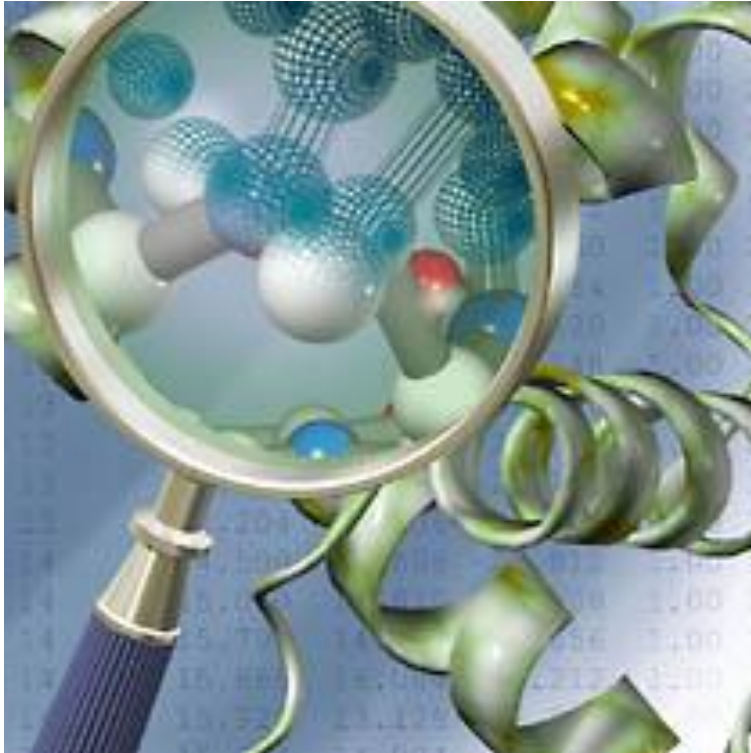


Biochemie



2. Aminokyseliny a peptidy, proteiny

Aminokyseliny a proteiny

2.1) Aminokyseliny

- Třídy aminokyselin
- Modifikované AMK v proteinech
- AMK stereoizomery
- Titrace AMK
- Reakce AMK

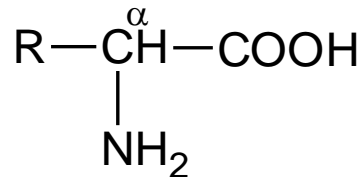
2.2) Peptidy

2.3) Struktura proteinů

- Struktura proteinů
- Vlákňité proteiny
- Globulární proteiny

Aminokyseliny

- **substituční deriváty karboxylových kyselin které obsahují skupinu $-\text{COOH}$ a $-\text{NH}_2$**
- ze živých organismů bylo izolováno několik set AMK
- nejdůležitějších je **20**, ze kterých jsou zbudovány bílkoviny – **kódované AMK**
- jako kódované se označují proto, že informace o jejich zařazení do bílkovin je uložena v nukleových kyselinách prostřednictvím **genetického kódu**
- tzn. že pro každou aminokyselinu existuje konkrétní kód nebo kódy tvořené třemi po sobě jdoucími nukleotidy → viz *nukleové kyseliny*
- **většina přírodních aminokyselin jsou α -aminokyseliny, mají proto stejný základní skelet**



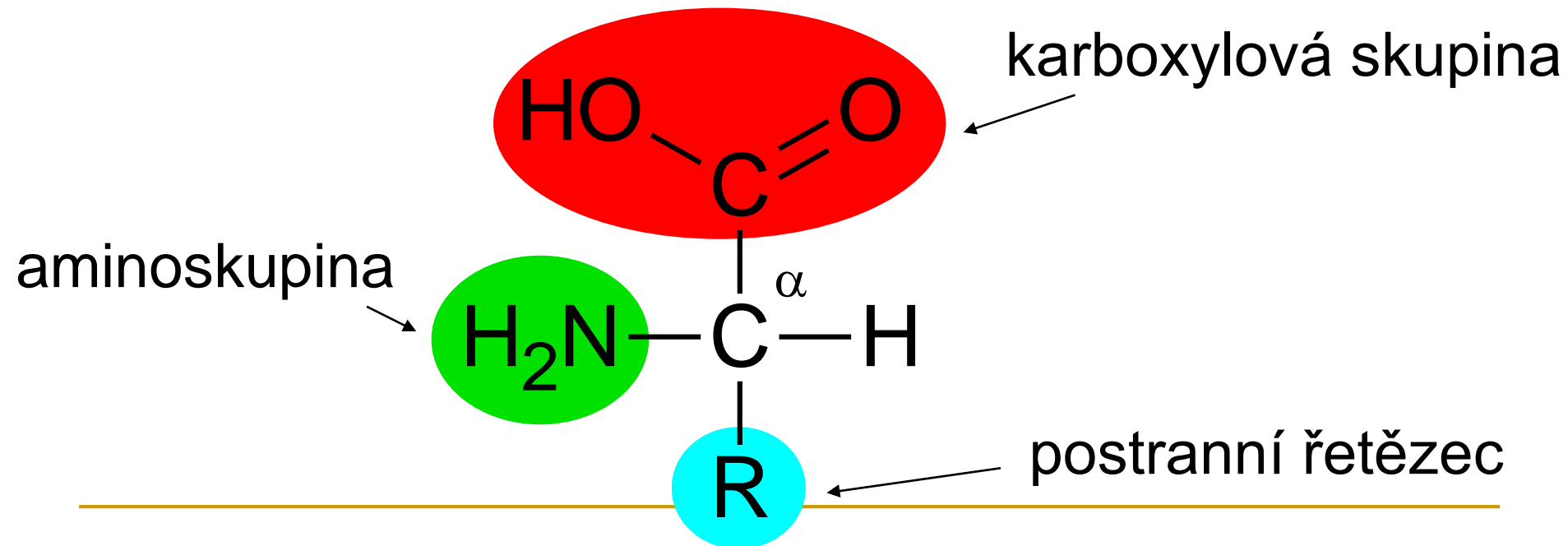
- složení:

$-\text{COOH}$...kyselá složka: $\text{COOH} \rightarrow \text{COO}^- + \text{H}^+$

$-\text{NH}_2$...zásaditá složka: $|\text{NH}_2 + \text{H}^+ \rightarrow \text{NH}_3^+$

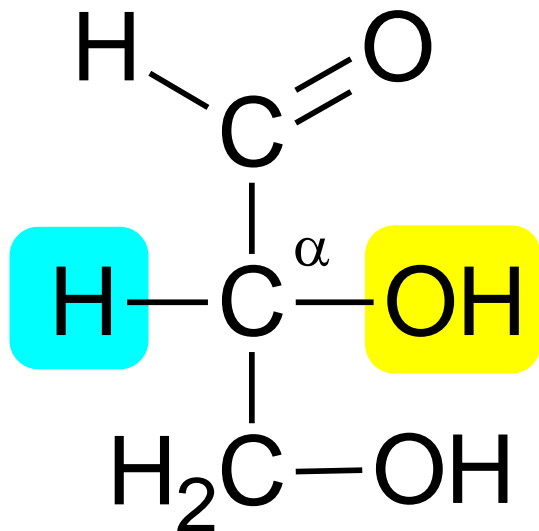
Aminokyseliny

- stavební jednotky bílkovin
- deriváty karboxylových kyseliny
- liší se postranním řetězcem (R)

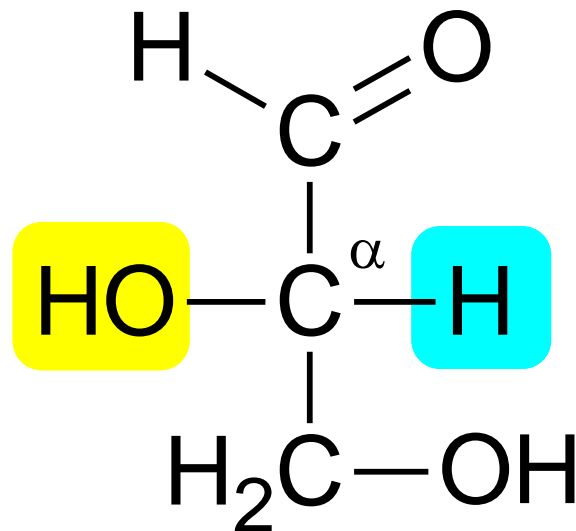


Prostorové uspořádání

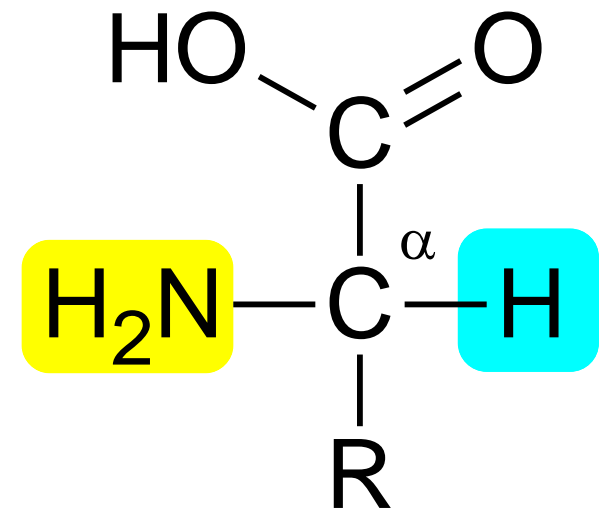
- α -aminokyseliny = NH_2 skupina na 2. C (C^α)
- C^α je **chirální** → enantiomery D a L



D-glyceraldehyd



L-glyceraldehyd

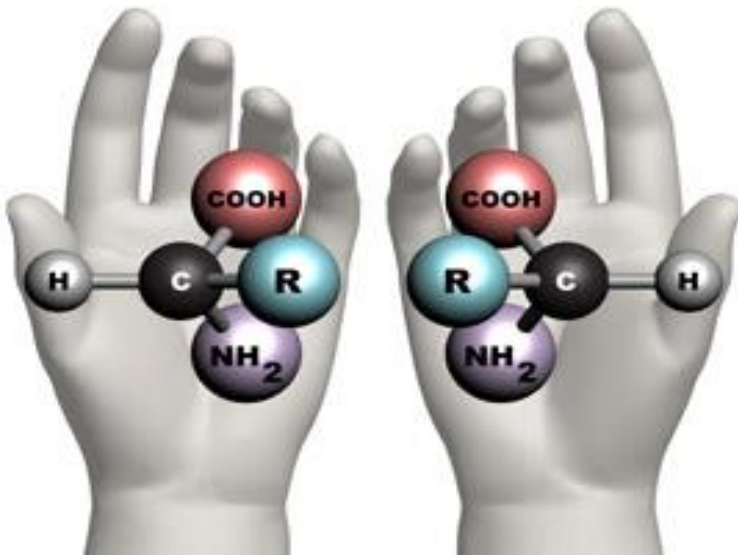
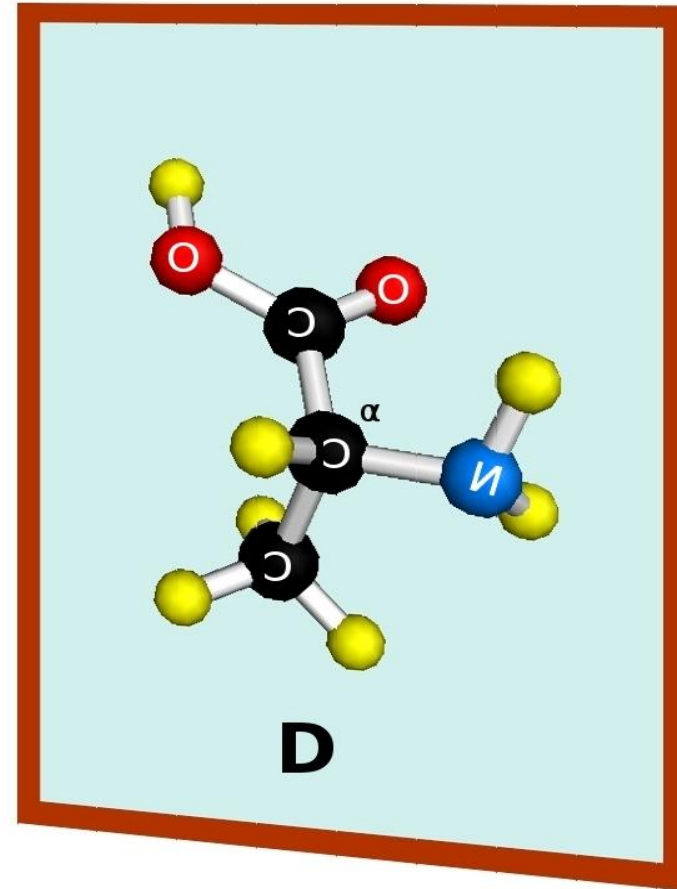
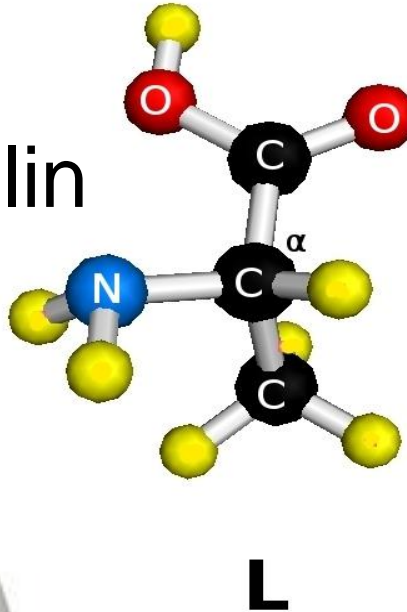


L-aminokyselina

Glycin

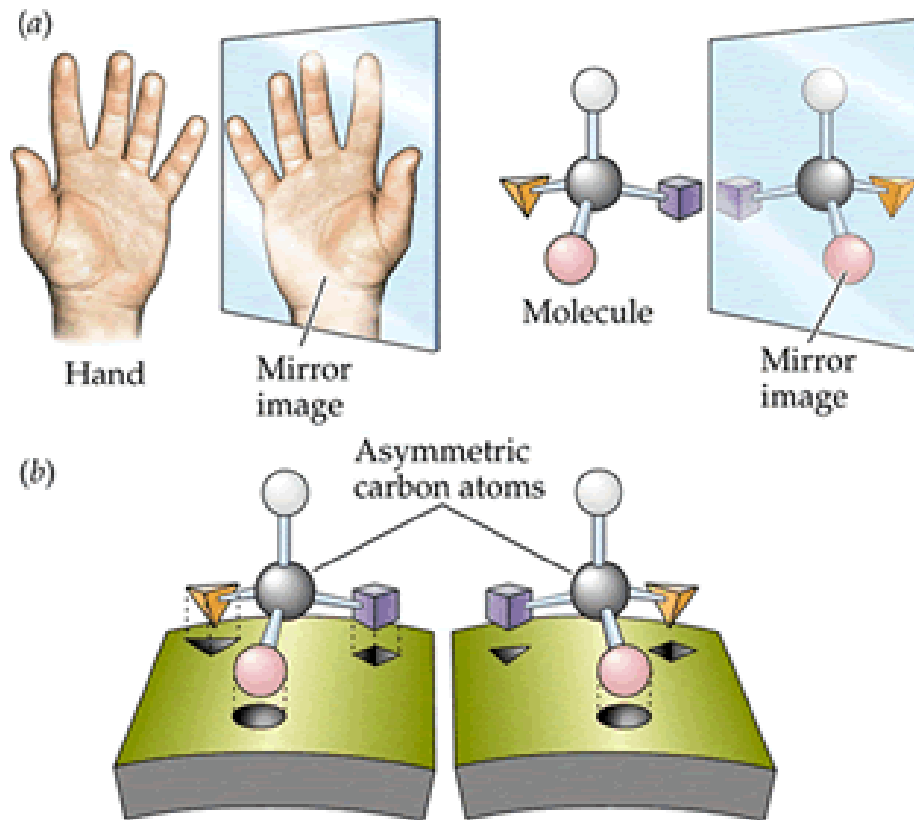
$\text{NH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$ nemá chirální uhlík (nejjednodušší AK)

většina aminokyselin
v přírodě: α ,L-AK



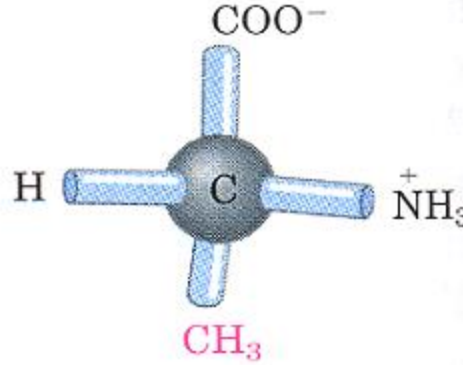
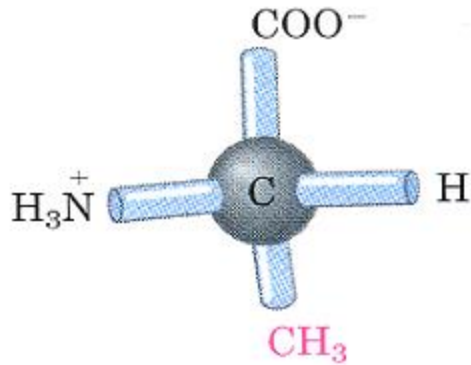
Stereochemie aminokyselin

Chirální molekuly existují ve dvou formách



© 2001 Sinauer Associates, Inc.

Dva stereoisomery alaninu

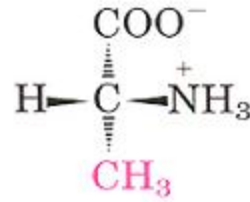
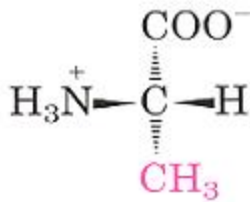


α -uhlík je **chirálním centrem**

(a) L-Alanine

D-Alanine

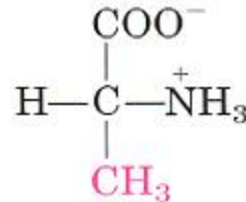
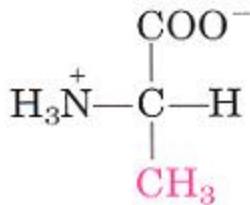
Dva stereoisomery se nazývají **enantiomery**.



(b) L-Alanine

D-Alanine

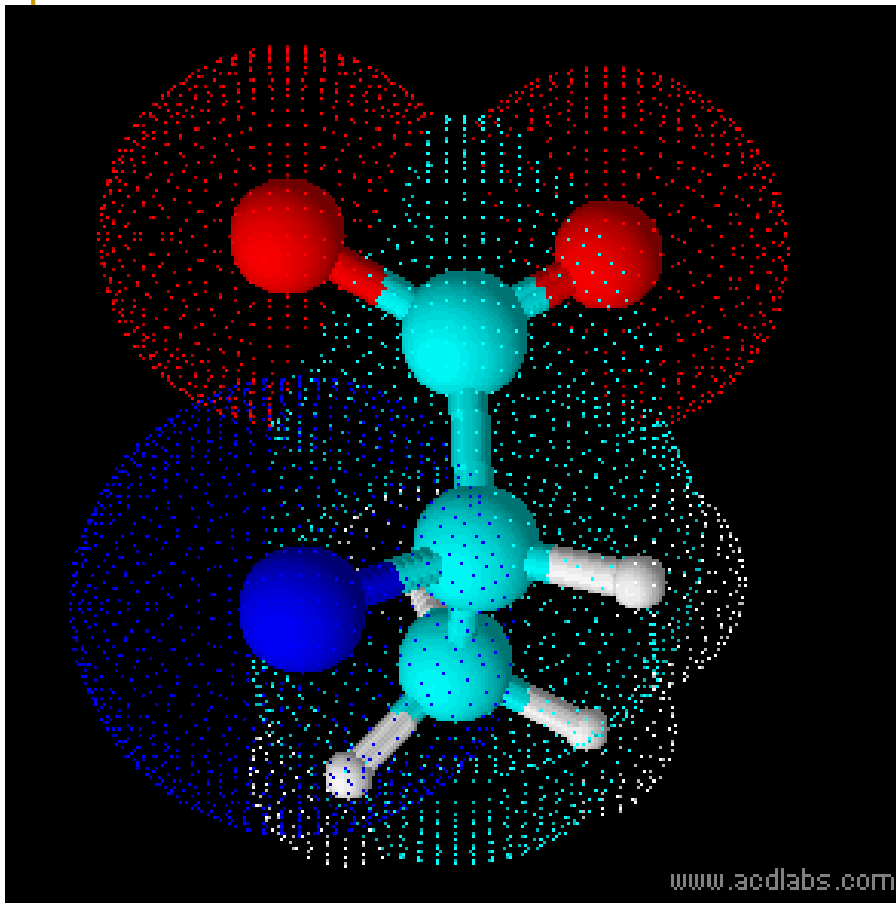
Tmavě vyznačené vazby jsou projectovány v rovině plátna a šrafované dozadu a dopředu.



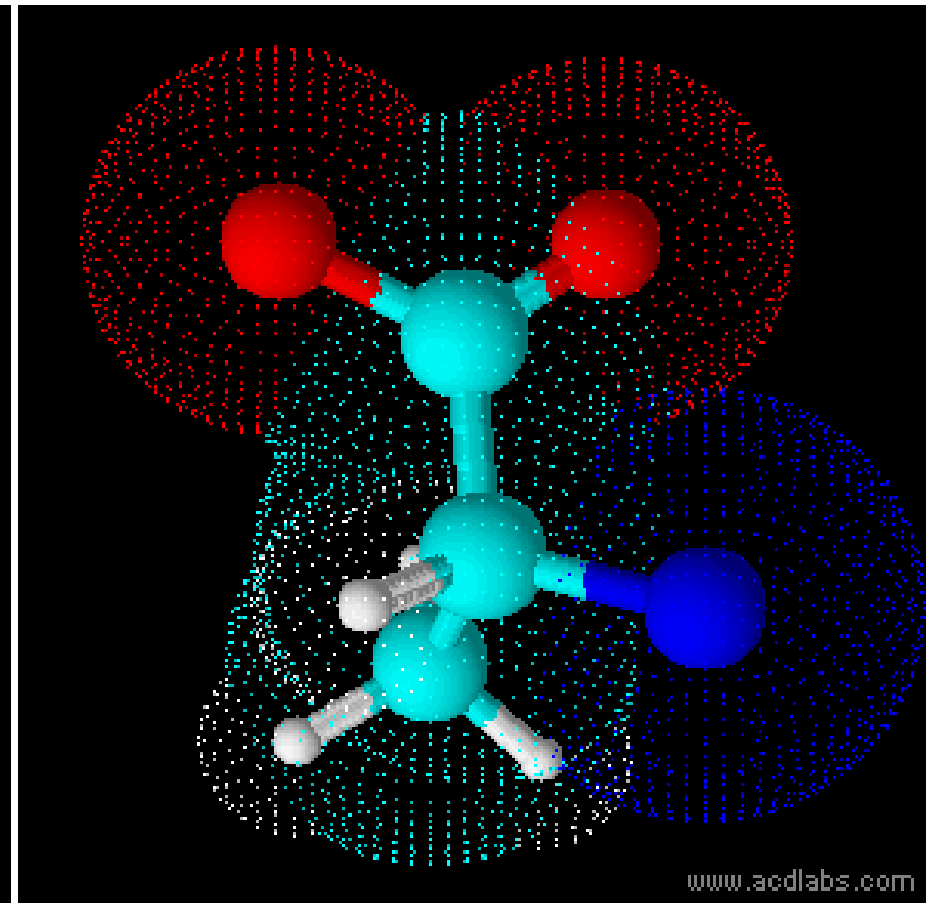
(c) L-Alanine

biochemie_2-1-Alanine

Horizontální vazby jsou projectovány v rovině plátna a vertikální dozadu a dopředu.



L-alanin



D-alanin

Proč je většina aminokyselin v přírodě právě v kofiguraci L a ne D nevíme..

Optická aktivita aminokyselin

Aminokyseliny rozpuštěné ve vodě při pH 7.0 stáčí rovinnu polarisovaného světla.

(+) alanin, isoleucin, arginin, k. glutamová, kyselina asparagová, kyselina glutamová, lysin, valin.

(-) tryptofan, leucin, fenylalanin.

Optická otáčivost se mění při změně pH.

Kódované aminokyseliny

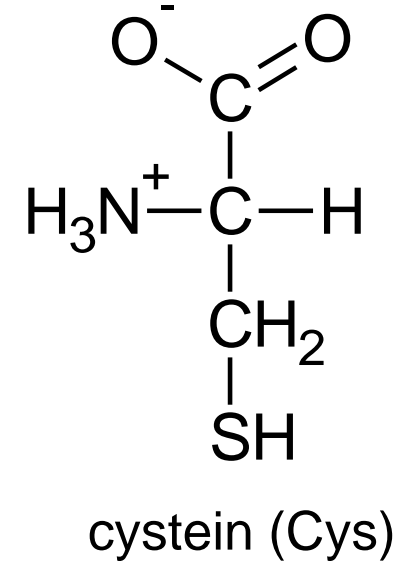
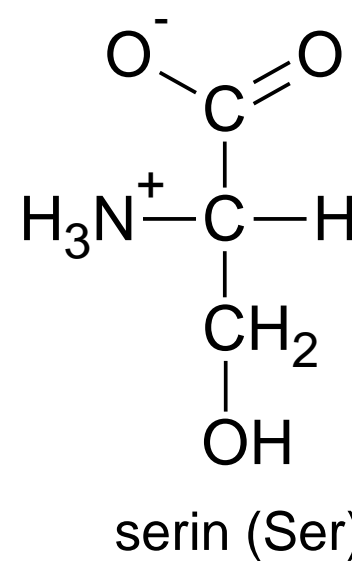
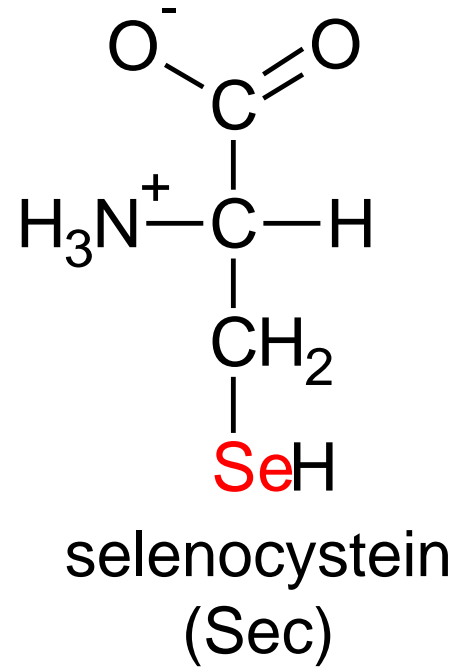
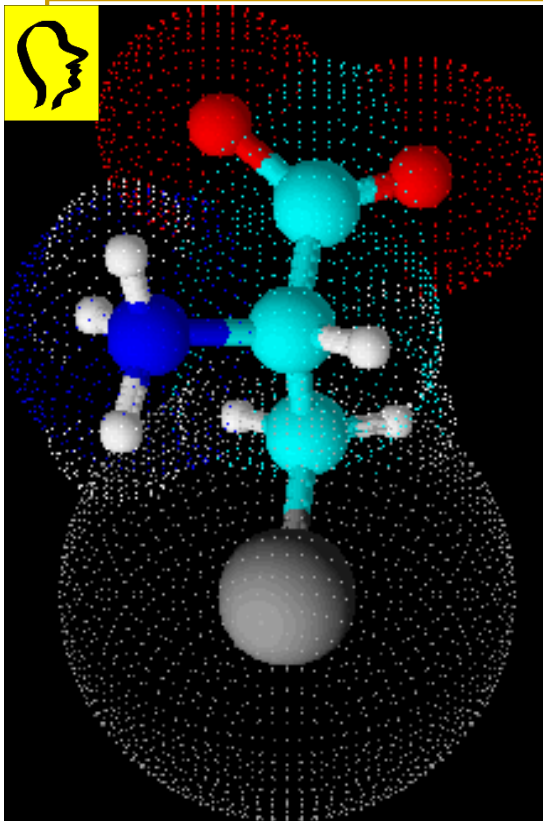
- základní stavební jednotky bílkovin
- mají svoji specifickou tRNA
- existuje 21 kódovaných aminokyselin
- některé si organismus neumí sám vytvořit a musí je přijímat v potravě - **esenciální**
- liší se svými postranními řetězci (-R)

V roce 1986 objevena **21. kódovaná aminokyselina selenocystein.**

Selenocystein se váže na speciální tRNA, která nese antikodon UCA. Tento antikodon rozeznává UGA kodon na mRNA, což je za normálních okolností stopkodon – žádná aminokyselina by se v tomto případě neměla zařadit a prodlužování proteinu by se mělo zastavit. To, že se zařadí aminokyselina selenocystein, je způsobeno sekvencí v bezprostředním okolí kodonu UGA.

Selenocystein se vyskytuje např. v selenoproteinech formiátdehydrogenázách.^[1]

Selenocystein



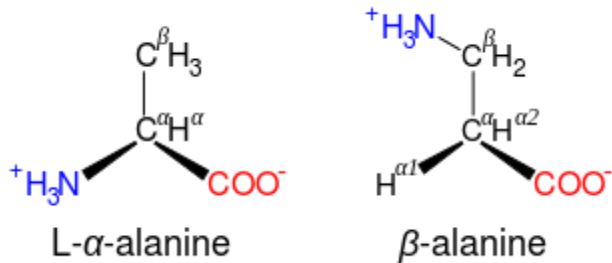
- v selenoproteinech – enzymy, kde Se je redukčním centrem (redukují volné kyslíkové radikály)
- v deiodinasech – regulují působení thyroidních hormonů

Aminokyseliny

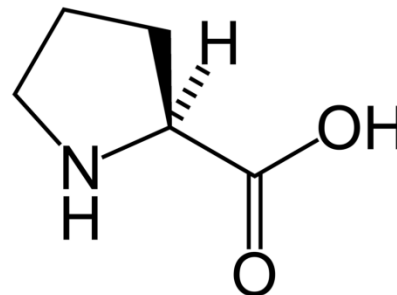
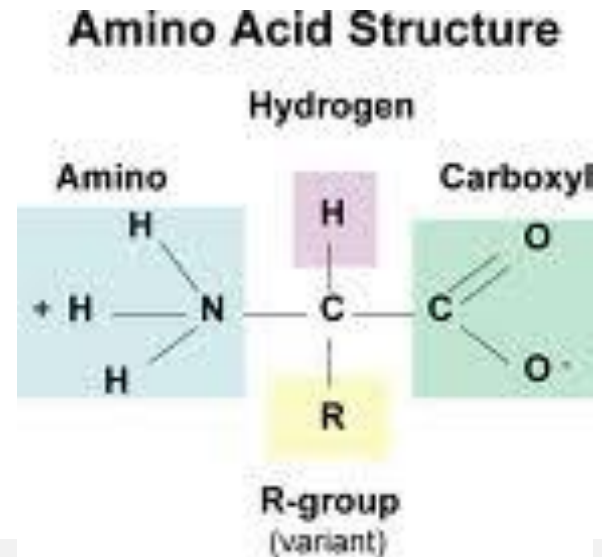
- Standardní AMK (v proteinech, 21), proteinogenní
- Nestandardní AMK (modifikované po začlenění do polypeptidu)

Obecná struktura

L- a- aminokyselina

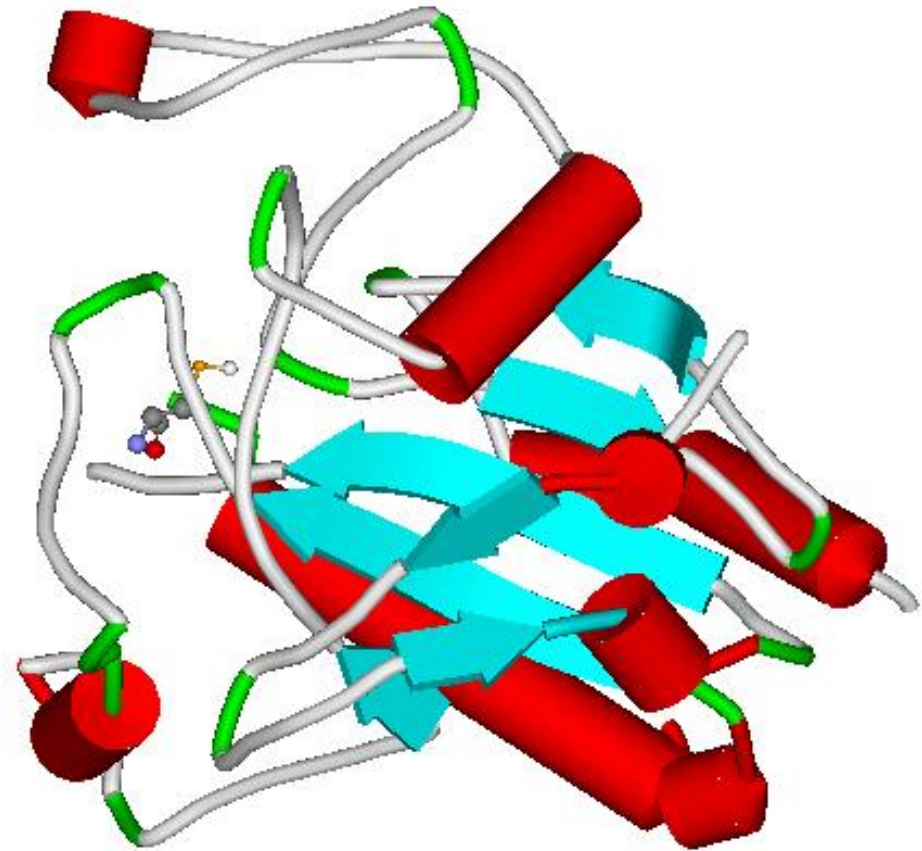
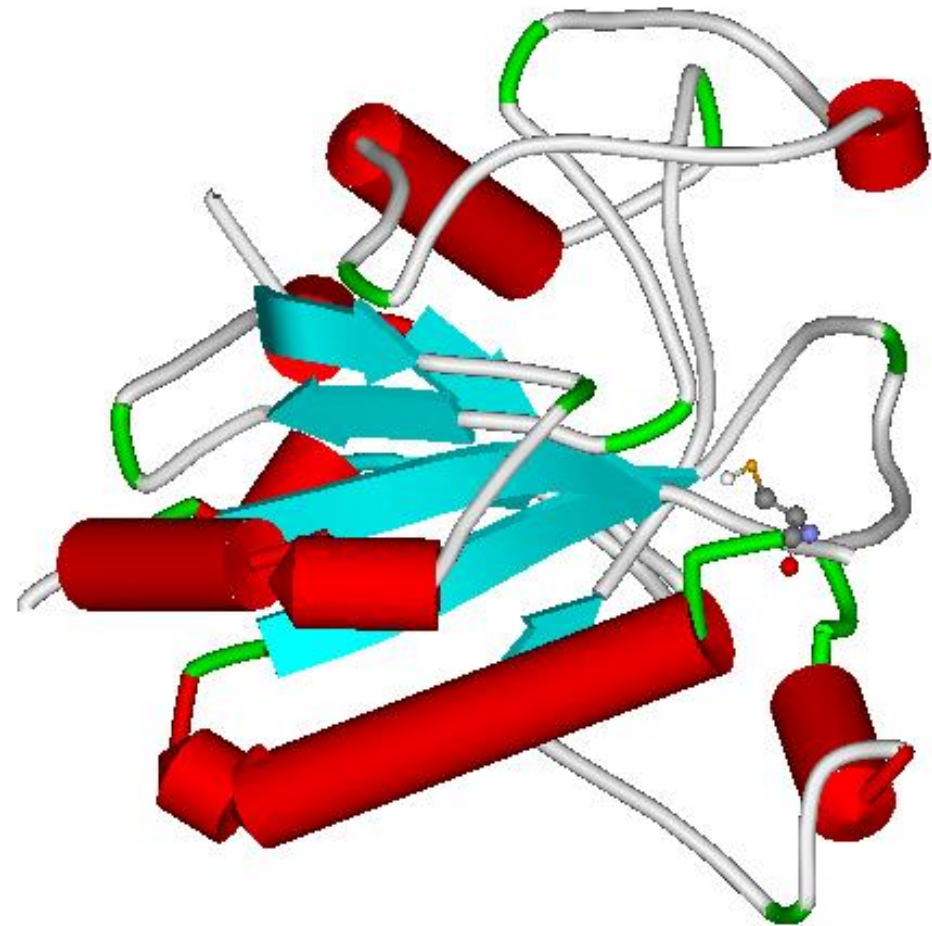


