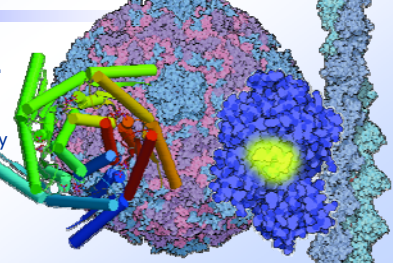


Fyzikální střípky ze světa proteinů

aneb od sekvence ke struktuře...

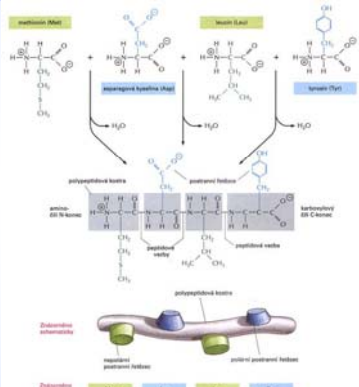
Vladimír Kopecký Jr.

Fyzikální ústav
Matematicko-fyzikální fakulty
Univerzity Karlovy v Praze
kopecky@karlov.mff.cuni.cz



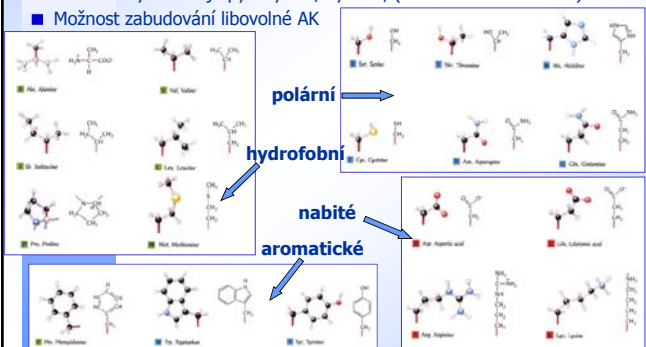
Co je a jak vzniká protein?

- Vzniká v ribosomech pomocí tRNA v procesu zvaném translace – překladem tripletního kódu
- Peptidový řetězec je **orientovaný od N-konce k C-konci**
- Existují peptidy od 40 do 10 000 aminokyselin
- Průměrná hmotnost aminokyselinového zbytku je 110 Da

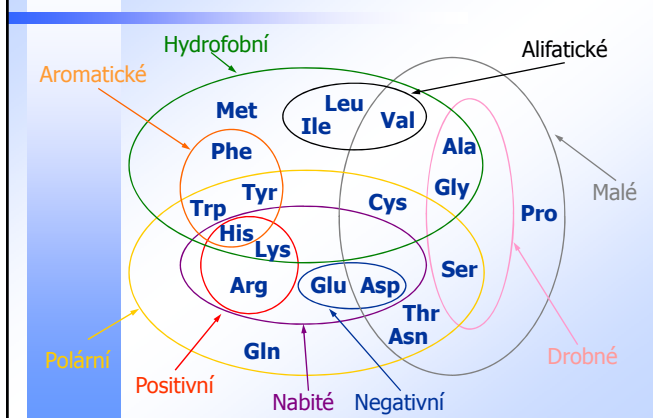


20 standardních aminokyselin

- 21 aminokyselinou je selenocystein, Sec – U, (výskyt od Archae po savce)
- 22 aminokyselinou je pyrrolisine, Pyl – O, (u Archae a Eubacteria)
- Možnost zabudování libovolné AK



Typy třízení aminokyselin

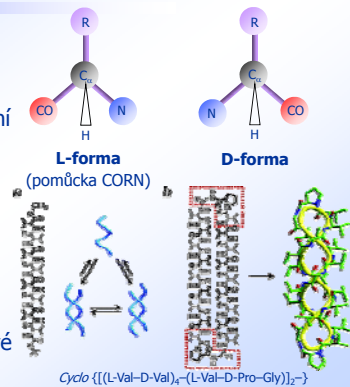


Genetický kód je když...

	U	C	A	G	
První pozice	U	Fenylalanin	Serin	Tyrosin	Cystein
	C	Leucin	Prolin	STOP	Tryptofan
	A	Izoleucin	Treonin	Histidin	Arginin
	G	Metionin	Lysin	Glutamin	Serin
					Třetí pozice
					U
					C
					A
					G
					U
					C
					A
					G
					U
					C
					A
					G

L vs. D enantiomery aminokyselin

- Všechny aminokyseliny mimo Gly jsou chirální
- Život na zemi užívá **L-enantiomery** (chirální formu)
- Neexistuje fyzikálně-chemický důvod pro preferenci L před D-formou
- V umělých peptidech lze kombinovat L i D formu
- D forma vytváří zrcadlové obrazy sek. struktur



■ M. Sastry et al., J. Am. Chem. Soc. 128 (2006) 10650–10651.

Šok ze struktury proteinů

- V roce 1958 rozřešili **J. Kendrew** a **M. Perutz** (Medical Research Council Laboratory of Molecular Biology, Cambridge) strukturu myoglobinu v nízkém rozlišení
- V roce 1962 oba dostali Nobelovu cenu
- Struktura se však jevila záhadnou bez špetky logiky...



John Cowdery
Kendrew
(1917–1997)

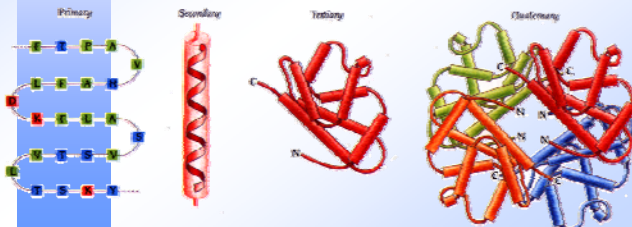


Max Ferdinand
Perutz
(1914–2002)



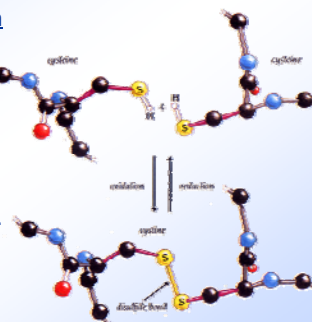
Od primární ke kvartérní struktuře

- **Primární** – pořadí aminokyselin v řetězci proteinu
- **Sekundární** – lokální 3D konformace hlavního řetězce
- **Terciální** – globální 3D struktura hlavního řetězce
- **Kvartérní** – globální 3D uspořádání všech podjednotek dané bílkoviny, tj. všech hlavních řetězců



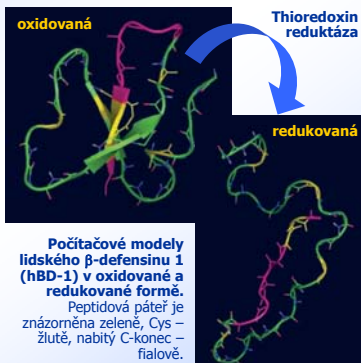
Disulfidické můstky cysteinu

- Cysteiny mohou v oxidačním prostředí tvořit siřné můstky
- Většinou se **nenachází u intracelulárních** proteinů
- Jsou **časté u extracelulárních** proteinů
- Úlohou S–S můstků je:
 - **stabilizace struktury** (např. před degradací u inhibitorů proteáz)
 - **spojování řetězců** bílkovin (např. A a B řetězce insulínu)



Můstky – konformační magie

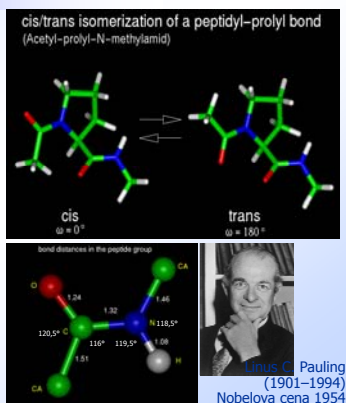
- **Lidský β -defensin 1** byl objeven v r. 1995
- Peptid 36 AA, **6 Cys** $\rightarrow$ **3 S-S můstky**, 1 Asp⁻, 4⁺ nabitý C-konec (4 Lys⁺, 1 Arg⁺)
- Exprimován v kůži a v epitelárních buňkách
- Thioredoxin reduktáza převádí hBD-1 ze stabilní neúčinné formy do antimikrobiálně aktivní redukované formy



■ R. I. Lehrer, Nature 469 (2011) 309–310. B. O. Schroeder et al., Nature 469 (2011) 419–423.

Cis/Trans forma peptidické vazby

- Peptidická vazba má 40% **charakter dvojné vazby** a je víceméně **planární** (rezonanční efekt π -vazby s max. 85 kJ/mol vede ke zkrácení C–N o 14 pm a prodloužení o 2 pm u C=O)
- Existuje **cis** ($\omega = 0^\circ$) a **trans** ($\omega = 180^\circ$) forma peptidické vazby
- Pozice **trans** je díky **sterickým zábranám** o 8 kJ/mol **stabilnější** než cis
- **Stabilní isomerisace** vazby se projevuje **pouze u prolinu!**



Geometrické parametry

- **Úhel omega ω** – úhel peptidické vazby **C'–N**
- **Úhel ři ϕ** – úhel vazby **N – C $_{\alpha}$**
- **Úhel psi ψ** – úhel vazby **C $_{\alpha}$ –C'**
- Konformace ψ vs. ϕ určuje typ sekundární struktury
- Na ψ vs. ϕ je založen Ramachandranův diagram
- **Glycin** může zaujmout mnoho rozdílných konformací (R = H), nepodléhá sterickému bránění, je silně konzervován v homologních proteinech

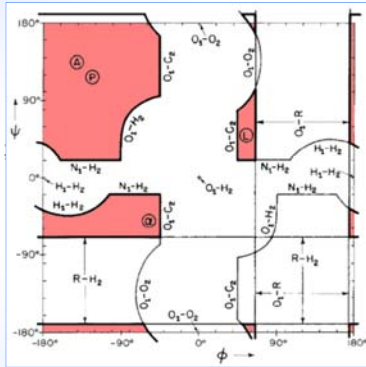


Ramachandranův diagram

- Závislost torzního úhlu ϕ na ψ definuje **stěricky dovolené oblasti** v konformačním prostoru proteinu
- Pojmenován po indickém biofyzikovi z University Madras, G. N. Ramachandranovi (1922–2001) objeviteli struktury kolagenu (1954)



Gopalasamundran Narayana Ramachandran (1922–2001)



■ G. N. Ramachandran et al.: Stereochemistry of polypeptide chain configur. J. Mol. Biol. 7 (1962) 95–99.

Proč existuje sekundární struktura?

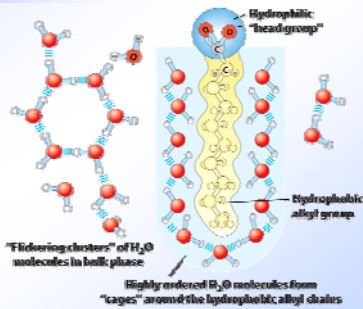
- Aminokyseliny uvnitř globulárních proteinů mají hydrofobní postranní řetězce
- Vzniká **hydrofobní jádro** a **hydrofilní povrch** bílkoviny – to je ovšem problém...
- **Hlavní řetězec je silně hydrofilní**, je **donorem vodíkové vazby NH**, a jejím **akceptorem C=O**, na každé peptidové jednotce
- Hlavní řetězec je **neutralizován vazbou sama na sebe**, což vede ke vzniku sekundární struktury ve které participují NH a C=O skupiny



Hydrofobní interakce

Amfipatické molekuly...

