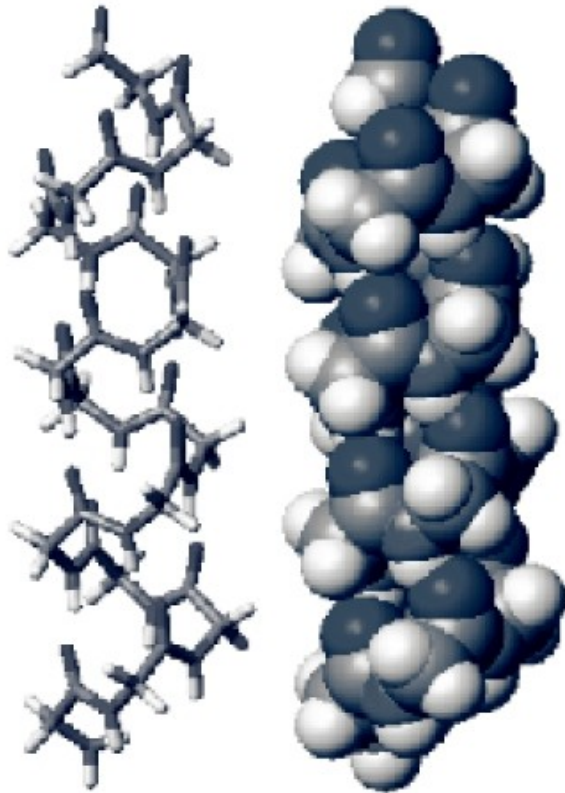
- terciárna štruktúra



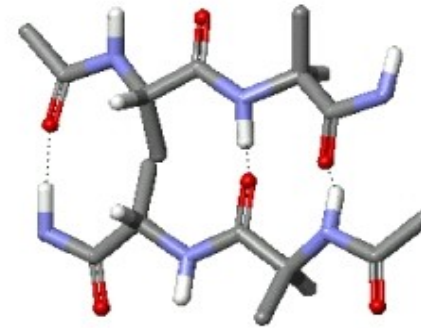
- kvartérna štruktúra



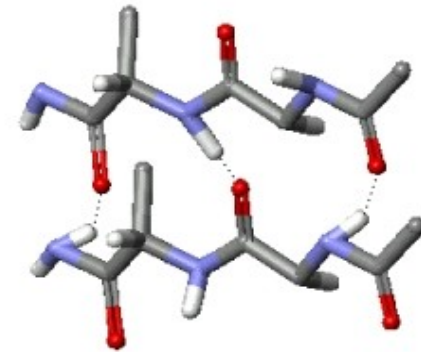
Sekundárne štruktúry proteínov



α -závitnica



(a)



(b)

β -skladaný list

a) paralelný

b) antiparalelný

Vzt'ah medzi jednotlivými štruktúrami

Všetky štruktúry sú determinované primárnou štruktúrou.

Úloha - predpovedať 3-D štruktúru na základe poradia aminokyselín v polypeptidovom reťazci (problém „protein folding“).

3-D štruktúra vyjadruje a vysvetľuje funkciu proteínu.

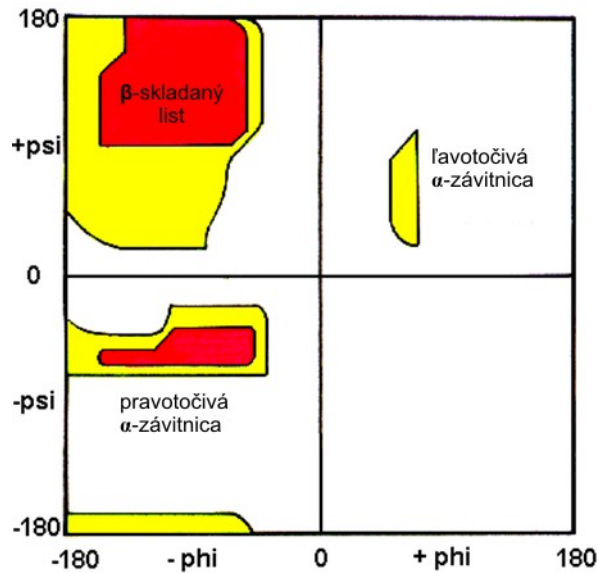
V súčasnosti je známych okolo 200 000 primárnych štruktúr proteínov, ale len 40 000 3-D štruktúr.