<http://awaremed.com/addictioneducation/wp-content/uploads/2014/07/amino-acid-structure.jpg>
http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/9/92/Beta_alanine_comparison.svg/317px-Beta_alanine_comparison.svg.png
<http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/d/d7/L-proline-skeletal.png/995px-L-proline-skeletal.png>

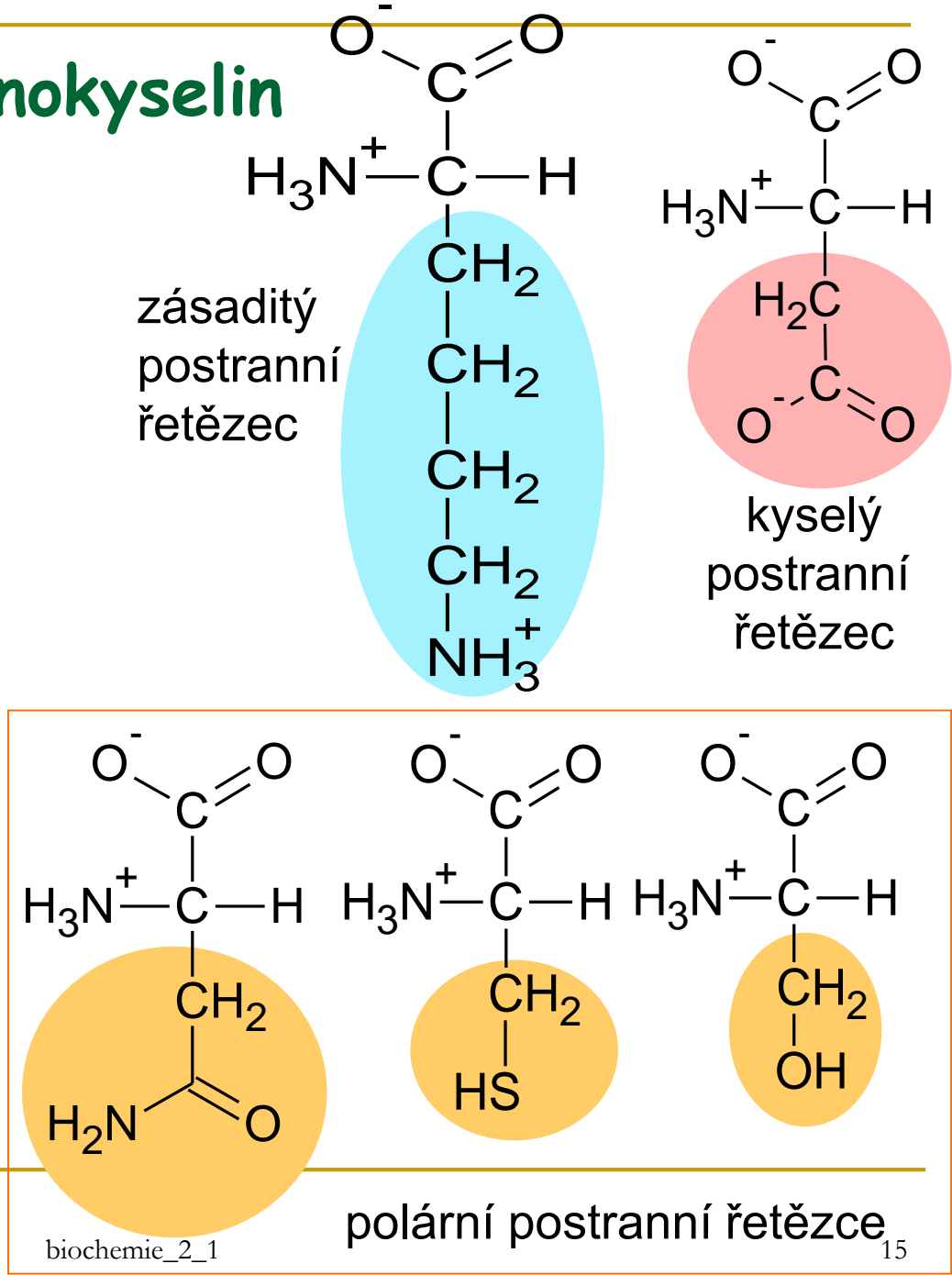
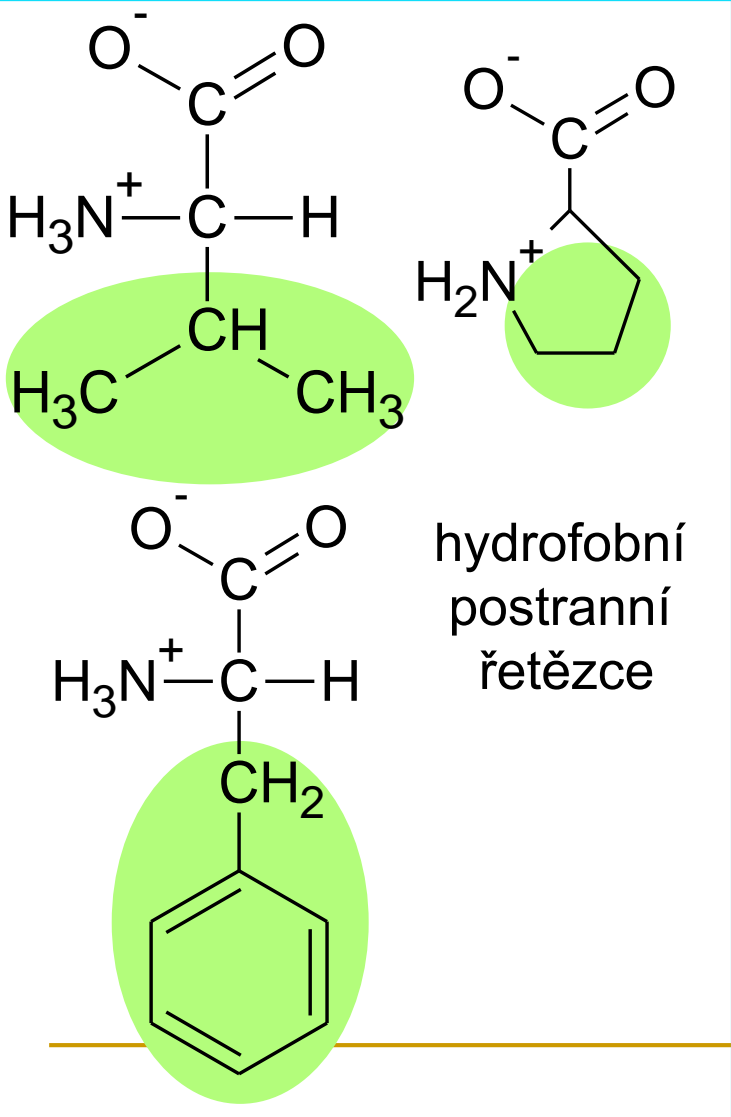


α -iminokyselina

prolin



Postranní řetězce aminokyselin



K čemu slouží aminokyseliny v organismech?

- dodávají a přenášejí N (esenciální prvek)
- jsou základní stavební jednotkou proteinů
- v případě hladovění mohou být alternativními zdroji energie a prekurzory pro tvorbu sacharidů
- slouží jako neurotransmitery a hormony- některé samy o sobě, jiné jako výchozí látky pro jejich tvorbu
- podílejí se na syntéze lipidové dvojvrstvy, nukleotidů, alkaloidů atd..
- a mají mnoho dalších funkcí

Označení aminokyselin

SYMBOL		AMINO ACID
1-Letter	3-Letter	
Y	Tyr	tyrosine
G	Gly	glycine
F	Phe	phenylalanine
M	Met	methionine
A	Ala	alanine
S	Ser	serine
I	Ile	isoleucine
L	Leu	leucine
T	Thr	threonine
V	Val	valine
P	Pro	proline

SYMBOL		AMINO ACID
1-Letter	3-Letter	
K	Lys	lysine
H	His	histidine
Q	Gln	glutamine
E	Glu	glutamic acid
Z	Glx	Glu and/or Gln
W	Trp	tryptophan
R	Arg	arginine
D	Asp	aspartic acid
N	Asn	asparagine
B	Asx	Asn and/or Asp
C	Cys	cysteine
X	Xaa	Unknown or other

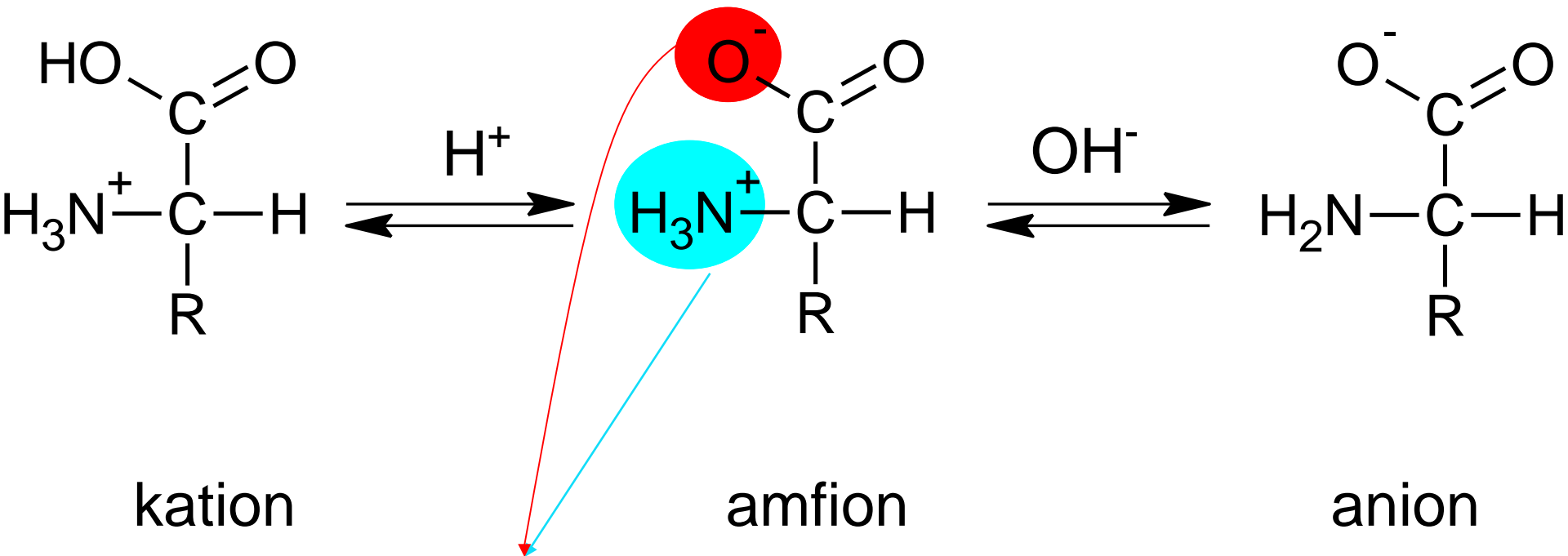
Elektrický náboj aminokyselin

Aminokyseliny mohou mít pozitivní, negativní nebo žádný náboj

nízké pH

neutrální pH
(fyziologické)

vysoké pH

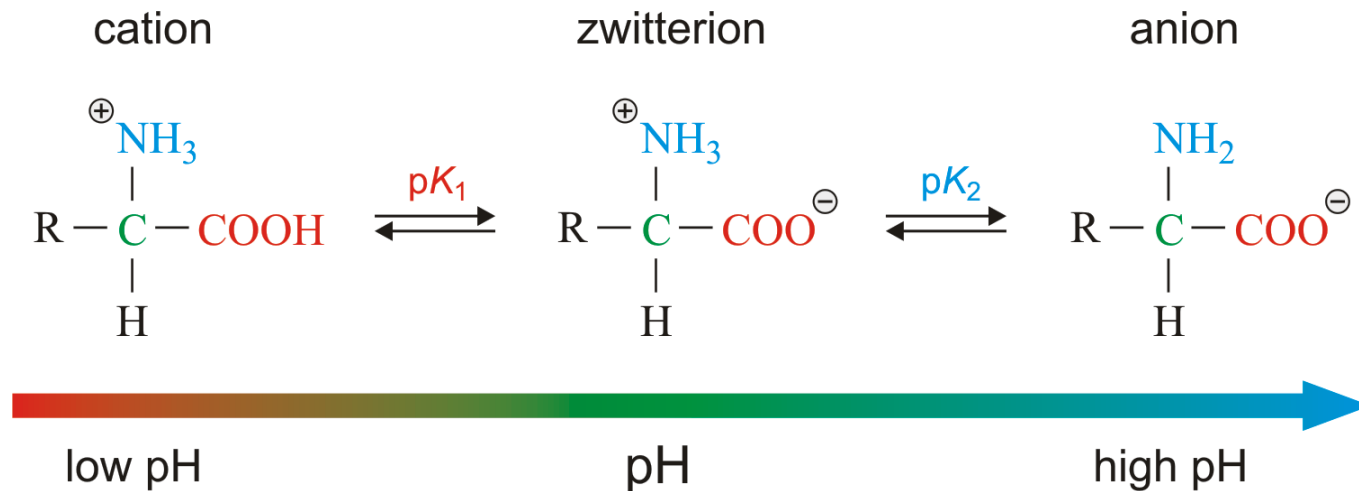


aminokyselina je elektroneutrální

Titrace aminokyselin

- Aminokyseliny mohou mít pozitivní, negativní nebo žádný náboj
- **-COOH a -NH₃ slabě kyselé skupiny existují v roztoku v iontové rovnováze:**

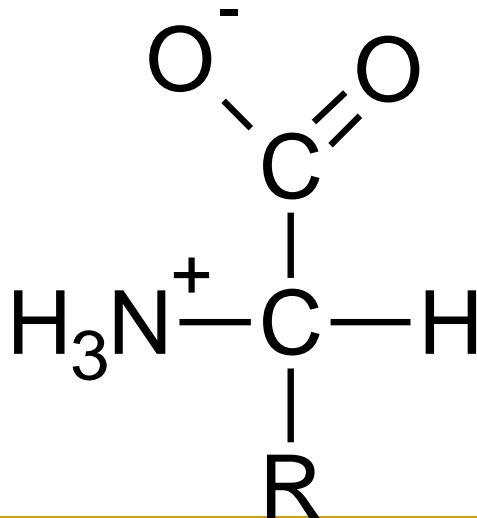
amfoterní
zwitterion (neutralní,
fyziologické pH)



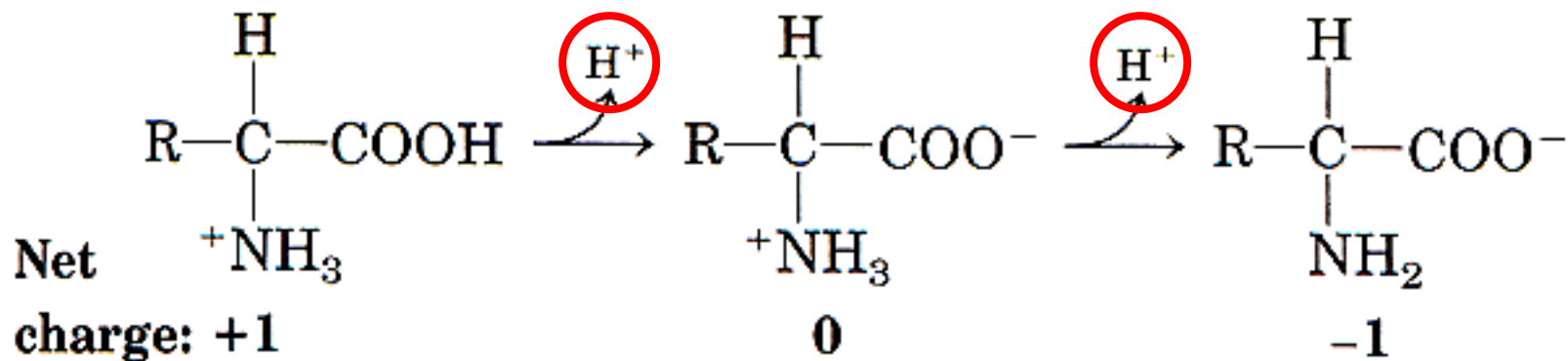
- Úplná disociace COOH a NH₂ skupin za fyziologického pH

Isoelektrický bod

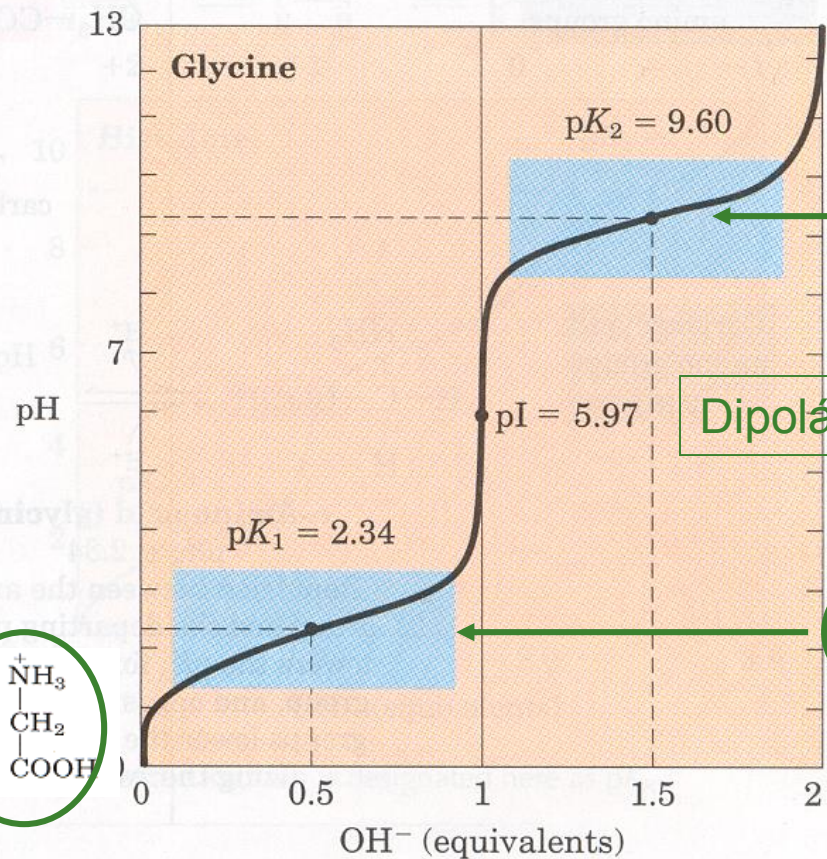
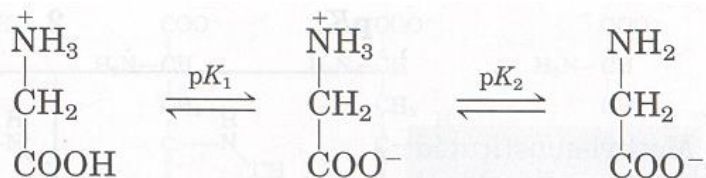
- pI
- pI = pH, kdy je celkový elektrický náboj aminokyseliny nulový (amfion), pro každou aminokyselinu jiné



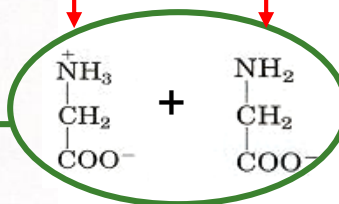
Jednoduchá monoamino monokarboxylová α -aminokyselina je diprotická kyselina (poskytuje proton) když je plně protonizovaná.



Aminokyselina má charakteristickou titrační křivku



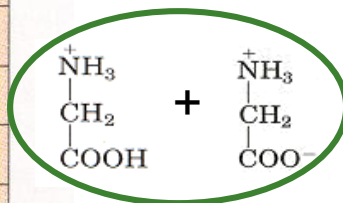
donor protonu akceptor protonu



Při pH, kdy $pK = 9.60$ je přítomná ekvimolární koncentrace donoru protonu a akceptoru protonu.

Dipolární iont

Izoelektrický bod



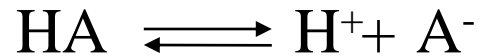
Při pH, kdy $pK_1 = 2.34$ je přítomná ekvimolární koncentrace donoru protonu a akceptoru protonu.

donor protonu akceptor protonu

Plně protonizovaná forma je při nejnižším pH

Henderson/Hasselbachova rovnice a pK_a

protonizovaná forma neprotonizovaná forma (konjugovaná báze)



$$K_a = \frac{[\text{H}^+][\text{A}^-]}{[\text{HA}]}$$

$$[\text{H}^+] = K_a \times \frac{[\text{HA}]}{[\text{A}^-]}$$

$$-\log[\text{H}^+] = -\log K_a - \log \frac{[\text{HA}]}{[\text{A}^-]}$$

$$pH = pK_a + \log \frac{[\text{A}^-]}{[\text{HA}]}$$

Acidobazické vlastnosti

- pH při, kterém je výsledný náboj nulový se nazývá **izoelektrický bod pI**
- je charakteristický pro každou AMK
- má vliv na fyzikální i chemické vlastnosti AMK

$$pI = (pK_1 + pK_2) / 2$$

($pK_1 + pK_2$ = disociační konstanty), graf !!!

- **pI: neutrální AMK = 4,8 – 6,3**
zásadité AMK = 7,6 – 10,8
kyselé AMK = 2,7 – 3,2
- tato vlastnost se často využívá při separaci a identifikaci aminokyselin (elektroforéza – izoelektrická fokusace)

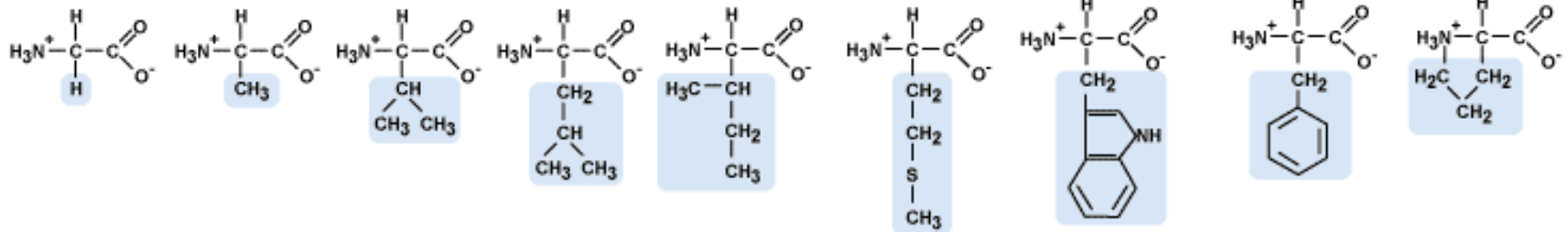
Klasifikace aminokyselin

Aminokyseliny se obecně dělí na skupiny podle polaridy postranních řetězců

Východiskem pro dělení aminokyselin je to, že mají:

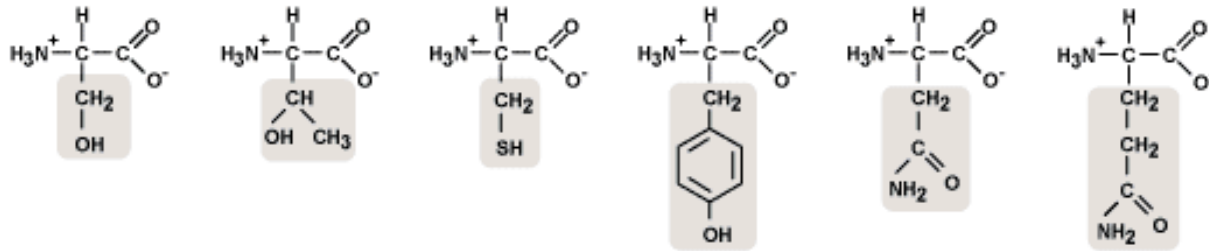
- **nepolární** postranní řetězec
- **polární** postranní řetězec
- **polární nabitým** postranní řetězcem

NONPOLAR



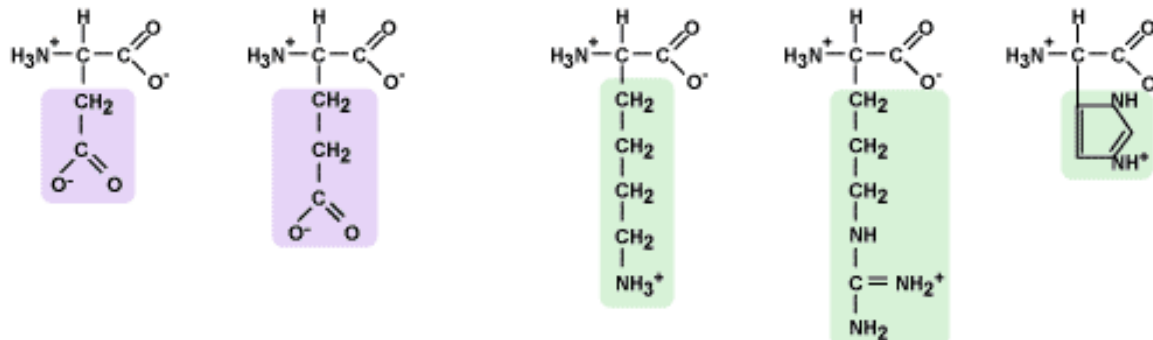
Glycine (Gly) Alanine (Ala) Valine (Val) Leucine (Leu) Isoleucine (Ile) Methionine (Met) Tryptophan (Trp) Phenylalanine (Phe) Proline (Pro)

POLAR



Serine (Ser) Threonine (Thr) Cysteine (Cys) Tyrosine (Tyr) Asparagine (Asn) Glutamine (Gln)

Electrically Charged



Acidic

Aspartic Acid (Asp) Glutamic Acid (Glu)

Basic

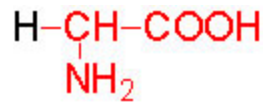
Lysine (Lys) Arginine (Arg) Histidine (His)

Nepolární aminokyseliny

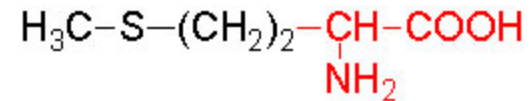
Nepolární aminokyseliny mají ve svém postranním řetězci pouze uhlík a vodík, obecně **nejsou reaktivní**. Fakt, že jsou **hydrofóbní**, je předurčuje k tomu, aby pomáhaly proteinům uspořádat se do 3-D struktury

Nonpolární (hydrofóbní) postranní řetězce R

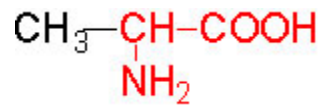
Glycin (Gly)



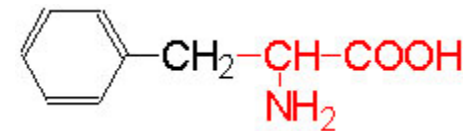
Methionin (Met)



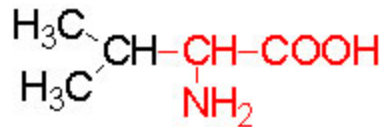
Alanin (Ala)



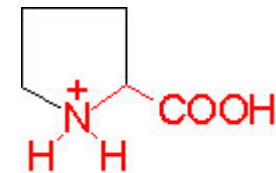
Fenylalanin (Phe)



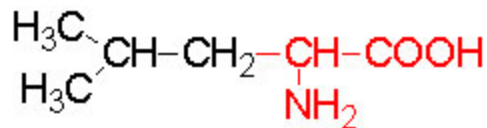
Valin (Val)



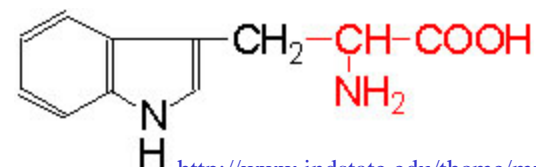
Prolin (Pro)



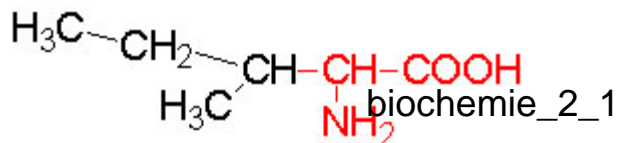
Leucin (Leu)



Tryptofan (Trp)



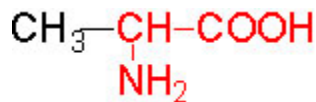
Isoleucin (Ile)



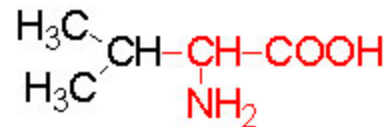
biochemie_2_1

Glycin – postranní řetězec tvoří pouze vodík

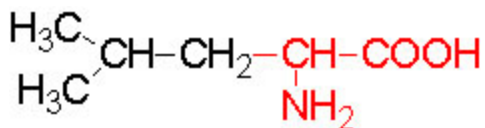
Alanin, valin, leucin a isoleucin mají saturevaný postranní řetězec s vodíkem a uhlíkem, leucin a isoleucin jsou isomery.



Alanin

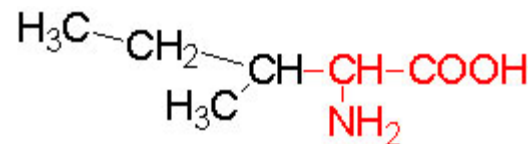


Valin



Leucin

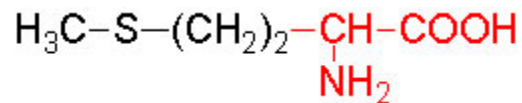
biochemie_2_1



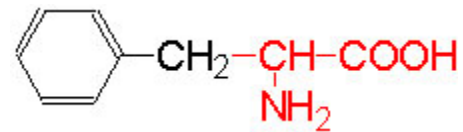
Isoleucin

Methionin má v postranním řetězci síru.

Fenylalanin je alanin s benzenovým jádrem. Je velice **hydrofóbní** a vyskytuje se v globulárních proteinech.

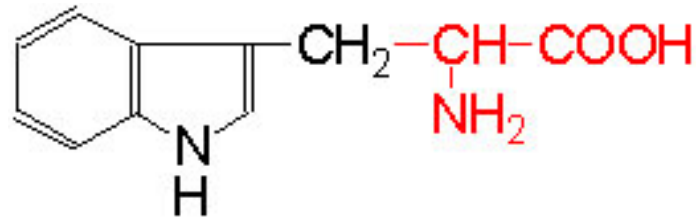


Methionin

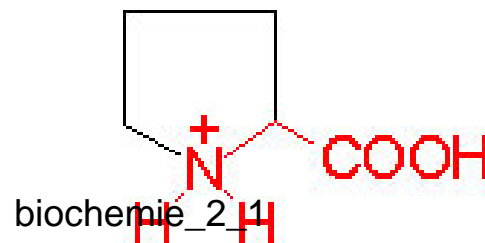


Fenylalanin

Tryptofan je strukturně podobný alaninu, s indolovou skupinou namísto aromatického kruhu fenylalaninu. Je **hydrofóbní** a také pomáhá sbalovat globulární proteiny.



Prolin je iminokyselina. Mezi aminokyselinami je výjimečný, postranní řetězec se stáčí do kruhu a váže se na kostru aminokyseliny. Je málo reaktivní.

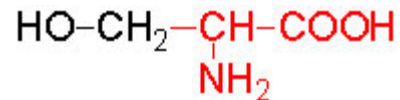


Polární (hydrofilní) aminokyseliny

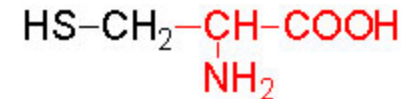
Mají v postranním řetězci **kyslík, síru a nebo dusík** a proto jsou polární. Snadno interagují s vodou, jsou **hydrofilní**. Jsou velmi dobře rozpustné ve vodě.

Polární (hydrofilní) postranní řetězce R

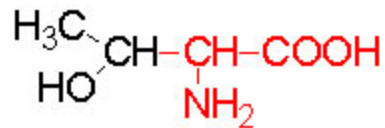
Serin (Ser)



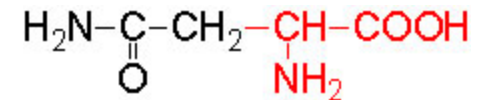
Cystein (cys)



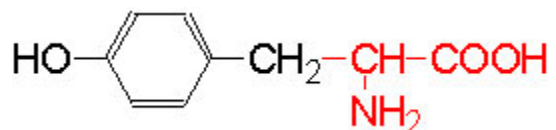
Threonin (Thr)



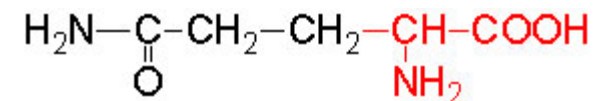
Asparagin (Asn)



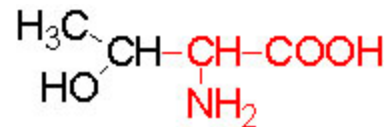
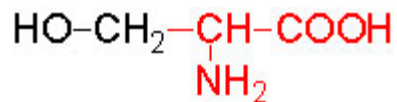
Tyrosin (Tyr)



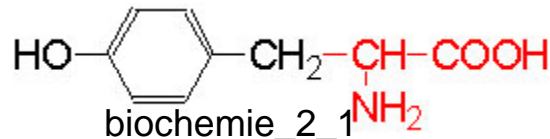
Glutamin (Gln)



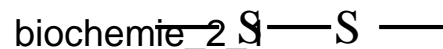
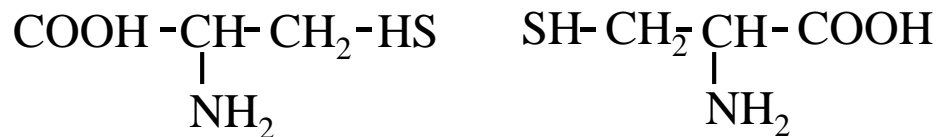
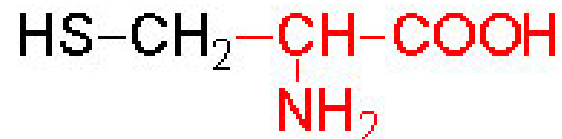
Serin a **threonin** mají –OH skupinu a jsou velmi **polární**. Hrají významnou úlohu při **fosforylačních reakcích** (v aktivním místě enzymů).



