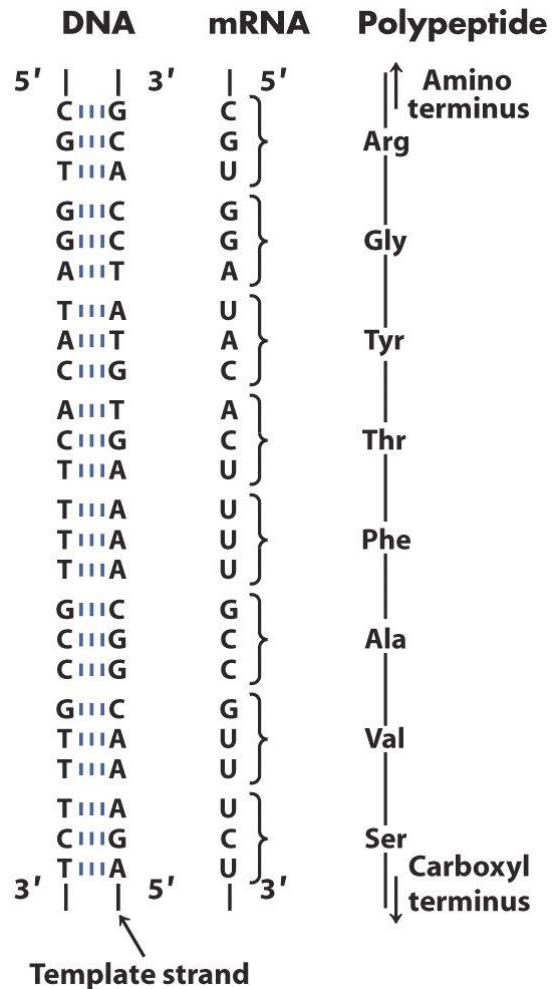


Struktura a funkce nukleových kyselin a proteinů

Ing. Eva Benešová, Ph. D.
Eva.Benesova@vscht.cz

Centrální dogma



Sekvence lidského genomu

3,2 miliardy párů basí

Oproti původním odhadům obsahuje méně než 25 000 genů.

Kódující sekvence pro proteiny – méně než 2%. (Př: u bakterií je poměr opačný)

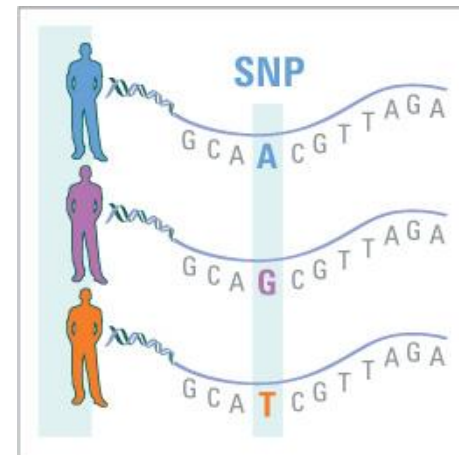
Nekódující oblasti:

a) přepisované – tRNA, rRNA, regulační formy RNA, introny

b) nepřepisované – počátky replikace, telomery, centromery, regulační oblasti apod.

Lidský genom je známý

- Human Genom Project
- program oficiálně ukončen v roce 2003

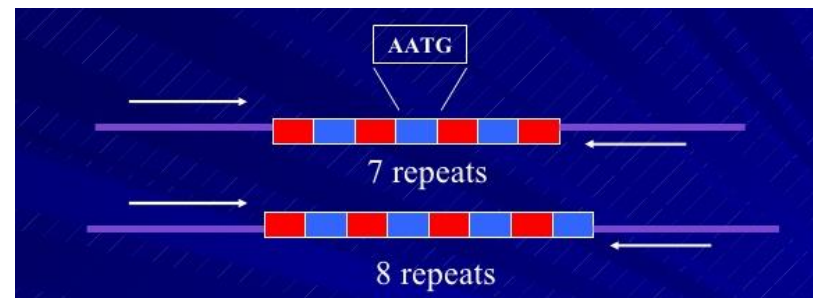


<https://www.broadinstitute.org/education/glossary/snp> (3.7.2014)

Lidský genom je variabilní

- Shoda u jednotlivců je v 99,9% basí
- Prediktivní medicína a personalizace léčby

Příklady rozdílů



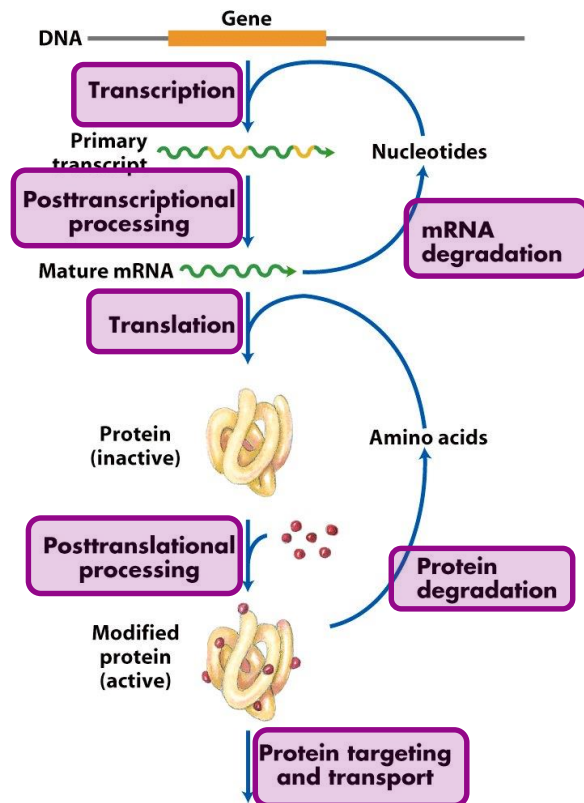
<http://www.slideshare.net/karanppt/microsatellite> (3.7.2014)

Opravdu vždy platí DNA → RNA → protein?

Genom x Transkriptom x proteom

veškerá přepisovaná RNA
(tj. mRNA, rRNA, tRNA, miRNA)

Méně než 5 % genomu.



Mnohobuněčný organismus:

- všechny buňky stejný genom
- různé buňky, různá genová exprese
- srovnání transkriptomů – informace vysvětlující různé buněčné typy i vztah s různými nemocemi

Množství proteinu přítomného v dané buňce v daný čas je regulováno nejméně na sedmi úrovních.

Funkce DNA a RNA

DNA:

uchování a přenos genetické informace (DNA obsahuje i sekvence jen s regulační funkcí – signály o začátku a konci genu, iniciační body pro replikaci apod.)

RNA:

ribosomální RNA = rRNA

složka ribozomů (na nich probíhá syntéza proteinů)

messenger RNA = mRNA

meziprodukty nesoucí genetickou informaci z 1 či více genů k ribozomu (tj. kódují AMK sekvenci 1 či více polypeptidů)

transfer RNA = tRNA

překlad informací z mRNA do sekvence AMK

- další funkce: regulační a katalytické (miRNA, siRNA, snRNA . . .)
- o těch si povíme v přednášce o Genových terapiích

Transkripce

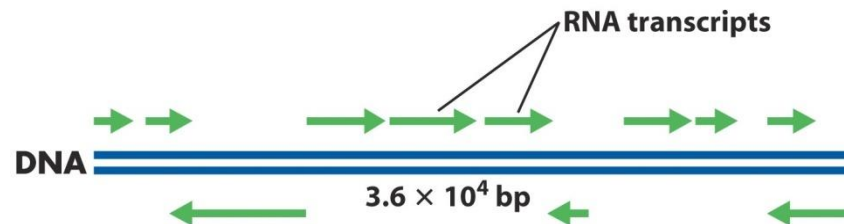
Překlad ds DNA do ss RNA (komplementární k jednomu řetězci).

(5')CGCTATAGCGTTT(3') DNA nontemplate (coding) strand

(3')GCGATATCGCAA(5') DNA template strand

(5')CGCUAUAGCGUUU(3') RNA transcript

V daném čase se transkribují jen některé geny – dle potřeb organismu. Kódující sekvence mohou být na obou řetězcích.



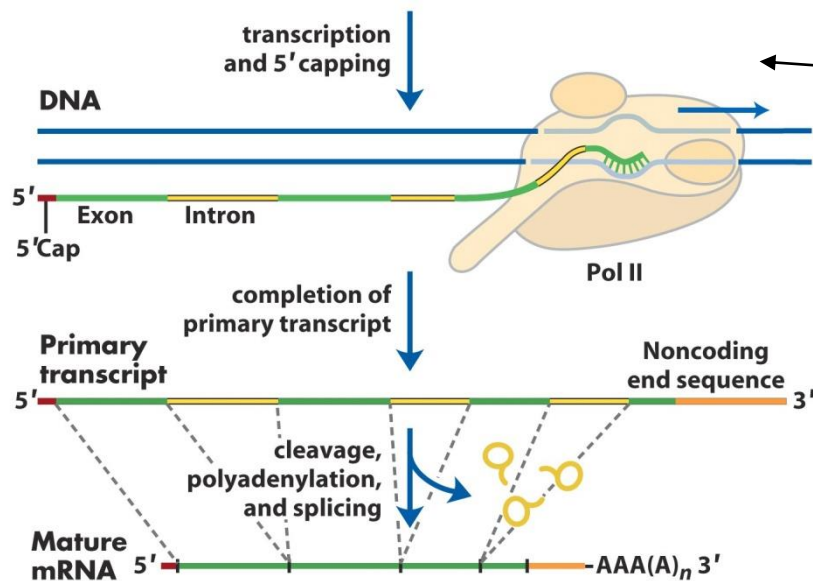
**Několik sousedních genů může mít společný promotor → přepis do jedné mRNA (tj. polygenová = polycistronní mRNA).
Na rozdíl od eukaryotních mRNA je u prokaryot většina mRNA polygenových.**

Posttranskripční modifikace u eukaryot

Nově syntetizovaná molekula je pouze primární transkript.