3D štruktúry sa získavajú predovšetkým pomocou röntgenštruktúrnej analýzy (X-ray) a NMR experimentov.

Dáta a údaje o štruktúrach proteínov sa dajú získať z rôznych databáz. Najvýznamnejšia databáza v tomto smere je Protein Data Bank (PDB, www.rcsb.org/pdb) - RCSB znamená Research Collaboratory for Structural Bioinformatics.

Ramachandrova mapa

Táto mapa znázorňuje veľkosti torzných uhlov φ a ψ pre jednotlivé aminokyselinové zvyšky v proteíne. Hodnoty φ a ψ nemôžu byť zo stérických dôvodov ľubovoľné. Existujú "územia" dvojíc φ a ψ , ktoré sa v proteínoch nevyskytujú. Pre jednotlivé typy sekundárnych štruktúr existujú charakteristické oblasti v Ramachandrovej mape.



Rozpustnosť (solubilita) proteínov

Rozpustnosť (solubilita) proteínov a ich komplexov s inými biomakromolekulami (proteíny, nukleové kyseliny, lipidy, cukry) zohráva dôležitú úlohu vo fyziológii, patológii, izolácii proteínov.

Rozpustnosť proteínov je funkciou pH, iónovej sily prostredia, teploty, tlaku.

Vplyv pH na solubilitu proteínov

Proteíny vo svojej štruktúre obsahujú aminokyselinové zvyšky s rôznymi pK. Pri nízkom pH majú proteíny celkovo kladný náboj, pri zásaditom pH naopak obsahujú celkovo záporný náboj. Hodnota pH, pri ktorej je molekula proteínu neutrálna, sa nazýva izoelektrický bod (pI). Neznamená to, že v tomto prípade proteín neobsahuje elektricky nabitú skupinu, avšak počet kladne nabitých skupín sa musí rovnať počtu záporne nabitých skupín.

V okolí izoelektrického bodu existuje najnižšia rozpustnosť proteínov (veľká pravdepodobnosť precipitácie). Táto skutočnosť sa využíva pri separácii a izolácii proteínov.

Solubilita proteínov – vplyv iónovej sily

Solubilita proteínov pri nízkych iónových silách vzrastá s koncentráciou solí - tzv. **vsoľovanie** (angl. salting in). Je to umožnené tým, že pri nízkych iónových silách existujú medzi molekulami proteínov príťažlivé interakcie prostredníctvom opačne nabitých častí týchto molekúl, čo znižuje rozpustnosť. Zvýšením koncentrácie solí sa znižuje veľkosť týchto interakcií, čím dochádza k zvyšovaniu rozpustnosti.

Pri veľmi vysokých iónových silách sú náboje na molekulách proteínu tierené \Rightarrow existencia len veľmi slabých elektrostatických interakcií medzi molekulami proteínu, čo vedie k nízkej rozpustnosti. Tento fenomén sa nazýva **vysoľovanie** (angl. salting out).

Vysoľovanie patrí medzi významné postupy pri izolácii a purifikácii proteínov.

Stabilita štruktúry proteínov

Sily určujúce stabilitu polypeptidového reťazca: vnútromolekulové vodíkové väzby, vodíkové väzby s molekulami rozpúšťadla, hydrofóbne interakcie aminokyselinových zvyškov (tieto zvyšky tvoria tzv. jadro proteínu), elektrostatické interakcie medzi nabitými časťami proteínu.

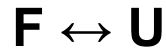
Stabilita determinovaná vonkajšími faktormi: teplotou, pH prostredia, iónovou silou, typom rozpúšťadla.

Pre mnoho proteínov musí byť štruktúra dostatočne flexibilná, aby proteín plnil svoju funkciu (napr. zmena štruktúry enzýmu po naviazaní substrátu).