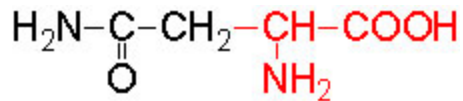
Tyrosin je fenylalanin s hydroxylovou (-OH) skupinou. Je velmi **polární**, slabou kyselinou. Má důležitou **katalytickou funkci v aktivním místě enzymů** (reverzibilní přenos fosfátové skupin).



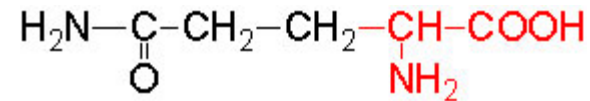
Cystein obsahuje síru a thyolová (-SH) skupina je velice reaktivní. Dva cysteiny vytváří kovalentní vazbu (**disulfidický můstek**). Ten je důležitý pro stabilizaci prostorového uspořádání proteinu.



Asparagin a **glutamin** jsou amidy kyselin asparagové a glutamové. Jejich postranní řetězce obsahují druhou aminoskupinu, která neionizuje.



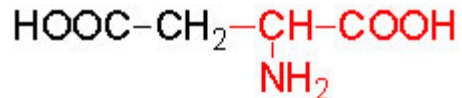
Asparagin



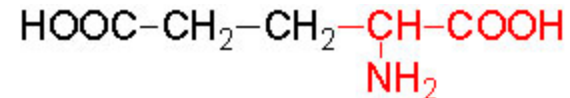
Glutamin

Negativně nabité (nepolární) postranní řetězce R

Asparagová kyselina (Asp)



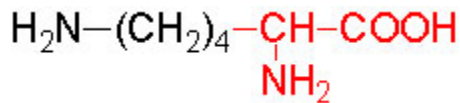
Glutamová kyselina (Glu)



Asparagová a glutamová kyselina obsahují druhou COO^- skupinu a jsou **negativně nabité**. Proteinu dodávají celkový záporný náboj.

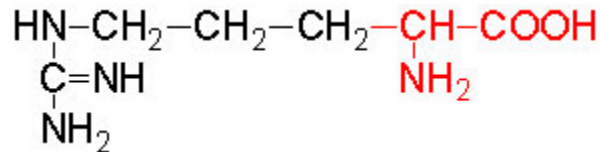
Pozitivně nabitě (nepolární) postranní řetězce R

Lysin (Lys)



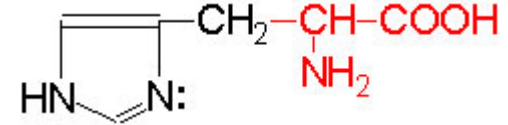
ϵ -aminoskupina

Arginin (Arg)



guanidinová skupina

Histidin (His)



imidazolová skupina

Lysin a **arginin** mají oba pK kolem 10 a jsou proto vždy při neutrálním pH **pozitivně nabitě**.

Histidin je zajímavý v tom, že jeho pK je 6.5 a proto může **být bez celkového náboje nebo pozitivně nabitý**. Histidin hraje důležitou roli v katalytickém mechanismu enzymových reakcí, často se vyskytuje v **aktivním místě enzymu**. Jako součást **hemoglobinu** reguluje pH krve.

Dělení aminokyselin podle chemického složení

malé aminokyseliny – glycin, alanin

větvené aminokyseliny – valine, leucine, isoleucine

hydroxy aminokyseliny (-OH skupina) – serin, threonin

aminokyseliny se sírou – cystein, methionin

aromatické aminokyseliny – fenylalanin, tyrosin, tryptofan

kyselé aminokyseliny a jejich deriváty – asparagová kyselina a asparagin, glutamová kyselina a glutamin

bazické aminokyseliny – lysin, arginin, histidin

iminokyselina - prolin

Esenciální aminokyseliny u člověka

- přísun z potravy
- člověk není schopen syntetizovat jejich uhlíkovou kostru

Arginin*

Histidin*

Isoleucin

Leucin

Valin

Lysin

Methionin

Threonin

Fenylalanin

Tryptofan

* Esenciální pouze u dětí, ne u dospělých

Neesenciální aminokyseliny

- není potřeba jejich přísun potravou
- vznikají transaminací α -ketokyselin a následnými dalšími reakcemi

Alanin

Asparagin

Aspartát

Glutamát

Glutamin

Glycin

Prolin

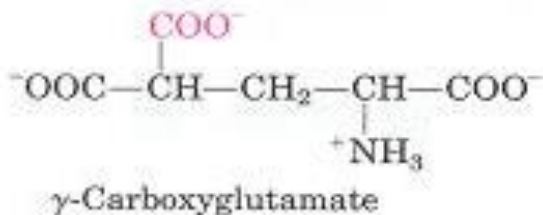
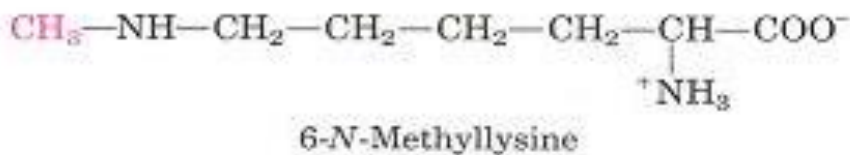
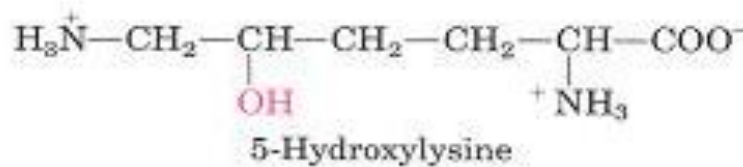
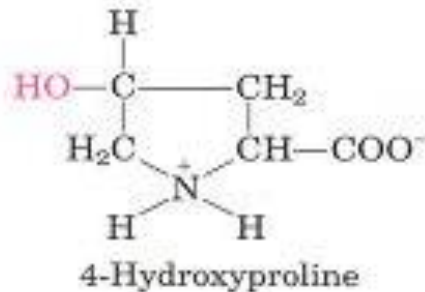
Serin

Cystein (z Met*)

Tyrosin (Phe*)

* Esenciální aminokyseliny

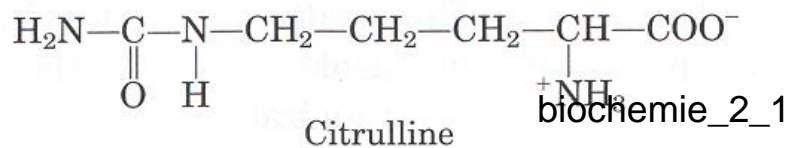
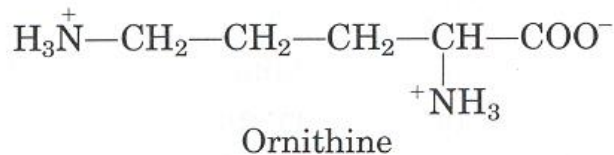
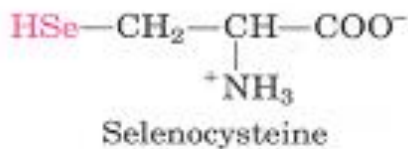
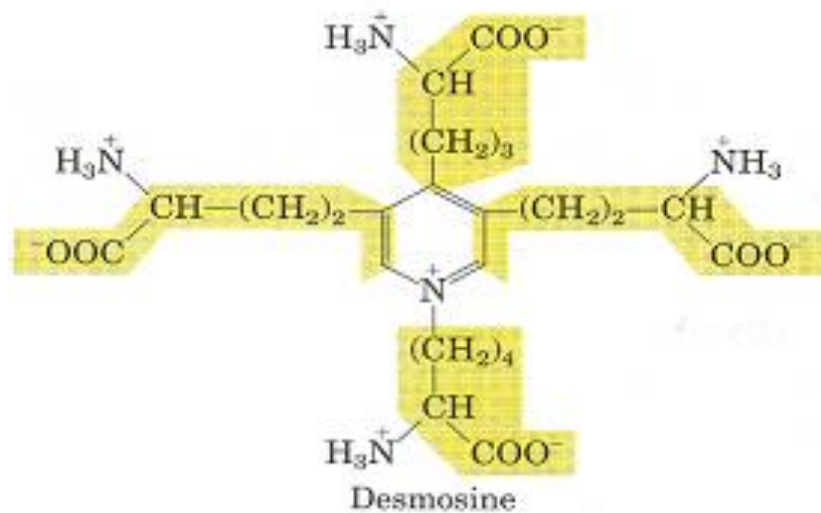
Málo běžné aminokyseliny vyskytující se v proteinech



hydroxyprolin a hydroxylysin
v kolagenu a elastinu

6-N-methyllysin
složka myosinu

γ -karboxyglutamát
složka prothrombinu a
dalších proteinů vázajících
 Ca^{2+}



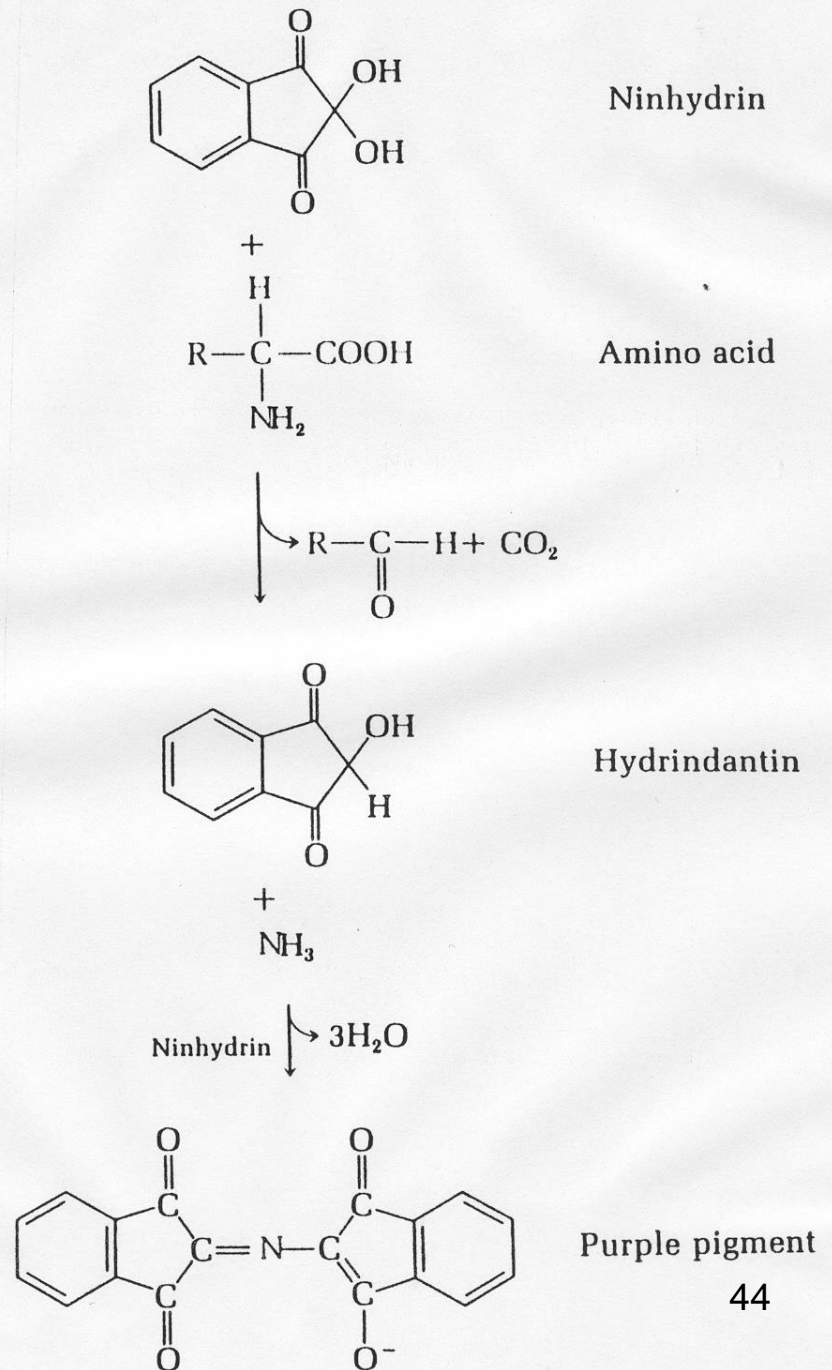
Desmosin
 příčná vazba v elastinu

Ornithin a citrulin
 intermediáty biosyntézy argininu a
 močovinového cyklu

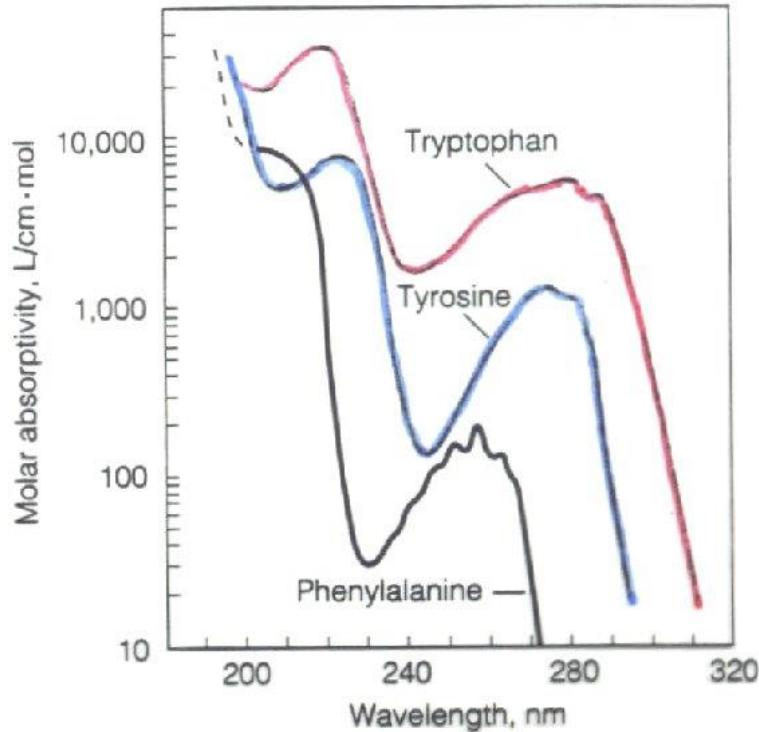
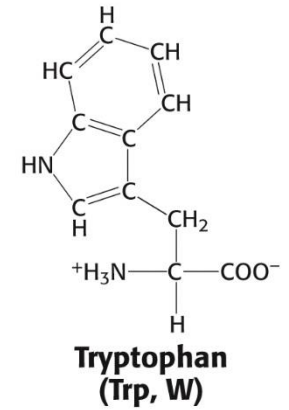
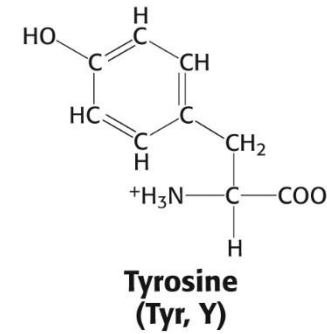
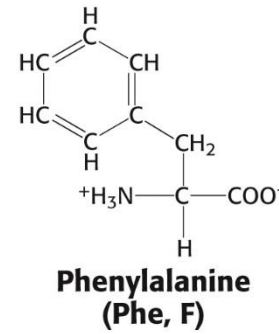
Ninhydrinová reakce

Toto silně oxidační činidlo oxidativně dekarboxyluje aminokyselinu. Amoniak a hydrindantin, který vznikne z ninhydrinu, vytvoří modročervenou barvu

biochemie_2_1



Optické vlastnosti AMK a proteinů

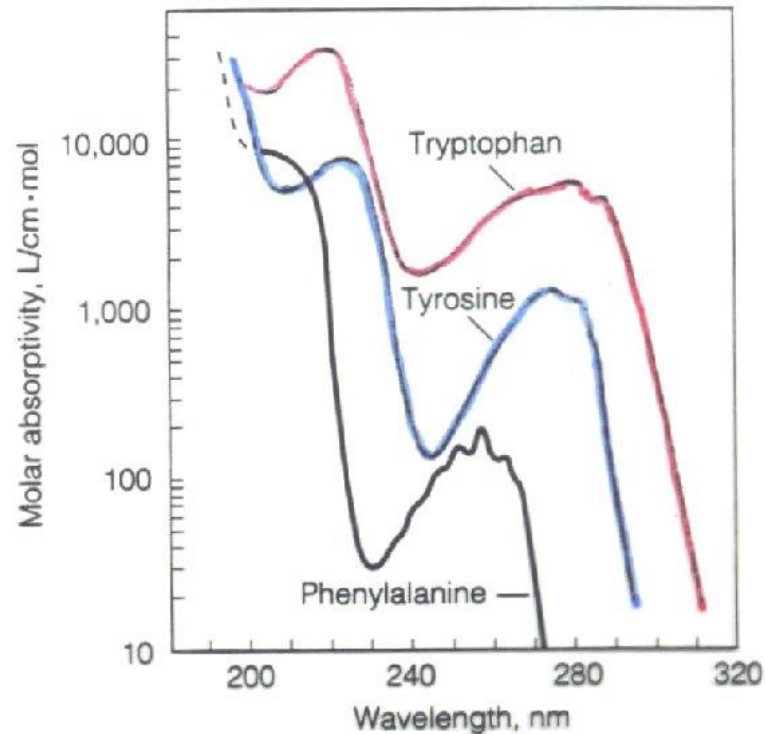


TEST

http://web.campbell.edu/faculty/nemecz/323_lect/amino/images/spectrum.jpg

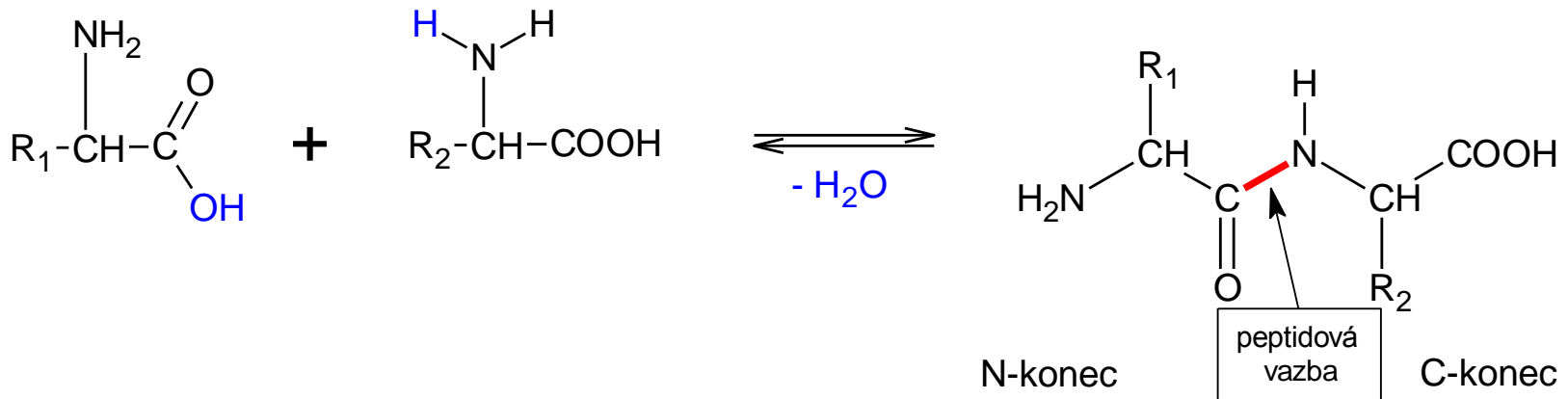
Absorpce spektra Trp & Tyr

Lamber - Beerův zákon: $A = \epsilon cl$. Používán na zjištění koncentrace proteinů

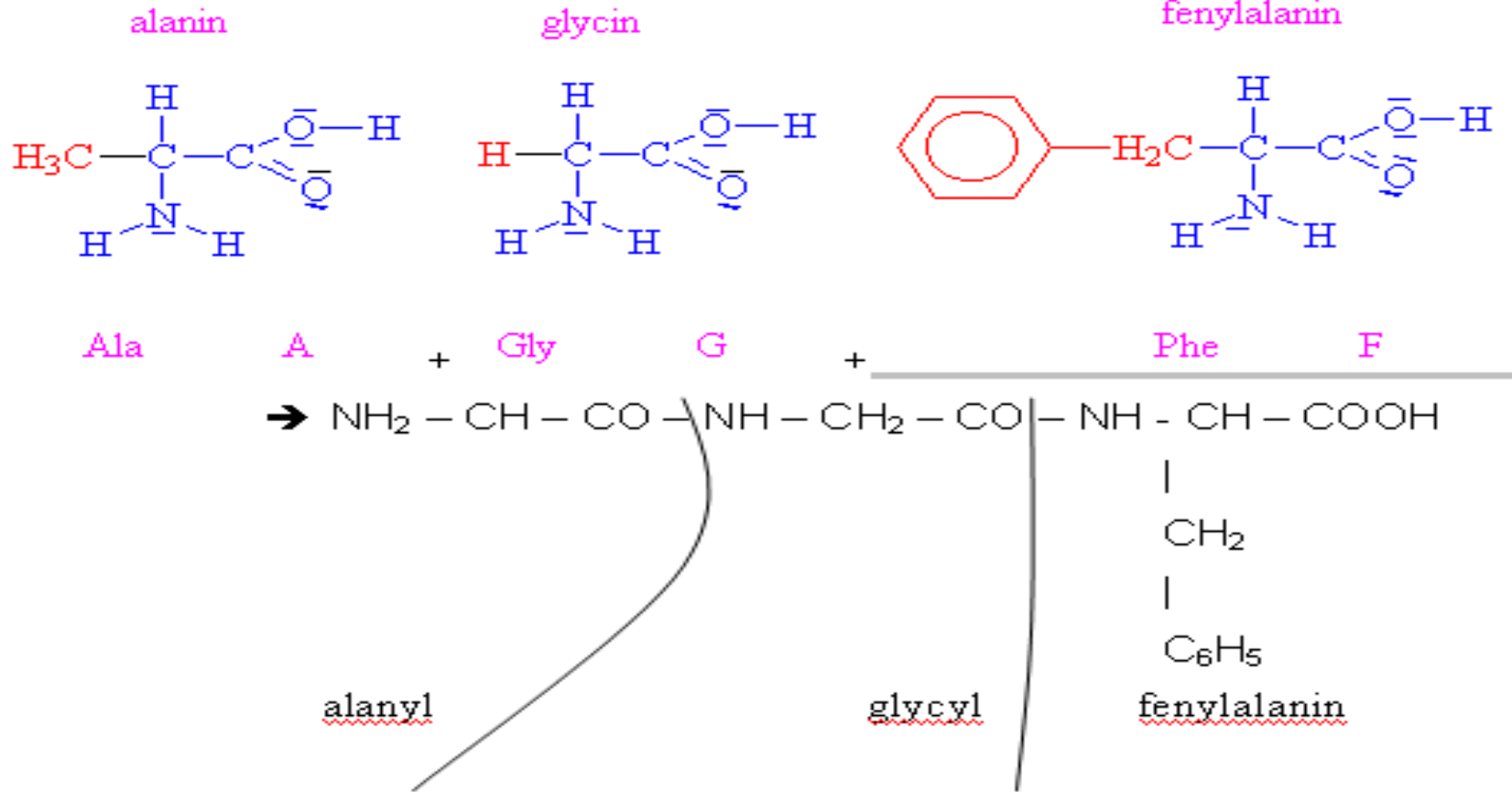


1) Reakce AMK - kondenzace

- reakce, při kterých dochází k propojování AMK do řetězců
- **reakce $-\text{COOH}$ skupiny 1. AMK s $-\text{NH}_2$ skupinou 2. AMK za současného odštěpení vody**
- vzniká dipeptid až polypeptid (tj. bílkovina)
- přítomnost peptidické vazby – **BIURETOVA reakce** (vzniká biuret = modrofialové zbarvení, peptid + Cu^{2+} v alkalickém prostředí)

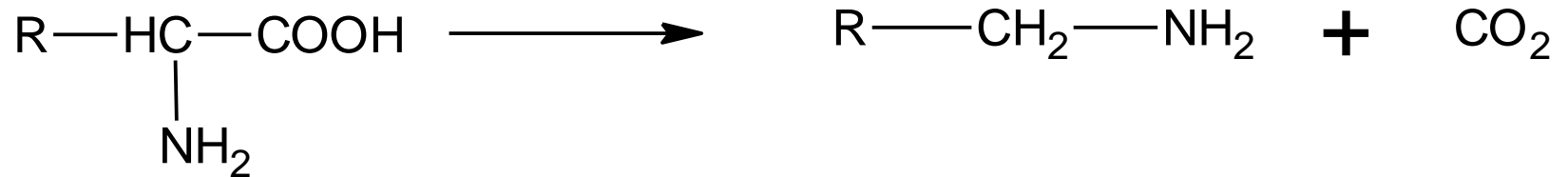


Příklad



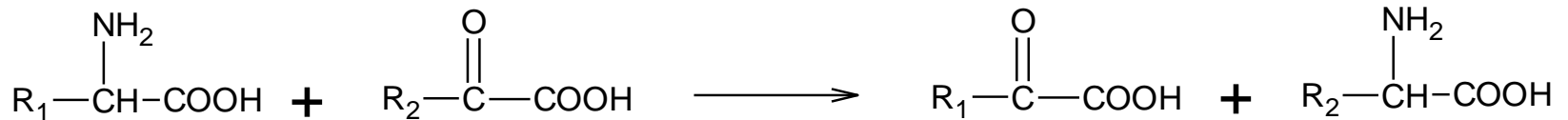
2) Reakce AMK - dekarboxylace

- reakce, které si využívají při odbourávání nadbytečných AMK



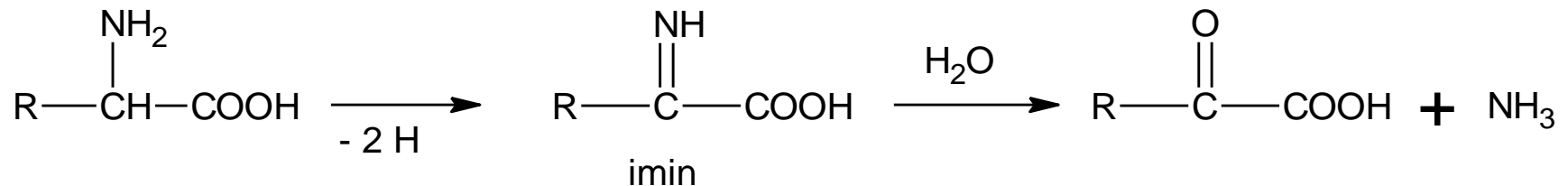
3) Reakce AMK - transaminace

- reakce slouží k přenosu aminoskupiny z jedné molekuly na druhou
- z kyseliny, která je v nadbytku se může vyrobit AMK potřebná

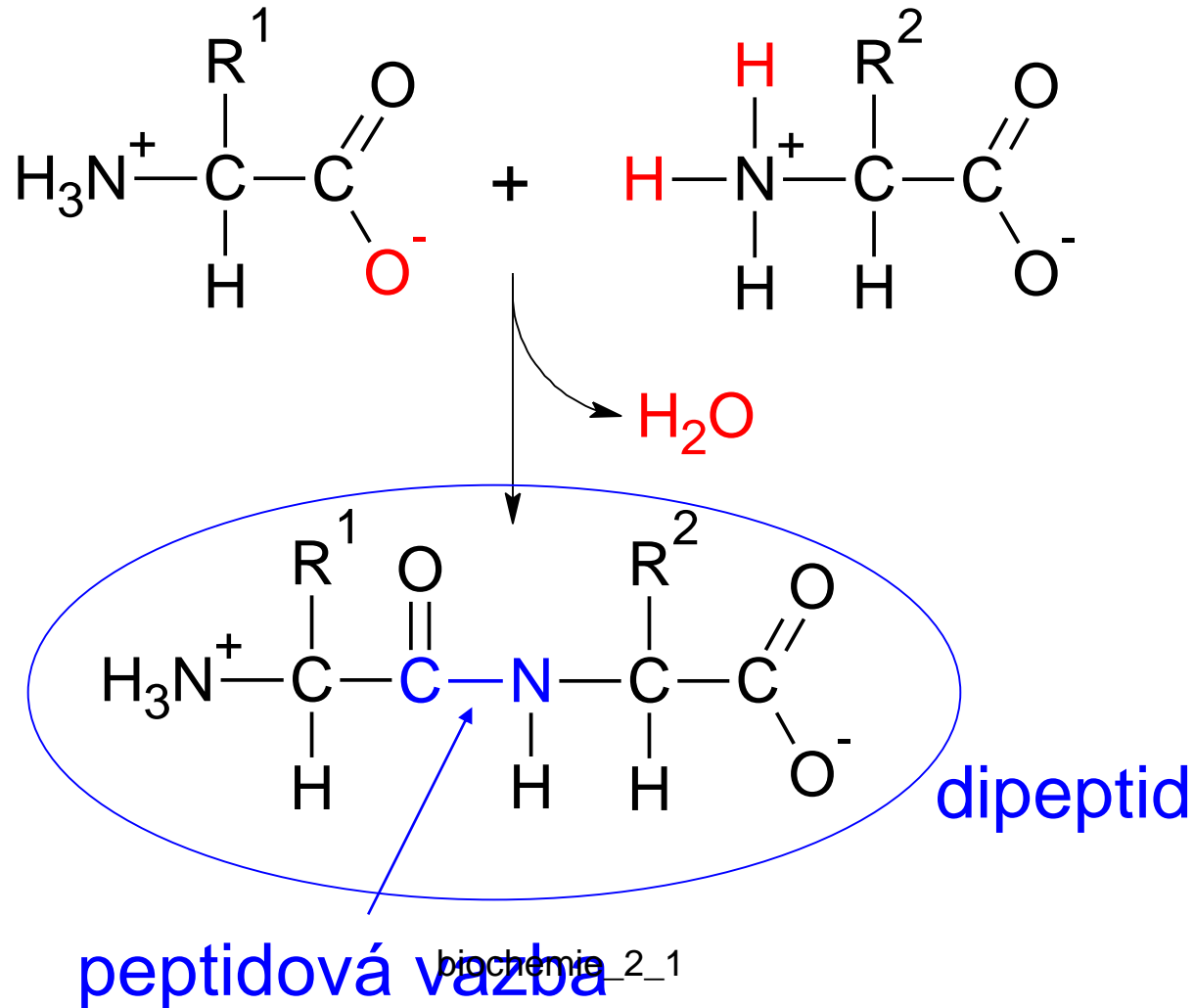


4) Reakce AMK - oxidační deaminace

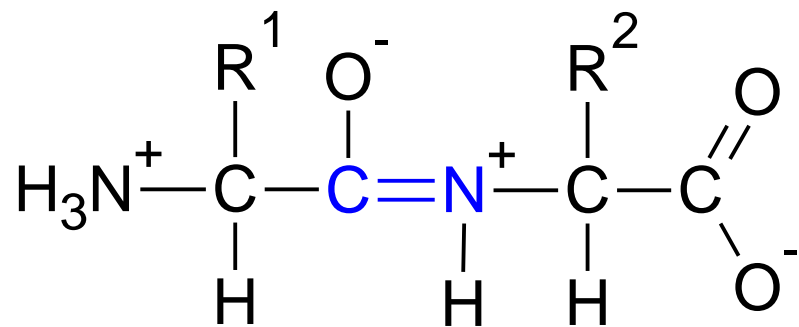
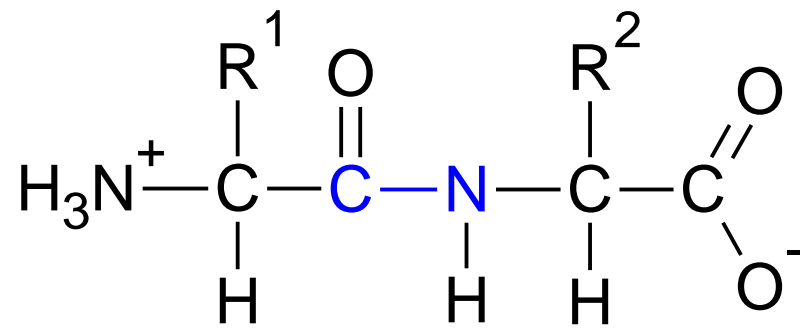
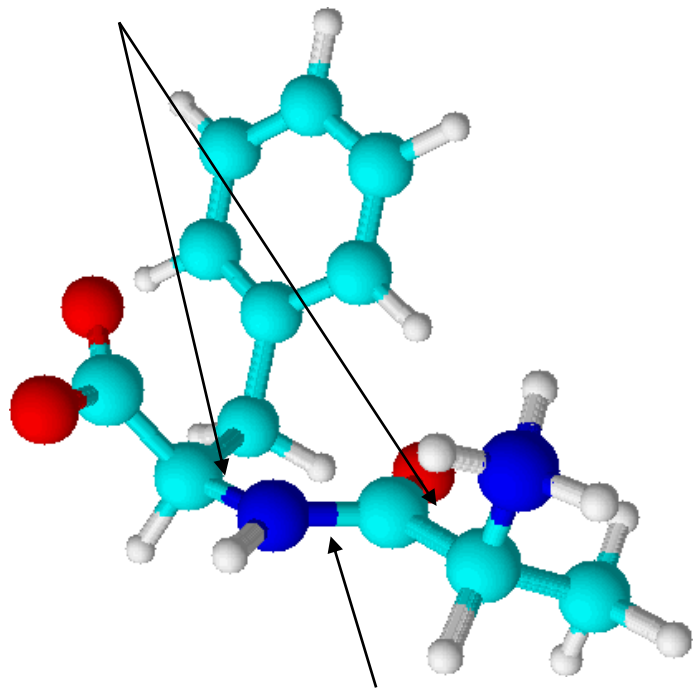
- reakce sloužící při získávání energie z AMK a bílkovin (např. při hladovění)
- úplným odbouráním AMK vzniká oxid uhličitý, voda a amoniak