Dochází u ní k:

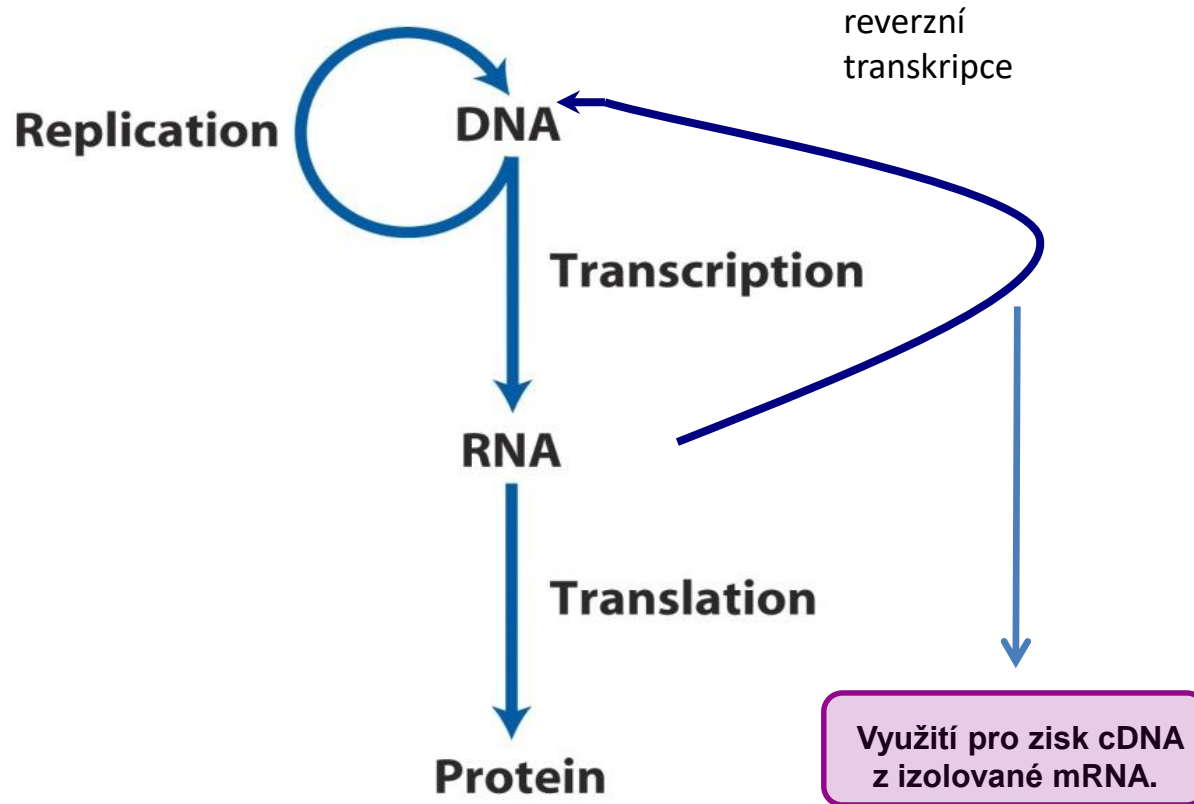
- a) **sestřihu** (Odstranění intronů a propojení exonů do souvislé sekvence.)
- b) **modifikaci 5' konce** (čepička)
- c) **modifikace 3' konce** (polyadenylace)



Všechny tyto kroky se odehrávají v jádře.

Žádná z těchto modifikací neprobíhá u prokaryot!!
(Velmi těsné propojení procesů transkripce a translace – téměř současný průběh.)

Význam pro výběr produkčního organismu



Translace

Překlad 4 písmenné řeči NK do 20 písmenné řeči proteinů.

Proces translace probíhá na ribozomech (rRNA v komplexu s proteiny).

Kodon: triplet nukleotidů kódující danou AMK - při translaci jsou tyto triplety čteny postupně. V rámci jednoho genu se kodony nepřekrývají.

Reading frame 1 5'---UUC|UCG|GAC|CUG|GAG|AAU|UCA|AGU---3'
Reading frame 2 ---U|UCU|CGG|ACC|UGG|AGA|UUC|ACA|GU---
Reading frame 3 ---U|UCU|C|GG|A|CC|U|GG|A|GA|U|UC|A|CA|GU---

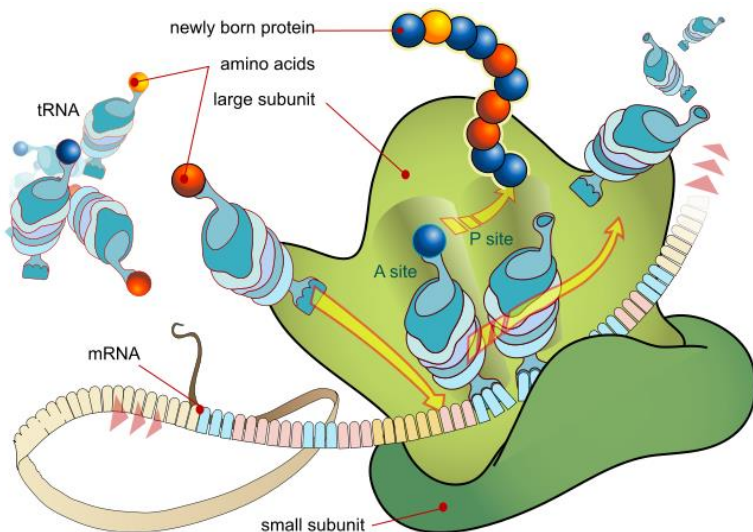
z knihy: D.L.Nelson, M.M.Cox: Lehninger Principles of Biochemistry,
W.H.Freeman&Co., New York, 2005

Nonoverlapping
code

A U A C G A G U C
1 2 3

Overlapping
code

A U A C G A G U C
1
2
3



Genetický kód

61 kodonů kóduje AMK.

3 kodony jsou terminační.

Degenerace kódu:

1 AMK může být kódována více než 1 kodonem.

1 kodon **NEMŮŽE** specifikovat více než 1 AMK.

Proteinogenní aminokyseliny

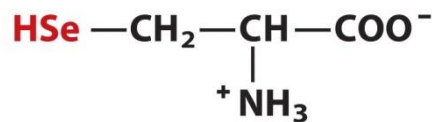
! Proteiny jsou složeny z 20 kódovaných AMK kovalentně spojených do charakteristických lineárních sekvencí!

X

proteiny s velmi odlišnými vlastnostmi a funkcemi (člověk – cca 100 000 různých proteinů)

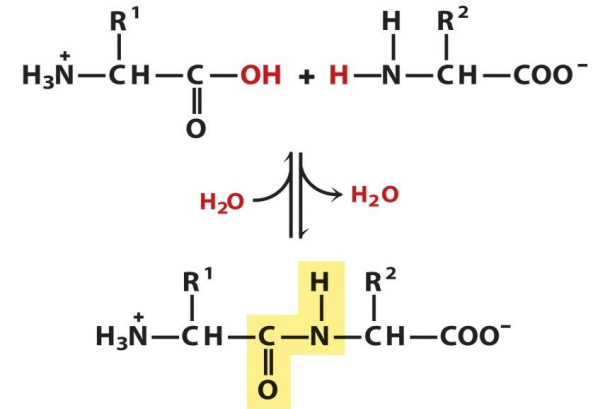
Ale!!!

**21. kodovaná
aminokyselina**



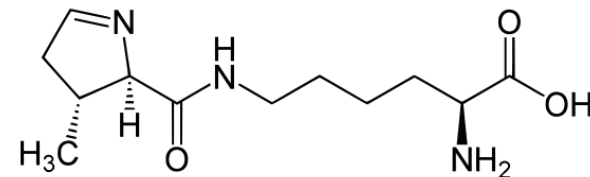
Selenocysteine

selenový analog cysteinu
(např. součást savčí glutathionperoxidasy)



z knihy: D.L.Nelson, M.M.Cox: Lehninger Principles of Biochemistry, W.H.Freeman&Co., New York, 2005

**22. kodovaná
aminokyselina**



Pyrolysine

Archebakterie př. *Methanosarcina barkeri*
(aktivní centrum methyltransferáz)

Struktura bílkovin :

Svinování

Lineární genetická informace – 3D struktura proteinu

*Pokus x omyl?

