

BIOCHEMIE II – SEMINÁŘ

JS 2015

Mgr. Pavel Bouchal, Ph.D.

Ústav biochemie PŘF MU

e-mail: bouchal@chemi.muni.cz

Kamenice 5, budova A5, místnost 208, 212

Mgr. Vendula Pernikářová

Ústav biochemie PŘF MU

Kamenice 5, budova A5, místnost 336

PROGRAM SEMINÁŘE

1. Nukleové kyseliny: Nukleové báze, nukleotidy, primární struktura NK.
2. Replikace, transkripce, translace a proteosyntéza. Úvod do molekulární biologie
3. PCR, výpočtové úlohy
4. Test 1
5. Redoxní reakce
6. Metabolismus a biosyntéza sacharidů a lipidů: Opakování a výpočtové úlohy I
7. Metabolismus a biosyntéza sacharidů a lipidů: Opakování a výpočtové úlohy II
8. Test 2
9. Metabolismus **bílkovin a aminokyselin**
10. Močovinový cyklus a metabolismus dusíku.
11. Biosyntéza aminokyselin.
12. Test 3

Opravné termíny zápočtu

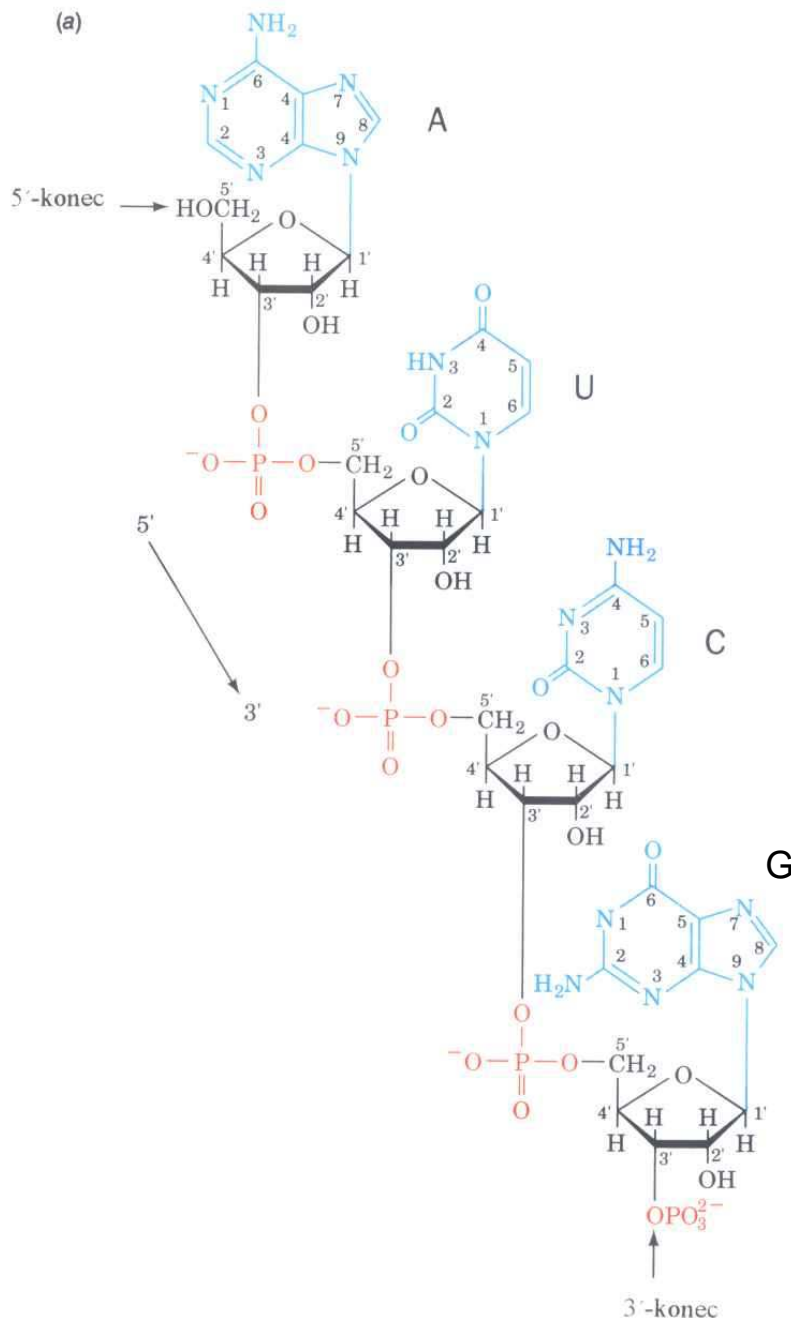
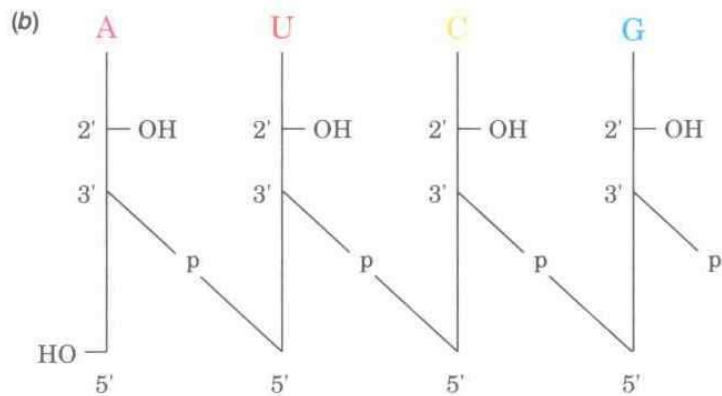
LITERATURA

