

I. OSNOVNI STRUKTURNI PRINCIPI

1. Gradnja

Vsi proteini so polimeri 20 različnih amino, kislin, povezanih s peptidnimi vezmi

Funkcija proteina je odvisna od 3D strukture, ki je povezana z AK sekvenco ta pa je odvisna od nukleotidnega zaporedja strukturnega gena.

Primarna struktura – razporeditev kovalentnih vezi v polipeptidu, ker je enako zaporedje aminokislin v polipeptidu skupaj z njihovimi kovalentnimi prečnimi povezavami.

□ polipeptidna vez (C-N)

Sekundarna struktura – lokalna ureditev polipeptidne verige pri kateri glavno vlogo igrajo vodikove vezi. Najpomembnejše oblike so α -vijajčnica, β -ploskev ali β -struktura in α -zavoj.

□ H-vez

Terciarna struktura – položaj polipeptidne verige v prostoru.

□ kovalentne vezi (S-S) → domene

Kvartarna struktura – pri oligomernih proteinih, medsebojna ureditev polipeptidnih podenot v prostoru

□ protein

AK je sestavljena iz stranske in glavne (karboksilna skupina, amino skupina) verige.

Večina naravnih proteinov se nahaja v L-obliki (CORN v smeri urinega kazalca), ostali pa v D-obliki.

Stranska veriga je lahko HIDROFOBNA:

A	Ala	alanin
V	Val	valin
F	Phe	fenilalanin
P	Pro	prolin
M	Met	metionin
I	Ile	izoleucin
L	Leu	leucin

NABITE:

D	Asp	asparagin
E	Glu	glutamin
K	Lys	lizin
R	Arg	arginin

POLARNE:

S	Ser	serin
T	Thr	treonin
Y	Tyr	tirozin
H	His	histidin
C	Cys	cistein
N	Asn	asparagin
Q	Gln	glutamin
W	Trp	triptofan
G	Gly	glicin

Konformacija proteina je določena z dvema konformacijskima kotoma:

- Φ (phi) = C_{α} -N
- Ψ (psi) = C_{α} -C'

Zaradi steričnih ovir med atomi glavne in stranske verige so dovoljene le določene kombinacije kotov. Ramachandrov plot prikazuje dovoljene/možne kombinacije konformacij kotov psi in phi. Izjema je glicin, ki dovoljuje nenavadno konformacijo v proteinu.

Nekatere konformacije so energetsko bolj obstojnejše kot druge. Številni proteini vsebujejo kovinske ione, ki so funkcijsko pomembni. Najpogostejši so Fe, Zn, Mg in Ca. Ti ioni so večinoma vezani na protein preko stranskih verig Cys, His, Asp in Glu.

2. Motivi proteinske strukture

Notranjost proteina je hidrofobna (vsebuje hidrofobne stranske verige), površina pa je hidrofilna. Glavna veriga v notranjosti je zvitja v sekundarno strukturo, da nevtralizira svoje polarne atome preko H-vezi. Osnovna veriga je polarna in zato hidrofilna. Vsebuje donor H-vezi NH in akceptor H-vezi CO. Za vsako peptidno enoto v hidrofilnem okolju se te polarne skupine nevtralizirajo s formulacijo H-vezi

Glavni obliki sekundarne strukture sta: α -heliks (en zavoje: 3.6 AK) in β -list.

β -listi so lahko orientirani paralelno, antiparalelno ali mešano. α -heliks ima dipolni moment (C proti N)

Proteinska struktura je zgrajena iz kombinacije sekundarnih struktur, ki tvorijo notranjost (jedro) molekule, povezane pa so z zankami na površini.

Določene kombinacije sekundarnih struktur, ki se pojavljajo imenujemo MOTIVI. Tako so na primer: **heliks-zanka-heliks motiv**, **hairpin motiv**. DNA-vezni heliks-zanka-heliks motiv in Ca-vezni heliks-zanka-heliks motiv imata vsak svojo specifično geometrijo in AK sekvenco uporabljeno v različnih proteinih.

β - α - β motiv, ki je sestavljen iz paralelnih β -listov povezanih z α -heliksom opažen v skoraj vseh strukturah, ki imajo β -liste. V strukturi z antiparalelnimi β -listi večkrat najdemo grški ključ motiv, kjer so povezani 4 antiparalelni β -listi.

Polipeptidne verige so zvite v več ločenih enot imenovanih DOMEN (terc. struktura), ki so pomembne funkcijske in 3D strukturne enote. Domene so sestavljene iz kombinacij manjših motivov sekundarnih struktur kot so **α -zanka- α** , **β -zanka- β** , **β - α - β** . Domene so razdeljene v tri glavne skupine:

- **α -strukture**, kjer je jedro zgrajeno samo iz α -heliksov
- **β -strukture**, ki vsebuje antiparalelne β -liste
- **α / β - strukture**, kjer kombinacije β - α - β motivov tvorijo β -list obdan z α -heliksi

3. α - domenske strukture

Coiled-coil α -heliks vsebuje ponavljajoč vzorec 7-ih AK. Takšne helikse najdemo v fibrilarnih proteinih in kot dele manjših domen v mnogih globularnih proteinih. (str 36)

Domenske strukture vsebujejo veliko število (bundle) heliksov, ki so tesno skupaj in tvorijo hidrofobno notranjost. Pogost motiv je štiri helična struktura, kjer so 4 heliksi paroma urejeni v paralelni oz. antiparalelni obliki in zviti skupaj. (3.6, 38)

Najbolj preučena α -struktura je zvitje globina, ki je bil najden v številnih sorodnih proteinih, med drugim tudi v mioglobinu in hemoglobinu. Ta struktura vsebuje 8 α -heliksov, ki se ovijejo okoli jedra v različnih smereh in tvorijo žep, kamor se veže hem. (3.10) Globinsko zvitje se e ohranilo skozi evolucijo.