*Hierarchický proces

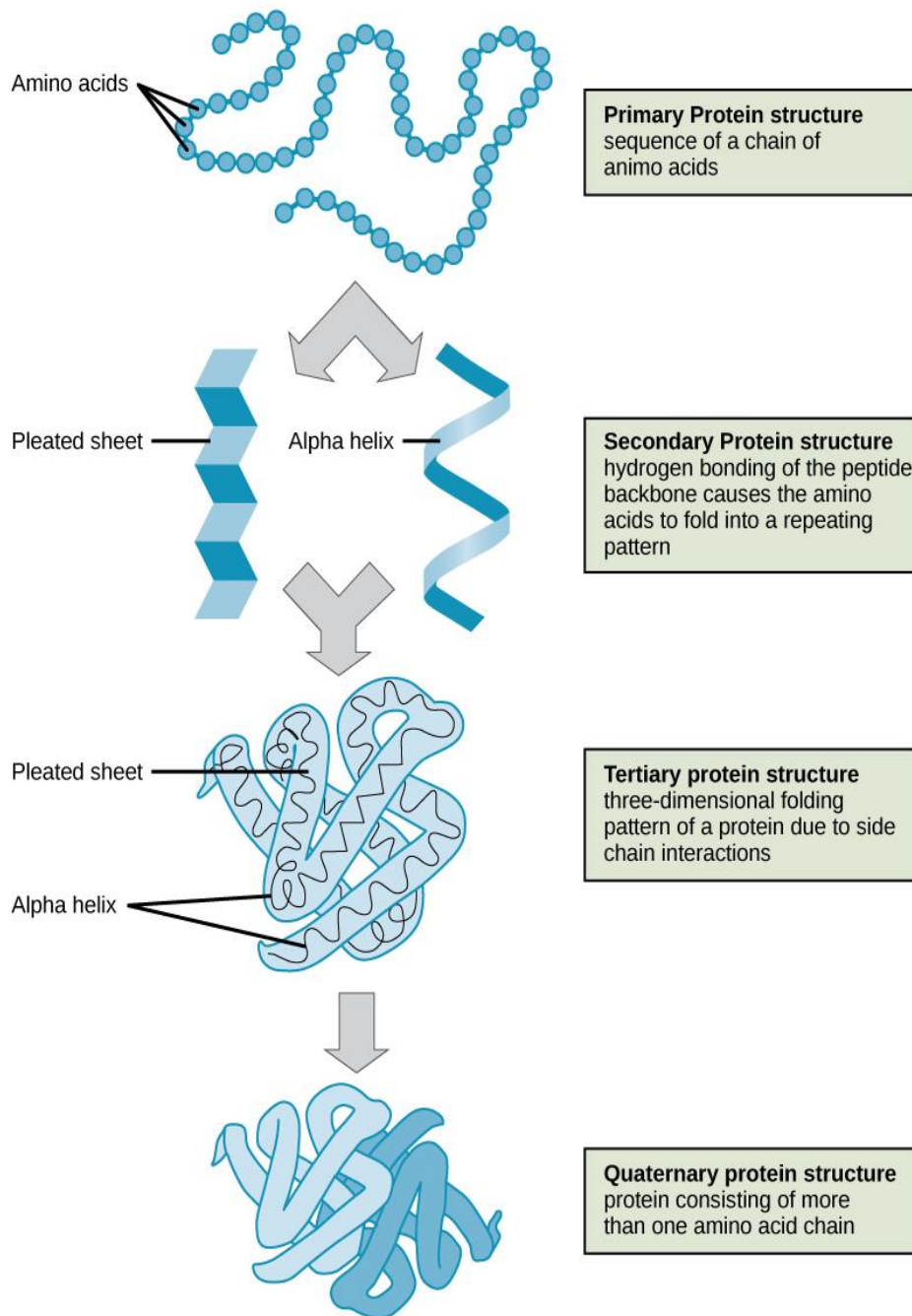
Vznik sekundárních struktur
- Uspořádání do nativní struktury

*Roztavená globule

Kolaps struktury způsobený
hydrofóbními interakcemi

*Model spojující obě teorie

Komplikace při výrobě bioléciv



Svinování s gardedámou 😊

Některé proteiny potřebují pro správné svinutí asistenci. Není to však jediná funkce chaperonů!!

Chaperon/(chaperonin)

- bílkoviny, často proteiny tepelného šoku
- od bakterií po člověka
- vazba na částečně nebo nesprávně svinuté proteiny

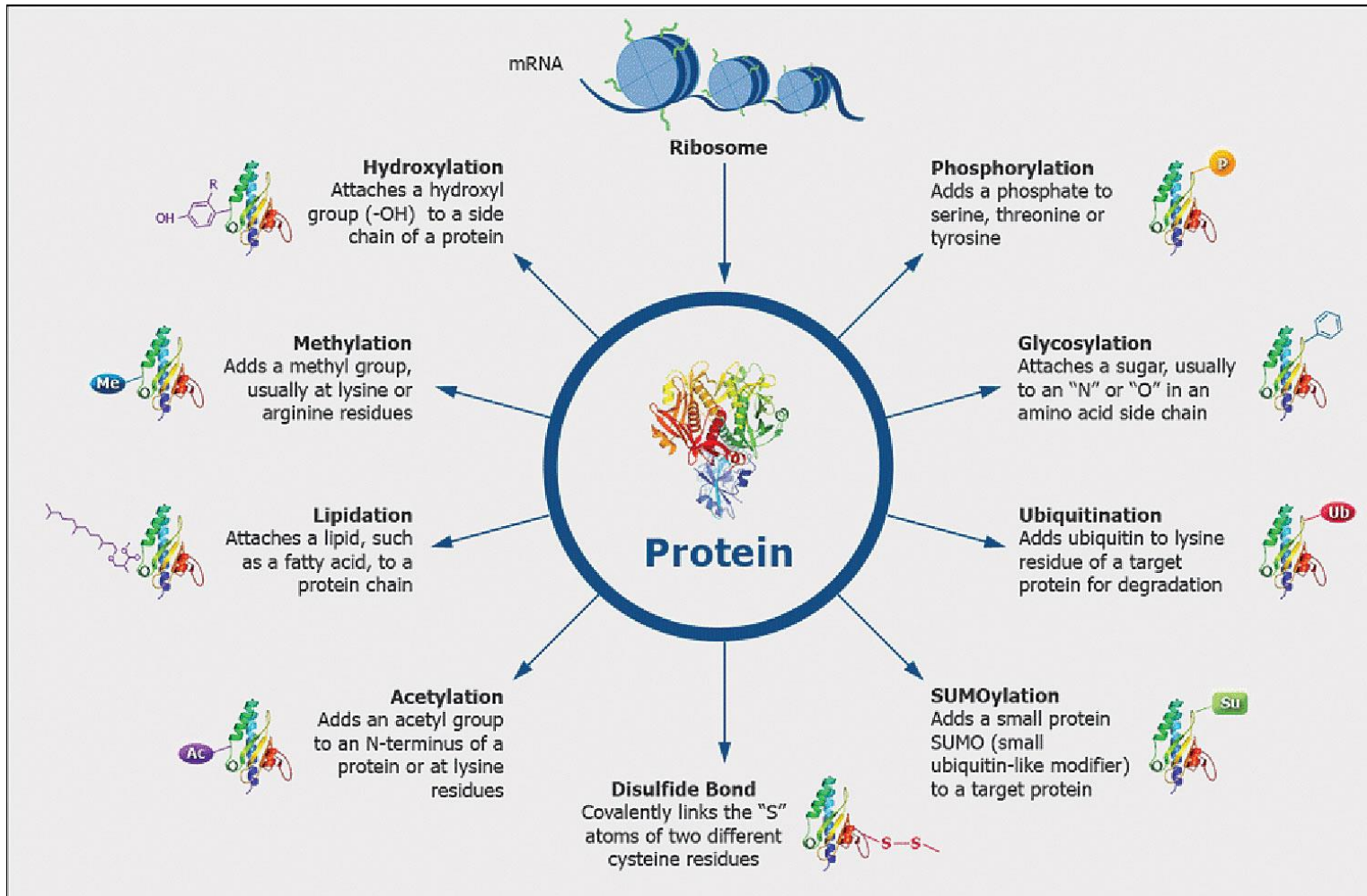
- Zabraňují nežádoucím interakcím mezi hydrofobními oblastmi nesvinutých řetězců a **agregaci**.
- Zabraňují předčasnému svinutí bílkovin určeným k přenosu přes membránu.
- Usnadňují vznik oligomerních struktur.
- Pomáhají daným proteinům zaujmout správnou prostorovou strukturu.
- Opravují nesprávně svinuté proteiny.



http://freemicrosoftclipart.blogspot.cz/2012_07_01_archive.html (3.9.2013)

Možnost léčby například
Alzheimerovy nebo
Parkinsonovy
choroby??

