

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko-technologická

Skládání proteinů

Jana Marečková

Bakalářská práce

2019

University of Pardubice  
Faculty of Chemical Technology

Protein Folding

Jana Marečková

Bachelor's thesis

2019

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Akademický rok: 2018/2019

## **ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE**

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Jana Marečková**  
Osobní číslo: **C16260**  
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**  
Studijní obor: **Zdravotní laborant**  
Název tématu: **Skládání proteinů**  
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

### *Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :*

1. Vypracovat teoretickou rešerši týkající se protein foldingu.
2. V úvodu krátce nastínit vhléd do problematiky.
3. V další části se zaměřit na mechanismus syntézy proteinu a jeho sbalení.
4. V závěru krátce zmínit důsledky chybného foldingu.

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**  
Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**  
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**  
Seznam odborné literatury:


Vedoucí bakalářské práce: **Mgr. Šárka Štěpánková, Ph.D.**  
Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání bakalářské práce: **21. prosince 2018**  
Termín odevzdání bakalářské práce: **4. července 2019**



Ing. Petr Kalenda, Ph.D.  
děkan

L.S.



prof. Mgr. Roman Kandár, Ph.D.  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2019

## **Prohlašuji:**

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 9/2012, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 3. 7. 2019

.....

Marečková Jana

## **Poděkování**

Ráda bych touto formou poděkovala vedoucí práce Mgr. Šárce Štěpánkové za odborné vedení, ochotu a především za nekonečnou trpělivost, kterou se mnou měla při zpracování této práce.

## **Anotace**

Bakalářská práce se zabývá teoretickou rešerší k problematice protein foldingu s důrazem na mechanismus proteosyntézy a vzniku sekundární a terciární struktury. Dále byly v práci zmíněny možnosti studia a predikce skládání proteinů. V závěru byl zmíněn mechanismus obrany buňky před chybným složením a případné patologie, pokud tento mechanismus selže.

## **Klíčová slova**

Skládání proteinů, proteosyntéza, struktura proteinu, chaperony

## **Annotation**

This bachelor's thesis deals with a theoretical research of protein folding problem. Primary focus is on a mechanism of proteosynthesis and a formation of secondary and tertiary structure. There are also mentioned possibilities of study and prediction of protein folding. The mechanism of a cell defence and misfolded protein pathologies were mentioned in the conclusion.

## **Keywords**

Protein folding, proteosynthesis, protein structure, chaperons



## Seznam používaných symbolů a zkratek

AD	Alzheimerova choroba (Alzheimer's disease)
ATF6	aktivační transkripční faktor 6 (activating transcription factor 6)
ATP	adenosintrifosfát (adenosine triphosphate)
A $\beta$	amyloidový $\beta$ -protein
BiP	imunoglobiny vázající protein (binding immunoglobulin protein chaperon)
BLAST	nástroj na vyhledávání dle sekvenční homologie (Basic Local Alignment Search Tool)
CASP	kritické vyhodnocení předpovědi proteinových struktur (Critical Assessment of protein Structure Prediction)
CLPP	proteolytická podjednotka kaseinolytické mitochondriální peptidázy (Caseinolytic Mitochondrial Matrix Peptidase Proteolytic Subunit)
CPU	centrální procesorová jednotka (central processing unit)
DNA	deoxyribonukleová kyselina (deoxyribonucleic acid)
EF1 $\alpha$ -GTP	eukaryotický translační elongační faktor 1 $\alpha$ – guanosintrifosfát (eucaryotic elongation factor 1 alpha – guanosine triphosphate)
eEF2	eukaryotický elongační faktor 2 (eucaryotic elongation factor 2)
ER	endoplazmatické retikulum
GMP	guanosinmonofosfát (guanosine monophosphate)
GTP	guanosintrifosfát (guanosine triphosphate)
Hsp	protein teplotního šoku (heat shock protein)
IAPP	ostrůvkový amyloidní polypeptid (islet amyloid polypeptide)
IRE1	inositol vyžadující enzym 1 (inositol-required enzyme 1)
JNK	c-Jun N-koncová kináza (c-Jun N-terminal kinase)

mRNA	mediátorová RNA (messenger RNA)
NCBI	Národní centrum pro biotechnologické informace (National Center for Biotechnology Information)
NFT	neurofibrilární klubka (neurofibrillary tangle)
NMR	nukleární magnetická rezonance
p38MAPK	p38 mitogenem aktivovaná proteinová kináza (p38 mitogen-activated protein kinase)
PD	Parkinsonova choroba (Parkinson's disease)
PDB	proteinová databanka (The Protein Data Bank)
PERK	kináza endoplazmatického retikula R proteinkinázového typu (protein kinase R (PKR)-like endoplasmic reticulum kinase)
PTM	posttranslační modifikace (post-translational modification)
RNA	ribonukleová kyselina (ribonucleic acid)
RNáza A	bovinní pankreatická ribonukleáza A
RNC	komplex ribozomu a vznikajícího polypeptidu (ribosome-nascent chain complex)
T2D	diabetes 2. typu (type 2 diabetes)
TFIID	transkripční faktor II D
tRNA	transferová RNA
UPR	system odpovědi na nesbalené proteiny (unfolded protein response)
UPR <sup>mt</sup>	mitochondriální UPR
XBP1	X-box vázající protein 1 (X-box binding protein 1)

## Seznam obrázků

Obrázek 1: Obecná struktura L- $\alpha$ -aminokyseliny .....	15
Obrázek 2: Kodony a jimi kódované aminokyseliny .....	16
Obrázek 3: Zjednodušené schéma elongace transkripce .....	17
Obrázek 4: Reakční schéma vzniku peptidické vazby .....	18
Obrázek 5: Schéma funkčních oblastí ribozomu .....	19
Obrázek 6: Reakční schéma prenylace .....	20
Obrázek 7: Cis a trans konformace peptidické vazby .....	21
Obrázek 8: Vznik vodíkového můstku .....	22
Obrázek 9: Porovnání $\alpha$ -helix a $\beta$ -skládaného listu .....	23
Obrázek 10: Kvartérní struktura hemoglobinu .....	24
Obrázek 11: Obecné strategie pro studium kotranslačního skládání proteinů.....	26
Obrázek 12: Energetické bariéry skládání proteinů .....	27
Obrázek 13: Hydrofóbní kolaps .....	28
Obrázek 14: Porovnání NMR spekter složeného, nesloženého a částečně složeného proteinu .....	31
Obrázek 15: Rentgenová krystalografie proteinů .....	32
Obrázek 16: Struktura Mason-Pfizerova opičího viru .....	33
Obrázek 17: Přehled UPR.....	35
Obrázek 18: Porovnání rychlosti tvorby agregátů u jednotlivých onemocnění.....	37

## Obsah

<b>1</b>	<b>Úvod</b> .....	<b>14</b>
<b>2</b>	<b>Syntéza proteinu</b> .....	<b>15</b>
2.1	Aminokyseliny .....	15
2.2	Transkripce .....	16
2.3	Translace.....	18
<b>3</b>	<b>Struktura proteinu</b> .....	<b>21</b>
3.1	Primární struktura.....	21
3.2	Sekundární struktura .....	21
3.2.1	$\alpha$ -Helix.....	22
3.2.2	$\beta$ -Skládaný list .....	22
3.2.3	Otočky, smyčky, výdutě.....	23
3.3	Terciární struktura.....	23
3.4	Kvartérní struktura .....	24
<b>4</b>	<b>Skládání proteinů</b> .....	<b>25</b>
4.1	Kotranslačně nebo posttranslačně .....	25
4.2	Skládání na ribozomu .....	26
4.3	Levinthalův paradox .....	27
4.4	Hnací síly protein foldingu .....	27
4.5	Chaperony.....	28
<b>5</b>	<b>Studium struktury a predikce skládání proteinu</b> .....	<b>30</b>
5.1	Studium struktury.....	30
5.1.1	Sekvenování.....	30
5.1.2	NMR spektroskopie .....	30
5.1.3	Rentgenová krystalografie.....	31

5.2	Predikce .....	32
5.2.1	Klasická bioinformatika .....	32
5.2.2	Rosetta@home, Foldit, Folding@home a jiné .....	33
<b>6</b>	<b>Rozbalování a špatné sbalování proteinů .....</b>	<b>34</b>
6.1	Důsledky a onemocnění .....	35
6.1.1	Alzheimerova choroba .....	35
6.1.2	Parkinsonova choroba .....	36
6.1.3	Diabetes mellitus 2. typu .....	36
<b>7</b>	<b>Závěr .....</b>	<b>38</b>
<b>8</b>	<b>Bibliografie .....</b>	<b>39</b>

# 1 Úvod

Proteiny patří spolu s lipidy a sacharidy mezi základní složky všech živých organismů. Jsou to makromolekulární látky a účastní se většiny chemických pochodů v těle. I drobná nerovnováha může zapříčinit kolaps celého systému. Lidský proteom, na rozdíl od genomu, ještě stále nebyl popsán, ale již teď se odhaduje, že by počet proteinů mohl dosáhnout i desetimístných čísel. Neustále jsou objevovány nové funkce proteinů, fyziologické i patologické, a v každém případě je klíčovou rolí jejich struktura.

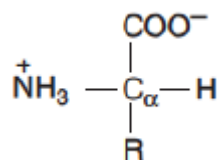
Skládání proteinů je komplikovaný proces, který stále není zcela objasněn. Řetězec aminokyselin, který tvoří primární strukturu, je skládán do konformací vyšších úrovní, do sekundární, terciární, případně kvartérní struktury. Bez správného složení není protein funkční a může docházet k onemocněním, jako jsou například neurodegenerativní poruchy. První pokusy pro objasnění protein foldingu byly v polovině 20. století díky rozvoji vědy, a především metod rentgenové krystalografie a NMR spektroskopie. Prvním proteinem s popsanou strukturou byl myoglobin a za tento objev byla autorům Maxu Perutzovi a Johnu Kendrewovi udělena roku 1962 Nobelova cena za chemii. S nástupem počítačů, a především internetu se otevřely nové možnosti studia skládání proteinů v rámci bioinformatiky, kdy se vychází z dat výše zmíněných metod a je možno i predikovat strukturu bez předchozího měření.