Pakiranje heliksov v coiled-coil strukture je determinirana kot prileganje "knobov" stranskih verig v prvem heliksu v luknje med stranskimi verigami drugega heliksa. Pri drugih α -helikalnih strukturah se en heliks prilega kot brazda med stranske verige drugega heliksa.

Globinsko zlaganje je bilo uporabljeno za študiranje razvijanje divergence oziroma razmika za ohranjanje strukture in funkcije. Divergenca je primarno stalna z ohranjanjem hidrofobnosti zakopanih ostankov. Proteini se prilagodijo mutacijam v zakopljenih ostankih z malimi spremembami celotne strukture.

4. α/β strukture

α/β so najpogostejše in običajne proteinske strukture.

Delimo jih v tri razrede:

1. jedro iz običajno 8-ih β -listov, ki so blizu skupaj in tvorijo valj katerega obdajajo α -heliksi (4.1 a)
2. upognjeni paralelni ali mešani β -listi z α -heliksi na obeh straneh β -lista (4.1 B)
3. strukture z leucinom bogatimi motivi v katerih veliko število β -listov tvori upognjeno β -strukturo z vsemi α -heliksi na zunanji strani (4.5)

α/β -valjasta (barrel) struktura je ena od največjih in najobičajnejših od vseh struktur (do 250 AK). Najdena je bila v ve

kot 20 različnih proteinih z čisto drugačnimi AK sekvencami in različnimi funkcijami. → iz 8-ih paralelnih β -listov obdanih s 8 α -heliksi

Vsi encimi, ki imajo aktivna mesta na podobnih položajih; na dnu lijakastega žepa, katerega ga tvorijo zanke, s C-koncem β -lista in N koncem α -heliksa. (53)

Specifična encimska aktivnost je določena z dolžino in AK sekvenco teh zank, ki pa ne prispeva k stabilnosti in zvitju.

HORSESHOE strukturo tvorijo homologne ponovitve leucin bogatih motivov, izmed katerih vsak tvori β -zanka- α enoto. Te enote so povezane tako, da se tvori zavita β -struktura v obliki podkve z α -heliksi na zunanji strani, notranjost pa je izpostavljena topilu. Nespremenljiv Leu teh motivov tvori velik del hidrofobne regije med α -heliksi in β -listom (4.11)

ODPRTE α/β strukture variirajo v velikosti in številu β -listov. Neodvisno od teh variacij imajo vsa aktivna mesta na karboksi robu β -listov. Ta aktivna mesta pa so usmerjena z zankami, ki povezujejo β -liste z α -heliksi. V tem pogledu so podobne valjastim α/β strukturam, vendar so aktivna mesta ustvarjena drugače v odprtih strukturah. Aktivna mesta pa so tvorjena v tistih regijah zunaj karboksi roba β -lista, kjer sta dve sosednji zanki na nasprotnih straneh β - lista. (4.13) Pozicijo teh regij se da napovedat iz topoloških diagramov.

5. β -strukture

Antiparalelne β -strukture obsegajo drugo veliko skupino proteinskih konformacij. Tu so antiparalelni β -nizi urejeni v dva β -lista, ki sta zložena skupaj in tvorita popačeno valjasto strukturo, jedro molekule. Glede na ureditev β -listov okoli valja, jih delimo na tri skupine:

1. **UP-AND-DOWN valji** (barrel)(5.2) so najenostavnejše strukture. Vsak β -list je povezan na naslednjega s kratko zanko. 8 tako urejenih β -listov tvori jedro v številnih proteinih kot so : plasma retinol binding protein pri sesalcih, biliverdin binding protein v insektih in β -laktoglobulin iz mleka. Predstavniki teh družin kot tudi sorodnih P2 družin z 10 β -listi vežejo dolge hidrofobne ligande znotraj valja. Valj deluje kot shramba za raznolike ligande. Vezava različnih ligandov je možna z različnimi dolžinami valja in AK, ki prav tako sodelujejo pri vezavi.

2. Večina znanih antiparalelnih β -struktur (tudi imunoglobini in različni encimi) ima valje, ki vsebujejo vsaj en **GREEK KEY** (4 antiparalelni β -listi) motiv. γ -kristalin ima dva zaporedna grška ključa na vsaki od dveh valjastih domen. Ti štirje motivi so homologni v 3D strukturi in AK sekvenci in so tako evolucijsko sorodni.
3. **JELLY ROLL valje** najdemo v različnih proteinskih molekulah, tudi v proteinih virusnega plašča in hemagglutininu influenza virusa = virus gripe. Struktura zгледа zapleteno vendar je v resnici zelo enostavna, če pomislimo na analogijo zvijanja lista okoli valja, kot rolado (5.16,77)

Poleg hemagglutinina se v membrani influenza virusa nahaja tudi protein neuramidaza, ki ne pripada nobeni od teh treh skupin valjastih struktur. Protein tvori propelerju podobno strukturo iz 24 β -listov, kateri so urejeni v 6 podobnih motivov, ki tvorijo 6 lopatic propelerja. Vsak motiv je β -list iz štirih up-and-down povezav β -nizov. Aktivna stran encima je sestavljena iz zanke na eni strani propelerja.

Poleg tega k antiparalelni β -strukturi spada tudi novo zvitje imenovano **β -heliks**. V β -heliksu je polipeptidna veriga zvita v širok heliks z dvema ali tremi β -nizi na zavoj. Notranjost med dvema ali tremi β -listi je popolnoma zapolnjena s stranskimi verigami (5.29,85)

6. Zvitje in upogljivost

Termodinamska stabilnost nativnega proteina je majhna in odvisna od razlike v entropiji in entalpiji med nativno in nezvito obliko. Iz biološkega vidika mora biti ta razlika čim manjša, ker morajo biti celice sposobne razgraditi in sintetizirati proteine, poleg tega pa funkcije proteinov zahtevajo strukturno fleksibilnost.