Posttranslační modifikace



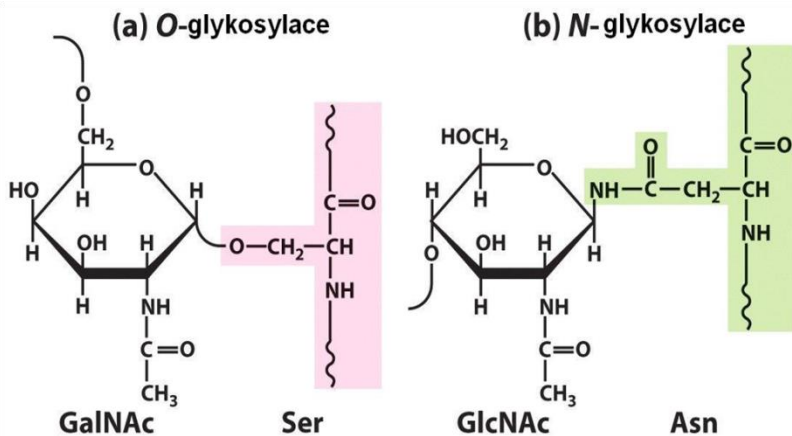
- připojení kofaktorů
- proteolýza
- vznik oligomerů
- karboxylace

Glykosylace

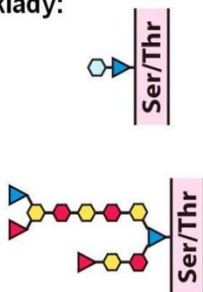
- z hlediska bioléciv nejdůležitější!!!!!! - cca 70% bioléciv jsou glykoproteiny

O-glykosylace – posttranslační modifikace, postupné sestavení, Golgiho aparát

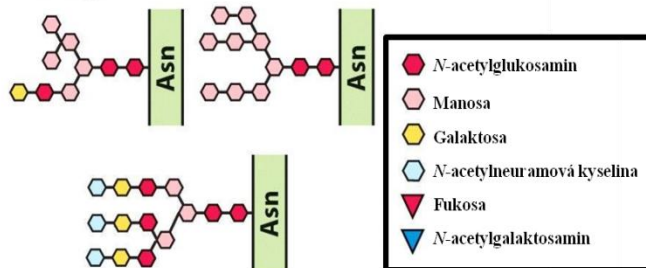
N-glykosylace – kotranslační proces, dolicholový donor, endoplasmatické retikulum, následné úpravy v Golgiho aparátu



Příklady:



Příklady:



Význam

- vlastnosti x aktivita

Zvýšení rozpustnosti

Svinování

Stabilizace

Ochrana

Specificky rozpoznávané markery

(cílení, ferilizace, embryogeneze, srážení krve, imunitní systém, symbiotické vztahy, patologické jevy)

Biodostupnost

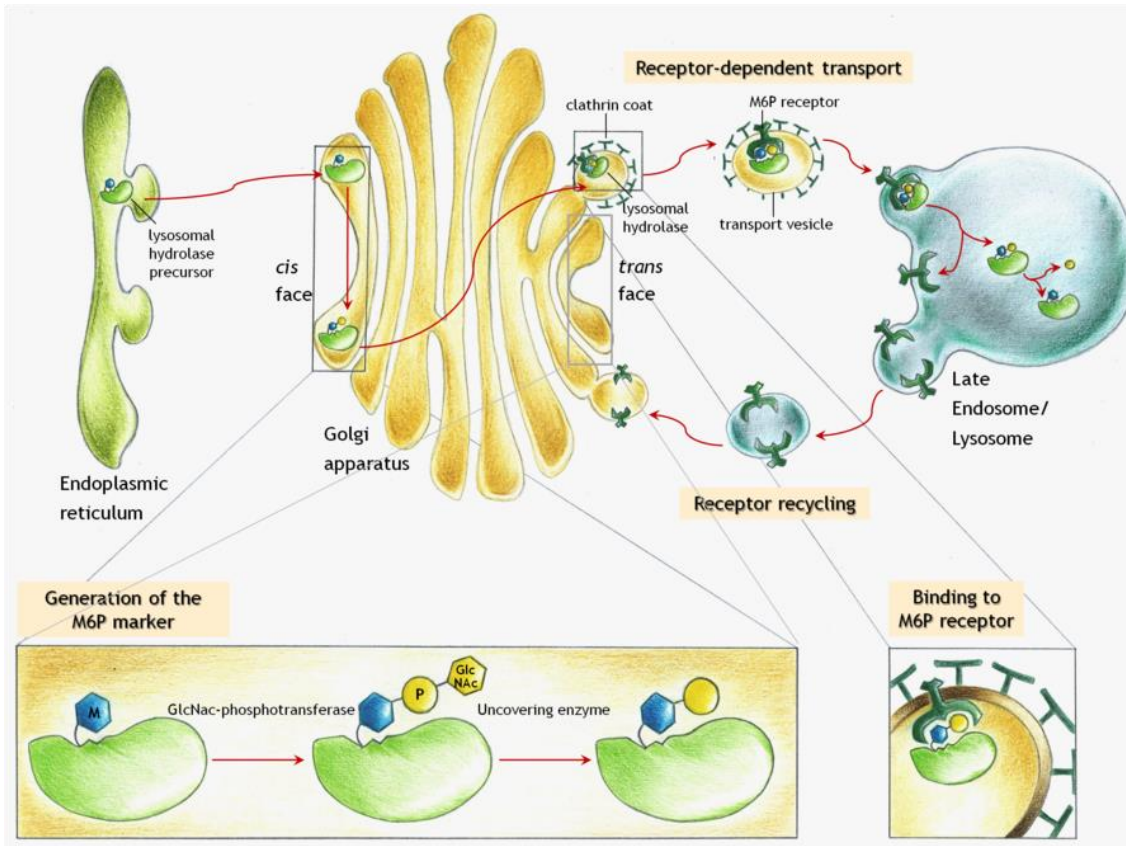
Farmakokinetika

Imunogenicita

z knihy: D.L.Nelson, M.M.Cox: Lehninger Principles of Biochemistry, W.H.Freeman&Co., New York, 2005

Glykosylfosfatidylinositol - kotva proteinů (C-konec) k membráně

Mannosa 6-fosfátový receptor



Lysosom obsahuje enzymy zajišťující degradaci různých substrátů.

Mutace těchto enzymů mají za následek „lysosomální stádavá onemocnění“.

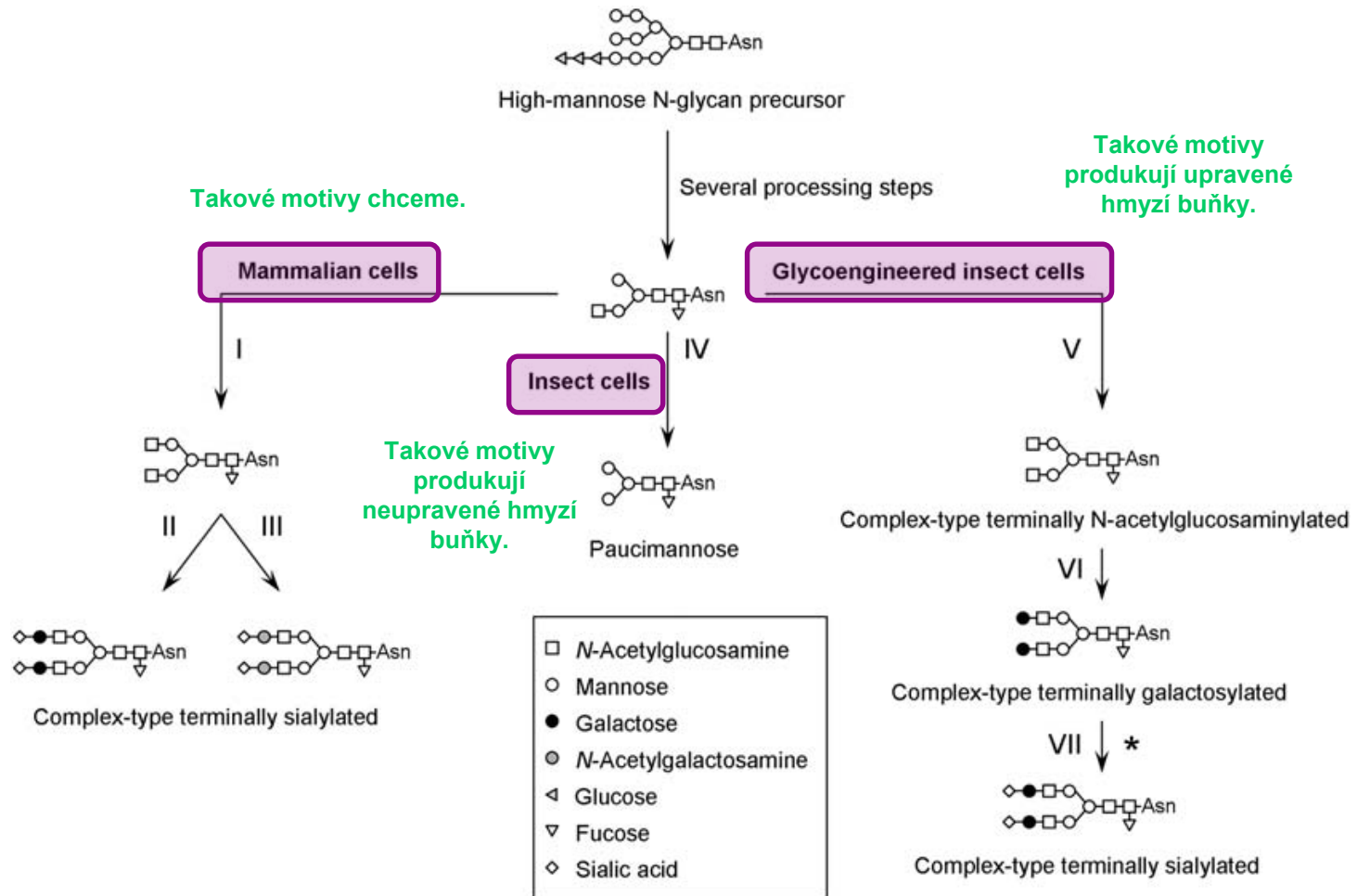
Cílení do lysosomu je zajištěno mannosu 6-fosfátovým receptorem.