- Látky s částmi, které jsou **polární** (nebo nabitě) a **též nepolární**
- Polární části interagují s vodou
- Nepolární části se shlukují dohromady a zmenšují tak hydrofobní povrch → **hydrofobní interakce** → minimalizace počtu uspořádaných molekul H_2O

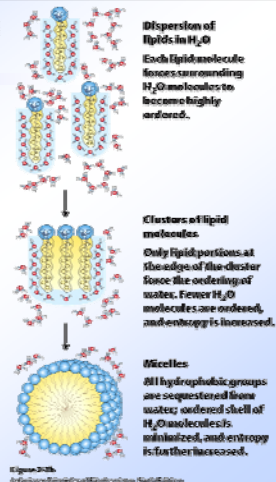


Dlouhé řetězce mastných kyselin mají hydrofobní alkylové řetězce obklopené velmi uspořádanými molekulami vody

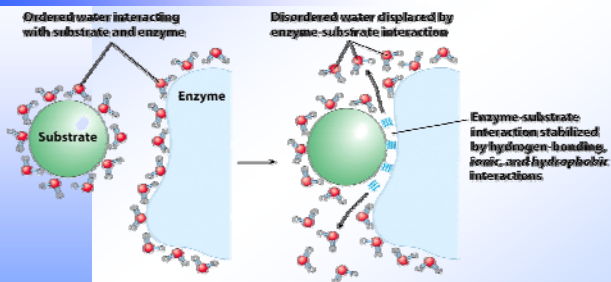
Hydrofobní interakce Amfipatické molekuly

- Shlukování molekul lipidů → lipidy exponují nejmenší možný hydrofobní povrch vůči vodě → celková obálka obsahuje menší počet uspořádaných vod než výchozí stav

- Energie uvolněná vyvázáním organizovaných vod stabilizuje micely → entropie systému roste



Hydrofobní interakce Amfipatické molekuly

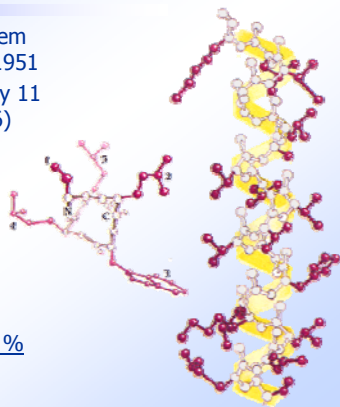


- W. Kauzmann v roce 1959 navrhuje interpretaci → entropie vody se zvýší když se odstraní přímý kontakt hydrofobních ploch s vodou → formování komplexů (např. enzym-substrát, protein-protein)

W. Kauzmann, Adv. Prot. Chem. 14 (1959) 1-63.

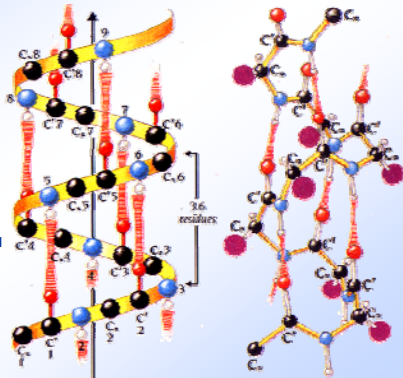
α -helix – základní informace

- Teoreticky navržen Linusem Paulingem (MIT) v roce 1951
- V průměru dosahuje délky 11 reziduí (od ca. 4 po až 56)
- Přibližně 25 % struktury globulárních proteinů je tvořeno α -helixem
- Helix je **pravotočivý** (levotočivost je pro L-aminokyseliny stericky bráněná)
- V proteinech existují 1–2 % krátkých (3–5 reziduí) levotočivých helixů



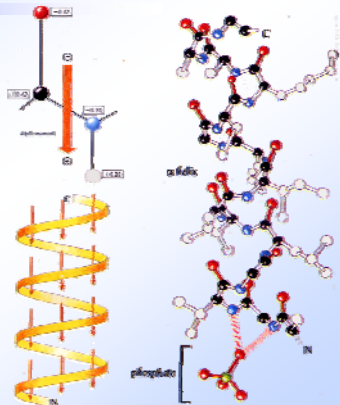
α -helix – technické parametry

- Úhel $\phi = -57^\circ$
(ca. -50° až -60°)
- Úhel $\psi = -47^\circ$
(ca. -40° až -60°)
- Počet reziduí na otáčku $n = 3,6$
- Výška závitů $p = 0,54 \text{ nm}$
- n -tý $\text{C}'=\text{O}$ se váže s $n+4$ NH zbytkem helixu, tj. vyjma první a poslední skupiny jsou všechny $\text{C}=\text{O}$ a NH skupiny vyvázané – konce helixů jsou polární a většinou umístěné na povrchu proteinu



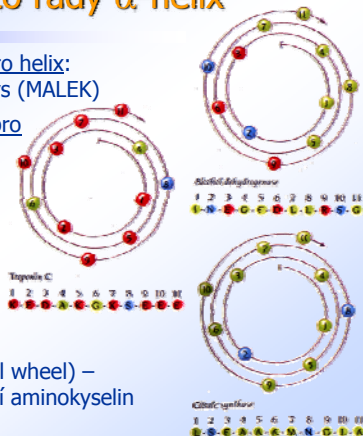
α -helix – fyz.-chemické vlastnosti

- Helix má s ohledem na nábojové parametry peptidické vazby **dipólový moment rovnoběžný s osou**
- **C-konec** je tak částečně **záporně** a **N-konec** částečně **kladně** nabitý
- Negativně nabitě ligandy se často váží na N-konec (díky geometrii a volným NH skupinám ideální pro fosfátové skupiny)
- Kladně nabitě ligandy se však na C-konec váží jen zřídka!



Aminokyseliny to rády α -helix

- Aminokyseliny dobré pro helix: Met, Ala, Leu, Glu, a Lys (MALEK)
- Aminokyseliny špatné pro helix: Pro (způsobuje ohyb v helixu), Gly, Tyr a Ser
- Nejčastější je umístění **helixu na povrchu proteinu** s jednou stranou obrácenou do roztoku
- **Helikální kruh** (helical wheel) – schématické znázornění aminokyselin v helixu (tj. po 100°)



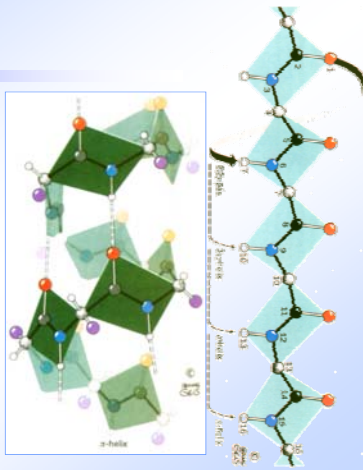
3₁₀-helix – technické parametry

- Úhel $\phi = -49^\circ$
- Úhel $\psi = -26^\circ$
- Počet **reziduí na otáčku 3,0 a 10 atomů** je vázáno v kruhu (včetně H)
- Výška stoupání 0,6 nm, tj. je užší a protáhlejší než α -helix
- V otočkách **končí α -helix 3₁₀-helixem**, či tento předchází β -struktura



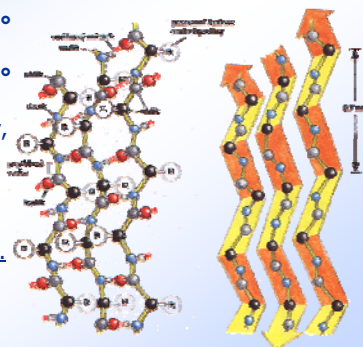
Exotické helixy

- **π -helix** – též 4,4₁₆-helix
 - úhly $\phi = -57^\circ$ a $\psi = -70^\circ$
 - výška stoupání 0,52 nm
- **2,2₇-helix** – nikdy nebyl v proteinech pozorován
 - úhly $\phi = -78^\circ$ a $\psi = +59^\circ$
 - 2,2 rezidua na obrátku a 7 atomů v kruhu
- 3₁₀-helix a π -helix se vyskytují v globulárních proteinech vzácně

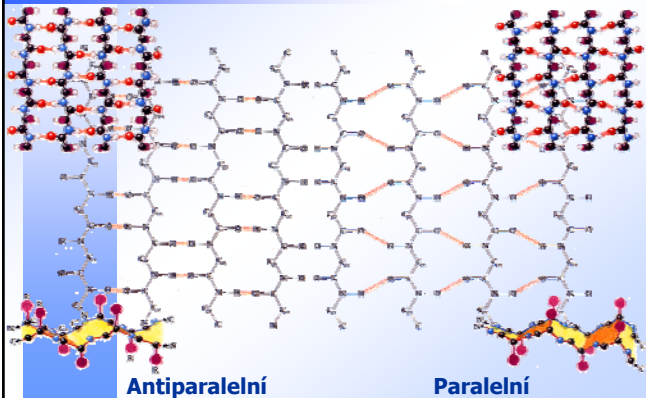


β -skládaný list – technické parametry

- **Antiparalelní**
 $\phi = -139^\circ, \psi = +135^\circ$
- **Paralelní**
 $\phi = -119^\circ, \psi = +113^\circ$
- **β -sheet** je de facto prvek terciální struktury, sekundární je **β -strand**
- Průměrná délka listu je 6 reziduí – tj. 2,1 nm (max. 15), v průměru je složen ze 6 vláken, tj. 2,5 nm (max. 15)
- Průměrný obsah v globulárním proteinu dosahuje 15 %

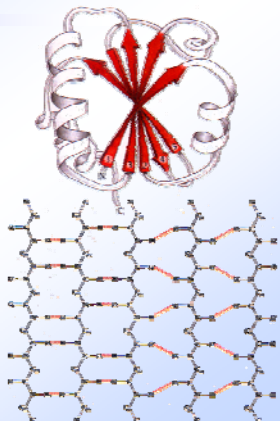


β-skládaný list – paralelní vs. anti



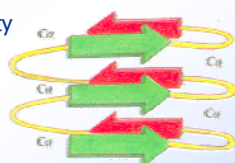
β-skládaný list – obecné vlastnosti

- Většina β-sheetů má **levotočivou torzy (twist) 10–25°** a výsledný útvar je **pravotočivý**
- **Smišené β-sheets** (na jedné straně β-strandu paralelní a na druhé antiparalelní) se vyskytují **pouze v 20 %**
- Průměrný obsah β-sheetu v proteinu je 15 %
- Aminokyseliny dobré pro β-sheet uprostřed: Tyr, Phe, Trp, Thr, Val, Ile (okraje jsou různorodé z důvodu možné agregace)



β-skládaný list – paralelní β-helix...

- Objeven v pektát lyáze v roce 1993 skupinou Francese Journaka (University of California)
- Nesouvisí s antiparalelními β-strukturami, sic!
- Řetězec **zavinut do helixu tvořeného β-vláknny** oddělenými oblastmi smyček
- V nejjednodušší formě každá otočka zahrnuje 2 β-vláknna a 2 otočky
- Podobnost s α/β proteiny → otočka – α-helix – otočka, zde **otočka – β-list – otočka**



Schematický diagram dvou-listového β-helixu. Zobrazeny jsou tři kompletní otočky (β-listy červeně a zeleně, otočky žlutě)

■ F. Journak et al., Current Opinion in Structural Biology 4 (1994) 802–806.

β-skládaný list – paralelní β-helix...

- V extracelulárních bakteriálních proteinech se opakuje 3× → formuje **pravotočivý helix 3 paralelních β-listů s hydrofobním jádrem**
- 3 β-listy (3–5 AA) formují „hranol“, 2 volné otočky dodávají variabilitu povrchu
- Počet otoček β-helixu se liší v různých strukturách
- Otočka ke kolmému β-listu (a) je tvořena vždy pouze 2 AA, ostatní jsou v délce proměnné

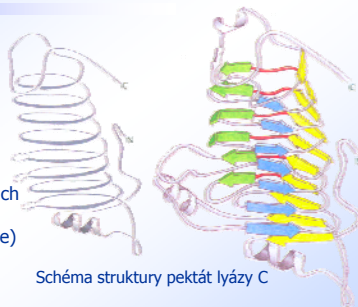


■ F. Jurnak et al., Current Opinion in Structural Biology 4 (1994) 802–806.

β-skládaný list – paralelní β-helix

■ Pektát lyáza

- 7 otoček, 34 Å dlouhé, Ø 17–27 Å → vyplněné, netvoří kanál
- lineární uspořádání k ose helixu stabilizuje
- Shlukování AA po skupinách – polární (Asu, Ser), alifatické (Ala, Val, Leu, Ile) a aromatické (Phe, Tyr)



■ Bakteriofág P22 tailspike protein

- 13 otoček, 200 Å dlouhé, Ø 60 Å
- připojen k základně ikosaedrické virové kapsidy

■ F. Jurnak et al., Current Opinion in Structural Biology 4 (1994) 802–806.