## 2 Syntéza proteinu

Syntéza proteinu vychází z genetického kódu a jedná se o energeticky nejnáročnější proces v buňce. Správná výroba samotného proteinu je klíčovým prvkem pro jeho správnou funkčnost. Celý proces přepisu informace z genu a jeho překladu do pořadí aminokyselin je popisován jako centrální dogma molekulární biologie. Tento pojem poprvé použil roku 1958 britský biolog Francis Crick, který spolu s Jamesem Watsonem poprvé popsal strukturu DNA na základě dat z rentgenové krystalografie. Za objev dvoušroubovice získali oba v roce 1953 Nobelovu cenu za fyziologii a lékařství. Centrální dogma dle jeho slov představovalo tvrzení, že přenos informace z nukleové kyseliny do nukleové kyseliny nebo do proteinu je možný, ale přenos informace z proteinu do proteinu či nukleové kyseliny možný není. Dogma bylo chápáno jako přenos informací následovně: DNA → DNA, DNA → RNA, RNA → protein. Bylo mu vytknuto, že podle jeho definice by přenos mohl probíhat i z RNA do DNA, což bylo tehdy kontroverzní, protože objev enzymu reverzní transkriptázy a procesu reverzní transkripce u retrovirů byl popsán až v roce 1970. [1- 4]

### 2.1 Aminokyseliny

Proteiny jsou polymery, jejichž základní stavební jednotkou jsou aminokyseliny. Obecně se jedná o organické látky, které ve své struktuře obsahují funkční karboxylovou (-COOH) a aminovou skupinu (-NH<sub>2</sub>). Obecná struktura L- $\alpha$ -aminokyseliny je znázorněna na obr. č. 1. V eukaryotech se vyskytuje celkem 21 proteinogenních geneticky kódovaných  $\alpha$ -aminokyselin (dále jen aminokyselin). Jednadvacátou aminokyselinou je selenocystein. Ten byl do této skupiny zařazen v roce 1988. Strukturně je podobný cysteinu, ale síra je zde nahrazena selenem. [1, 2]



**Obrázek 1: Obecná struktura L- $\alpha$ -aminokyseliny (převzato z [1])**

Vlastnosti jednotlivých aminokyselin se liší v závislosti na postranním řetězci. Kromě glycinu jsou na C <sub>$\alpha$</sub>  vázány 4 různé substituenty, což označuje chiralitu uhlíku.

Díky němu existují 2 enantiomery pro každou aminokyselinu, L a D dle stáčitosti polarizovaného světla. V savcích proteinech se vyskytuje pouze L forma. [1, 2]

V genetickém kódu je zapsán alespoň jeden kodon (triplet, tři po sobě jdoucí nukleotidy mRNA) pro každou z těchto aminokyselin (viz obr. č. 2). Selenocystein je kódován UGA kodonem. [1, 2]

		U		C		A		G			
	U	UUU	] Phe	UCU	] Ser	UAU	] Tyr	UGU	] Cys	U	
		UUC		UCC		UAC		UGC		C	
		UUA		UCA		UAA		UGA		Stop	A
		UUG		UCG		UAG		UGG		Trp	G
	C	CUU	] Leu	CCU	] Pro	CAU	] His	CGU	] Arg	U	
		CUC		CCC		CAC		CGC		C	
		CUA		CCA		CAA		CGA		A	
		CUG		CCG		CAG		CGG		G	
5' Base	A	AUU	] Ile	ACU	] Thr	AAU	] Asn	AGU	] Ser	U	
		AUC		ACC		AAC		AGC		C	
		AUA		ACA		AAA		AGA		A	
		AUG		ACG		AAG		AGG		Arg	G
	G	GUU	] Val	GCU	] Ala	GAU	] Asp	GGU	] Gly	U	
		GUC		GCC		GAC		GGC		C	
		GUA		GCA		GAA		GGA		A	
		GUG		GCG		GAG		GGG		G	
										3' Base	

Obrázek 2: Kodony a jimi kódované aminokyseliny (převzato z [1])

## 2.2 Transkripce

Transkripce, přepis, je proces syntézy řetězce RNA dle templátu DNA podle Watson-Crickových pravidel párování bází. Jedná se o enzymatický proces rozdělený do tří fází: iniciace, elongace a terminace. Celá transkripce se odehrává v jádře buňky. [1, 2]

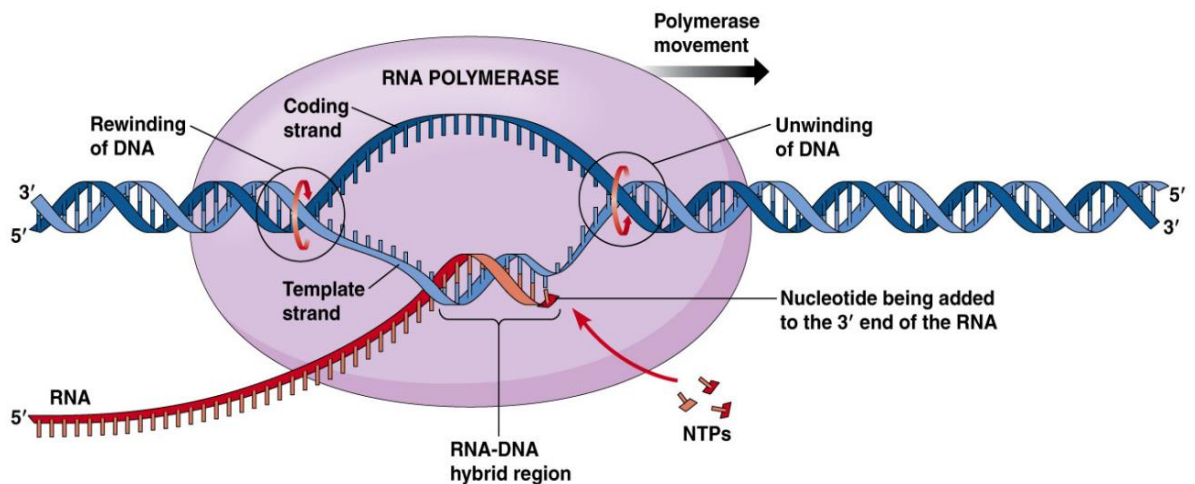
Při iniciační fázi se mění oblast chromatinu obsahující promotor (sekvence DNA obsahující informace o startu transkripce) tak, aby byl přístupný pro další transkripční faktory. To je docíleno např. modifikací histonů či pomocí chromatinových remodelačních faktorů. Jednou z nejvíce prostudovaných sekvencí v promotorové oblasti je tzv. TATA-box. Tato sedmi nukleotidová sekvence na sebe váže TATA vazebný protein, který je součástí transkripčního faktoru TFIID (*Transcriptional Factor*



II D). Vzniklý komplex je rozpoznáván RNA polymerázou II, která se váže a vzniká preiniciační komplex. [5]

RNA polymeráza poté rozvine dvoušroubovici DNA v délce přibližně 14 nukleotidů v oblasti začátku transkripce a začne syntetizovat vlákno RNA ve směru 5'→3'. Transkripty kratší 9 nukleotidů jsou uvolněny a spolu s dalšími mechanismy je enzym posunut z oblasti promotoru. V této fázi se syntetizuje již vlákno delší a transkripce přechází do bodu elongace. [2]

Proces elongace (viz obr. č. 3) popisuje syntézu pre-mRNA dle komplementarity bází, kdy se polymeráza posunuje po vláknu DNA ve směru 3'→5'. Jakmile transkript dosáhne velikosti přibližně 25 nukleotidů, dosud neaktivní C-koncová doména polymerázy je fosforylována. Tato reakce vyvolá odezvu komplexu čepičkových (capping) enzymů, kdy na 5'-konci RNA dojde k odstranění fosfátové skupiny, adici guanosinmonofosfátu a následné methylaci. Výsledkem je tzv. 5'-čepička, která chrání konec vlákna před možnou destrukcí. Dále se aktivuje sestřihový (splicing) komplex, kdy se ze syntetizovaného vlákna odstraňují nekódující sekvence. Někdy se výše zmíněné procesy nazývají jako post-transkripční nebo ko-transkripční. [6] Součástí transkripce je i proofreading, který kontroluje správnost pořadí nukleotidů, ale není tak účinný jako při replikaci DNA, proto je syntéza zatížena větší chybou. [1, 5]



**Obrázek 3: Zjednodušené schéma elongace transkripce (převzato a upraveno z [7])**

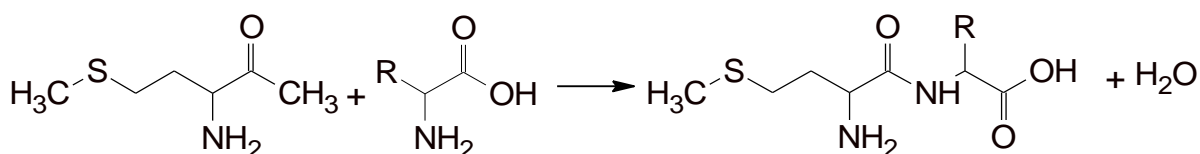
Poslední fází je terminace, kdy se transkripční komplex rozpustí, na vzniklý 3'-konec se přidá tzv. poly(A) konec a nasyntetizovaná mRNA opouští jádro. [2]

## 2.3 Translace

Translace označuje samotnou biosyntézu proteinů, která probíhá na ribozomech. Podobně jako transkripce se dá také rozdělit na fázi iniciace, elongace a terminace. [1, 2]

Během iniciace se tvoří ternární komplex složený z malé ribozomální podjednotky, mRNA a iniciační transferové RNA s aminokyselinou methioninem. Tohoto procesu se účastní vedle několika dalších iniciačních faktorů i RNA helikáza, která má za úkol rozmotat sekundární strukturu mRNA nebo poly(A) vázající protein. [8] Vzniklý preiniciační komplex začne skenovat mRNA ve směru 5'→3' a hledat start kodon AUG. Jakmile je kodon nalezen, dochází k odpoutání několika iniciačních faktorů a naopak navázání velké ribozomové podjednotky. Takto vzniklý komplex je již schopný syntézy polypeptidu. [1, 2]

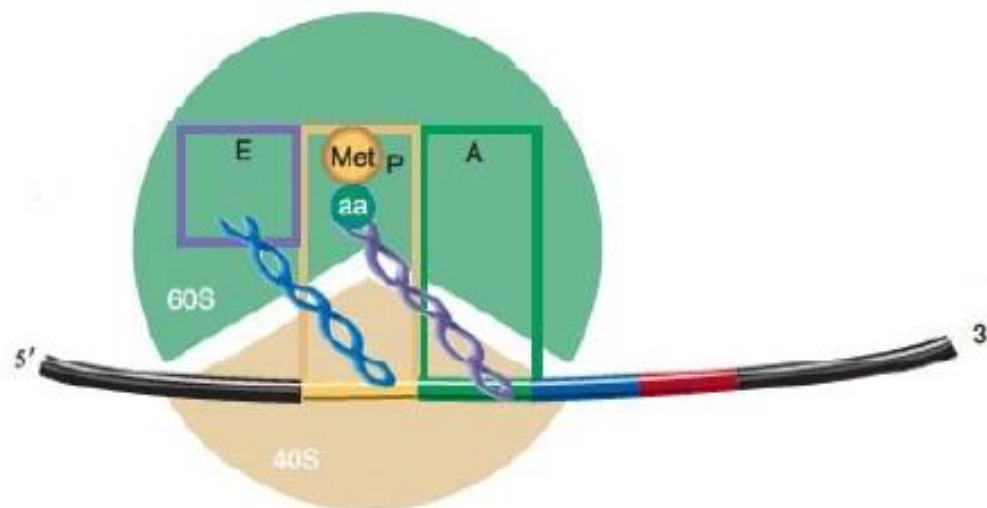
Ribozom je funkčně rozdělen na tři oblasti. Iniciační met-tRNA je umístěn v peptidylové oblasti P, aminoacylová-tRNA, kterou kóduje následující kodon mRNA je navázána v aminoacylové oblasti A. Aminokyseliny se tedy nacházejí v těsné blízkosti. Enzym peptidyltransferáza přesune methionin z iniciační tRNA na vedlejší aminokyselinu, vznikne peptidická vazba mezi karbonylovou skupinou methioninu a  $\alpha$ -aminoskupinou následující kyseliny (viz obr. č. 4). Proteosyntéza tedy probíhá ve směru od N-konce k C-konci. [1, 2]