Coutinho MF, Prata MJ, Alves S.: Mannose-6-phosphate pathway: a review on its role in lysosomal function and dysfunction, *Molecular Genetics and Metabolism*, 105 (2012), 542-550

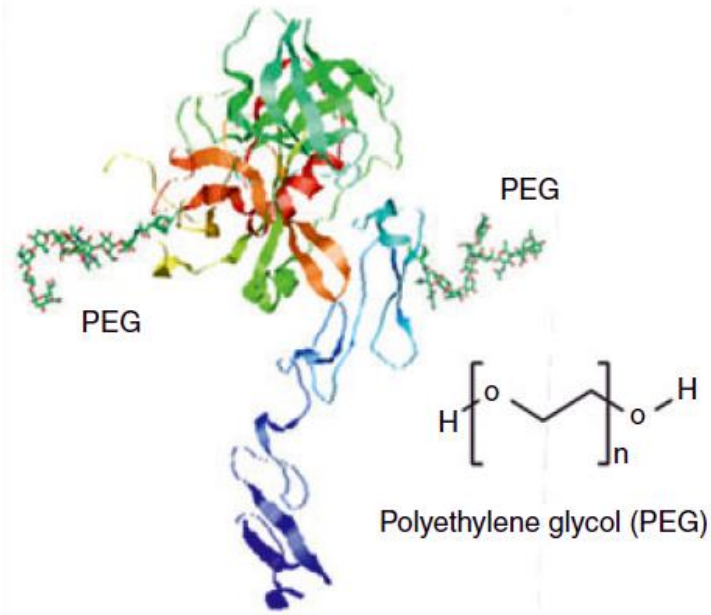
Příklad využití: Gaucherova choroba

- rekombinantní glukocerebrosidasa (CEREZYME, Genzyme),
- produkce v CHO buňkách, modifikace glykosylace
- schváleno 1994, výrobní komplikace 2009

Jak si umíme pomoci

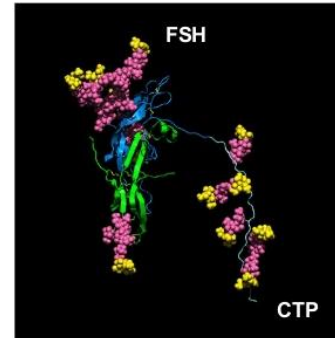


Umělé způsoby modifikace



<http://www.hemophiliareport.com/hege.php> (22-9-2017)

Molecular Structure of Corifollitropin alfa



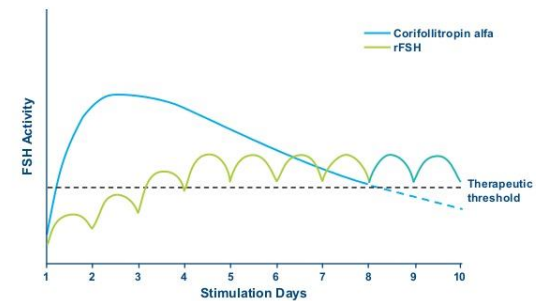
- A recombinant fusion molecule of FSH and the CTP of the hCGβ-subunit
- The first of a new class of gonadotropins with different pharmacokinetic properties but similar pharmacologic features as rFSH
- Interacts only with the FSH receptor and not with the LH receptor

FSH: Follicle Stimulating Hormone; CTP: Chorionic Gonadotropin; hCG: Human Chorionic Gonadotropin; hCGβ: hCGβ-subunit; hCGβ-CTP: hCGβ-CTP fusion molecule; FSH-CTP: FSH-CTP fusion molecule; FSH-CTP-CTP: FSH-CTP-CTP fusion molecule; FSH-CTP-CTP-CTP: FSH-CTP-CTP-CTP fusion molecule.

4



Treatment regimen of corifollitropin alfa in comparison to daily rFSH



Fausser et al, Hum Reprod Update, 2009;15:309-321

5



<https://www.slideshare.net/UARM/corifollitropin-alfa-elonva-clinical-trial-experience> (22-9-2017)

Funkce proteinů v živých organismech

- a) Katalytická
- b) Transportní
- c) Signální a regulační
- d) Obranná
- e) Pohybová
- f) Strukturní
- g) Zásobní

Jsou opravdu všechny 😊 ?

Je dělení skutečně tak jednoznačné?

Moonlighting proteins

- Proteiny vykonávající více spolu vzájemně nesouvisejících funkcí.
- Popsány u prokaryot, kvasinek, rostlin i živočichů.
- Komplikují určení fenotypu z genotypu – nemoci.
- Příklad: Lidská akonitasa – Citrátový cyklus, homeostaza železa
Glutamát racemasa z *Mycobacterium tuberculosis* – konverze
L-glutamátu na D-glutamát a inhibitor DNA-gyrasy

Enzymy

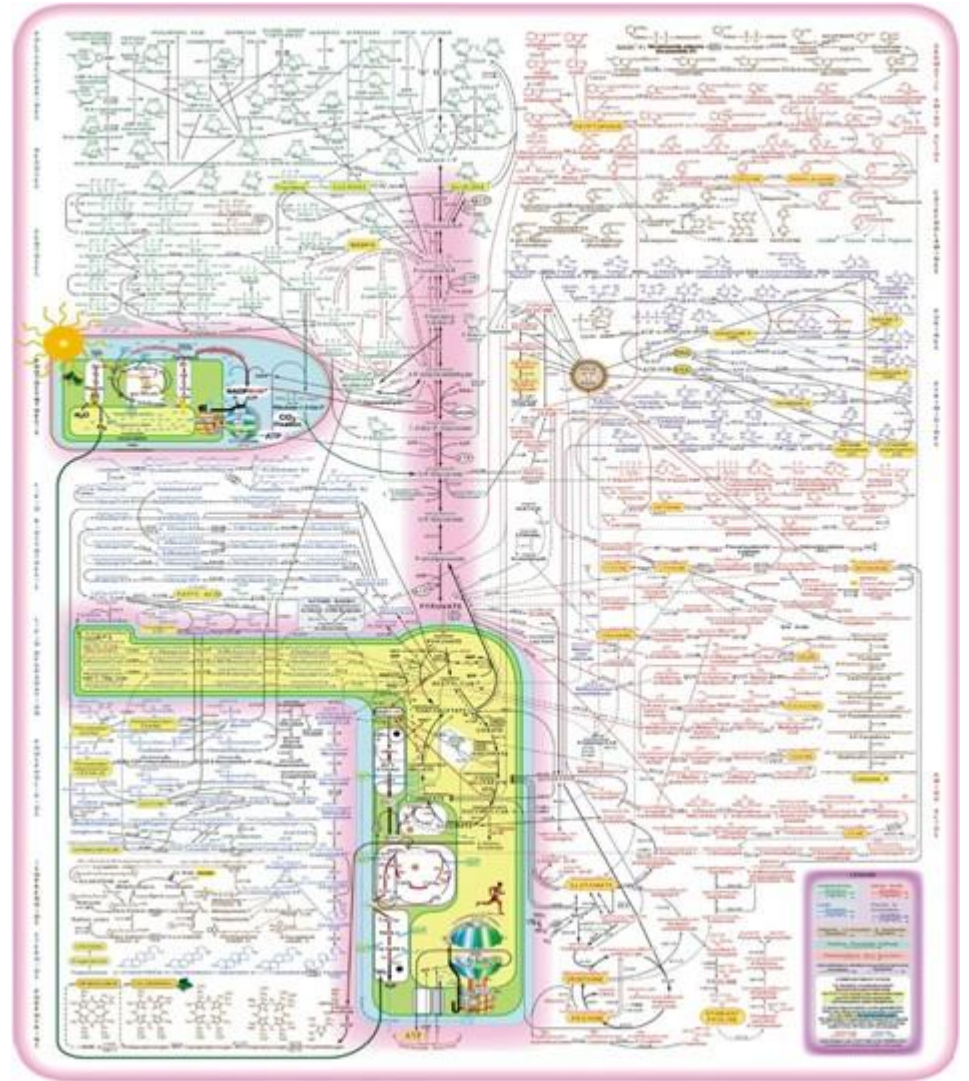
Jsou katalyticky aktivní proteiny.

(**výjimka** – skupina katalytických RNA molekul)

Vykazují účinkovou a substrátovou specifitu.

Využití – léčba, diagnostika

Ovlivnitelnost léky.

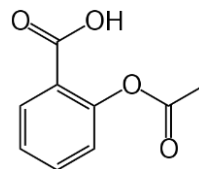


Inhibice enzymové aktivity

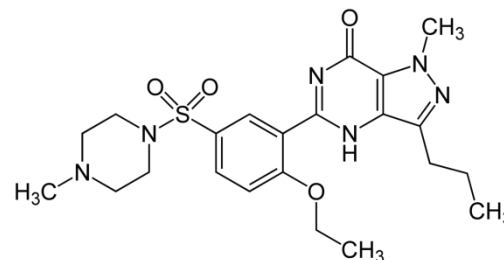
děj, při němž je schopnost enzymu katalyzovat reakci snížena vazbou inhibitoru
– význam v regulacích i v medicíně

Příklady léčiv působících jako inhibitory

Aspirin – cyklooxygenasa

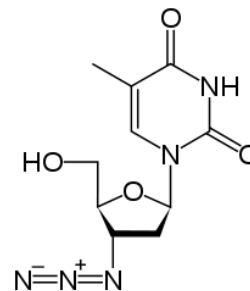


Viagra - cGMP specifická 5-fosfodiesterasa



V těchto případech nejde o bioléčiva!