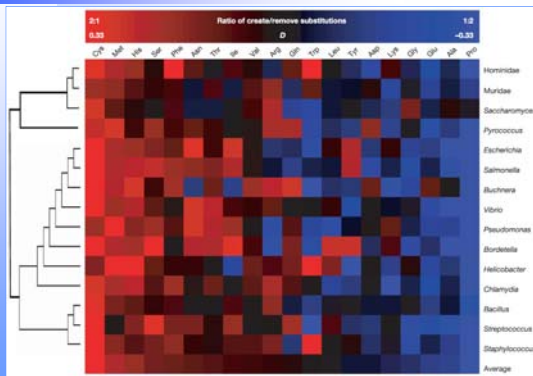
„Velikost“ jednotlivých struktur

- Různé typy sekundárních struktur zabírají různě velký prostor
- Obrázek udává možné velikosti a tvary proteinu o 300 aminokyselinách. Struktura je určena na základě aminokyselinové sekvence.



■ D. E. Metzger: Biochemistry. Academic Press, New York, 1977.

Konec vývoje? Ne!



■ I. K. Jordan et al., Nature 433 (2005) 633–638.

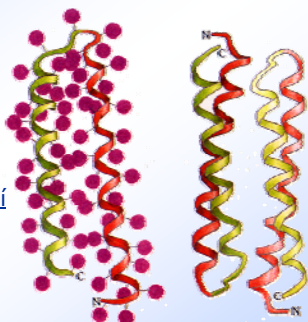
Strukturní motivy

- **Strukturní motiv** – kombinace několika elementů sekundární struktury
- Některé strukturní motivy se váží ke konkrétní biologické funkci (např. vazbě DNA) jiné nemusí mít žádnou specifickou funkci (mimo strukturní)
- Jednoduché motivy se skládají a vytváří komplexnější motivy
- Ne všechny komplexní motivy se v proteinech nachází se stejnou pravděpodobností



α struktury

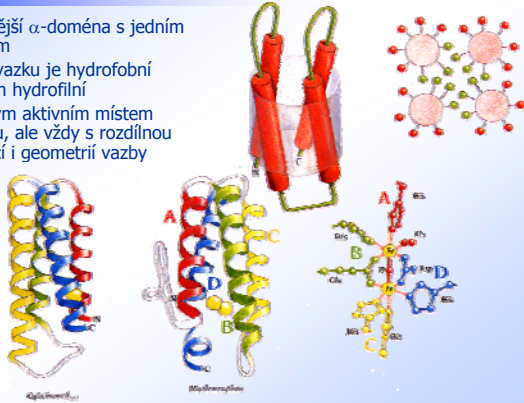
- Jsou nejméně početnou třídou
- Skládají se ze **svazků s hydrofobním jádrem**
- Nejčastější jednotkou jsou dva α -helixy v antiparalelním uspořádání
- **Svazek (bundle) čtyř α -helixů** je nejčastější doménovou jednotkou α -proteinů



Antiparalelní seskupení α -helixů u RNA vázícího proteinu ROP, který ve skutečnosti sestává ze dvou řetězců uspořádaných do svazku

α struktury – svazek helixů

- Nejčastější α -doména s jedním řetězcem
- Jádro svazku je hydrofobní a povrch hydrofilní
- Je častým aktivním místem proteinu, ale vždy s rozdílnou sekvencí i geometrií vazby



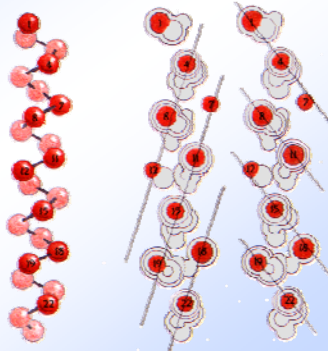
α struktury – globin

- Vyskytuje se u proteinů příbuzných hemoglobinu a myoglobinu
- Ačkoli **homologie kolísá** od 99 % do 16 %, **topologie je vysoce konzervována**
- Jde o svazek 9 helixů (A–H) spojených krátkými smyčkami
- Délka helixů je různorodá od 7 (C) po 28 (H) reziduí
- Uspořádání tvoří vazebnou kapsu pro hem
- Helixy ji obtáčí v různém směru, sekvenčně blízké oblasti si nejsou blízké v 3D (nejde o složení jednoduchých motivů)



α struktury – žlábková struktura

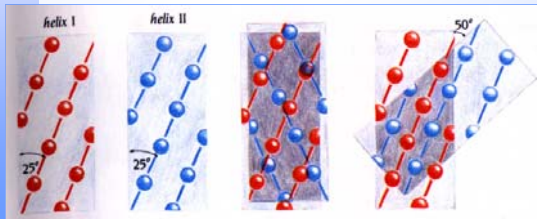
- Postranní řetězce α -helixů vytváří strukturu hřebenů a žlábků
- Struktura žlábků je **závislá na primární sekvenci** (na rozdíl od DNA)
- Žlábkové jsou tvořeny ob třemi až čtyřmi rezidui
- Skládání více helixů je umožněno právě žlábkovou strukturou



α struktury – žlábková struktura

■ Nejčastější je struktura žlábků ob 4 rezidua s úhlem 25° vůči ose helixu

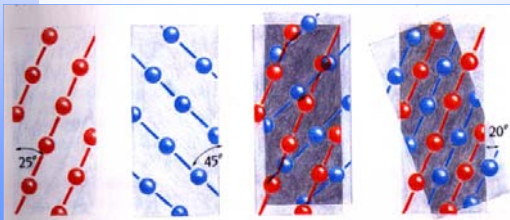
- jeden z helixů se otočí o 180° – rezidua však křížem do žlábků nezapadnou (jejich orientace je právě opačná)
- Následně se helix posune o 50° ($25^\circ + 25^\circ$) tak, aby hřebeny zapadly do žlábků (časté u globulinů)



α struktury – žlábková struktura

■ Struktura žlábků ob 4 rezidua + ob 3 rezidua s úhlem 45° vůči ose helixu

- jeden z helixů se otočí o 180° avšak i když mají žlábků blízkou orientaci, opět do sebe nezapadnou
- Následně se helix sklopí o 20° ($45^\circ - 25^\circ$) tak, aby hřebeny zapadly do žlábků (časté u svazku helixů)



Anti- β – β -soudek (barrel)

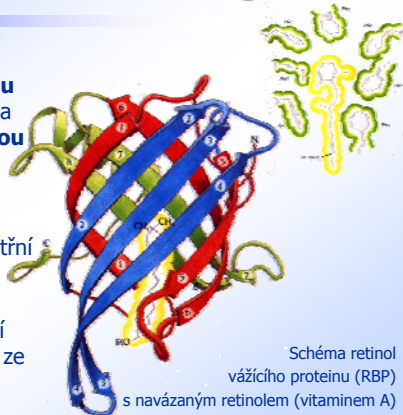
■ Velmi jednoduchá topologie složená z motivu β -vlásenek

- V β -lístech se střídají hydrofobní aminokyseliny s polárními či nabitými aminokyselinami
- Vytváří se hydrofobní jádro soudku a hydrofilní povrch
- Některá vlákna se mohou podílet na více spojích než jen ve dvojici β -vlásenek



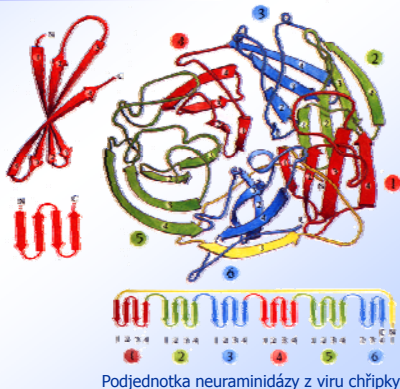
Anti- β – β -souděk – vazba ligandů

- β -soudky náleží do superrodin s **nízkou homologií** (identita <25 %) ale **vysokou strukturní podobností**
- Vazebné místo leží uvnitř soudku a vnitřní AA zbytky určují specifitu
- Ligandy se orientují hydrofilní částí ven ze soudku



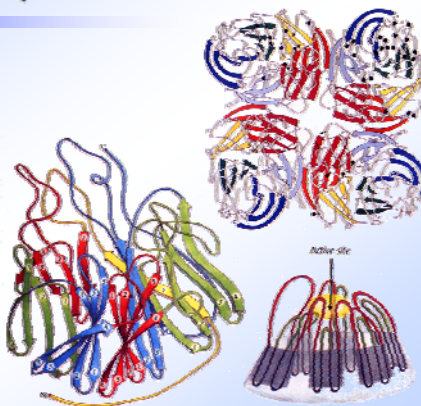
Anti- β – β -supersouděk (superbarrel)

- Složen z **motivu 4 antiparalelních β -listů**
- Motiv má extrémní twist, tak, že 1. a 4. β -list svírají úhel 90°
- 6 podjednotek se kládá do **supersoudku (superbarrel)**
- Celá molekula má 1600 AA, složených do 24 β -vláken



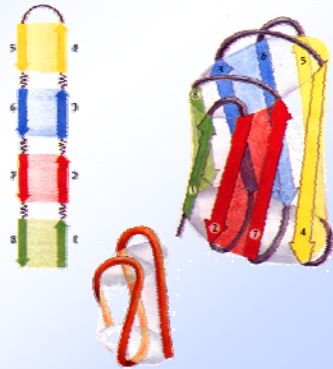
Anti- β – β -superbarrel – vazba

- Celý protein je u neuraminidázy tetramer
- Aktivní místo je tvořeno podobně jako u α/β -barrelů
- Zapojeny jsou volné smyčky a zbytek molekuly slouží jako lešení



Anti- β – Roláda (jelly roll barrel)

- Polypeptidový řetězec se **zavínuje okolo barelu jako v roládě (jelly roll, Swiss roll)**
- Motiv je velmi častý u proteinů virových obálek a lektinů
- 8 β -listů složíme následovně: nejdříve antiparalelní páry 1-8, 2-7, 3-6 a 4-5, následně H-vazby mezi 1-2, 7-4, 5-6, 3-8 – vše zůstává antiparalelní, sic!



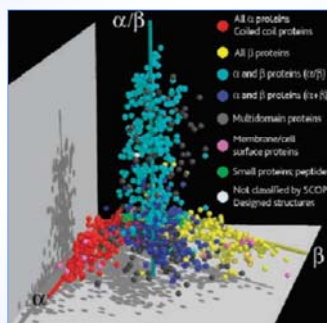
Anti- β – Roláda – struktura a skládání

- Topologické grafy jsou idealizované, ve skutečnosti roláda trpí torzí a přerušeními
- Objevuje se základ v Reckém klíči
- Ve skutečnosti začíná balení struktury **z dlouhé β -vlásenky**, následuje silná torze struktury a spirálové svinutí zakončené zarolováním do podoby soudku



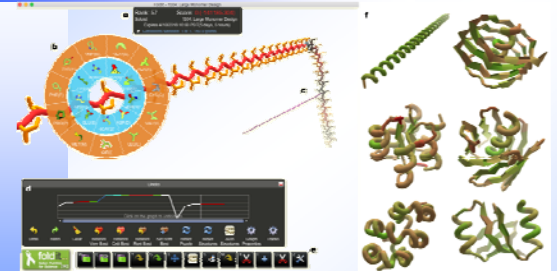
Ne vše je dovoleno... asi...

- Poslední výzkumy naznačují že již bylo dosaženo téměř úplné znalosti všech typů uspořádání sekundárních struktur...
- Z diagramu je patrné, že existují „ostrovy“ dovolených struktur...
- Výpočty naznačují rychlé uspořádání sekundárních struktur...
- Možná už známe co potřebujeme...



Lze postavit i nevidané





- Online protein-folding game **Foldit** (<https://fold.it/portal/>)
- Hráči vytvořili 146 struktur, 56 rozpustných monomerů exprimováno v *E. coli*, 4 určeny krystalograficky a shodné s modely
- 20 rozdílných foldů včetně 1 dosud nepozorovaného v přírodě!
- Koepnick et al., Nature 570 (2019) 390–394.