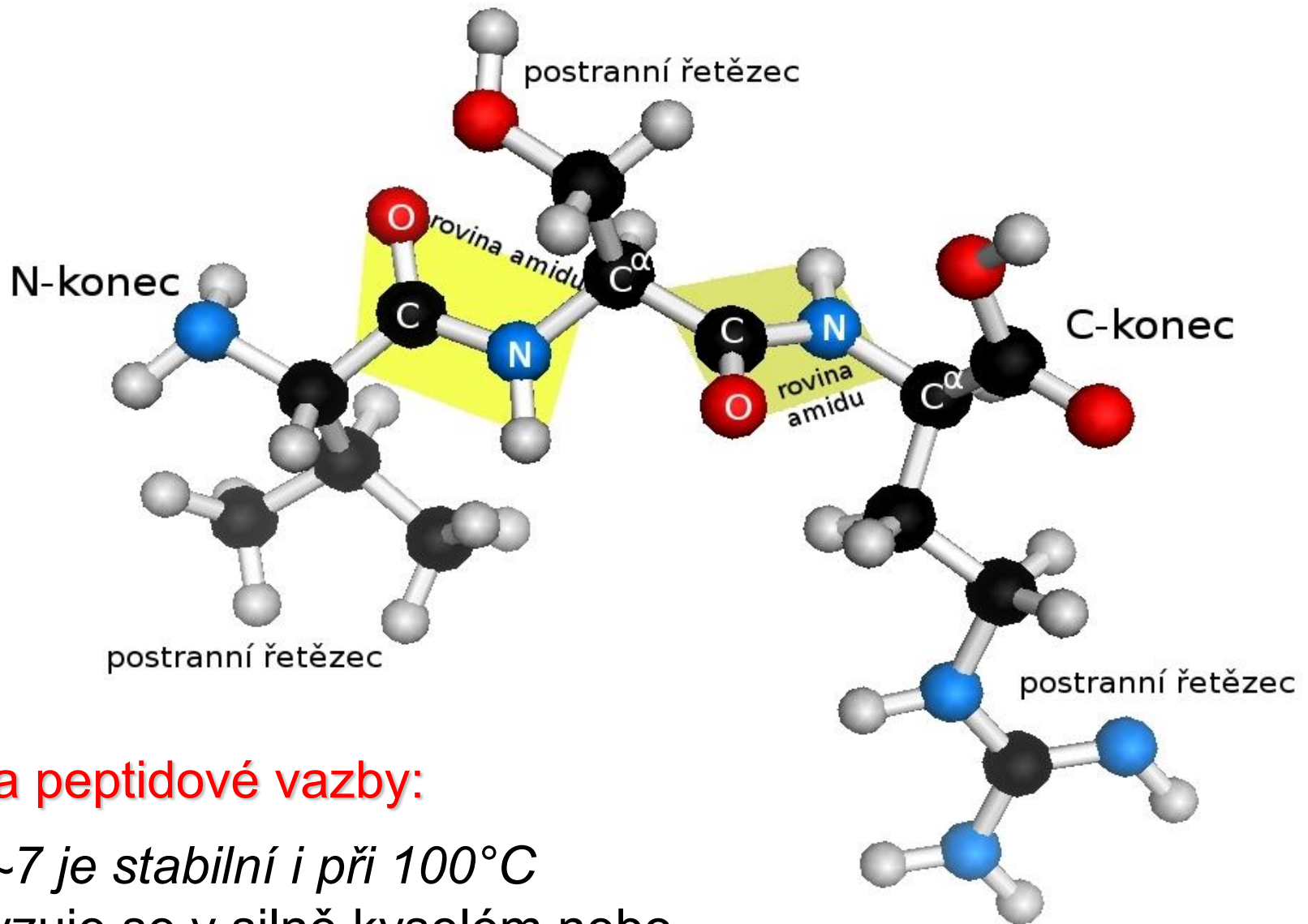
Tvorba proteinů - vznik peptidové vazby



tyto dvě vazby jsou jednoduché, umožňují volnou rotaci atomů, takže dlouhé řetězce aminokyselin jsou vysoce pohyblivé



peptidová vazba je vazbou kovalentní, je **rigidní – vazba C-N má částečně charakter dvojné vazby v důsledku rezonance**, atomy se kolem ní nemohou volně otáčet

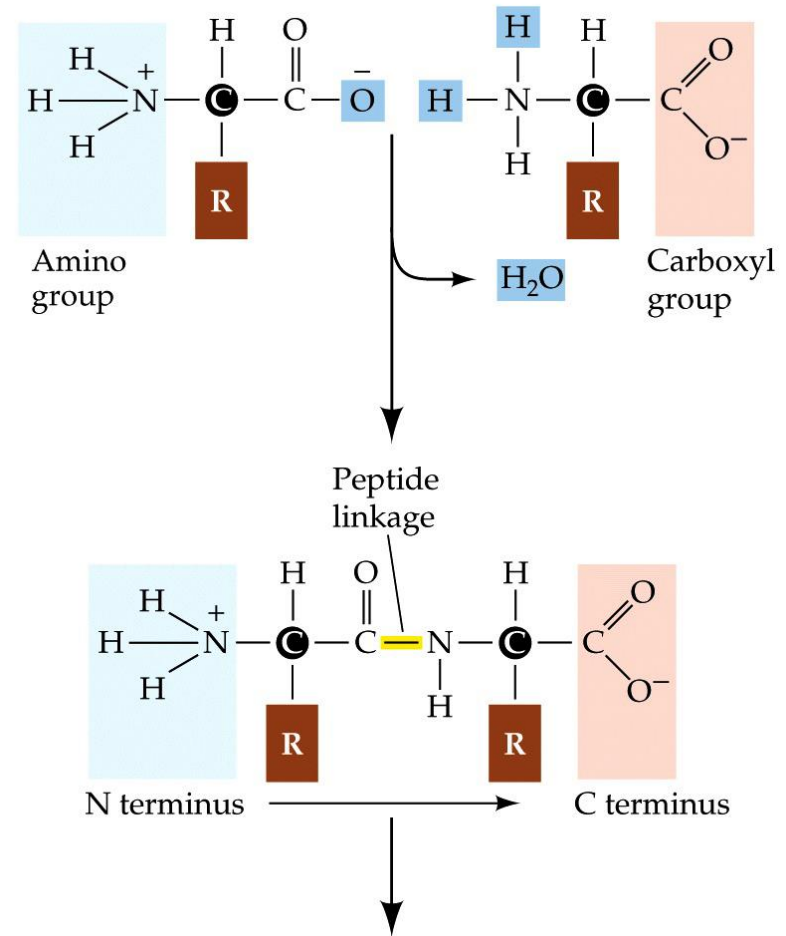


stabilita peptidové vazby:

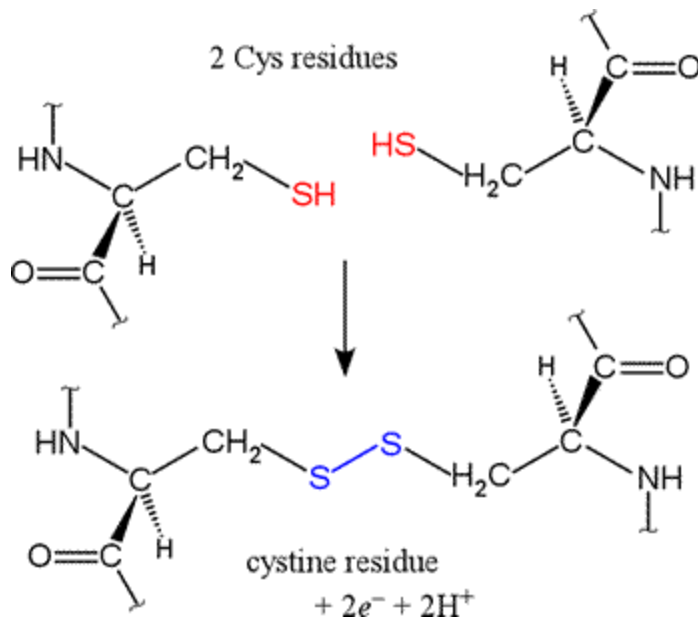
při pH~7 je stabilní i při 100°C
 hydrolyzuje se v silně kyselém nebo
 zásaditém prostředí
 nebo pomocí enzymů

Reakce aminokyselin

- Peptidická vazba
- Disulfidový můstek



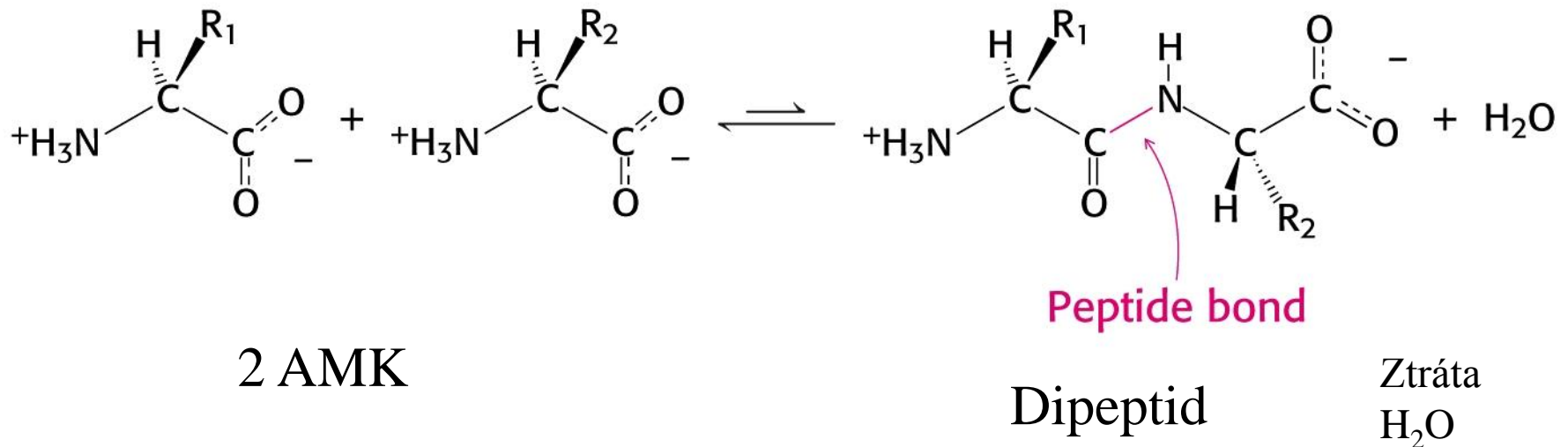
© 2001 Sinauer Associates, Inc.



<http://www.blc.arizona.edu/courses/schaffer/182/PeptideBond-HiRes.JPG>
http://guweb2.gonzaga.edu/faculty/cronk/biochem/images/disulfide_bond_formaton.gif

Primární struktura: Peptidická vazba, mezi AMK

Mezi α -karboxylovou skupinou jedné AMK & α -amino skupinou jiné AMK



Tvorba peptidické vazby kondenzací. Amino skupina jedné AMK (s R2 skupinou) se účastní jako **nukleofil**, aby nahradila hydroxylovou skupinu druhé AMK (s R1 skupinou) za vytvoření peptidické vazby. Amino skupina je dobrý nukleofil, zatímco hydroxylová skupina je slabě odštěpitelná skupina a není tedy ihned nahrazena. Za fyziologického pH se tato reakce nevyskytuje ve značné míře.

Rovnováha upřednostňuje hydrolýzu, a proto biosyntéza peptidových vazeb vyžaduje volný vstup energie

Peptidové vazby jsou kineticky stabilní

Polypeptidické vazby jsou planární

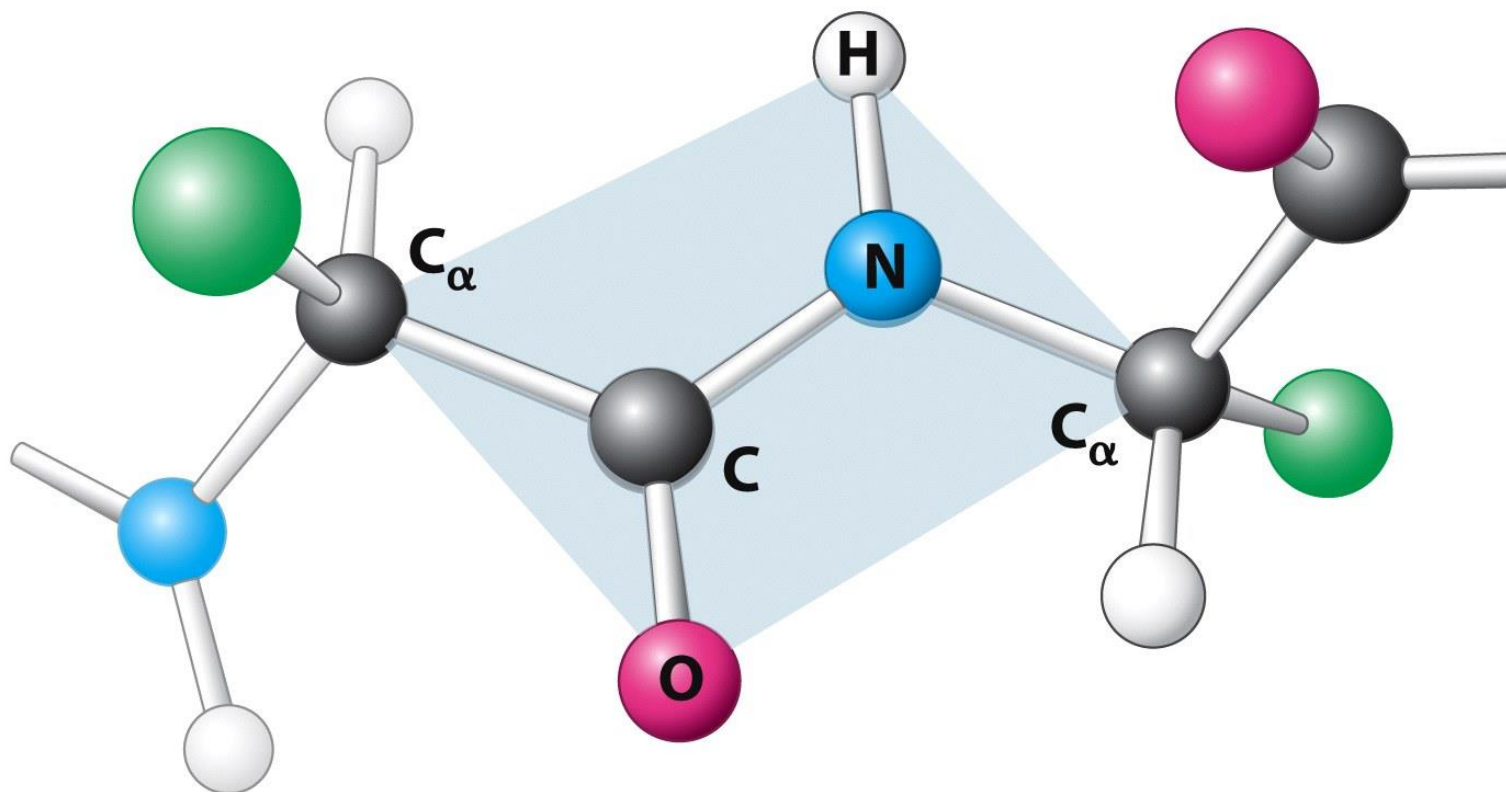
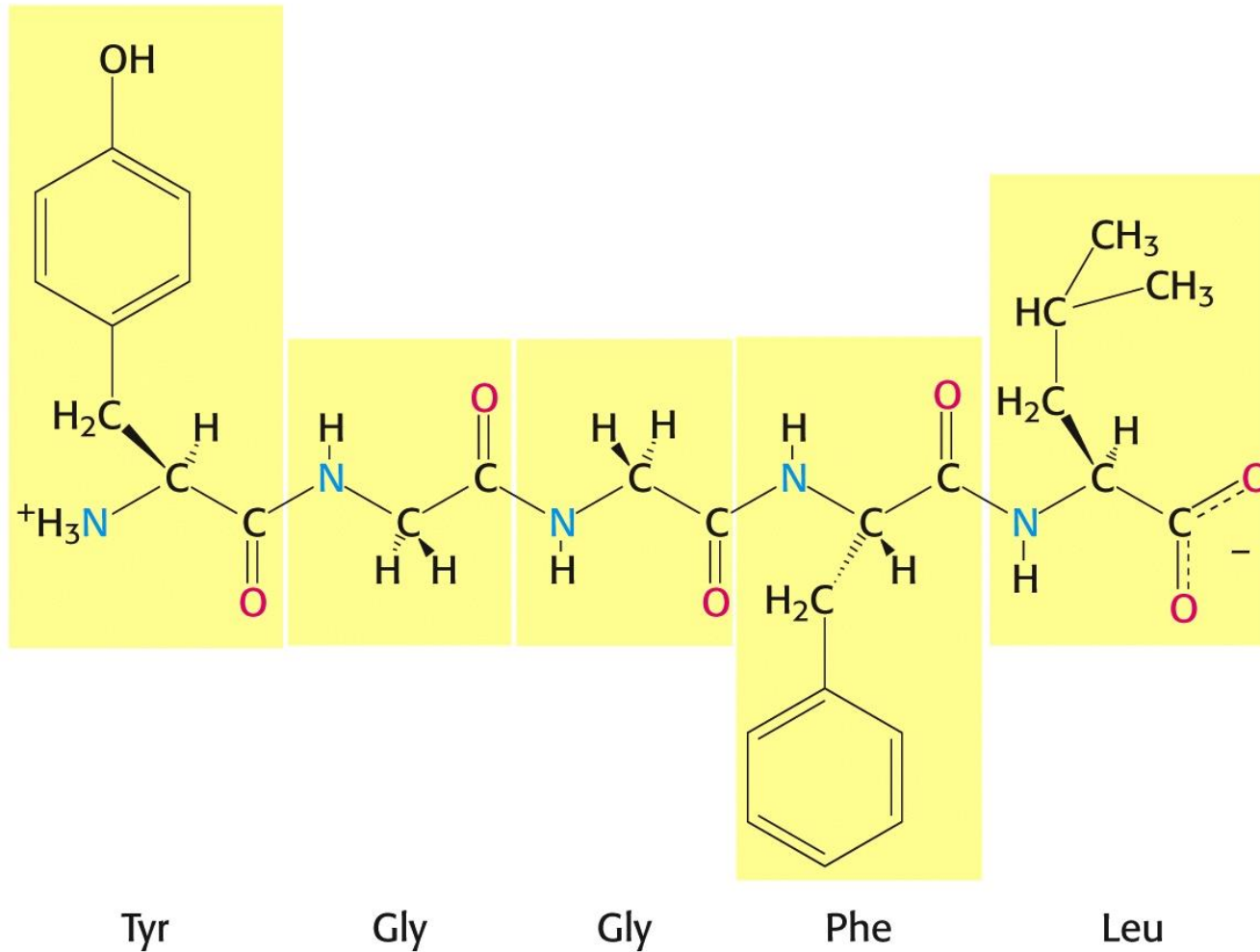


Figure 2.18
Biochemistry, Seventh Edition
© 2012 W. H. Freeman and Company

http://oregonstate.edu/instruct/bb450/spring14/stryer7/2/figure_02_18.jpg

Šest atomů (C_{α} , C, O, N, H, C_{α}) leží v rovině, mezi jedním párem AMK

Polypeptidový řetězec je orientovaný



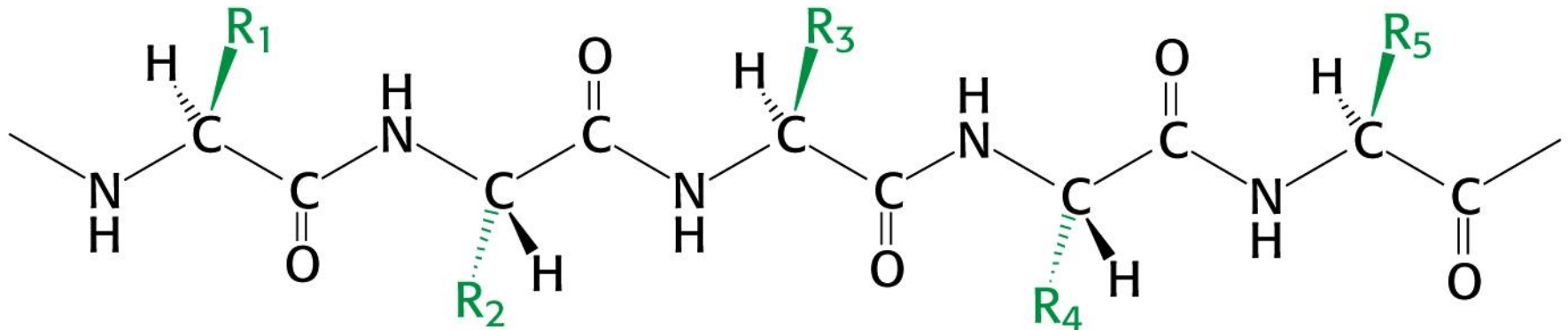
Amino
terminal residue

Carboxyl
terminal residue

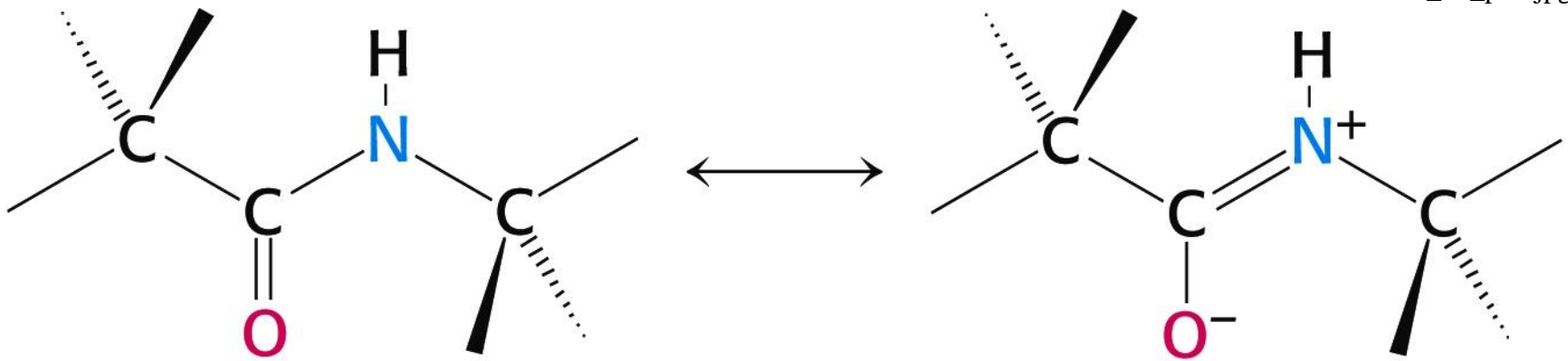
Hlavní řetězec neboli páteř

Konstantní hlavní řetězec: pravidelně se opakující část

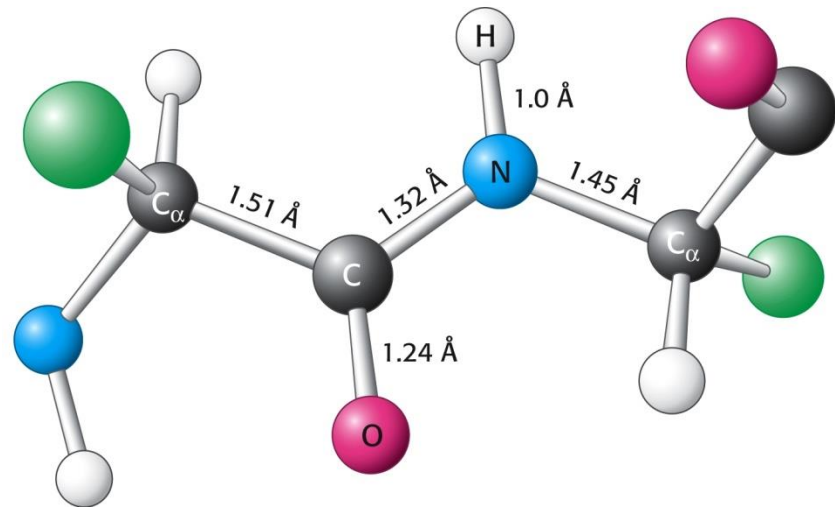
Rozdílný postranní řetězec (R-skupiny): variabilní část



AMK jednotky v polypeptidu se nazývají zbytky, které obsahují
Karbonylovou skupinu; dobrý akceptor vodíkové vazby,
Amino skupinu(kromě Pro); dobrý donor vodíkové vazby



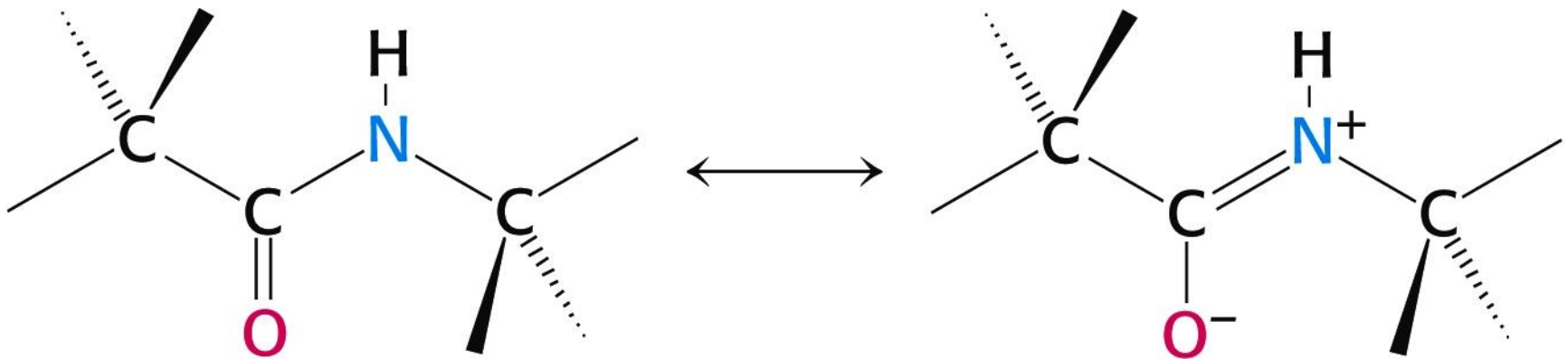
Peptide bond resonance structures



Délka vazeb v peptidové vazbě

Peptidová vazba: charakter dvojně vazby

Zabraňuje rotaci kolem vazby



Peptide bond resonance structures

Délka vazby:

C-N peptid = 1.32 Å

C-N jednoduchá = 1.49 Å

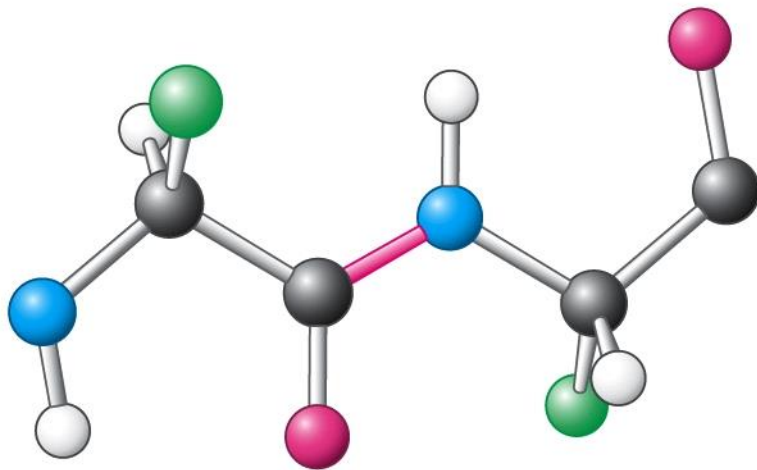
C-N dvojná = 1.27 Å

Možné dvě (cis & trans)

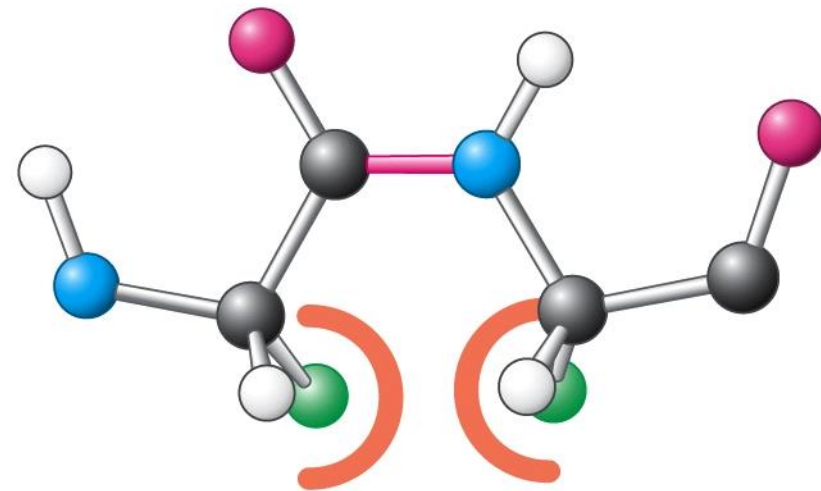
konfigurace. Vyskytuje se pouze **trans**

Trans & cis peptidy

Cis konfigurace má stérickou překážku; trans silně preferovaná



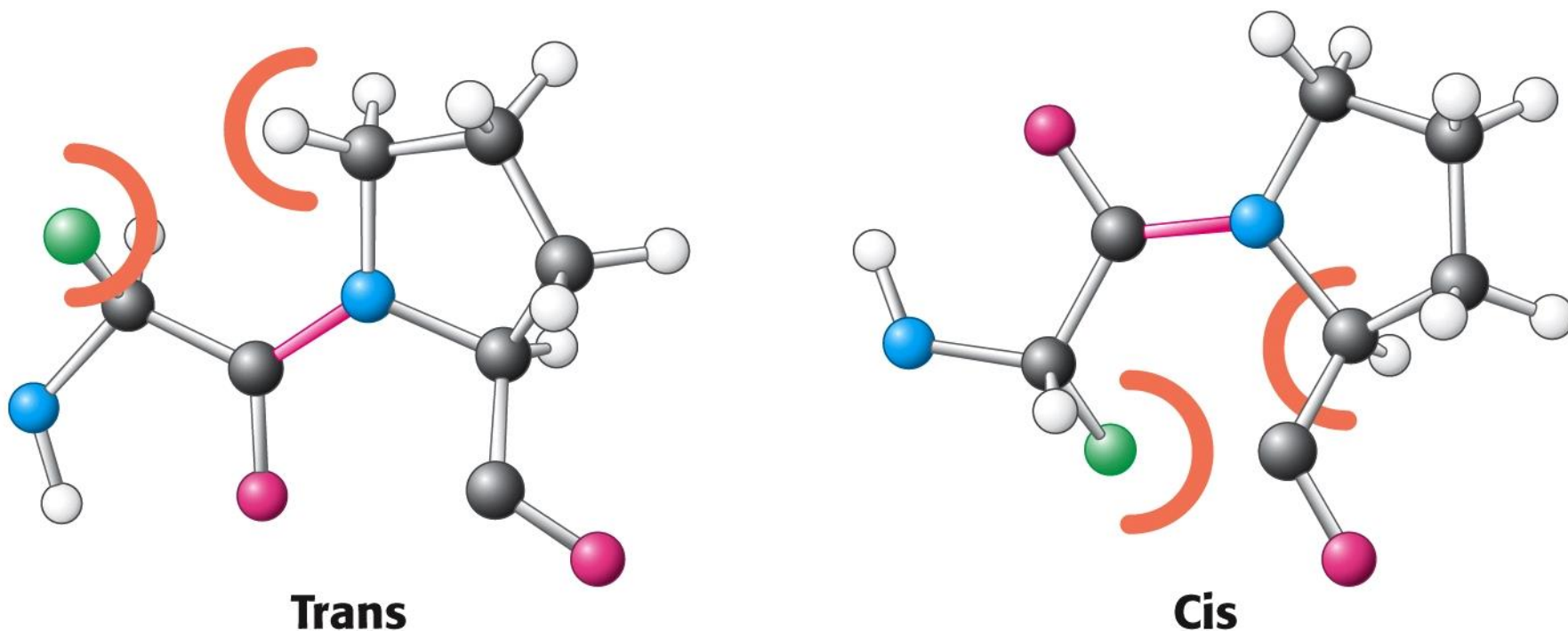
Trans



Cis

Trans & cis X-Pro

N prolinu je vázán na dva tetraedrické C:
Stérická překážka v obou formách, nižší preference pro trans



Rotace vazeb v polypeptidu

Amino skupina C_α & karbonylová skupina C_α jsou čisté jednoduché vazby, Umožňují rotaci