Zidovudine – HIV reversní transkriptasa



Specifita – příklad srovnání při štěpení proteinů

Chemické štěpení proteinů

kyselá hydrolýza (6M HCl, 110 °C, 24 hodin popř. déle)

alkalická hydrolýza (2 až 4 M NaOH či KOH, 100 °C, 24 hodin popř. déle)

- rozpad na jednotlivé AMK

Enzymy katalyzovaná hydrolýza proteinů

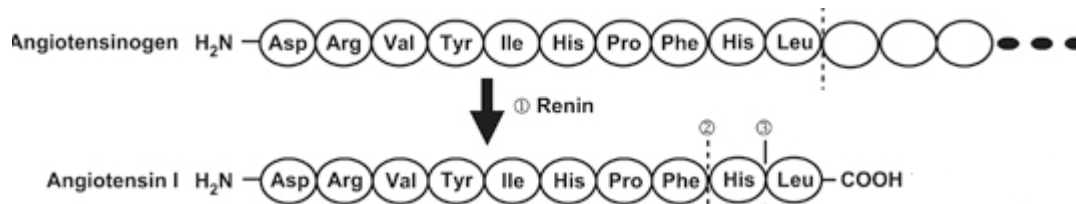
Obecně proteinasy

Substrát – protein. Různé enzymy budou štěpit v různých pozicích.

Např: **trypsin** za Arg a Lys, **chymotrypsin** za Tyr, Trp, Phe, Leu

Ale například:

a) Renin (štěpení angiotensinogenu na angiotensin I)



http://www.nature.com/hr/journal/v34/n2/fig_tab/hr2010235f1.html (18-7-2014)

b) HIV proteasa (štěpení dlouhého polypeptidového řetězce na jednotlivé funkční proteiny)

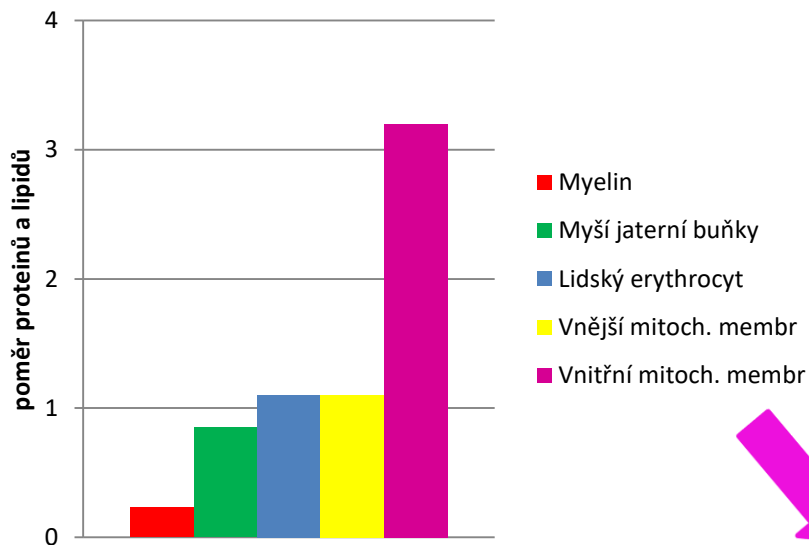
Příklady terapeuticky využívaných enzymů

Table 9.12. Enzymes used therapeutically

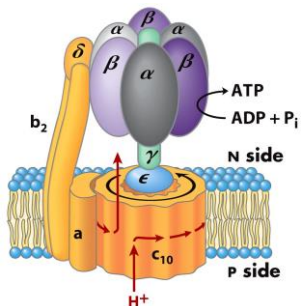
Enzyme	Application
Tissue plasminogen activator	Thrombolytic agent
Urokinase	Thrombolytic agent
Ancrod	Anticoagulant
Factor IXa	Haemophilia B
Asparaginase	Anti-cancer agent
Nuclease (DNase)	Cystic fibrosis
Glucocerebrosidase	Gaucher's disease
α -Galactosidase	Fabry's disease
Urate oxidase	Hyperuricaemia
Superoxide dismutase	Oxygen toxicity
Trypsin/papain/collagenase	Debriding/anti-inflammatory agents
Lactase/pepsin/papain/pancrelipase	Digestive aids

Proteiny v membránách

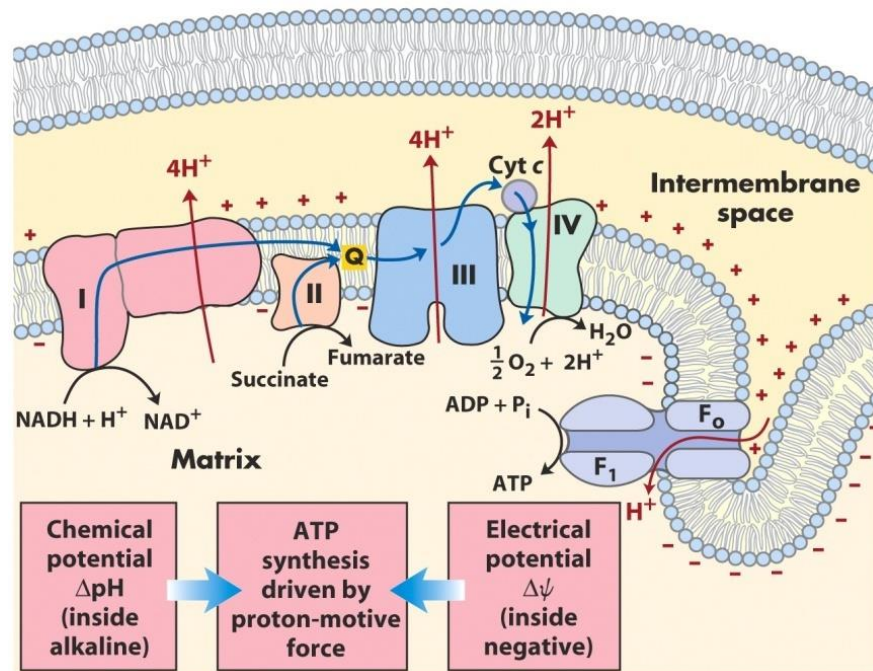
Různé membrány → různé funkce → různé složení
 Funkce - enzymy, přenašeče, strukturální proteiny, receptory



Upraveno z knihy: R.K.Murray, D.K.Granner, P.A.Mayes, V.W.Rodwell: Harperova Biochemie, H+H, Jinočany, 2002



Protonové pumpy Transport elektronů



<http://www.firstpeople.us/pictures/bea/r/Playful-Baby-Polar-Bear-1600x1200.html> (16.9.2013)



Když dva dělají totéž, není to totéž

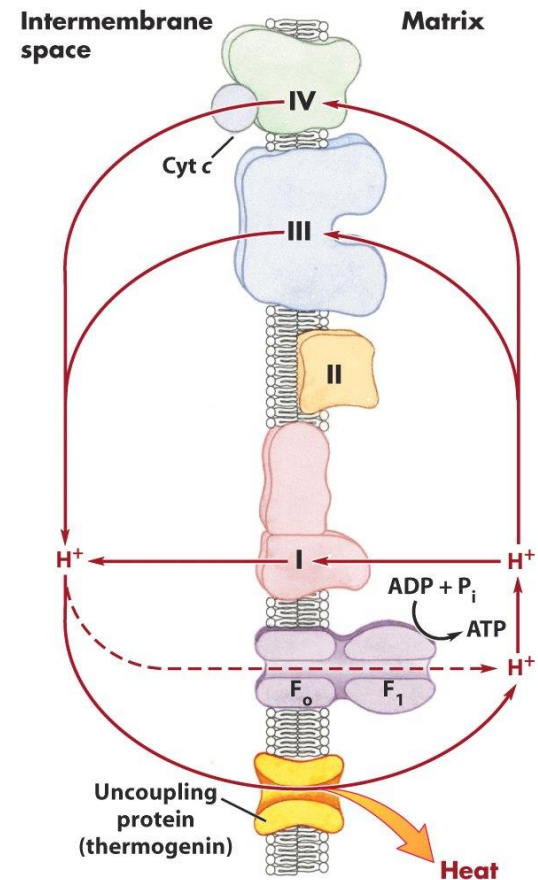
-Léčba obezity pomocí 2,4-dinitrofenolu (odpřahovač oxidační fosforylace)

Thermogenin

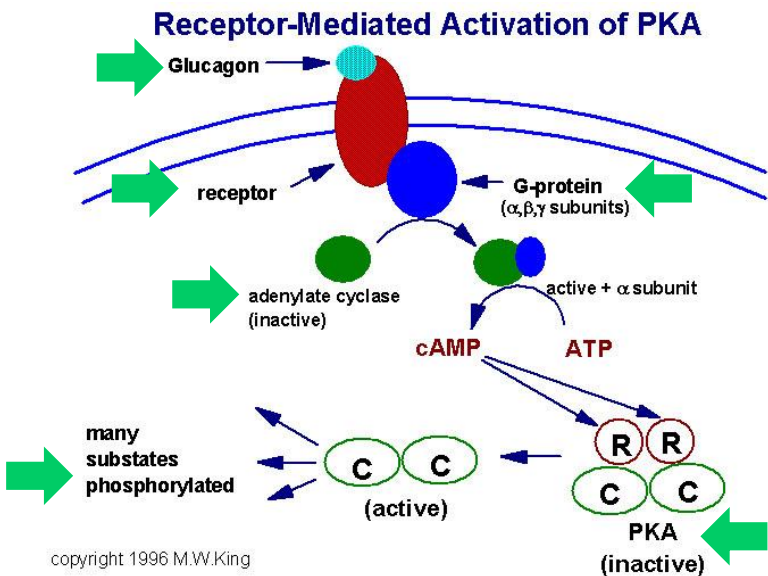
Novorozenci savců mají speciální tukovou tkáň tzv. hnědou tukovou tkáň. Zde energie z oxidace „paliv“ neslouží k produkci ATP, ale k výrobě tepla.