Musí existovať súlad medzi stabilitou a aktivitou proteínu (enzýmu).

Denaturácia proteínov

Denaturácia proteínov – proces, pri ktorom prechádza proteín z usporiadaného do neusporiadaného stavu.



F - usporiadaná forma proteínu (angl. folded)

U - neusporiadaná forma proteínu (angl. unfolded)

Za daných podmienok (pH, teplota, iónová sila...) je rovnováha medzi F a U charakterizovaná rovnovážnou konštantou:

$$K = [U]/[F]$$

Na predpoklade, že proces denaturácie je vratný, sú odvodené vzťahy na určenie termodynamických parametrov charakterizujúcich denaturáciu proteínov. Tieto vzťahy sa však dajú relatívne veľmi dobre aplikovať aj pri štúdiu nevratnej denaturácie proteínov. Nevratnosť denaturácie môže byť spôsobená agregáciou molekúl po denaturácii, prílišnou veľkosťou študovaného proteínu (veľké proteíny majú „ťažkosti“ pri samovoľnom zbalovaní).

Tepelná denaturácia proteínov

Tepelná denaturácia proteínov je spôsobená teplom.
Pre zmenu Gibbsovej energie v procese denaturácie platí:

$$\Delta G_d = \Delta H_d - T \cdot \Delta S_d$$

ΔG_d , ΔH_d a ΔS_d predstavujú rozdiel Gibbsovej energie, entalpie a entropie medzi denaturovaným a natívnym stavom proteínu.

Teplota, pri ktorej je koncentrácia denaturovaného proteínu rovná koncentrácii natívneho proteínu, sa nazýva teplota topenia (denaturácie, prechodu) - T_d . V tomto prípade platí rovnosť:

$$\Delta G_d = \Delta H_d - T_d \cdot \Delta S_d = 0 \Rightarrow \Delta S_d = \Delta H_d / T_d$$

Hodnota ΔH_d sa dá priamo určiť prostredníctvom merania na diferenčnom skenujúcom kalorimetri (DSC).

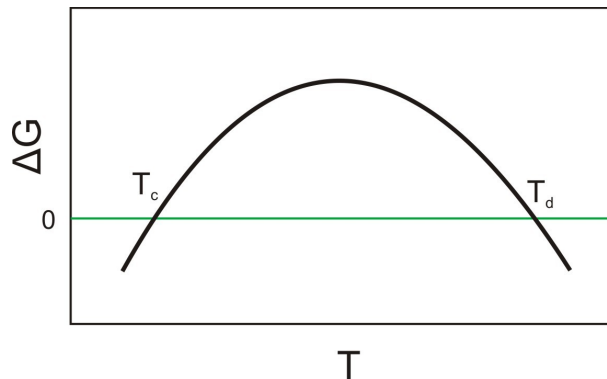
Tepelná denaturácia proteínov

Ak poznáme entalpiu a entropiu denaturácie pri teplote prechodu, ako aj rozdiel medzi tepelnými kapacitami denaturovaného a natívneho stavu (Δc_p), je možné stanoviť hodnotu ΔG_d pri ľubovoľnej teplote:

$$\Delta G_d(T) = \Delta H_d(T_d) + \Delta c_p(T - T_d) - T \cdot (\Delta S_d(T_d) + \Delta c_p \cdot \ln(T/T_d))$$

Hodnota $\Delta G_d(T)$ je vyjadrením stability proteínu pri danej teplote.

Krivka závislosti ΔG_d od T sa nazýva krivkou stability.



Ako je zrejmé, táto krivka pretína x-ovú os v dvoch bodoch. Jedným z nich je T_d a druhým T_c (teplota chladnej denaturácie (angl. cold denaturation)).