**Obrázek 4: Reakční schéma vzniku peptidické vazby**

Akceptorová část deacylované tRNA je nakloněna do exitové oblasti E. Translokáza posune tRNA s dipeptidem z místa A do místa P za hydrolýzy guanosintrifosfátu (GTP), tím se deacylovaná tRNA přesune do oblasti E (viz obr. č. 5). Do akceptorové oblasti je pomocí eEF1 $\alpha$ -GTP navázána podle kodon-antikodon interakce další tRNA s aminokyselinou, deacylovaná tRNA z E oblasti je uvolněna a cyklus se opakuje. [9] Pořadí aminokyselin určuje primární strukturu proteinu. Celého mechanismu se účastní několik elongačních faktorů, přičemž některé z nich zastávají

v buňce i jiné než translační funkce. Podjednotka A1 výše zmíněného elongačního faktoru eEF1 $\alpha$  se vedle translace účastní ještě při embryogenezi, stárnutí, onkogenních transformacích, buněčné proliferaci, apoptóze, organizaci cytoskeletu a degradaci proteinů. U onkogenních onemocnění bývá podobně jako u eEF1 $\alpha$  zvýšena i hladina elongačního faktoru 2 (eEF2). [2, 10]

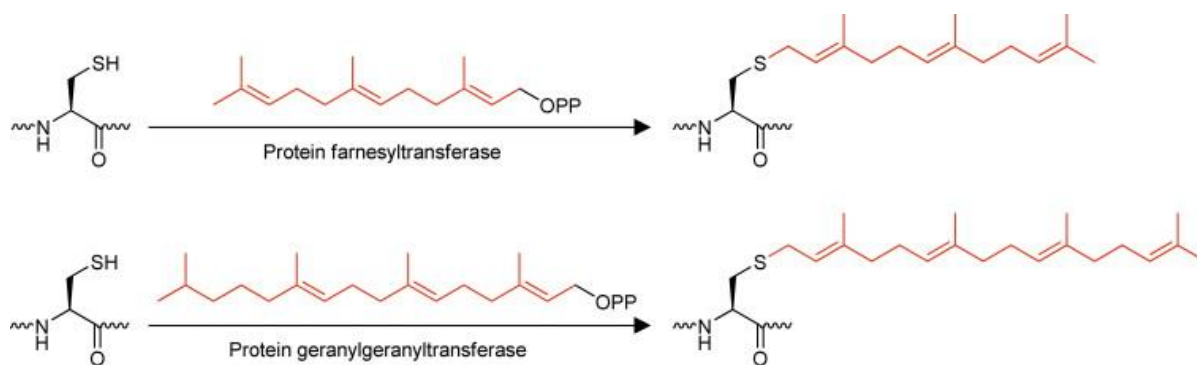


**Obrázek 5: Schéma funkčních oblastí ribozomu** (převzato a upraveno z [1])

Terminace vyžaduje přítomnost stop kodonu v A oblasti ribozomu. To podněcuje navázání uvolňovacího faktoru eRF1 a deacylovaná tRNA z E oblasti se uvolní. Peptidyl transferáza, která v tomto případě figuruje jako hydroláza, rozštěpí esterovou vazbu tRNA s polypeptidem. Ribozom se disociuje zpět do podjednotek, které jsou připraveny pro další syntézu. [1, 2]

Během i po proteosyntéze může docházet k dalším modifikacím polypeptidového řetězce v rámci ko- či posttranslačních úprav. [1] Dosud bylo zaznamenáno více než 200 různých typů posttranslačních modifikací (PTM) od malých chemických úprav, jako je fosforylace nebo acetylace, až po přeměny celých proteinů, jako je například ubikvitinace, kdy se na protein pomocí enzymů naváže ubikvitin za účelem degradace proteinu. Podobně destruktivní jako ubikvitinace je proteolýza, kdy dochází k rozštěpení peptidické vazby. Mezi další PTM patří glykosylace, acylace, z nichž nejběžnější je myristoylace a palmitoylace, a prenylace. Glykosylace je jednou z nejčastějších PTM a byly zaznamenány případy, kdy spolu s fosforylací tvoří určitou

formu regulačního mechanismu, přepínače. Při prenylaci se na cystein v oblasti C-konce proteinu kovalentně naváže polyisoprenní lipid (např. farnesyl nebo geranylgeranyl, viz obr. č. 6). Chybná prenylace Ras a Rab proteinů bývá spojena s infekčními a dědičnými onemocněními a rakovinou. [11, 12]



**Obrázek 6: Reakční schéma prenylace (převzato z [13])**

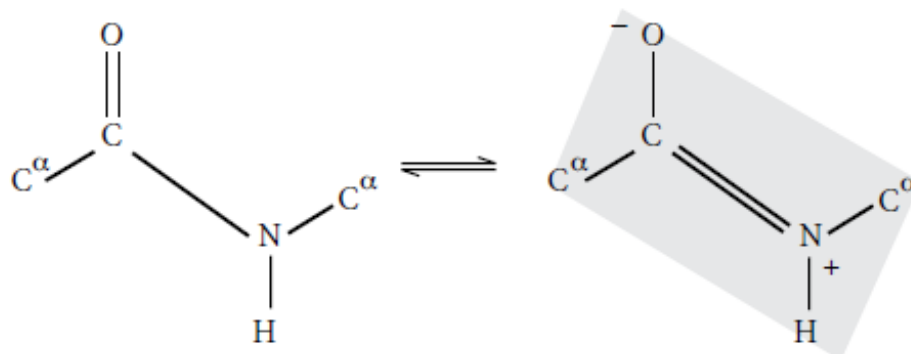
### 3 Struktura proteinu

Běžně dělíme strukturu proteinu do čtyř úrovní, vedle již zmíněné primární je to dále sekundární, terciární a kvartérní. [14]

#### 3.1 Primární struktura

Pro každý protein je charakteristická primární struktura, ta určuje jeho vlastnosti a obsahuje veškeré informace potřebné pro uspořádání vyššího řádu. [15] Jeden z prvních proteinů, u kterého byla primární struktura popsána, byl insulin. [16]

Aminokyseliny jsou spojeny kovalentní peptidickou vazbou. Ta má díky rezonanci částečně charakter dvojné vazby, je planární a atomy nemohou volně rotovat. Zpravidla se tak vyskytují dvě konformace, cis a trans, které se liší vazebným úhlem  $\omega$  (viz obr. č. 7). [14]

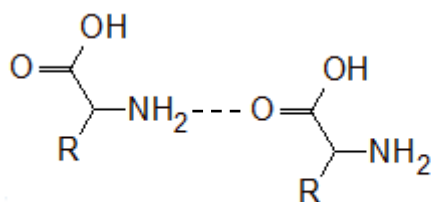


Obrázek 7: Cis a trans konformace peptidické vazby (převzato z [14])

#### 3.2 Sekundární struktura

Polypeptidový řetězec proteinu je zhruba z 60 % uspořádán do krátkých pravidelných struktur, a sice do šroubovice ( $\alpha$ -helix) a skládaného listu ( $\beta$ -skládaný list). Zbytek řetězce je složen z nahodilých spirál a otoček, tedy neuspořádaných struktur. [17]

Na rozdíl od struktury primární, se vzniku sekundární struktury účastní nekovalentní vazby, konkrétně vodíkové můstky mezi atomem vodíku amidové skupiny a atomem kyslíku v karbonylové skupině hlavního řetězce (viz obr. č. 8). [18]



**Obrázek 8: Vznik vodíkového můstku**

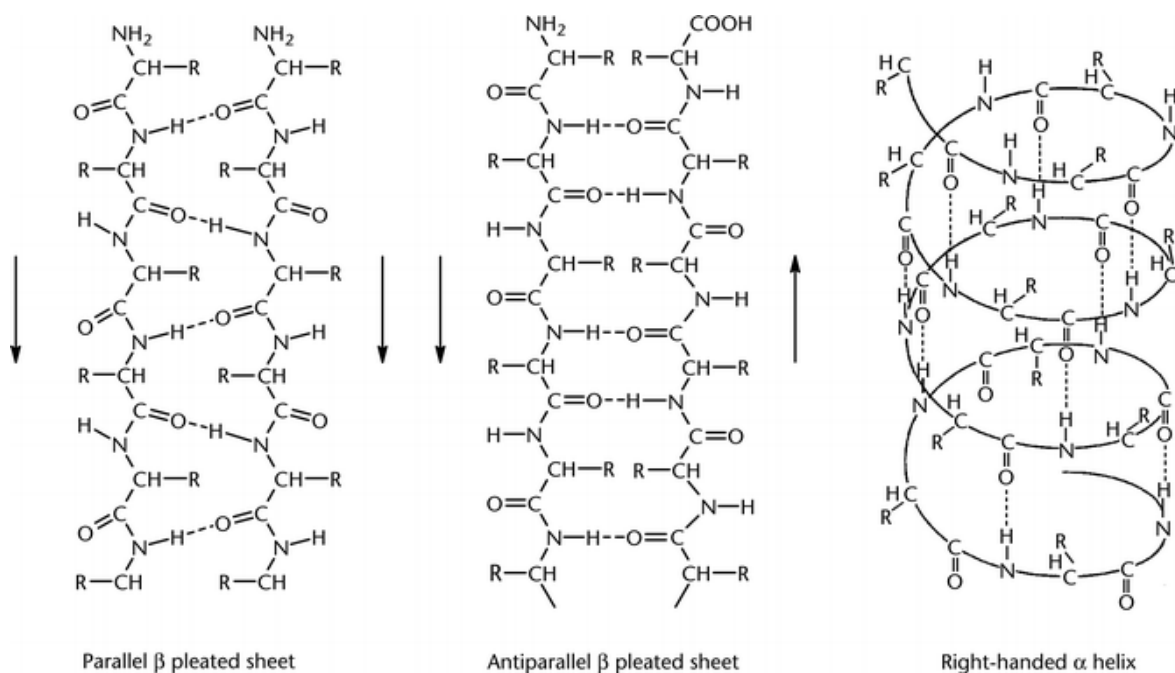
### 3.2.1 $\alpha$ -Helix

$\alpha$ -Helixy patří mezi nejběžnější formu sekundární struktury. Jedná se o pravotočivou šroubovici, kdy každá otáčka obsahuje 3,6 aminokyselinových zbytků, rotace  $100^\circ$  na jedno reziduum, a výška závitů je  $5,4 \text{ \AA}$  (cca  $0,54 \text{ nm}$  mezi jednotlivými zbytky). Vodíkové vazby se vyskytují v pravidelném vzoru, kdy se každá  $-\text{N}-\text{H}$  skupina váže s  $-\text{C}=\text{O}$  skupinou aminokyseliny o 4 rezidua níže. Vedle úhlu peptidické vazby  $\omega$ , se v polypeptidu ještě vyskytují další dva typy, úhel  $\Phi$  rotace vazby  $\text{C}\alpha-\text{N}$  a úhel  $\Psi$  rotace vazby  $\text{C}\alpha-\text{C}'$ . Pro  $\alpha$ -helix je  $\Phi$  rovno přibližně  $-60^\circ$  a  $\Psi -50^\circ$ . Kombinace těchto úhlů popisuje Ramachandranův diagram. [14, 18]