Historie – k objevu virů

- 1892 – Dmitrij Ivanovskij – pokusy s virem tabákové mozaiky procházejícím Chamberlandovým filtrem (vyvinut 1884)
- 1896 – Ernes Hankin – něco zabíjí *Vibrio cholerae* v Ganze
- 1915 – Frederick Twort objevuje bakteriolytické agens, snad enzym...
- 1917 – Félix d'Hérelle spoluobjevuje bakteriofágy → 1919 – fágová terapie
- 1931 – Erns Ruska & Max Knoll – viry zobrazené elektronovým mikroskopem



Félix d'Hérelle
(1873–1949)



Dmitrij Isifovič
Ivanovskij
(1864–1920)



Charles
Chamberlan
(1851–1908)
a jeho filtry



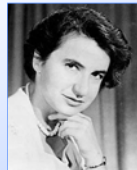
Ernst Ruska
(1906–1988), NC
1986, mikroskop
z roku 1933

Historie – struktura virů

- 1941 – J. D. Bernal & Isidor Fankuchen – krystalizace viru tabákové mozaiky
- 1955 – Rosalinda Franklinová vyřešila rtg strukturu TMV
- 1955 – H. F. Conrat & R. Williams ukazují samoskladnost TMV proteinu a RNA
- 1957 – Franklinová, Finch a Holmes objevují strukturu polio viru



John Desmond
Bernal (1901–1971)



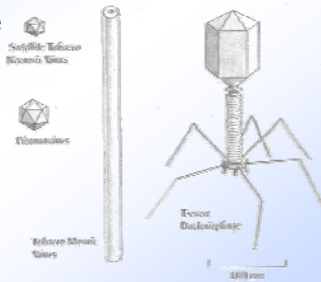
Rosalind Elsie Franklin
(1920–1958)



Modely TMV a polia pro Expo 85 (foto od Johna Finche), otevřené 17. 4. 1958, den po smrti Franklinové

Virus je když...

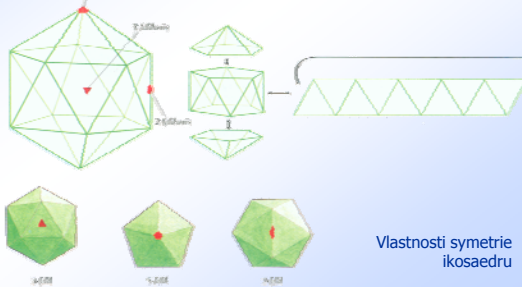
- **Kapsida** – genom viru je vždy uzavřen do proteinové „skořápky“, některé viry mají ještě obálku v podobě lipidové dvojvrstvy (např. chřipka)
- Není možné aby jednotlivá bílkovina obalila virovou NK
- Kapsidy se skládají z jedné či více opakujících se proteinových podjednotek
- Struktura kapsidy ovlivňuje mechanismus virové akce



Viry se liší svojí velikostí i složitostí

Virové ikosaedry

- **Ikosaedrální symetrie** – identické podjednotky vytváří sférický tvar
- **Ikosaedr** – 20 trojúhelníků, 20×3četná osa, 30×2četných OS



Virové ikosaedry...

- **K symetrii vztažené jednotky** – proteiny jsou asymetrické → neprochází jimi osa symetrie → počet proteinů je k nim vztažen
- **Asymetrické podjednotky** – 20 stěn × 3četná osa = 60; min. 60 podjednotek (monomery, dimery atp.) pro ikosaedr



Rozdělení povrchu ikosaedru na asymetrické podjednotky

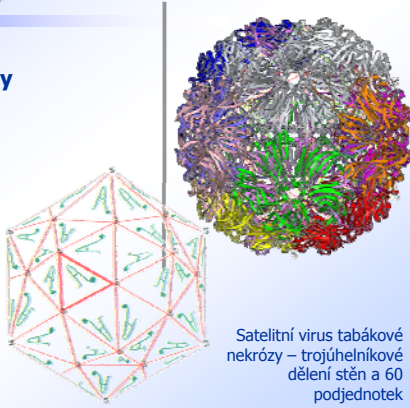
Nejmenší viry

■ Satelitní virus tabákové nekrózy

– nejmenší replikující se jednotka v přírodě (125–180 Å)

■ Funguje pouze společně s TMV

■ Sestává z 60 identických podjednotek (195 AA), 1120 bp RNA



Satelitní virus tabákové nekrózy – trojúhelníkové dělení stěn a 60 podjednotek

Komplexní sférické viry...

■ Nutnost zvětšit kapsidu pro větší a komplexnější genom

■ **Triangulační čísla T** – dovolené násobky 60 podjednotek, i.e., $T=3$ | $T=4 \rightarrow 3 \times 60 = 180$ | $4 \times 60 = 240$ podjednotek ikosaedrální obálky

Srovnání velikostí virových kapsid – stínováno dle vzdálenosti od centra (tmavší zanořeno hlouběji)

Satelitní virus tabákové nekrózy

T=1

MS2 fág

T=3

Nudaurelia capensis ω virus

T=4

HK97 fág

T=7

Virus modrého jazyka (BTV)

T=13

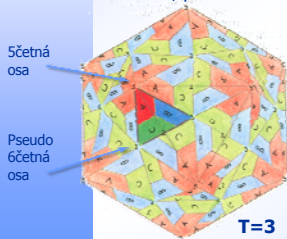
■ VIPERdb: Virus Particle Explorer² – <http://viperdb.scripps.edu/>

Komplexní sférické viry

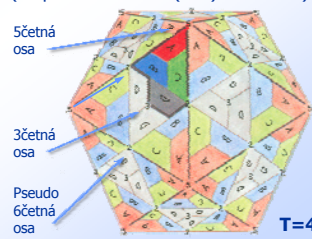
■ **Triangulační čísla T** – dovolené násobky 60 podjednotek, i.e., $T=3$ | $T=4 \rightarrow 3 \times 60 = 180$ | $4 \times 60 = 240$ podjednotek ikosaedrální obálky

■ **T=1** – protein-proteinové interakce jsou ekvivalentní, pro **T>1** existují čísla (3, 4, 7, ...) pro které jsou vazebné vzory kvazi-ekvivalentní

■ $T = h^2 + h \cdot k + k^2$, pro $h \geq 1$ a $k \geq 0$ (12 pentamerů + $10(T-1)$ hexamerů)



T=3

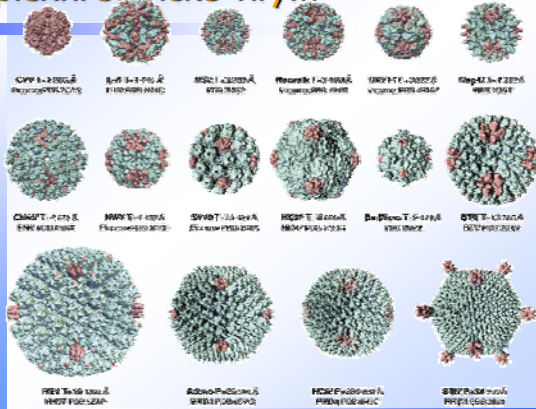


T=4

■ D. L. D. Caspar & A. Klug, Quant. Biol. 27 (1962) 1–24.

Komplexní sférické viry...

Srovnání
sférických
virů, kvazi
či pseudo-
symetrie,
průměr
kapsidy,
line
založená
na
hlavním
proteinu
kapsidy,
PDB



J. E. Johnson, A. J. Olson, J. Biol. Chem. – Reviews 296 (2021) 100554.

Tomato bushy stunt virus, $T=3$

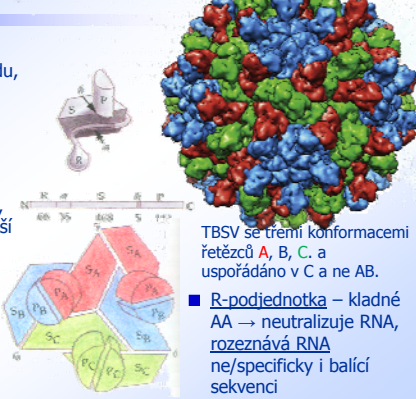
■ **TBSV** – určen 1978
Harrisonem z Harwardu,
kvazi-ekvivalent $T=3$,
330 Å průměr

■ 180 řetězců o 386 AA
→ moduly: vnitřní
neuspořádaná R,
propojující raménko a,
obálka S, pant h, vnější
P-doména

■ 3 varianty konformací
řetězců

■ P-doména párově –
2četná osa → $30 \times C$,
60× pseudo2 AB →
180×P=90 výčnělků

■ S. C. Harris et al., Nature 276 (1978) 368–373.



TBSV se třemi konformacemi
řetězců A, B, C. a
uspořádáno v C a ne AB.

■ **R-podjednotka** – kladné
AA → neutralizuje RNA,
rozeznává RNA
ne/specificky i balící
sekvenci

Bakteriofág T4...

■ DNA fág infikující E. coli

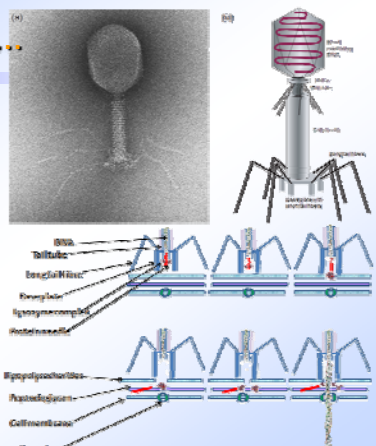
■ 169 kb, 300 genových
produktů

■ **Hlava** – ikosaedr $T=13$,
vytvářena samostatně

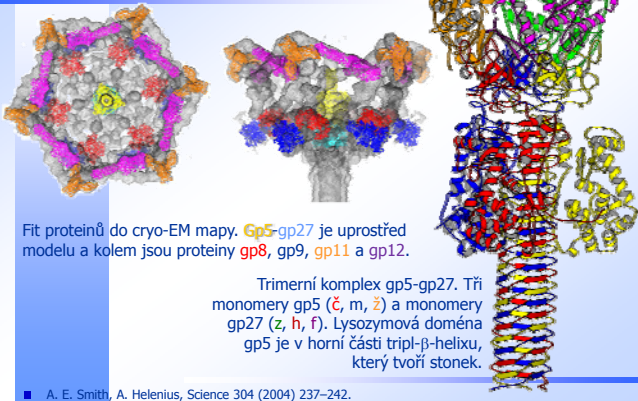
■ **Stonek** – další
prodlužující podjednotky,
zkončené základnou s
vlákny, 6četná symetrie,
14 různých proteinů
(různého zastoupení)

■ Spousta laureátů
Nobelovy ceny pracovala
s T4, je v základech
replikačních experimentů

■ A. E. Smith, A. Helenius, Science 304 (2004) 237–242.

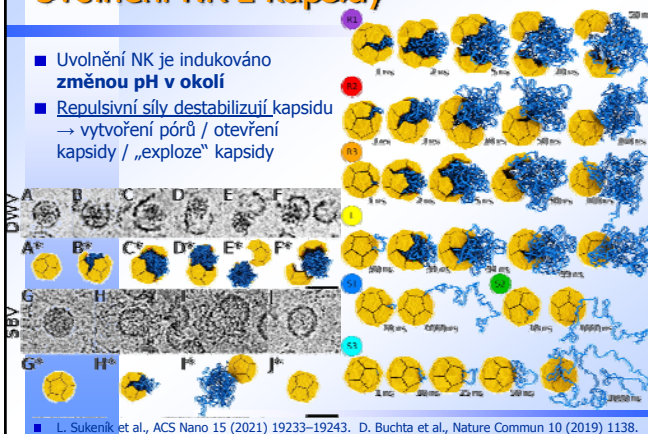


Bakteriofág T4



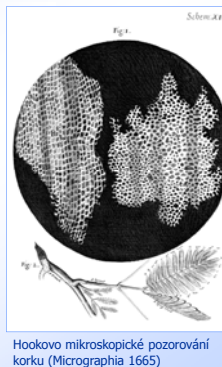
Uvolnění NK z kapsidy

- Uvolnění NK je indukováno změnou pH v okolí
- Repulsivní síly destabilizují kapsidu → vytvoření pórů / otevření kapsidy / „exploze“ kapsidy



Prvotní představy o buňce... Od Hooka k buněčné stěně

- Robert Hooke (1635–1703) – korek složen z tisíců kapsiček, jež pojmenovává buňky (cells)
- Buněčná stěna snadno pozorovatelná u rostlin
- Existuje buněčná stěna i u živočišných buněk?
- 1848 – Ecker pozoruje vlastní pohyb žabích blastomer → pevná „buněčná stěna“ u živočišných buněk být nemůže
- Pozorování buněčných pohybů hovoří proti!