Van't Hoffova entalpia denaturácie

Pomocou van't Hoffovej rovnice teplotnej závislosti entalpie je možné stanoviť van't Hoffovu entalpiu prechodu proteínu z natívneho do denaturovaného stavu:

$$\Delta H_{\text{VH}}(T) = R \cdot T^2 \cdot (d \ln K / dT) - \text{van't Hoffova rovnica}$$

K (rovnovážna konštanta prechodu $F \leftrightarrow U$) si vyjadríme prostredníctvom relatívneho zastúpenia denaturovaného stavu (θ) $\Rightarrow K = \theta / (1 - \theta)$.

van't Hoffova rovnica má potom tvar:

$$\Delta H_{\text{VH}} = R \cdot T^2 \cdot (1 / (\theta \cdot (1 - \theta))) \cdot (d\theta / dT)$$

Pri teplote denaturácie je $\theta = 0.5$ a tak je možné písať:

$$\Delta H_{\text{VH}} = 4 \cdot R \cdot T_d^2 \cdot (d\theta / dT)_{T=T_d}$$

Van't Hoffova entalpia denaturácie

Podiel $\Delta H_{\text{VH}}/\Delta H_{\text{d(cal)}}$ napovedá o spôsobe denaturácie proteínu:

$\Delta H_{\text{VH}}/\Delta H_{\text{cal}} = 1$ - dvojstavový prechod

$\Delta H_{\text{VH}}/\Delta H_{\text{cal}} > 1$ - v kooperatívnej jednotke pre denaturáciu sa nachádza viac molekúl

$\Delta H_{\text{VH}}/\Delta H_{\text{cal}} < 1$ - denaturácia prebieha prostredníctvom intermediátov

Chemická denaturácia proteínov

Denaturácia proteínov môže byť spôsobená aj rôznymi chemickými látkami (organické rozpúšťadlá, močovina, guanídium chlorid).

Stabilita proteínu v prítomnosti chemického denaturantu je vyjadrená vzťahom:

$$\Delta G_d(T) = \Delta G_d^0(T) - m \cdot [D]$$

ΔG_d^0 - zmena Gibbsovej energie denaturácie bez prítomnosti denaturantu

ΔG_d - zmena Gibbsovej energie denaturácie v prítomnosti denaturantu

[D] - koncentrácia denaturantu

m - parameter, ktorý v sebe zahŕňa informáciu o zväčšení povrchu proteínu, ktorý je v kontakte s rozpúšťadlom počas denaturácie

Molten-globulárny stav

Molten-globulárny stav (MG) proteínov predstavuje čiastočne usporiadanú štruktúru týchto molekúl, v ktorých je čiastočne zachovaná sekundárna štruktúra, avšak je úplne rozrušená terciárna resp. kvartérna štruktúra.

MG stav je pozorovaný pri zbaľovaní istých proteínov (predovšetkým globulárnych) do natívneho stavu. Tento proces môže byť modelovaný ako trojstavový proces:

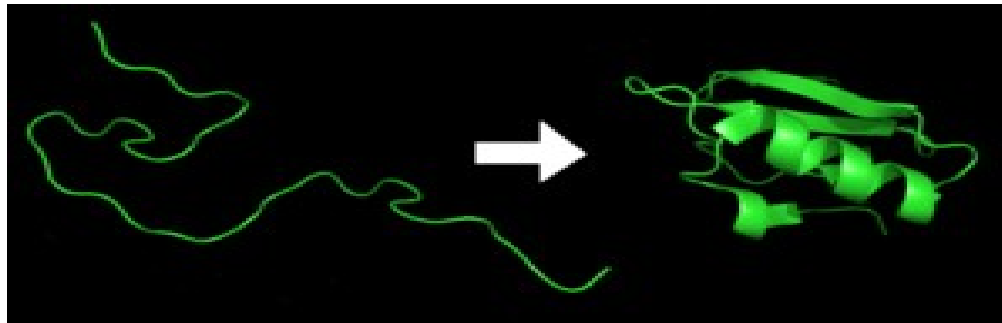


Energia MG stavu je vyššia než energia natívneho stavu, avšak nižšia než energia denaturovaného stavu.

Prechod z denaturovaného stavu (U) do MG stavu môže byť dvojstavový proces, alebo môže ísť o kontinuálny prechod bez viditeľnej kooperativity.