V  $\alpha$ -helix struktuře je pozorován silný dipól moment, makrodipól, který vzniká kumulativním efektem jednotlivých peptidových dipólů. [18]

### 3.2.2 $\beta$ -Skládaný list

Druhou nejčastější formou sekundární struktury je  $\beta$ -skládaný list. Je tvořen z dvou a více aminokyselinových řetězců spojených vodíkovými můstky, přičemž samotné řetězce stabilní nejsou. Pokud jsou polypeptidy orientované ve stejném směru, jedná se o paralelní uspořádání ( $\Phi = -119^\circ$ ,  $\Psi = 113^\circ$ ), pokud v navzájem opačném směru, mluvíme o antiparalelním ( $\Phi = -139^\circ$ ,  $\Psi = 135^\circ$ ).  $\beta$ -Skládaný list může být tvořen čistě paralelně, antiparalelně nebo i kombinací obou uspořádání, kdy tento smíšený typ obsahuje zpravidla 3-15 řetězců. Tento typ sekundárního uspořádání se často vyskytuje v nerozpustných strukturních proteinech. Porovnání  $\alpha$ -helix a  $\beta$ -skládaného listu s vyznačenými vodíkovými můstky je na obr. č. 9. [14, 16, 19]



Obrázek 9: Porovnání  $\alpha$ -helix a  $\beta$ -skládaného listu (převzato z [20])

### 3.2.3 Otočky, smyčky, výdutě

Otočky, smyčky a výdutě nepatří zcela mezi sekundární strukturu, neb se vodíkové vazby nevyskytují v pravidelných vzorech a nejde o repetitivní řetězce. Jsou to prvky, které se podílejí na tvorbě tzv. proteinových strukturních motivů, někdy označovaných jako supersekundární struktura, což by se dalo označit jako přechod mezi sekundární a terciární strukturou. Mezi nejznámější motivy patří zejména  $\beta$ -vlásenka nebo helix-smyčka-helix. [14, 21, 22]

## 3.3 Terciární struktura

Další úroveň skladby proteinu je jeho terciární struktura, kdy polypeptidový řetězec dostane trojrozměrnou podobu. Tvoří se spontánně a je stabilizována interakcemi postranních řetězců a disulfidickými můstky. V rozpustných proteinech se hydrofobní postranní řetězce nachází v jádru proteinu a hydrofilní řetězce, které dokáží s molekulami vody tvořit vodíkové můstky, jsou orientovány vně. [23, 24] Nejstabilnější struktura se nazývá nativní konformace proteinu. Existují čtyři hlavní interakce postranních řetězců, které tuto nativní strukturu stabilizují. Největší vliv mají hydrofobní interakce, kdy se aminokyseliny orientují podle svého vztahu k vodě. Mezi další interakce determinující terciární strukturu patří Van der Waalovy síly,

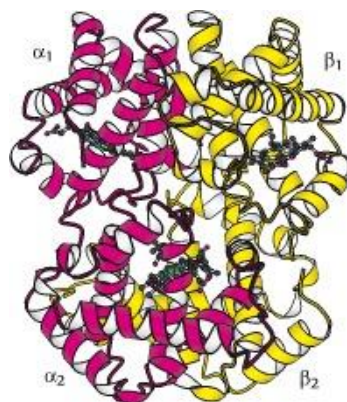
elektrostatické (iontové) vazby a vodíkové můstky mezi polárními skupinami řetězců. [23]

Terciární struktura velkých proteinů se často dále dělí na domény, globulární a fibrilární. Tyto oblasti jsou zpravidla odlišné od zbytku proteinu strukturně, funkčně či obojí, avšak jsou stále spojeny polypeptidovým řetězcem. Protein může obsahovat oba typy domén. Strukturně to jsou 100-200 aminokyselin dlouhé řetězce, které se zakomponovávají jako moduly do dalších proteinů. [17]

### 3.4 Kvartérní struktura

Kvartérní struktura se skládá ze dvou nebo více identických či rozdílných polypeptidových řetězců, podjednotek, které jsou spojeny nekovalentními vazbami, tzn. ne peptidickou vazbou, přičemž nejčastěji se jedná o dimery nebo tetramery. Stejně síly, které stabilizují terciární strukturu, drží pohromadě i strukturu kvartérní a může docházet vlivem vnějších podmínek k disociaci podjednotek. [23, 25]

Mezi proteiny s kvartérní strukturou se řadí např. enzymy alkoholdehydrogenáza, aldoláza nebo fumaráza, dále hormon inzulin nebo metaloprotein hemoglobin (Hb). Ten se skládá z bílkovinné části, globinu, a nebílkovinné části, hemu. Bílkovinnou část tvoří 4 podjednotky, 2 řetězce  $\alpha$  a 2 řetězce  $\beta$  (viz obr. č. 10). Tyto polypeptidy jsou k molekulám hemu vázány pomocí aminokyseliny histidinu. Naváže-li se molekula kyslíku na hem, změní se konformace okolních peptidových řetězců a nastane tzv. allosterecký efekt. Díky této kooperaci jsou neoxidované molekuly hemu přístupnější pro další kyslík. [26]



Obrázek 10: Kvartérní struktura hemoglobinu (převzato z [27])



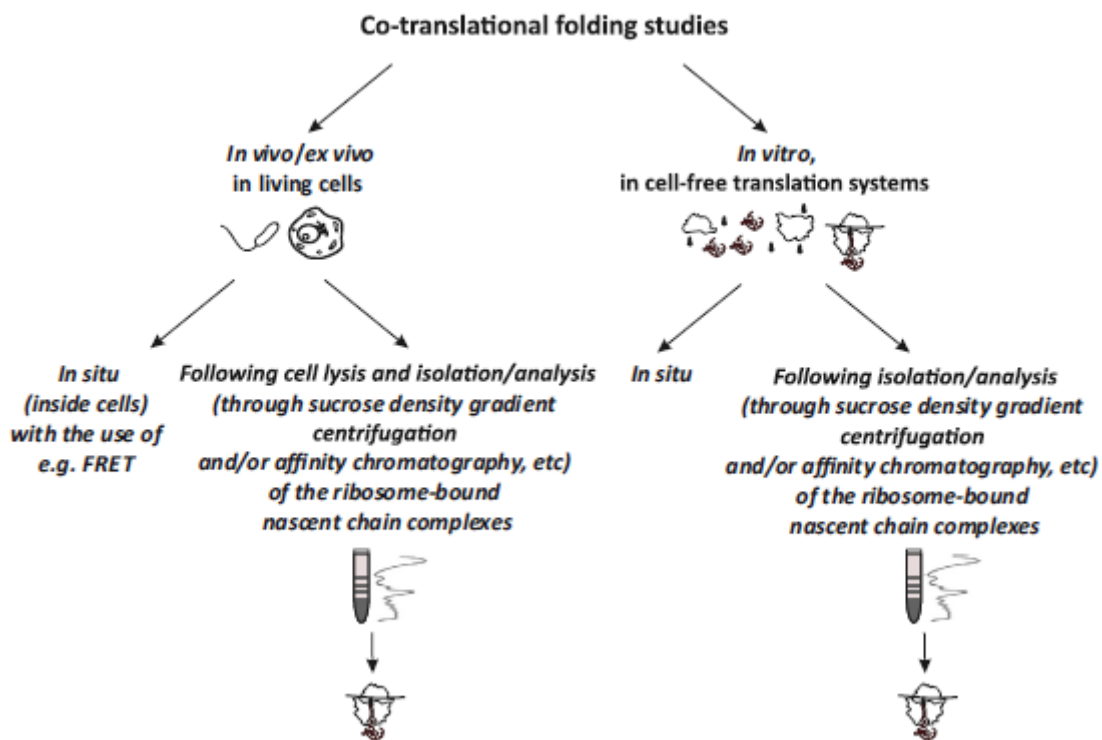
## 4 Skládání proteinů

Aby protein mohl být správně biologicky aktivní je esenciální jeho korektní sbalení do 3D struktury. Mechanismus tohoto procesu je předmětem studia již téměř 60 let, ale stále není plně objasněn. [28]

### 4.1 Kotranslačně nebo posttranslačně

První pokusy pro objasnění skládání sekundární a terciární struktury proteinu byly provedeny koncem 50. let minulého století biochemiky Fredericem Richardsem a Christianem Anfinsenem, kteří studovali *in vitro* enzymatickou aktivitu RNázy A. Tento enzym vystavili různým okolním podmínkám (pH, teplota, urea atd.) a sledovali, jak se mění jeho aktivita. Výsledkem pozorování bylo, že pokud se podmínky vrátili do původních hodnot a nebyla přerušena disulfidická vazba, obnovila se i aktivita enzymu, tudíž ke složení dochází nezávisle na biosyntéze, tedy post-translačně. Chybným závěrem však bylo, že se protein během reakce kompletně rozvinul a poté složil dohromady. Zde je nutné rozeznat pojmy denaturace a rozvinutí proteinu (angl. *unfolding*). V tomto případě je protein denaturován, neaktivní, ale stále mohou být na řetězci přítomny oblasti složené. Navíc skládání proteinů je multifaktorový proces, takže nelze zcela aplikovat závěry pokusů provedených *in vitro* na prostředí *in vivo*. [28-30]

Během 60. a 70. let byly pozorovány první náznaky toho, že by skládání mohlo probíhat již během syntézy proteinu, tedy kotranslačně. Většina těchto raných pokusů zahrnovala izolaci/frakcionaci RNCs (ribosome-bound nascent chain complexes) pomocí sacharózového hustotního gradientu a následného stanovení strukturních vlastností vznikajícího polypeptidového řetězce (viz obr. č. 11). Kotranslační hypotézu postupem času podporovala i další měření modernějšími metodami. [31]



**Obrázek 11: Obecné strategie pro studium kotranslačního skládání proteinů**  
(převzato z [31])

## 4.2 Skládání na ribozomu

Ribozom, jakožto výrobní jednotka proteinů, má vliv i na jejich složení. Tento fakt je zjevný už jen z informace, že skládání probíhá kotranslačně, tedy kdy je vznikající řetězec stále k ribozomu připoután. Při elongační fázi proteosyntézy postupuje řetězec skrz tzv. ribozomální exitový tunel. Je to kanál, který spojuje místo samotné syntézy proteinu s vnitřním prostředím buňky, cytosolem. Jeho délka je zhruba 80 Å a šířka osciluje mezi 10 a 20 Å. Aby mohl vznikající polypeptid volně procházet skrz, má tunel hydrofilní charakter. Již v této oblasti mohou vznikat náznaky sekundární struktury či celé strukturní motivy jako např. zinkový prst ADR1a (angl. zinc finger), pro terciární strukturu je tunel příliš úzký. [30, 32- 34]

Do cytosolu nejprve vstupuje N-konec, tedy nejen syntéza, ale i skládání proteinu začíná od tohoto konce. Skládání probíhá krokově tak, jak jednotlivá rezidua řetězce opouští ribozom, a trvá zhruba stejnou dobu jako biosyntéza. V každém jednotlivém kroku se vznikající prvky sekundární struktury mohou měnit či úplně zanikat. [30]