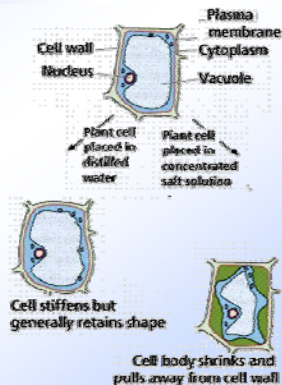
- Wikipedia <https://en.wikipedia.org/wiki/History_of_cell_membrane_theory>.
- A. Ecker, Zeitschrift für wissenschaftliche Zoologie 1 (1848) 218.

Prvotní představy o buňce...

Buněčná stěna vs. membrána...

■ Strukturní vrstva obalující buněčnou membránu

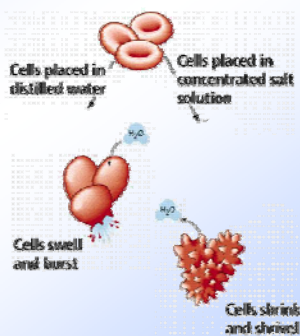
- Přítomna u většiny prokaryot i eukaryot (včetně řas, hub, rostlin, ale s výjimkou živočichů)
- Pomáhá buňkám v prostředí o proměnlivé osmolaritě zachovat integritu
- Složení je závislé na druhu (zahrnuje např. celulosu, lignin, peptidoglykany, glykoproteiny či polysacharidy)



Prvotní představy o buňce...

Buněčná stěna vs. membrána

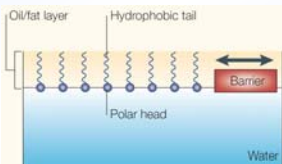
- Erythrocyty, podobně jako mnoho jiných typů **živočišných buněk, stěnu nemají**
- Jsou-li přeneseny do prostředí o nízké osmolaritě, dochází k jejich lýze
- **Extracelulární matrix**
 - Síť makromolekul (kolagen, enzymy, glykoproteiny) poskytující podporu okolním buňkám
 - Pufrovací schopnost polysacharidových gelů a fibrilárních proteinů v tkáních



Modely biomembrán...

Lipidová dvojvrstva

- 1923 – Hugo Fricke stanovuje pomocí měření elektrické kapacity suspenzí krevních buněk tloušťku membrány na 3,3 nm
- 1925 – E. Gorter & F. Grendel přichází s konceptem **lipidové dvojvrstvy**
 - Extrahují acetoneem lipidy z erytrocytů 6 savců
 - Měří plochu v Langmuirově žlábků
 - Porovnávají se spočtenou plochou erytrocytů → poměr 2:1 → mají štěstí na kompenzaci chyb...



Žlábek Langmuir-Blodgettové

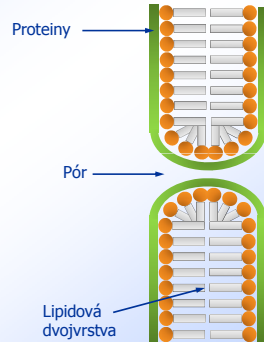
- slouží k měření závislosti povrchového napětí na ploše monovrstvy
- vytvořen v kuchyni Agnes Pockelsové (1862–1935)
- vylepšen laureátem Nobelovy ceny Irvingem Langmuirem (1881–1957) a jeho kolegyní Katharine Burr Blodgettovou (1898–1979)

■ H.Fricke, Phys. Rev. Series II 23 (1923) 137–152; E.Gorter & F.Grendel, J. Exp. Med. 41 (1925) 439–443.

Modely biomembrán...

Danielli & Davsonův model

- 1935 – J. F. Danielli & H. Davson přichází s „paucimolekulárním“ modelem
- **Lipidová dvojvrstva je zaobalena do proteinového pláště**
- Postulují **póry v membráně** na základě fyziologických experimentů
- Póry tvoří proteinová vrstva
- Proteiny v β -skládaném listu či neuspořádané drží elektrostatickou interakcí



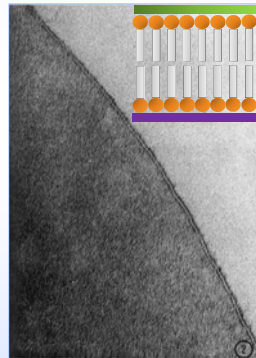
■ J. F. Danielli, H. Davson, Journal of Cellular and Comparative Physiology 5(4) (1935) 495–508.

Modely biomembrán...

Robertsonův model

- 1959 – J. D. Robertson zobrazuje membrány pomocí **elektronové mikroskopie** za užití fixace KMnO_4 a glutaraldehydu
- 3,5nm dvojvrstva lipidů pokrytá z obou stran 2nm vrstvou proteinů
- Žádné póry nespátřeny
- Použití různých činidel → **nesymetrická membrána** (tj. různá intracelulární a extracelulární strana)
- Transmembránové proteiny?

Elektronová mikrofotografie plasmatické membrány červené krvinky (Robertson)



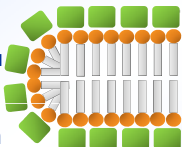
■ J. D. Robertson, Biochemical Society Symposium 16 (1959) 3–43.

Modely biomembrán...

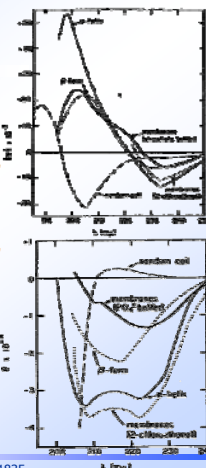
ECD a ORD

- ~1960 – experimenty pomocí **ECD/ORD** ukazují α -helix jako převládající strukturu membránových proteinů → proteiny musí být globulární a tvořit spojitou vrstvu

Spektra optické rotační disperse (ORD) membrán krevních buněk



Spektra elektronového cirkulárního dichroismu (ECD) membrán krevních buněk v 8mM fosfátovém pufru, pH 7,7 a v 2-chloroethanolu. Srovnání s poly-L-lysinem.

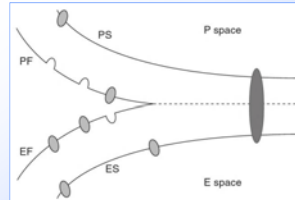
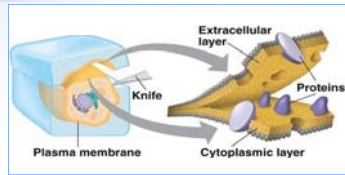


■ J. Lenard & S. J. Singer, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 56 (1966) 1828–1835.

Modely biomembrán...

Mrazové štípání...

- 1961–63 – metoda **mrazového štípání (freeze etching)**
- Vzorek štípán nožem za nízkých teplot ($-100\text{ }^{\circ}\text{C}$) a ve vakuu
- Membrána se dělí na dva nesymetrické listy (ES – externí, PS – protoplasmický povrch, EF – externí, PF – protoplasmická strana listu)

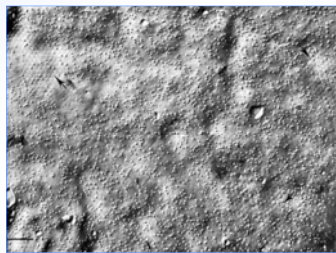


■ Moor et al., J. Biophys. Biochem. Cytol. 10 (1961) 1–13, J. E. Heusler, J. Electron. Microsc. 60 (2011) S3.

Modely biomembrán...

Mrazové štípání

- Ukazující **se částice o velikostech 8–10 nm, tj. proteiny**
- Náhodné rozmístění, velikostní distribuce dle typu membrány
- Proteiny nerovnoměrně distribuovány mezi oba listy → asociace s intra/extracelulární částí, či prochází skrz membránu, vytváří též shluky



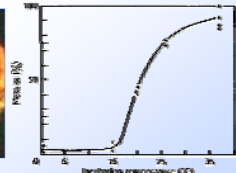
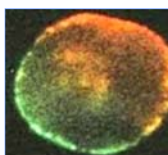
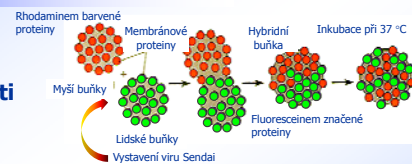
Mikrografie vzorku mrazového štípání.
(Úsečka odpovídá 100 nm)

■ H. Moor, K. Mühlethaler, Journal of Cell Biology 17 (1963) 609–628.

Modely biomembrán...

Tekutost membrán

- 1970 – Frye & Edidin podávají **důkaz o tekutosti membrán**
- Na membránové receptory jsou navázány fluorescenčně značené protilátky odlišných fluorochromů



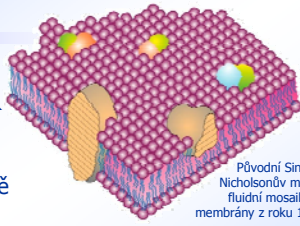
Fúzané buňky na počátku Frye-Edidinova experimentu
Efekt teploty na mosaicitu buněčné membrány během 40 min buněčné fúze

■ L. D. Frye & M. Edidin, J. Cell Sci. 7 (1970) 319–335.

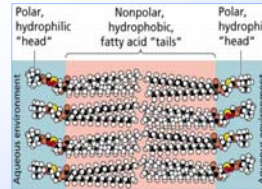
Modely biomembrán...

Fluidní mosaika...

- 1972 – **model fluidní mosaiky** od S. J. Singera & G. R. Nicholsona
- Globulární proteiny jsou volně pohyblivé v membráně
- Integrální membránové proteiny tvorí specifické komplexy
- Lipidy volně rotují ($10^9 - 10^{10} \text{ s}^{-1}$) a difundují ($2 \mu\text{m/s}$) → nepravděpodobné překlápění mezi vrstvami → asymetrické složení dvojvrstvy



Původní Singer-Nicholsonův model fluidní mosaikové membrány z roku 1972



■ S. J. Singer & G. R. Nicholson Science 175 (1972) 720-731; G. R. Nicholson, Discoveries 1 (2013) e1.

Charakteristika membr. proteinů

Historie – první představy

- 1948 – Benjamin Libert identifikuje membránový enzym ATPázu z nervů krakatice obrovské
- 1952 – postulace iontových kanálů Hodgkin & Huxley (Nobelova cena 1963)
- 1957 – Jens Christian Skou ukazuje, že Libertova ATPáza je spínána specifickými poměry $\text{Na}^+ \text{K}^+$ → dlouho hledaná Na-pumpa postulovaná Overtonem 1890
- 1960 – Jardetzkyho představa o vysokoafinitním místě přepínajícím pozice ATPáz



Alan Lloyd Hodgkin
(1914–1998)

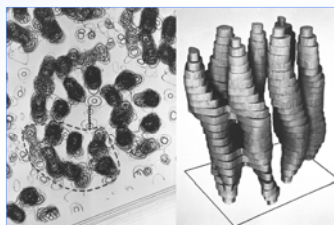


Andrew Fielding Huxley
(1917–2012)

Charakteristika membr. proteinů

Historie – první struktury...

- 1975 – **elektronová mikroskopie** Hendersona & Unwina na 2D krystalech bakteriorhodopsinu → 3D mapy s rozlišením $7 \text{ \AA}$
- Rozlišení 7 „prutů“ o délce $35-40 \text{ \AA}$ → odhadnuto jako transmembránové α -helixy



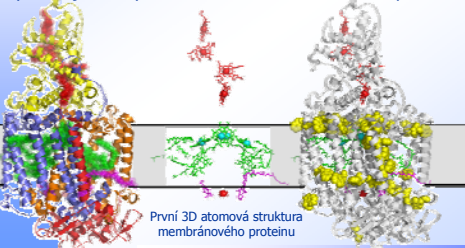
Projekční mapa elektronové hustoty (vlevo) a 3D rekonstrukce bakteriorhodopsinu na 2D krystalech purpurových membrán

■ R. Henderson, P. N. T. Unwin, Nature 257 (1975) 28–32.

Charakteristika membr. proteinů

Historie – první struktury...

- 1980 – první 3D krystaly membránové proteinu **bakteriorhodopsinu** (Oesterhelt & Michel) a **porinu OmpF** z *E. coli* → RTG vyřešeno až 1992
- 1982 – H. Michel (NC 1988 s J. Deisenhoferem a R. Huberem) krystalizuje fotosyntetické reakční centrum *Rhodospseudomonas viridis*



První 3D atomová struktura membránového proteinu



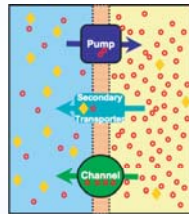
Hartmut Michel (*1948)

■ J. Deisenhofer, O. Epp, K. Miki, R. Huber, H. Michel, J. Mol. Biol. 180 (1984) 385–398.