Ko se raztegnjen protein začne zvijati, hidrofobni deli težijo k notranjosti in tako onemogočijo številne možne konformacije ter tako skrajšajo čas zvijanja na nekaj sekund. Nekateri proteini imajo eno pot zvijanja, medtem ko potrebujejo drugi več vzporednih poti do nativnosti. Obstajajo določene visoke energijske ovire pri zvijanju kot so npr.: formacija pravih S-S vezi in izomerizacija prolina. Celice vsebujejo encime, ki katalizirajo te reakcije in pospešijo zvijanje. Proteine z S-S vezmi ne najdemo na citosolni strani, ampak samo v plazmi membrane ali pa v ekstracelularnem matriksu.

Proteinske AK se ponavadi nahajajo v trans-obliki saj je cis- 1000-krat manj stabilnejša, razen kadar imamo na drugem mestu Pro. Ta zveča stabilnost cis-oblike, čeprav se ponavadi tudi Pro nahaja v trans-obliki. V nativnih proteinih so te cis-Pro stabilizirani še z tetraedrično strukturo, medtem pa sta pri nezvitih proteinih cis- in trans-oblika v ravnotežju.

Samo zvijanje poteka preko **molten globule** (stopljenega proteina) (6.2, 92), ki je vmesno stanje med nativnim in razvitim stanjem. Prehajanje iz enega stanja v drugega je zelo hitro. Molten globule ima večino sekundarne strukture nativnega proteina, a je manj kompaktno vezan kot nativni. Večina zank in drugih povezovalnih struktur ostaja nezvitih ter v različnih konformacijah.

Celična membrana vsebuje zvite proteine. Nezviti proteini z izpostavljenimi hidrofobnimi deli se z lahko združijo z nespecifičnimi interakcijami. Ta problem preprečuje razred proteinov imenovanih chaperoni, ki izolirajo nezvite proteine. Delovanje chaperonov so preučili na kompleksni strukturi multimetričnih chaperonov GroEL (14 podenot) in GroES (7 podenot), ki formirajo kompleks **chaperonin** (6.11-15,100), ta pa potrebuje ATP za funkcioniranje. To so kratki cilindri, ki se lahko zaradi hidrofobne notranjosti vežejo na vsak nezvit, delno zvit ali nepravilno zvit polipeptid, ne glede na AK sekvenco. Ko je polipeptidna veriga zaščitena s chaperonom, se ne more združiti z drugo verigo (agregirati). Med zvijanjem grede nekatere verige preko mnogo ciklov vezave in ločbe od chaperonov.

Tudi znotraj kristalov prestajajo atomi prot manjše oscilacije (nihanja). Nekateri proteini prestajajo večje konformacijske spremembe pri vezavi liganda ali pri spremembah v okolju. Te spremembe so bistvene pri funkcioniranju proteinov.

Prehod skozi evkariontsko celico je odvisen od sprememb v konformaciji α -heliksa in zankine regije v cilkin-odvisni kinazah. Pri kalmodulinu igra struktura pomembno vlogo pri signalizacijski poti kalcija. Neaktivna molekula v obliki ročke se zruši v globularno obliko, ki veže regulatorni protein.

Serpini- serinski proteinazni inhibitorji- aktivacija zahteva konverzijo β -niza v fleksibilno zanko enega izmed β -listov. (6.21,110)

Mnogi multimerični encimi in prot (hemoglobin, fosfofruktokinaza) so odvisni od alosteričnega nadzora. Alosterični proteini obstajajo v dveh konformacijah: R(relaxed) in T(tense) obliki. Efektorji imajo visoko afiniteto samo za eno izmed obeh oblik. Ko je efektor prisoten se ravnotežje premakne v prid visoko afinitetnega stanja. Vezavno mesto za efektor ni povezano z aktivnim mestom. V primeru PKF poznamo dva efektorja: aktivator ADP, ki premakne 4 identične podenote encima v encimsko aktivno R-obliko; in inhibitor PEP, kateri premakne te podenote v neaktivno T obliko. Aktivno mesto pri R obliki ima 1000 krat večjo afiniteto za substrat F6P, kot aktivno mesto pri T-obliki, zaradi strukturnih razlik med aktivnima mestoma obeh oblik.

V celici je aktivnost PFK nadzorovana preko tega alosteričnega mehanizma z relativno koncentracijo obeh efektorjev. PEP je produkt pri delovanju PFK. Če ga je preveč, ta inhibira PFK in reakcija se ustavi (feedback inhibicija) (6.24)

7. DNA struktura

B-DNA je konformacija DNA *in vivo*. Ima širok velik žleb in ozek mali žleb. Robovi baznih parov tvorijo dno žlebov, kjer lahko N in O tvorita H-vezi s stranskimi skupinami proteina. Takšne H- vezi tvorijo osnovo za prepoznavanje specifične sekvence DNA.

II. STRUKTURA, FUNKCIJA IN INŽINERSTVO

8. Razpoznavanje DNA pri prokariontih z heliks-zavoj-heliks motivi

Mnogi proteini, ki lahko spodbudijo oz. prekinejo gensko ekspresijo so dimerne molekule; DNA sekvenca, ki jo prepoznajo pa je na koncih palindromska. Dvakratna simetrija proteina se tako ujema z dvakratno simetrijo na koncih razpoznavne sekvence.

Monomerne podenote imajo heliks-zavoj-heliks motiv, ki funkcionira kot specifična DNA-vezavna regija. Drugi heliks tega motiva je razpoznavni heliks, katerega stranske verige tvorijo H-vezi in hidrofobne stike z nukleotidnimi bazami na dnu velikega žleba B-DNA. Te interakcije ustvarijo razpoznavni signal za operatorske regije za Cro in represorske proteine. V dimernih proteinih sta razpoznavna heliksa v vsakem od dveh heliks-zavoj-heliks motivov za 34 Å narazen, kar ustreza enemu zavoju B-DNA. Ko se en razpoznavni heliks veže na žleb DNA se drugi oddaljen za 34 Å pozicionira za eni anko vzdolž DNA.