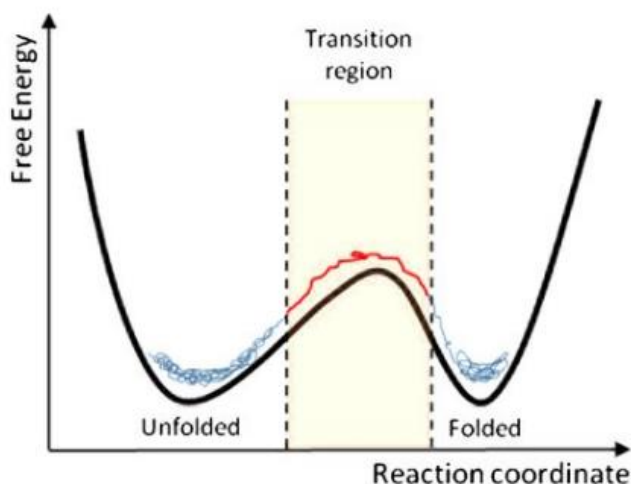
### 4.3 Levinthalův paradox

V roce 1969 se Cyrus Levinthal, americký molekulární biolog, zaměřil na otázku, jak si protein dokáže z toho obrovského množství možných nativních struktur vybrat tu jednu správnou. Je-li dán polypeptidový řetězec o délce 100 aminokyselin, je minimálně  $21^{100}$  možných konformací jednotlivých reziduí. Za předpokladu, že řetězec nemůže měnit svou konformaci rychleji než za jednu pikosekundu (to je čas termální vibrace), hledání té jedné správné by trvalo přibližně  $10^{10}$  let, někdy uváděno možná i  $10^{80}$  či  $10^{180}$ . Jako odpověď Levinthal navrhl, že skládání proteinu je řízeno pomocí specifických cest a tedy že nativní struktura proteinu je na konci této cesty nezávisle na tom, zda se jedná o nejstabilnější strukturu. [35]

Dle dalších studií a počítačových simulací je pravda pravděpodobně někde napůl mezi skládáním termodynamicky, tedy cílem je dosažení co nejnižší Gibbsovy energie, a kineticky, kdy je sledován určitý sled reakcí. V každém případě musí být překonána volná energie, která odděluje nativní strukturu od rozloženého stavu. [35, 36]

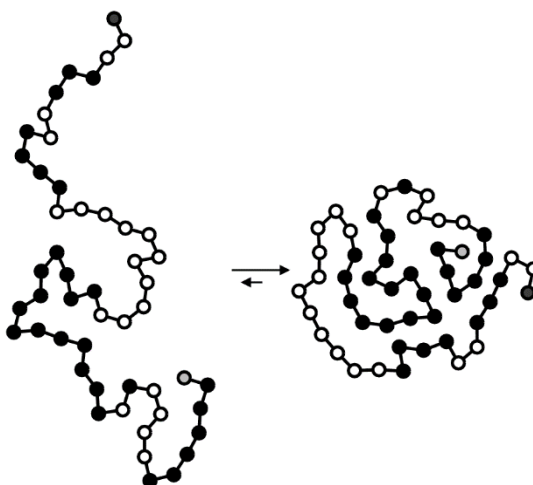
### 4.4 Hnací síly protein foldingu

Primárním impulsem pro složení je tvorba tzv. jádra složení (angl. folding nucleus). Je to část molekuly v přechodném stavu, která se nachází na vrcholu bariéry volné energie. Kvůli energeticky nevýhodné pozici je tato struktura velmi nestabilní, tudíž její studium je značně komplikované. Po překonání kritické hodnoty volné energie pokračuje skládání po energetickém spádu (viz obr. č. 12). [37]



**Obrázek 12: Energetická bariéra skládání proteinů (převzato a upraveno z [38])**

Jedním z mechanismů stabilizace tohoto klíčového prvku skládání je hydrofobní kolaps (viz obr. č. 13), kdy se aminokyseliny s hydrofobním postranním řetězcem (plná kolečka) orientují dovnitř struktury a jsou tak chráněny před stykem s vodným prostředím. Jádro složení nemusí odpovídat hydrofobnímu jádru. Folding nucleus se může nacházet v podstatě kdekoliv na proteinovém řetězci, jeho pozice ani mechanismus tvorby zatím není popsán. [37]



Obrázek 13: Hydrofóbní kolaps (převzato z [39])

Podobně jako další chemické reakce je i skládání proteinů ovlivněno teplotou, osmotickým tlakem nebo pH.

## 4.5 Chaperony

Molekulární chaperony (z fr. chaperon, česky též gardedáma) jsou proteiny, které napomáhají při skládání. Jsou přítomny jak v prokaryotech, tak v eukaryotech kde je možno je nalézt i v organelách jako např. v mitochondriích či endoplasmatickém retikulu. [40, 41]

V přeplněném prostředí buňky, kde existuje vyšší riziko inter-molekulárních interakcí, které by vedly k natlačení molekul na sebe a tedy vzniku agregátů, probíhá skládání proteinů za asistence chaperonů. Ty mají za úkol předejít agregaci a zajistit správnou funkčnost proteinu jak nově syntetizovaných, tak i nesložených proteinů, které byly vystaveny stresovým podmínkám, např. vysoké teplotě. Někdy je možno se setkat s výrazem protein teplotního šoku (heat shock protein, hsp), které tvoří podskupinu chaperonů. [40-42]

Chaperony lze rozdělit do dvou tříd dle závislosti na adenosintrifosfátu (ATP). ATP-dependentní chaperony využívají hydrolyzy ATP jako zdroj energie při velkých konformačních změnách chaperonu a zajištění správného složení proteinu. Chaperony na ATP nezávislé se váží na proteiny, u kterých hrozí agregace, a později je přesouvá k ATP-dependentním chaperonům ke složení. Do skupiny chaperonů nezávislých na ATP se řadí i chaperony, které napomáhají složení proteinů pomocí pasivní interakce. [42, 43]

Skládání proteinů by se dalo rozdělit do tří cest: skládání spontánní bez asistence chaperonů, skládání asistované opakujícími se Hsp70 cykly a skládání pomocí Hsp70-Hsp90 kaskády. [44]

Při skládání proteinu bez asistence je využíváno především hydrofobních interakcí a skládají se tak především menší proteiny jako např. ribonukleáza A. U větších proteinů, které se skládají touto cestou (např. luciferáza), je větší riziko misfoldingu, protože jsou náročnější na podmínky, především teplotu a koncentraci. [44] Hsp70 je pravděpodobně nejdůležitější chaperon. Uplatňuje se jak při syntéze *de novo*, tak při skládání proteinů po teplotním stresu. Hsp70 řídí skládání pomocí cyklů regulovaných ATP. Afinita Hsp70 k substrátu je zvýšena hydrolyzou ATP. Poté, co se uvolní adenosindifosfát, uvolní se i vazba chaperon-substrát a protein se buď složí sám, nebo se chaperon naváže znovu. [44]

Hsp70-Hsp90 kaskáda asistuje při skládání především velkých a na složení náročných proteinů. Hsp70 se naváže na vznikající jádro složení. Hsp90 umožní dokončení tohoto vznikajícího jádra tak, že působí jako puf. Poté „převezme“ od Hsp70 pomocí hydrolyzy ATP substrát a uvolní ho. [44]

## 5 Studium struktury a predikce skládání proteinu

V dnešní době je většina struktur nejběžnějších proteinů známa a uložena v databázích, avšak lidský proteom se dle vědců může skládat z 10000 až několika miliard různých proteinů, takže spousta informací stále zůstává neznámá. [45]

### 5.1 Studium struktury

#### 5.1.1 Sekvenování

Primární struktura proteinu se získává sekvenováním. Preferované je sekvenování genu, který daný protein kóduje, pokud je gen známý. Při sekvenování samotného proteinu je prvním krokem určení aminokyselin a jejich zastoupení v řetězci, kdy se peptidické vazby rozštěpí hydrolýzou, chemickou nebo enzymatickou, a vzorek je zanalyzován na chromatografu. Dalšími kroky jsou fragmentace proteinu na peptidy a analýza na hmotnostním spektrometru. [14]

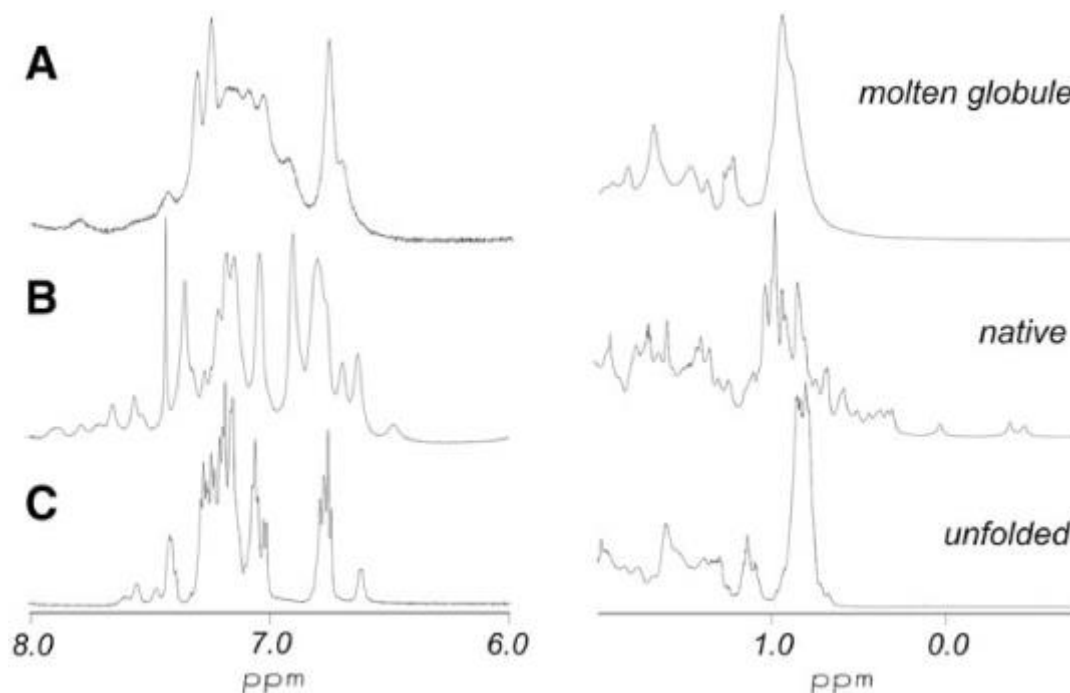
#### 5.1.2 NMR spektroskopie

Multidimenzionální NMR (nukleární magnetická rezonanční spektroskopie) je jednou z hlavních metod pro určení struktury biomolekul a za práci v této oblasti byla v roce 2012 Kurtu Wütrichovi udělena Nobelova cena za chemii. [46]