Volnost v rotaci umožňuje proteinu sbalení v různých formách

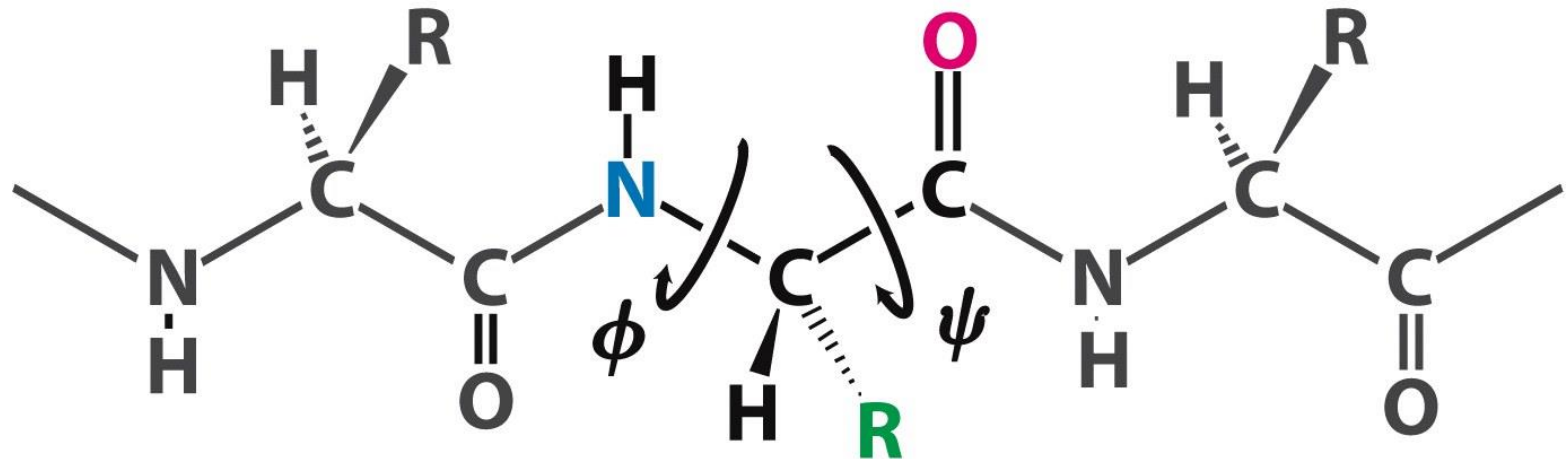
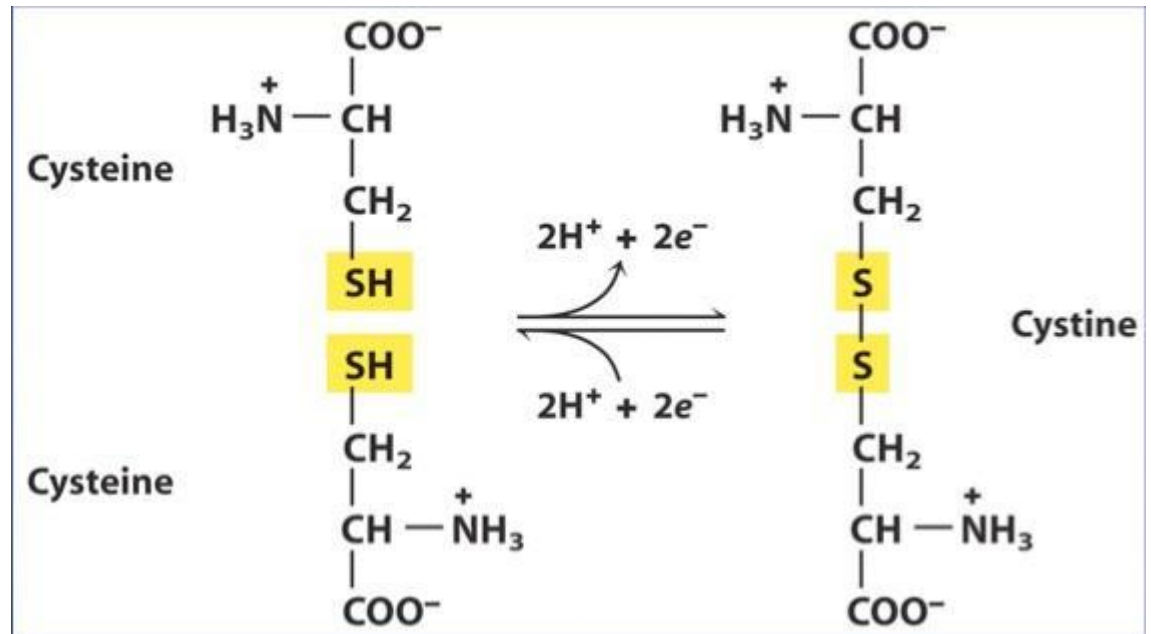


Figure 2.22a
Biochemistry, Seventh Edition
© 2012 W. H. Freeman and Company

Úhel vzpětí: měření rotace mezi -180° & $+180^\circ$

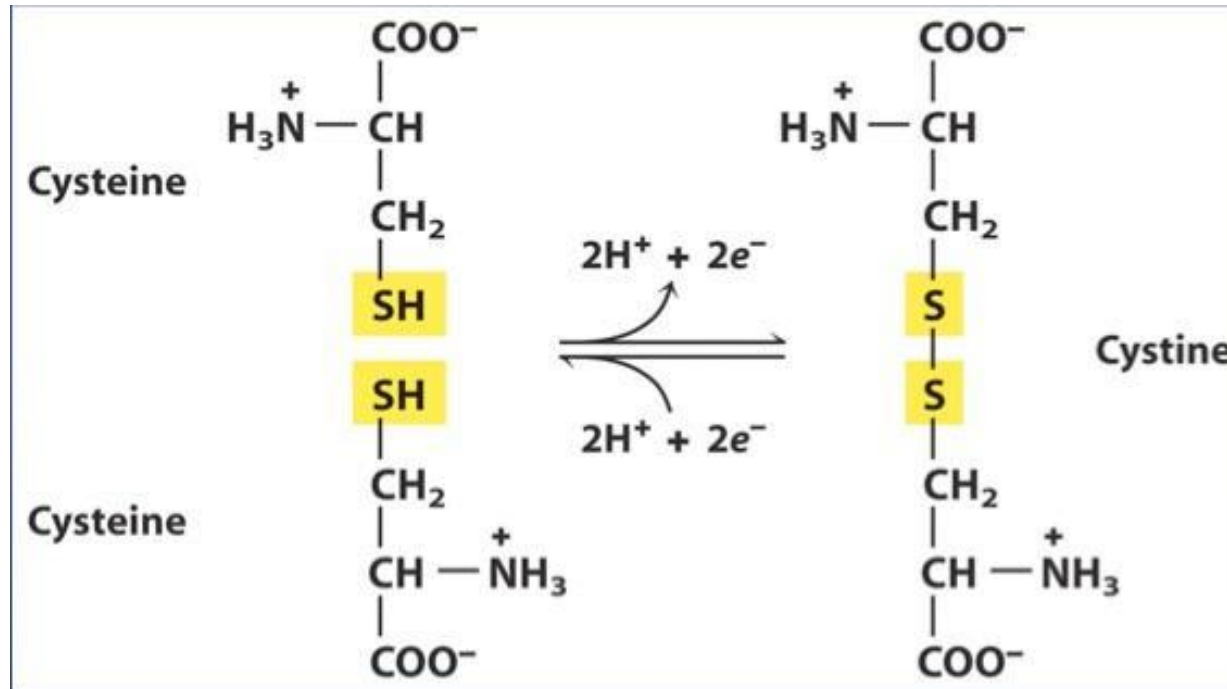
Oxidace cysteinu

- Vysoce reaktivní SH- (thiolová skupina cysteinu)
- reverzibilní oxidace – vznik disulfidu
- CYSTIN (disulfid) –
- DISULFIDICKÝ MŮSTEK**
- jeden řetězec, 2 separované řetězce
- V proteinech: stabilita



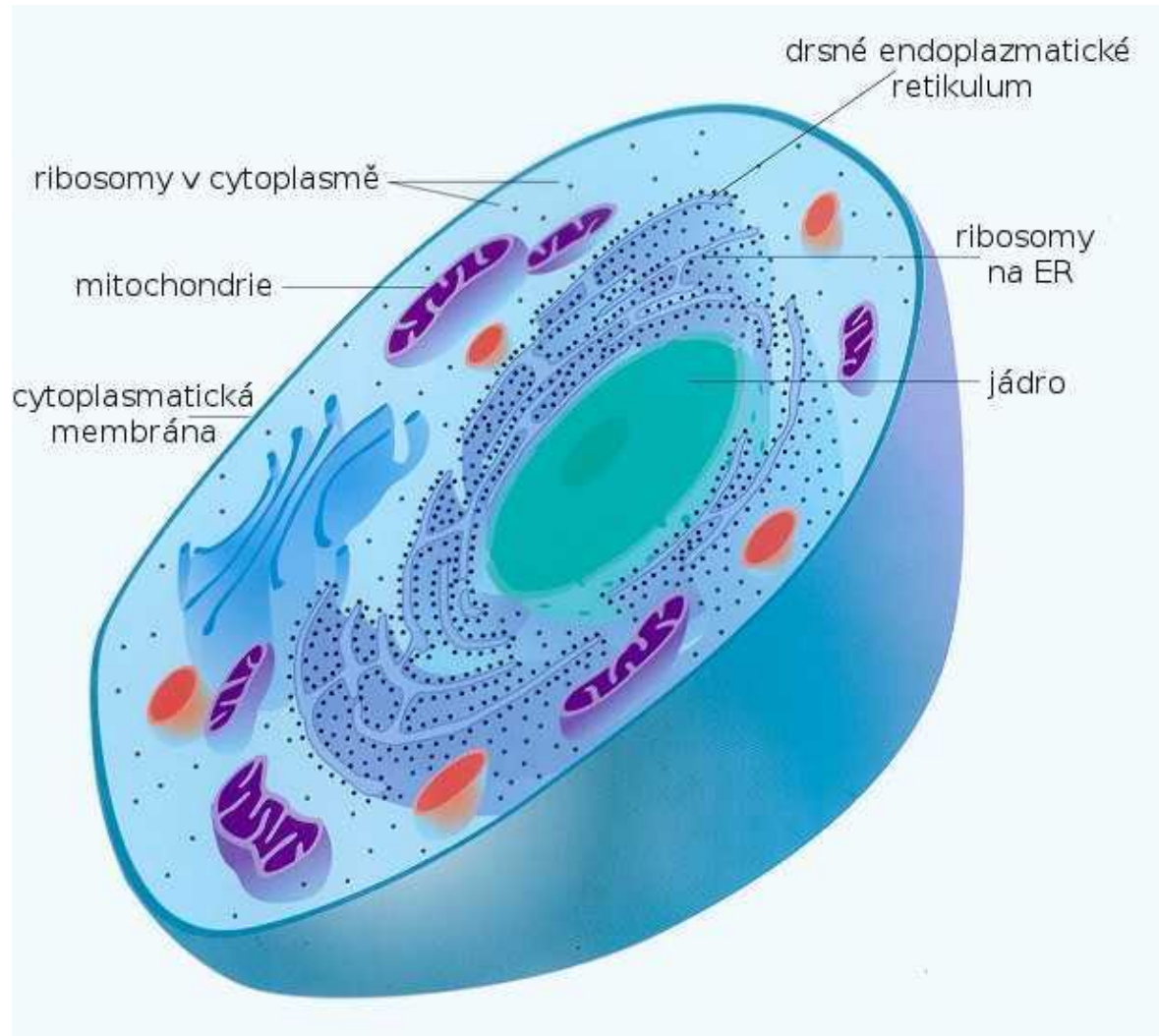
Cross link (disulfidické můstky)

Vyskytují se hlavně v extracelulárních proteinech



Peptidy a proteiny

- v těle vznikají proteosyntézou v cytoplasmě buněk
- proteosyntéza probíhá na ribozomech
- 2 – 50 AK: peptid
- > 50 AK: protein (bílkovina)



Názvosloví peptidů

- pořadí aminokyselin (=jejich **sekvenci**)
čteme od N konce k C konci
- k názvu aminokyselin přidáme koncovku –yl
- např.: **Tyrozylalanyl**cystein
- $\text{H}_2\text{N-Tyr-Ala-Cys-COOH}$
- většina peptidů a proteinů mají triviální názvy
(glutathion, hemoglobin, kolagen)

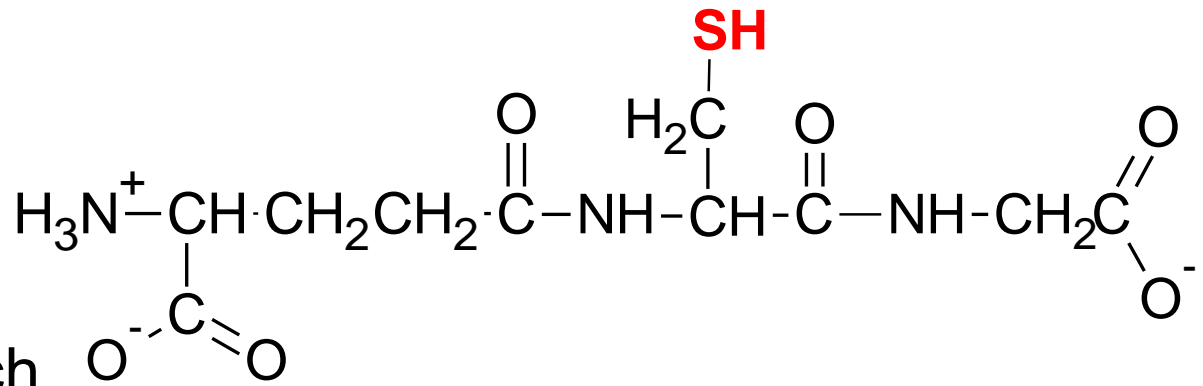


Některé významné peptidy v našem těle

některé hormony: **oxytocin, vazopresin, glukagon, ...**

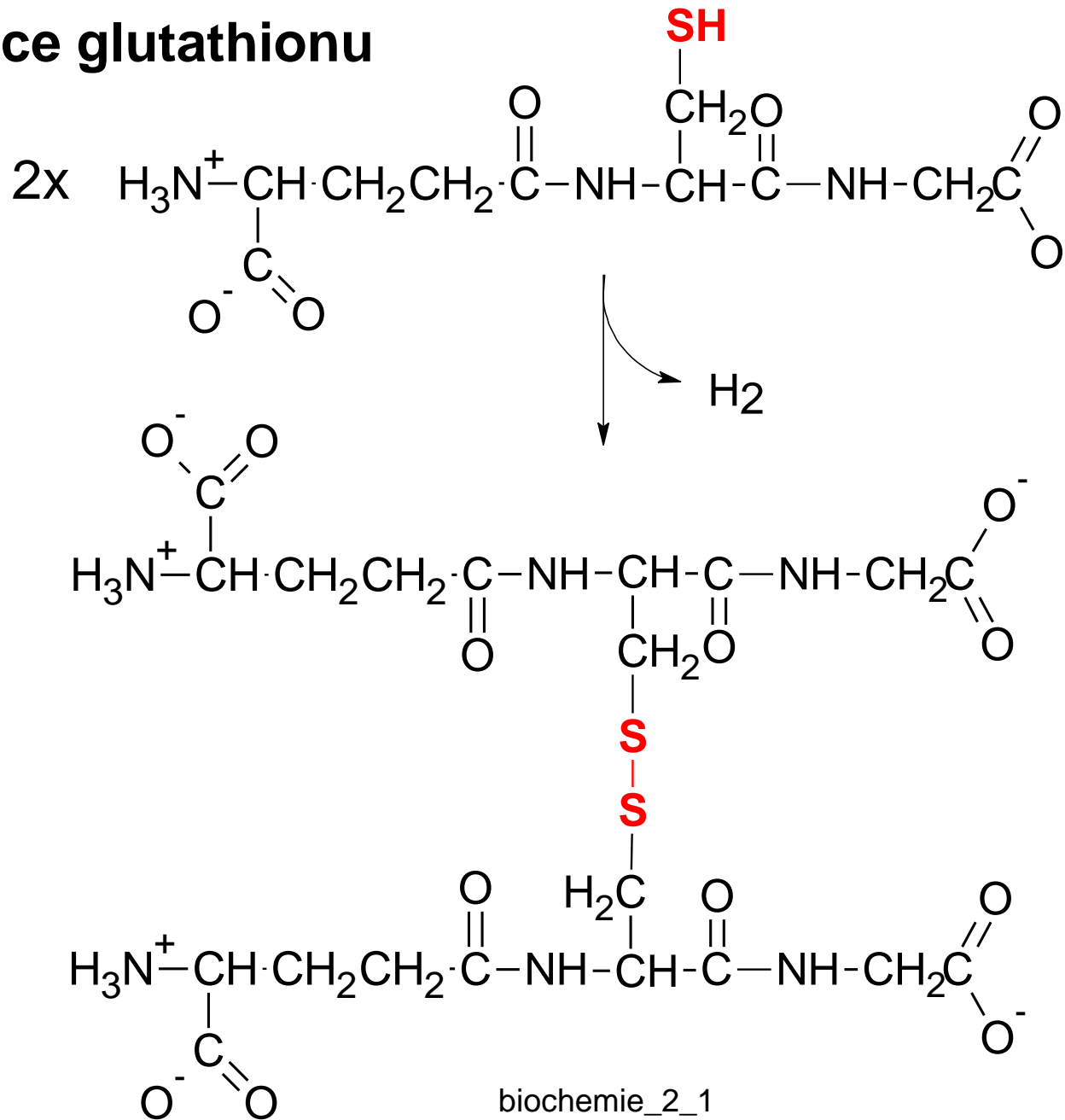
také některé jedy a mnoho dalších významných látek

glutathion –
tripeptid, v těle
působí proti
oxidativnímu stresu
tvorbou disulfidových
můstků



Umělá příprava polypeptidů by mohla vést k získání bezpečných vakcín.

Oxidace glutathionu

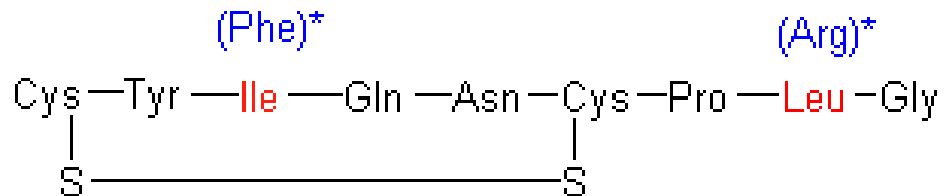
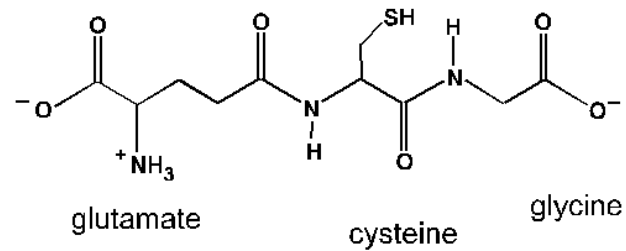


Peptidy

- Peptidická vazba, výrazná reaktivita
- Výrazná biologická aktivita

- Glutathion
- Oxytocin
- Vasopresin
- Enkefaliny a endorfiny
- Atriální natriuretický faktor
- Substance P
- Bradykinin

glutathione (GSH)



oxytocin - stahy hladkého svalstva

vasopresin - řídí metabolismus vody

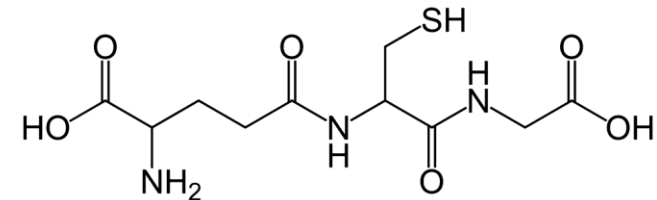
■ Glutathion –

■ (g-glutamyl-L-cysteinylglycine)

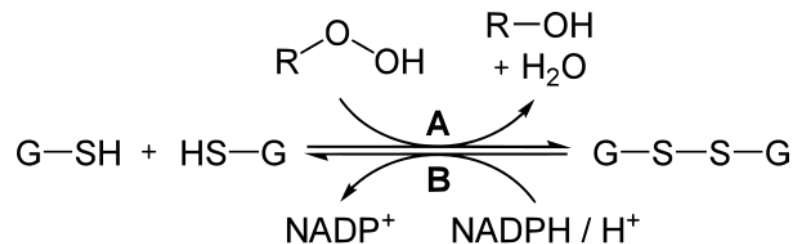
(g-amidová vazba, g-karboxy skupina se účastní na peptidické vazbě)

Funkce:

- Syntéza proteinů a DNA,
Metabolismus xenobiotik (léčiva, toxiny),
transport AMK



- Redukční činidlo
- Chrání buňky před oxidativním poškozením
- GSH/GSSG je běžně přítomen v buňkách ve vysoké koncentraci
- Významné intracelulární redukční činidlo
- *Glutathion peroxidáza*



(methemoglobin)

<http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/7/7e/Glutathione-skeletal.png>

<http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/0/0d/Gl>

Peptidické hormony

• **Hormony obratlovců:** mnoho malých peptidů vykazuje svůj účinek při velmi nízkých koncentracích.

• Hypotalamus:

Oxytocin (9 AMK zbytků) sekretován ze zadního laloku hypofýzy a stimuluje kontrakce dělohy

Vasopresin

bradykinin (9 zbytků) brání zánětu tkání

thyrotropin-releasing factor (3 zbytky) tvořen v hypotalamu a atimuluje uvolnění dalšího hormonu; thyreotropinuz předního laloku hypofýzy.

Copyright © The McGraw-Hill Companies, Inc. Permission required for reproduction or display

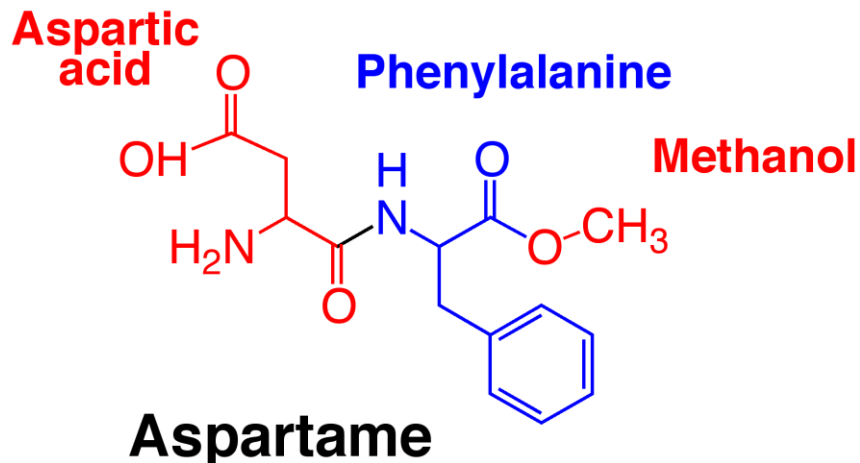
Table 11.2 | Examples of Polypeptide and Glycoprotein Hormones

Hormone	Structure	Gland	Primary Effects
Antidiuretic hormone	8 amino acids	Posterior pituitary	Water retention and vasoconstriction
Oxytocin	8 amino acids	Posterior pituitary	Uterine and mammary contraction
Insulin	21 and 30 amino acids (double chain)	Beta cells in islets of Langerhans	Cellular glucose uptake, lipogenesis, and glycogenesis
Glucagon	29 amino acids	Alpha cells in islets of Langerhans	Hydrolysis of stored glycogen and fat
ACTH	39 amino acids	Anterior pituitary	Stimulation of adrenal cortex
Parathyroid hormone	84 amino acids	Parathyroid	Increase in blood Ca ²⁺ concentration
FSH, LH, TSH	Glycoproteins	Anterior pituitary	Stimulation of growth, development, and secretory activity of target glands

Peptidy

■ Aspartam

L-aspartyl-L-phenylalanine methyl ester, umělé sladidlo známé jako aspartam nebo NutraSweet.



Mapa aminokyselin

TEST

Bazické



Arg **R**

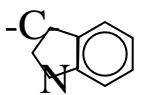
Lys **K**

His **H**

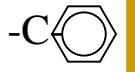


Aromatické

Trp **W**



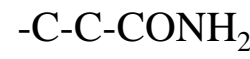
Tyr **Y**



Phe **F**



Asn **N**



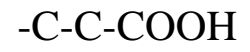
Gln **Q**

Amidy

Asp **D**



Glu **E**



Kyseliny

Alifatické

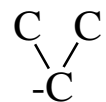
Gly **G**



Ala **A**



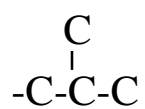
Val **V**



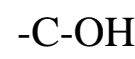
Ile **I**



Leu **L**



Ser **S**



Cys **C**



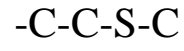
South line

Circular line

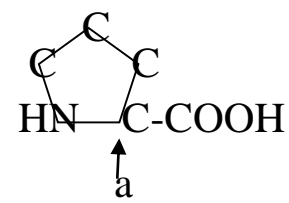
Thr **T**



Met **M**



Pro **P**



Nepolárn

Polární

Hydroxy

Síra

Imino, Cyklické

Toto není metabolická dráha

Klasifikace AMK podle polarity

TEST

	Acidic	Neutral	Basic
POLÁRNÍ	Asp	Asn Ser	Arg
	Tyr	Cys	His
	Glu	Gln Thr	Lys
NEPOLÁRNÍ	Ala	Ile	Phe Trp
	Val	Leu Met	Pro
		Gly	

Polarita je základní vlastností AMK.

Struktura a funkce proteinů

Proteiny jsou nejvšestrannějšími makromolekulami v živých systémech a mají klíčové funkce v podstatě ve všech biologických procesech

1 Proteiny se skládají z 20 AMK

2 Primární struktura: aminokyseliny spojené peptidovou vazbou tvoří polypeptidový řetězec

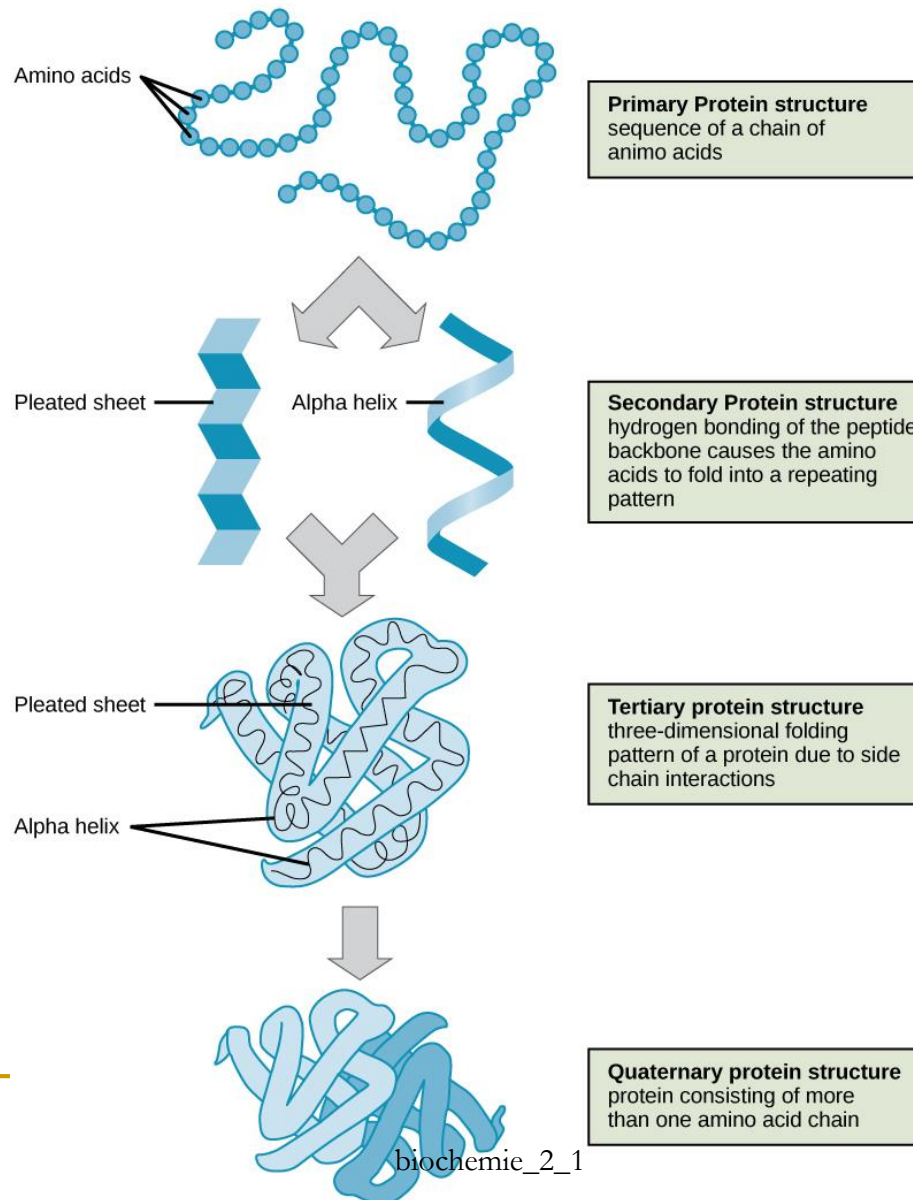
3 Sekundární struktura: polypeptidové řetězce se sbalují do pravidelných struktur jako alfa helix, beta list, & obraty & smyčky

4 Terciární struktura: ve vodě rozpustné proteiny se sbalují do kompaktních struktur s nepolárním jádrem

5 Kvartérní struktura: polypeptidové řetězce se mohou seskupovat do více jednotkových struktur

6 Sekvence aminokyselin v proteinu určuje jeho trojrozměrnou strukturu

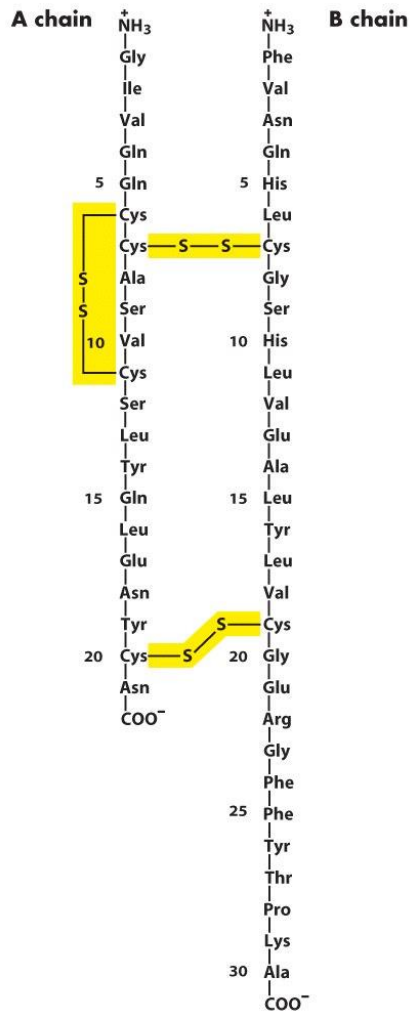
Struktura proteinů na různých úrovních



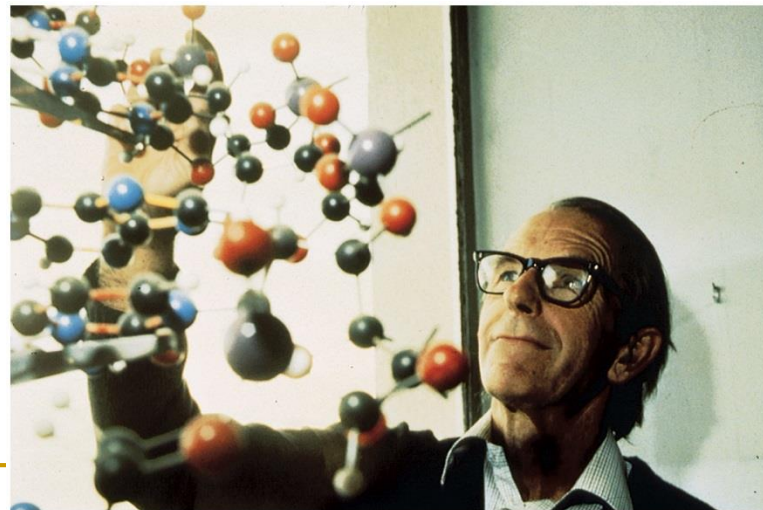
Proteiny – Klíčové vlastnosti- široký rozsah funkcí

- 1. Proteiny jsou lineární polymery sestavené z monomerních jednotek aminokyselin – spontánně složeny do prostorových struktur**
- 2. Proteiny obsahují velké množství funkčních skupin- alkoholy, thioly, thioethery, karboxylové kyseliny, karboamidy, a další základní skupiny - např. chemická reaktivita nezbytná pro funkci *proteinů***
- 3. Proteiny mohou interagovat spolu navzájem, s dalšími biologickými makromolekulami za vzniku komplexních struktur**
- 4. Některé proteiny jsou rigidní, zatímco ostatní vykazují určitou flexibilitu- structuralní elementy v cytoskeletu**

Primární struktura hovězího insulinu



First protein to be fully sequenced (by Fred Sanger in 1953). For this, he won his first Nobel Prize (his second was for the Sanger dideoxy method of DNA sequencing).

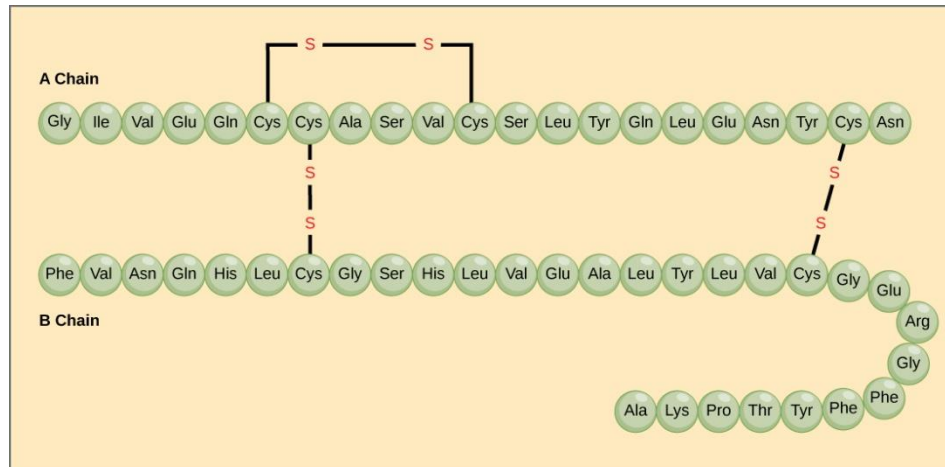


Bovinní insulin: AMK sekvence

1953, Fred Sanger stanovil sekvenci inzulinu, mezník!

Ukázáno vůbec poprvé, že protein má přesně definovanou sekvenci
Také dokázáno, že jsou přítomny pouze L-aminokyseliny spojené
peptidickou vazbou

Nyní je známa AMK sekvence > 100,000 proteinů



1950-1960 léta: studie rovněž dokázaly genetické ovlivnění
sekvence

Každá z 20 AMK je kódována jednou nebo více specifickými
sekvencemi 3 nukleotidů.