Vezava Cro ali represor na operator izzove specifične strukturne spremembe na DNA. Spremembe, ki jih izzoveta ta dva proteina so zelo podobne, vendar se razlikujejo v enem segmentu hrbtenice DNA, ki je pomemben pri ključni razliki med Cro in represorjem (njuni relativni afiniteti na OR1 in OR3). (8.13)

Konformacija vezane DNA je stabilizirana z interakcijami med sladkorno-fosfatno verigo deli proteina, ki tvorijo veliko interakcijsko območje s komplementarnimi površji. Sposobnost teh

interakcij, da izvršujejo strukturno spremembo, je lahko uravnana z dejansko DNA sekvenco na račun afinitetnih razlik med različnimi predeli. (8.16)

Specifična razpoznavnost DNA tarč z heliks-zavoj-heliks motivom, ne vključuje samo interakcij med stranskimi verigami razpoznavnega heliksa in DNA bazami velikega žleba, ampak je v veliki meri odvisna tudi od interakcij znotraj komplementarnih površin med proteinom in DNA. Te interakcije večkrat vključujejo H-vezi iz atomov proteinske glavne verige do hrbtenice DNA velikega in majhnega žleba in so odvisne od sposobnosti specifičnega sekvenčnega popačenja DNA tarč. Interakcije z vodo nastopijo tudi med bazami v velikem žlebu in stranskimi verigami razpoznavnega heliksa.

Nekateri prokariotski DNA-vezni proteini so aktivirani z vezavo alosteri njih efektorjev. Ta pojav spremeni konformacijo dimernega proteina tako, da povzroči odmik heliks-zavoj-heliks motivov za 34 Å narazen. Dimerni represor za sintezo purina, PurR, povzroči oster upogib DNA na osnovi vezave α -heliksov na majhen žleb med dvema heliks-zavoj-heliks motivoma na velikem žlebu. (8.20)

Vsak dimer V oblikovanega tetramernega lac represorja, ki ima PurR homologno sekvenco-se veže neodvisno na DNA fragment podobno kot PurR represor. Tako upognjena DNA dovoljuje lac represorju vezavo na dva operatorja, ki sta oddaljena na operonu. (8.22-23,145)

Vezava CAP proteina upogne DNA z izdelavo dveh lokaliziranih zank vsako za 40°. Takšna vezava bi lahko aktivirala transkripcijo z olajšanjem stikov med RNA polimerazo in DNA nad CAP vezanim mestom. Sekvenčna specifičnost vezave CAP izvira iz deformirane sekvenčne odvisnosti na heliksu DNA ter sekvenčni specifičnosti interakcij med proteinskimi stranskimi skupinami, ki so izpostavljene robu baznih parov v velikem žlebu.

9. Razpoznavna DNA z evkariontskim transkripcijskimi faktorji

Splošen transkripcijski faktor TBP ostro upogne in odvijne TATA box DNA, kar povzroči odprtje majhnega žleba, ki postane širok in dovolj plitev za nastanitev β -lista (9.5-6,156) med stranskimi verigami β -lista in sladkorjem ter bazami DNA se pojavijo hidrofobne interakcije. Mehanizem vezave DNA z TBP je tako zelo različen od vezave heliks-zavoj-heliks transkripcijskih faktorjev, kot so Cro in receptorji v bakteriofagih s hidrofilnimi interakcijami na velikem žlebu. Razlika nastane, ker se Cro in represor vežeta kot homodimera, medtem ko se ti TF vežejo kot monomeri.

TBP in heliks-zavoj-heliks transkripcijski faktorji, kot so vsi ostali transkripcijski faktorji, tvorijo solne mostove med njihovimi Lys in Arg stranskimi verigami in fosfatnimi skupinami DNA ter tako stabilizirajo DNA-protein kompleks. Monomerni POU transkripcijski faktorji imajo dva tandemsko vezana heliks-zavoj-heliks motiva v isti polipeptidni verigi, ki se vežeta na dve sekvenčni vezavni mesti v velikem žlebu DNA.

Vezava TBP na DNA je močno odvisna od prisotnosti T-A baznih parov v TATA box-u. upogibanje omogoča oddaljevanje predelov na DNA, tako da pridejo blizu skupaj in lahko proteini reagirajo in tvorijo transkripcijsko pred-iniciatorski kompleks.

DNA vezavne domene tetramernega tumor supresorskega proteina p53 imajo antiparalelno β -valjasto ogrodje z imunoglobinskim zvitjem iz katerega na eni strani molekule izhajata dve zanki, ki sta neposredno vpleteni v vezavo na veliki žleb DNA. Poleg tega se C-konec DNA vezavne domene razteza iz valja (na isti strani kot zanki) kot α -heliks in prav tako sodeluje pri vezavi na žleb. (9.18) Večina tumorgenih točkastih mutacij p53 je v tem DNA veznem predelu. (9.17)

Transkripcijski faktorji kot je NF- κ B, ki vsebuje REL-homologno regijo, prav tako uporabljajo imunoglobinsko zvitje kot ogrodje za zanke, ki vežejo DNA.

10. Specifične transkripcijske faktorje uvrščamo v družine

Velika skupina evkariontskih transkripcijskih faktorjev uporablja Zn atome za stabilizacijo DNA veznih motivov in večina klasičnih **Zn-finger transkripcijskih faktorjev** vsebuje nekaj in včasih več kot 30 vezanih Zn-finger motivov. Ti motivi se vežejo na sekvenco vezavnih mest tarčne DNA. Čeprav vsak motiv prepozna samo tri do štiri baze preko začetne loop regije na koncu vsakega prsta, postane Zn-finger transkripcijski faktor (vsebuje multiple prste od katerih ima vsak svojo kratko razpoznavno mesto) visoko občutljiv DNA-vezni protein. (10.4-5,179)

Nuklearni receptorji uporabljajo Zn atome za stabilizacijo DNA-vezavne domene. Steroidni hormonski receptor je homodimer z dvema DNA-vezavnima mestoma, ki prepoznavajo skoraj palindromske sekvence v DNA. Monomerne DNA-vezavne domene dimerizirajo, tako da se lahko dva razpoznavna heliksa vežeta na tarčno sekvenco odzivnega elementa z primerno prostorno regijo. Ti dimeri so simetrični prav tako kot dimeri 434 represorja. Drugi nuklearni receptorji iz heterodimerov, ki niso simetrični in se vežejo na odzivne elemente, kjer je tarča organizirana kot direktne ponovitve, se urejajo glede na dolžino prostorne regije odzivnega elementa. A-DNA površine, ki podpirajo asimetrično dimerizacijo lokalizirano v sami DNA-vezavni domeni dovoljuje, da ti heterodimeri razlikujejo med podobnimi odzivnimi elementi.