NMR spektroskopie je analytická metoda, která využívá atomů s nenulovým jaderným magnetickým spinem umístěných do vnějšího magnetického pole. Multidimenzionální NMR je schopná určit 3D strukturu proteinů až do molekulové hmotnosti 15 kDa. NMR v kombinaci s použitím pulzních sekvencí jako např. TROSY (transverse relaxation optimized spectroscopy) lze zobrazit proteiny až o hmotnosti 1 MDa. [46, 47]

Prvním krokem při získávání struktury je obohacení atomů proteinu izotopy (tzv. isotope labeling) a to  $^{13}\text{C}$  a  $^{15}\text{N}$ . To může být uniformě, tzn. všechny atomy uhlíku a dusíku v proteinu jsou nahrazeny, nebo selektivně jen určitá rezidua, čehož se využívá především u větších proteinů. Takto značený protein se získá buď chemicky, *in vitro* translací, nebo často syntézou v mikroorganismech, kdy jsou bakterie živěny  $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$  a  $^{13}\text{C}$ -glukózou. U vzorku jsou kladeny nároky především na velikost molekuly, koncentraci a stabilitu, pH se zpravidla upravuje na neutrální či nižší kvůli minimalizaci

výměny amidových protonů. Měření je prováděno metodou NMR s Fourierovou transformací, kdy se radiofrekvenčním pulsem excitují všechny jaderné spiny. Výsledkem jsou spektra (viz obr. č. 14), která se porovnávají s databází. [46, 48, 49]



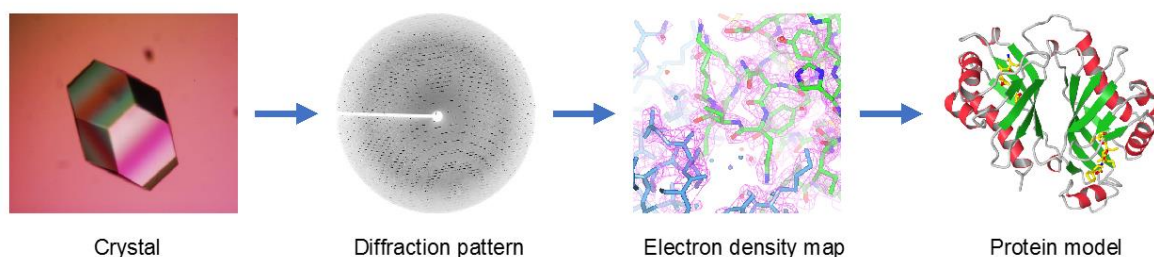
**Obrázek 14: Porovnání NMR spekter složeného, nesloženého a částečně složeného proteinu (převzato z [50])**

### 5.1.3 Rentgenová krystalografie

Rentgenová krystalografie určuje strukturu proteinů podle difrakce rentgenového záření na jejich krystalech. Proces krystalizace je značně komplikovaný oproti např. krystalizaci solí. Je ovlivňován především pH, teplotou, čistotou a koncentrací precipitátu a iontovou silou. Výsledný krystal je křehký, protože je držen pohromadě slabými interakcemi, jako jsou vodíkové můstky a van der Waalsovy síly. [46, 51, 52]

Paprsek monochromatického rentgenového záření dopadá na krystal. Část paprsků projde skrz beze změny, část projde s pozměněnou trajektorií. Tento jev je nazýván difrakce a způsobují ho interakce rentgenového záření s elektrony. Difraktované paprsky jsou detekovány a dle pozice a intenzity je vyhodnocen difrakční vzor. Poté je krystal pootočen a proces se opakuje. [51, 46]

Na základě získaných dat se vypočítají mapy elektronových hustot a získá se struktura proteinu (viz obr. č. 15). [46, 52]



**Obrázek 15: Rentgenová krystalografie proteinů** (převzato z [53])

## 5.2 Predikce

Predikcí sekundární a terciární struktury na základě aminokyselinové sekvence se zabývá relativně nový obor bioinformatika. Tento obor kombinuje, jak už název napovídá, znalosti z biologie a informatiky a věnuje se zpracování, prohledávání a analýze sekvenčních a strukturních dat biologických makromolekul. [54]

### 5.2.1 Klasická bioinformatika

Za klasickou bioinformatiku se dají označit obecné postupy při řešení problému, v tomto případě predikce struktury proteinu. Využívá se především prohledávání databází pomocí algoritmů. [54]

Dva nejvyužívanější programy pro vyhledávání jak DNA, tak proteinových sekvencí se nazývají FASTA a BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). BLAST je obecně populárnější a pravděpodobně i rozšířenější než FASTA a to především díky své rychlosti. BLAST program je integrovaný do webové databáze NCBI (National Center for Biotechnology Information). Oba programy obsahují několik algoritmů, které je třeba zvolit dle situace. [54-56]

Pravděpodobně nejdůležitější webovou databází s daty 3D struktur proteinů je PDB (*The Protein Data Bank*), která byla založena roku 1971. Od začátku roku 2019 na svém webu <http://www.wwpdb.org/> zprostředkovala již 5568 modelů struktur proteinů (údaje k 25. 6. 2019). Mezi další databáze patří např. SWISS-MODEL Repository, která obsahuje modely generované vlastním softwarem. Od roku 1994 běží program CASP (*Critical Assessment of protein Structure Prediction*), což je celosvětový experiment pro predikci struktury proteinu. [57-59]

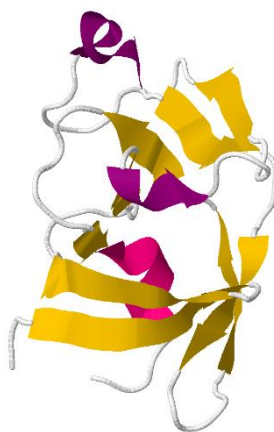


### 5.2.2 Rosetta@home, Foldit, Folding@home a jiné

Jedním z nejznámějších programů na generování modelů proteinů *ab initio* je ROSETTA vyvinutý na Washingtonské univerzitě. Tento program tvoří strukturu pomocí malých proteinových fragmentů z databáze PDB a sklídl úspěchy v rámci CASP experimentu. [60-62]

Protože výpočty struktury jsou náročné na hardware a postavit tak výkonný počítač, kterému by výpočty netrvaly měsíc, je značně finančně náročné, byla vytvořena aplikace Rosetta@home, která využívá crowdsourcingu. Běžný PC uživatel, dobrovolník, si tuto aplikaci stáhne za webu <https://boinc.bakerlab.org/>, nainstaluje a nechá běžet jako spořič obrazovky. Program využije část výpočetního výkonu CPU (*central processing unit*, česky též procesor) pro kalkulaci struktury proteinu. Do projektu bylo zapojeno již 1,296,669 uživatelů (data k 26. 6. 2019) a napomohli tak ke strukturám více než 5200 rodin proteinů (údaje k 19. 1. 2017). [63, 64]

Uživatelé byli často nespokojeni s tím, jak program pracuje, stěžovali si na „hloupost“ počítače, kdy umísťuje struktury mechanicky a ne intuitivně, jako by to udělal člověk. Jako reakci na připomínky přišli vývojáři se hrou Foldit, která zaznamenala velký úspěch vyřešení krystalické struktury retrovirální proteázy Mason-Pfizerova opičího viru (viz obr. č. 16). [65]



**Obrázek 16: Struktura Mason-Pfizerova opičího viru (převzato z [66])**

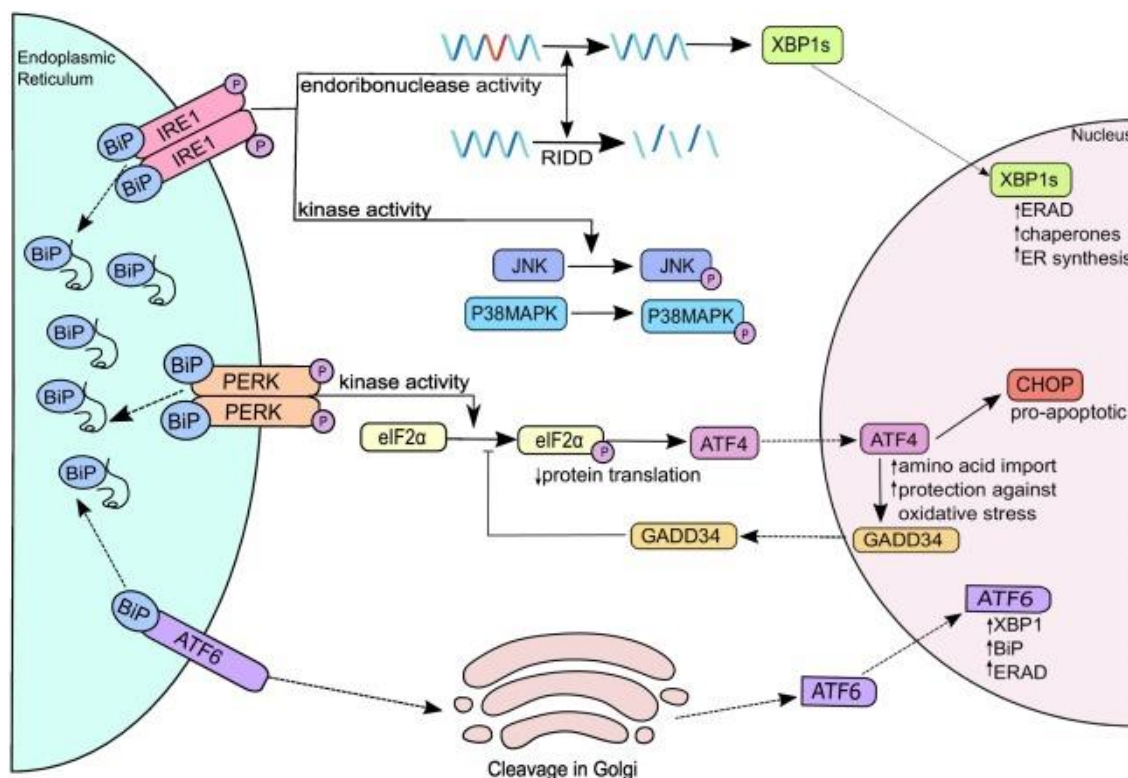
Podobně jako Rosetta@home existuje i aplikace Folding@home vyvinutá na Standfordské univerzitě, která má na svém kontě již 211 publikovaných odborných článků (data k 26. 6. 2019). [67]

## 6 Rozbalování a špatné sbalování proteinů

Endoplazmatické retikulum (ER), jakožto důležitá organela proteosyntézy, má řadu regulačních mechanismů pro kontrolu jakosti proteinů. Je-li ER vystaveno stresu, tzn. je-li přeplněna kapacita ER pro skládání proteinů a je tedy zvýšené riziko chybného skládání, aktivuje se systém UPR (unfolded protein response), který rozhodne o dalším osudu buňky. [68-70]

ER stres je detekován třemi transmembránovými proteiny: ER kinázou PERK (protein kinase R (PKR)-like endoplasmic reticulum kinase), transkripčním faktorem ATF6 (activating transcription factor 6) a enzymem IRE1 (inositol-required enzyme 1). Chaperon BiP (binding immunoglobulin chaperon, někdy označovaný i jako GRP78) je při homeostáze navázán na tyto senzory. Díky své vysoké afinitě k nesloženým či špatně složeným proteinům se při jejich zvýšené koncentraci z těchto senzorů odštěpí, čímž je aktivuje a spustí se celá kaskáda reakcí. [68-70]