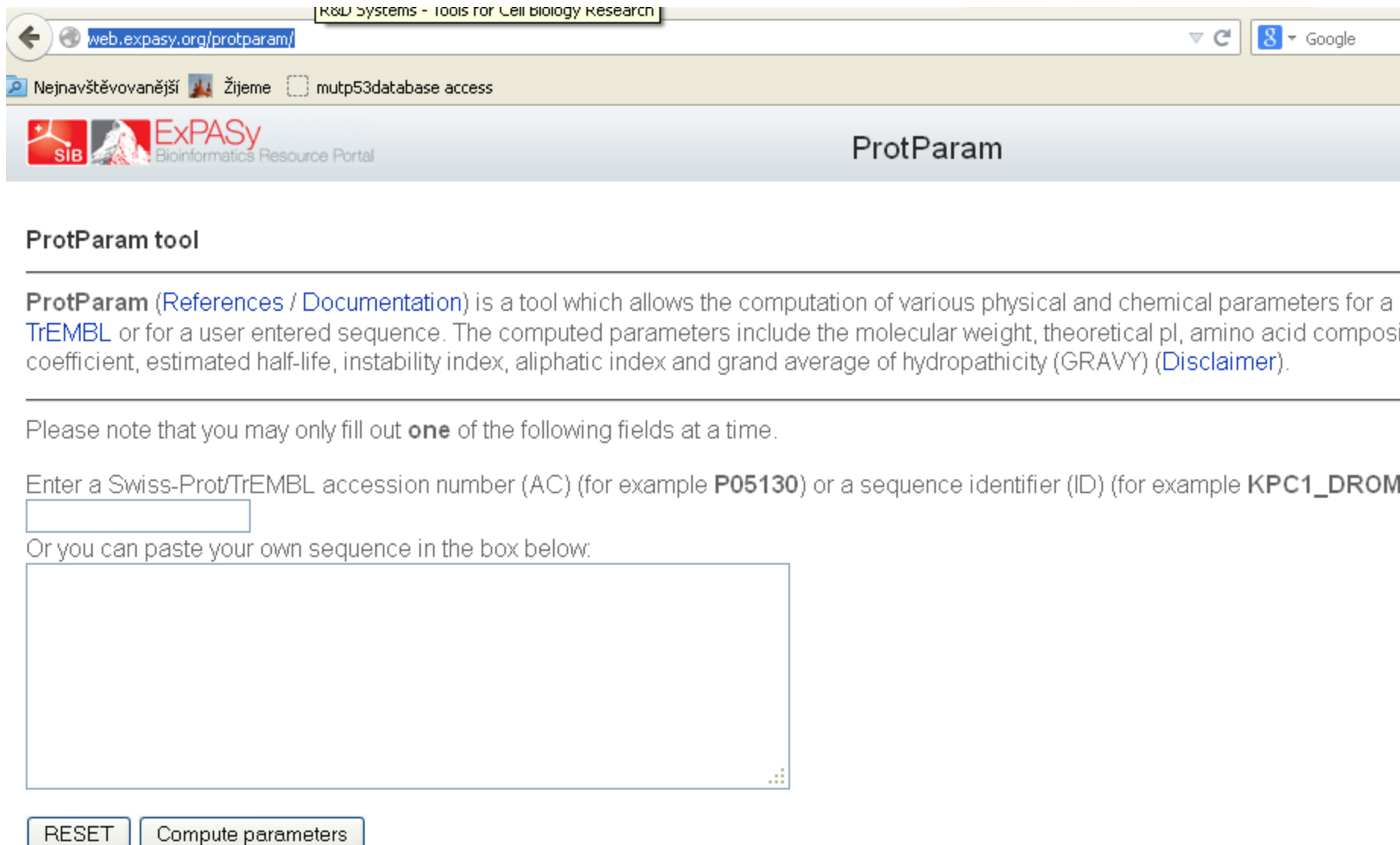
Molekulární údaje o některých proteinech

TABLE 3-2 Molecular Data on Some Proteins

	<i>Molecular weight</i>	<i>Number of residues</i>	<i>Number of polypeptide chains</i>
Cytochrome c (human)	13,000	104	1
Ribonuclease A (bovine pancreas)	13,700	124	1
Lysozyme (chicken egg white)	13,930	129	1
Myoglobin (equine heart)	16,890	153	1
Chymotrypsin (bovine pancreas)	21,600	241	3
Chymotrypsinogen (bovine)	22,000	245	1
Hemoglobin (human)	64,500	574	4
Serum albumin (human)	68,500	609	1
Hexokinase (yeast)	102,000	972	2
RNA polymerase (<i>E. coli</i>)	450,000	4,158	5
Apolipoprotein B (human)	513,000	4,536	1
Glutamine synthetase (<i>E. coli</i>)	619,000	5,628	12
Titin (human)	2,993,000	26,926	1

Proteinové databaze

- <http://web.expasy.org/protparam/>



The screenshot shows a web browser window with the URL web.expasy.org/protparam/. The browser's address bar also shows "R&D Systems - Tools for Cell Biology Research". The page header includes the Expasy logo (SIB Bioinformatics Resource Portal) and the title "ProtParam".

ProtParam tool

ProtParam ([References](#) / [Documentation](#)) is a tool which allows the computation of various physical and chemical parameters for a given protein sequence from a [TrEMBL](#) or for a user entered sequence. The computed parameters include the molecular weight, theoretical pI, amino acid composition, hydropathy coefficient, estimated half-life, instability index, aliphatic index and grand average of hydropathicity (GRAVY) ([Disclaimer](#)).

Please note that you may only fill out **one** of the following fields at a time.

Enter a Swiss-Prot/TrEMBL accession number (AC) (for example **P05130**) or a sequence identifier (ID) (for example **KPC1_DROM**)

Or you can paste your own sequence in the box below:

TABLE 3-3 Amino Acid Composition of Two Proteins

Amino acid	Number of residues per molecule of protein*	
	Bovine cytochrome c	Bovine chymotrypsinogen
Ala	6	22
Arg	2	4
Asn	5	15
Asp	3	8
Cys	2	10
Gln	3	10
Glu	9	5
Gly	14	23
His	3	2
Ile	6	10
Leu	6	19
Lys	18	14
Met	2	2
Phe	4	6
Pro	4	9
Ser	1	28
Thr	8	23
Trp	1	8
Tyr	4	4
Val	3	23
Total	104	245

*In some common analyses, such as acid hydrolysis, Asp and Asn are not readily distinguished from each other and are together designated Asx (or B). Similarly, when Glu and Gln cannot be distinguished, they are together designated Glx (or Z). In addition, Trp is destroyed. Additional procedures must be employed to obtain an accurate assessment of complete amino acid content.

TABLE 3-4 Conjugated Proteins

<i>Class</i>	<i>Prosthetic group</i>	<i>Example</i>
Lipoproteins	Lipids	β_1 -Lipoprotein of blood
Glycoproteins	Carbohydrates	Immunoglobulin G
Phosphoproteins	Phosphate groups	Casein of milk
Hemoproteins	Heme (iron porphyrin)	Hemoglobin
Flavoproteins	Flavin nucleotides	Succinate dehydrogenase
Metalloproteins	Iron	Ferritin
	Zinc	Alcohol dehydrogenase
	Calcium	Calmodulin
	Molybdenum	Dinitrogenase
	Copper	Plastocyanin

Evolve a conserve proteinové sekvence

Key:

- Identical amino acids
- Conservative substitutions
- Nonconservative substitutions

			Signature sequence	
Archaeobacteria	<i>Halobacterium halobium</i>	IGHVDHGKSTMVGR	LLYETGSVPEHV	IEQH
	<i>Sulfolobus solfataricus</i>	IGHVDHGKSTLVGR	LLMDRGFIDEKT	IVKEA
Eukaryotes	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	IGHVDSGKSTTTGHL	IYKCGGIDKRT	IEKF
	<i>Homo sapiens</i>	IGHVDSGKSTTTGHL	IYKCGGIDKRT	IEKF
Gram-positive bacterium	<i>Bacillus subtilis</i>	IGHVDHGKSTMVGR		ITTV
Gram-negative bacterium	<i>Escherichia coli</i>	IGHVDHGKSTLTAA		ITTV

Translation elongation factor Tu/1 α

Number	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15			
Human	G	L	S	D	G	E	W	Q	L	V	L	N	V	W	G			
Whale	V	L	S	E	G	E	W	Q	L	V	L	H	V	W	A			
Number	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30			
Human	K	V	E	A	D	I	P	G	H	G	Q	E	V	L	I			
Whale	K	V	E	A	D	V	A	G	H	G	Q	D	I	L	I			
Number	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45			
Human	R	L	F	K	G	H	P	E	T	L	E	K	F	D	K			
Whale	R	L	F	K	S	H	P	E	T	L	E	K	F	D	R			
Number	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60			
Human	F	K	H	L	K	S	E	D	E	M	K	A	S	E	D			
Whale	F	K	H	L	K	T	E	A	E	M	K	A	S	E	D			
Number	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75			
Human	L	K	K	H	G	A	T	V	L	T	A	L	G	G	I			
Whale	L	K	K	H	G	V	T	V	L	T	A	L	G	A	I			
Number	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90			
Human	L	K	K	K	G	H	H	E	A	E	I	K	P	L	A			
Whale	L	K	K	K	G	H	H	E	A	E	L	K	P	L	A			
Number	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105			
Human	Q	S	H	A	T	K	H	K	I	P	V	K	Y	L	E			
Whale	Q	S	H	A	T	K	H	K	I	P	I	K	Y	L	E			
Number	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120			
Human	F	I	S	E	C	I	I	Q	V	L	Q	S	K	H	P			
Whale	F	I	S	E	A	I	I	H	V	L	H	S	R	H	P			
Number	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135			
Human	G	D	F	G	A	D	A	Q	G	A	M	N	K	A	L			
Whale	G	N	F	G	A	D	A	Q	G	A	M	N	K	A	L			
Number	136	137	138	139	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150	151	152	153
Human	E	L	F	R	K	D	M	A	S	N	Y	K	E	L	G	F	Q	G
Whale	E	L	F	R	K	D	I	A	A	K	Y	K	E	L	G	Y	Q	G

Copyright© 2000 Benjamin/Cummings, an imprint of Addison Wesley Longman, Inc.

Myoglobin

Genetický kód

		Second position						
		U	C	A	G			
U	UUU	Phe	UCU	UAU	UGU	U		
	UUC					Ser	UAC	UGC
	UUA	Leu	UCA	UAA	Stop			
	UUG			UAG	Stop	UGG	Trp	G
C	CUU	Leu	CCU	CAU	CGU	U		
	CUC					Pro	CAC	CGC
	CUA	Gln	CAA	CGA	A			
	CUG				CAG	CGG	G	
A	AUU	Ile	ACU	AAU	AGU	U		
	AUC					Thr	AAC	AGC
	AUA	Lys	AAA	AGA	A			
	AUG Met/start				ACG	AAG	AGG	G
G	GUU	Val	GCU	GAU	GGU	U		
	GUC					Ala	GAC	GGC
	GUA	Glu	GAA	GGA	A			
	GUG				GAG	GGG	G	

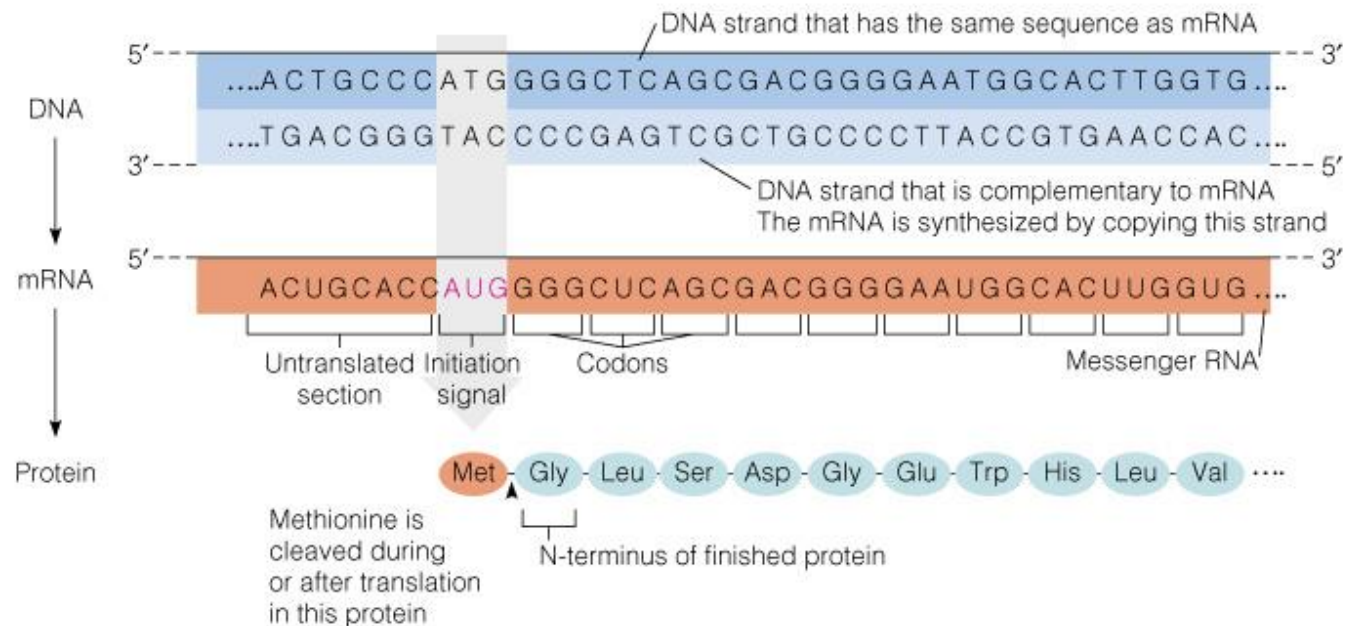
Copyright © 2000 Benjamin/Cummings, an imprint of Addison Wesley Longman, Inc.

Amino acid

sequence (protein)

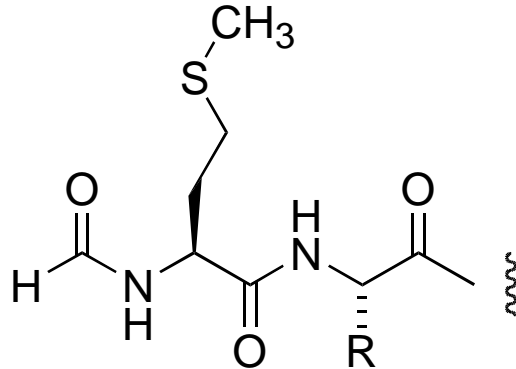
Gln – Tyr – Pro – Thr – Ile – Trp

DNA sequence (gene) **CAGTATCCTACGATTTCG**

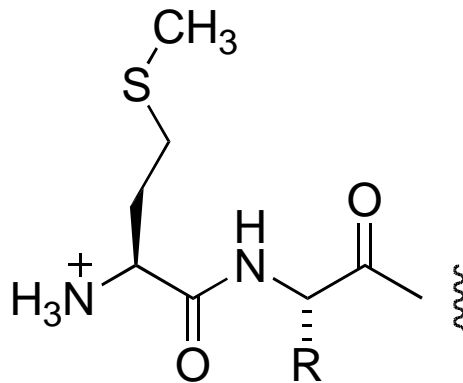


Copyright © 2000 Benjamin/Cummings, an imprint of Addison Wesley Longman, Inc.

Iniciační aminokyseliny v procesu translace

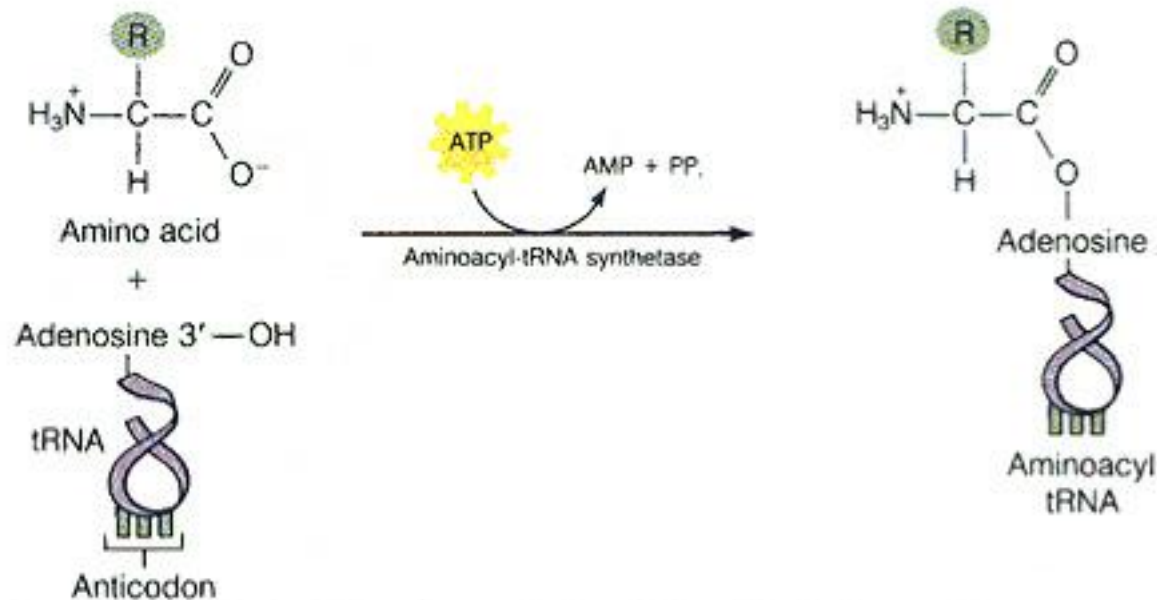


N-Formylmethionine in prokaryotes



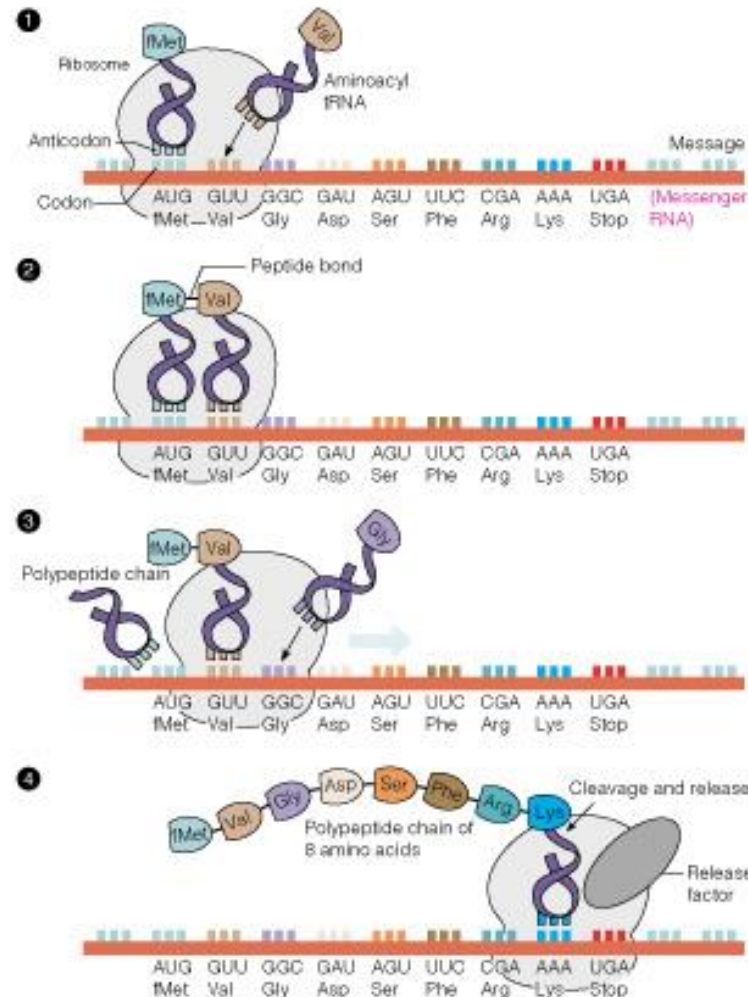
Just methionine in eukaryotes

Aktivace tRNAs specifickou AK



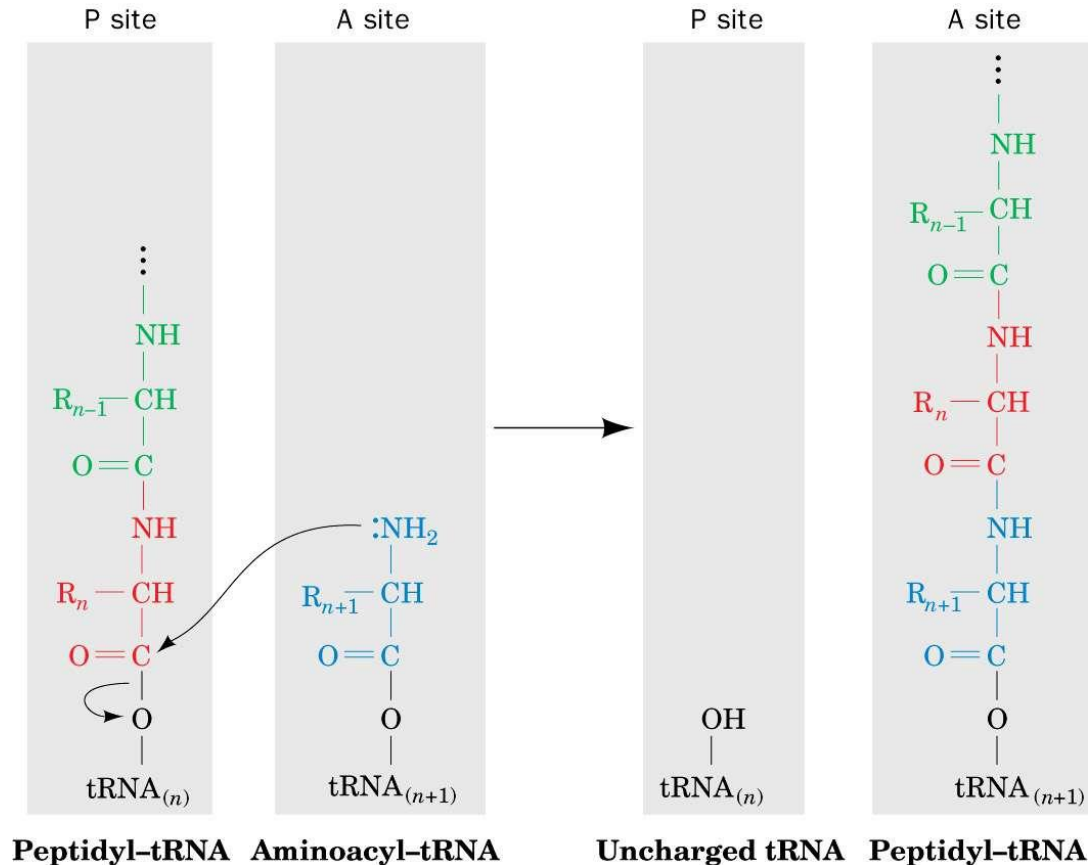
Copyright © 2000 Benjamin/Cummings, an imprint of Addison Wesley Longman, Inc.

Translacja z mRNA do Proteinu



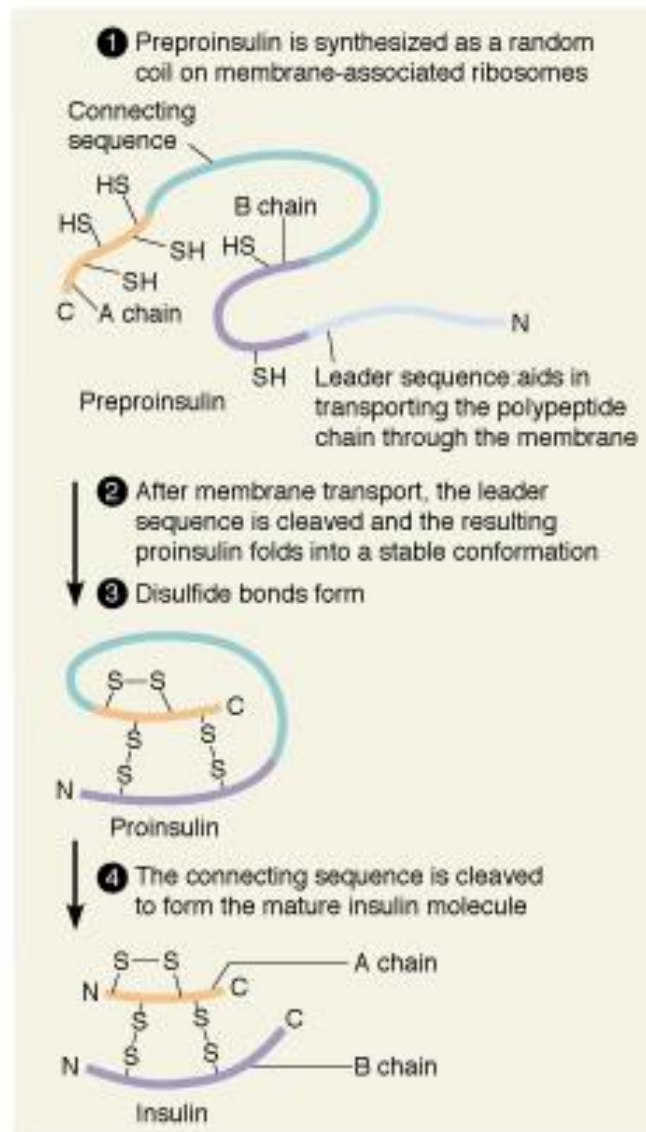
Copyright © 2000 Benjamin/Cummings, an imprint of Addison Wesley Longman, Inc.

Aktivita Ribosomální Peptidyl Transferase



Note: the catalytic component of the ribosome's peptidyl transferase activity is RNA; it's an example of a catalytic RNA or ribozyme.

Tvorba disulfidických vazeb v insulinu

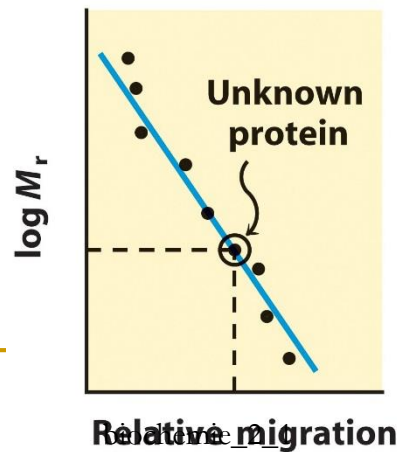
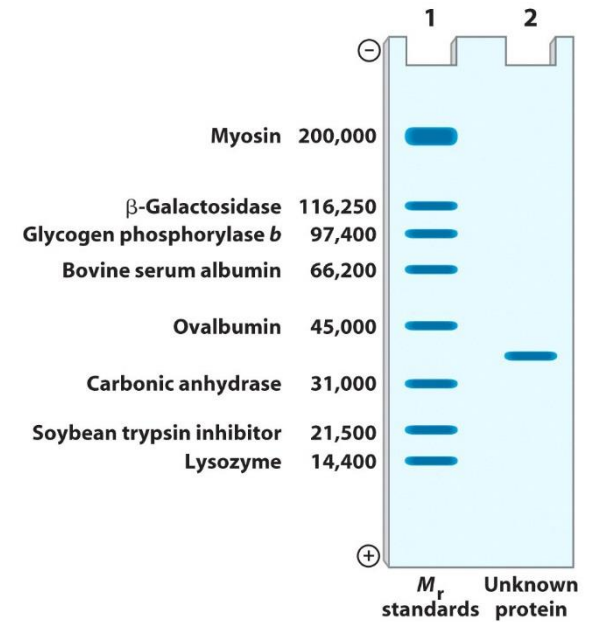
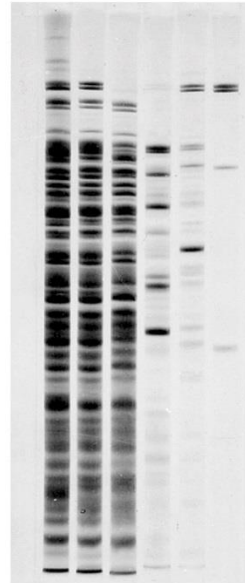
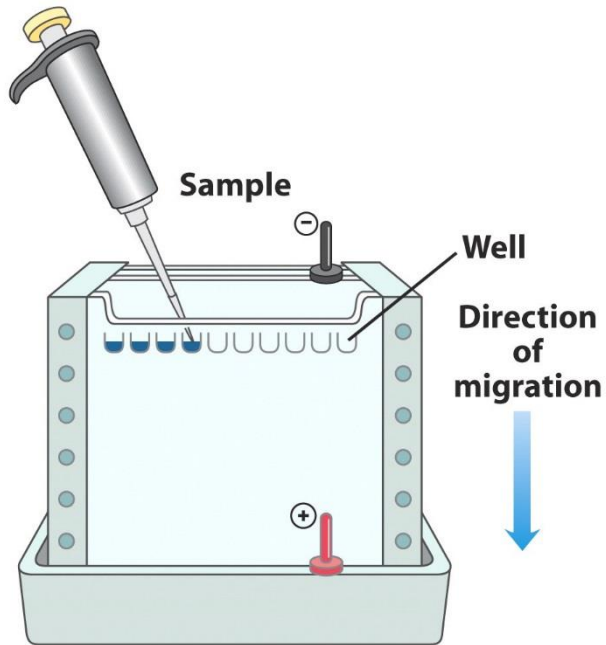


Shrnutí

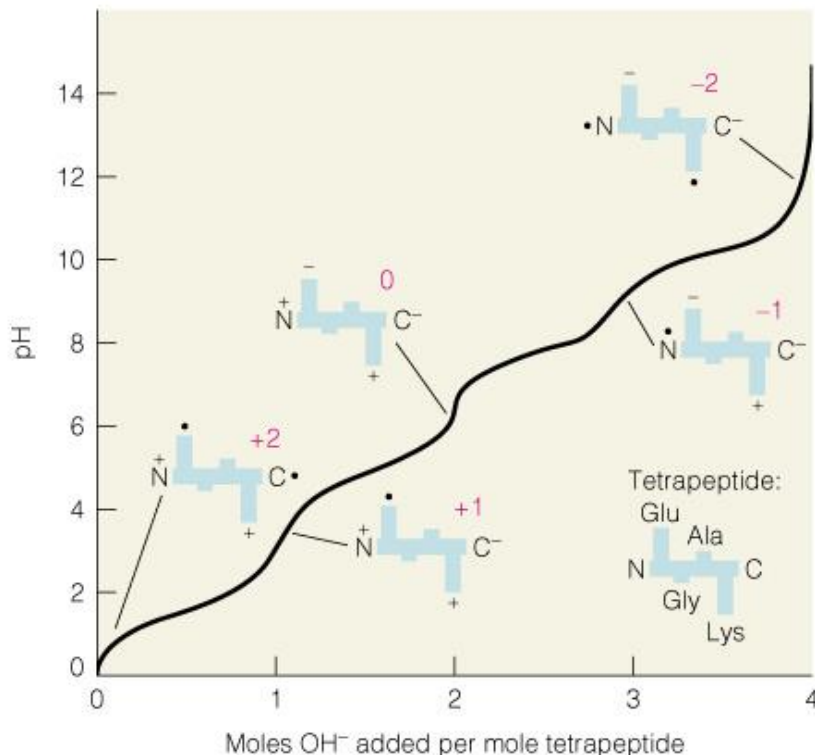
- 1) Aminokyseliny mohou být kovalentně spojeny peptidickou vazbou za vzniku peptidů a proteinů. Buňky obecně obsahují tisíce různých proteinů, každý s jinou biologickou aktivitou.
2. Proteiny mohou být velmi dlouhé polypeptidové řetězce o 100 až několik tisíc zbytků. Ačkoli některé přirozeně se vyskytující peptidy mají jen velmi málo zbytků. Některé proteiny jsou složeny z několika nekovalentně asociovaných polypeptidů; podjednotek. Jednoduché proteiny se hydrolýzou rozkládají pouze na AMK; konjugované proteiny navíc obsahují další složku např. kov nebo prostetickou skupinu.
3. Sekvence aminokyselin v proteinu je charakteristická pro každý protein a nazývá se primární struktura. Toto je jedna ze čtyř obecně rozlišovaných úrovní struktury proteinů.

Metody v proteinové biochemii

Gelová elektroforeza



Polyamfolitní charakter peptidu a izoelektrický bod



Copyright © 2000 Benjamin/Cummings, an imprint of Addison Wesley Longman, Inc.

Group	pKa
$\alpha\text{-NH}_3^+$	9.7
Glu $\gamma\text{-COOH}$	4.2
Lys $\epsilon\text{-NH}_3^+$	10.0
$\alpha\text{-COOH}$	2.2

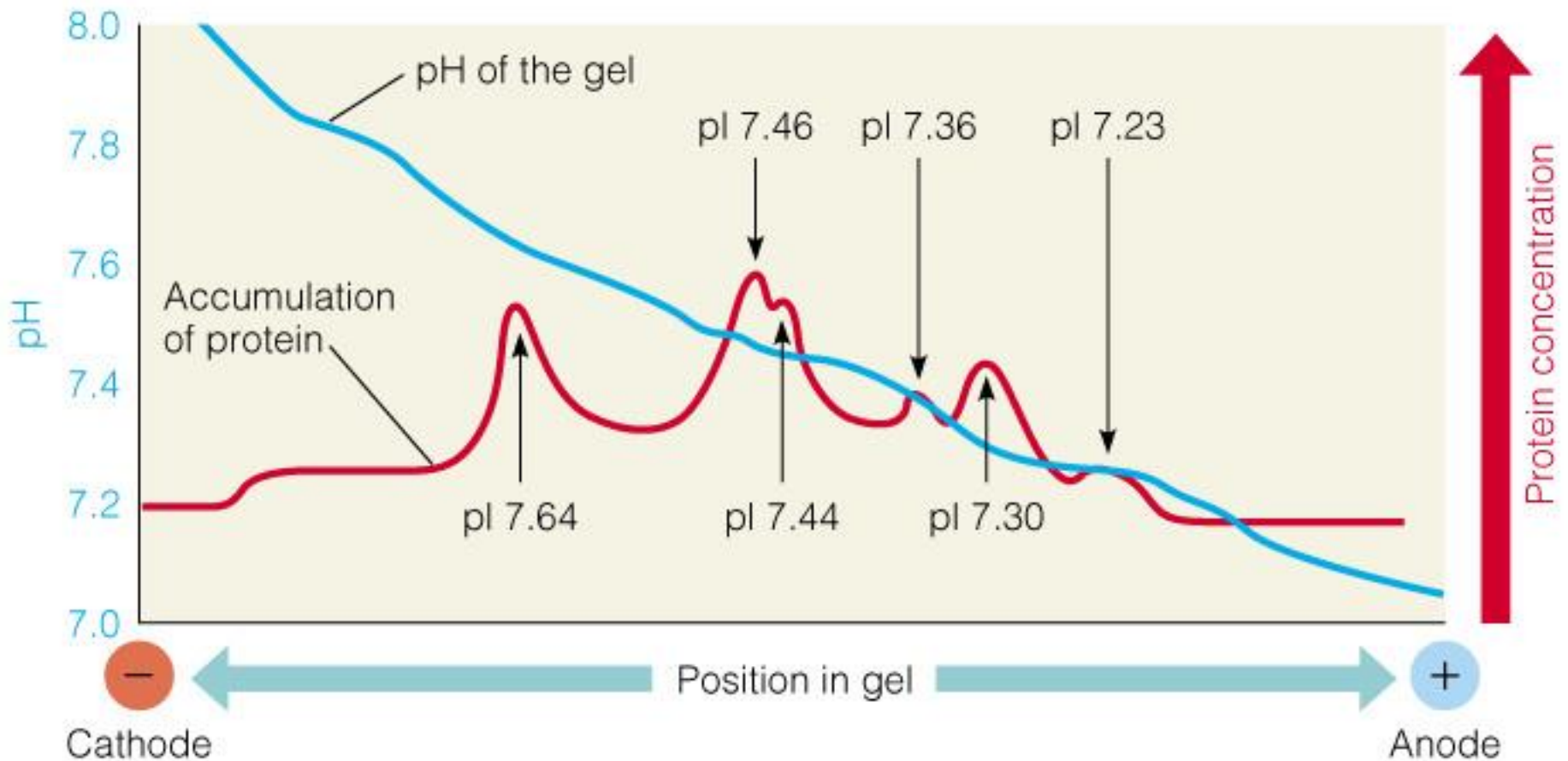
Isoelectric Point (pI), pH at which molecule has net zero charge, determined using computer program for known sequence or empirically (by isoelectric focusing).