1. **Zn₂Cys₆ transkripcijski faktorji** uporabljajo 2 Zn atoma povezana s 6 Cys preostanki za stabilizacijo ogrodja monomerne podenote. Aktivni faktor je dimer z dimerizacijsko regijo; dimer je podoben črki T: dimerizacijska regija je na navpičnem trupu, 2 DNA-vezavna motiva pa sta na koncih prečke. Vsi člani te družine prepoznajo isto bazno sekvenco, triplet CCG, specifičnost pa je dosežena z dolžino prečke oz. z ločenostjo CCG tripletov vzdolž DNA. (10.13-14)
2. Dimerizacija **C₆Zn transkripcijskih faktorjev** vključuje α -helično coiled-coil v dimerizacijski regiji. Coiled-coil, pogosto imenovanem leucinske zadrge, prav tako najdemo v drugih skupinah transkripcijski faktorjev, ki ne vsebujejo Zn. Leucinska zadruga je narejena iz dveh α -heliksov ovitih v zvitje, kjer je vsak sedmi preostanek Leu ali kakšen drug hidrofobni preostanek (Ile, Val). Leucinska zadruga transkripcijski faktorji (b/zip) vključujejo heterodimerizirane faktorje, na primer Fos in Jun. α -helična DNA vezni motivi heterodimerov prepoznajo zelo različne bazne sekvence.
3. **Heliks-zanka-heliks** (b/HLH) transkripcijski faktorji so heterodimeri ali homodimeri z osnovnimi α -heličnimi DNA veznimi regijami, ki raje leže preko (ne vzdolž) velikega žleba in se raztezajo v 4 helični zvitke, ki tvorijo dimerizacijsko regijo. Prilagoditev/sprememba b/HLA strukture je vidna pri nekaterih transkripcijskih faktorjih (b/HLH/zip), kjer se 4 helični zvitki raztegne v klasično leucinsko zadrugo (10.26, 198).

Homodimerizacija skupno značilnost prokariotnih transkripcijskih faktorjev je pri evkariontih razširjena z heterodimerizacijo (kot leucinske zadrge) in za medsebojno povezavo (kot Zn – fingers in POU). Ti mehanizmi povečajo niz DNA sekvenc, ki so lahko prepoznavne in s stopnjo vezavne specifičnosti. V evoluciji je to povečanje niza in specifičnosti postalo nujno z večanjem in zapletanjem genoma.

Različni transkripcijski faktorji povezani s promotorjem imajo specifično 3D razmerje in tako tvorijo makromolekularno sestavo analogno ribosomu, proteosomu ali spliceosomu.

11. Primeri encimske katalize: serinska proteinaza

Encimi povečajo stopnjo kemijske reakcije z zmanjšanjem aktivacijske energije reakcije. To se doseže najprej za encimsko prednostjo vezavo na prehodno stanje substrata. Za pretvorbo substrata v produkt so potrebne katalitične skupine encima.

Serinske proteinaze kot na primer: kimotripsin in subtilizin katalizirajo razkroj peptidne vezi. V 3D strukturi vseh serin proteinaz so prisotne 4 nujne značilnosti (kljub zelo različni strukturi): katalitična triada, oksidacijsko vezavno mesto, poseben žep za substrat in nespecifično vezavno mesto za polipeptidne substrate (11.7.9.10)

Kimotripsin je sestavljen iz dveh α valjev, medtem ko ima subtilizin strukturo tipa α/β . Ta dva encima sta lepa primera, kjer različna loop regija na različnih okvirjih formira podobno aktivno mesto.

Katalitična triada sestoji stranskih verig Asp, His in Ser, ki so blizu skupaj. Serinski preostanek je reaktiven in s substratom tvori kovalentno vez in s tem preskrbi specifično pot za reakcijo. To ima dvojno vlogo:

- sprejme proton od Ser, da pospeši pretvorbo kovalentne vezi
- stabilizira negativno prehodno stanje.

Proton se kasneje prenese na N izstopajoče skupine. Asp stabilizira pozitivni naboj His.

Oksidacijsko vezavno mesto stabilizira prehodno stanje s tvorbo dveh H-vezi na negativno nabit, kisikov atom na substrat.

Poseben žep tripsina spremeni substratno "nagnjenost" do encima.

Mutacija močno zmanjšajo stopnjo reakcije (10^6).

12. Membranski proteini

Hidrofobnim heliksom lahko z določeno gotovostjo napovemo pozicijo njegovih AK. To velja tako za transmembranske helikse H polipeptidne verige reakcijskega centra kot tudi za 5 transmembranskih heliksov L in M verige, ki so povezani z loopom. To pa ne pomeni, da je enostavno napovedovati pozicijo transmembranskih heliksov v različnih razredih proteinov z hidrofobnim plotom. Transmembranski heliksi ionskih kanalčkov imajo nabite ostanke, ki so obrnjeni proti kanalom. Tak plot bi bil precej drugačen od plota kakšnega samskega transmembranskega heliksa v receptorskem proteinu.