Charakteristika membr. proteinů

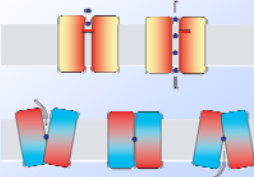
Základní dělení a funkce...

- **Pasivní transport** – póry/kanály → rychlý ($\mu\text{s}/\text{ps}$) → hradlování (světlo, potenciál, cAMP, Ca^{2+})
- **Aktivní transport** – transportéry, pumpy (proti elektrochemickému gradientu) → pomalý (ms), regulovaný

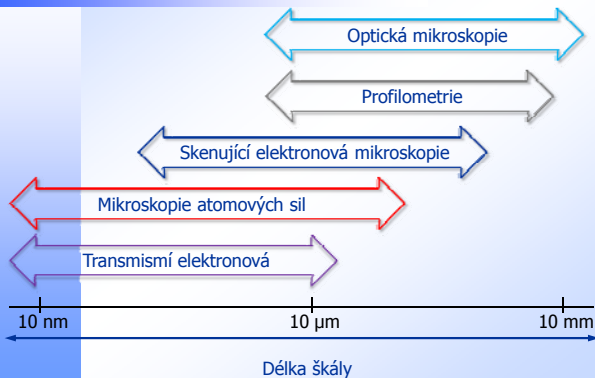


Nahoře) schematické znázornění transportních mechanismů

Dole) různé principy hradlování kanálů

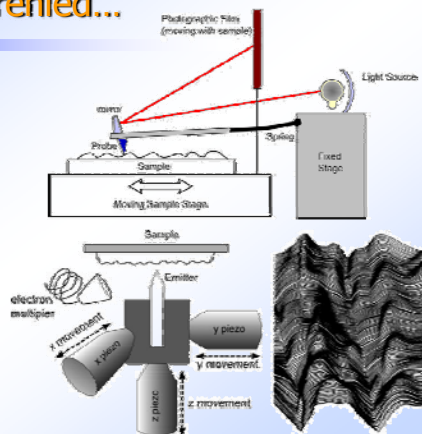


Porovnání mikroskopií...



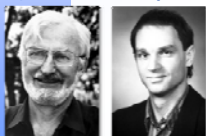
Historický přehled...

- 1929 – **optická profilometrie** (Shmalz)
- 1950 – oscilující hrot (Becker)
- 1971 – **topografiner**, bezkontaktní typ hrotu (R. Young) pro elektricky vodivé vzorky



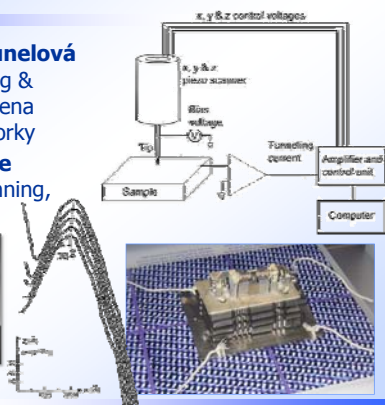
Historický přehled

- 1981 – **skenující tunelová mikroskopie** (Bining & Rohrer – Nobelova cena 1986) pro vodivé vzorky
- 1986 – **mikroskopie atomárních sil** (Binning, Quate, Gereber)



H. Rohrer
(*1933)

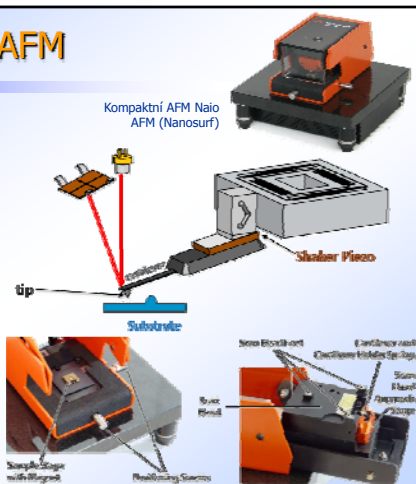
G. K. Bining
(*1947)



■ G. Binning, C. F. Quate, C. Greber, Physical Review Letters 56 (1986) 930–933

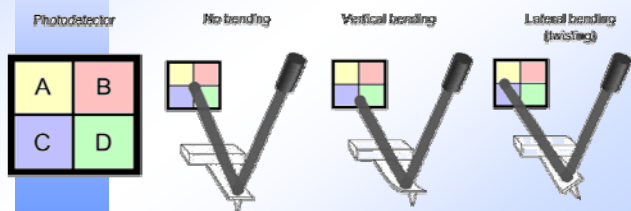
Jak funguje AFM

- **Sonda** (hrot na nosníku) interaguje s povrchem
- Monitorován odrazem laseru od nosníku na čtveřici diod
- **Piezo-keramický držák** posunuje sondu/vzorek
- Možnost oscilace nosníku (~100 Hz – 1 MHz)
- **Rozlišení** x-y osa 1 nm, z-osa 0,1 nm
- **Detekce** pN sil, výhybký nosníku < Å

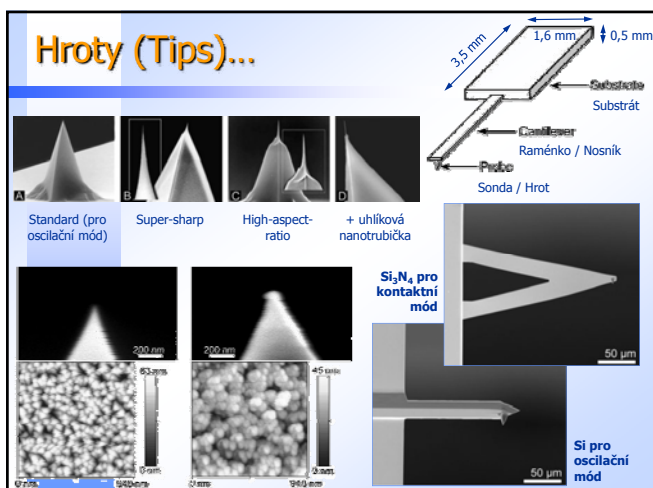


AFM módy – kontaktní...

- **Laterální odchylka** – $(B+D) - (A+C)$, užíván pro materiálovou citlivost – tření (ne pro výškovou)
- **Vertikální odchylka** – $(A+B) - (C+D)$

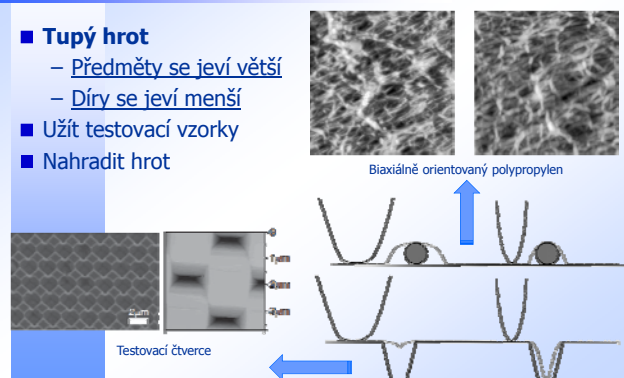


Hroty (Tips)...



Hroty (Tips) – artefakty...

- **Tupý hrot**
 - Předměty se jeví větší
 - Díry se jeví menší
- Užít testovací vzorky
- Nahradit hrot



AFM módy...

■ Kontaktní mód – hrot se pohybuje po povrchu

- Vysoké rozlišení
- Možné ohrožení vzorku
- Měření třecích sil, vodivosti



■ Bezkontaktní mód (NC) – hrot se osciluje těsně nad povrchem aniž by se dotkl

- Nižší rozlišení
- Nepředstavuje ohrožení vzorku
- Elektrostatická, magnetická měření

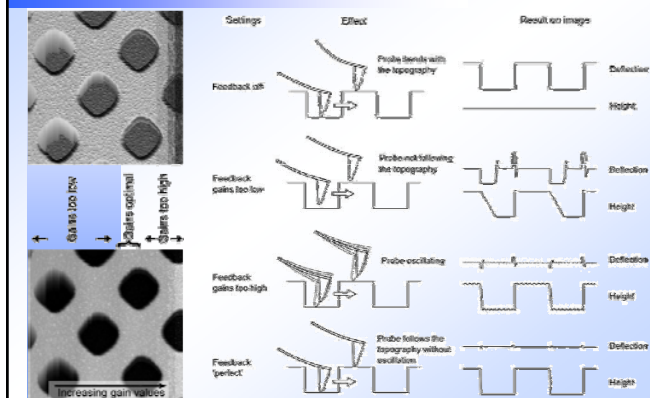


■ Poklepový (tapping) mód (IC/AC) – hrot osciluje a v nejnižším bodě má repulzivní kontakt

- Lepší rozlišení než bezkontaktní
- Minimalizace ohrožení vzorku

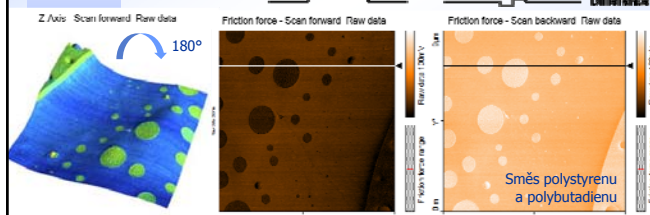
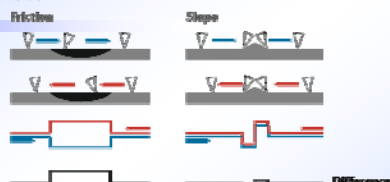


Optimalizace podmínek...



Strmost vs. tření

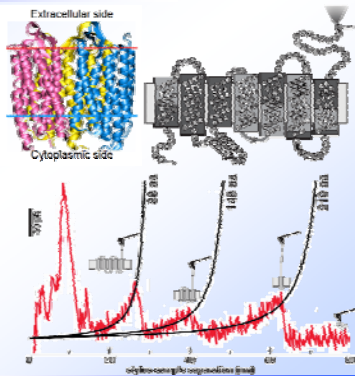
■ Boční výchylka nosníku přináší novou informaci o chování povrchu v kontaktu s hrotem



■ Nanosurf (<http://www.nanosurf.com>)

AFM proteinů – bakteriorhodopsin...

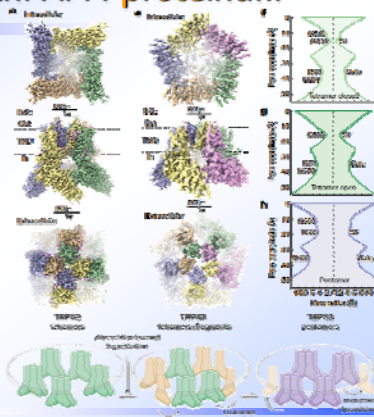
- **Bakteriorhodopsin** – membránový protein, protonová pumpa
- Organizuje se jako **trimer**
- **Rozvinování proteinu** krok za krok po nespecifickém navázání na hrot
- Existence „membránových“ bariér



■ Bippes & Muller, Phys. Rev. Letters (2011)

Vysokorychlostní AFM proteinů...

- **Přechod kanálu TRPV3 (transient receptor potential) z tetramerní na pentamerní formu a naopak**
- **Pentamer je raritní, reversibilní a překlopení forem probíhá od sekund po minuty**
- Agonista difenylboron anhydrid (DPBA) indukuje dilataci póru a následné zdvojnásobení populace pentameru

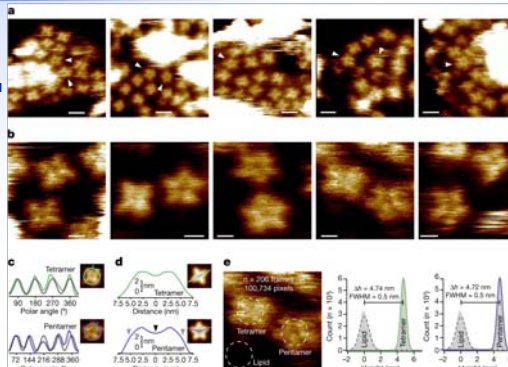


■ S. Lansky et al., Nature 621 (2023) 206–214.

Vysokorychlostní AFM proteinů...

Koexistence TRPV3 tetramerů a pentamerů v membráně (a, b).

Radiální a výškové profily tetra- a pentamerů (c, d). Statistika výškových profilů AFM snímků (e).