Zbaľovanie proteínov (protein folding)

Protein folding je fyzikálny proces, v ktorom sa polypeptidový reťazec zbaľuje do charakteristickej 3D štruktúry pre daný proteín. Mechanizmus proteín folding-u nie je doteraz jednoznačne vysvetlený a táto problematika zostáva jednou z najatraktívnejších nevyriešených problémov vo vede.



obrázok prebratý z Wikipédie

3D štruktúra proteínov je za daných fyzikálno-chemických podmienok (teplota, pH, iónová sila, typ rozpúšťadla) determinovaná sekvenciou aminokyselín v polypeptidovom reťazci. Úlohou je zistiť, akým spôsobom sa proteín dokáže za relatívne krátky čas zbaľiť do svojej natívnej štruktúry.

Zbaľovanie proteínov (protein folding)

Je všeobecne akceptované, že minimalizácia kontaktov hydrofóbných aminokyselín s molekulami vody je „hnacou silou“ zbaľovacieho procesu, avšak príspevok ostatných interakcií musí byť taktiež braný do úvahy (predovšetkým tvorba vodíkových väzieb medzi aminokyselinovými zvyškami navzájom, ako aj väzby týchto molekúl s molekulami rozpúšťadla).

Proces zbaľovania proteínov *in vivo* často prebieha už počas syntézy polypeptidového reťazca na ribozómoch. N-koniec tohto reťazca sa už zbaľuje, zatiaľ čo C-koniec polypeptidu sa ešte syntetizuje. V tomto procese zohrávajú veľmi dôležitú úlohu chaperóny.

Chaperóny sú molekuly (proteínového pôvodu), ktoré umožňujú správne zbaľovanie proteínov *in vivo* a znemožňujú tvorbu proteínových agregátov.

Levinthalov paradox

Rýchlosť zbaľovania proteínov závisí od veľkosti proteínu a vonkajších podmienok zbaľovania. Malé jednodomé proteíny sú schopné nadobudnúť svoju natívnu 3D štruktúru za niekoľko milisekúnd.

Zbaľovanie veľkých viacsubjednotkových proteínov prebieha cez viacero intermediátov a môže trvať aj niekoľko desiatok minút, či dokonca hodín.

Počet možných rôznych konformácií polypeptidového reťazca je veľmi veľký (napr. pre polypeptid pozostávajúci z 300 aminokyselín je tento počet $\sim 10^{143}$). Čiže, ak by proces zbaľovania proteínu prebiehal náhodne cez všetky možné konformačné stavy, trval by tento proces veľmi dlho (doba dlhšia než je vek vesmíru), avšak proteíny sa zbaľujú relatívne veľmi rýchlo – [Levinthalov paradox](#).

Je zrejmé, že protein folding sa nemôže uskutočňovať prostredníctvom náhodného hľadania „správneho“ konformačného stavu proteínu.

Fyziologické konzekvencie nesprávne zbalených a agregovaných proteínov

Nesprávne zbalené proteíny sú zodpovedné za viacero zákerných chorôb: Creutzfeldt-Jacobsova choroba, bovinná spongiformná encefalopatia, ochorenia spôsobené tvorbou amyloidných plakov a spleť (Alzheimerova choroba).

Všetky tieto ochorenia sú zapríčinené tvorbou agregátov nesprávne zbalených proteínov. V prípade Alzheimerovej choroby je to tvorba amyloidných plakov z proteínu amyloid B (proteolytický produkt amyloidného prekursorového proteínu). Pri vysokých koncentráciách tieto proteíny menia svoju terciárnu štruktúru, čoho dôsledkom je ich agregácia. Takto vytvorené amyloidné plaky sa ukladajú v okolí neurónov.

Alzheimerova choroba je takisto charakteristická tvorbou agregátov molekúl tau proteínu (proteín exprimovaný v neurónoch, ktorého úlohou je stabilizovať mikrotubuly v cytoskelete neurónových buniek). Agregovaný stav molekúl tau proteínu vedie k vzniku tzv. neurofibrilárnych spleť (neurofibrillary tangles).