Za razliko od drugih membranskih proteinov, ki so tu opisani imajo porini na zunanji membrani Gram negativnih bakterij transmembranske regije iz β -listov (12.7, 230) in ne α -heliksov. β -list (16 oz. 18) so urejeni v antiparalelne valje. Ti valji zaradi veliko listov okoli sten nimajo močnega hidrofobnega jedra. Njihov center je kanal, ki je delno blokiran z zankami med dvema listoma. Delujoča porinska molekula vključuje tri takšne valje; zanke iz zgornje površine teh valjev so v stiku z ekstracelularnim prostorom in tvorijo širok lijak, ki vodi do valjev in preko njihovih luknjic v periplazmatski prostor (12.8,231). Tako porini tvorijo po velikosti omejene kanale za pasivno difuzijo molekul in v periplazmatski prostor.

Bakterijski K^+ kanal ima prav tako, kot fotosintetski reakcijski center in bakteriorodopsin, pokrite transmembranske helikse, dva v vsaki podenoti homotetrametrične molekule. Vendar ti ne prispevajo k 10.000-kratni selektivnosti K^+ ionov nad Na^+ ioni. Ta odločilna vrlina kanala je dosežena preko ozkega selektivnostnega filtra tovorjenega iz zank, ki izhajajo iz štirih podenot in glavne verige karbonil, kisikovih atomov, kamor se vežejo dehidrirani K^+ ioni. (12.10,233).

13. Signala transdukcije

Signal – transdukcijski receptorji so plazma membranski proteini, ki vežejo specifične molekule kot so rastni faktorji hormoni ali neurotransmiterji in nato posredujejo signal v notranjost celice in povzročijo, da se celica odzove na določen način. Vsi na membrano vezani receptorji imajo ekstracelularno domeno, ki prejme in spozna določen signal, transmembranska regija, preko katerega prenesejo signal in intracelularno domeno, ki izsili odziv. V mnogih primerih je signal ojačan z mrežo intracelularnih signalnih poti.

G proteini so molekularni ojačevalci za veliko število 7TM heličnih receptorjev, ki urejajo odzive kot so vid, vonj in stres. To so heterotrimetrične molekule $G_{\alpha\beta\gamma}$, ki se razkrojijo v na membrano vezane signale prenašalce G_{α} in $G_{\beta\gamma}$. Pri aktivaciji receptorja (vezava hormona). (13.2-3,253)

G_{α} ima dve domeni: helična domeno in katalitično aktivno GTP-azno domeno, ki je podobna majhnemu G proteinu, Ras. Oba Ras in G_{α} sta lahko v dveh oblikah: v aktivni GTP vezani obliki ali v neaktivni GDP vezani obliki na $G_{\beta\gamma}$ se veže samo neaktivna GDP oblika.

Stopnja Ras GTP-azne aktivnosti se poveča z vezavo na GAP, ki prispeva katalitično pomemben arginin. Aktivnost G_{α} , ki ima večjo stopnjo aktivnosti kot Ras zaradi prisotnosti arginina, je regulirana z proteini, ki vplivajo na konformacijo switch regij.

G_{β} ima N-terminalni α -heliks, ki oblikuje Coiled-coil strukturo z N-terminalnim heliksom iz G_{γ} v $G_{\beta\gamma}$ dimer. Ostali del G_{β} vsebuje 7 WD (TrpAsp) sekvenčni struktur, ki sestavljajo krožni propeler. GTP-azna domena G_{α} se poveže z G_{β} v trimer $G_{\alpha\beta\gamma}$. Tako, da je stikalna (ki spreminja aktivno/neaktivno obliko) regija zaprta v neaktivno obliko, ki veže GDP. Negativni regulator $G_{\beta\gamma}$ signaliziranja (phosducin) se veže na isto mesto kot G_{α} in tako prepreči signaliziranje $G_{\beta\gamma}$ in tudi ponovno tvorbo $G_{\alpha\beta\gamma}$ kompleksa.

Rastni hormoni aktivirajo svoje sorodne receptorje s sprožitvijo tvorbe receptorskih dimerov. Struktura kompleksa rastnega hormona in receptorja je pokazala, da lahko en hormon veže dva receptorja.

Signaliziranje preko tirozin-kinazne domene je potrebno v bioloških aktivnostih kot so: celična rast oblika kontrola cikla transkripcija in apoptoza. Receptor citosolne tirozin-kinaze vsebuje niz proteinskih enot SH2, SH3 in PH domene, ki delujejo kot združitelji, kinazne domene in njej primerne tarče. SH2 in SH3 prepoznajo kratke peptidne sekvence, ki vsebujejo fosfotirozin (SH2) ali s prolinom bogate predele (SH3); nekatere PH domene pa prepoznajo skupine lipidnih glav. SH2 domena je zvita v centralni β -list obdan z dvema heliksoma in ima specifičen fosfotirozin vezavni žep. (13.26,273) SH3 se zvijejo v b-valj veznim mestom za peptid na enem koncu valja, ki je stisnjen med dvema loop regijama. Peptidna regija veže poliprolin tipa II konformacijo s tremi ostanki na obrat. Prolin bogate sekvence favorizirajo takšno konformacijo. Dodatna specifičnost za tarče proteinov zagotovijo interakcije med loop regijo in ostanki tarče na proteinu zunaj protein bogate sekvence.

Src tirozin-kinaza vsebuje SH2 in SH3 domeni povezani na tirozin-kinazno enoto. Fosforilirana oblika, kinaze je neaktivna z vezavo fosfotirozina na C-terminalni rep lastne SH2 domene (avtoinaktivacija).

14. Fibrilarni (nitasti) proteini

Fibrilarni proteini so dolgi verižni polimeri, ki so uporabni kot strukturni materiali. Večina jih vsebuje ponovljeno AK sekvenco in spadajo v tri skupine Coiled-coil α -heliks kot v keratinu in miozinu; trojni heliks kot v kolagenu; in β -listih kot v svilenih vlaknih.

Coiled-coil fibrilarni proteini imajo heptadna ponavljanja AK sekvence in tvorijo oligomere – običajno dimere ali trimere. Te oligomerne enote nato sestavijo vlakna.

Kolagen (trojni heliks) je velika trimetrična superhelična molekula. V sekvenci polipeptidne verige se mnogokrat ponovi sekvenca Gly-X-Y (X=Pro, Y=OHPro). Pri stabilizaciji trojnega heliksa so pomembne direktne in vodene vodikove vezi.