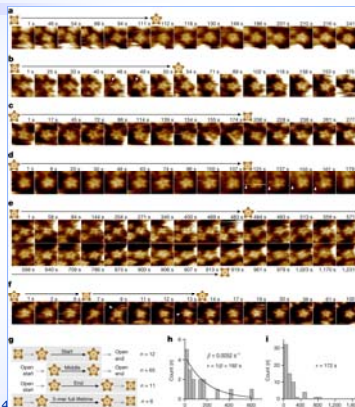
■ S. Lansky et al., Nature 621 (2023) 206–214.

Vysokorychlostní AFM proteinů...

■ Vysokorychlostní AFM

■ 2 μL vzorku nanášeny na 1,5 mm² slídy → inkubováno 5 min → opláchnuto → hydratováno 5 Å pufru pro difúzi TRPV3 kanálů

■ Skenováno 0,5–3 snímky za sekundu s rozlišením 1,5–8 Å na pixel pomocí HS-AFM (SS-NEX, RIBM)



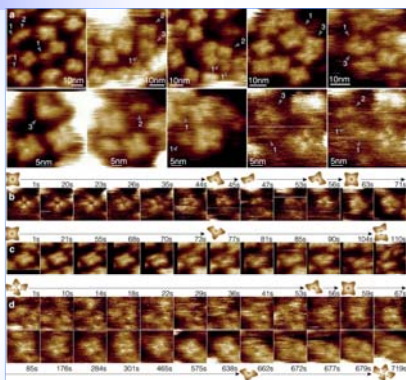
■ S. Lansky et al., Nature 621 (2023) 206–214

Vysokorychlostní AFM proteinů

■ TRPV3 tetramery se mohou rozpadnout a opět složit zpět do tetramerní podoby

■ Šedé šipky indikují monomerní (1), dimerní (2) a trimerní (3) fragmenty.

■ HS-AFM série ukazují rozpad tetrameru na trimer (b) a dimer (c). Poslední série (d) ukazuje zformování tetrameru a jeho opětovný rozpad

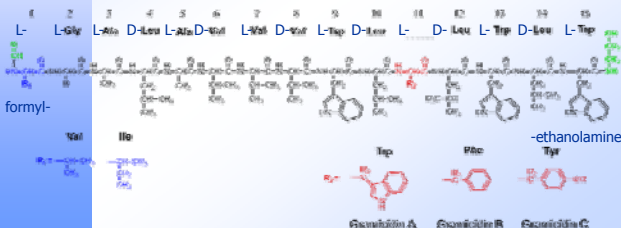


■ S. Lansky et al., Nature 621 (2023) 206–214.

Membránové kanály... Samostatný helix – gramicidin...

■ **Gramicidin** – peptid 15 AA, střídání L- a D-AA nejjednodušší kanál, hydrofobní postranní řetězce, formování pravotočivého β -helixu (β -rolka ze 2 ks)

■ Dipeptid formuje kanál pro monovalentní kationty při elchem. gradientu (2×10^4 kationtů/msec)

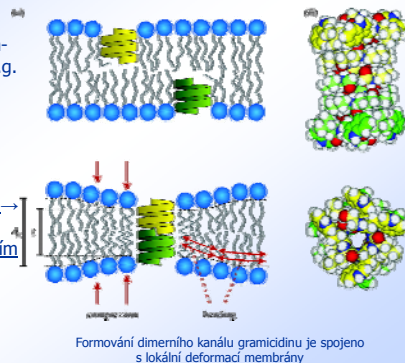


■ J. A. Lundbaek et al., Journal of the Royal Society Interface 7 (2010) 373–395.

Membránové kanály...

Samostatný helix – gramicidin

- **Gramicidin** – antibiotikum proti gram-pozitivním bakteriím (e.g. *B. subtilis*, *S. aureus*)
- Dimer právě přesahuje membránu, tj. 2,6 Å, kanál má větší průměr než α -helix
- **Reverzibilní dimerizace** → hradlování kanálu
spojováním/rozpojováním podjednotek → kanál otevřen na ca. 1 s → transportní rychlost závislá na koncentraci gramicidinu



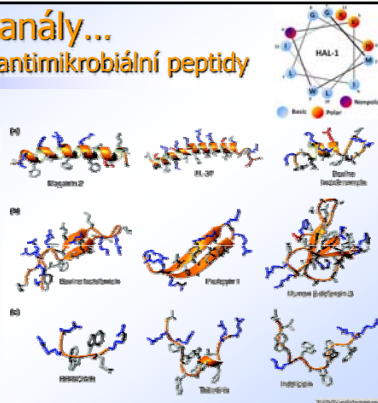
Formování dimerního kanálu gramicidinu je spojeno s lokální deformací membrány

■ J. A. Lundbaek et al., *Journal of the Royal Society Interface* 7 (2010) 373–395.

Membránové kanály...

Samostatné helixy – antimikrobiální peptidy

- 1980 – první peptid cecropin hemolymfy kukly amerického martináče *Hyalophora cecropia*
- 10–50 AA, bazické (Lys, Arg) a hydrofobní
- **Působí kolektivně** v interakci s membránou
- V základním stavu jsou v β -listech často neaktivní
- **Neuspořádané formy se uspořádávají na membráně**
- Utváří α -helikální póry či β -soudky



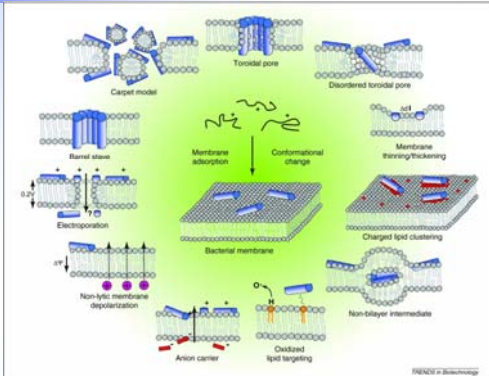
Přehled základních strukturálních tříd antimikrobiálních peptidů – a) α -helikální (v interakci s membránou), b) β -skládané listy (v roztoku), c) neuspořádané

■ L. T. Nguyen et al., *Trends in Biotechnology* 29 (2011) 464–472.

Membránové kanály...

Samostatné helixy – antimikrobiální peptidy

- V klasické představě **proteiny dosahují kritické koncentrace** a formují póry
- Specifické interakce s fosfolipidy
- Možné složitější formy akce

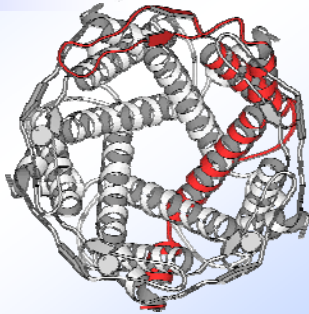


■ L. T. Nguyen et al., *Trends in Biotechnology* 29 (2011) 464–472.

Lipidové interakce s proteiny

Mechanosensitivní proteinové kanály...

- Otevírání pórů/kanálů na základě **laterálního tlaku membrány**
- Kritické pro fyzické stimulace (hmat, sluch, osmoregulace)
- Mechanoselective channel (MscL) – pór 25 Å, lysofosfatidylcholinu (LPC) do membrány → uvolnění laterálního tlaku → otevření



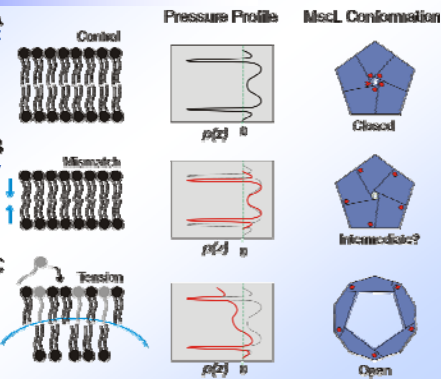
Struktura velkého membránového kanálu MscL z *M. tuberculosis* (PDB: 2OAR) v zavřené konformaci. Kanál je zobrazen z vnější strany kolmo na membránu – pentamer, každá z podjednotek 2 transmembránové helixy

Lipidové interakce s proteiny

Mechanosensitivní proteinové kanály

- Schematický **efekt zakřivení lipidové dvojvrstvy** → změna laterálního tlaku

- A) Relaxovaný stav
- B) Příčná tenze → komprese/expenze tlakového profilu
- C) Přidání LPC s jedním řetězcem → zakřivení vnějšího povrchu → otevření kanálu

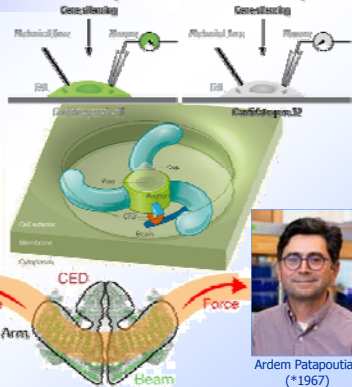


■ Perozo & Rees, Current Opinion in Structural Biology 13 (2003) 432–442.

Lipidové interakce s proteiny

Piezo mechanosensitivní iontové proteinové kanály...

- **Piezo kanály** – největší známé multimerní iontové kanály
- Trimery o ~2500 AA (300 kDa), 30–40 hydrofobních transmembránových segmentů
- Aktivace (od 5 ms po 1 s) vede k vtékání Na⁺, Ca²⁺ iontů → šíření elektrických signálů a iniciace drah sekundárních posílů
- Za objev r. 2010 udělena Nobelova cena za fyziologii a lékařství pro rok 2021



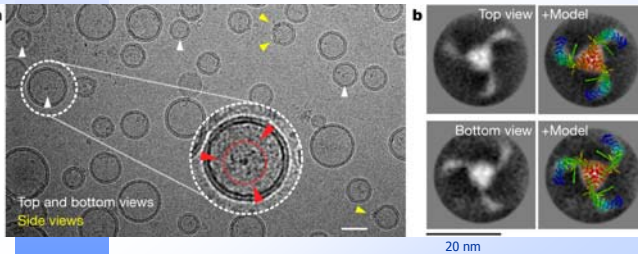
Ardem Patapoutian (*1967)

■ S. E. Murtthy, A. E. Dubin, A. Patapoutian, Nature Reviews Molecular Cell Biology 18 (2017) 771–783.

Lipidové interakce s proteiny

Piezo mechanosensitivní iontové proteinové kanály...

- **PIEZO 1 & 2** – sdílí ~50 % identity, ale nepodobají se ničemu jinému → unikátní fold
- Studium ve vesikulech POPC:DOPS:cholesterol 8:1:1

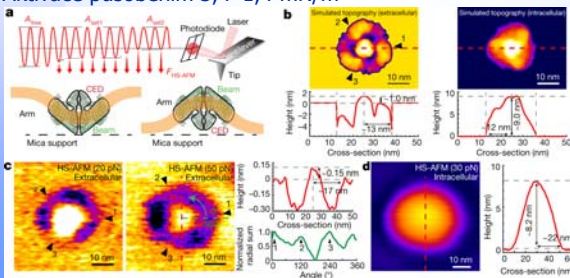


Y.-C. Lin et al., Nature 573 (2019) 230–234.

Lipidové interakce s proteiny

Piezo mechanosensitivní iontové proteinové kanály...

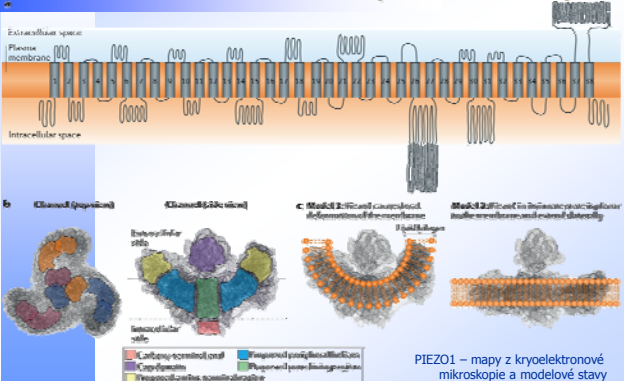
- **PIEZO 1 & 2** – sdílí ~50 % identity, ale nepodobají se ničemu jinému → unikátní fold
- Aktivace působením 3,4–1,4 mN/m



Y.-C. Lin et al., Nature 573 (2019) 230–234.

Lipidové interakce s proteiny

Piezo mechanosensitivní iontové proteinové kanály...