PERK fosforyluje a inaktivuje eukaryotický iniciační faktor 2 alfa ( $eIF2\alpha$ ), který zpomaluje translaci, čímž sníží přísun proteinů do ER. PERK také zvýší regulaci ATF4 (activating transcription factor 4). Ten, je-li exprimován příliš, indukuje buněčnou smrt. IRE1 má vedle funkce transmembránové kinázy ještě funkci endoribonukleázy. Při aktivaci vyštípne z mRNA, která kóduje specifický UPR transkripční faktor, intron a tento faktor XBP1 (X-box binding protein 1) se začne syntetizovat. XBP1 aktivuje geny, které se snaží buňku udržet při životě pomocí syntézy membrány ER nebo indukci syntézy chaperonů. Kinetická aktivita vede k aktivaci JNK (c-Jun N-terminal kinase) a p38MAPK (p38 mitogen-activated protein kinases), které jsou proapoptické. ATF6 se po aktivaci přemísťuje přes Golgiho aparát do jádra, kde působí jako transkripční faktor pro BiP, XBP1 a pro proteiny spojené s degradací asociovanou s ER (viz obr. č. 17). [68-70]



**Obrázek 17: Přehled UPR (převzato z [68])**

Podobně jako ER mají i mitochondrie svůj systém odpovědi na špatně sbalené či poškozené proteiny, které ohrožují funkci organely. Mitochondriální UPR (UPR<sup>mt</sup>) spočívá v aktivaci CLPP proteázy (proteolytická podjednotka kaseinolytické mitochondriální peptidázy), která chybné proteiny zpracuje a exportuje z mitochondrie. [71]

## 6.1 Důsledky a onemocnění

Rozbalené a špatně sbalené proteiny se vyskytují u řady onemocnění. Od neurodegenerativních, jako např. Alzheimerova choroba, Parkinsonova choroba, Huntingtonova choroba, Creutzfeldt–Jakobova choroba, až po diabetes 2. typu nebo špatný vývoj kostí. [72, 73]

### 6.1.1 Alzheimerova choroba

Alzheimerova choroba (AD) je nejčastější příčinou demence. První popsáný případ byl roku 1907 Aloisem Alzheimerem. Tato nemoc je charakterizována masivní ztrátou neuronů v kůře mozkové a hipokampu přítomností neurofibrilárních klubek

(NFT), snížením kognitivních funkcí a akumulací amyloidového  $\beta$ -proteinu ( $A\beta$ ), resp. plaků, v mozkové tkáni. [19, 74-76]

NFT jsou tvořeny vlákny dvoušroubovice hyperfosforylovaného  $\tau$ -proteinu.  $A\beta$  shluky jsou způsobeny změnou struktury proteinu a existují jak ve formě rozpustných oligomerů, tak ve formě nerozpustných vláken, které jsou tvořeny  $\beta$ -skládaných listů. Zatím není zcela jasné, zda se jedná o příčinu či následek AD. [19, 74-76]

### **6.1.2 Parkinsonova choroba**

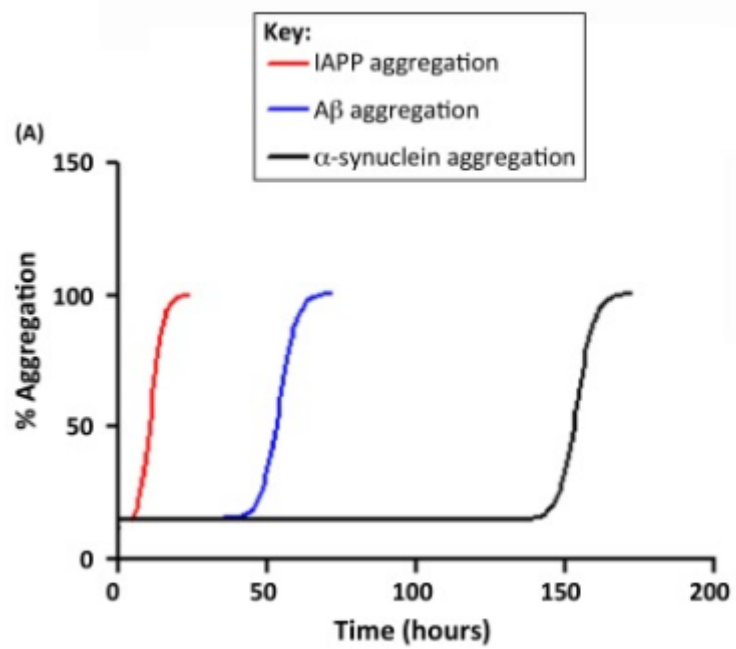
Parkinsonova choroba (PD) se projevuje především zhoršením motorických funkcí a prvně byla popsána roku 1817 Jamesem Parkinsonem. Geneticky podmíněná PD je způsobena mutací PARK genů, což má za následek syntézu špatně sbalených proteinů. Jedná se především o geny PARK6, PARK8 a PARK14. PARK1 gen kóduje syntézu  $\alpha$ .synukleinu, proteinu s ne zcela objasněnou funkcí, ale agreguje a tvoří tzv. Lewyho tělíska. [77, 78]

### **6.1.3 Diabetes mellitus 2. typu**

Diabetes 2. typu (T2D), někdy též cukrovka 2. typu, je komplexní metabolické onemocnění charakterizováno chronickou inzulinovou rezistencí a často je predispozice spojována s genetickými a environmentálními faktory. [73, 79]

Při T2D dochází ke snížení množství a funkce  $\beta$  buněk (B buněk). Toxicky na tyto buňky působí shluky amylinu, někdy též IAPP (ostrůvkový amyloidní polypeptid). To je neuroendokrinní peptidický hormon o 37 aminokyselinách a podle nedávných studií se tyto shluky objevují u více než 90 % pacientů s T2D. Protože se větší množství amylinu obecně nachází u starších lidí, bývá často spojován i s AD nebo PD. [73, 79]

První fází tvorby shluků je lag fáze. V průběhu této fáze protein zaujme chybnou terciární strukturu tak, že se nejprve vytvoří malé oligomery, které slouží jako jádro složení. Na to se nabalí další monomerní proteiny, což vyústí k exponenciálnímu růstu a vzniku agregátu. Porovnání rychlostí vzniku shluků je na obr. č. 18. [73, 79]



Obrázek 18: Porovnání rychlosti tvorby agregátů u jednotlivých onemocnění (převzato a upraveno z [73])

## 7 Závěr

Proteiny hrají v organismu zásadní roli. Jsou to makromolekuly, které se skládají z aminokyselin vázaných peptidickou vazbou. Jsou syntetizovány podle genetické informace pomocí transkripce a translace. Centrem proteosyntézy jsou ribozomy, které se podílejí i na tvorbě sekundární a terciární struktury. Sekundární struktura je tvořena vodíkovými můstky do  $\alpha$ -helixů a  $\beta$ -skládaných listů. Pro vznik terciární struktury jsou klíčové prvky hydrofobní interakce a chaperony. Terciární strukturu tvoří domény. Nejvyšší úroveň uspořádání proteinů je kvartérní struktura, která je tvořena více jak jedním polypeptidovým řetězcem. Pro studium struktury se využívá především rentgenová krystalografie a nukleární magnetická rezonance. Údaje z těchto metod slouží spolu s primární strukturou k predikci skládání proteinů. Hlavním obranným mechanismem buňky je UPR systém. Mezi choroby s výskytem špatně složených proteinů patří především neurodegenerativní onemocnění, jako je Alzheimerova nebo Parkinsonova choroba.

## 8 Bibliografie

1. **Devlin, Thomas M.** *Textbook of biochemistry: with clinical correlations*. 7. ed. Hoboken : John Wiley & Sons, 2011. ISBN 978-0-470-28173-4.
2. **Watson, James D.** *Molecular Biology of the Gene*. 7. ed. Boston : Pearson Education, 2013. ISBN 978-0-321-90537-6.
3. **Cammack, R. a další.** *Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology*. 2. ed. Oxford : Oxford University Press, 2006. ISBN 978-0-19-852917-0.
4. **Coffin, John M. a Fan, Hung.** The Discovery of Reverse Transcriptase. *Annual review of virology*. 2016, Sv. 3, 1.
5. **Latchman, David.** *Eukaryotic Transcription Factors*. 5. ed. Amsterdam : Academic Press, 2007. ISBN 978-0-123-73983-4.
6. **Hertel, Klemens J.** *Spliceosomal Pre-mRNA*. Totowa : Humana Press, 2014. ISBN 978-1-62703-979-6.
7. **Pearson Education, Inc.** Online Biology Notes. [Online] 2012. [Citace: 18. 6. 2019.] <https://www.onlinebiologynotes.com/transcription-in-prokaryotes/>.
8. **Thorton, Sarah a další.** Not just for housekeeping: protein initiation and elongation factors in cell growth and tumorigenesis. *Journal of Molecular Medicine*. 2003, Sv. 81, 9.
9. **Negrutskii, B. S. a El'skaya, A. V.** Functional Compartmentalization of the Translation Apparatus and Channeling of tRNA/Aminoacyl-tRNA in Cells of Higher Eukaryotes. *Molecular Biology*. 2001, Sv. 35, 4.
10. **Blanch, Alvaro a další.** Eukaryotic Translation Elongation Factor 1-Alpha 1 Inhibits p53 and p73 Dependent Apoptosis and Chemotherapy Sensitivity. *PLoS One*. 2013, Sv. 8, 6.
11. **Heal, William P. a Tate, Edward W.** Getting a chemical handle on protein post-translational modification . *Organic & Biomolecular Chemistry*. 2010, 4.

12. **Gui-Min, Qin, Yi-Bo, Hou a Xing-Ming, Zhao.** The exploration of amino acid variants co-occurring with post-translational modifications . *34th Chinese Control Conference*. 2015.
13. **Green, Keith D. a Garneau-Tsodikova, Sylvie.** *Comprehensive Natural Products II: Amino Acids, Peptides and Proteins*. Amsterdam : Elsevier Science, 2010. ISBN 978-0-08-045382-8.
14. **Creighton, Thomas E.** *The Biophysical Chemistry of Nucleic Acids and Proteins*. Eastbourne : Helvetian Press, 2010. ISBN 978-0-9564781-1-5.
15. **Murphy, Kenneth P.** *Protein Structure, Stability and Folding*. Totowa : Humana Press, 2001. ISBN 978-1-89603-682-6.
16. **Ravi, R., Vinu, R. a Gummadi, S. N.** *Coulson and Richardson's Chemical Engeneering*. 4. ed. Oxford : Butterworth-Heinemann, 2017. Sv. 3A: Chemical and Biochemical Reactors and Reaction Engineering. ISBN 978-0-08-101096-9.
17. **Lodish, Harvey a další.** *Molecular Cell Biology*. 6. ed. New York : W. H. Freeman, 2007. ISBN 978-0-716-77601-7.
18. **Petsko, Gregory A. a Ringe, Dagmar.** *Protein Structure and Function*. London : New Science Press Ltd, 2004. ISBN 0-9539181-4-9.
19. **Francioso, Antonio a další.**  $\beta$ -Sheet interfering molecules acting against  $\beta$ -amyloid aggregation and fibrillogenesis. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2015, Sv. 23, 8.
20. **Swiss Institute of Bioinformatics.** Protein sequence, structure and function. *Swiss Institute of Bioinformatics*. [Online] [Citace: 29. 6. 2019.] <https://edu.sib.swiss/course/view.php?id=20>.
21. **Navrátilová, Veronika.** Flexibilita aktivního místa lidského cytochromu P450 CYP2E1. *Bakalářská práce*. Olomouc : Univerzita Palackého v Olomouci, 2011.
22. **Chiang, Yih-Shien a další.** New Classification of supersecondary structures of sandwich-like proteins uncovers strict patterns of strand assemblage. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*. 2007, Sv. 68, 4.