Mitochondrie této tkáně obsahují ve vnitřní membráně protein thermogenin. Ten umožňuje návrat protonů do matrix, aniž by musely projít F_0F_1 komplexem.

Vznikající teplo pomáhá udržet tělesnou teplotu novorozenců. Stejný princip funguje i u zvířat v zimním spánku.



Receptory spojené s G-proteiny



mají GTPasovou aktivitu

- podílejí se na přenosech signálu do buňky

- podjednotky - α , β , γ

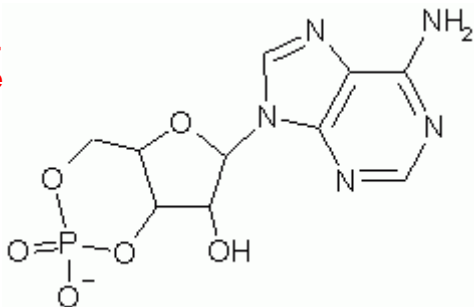
neaktivní forma G proteinu

heterotrimer – na podjednotku α vázáno GDP, interakce s neaktivovaným receptorem

Po aktivaci receptoru

konformační změna G-proteinu – vazba α podjednotky s GTP – disociace a následná vazba α -podjednotky k enzymu signální kaskády (př: adenylátcyklase, fosfolipase C) – účinkem aktivovaného enzymu vznik např. cAMP (druhý posel) - aktivace cAMP dependentní protein kinasy (PKA)

cAMP (cyclic adenosine-3',5'-monophosphate)



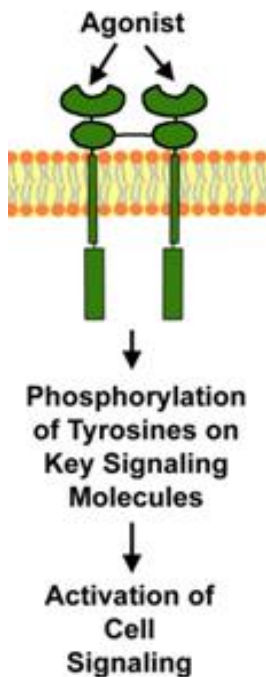
http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-002/ebook.help.htm (27.2.2010)

<http://themedicalbiochemistrypage.org/peptide-hormones.html> (27.2.2010)

Receptory s enzymovou aktivitou

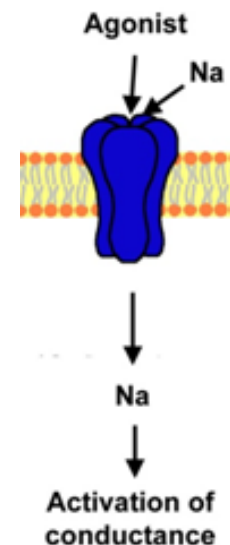
- Vazba agonisty vyvolá konformační změnu aktivující enzym

- guanidylátcyklasy
- tyrosinové proteinkinasy a protein fosfatasy
- serinové a threoninové proteinkinasy



Receptory spojené s iontovými kanály

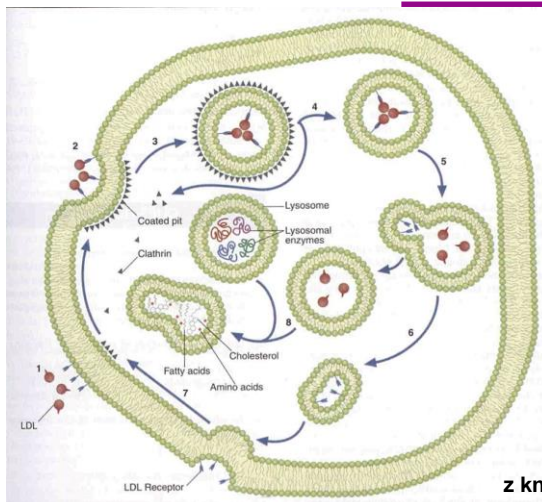
- Agonista způsobí otevření kanálu
- Komunikace mezi nervovými buňkami



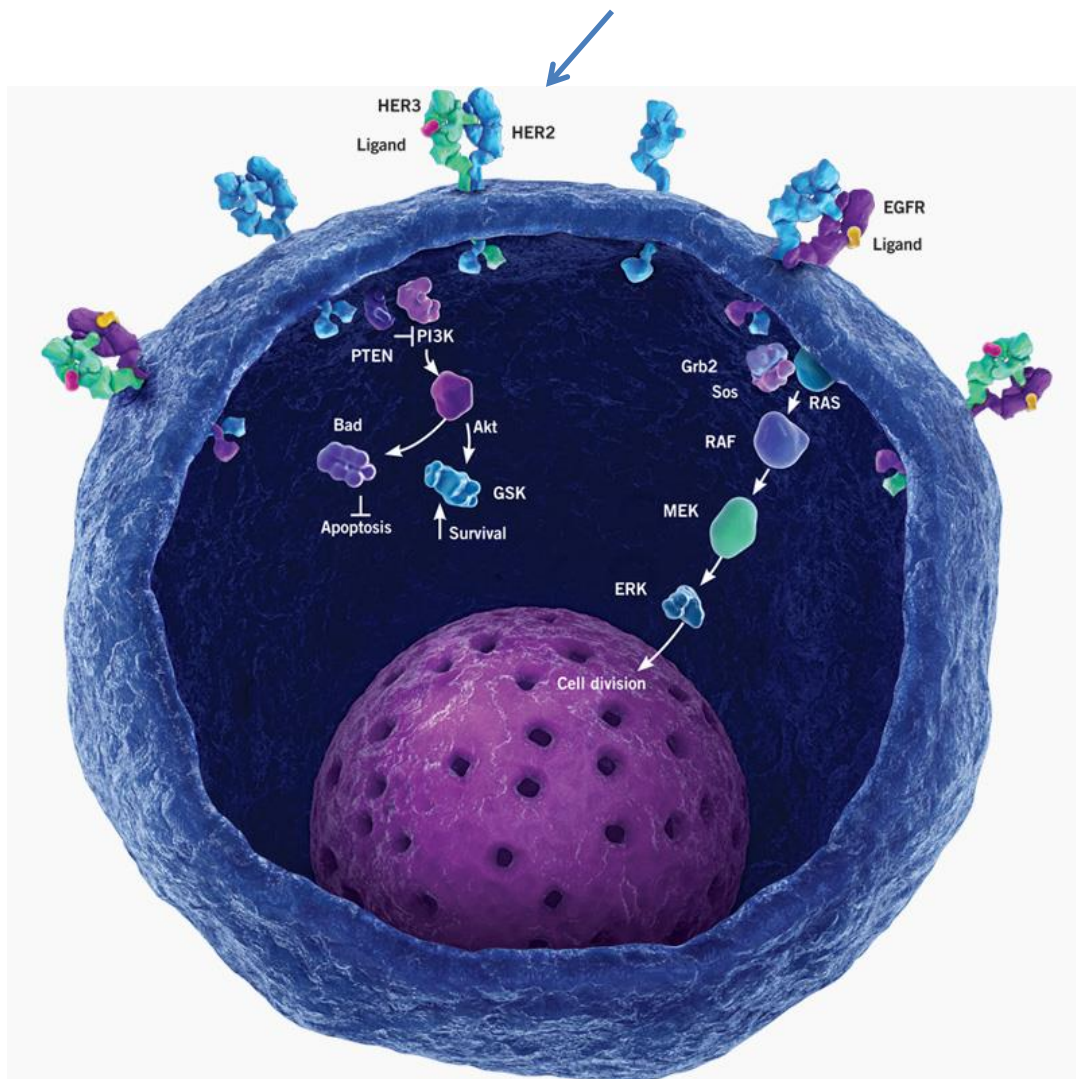
Receptory vyvolávající

endocytosu

Vazba ligandu – změna konformace – klathrin - coated pit – další osud



Cílení bioléčiva na receptor HER2



HER2

- transmembránová tyrosin kinasa
- receptor pro lidský epidermální růstový faktor
- kontrola buněčné proliferace
- kontrola apoptosy
- zvýšená exprese cca u 30% případů rakoviny prsu

Trastuzumab (Herceptin)

- FDA povolen 1998
- monoklonální protilátka
- rakovina prsu (a žaludku)
- blokáce signalizace HER2

Hormony

Definice:

Regulační molekuly tvořené v těle žlázami s vnitřní sekrecí.

Dělení dle chemické povahy

hormony peptidové a bílkovinné povahy !!!!!!!

hormony odvozené od aminokyselin

steroidní hormony

hormony odvozené od mastných kyselin

nízkomolekulární hormony

Kdo byl první? 1982 – rekombinantní lidský insulin

Příklady dalších hormonů/bioléčiv na trhu:

glukagon

růstový hormon

gonadotropní hormony

Cytokiny

Definice: Proteiny a glykoproteiny sloužící ke komunikaci mezi buňkami.