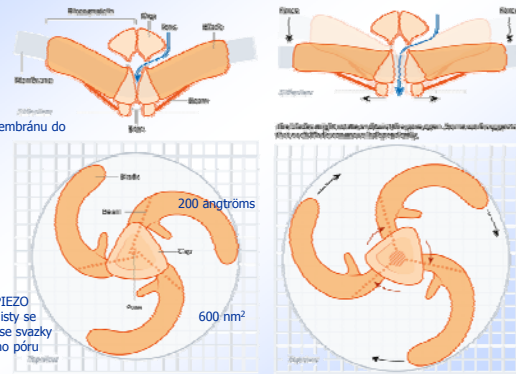
S. E. Murthy, A. E. Dubin, A. Patapoutian, Nature Reviews Molecular Cell Biology 18 (2017) 771–783.

Lipidové interakce s proteiny

Piezo mechanosensitivní iontové proteinové kanály...

Kanál zvrásní membránu do podoby jamky

3 podjednotky PIEZO proteinů tvoří listy se seskupují spolu se svazky kolem centrálního póru

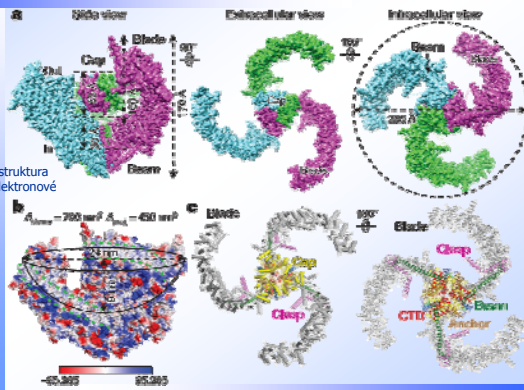


■ A. Dance, Nature 577 (2020) 158–160.

Lipidové interakce s proteiny

Piezo mechanosensitivní iontové proteinové kanály...

Homotrimerická struktura Piezo2 z kryoelektronové mikroskopie



■ L. Wang et al., Nature 573 (2019) 225–229. Q. Zhao et al., Nature 554 (2018) 487–492.

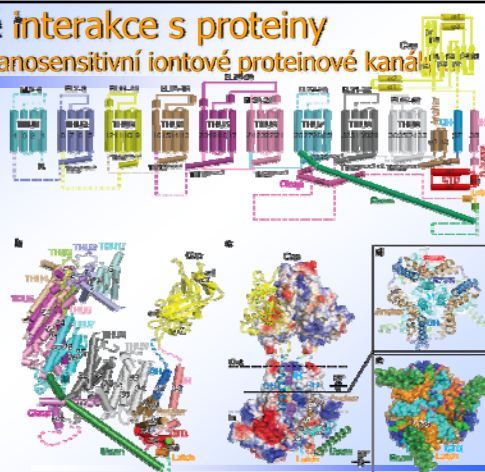
Lipidové interakce s proteiny

Piezo mechanosensitivní iontové proteinové kanály...

Topologický (a) a strukturální model (b) Piezo2 protomeru.

(c) Pohled na centrální část trimeru, pohled shora (d) a zdola (e)

Oblast sevření (dasp) a svazky (beam) vedoucí od závoří (Latch) je možné napojení na aktinová vlákna s vazbou na kolegen a otevírání „pružinkou“ (zatím neprokázané)

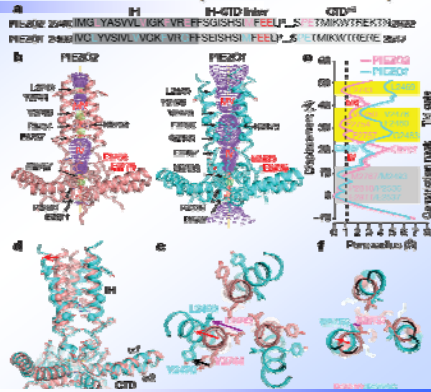


■ L. Wang et al., Nature 573 (2019) 225–229. Q. Zhao et al., Nature 554 (2018) 487–492.

Lipidové interakce s proteiny

Piezo mechanosensitivní iontové proteinové kanály...

- Sekvenční srovnání mezi Piezo1 a Piezo2 pro centrální část iontového kanálu
- Stužkový model centrálního póru pro Piezo2 (lososová) a Piezo1 (tyrkysová) s vyznačením dostupné trajektorie v kanálu
- Poloměr póru podél centrální osy iontového kanálu
- Boční pohled na superimponovaný kanál Piezo1 a Piezo2
- Kolmý pohled do iontového kanálu pro superpozici obou struktur

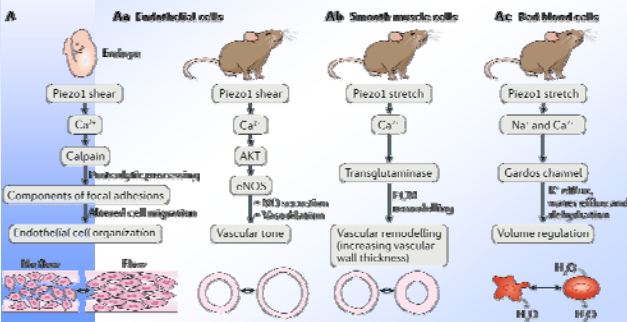


■ L. Wang et al., Nature 573 (2019) 225–229. Q. Zhao et al., Nature 554 (2018) 487–492.

Lipidové interakce s proteiny

Piezo mechanosensitivní iontové proteinové kanály...

■ Piezo1 – mechanotransdukce v kardiovaskulárním systému savců

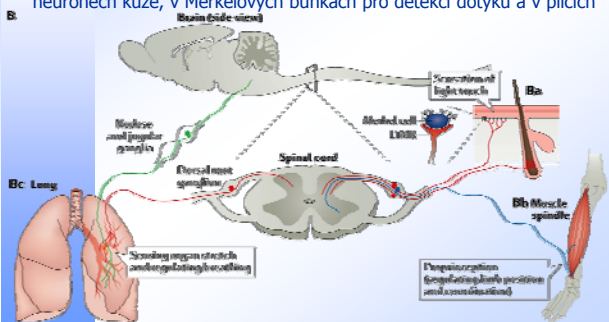


■ S. E. Murthy, A. E. Dubin, A. Papatoutian, Nature Reviews Molecular Cell Biology 18 (2017) 771–783.

Lipidové interakce s proteiny

Piezo mechanosensitivní iontové proteinové kanály

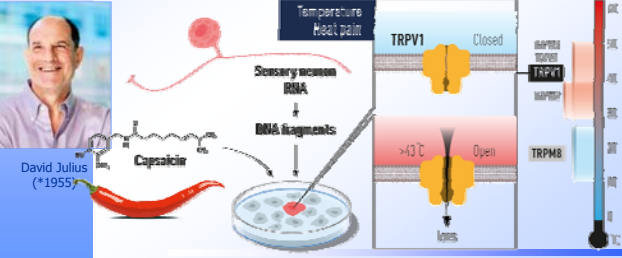
■ Piezo2 – senzorická a respirační mechanotransdukce, exprese neuronů kůže, v Merkelových buňkách pro detekci dotyku a v plicích



■ S. E. Murthy, A. E. Dubin, A. Papatoutian, Nature Reviews Molecular Cell Biology 18 (2017) 771–783.

Transient receptor potential (TRP) kanály...

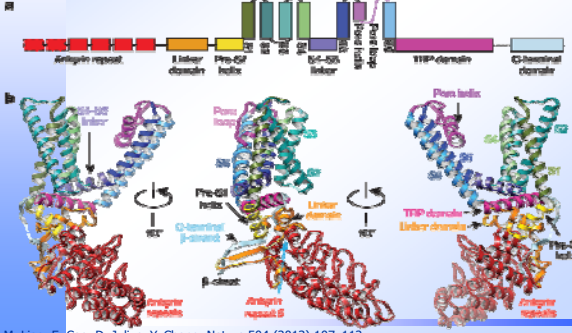
- **TRPV1 (vaniloid VR1)** – termosensitivní receptor aktivovaný teplotou $>43\text{ }^{\circ}\text{C}$ (s přesností $1\text{ }^{\circ}\text{C}$), ale i řadu dalších látek, indukuje vtok Ca^{2+} , objeven 1997 přes kapsaicin, Nobelova cena 2021
- **TRPM8** – receptor chladu, $<28\text{ }^{\circ}\text{C}$ s přesností až $0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$, aktivován mentolem, vstup Na^{+} a Ca^{2+}



■ M. Liao, E. Cao, D. Julius, Y. Cheng, *Nature* 504 (2013) 107–112

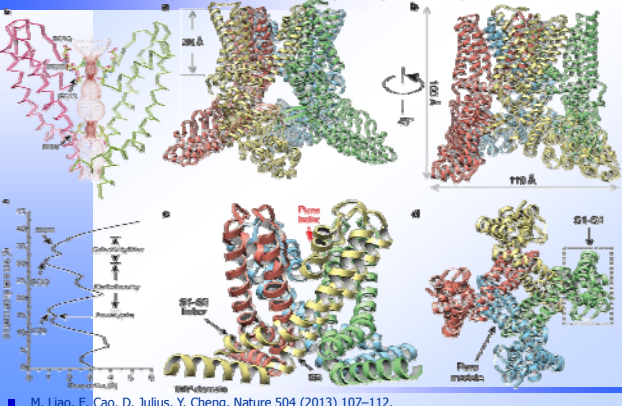
Transient receptor potential (TRP) kanály...

- **TRPV1** – přítomen v periferních nervech, tetramer s čtyřčetnou symetrií podobnou napětím spínáním kanálům, cíl analgetik



■ M. Liao, E. Cao, D. Julius, Y. Cheng, Nature 504 (2013) 107–112

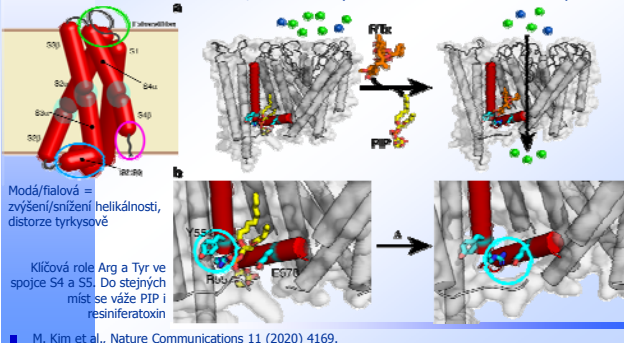
Transient receptor potential (TRP) kanály...



■ M. Liao, E. Cao, D. Julius, Y. Cheng, *Nature* 504 (2013) 107–112

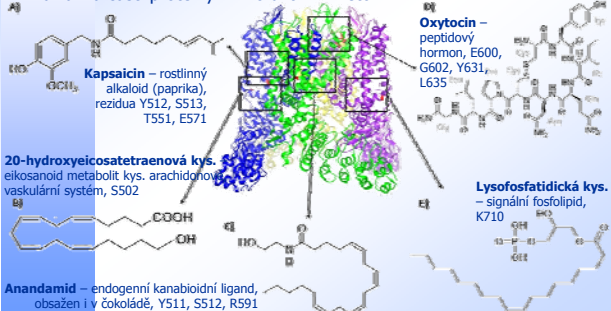
Membránové kanály... Transient receptor potential (TRP) kanály

- **Teplotní spínání** je pravděpodobně dáno změnou sekundární struktury a distorzí několika α -helixů, velmi citlivých strukturních změn na teplotu



Membránové kanály... Transient receptor potential (TRP) kanály...

- **Agonisté TRPV1** – příklad alosterického efektu, různé molekuly se váží na různá místa proteiny mimo aktivní místo



■ M. Benítez-Angeles et al., Int. J. Mol. Sci. 21 (2020) 3421.

Doporučená literatura

- C. Branden, J. Toonze: *Introduction to protein structure*, Garland Publishing, New York – London, 1991.
- D. Eisenberg: The discovery of the α -helix and β -sheet, the principal structural features of proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100 (2003) 11207–11210.
- W. Kabsch, C. Sander: Dictionary of protein secondary structure. Biopolymers 22 (1983) 2577–2637.
- J. S. Richardson: The Anatomy and Taxonomy of Protein Structure. Advances in Protein Chemistry, vol. 34, Academic Press. <http://kinemage.biochem.duke.edu/>
- D. Voet, J. G. Voetová: Biochemie. Victoria Publishing, Praha, 1995.