23. **Pelley, John W.** *Elsevier's Integrated Biochemistry*. Maryland Heights : Mosby, 2007. ISBN 978-0-323-03410-4.
24. **Godbey, Terrance W.** *An Introduction to Biotechnology*. London : Academic Press, 2015. ISBN 978-1-907568-28-2.
25. **Bhagavan, Nadhipuram V. a Ha, Chung-Eun.** *Essentials of Medical Biochemistry*. 2. ed. London : Academic Press, 2015. ISBN 978-0-12-416687-5.
26. **Ouellette, Robert J. a Rawn, David J.** *Organic Chemistry: Structure, Mechanism, Synthesis*. 2. ed. Londýn : Academic Press, 2019. ISBN 978-0-12-812838-1.
27. **Berg, Jeremy M., Tymoczko, John L. a Stryer, Lubert.** *Biochemistry*. New York : W. H. Freeman, 2002. ISBN 0-7167-3051-0.
28. **Gianni, Stefano a Jemth, Per.** Protein folding: Vexing debates on a fundamental problem. *Biophysical Chemistry*. 2016, Sv. 212.
29. **Richards, Frederic M.** On the Enzymic Activity of Subtilisin-Modified Ribonuclease. *Proceedings of the National Academy of Sciences - PNAS*. 1958, Sv. 44, 2.
30. **Basharov, Mahmud A.** Protein Folding. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2003, Sv. 7, 3.
31. **Komar, Anton A.** Unraveling co-translational protein folding: Concepts and methods. *Methods*. 2018, Sv. 137.
32. **Cabrita, Lisa D. a Dobson, Christopher M., Christodoulou, John.** Protein folding on the ribosome. *Current Opinion in Structural Biology*. 2010, Sv. 20, 1.
33. **Kaiser, Christian M. a Liu, Kaixian.** Folding up and Moving on - Nascent Protein Folding on the Ribosome. *Journal of Molecular Biology*. 2018, Sv. 430, 22.
34. **Nilsson, Ola B., a další.** Cotranslational Protein Folding inside the Ribosome Exit Tunnel. *Cell Reports*. 2015, Sv. 12, 10.
35. **Finkelstein, Alexei V., a další.** There and back again: Two views on the protein folding puzzle. *Physics of Life Reviews*. 2017, Sv. 21.

36. **Bachmann, Annett a Kiefhaber, Thomas.** *Kinetic Mechanisms in Protein Folding.* Weinheim : Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2005, Sv. 1. ISBN 3-527-30784-2.
37. **Garbuzynskiy, Sergiy O. a Kondratova, Maria S.** Structural features of protein folding nuclei. *FEBS Letters.* 2008, Sv. 582, 5.
38. **Muñoz, Victor a Cerminara, Michele.** When fast is better: protein folding fundamentals and mechanisms form ultrafast approaches. *Biochemical Journal.* 2016, Sv. 473, 17.
39. **Tomixdf.** Hydrophobic collapse. *Wikipedia.* [Online] 2008. [Citace: 24. 6. 2019.] [https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=File:Protein\\_folding\\_schematic.png](https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=File:Protein_folding_schematic.png).
40. **Hardin, Charles a Knopp, James A.** *Biochemistry - Essential Concepts.* Oxford : Oxford University Press, 2013. ISBN 978-0-19-976562-1.
41. **Dahiya, Vinay a Buchner, Johannes.** Chapter One - Functional principles and regulation of molecular chaperones. *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology.* 2019, Sv. 114.
42. **Horowitz, Scott, a další.** Folding while bound to chaperones. *Current Opinion in Structural Biology.* 2018, Sv. 48.
43. **Hájek, David.** Bakalářská práce. *Využití chaperonů v přípravě medicíně významných rekombinantních proteinů.* Pardubice : Univerzita Pardubice, 2017.
44. **Luengo, Tania M., Mayer, Matthias P. a Rudiger, Stefan G. D.** The Hsp70-Hsp90 Chaperone Cascade in Protein Folding. *Trends in Cell Biology.* 2018, Sv. 29, 2.
45. **Ponomarenko, Elena A. a další.** The Size of the Human Proteome: The Width and Depth. *International Journal of Analytical Chemistry.* 2016.
46. **Sheehan, David.** *Physical biochemistry: principles and applications.* 2. ed. Chichester : Wiley-Blackwell, 2009. ISBN 978-0-471-85603-1.
47. **Jiang, Yajun a Kalodimos, Charalampos G.** NMR Studies of Large Proteins. *Journal of Molecular Biology.* 2017, Sv. 429, 17.

48. **Sýsová, Kateřina.** Bakalářská práce. *Metody studia struktury proteinů*. Pardubice : Univerzita Pardubice, 2017.
49. **Pujato, Mario a další.** pH Dependence of Amide Chemical Shifts in Natively Disordered Polypeptides Detects Medium-Range Interactions with Ionizable Residues. *Biophysical Journal*. 2005, Sv. 89, 5.
50. **Downing, Kristina A.** *Protein NMR techniques*. 2. ed. Totowa : Humana Press, 2004. ISBN 978-1-58829-246-9.
51. **Dohnálek, Jan a Kovař, Tomáš.** Krystalografie proteinů. *Fyzikální ústav Akademie věd České republiky*. [Online] [Citace: 25. 6. 2019.] <https://www.fzu.cz/oddeleni/oddeleni-strukturni-analyzy/research-subjects/krystalografie-proteinu>.
52. **Drenth, Jan.** *Principles of Protein X-Ray Crystallography*. New York : Springer, 2007. ISBN 978-0-387-33334-2.
53. **Creative Biostructure.** X-ray Crystallography Platform. *Creative Biostructure*. [Online] [Citace: 25. 6. 2019.] [https://www.creative-biostructure.com/x-ray-crystallography-platform\\_60.htm](https://www.creative-biostructure.com/x-ray-crystallography-platform_60.htm).
54. **Cvrčková, Fatima.** *Úvod do praktické bioinformatiky*. Praha : Academia, 2006. ISBN 80-200-1360-1.
55. **Reddy, C. A. a další.** *Methods for General and Molecular Microbiology*. Washington : American Society for Microbiology, 2007. ISBN 978-1-55581-223-2.
56. **Pearson, William R. a Lipman, David J.** Improved tools for biological sequence comparison. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1988, Sv. 8.
57. **Laskowski, Roman A.** Protein Structure Databases. *Molecular Biotechnology*. 2011, Sv. 48, 2.
58. **Bienert, S. a další.** The SWISS-MODEL Repository is a database of annotated 3D protein structure models generated by the SWISS-MODEL homology-modelling pipeline. *Nucleic Acids Res*. 2017, Sv. 45, D1.

59. **Moult, John a další.** Critical assessment of methods of protein structure prediction (CASP) - round IX. *Proteins, structure, function, and bioinformatics*. 2011, Sv. 79, 10.
60. **Bradley, Philip a další.** Free modeling with Rosetta in CASP6. *Protein: Structure, Function and Bioinformatics*. 2005, Sv. 61, 57.
61. **Rigden, Daniel J.** *From Protein Structure to Function with Bioinformatics*. Amsterdam : Springer Nature, 2017. ISBN 978-94-024-1067-9.
62. **Shmygelska, Alena a Levitt, Michael.** Generalized ensemble methods for de novo structure prediction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009, Sv. 106, 5.
63. Big data (and volunteers) help scientists solve hundreds of protein puzzles. *GeekWire*. [Online] [Citace: 26. 6. 2019.] <https://www.geekwire.com/2017/big-data-rosetta-protein-puzzles/>.
64. **Kaufmann, Kristian W., a další.** Practically Useful: What the Rosetta Protein Modeling Suite Can Do for You. *Biochemistry*. 2010, Sv. 49, 14.
65. **Khatib, Firas a další.** Crystal structure of a monomeric retroviral protease solved by protein folding game players. *Nature Structural & Molecular Biology*. 2011, Sv. 18, 10.
66. **Foldit.** Mason-Pfizer Monkey Virus. *Foldit Wiki*. [Online] [Citace: 26. 6. 2019.] [https://foldit.fandom.com/wiki/Mason-Pfizer\\_Monkey\\_Virus](https://foldit.fandom.com/wiki/Mason-Pfizer_Monkey_Virus).
67. *Folding@home*. [Online] [Citace: 26. 6. 2019.] <https://foldingathome.org/>.
68. **Bennett, Melissa K., Wallington-Beddoe, Craig T. a Pitson, Stuart M.** Sphingolipids and the unfolded protein response. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*. 2019.
69. **Chawla, Aditi a Niwa, Maho.** The unfolded protein response. *Current Biology*. 2005, Sv. 15, 22.
70. **Walter, Peter a Ron, David.** The Unfolded Protein Response: From Stress Pathway to Homeostatic Regulation. *Science (American Association for the Advancement of Science)*. 2011, Sv. 334, 6059.

71. **Callegari, Sylvie a Dennerlein, Sven.** Sensing the Stress: A Role for the UPRmt and UPRam in the Quality Control of Mitochondria. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2018.
72. **Makareeva, Elena, Aviles, Nydea A. a Leikin, Sergey.** Chaperoning osteogenesis: new protein-folding disease paradigms. *Trends in Cell Biology*. 2011, Sv. 21, 3.
73. **Mukherjee, Abhisek a další.** Type 2 diabetes as a protein misfolding disease. *Trends in Molecular Medicine*. 2015, Sv. 21, 7.
74. **Krone, Mary Griffin a další.** Effects of Familial Alzheimer's Disease Mutations on the Folding Nucleation of the Amyloid  $\beta$ -Protein. *Journal of Molecular Biology*. 2008, Sv. 381, 1.
75. **Crews, Leslie a Masliah, Eliezer.** Molecular mechanisms of neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Human Molecular Genetics*. 2010, Sv. 19, 1.
76. **Raffi, Michael S.** Targeting tau protein in Alzheimer's disease. *Lancet*. 2016, Sv. 338, 10062.
77. **Zhou, Yishu a další.** Association of Parkinson's disease with six single nucleotide polymorphisms located in four PARK genes in the northern Han Chinese population. *Journal of Neuroscience*. 2012, Sv. 19, 7.
78. **Dauer, William MD a Ho, Cherry Cheng-Ying.** The biology and pathology of the familial Parkinson's disease protein LRRK2. *Movement Disorders*. 2010.
79. **Negahdar, Maria a další.** GCK-MODY diabetes associated with protein misfolding, cellular self-association and degradation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. 2012, Sv. 1822, 11.