TABLE 3-6 The Isoelectric Points of Some Proteins

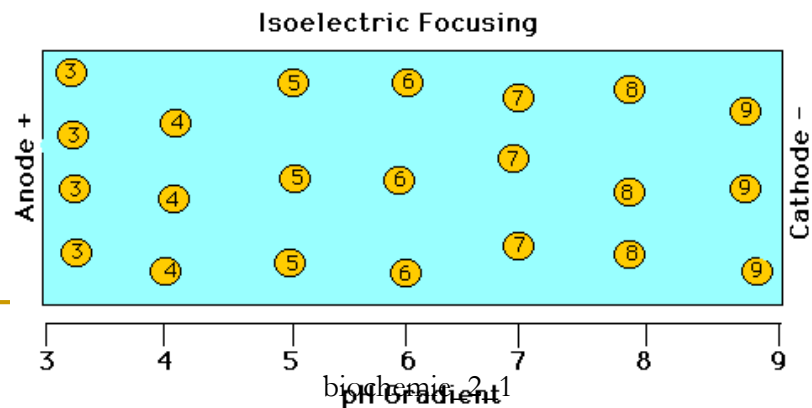
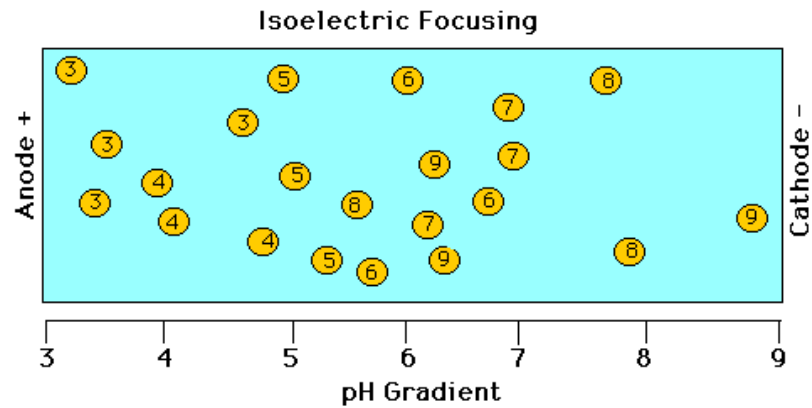
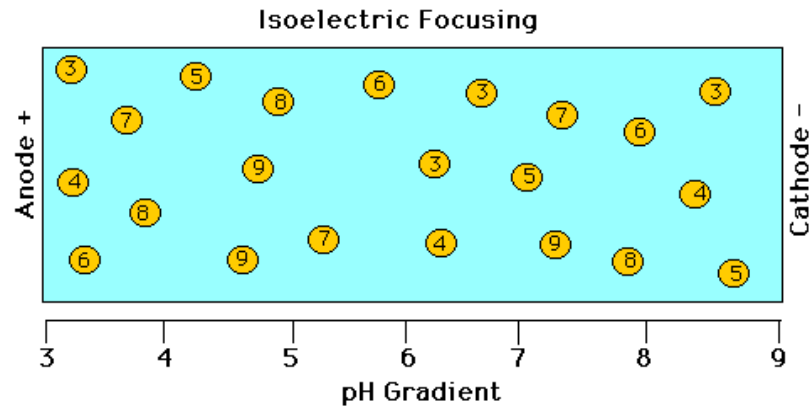
<i>Protein</i>	<i>pI</i>
Pepsin	<1.0
Egg albumin	4.6
Serum albumin	4.9
Urease	5.0
β -Lactoglobulin	5.2
Hemoglobin	6.8
Myoglobin	7.0
Chymotrypsinogen	9.5
Cytochrome c	10.7
Lysozyme	11.0

Isoelektrická fokusace

Electrophoresis through polyacrylamide gel in which there is a pH gradient.

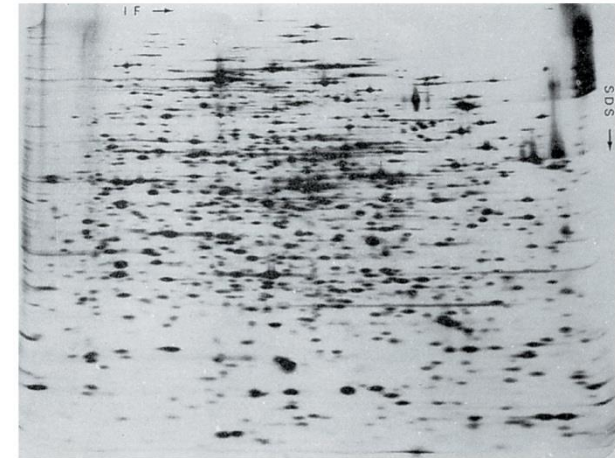
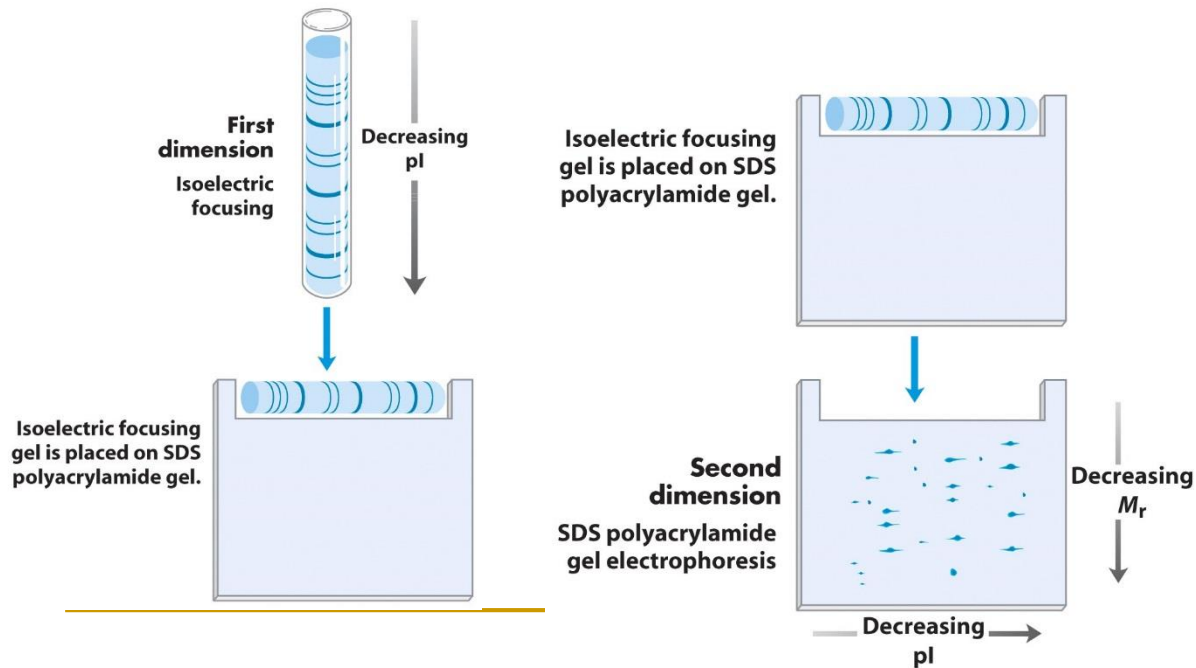


Copyright © 2000 Benjamin/Cummings, an imprint of Addison Wesley Longman, Inc.

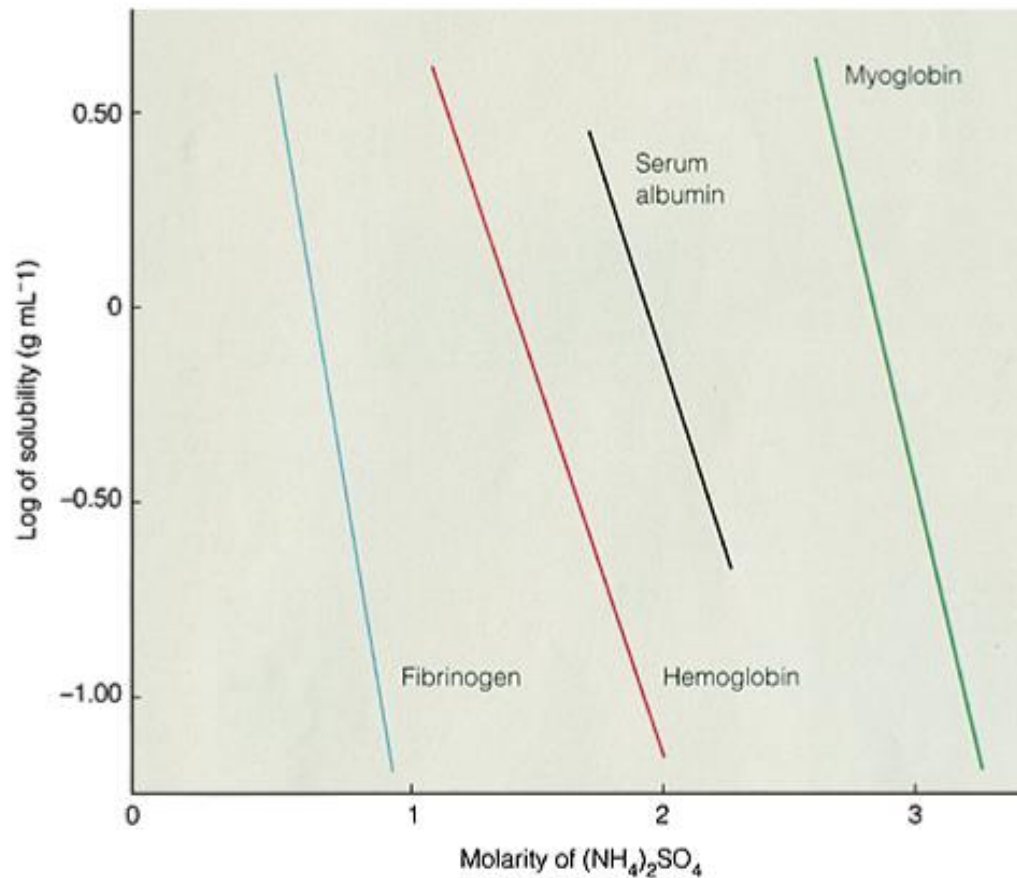
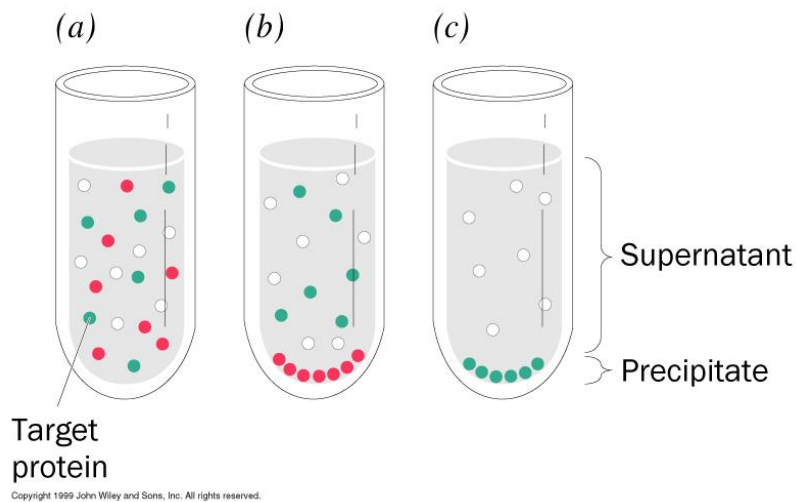


2D gelová elektroforesa

- Separace proteinů založená na isoelektrickém bodě v prvním rozměru
- Separace proteinů založená na molekulové hmotnosti v 2. směru



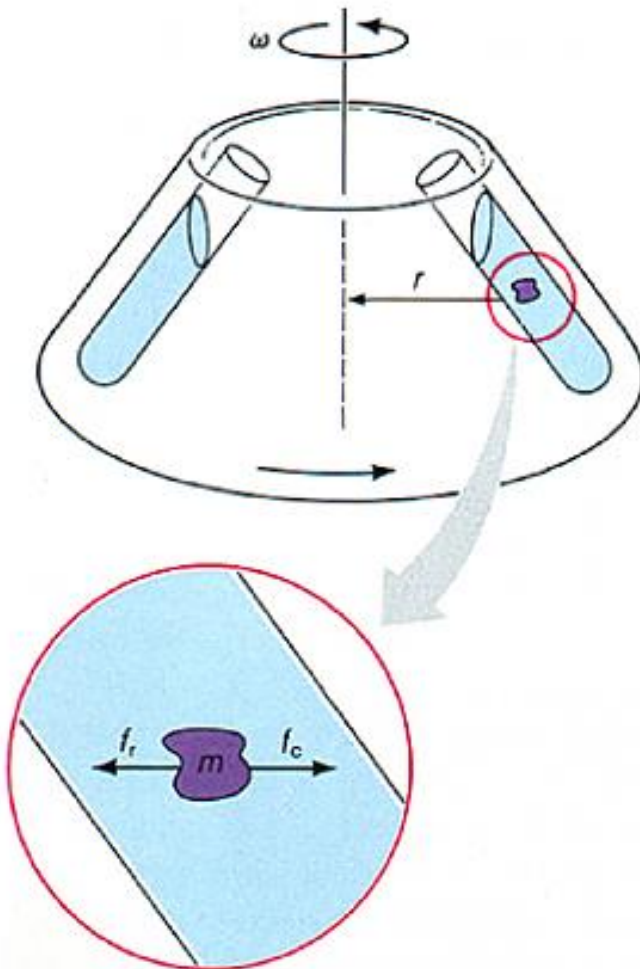
Vysolování: precipitace, srážení síranem amonným – proteinová frakcionace



Copyright © 2000 Benjamin/Cummings, an imprint of Addison Wesley Longman, Inc.

Centrifugace

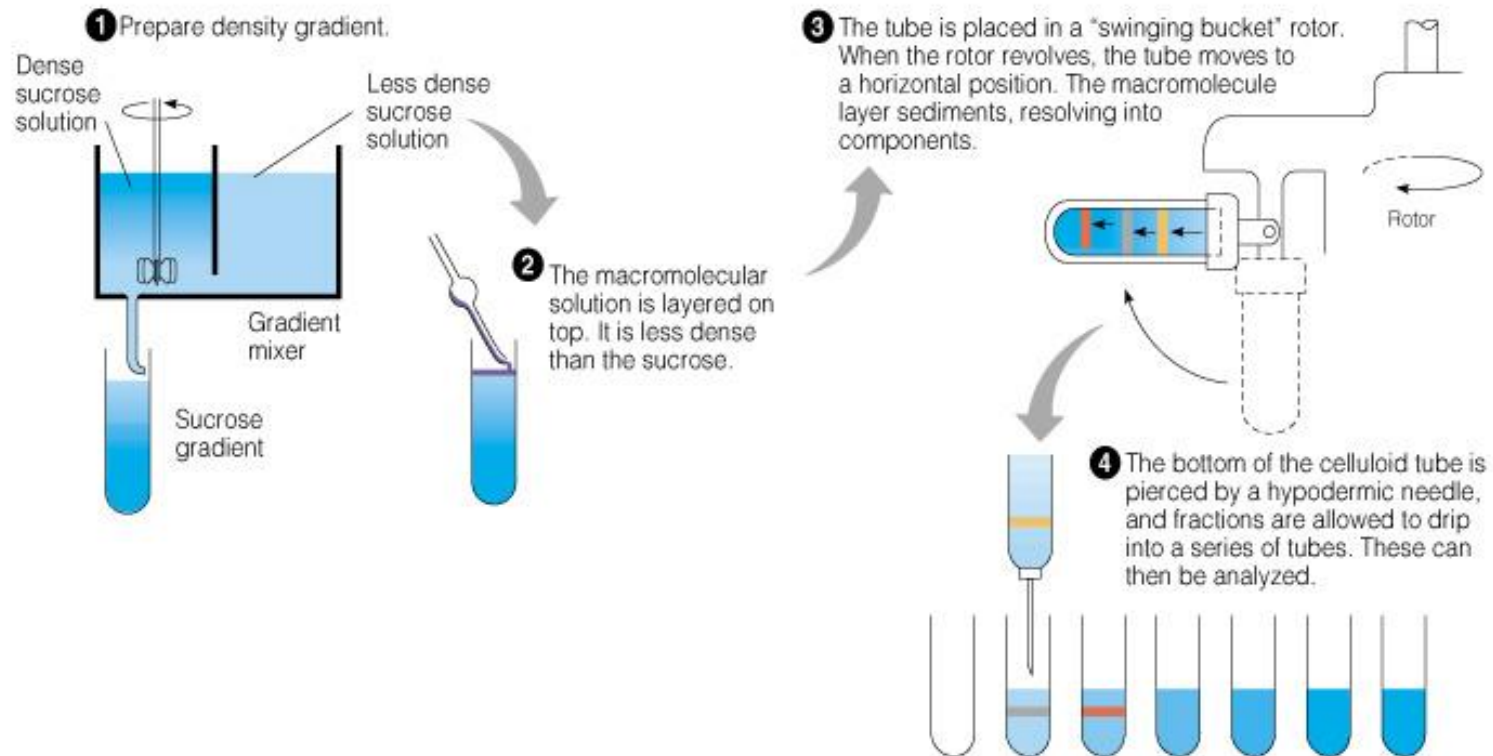
Low-speed, high-speed, or ultracentrifugation: different spin speeds and g forces



Centrifugation Methods

- Differential (Pelletting) – simple method for pelleting large particles using fixed-angle rotor (pellet at bottom of tube vs. supernatant solution above)
- Zonal ultracentrifugation (e.g., sucrose-gradient) – swinging-bucket rotor
- Equilibrium-density gradient ultracentrifugation (e.g., CsCl) – swinging-bucket or fixed-angle rotor

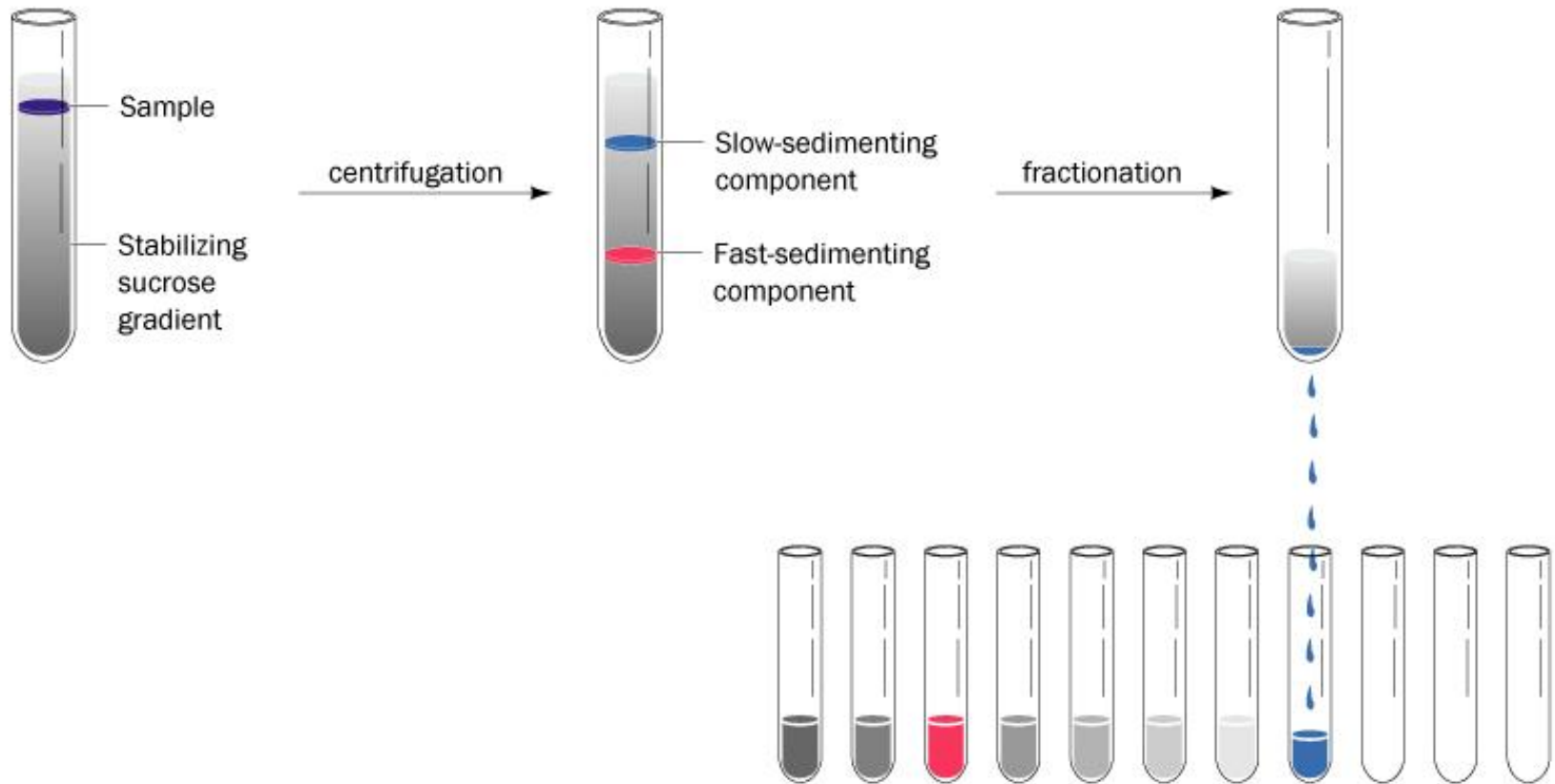
Zonální centrifugace v gradientu sacharosu: gradientová preparativní ultracentrifugace



Copyright © 2000 Benjamin/Cummings, an imprint of Addison Wesley Longman, Inc.

Separates by sedimentation coefficient
(determined by size and shape of solutes)

Sacharosová gradietová preparativní ultracentrifugace

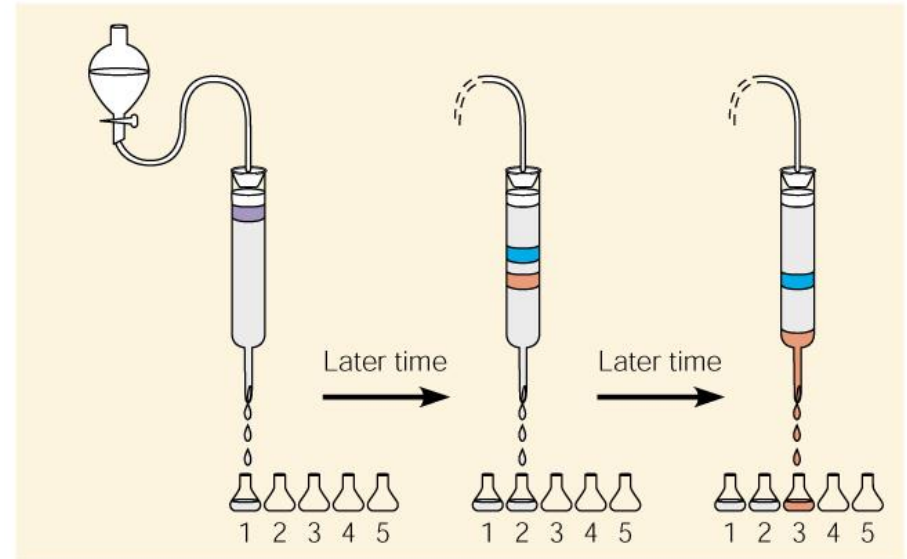
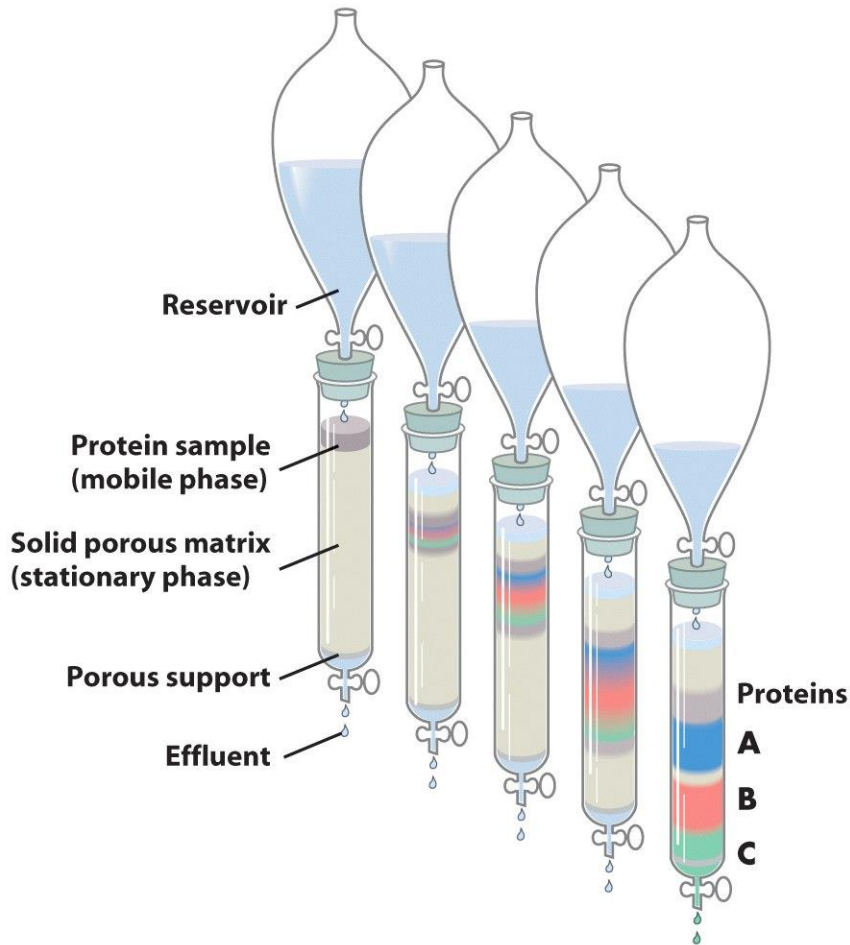


Copyright 1999 John Wiley and Sons, Inc. All rights reserved.

Gradientová ultracentrifugace založená na stejné hustotě

- využívá se Meselsen-Stahl experimentu, rozdělení na základě hustoty rozpuštěných látek.
- Nevyžaduje předpřipravený gradient
- Nalijte hustý roztok rychle rozptylující látky ve zkumavce (obvykle CsCl).
- Gradientem hustoty se vytvoří během odstředování ("self-generování gradientu")
- Rozpuštěné látky migrují podle jejich hustoty, rychlosti sedimentace (kde hustota rozpuštěné látky = hustota roztoku CsCl).

Chromatografie na koloně



Copyright © 2000 Benjamin/Cummings, an imprint of Addison Wesley Longman, Inc.

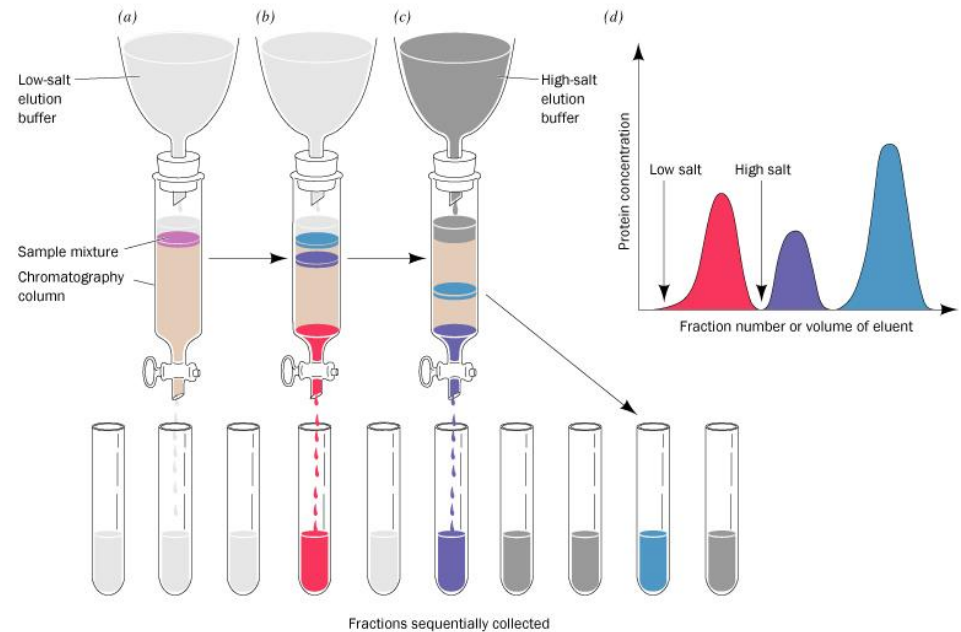
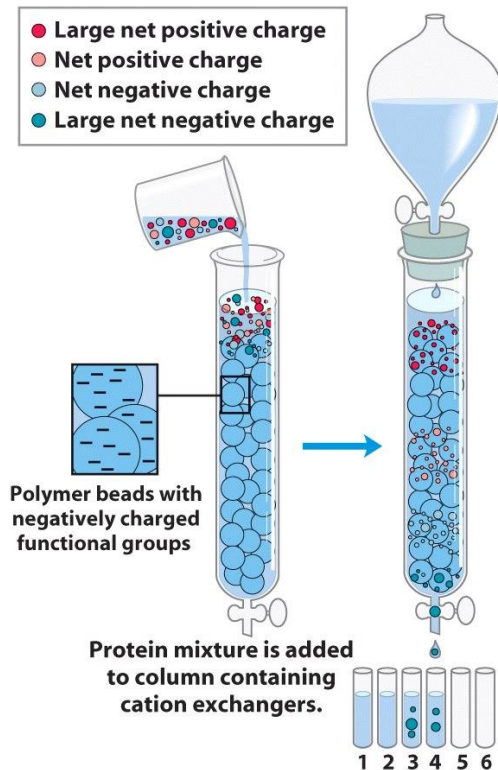
Flow-through

Eluate

Různé typy chromatografie

- Gelová filtrace / molekulární síto - dělí podle velikosti (molekulové hmotnosti) proteinů
- Ionoměničová (katex a výměna aniontů) - odděluje od povrchového náboje na proteiny
Katexová: odděluje na základě kladných nábojů rozpuštěných látek / proteinů matrix je záporně nabitý
Anexová: odděluje na základě záporných nábojů rozpuštěných látek / proteinů, matice je pozitivně nabitá
- Hydrofobní - odděluje od hydrofobnosti proteinů
- Afinitní - odděluje nějakou unikátní závaznou charakteristiku proteinu zájmu afinitní matrix ve sloupci

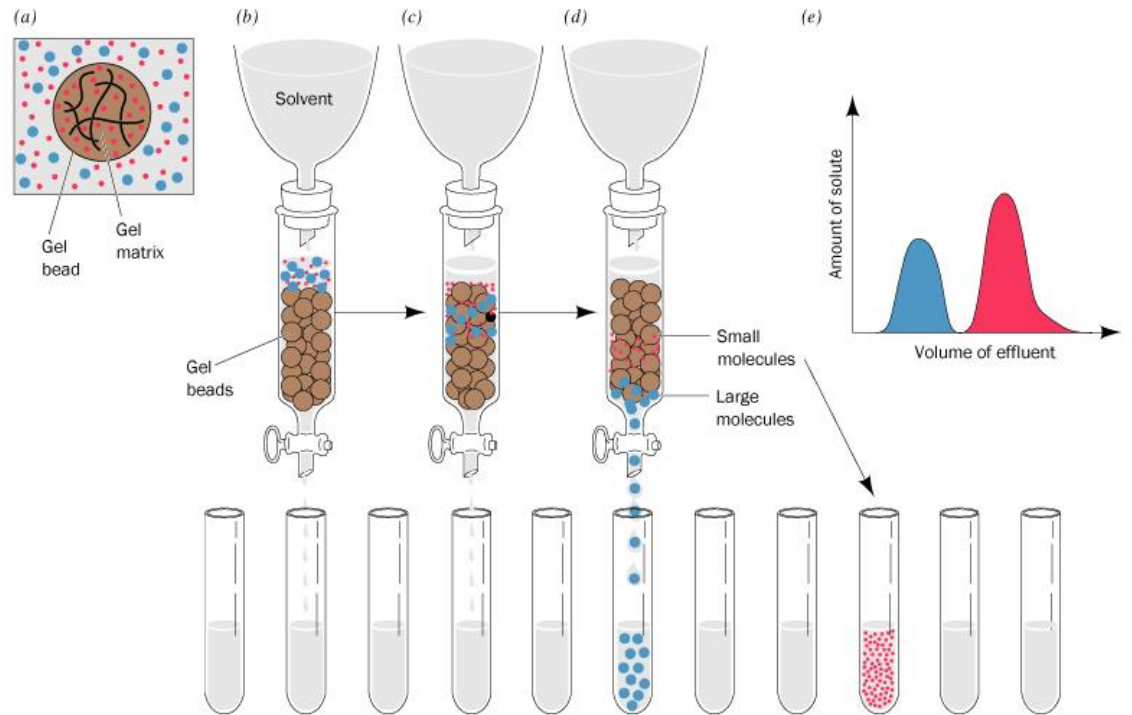
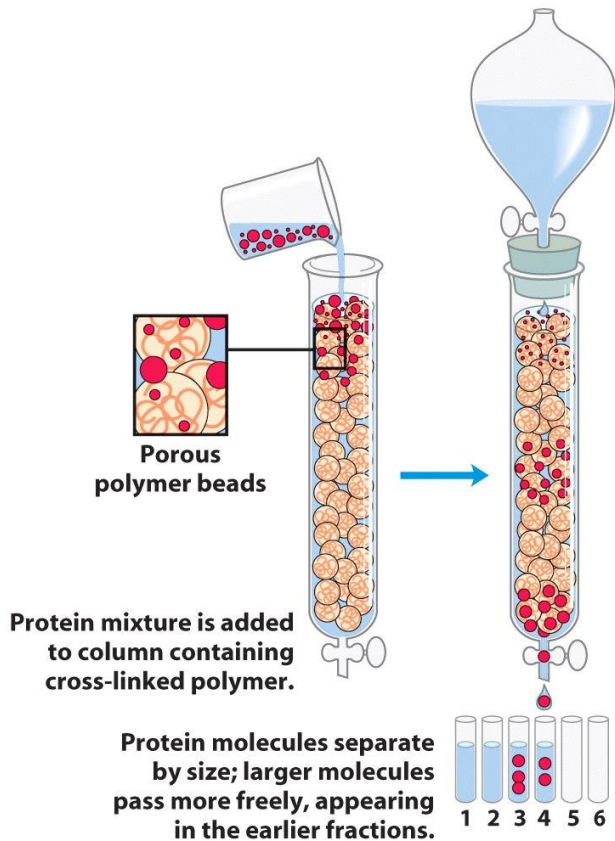
Iontoměničová chromatografie



Copyright 1999 John Wiley and Sons, Inc. All rights reserved.