Mokasta (amyloid) vlakna, ki so med drugim tudi v celicah oči, možganov in srca so povezane z različnimi dednimi in infekcijskim boleznimi. Vlakna nastanejo kot rezultat ponovnega zvijanja običajno globularnih, topnih proteinov, ki vodi do polimerizacije v dolge ravne niti, ki se sestavijo v vlakna.

Štirje paralelni protofilamenti zloženi skupaj tvorijo nitko. Vsak protofilament je sestavljen iz štirih upognjenih β -listov (ki potekajo paralelno z nitkino osjo), ki so sestavljeni iz β -nizov nagnjeni desno od smeri osi. (14.7,288)

Svilena vlakna, ki so zelo močna vsebujejo dobro urejene mikrokristale β -listov. β -nizi teh listov so orientirani paralelno z osjo.

Mišica je sestavljena iz dveh vrst filamentov: debeli filamenti, ki vsebujejo fibrilaren protein miozin in tanki filamenti, ki vsebujejo F-aktin (helični polimer topnega globularnega monomernega G-aktina). Poleg teh so v mišici še številni drugi mišični proteini, ki regulirajo mišično aktivnost. Ko se mišica skrči miozinski in aktinski filamenti drsijo skupaj. To pomikanje omogočajo konformacijske spremembe glav miozinskih molekul, ki so zasnovane kot mostovi med miozinom in aktinom. Vsak premik zahteva hidrolizo ene molekule ATP. (14.17,296)

15. Prepoznavanje tujih molekul z imunskim sistemom.

IgG antitelesa so zgrajena iz dveh lahkih in dveh težkih verig, ki so povezane s S-S vezmi. Vsaka lahka veriga ima eno variabilno in eno konstantno domeno, medtem ko ima vsaka težka veriga eno variabilno in tri konstantne domene. Vse te domene imajo podobno 3D strukturo znano kot imunoglobinsko zvitje. Fc trup molekule tvorijo konstantne domene težkih verig, medtem ko dve Fab rami sestavljajo konstantne in variabilne (nihajoče) domene težkih in lahkih verig. Vz gibna regija med trupom in ramama je fleksibilna in dovoljuje premik ram skupaj in proti trupu (15.2,301)

Konstantna domena ima stabilno ogrodje sestavljeno iz dveh antiparalelnih listov, ki sta iz 7 β -nizov (štirje v enem in trije v drugem). Sestava spremenljivih domen je podobna vendar iz 9-ih β -nizov (5+4). Tri hipervariabilne regije (CDR1,2,3) so v zankah na koncu variabilne domene (15.7-8)

Hipervariabilne zanke lahko tvorijo vezavna mesta za antigene različnih oblik odvisno od dolžine in sekvence. "Haptens" sprožijo protitelesa zvezanimi luknjami, proteinski antigeni pa protitelesa s povečano vezavno površino, ki vsebuje brazde in žepe za štrleče predele antigena. Pri vezavi antigena in protitelesa se v splošnem ne pojavi nobena večja strukturna sprememba razen kakšne manjše konformacijske spremembe. Tretja hipervariabilna regija (CDR3) teže verige je v centru interakcijskega območja in tvori številne stike z antigenom.

MHC I in MHC II molekule vežejo peptidne antigene in jih predstavijo na celični površini za interakcije z receptorji T-celic. (15.18,313) Ekstracelularni del teh molekul je sestavljen iz vezavne domen za peptid, ki jo formirata dve helični regiji nad osmimi antiparalelnimi β -listi ta pa je ločena z dvema nižjima imunoglobulinskima domenama. Te domene so različno naklonjene v I in II tipu.

MHC I molekule vežejo kratke peptide (8 do 11 preostankov), kjer so konci peptida skriti v notranjosti proteina, centralna regija pa je izpostavljena interakcijam z T-celicami. Ohranjeni ostanki interagirajo zglavno verigo skupi iz konca peptida in dva ali trije peptidne stranske verige na določenih pozicijah se vežejo v žep znotraj vezavnega žleba. Ti žlebi variirajo med različnimi MHC I aleli in definirajo specifičnost vezavnega peptida za posamezno MHC I molekulo. MHC II vežejo daljše peptide, kjer pa so konci izpostavljeni in segajo preko žepa za peptid. Ohranjene ostanki v MHC molekulah interagirajo z glavno verigo atomov vzdolž peptida. MHC II motivi vežejo v glavnem svoje ligande na več pozicij kot v MHC I. Oboji so polimorfni.

Receptorji T celic so površinski proteini z ekstracelularno domeno sestavljeno iz dveh podobno velikih podenot, ki imata eno variabilno in eno stalno imunoglobulin podobno domeno in sta urejeni podobno kot Fab rami protiteles. Ti receptorji imajo antigen vezavno mesto iz hipervariabilnih zank obeh variabilnih domen CDR3 zanka pa igra odločilno vlogo pri

prepoznavanju antigena. Receptorji T-celic prepoznajo antigen samo kadar je vezan na MHC protein. Sestavljeni kompleksi T-cell receptorjev, MHC molekul in peptidnega antigena ki so bili določeni da se spojijo s T-cell receptorjem, ležijo diagonalno preko vrha MHC veznega mesta za peptid in se dotikajo tako MHC helikse kot izpostavljene dele peptida.

Imunski odziv lahko uporabi različne tipe proteinov, ki se vežejo na skoraj nešteto število antigenov in s tem dosežejo pestrost vezave z uporabo zank ali žepov, ki jih podpira konstantno ogrodje. Če se želi določen antigen prepoznati, bo vezavno mesto vsebovalo regije ki prepoznajo nespremenljive dele antigena, če pa so antigeni različni, morajo vezavne regije variirati. Za protitelesa in T-cell receptorje je potrebno, da variabilnost presega število genov v genomu in da sta genska rekombinacija in mutacija koristna v izdelavi raznolikosti.