Český název	Anglický název	Zkratka
Interleukiny	Interleukins	IL-1 až IL-15
Interferony	Interferons	IFN- α , - β , -g, -t, -w
Faktory stimuluující kolonie	Colony stimulating factors	G-CSF, M-CSF, GM-CSF
Tumorový nekrotický faktor	Tumor necrosis factor	TNF- α , - β
Neurotropiny	Neurotrophins	NGF, BDNF, NT-3, NT-4/5
Ciliární neurotropní faktor	Ciliary neurotrophic factor	CNTF
Neurotropní faktor odvozený od gliálních buněk	Glial cell-derived Neurotrophic factor	GDNF
Epidermální růstový faktor	Epidermal growth factor	EGF
Erythropoetin	Erythropoietin	EPO
Růstový faktor fibroblastů	Fibroblast growth factor	FGF
Leukemický inhibující faktor	Leukaemia inhibitory factor	LIF
Makrofágové zánětlivé proteiny	Macrophage inflammatory proteins	MIP-1 α , -1 β , -2
Růstový faktor odvozený od krevních destiček	Platelet-derived growth factor	PDGF
Transformující růstový faktor	Transforming growth factors	TGF- α , - β
Trombopoetin	Thrombopoietin	TPO

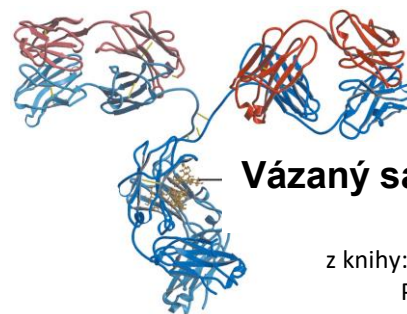
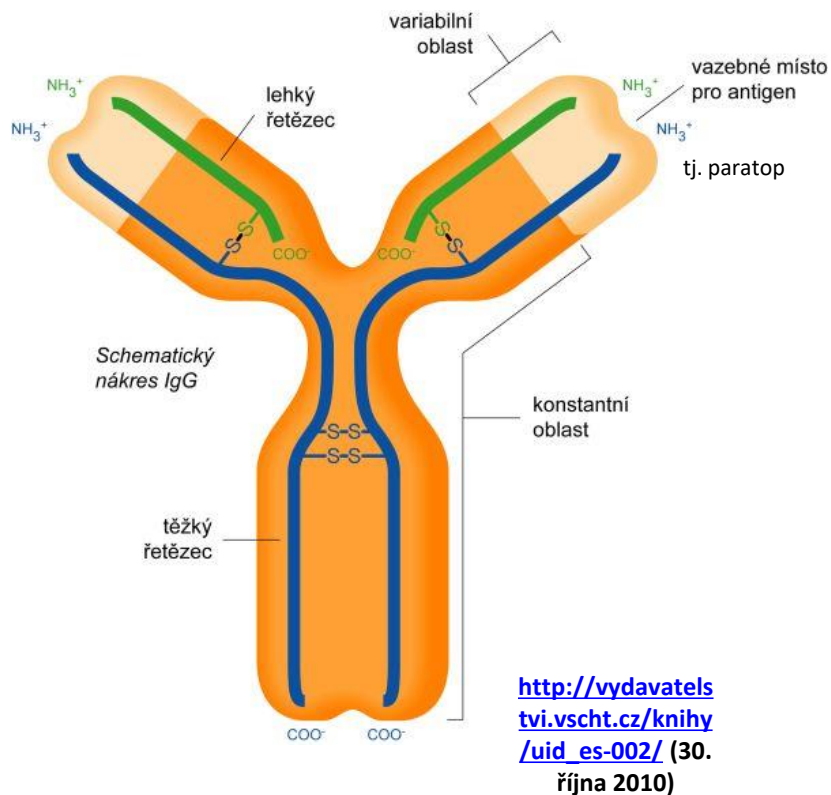
Jsou pleiotropní – jeden cytokin působí na různé buňky

Působí v kaskádě

Jsou redundantní (nahraditelné navzájem)

Proteiny s obrannou funkcí

Protilátky (imunoglobuliny) – glykoproteiny krevního séra, které specificky váží antigen, na jehož podnět byly v organismu vytvořeny



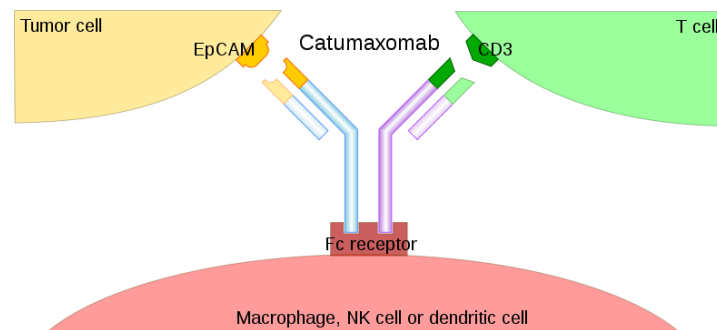
z knihy: D.L.Nelson, M.M.Cox: Lehninger
Principles of Biochemistry,
W.H.Freeman&Co., New York, 2005

Příklady využití PI jako léčiv

Pasivní imunizace
Rakovinná onemocnění
Autoimunitní onemocnění
Transplantace
- dále pak diagnostické účely

Aby nebyla s protilátkami nuda

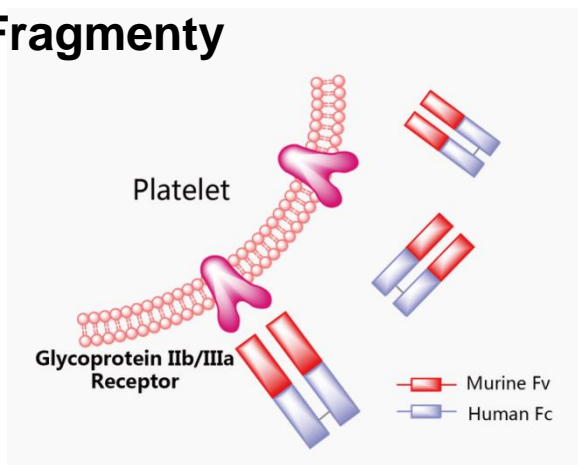
a) Úpravy - různé zastoupení lidských a jiných sekvencí - trifunkční protilátky



Catumaxomab (Removab)

- Bispecifická trifunkční MAb anti -EpCAM/anti-CD3
- Karcinom ovaria, maligni ascit

b) Fragmenty



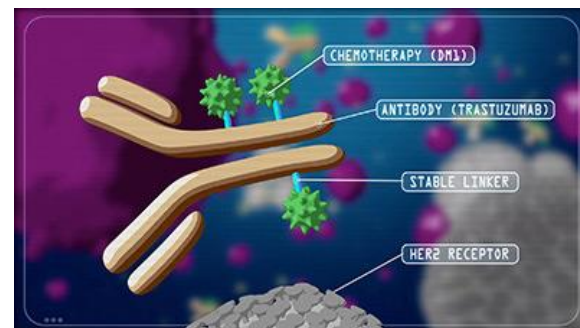
Abciximab (ReoPro)

- chimerní Fab fragment proti receptoru fibrinogenu na povrchu krevních destiček
- Prevence tvorby krevních sraženin během angioplastických operací

c) Konjugáty - s léčivem - s radionuklidy

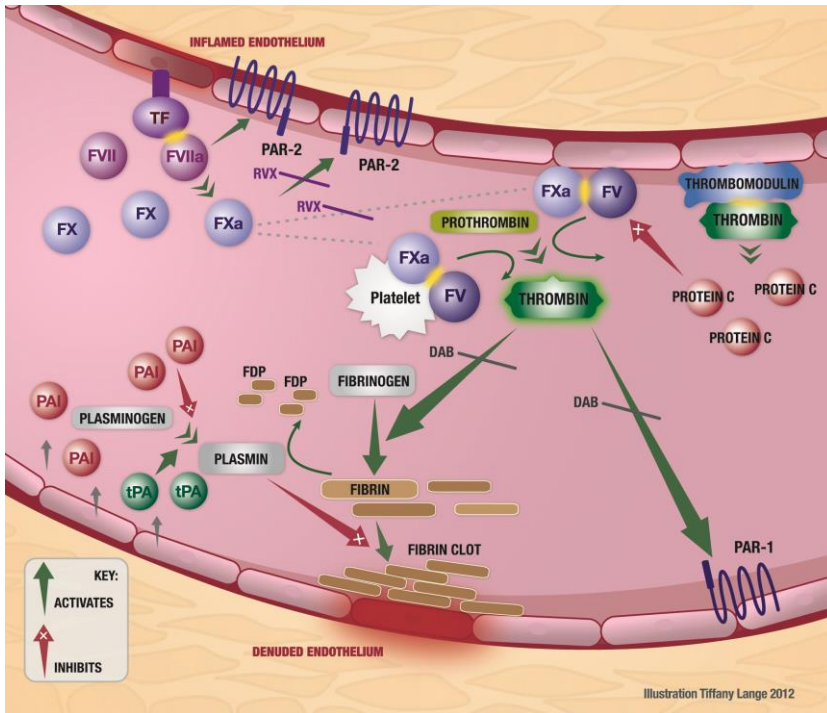
Ado-trastuzumab emtansin (Kadcyla)

- monoklonální protilátka proti HER2 (Herceptin) + mertansin
- léčba rakoviny prsu (HER2 pozitivní)



Další příklady proteinů s obrannou funkcí

Proteiny účastníci se srážení krve



Široké využití bioléciv

Přípravky zvyšující i snižující srážlivost krve.

Léčba hemofilie

- koagulační faktory

Léčba infarktu myokardu a dalších cévních onemocnění

- tkáňový aktivátor plasminogenu
- hirudinové preparáty
- streptokinasa
- urokinasa