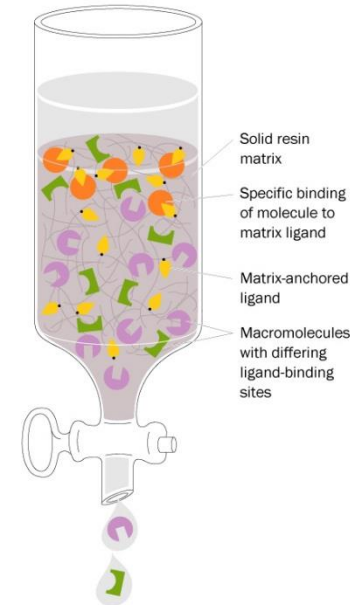
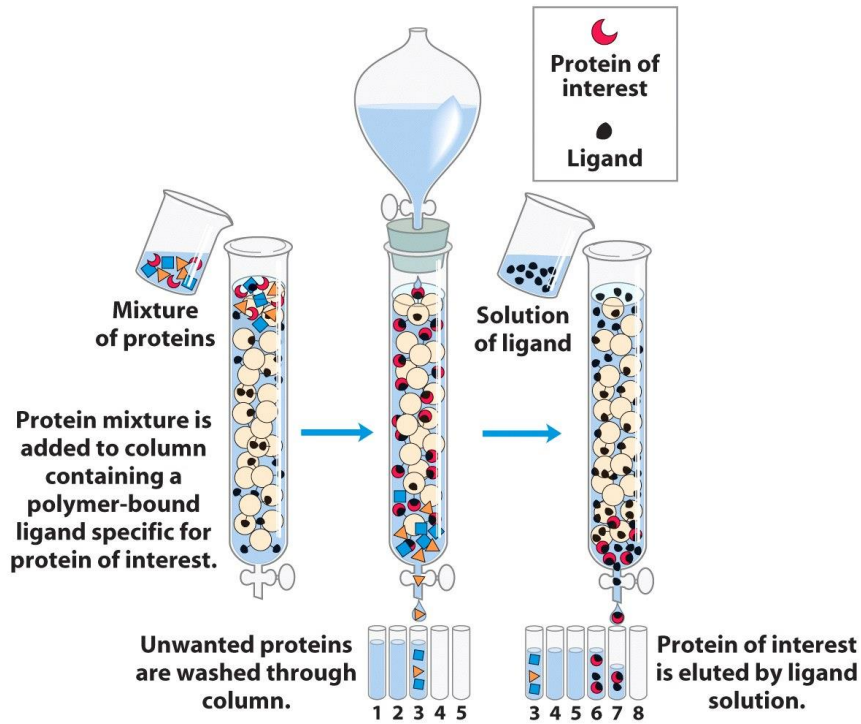
Proteins move through the column at rates determined by their net charge at the pH being used. With cation exchangers, proteins with a more negative net charge move faster and elute earlier.

Gelová filtrace

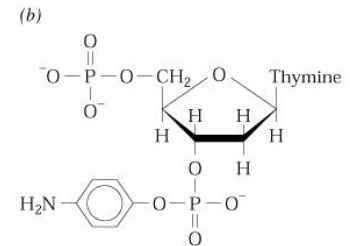
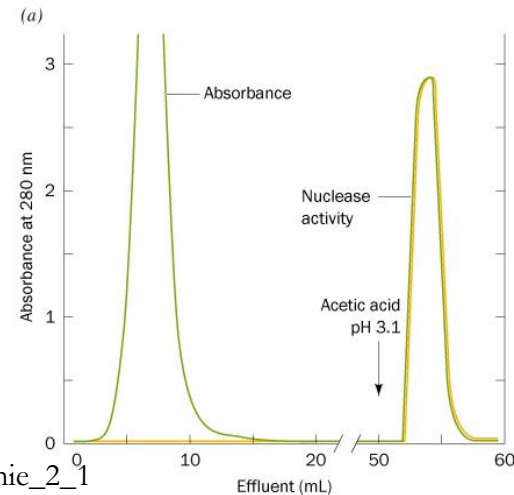


Copyright 1999 John Wiley and Sons, Inc. All rights reserved.

Afinní chromatografie



Copyright 1999 John Wiley and Sons, Inc. All rights reserved.



Štěpení polypeptidového řetězce pro analýzu

- Silná kyselina (např, 6 M HCl) – nespecifické
- Sekvence specifické pro proteolytické enzymy (proteázy)
- Sekvence specifické - chemické štěpení (např, štěpení bromkyanem na zbytcích methioninu)

Specifické proteázy

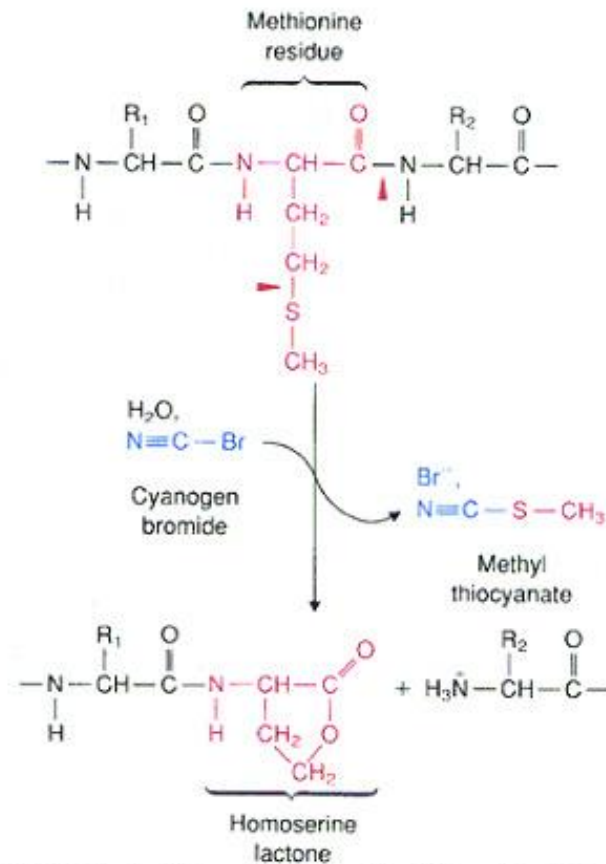
TABLE 3-7 The Specificity of Some Common Methods for Fragmenting Polypeptide Chains

<i>Reagent (biological source)*</i>	<i>Cleavage points†</i>
Trypsin (bovine pancreas)	Lys, Arg (C)
<i>Submaxillaris</i> protease (mouse submaxillary gland)	Arg (C)
Chymotrypsin (bovine pancreas)	Phe, Trp, Tyr (C)
<i>Staphylococcus aureus</i> V8 protease (bacterium <i>S. aureus</i>)	Asp, Glu (C)
Asp-N-protease (bacterium <i>Pseudomonas fragi</i>)	Asp, Glu (N)
Pepsin (porcine stomach)	Phe, Trp, Tyr (N)
Endoproteinase Lys C (bacterium <i>Lysobacter enzymogenes</i>)	Lys (C)
Cyanogen bromide	Met (C)

*All reagents except cyanogen bromide are proteases. All are available from commercial sources.

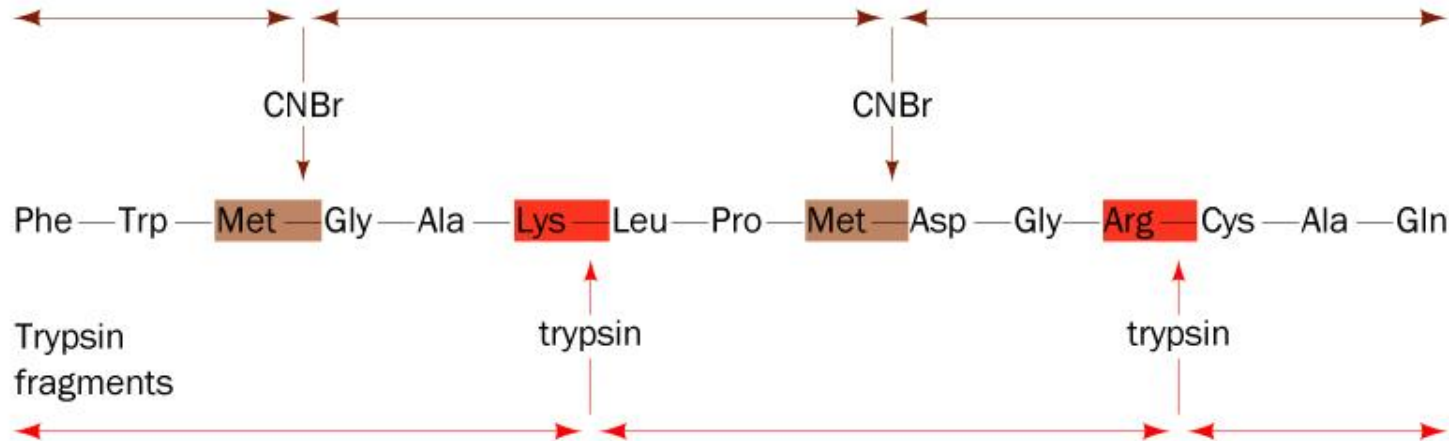
†Residues furnishing the primary recognition point for the protease or reagent; peptide bond cleavage occurs on either the carbonyl (C) or the amino (N) side of the indicated amino acid residues.

Štěpení – methioninové zbytky pomocí kyanogen Bromidu



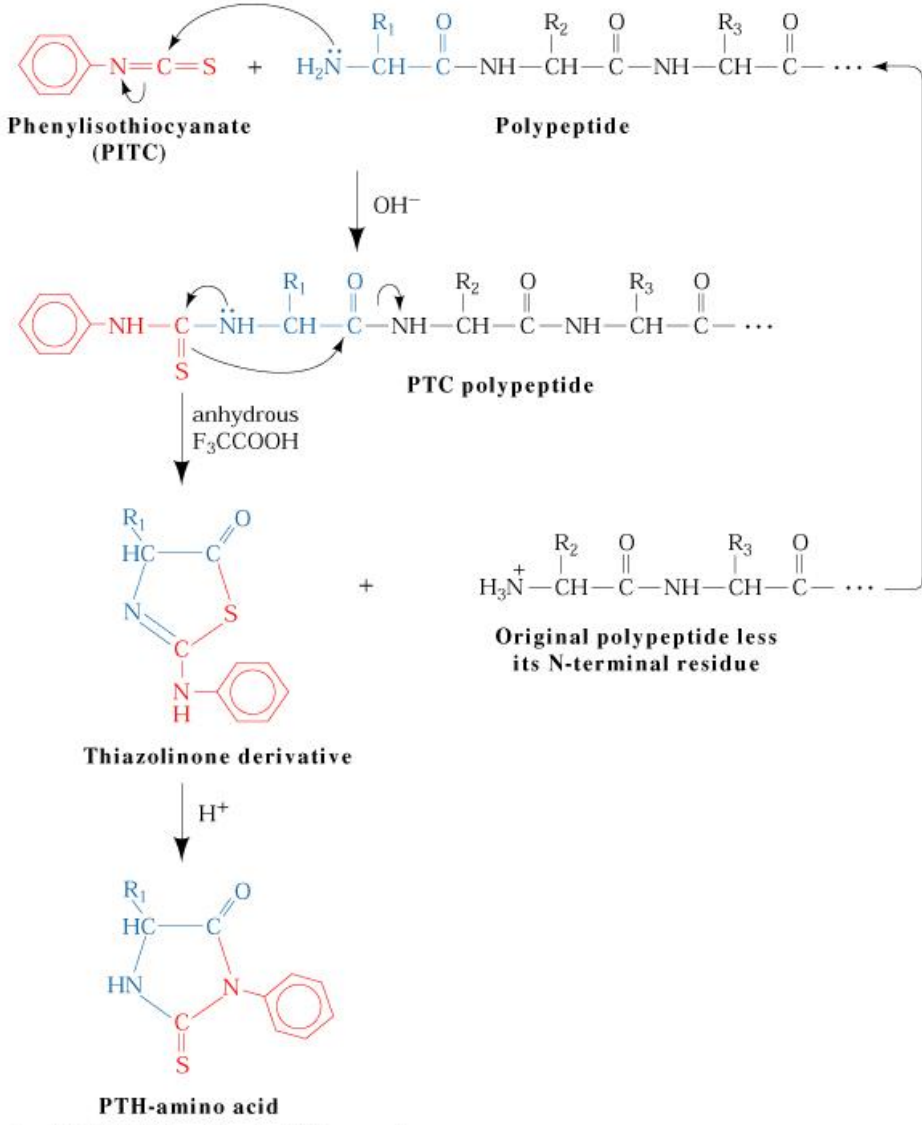
Copyright © 2000 Benjamin/Cummings, an imprint of Addison Wesley Longman, Inc.

CNBr
fragments



Copyright 1999 John Wiley and Sons, Inc. All rights reserved.

Proteinové sekvenace pomocí Edman Degradace

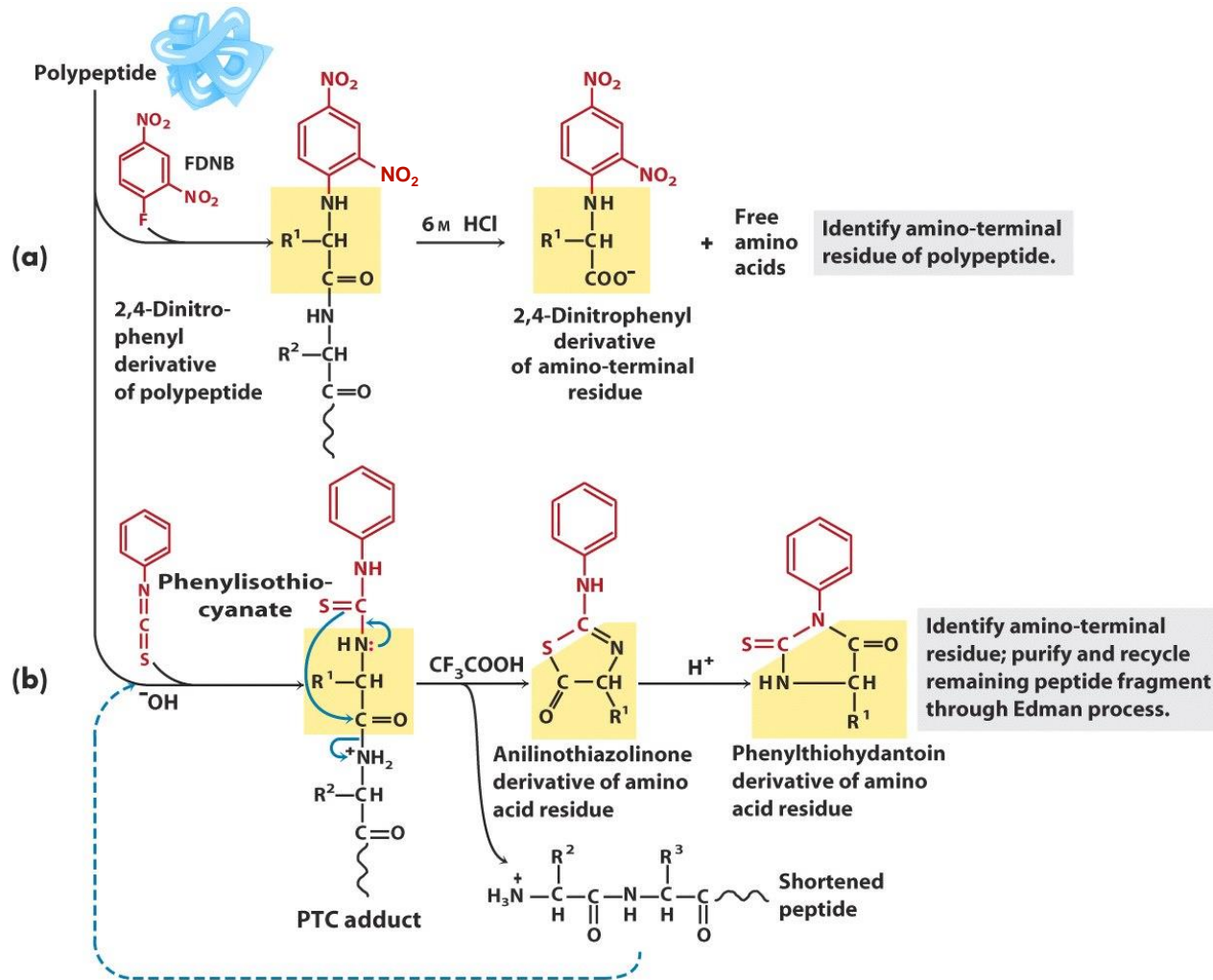


PTC = phenylthiocarbonyl

F_3CCOOH = trifluoroacetic acid

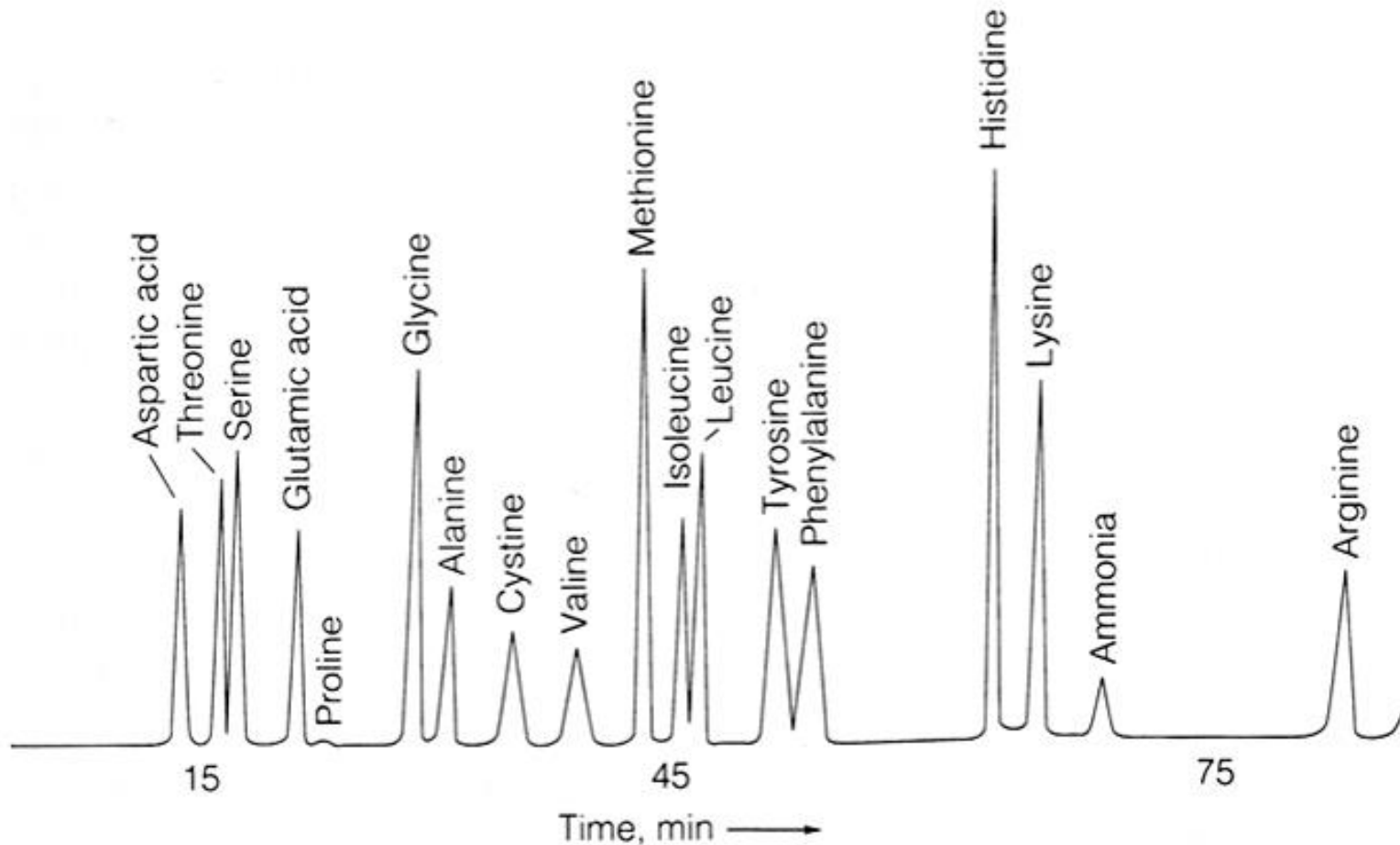
PTH = phenylthiohydantion

Identifikace N-koncové AA



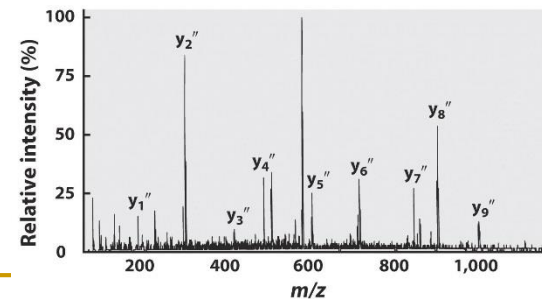
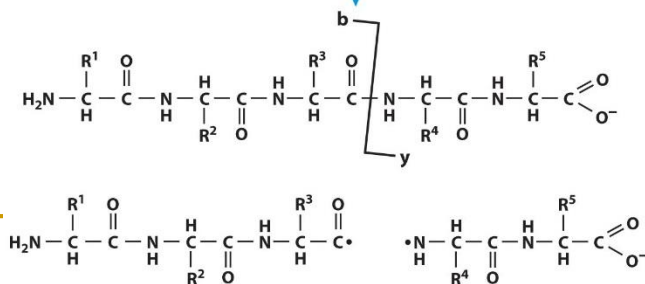
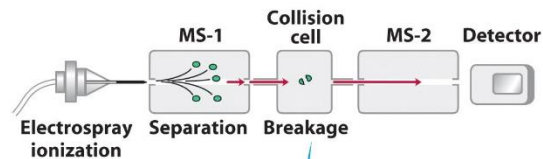
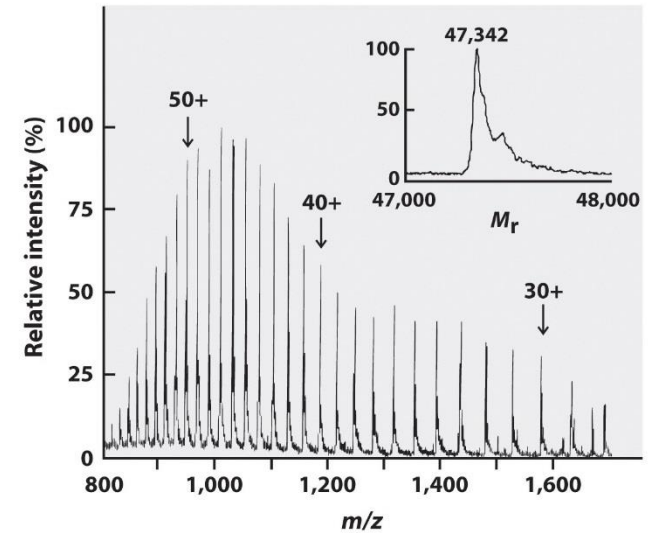
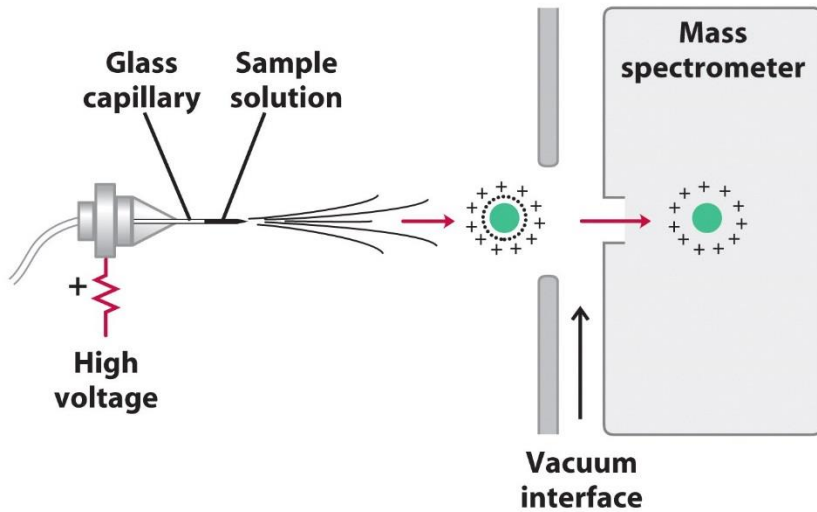
Note: Identification of C-terminal residue done by hydrazinolysis (reaction with anhydrous hydrazine in presence of mildly acidic ion exchange resin) or with a C-terminus-specific exopeptidase (carboxypeptidase).

Separace AA pomocí HPLC



Copyright © 2000 Benjamin/Cummings, an imprint of Addison Wesley Longman, Inc.

Identifikace proteinů pomocí hmotnostní spektrometrie



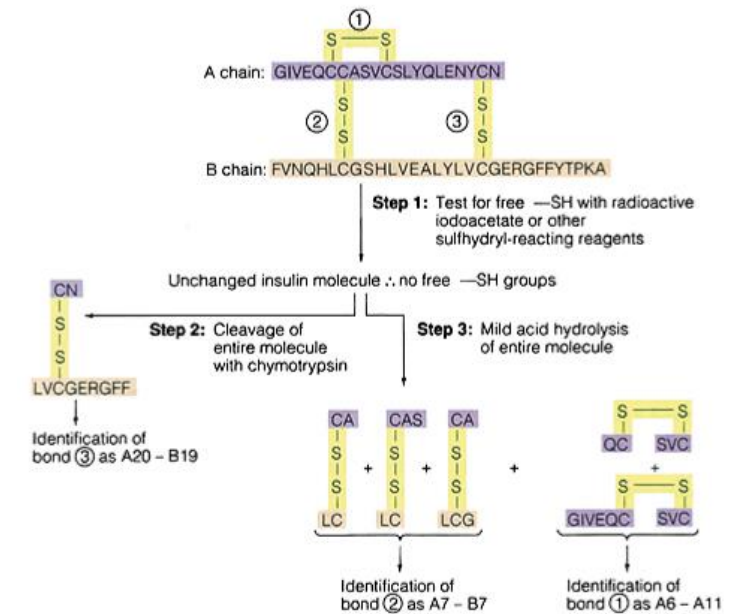
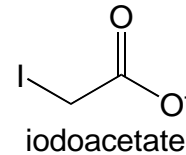
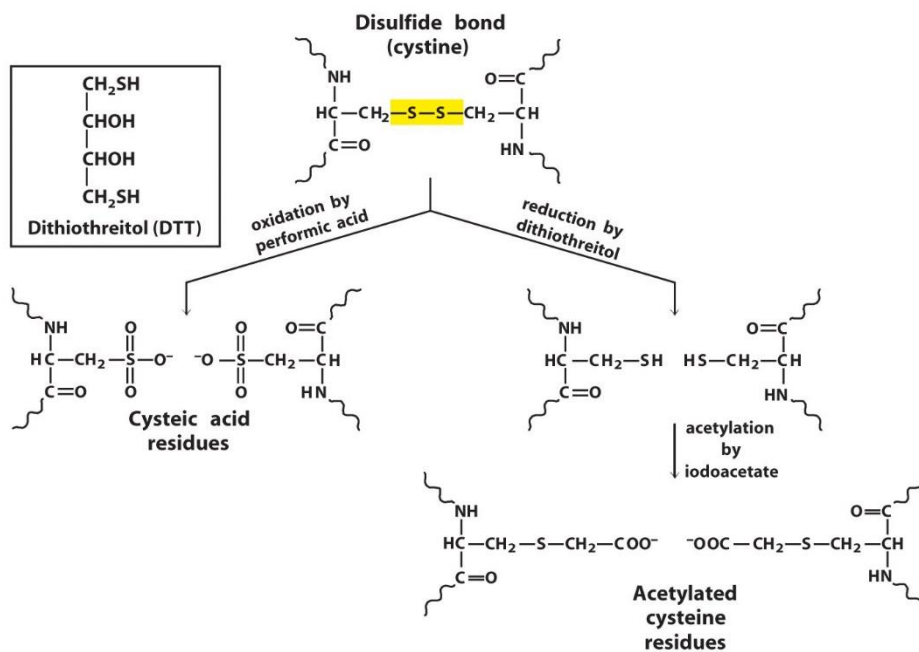
Identifikace proteinů pomocí hmotnostní spektrometrie

Dva hlavní přístupy:

1. Peptide hmotnost otisků prstů: proteolytické štěpení bílkovin, pak stanovení m / z peptidů MS (např, MALDI-TOF a ESI-TOF), hledání "otisk prstu" proti databázi. Úspěch je závislé na kvalitě / úplnost databáze pro konkrétní proteomu.

2. Tandem MS (MS / MS - například nanoLC-ESI-MS / MS): proteolytické štěpení bílkovin, separaci a stanovení m / z každého (MS-1), pak určení kolizí indukované disociace fragmentu spektra pro každý peptid (MS-2). Poskytuje kontext / sekvenčně závislé informace, takže spíše dělat novo metodou sekvenování.

Locating Disulfide Bonds



Copyright © 2000 Benjamin/Cummings, an imprint of Addison Wesley Longman, Inc.

Determining Primary Structure of an Entire Protein

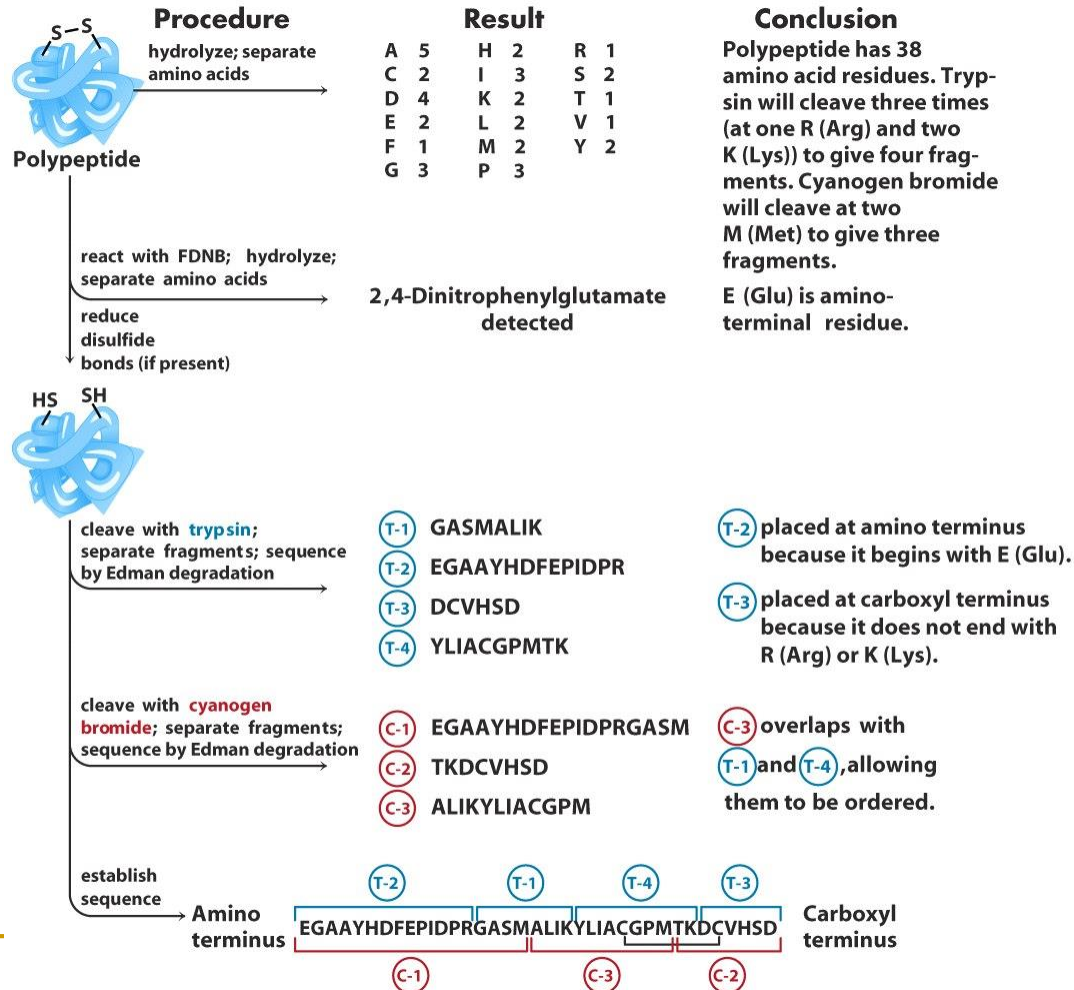


TABLE 3-8 Effect of Stepwise Yield on Overall Yield in Peptide Synthesis

<i>Number of residues in the final polypeptide</i>	<i>Overall yield of final peptide (%) when the yield of each step is:</i>	
	96.0%	99.8%
11	66	98
21	44	96
31	29	94
51	13	90
100	1.7	82

Aminokyseliny

Proteiny: Esenciální pro všechny organismy

- AMK
 - Peptidy
 - Polypeptidy
 - Proteiny; více než 50 AMK
-
- **Proteiny** jsou polymery aminokyseliny, kde je každý aminokyselinový zbytek navázán na svého souseda specifickým typem kovalentní vazby.
 - L- α -aminokyseliny a jejich deriváty se podílí na rozličných buněčných funkcích jako nervový přenos a biosyntéza porfyrinů, purinů, pyrimidinů a močoviny.
 - Existuje více než 300 AK, 21 v proteinech savců...

Funkce aminokyselin

● Primární funkce (součást proteinů)

● Chemický přenašeč:

- **Neurotransmitery** (substance z jedné nervové buňky, které ovlivňují funkci druhé nervové buňky)
- GABA (γ -amino máselná kyselina), glycin, serotonin (tryptofan)

- **Hormony** (chemické přenašeče....produkovány jedním typem buněk a regulují funkci jiných typů buněk)
- Thyroxin (tyrozin)
- Indolkarboxylová kyselina (rostliny)

● Prekurzory pro molekuly obsahující dusík

- Nukleotidy, hem, chlorofyl

● Metabolické intermediáty: arginin, citrulin, ornithin – cyklus močoviny