16. Struktura sferičnih virusov

Majhni virusi imajo okoli nukleinske, kisline proteinsko lupino z ikozaedrsko simetrijo. Predmeti s takšno strukturo imajo 60 identičnih enot povezanih s petkratno trikratno in dvakratno osjo simetrije vsaka enota lahko "nastani" eno ali nekaj polipeptidnih verig. Zato so virusne lupine zgrajene iz številnih polipeptidnih verig, ki je mnogokratnik števila 60. Za ohranitev navidez ekvivalentne simetrije so pri pakiranju podenot v lupino dovoljeni samo določeni mnogokratniki ($T = 1, 3, 4, 7, \dots$).

Satelit tobačni nekrozni virus je primer T1 virusne strukture (16.1,326). 60 identičnih podenot se povezuje tesno okoli 5x osi simetrije na površju lupine in okoli 3x osi simetrije v notranjosti.

Tomato Bushy stunt virus je T3 rastlinski virus v za 180 kemijsko identičnimi podenotami. Vsaka polipeptidna veriga je razdeljena v več domen. Podenote ohranjajo kvazi ekvivalentno obliko s informacijskimi spremembami proteinskih verig, še najbolj se spremeni orientacija domen.

Pikornavirusi zgradijo lupino iz 60 kopij vsake od treh različnih polipeptidnih verig. Teh 180 podenot ima podobno ureditev kot Bushy stunt virusi. Pri nekaterih pikornavirusih so okoli 5x osi izbočine, ki jih obkrožajo globo, ki kanjoni. Pri rhino virusih tvorijo ti kanjoni pritrditveno mesto za proteinske receptorje na površini gostiteljskih celic in so blizu lukenj, ki vežejo protivirusne surovine.

Večina podenot rastlinskih in živalskih sferičnih virusov ima enako topologijo jedra kot Jelly Roll antiparalelna. Valj je sploščen s kratkimi zankami na vrhu in dolgimi spodaj, kar da valju klinasto obliko (16.13,335) Strukture podenot v alphavirusih in bakteriofagih MS2 imajo različne ureditve antiparalelnih β -nizov. Plaščni protein Sindbis virusa ima kimotripsinski prepogib; njegov prekurzorski protein pa ima avtokatalitično proteazno aktivnost. Dimeri MS2 plaščnega proteina vežejo specifično prepoznavno strukturo RNA-ja ki sprožijo sestavljanje bakteriofagnih delcev.

Kapside polinoma virusa in sorodnega SV40 imajo ikozaedrično simetrijo z 72 pentameričnimi deli velikega kapsidnega proteina. Pentameri so povezani s svojimi sosedi preko fleksibilnih ročic z β -nizom, ki poveča β -list napadenega pentamera. Te fleksibilne ročice dovoljujejo povezanost pentamerov tako v petgibno kot tudi v šestgibno simetrijo.

17. Napoved, inženirstvo (tehnika) in sestava proteinske strukture

Homologni proteini imajo podobno 3D strukturo. Vsebujejo jedrno regijo; ogrodje elementov sekundarne strukture, kjer so zvitja polipeptidnih verig podobna. Zračne regije, ki povezujejo dele ogrodja lahko variirajo po dolžini in strukturi. Iz baze podatkov znanih imunoglobinskih struktur je bilo vseeno možno uspešno predvideti konformacijo hipervariabilnih zračnih regij protiteles z znano aminokislinsko sekvenco.

Metode za predvidevanje sekundarnih struktur homolognih proteinov so lahko do 57% natančne, večina napak nastane na koncih α -heliksov in β -listov. Osrednje regije teh sekundarnih struktur so pogosto pravilno predvidene vendar metode ne ločijo vedno med α -heliksi in β -listi.

Napoved terciarne strukture iz aminokislinske sekvence je glavni nerešen problem molekularne biologije. Lažje zglada rešitev aminokislinske sekvence gleda na dano zvitje.

Proteinsko inženirstvo se rutinsko uporablja za spremembo proteinskih molekul preko "site-directed" mutageneze ali s kombinatornimi metodami. Kombinatorne metode proizvedejo veliko število naključnih mutantov od katerih so *in vitro* izbrani tisti zaželenimi lastnosti. Primer uspešne uporabe teh metod so specifični encimski inhibitorji, povečana encimska aktivnost... majhne proteinske molekule z vnaprej določenim zvitjem so sestavljene *in silico* z izračuni energije vseh možnih kombinacij določenega amino, kislinskega zaporedja.

18. Določevanje proteinskih struktur

3D strukturo proteinskih molekul lahko eksperimentalno določimo z rentgensko kristalografijo in NMR. Interakcija rentgenskih (x) žarkov z elektroni v molekuli (kristalu) se uporablja za pridobitev elektronske mape molekule, katero razložijo na osnovi atomskega modela.

Kristalizacija proteina je težko doseči in običajno zahteva veliko različnih eksperimentov s spreminjanjem številnih parametrov, kot so pH, temperatura, koncentracija proteina, lastnosti topila. Proteinski kristali vsebujejo velike kanale in lukenj napolnjene s topili, kjer lahko pride do difuzije težkih kovin v kristal. Dodatek težkih kovin je potreben za fazno determinacijo lomljenih žarkov.

Rentgenske strukture so določene pri različnih resolucijah. Pri nizkih resolucijah je določena le oblika molekule, medtem ko lahko pri visoki resoluciji določimo pozicijo večini atomov z veliko točnostjo. Pri visoko očiščeni strukturi, z R (refinement/očiščeno) faktorjem manj kot 0.20, pri resoluciji blizu 2.0 Å so napake v poziciji atomov 0.1 Å - 0.2 Å, pod pogojem je AK zaporedje.

Pri-NMR se uporablja za pridobitev razdalj med atomi v molekuli odkoder lahko dobimo 3D strukturo proteina. Metoda ne zahteva proteinskih kristalov in jo lahko uporabimo na proteinih v koncentriranih raztopinah ne smemo pa uporabljati majhnih proteinov.