Skripta Seminar 2.rtf Skripta Cvičení z biochemie, V. Mikeš
(IS: Studijní materiály/Učební materiály)
Biochemie II – seminář www.ppt

PODMÍNKY ZÍSKÁNÍ ZÁPOČTU

- Účast ve výuce: max. 1 neomluvená absence (více absencí: jen nemoc – lékařské potvrzení, řeší se individuálně)
- Testy (3), min. 50% z celkového počtu bodů => zápočet v řádném termínu
- Souhrnný test z učiva celého semestru => zápočet v 1. (2.) opravném termínu

PRIMÁRNÍ STRUKTURA NUKLEOVÝCH KYSELIN



MAXAM-GILBERTOVA METODA SEKVENOVÁNÍ NUKLEOVÝCH KYSELIN

Provede se štěpení před:

G (DMS/ Δ T)

G+A (H^+ / Δ T)

C (hydrazin, 5M NaCl)

C+T (hydrazin)

Příklad:

5' 3'
³²P-TGTAGGAGCT

Štěpení před G (DMS/ Δ T) vede ke vzniku fragmentů:

³²P-TGTAGGAGCT

³²P-TGTAGGAGCT

³²P-TGTAGGAGCT

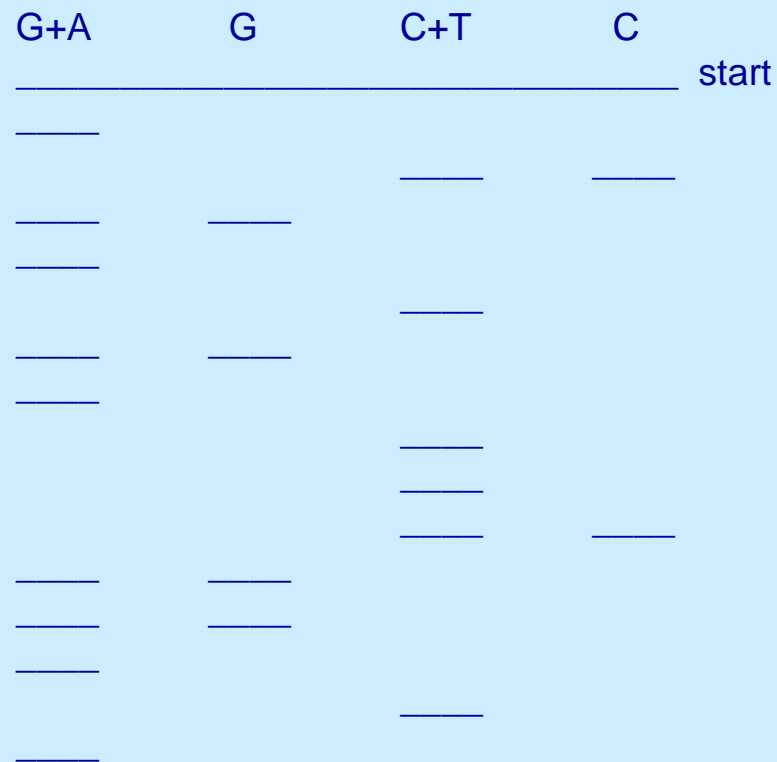
³²P-TGTAGGAGCT

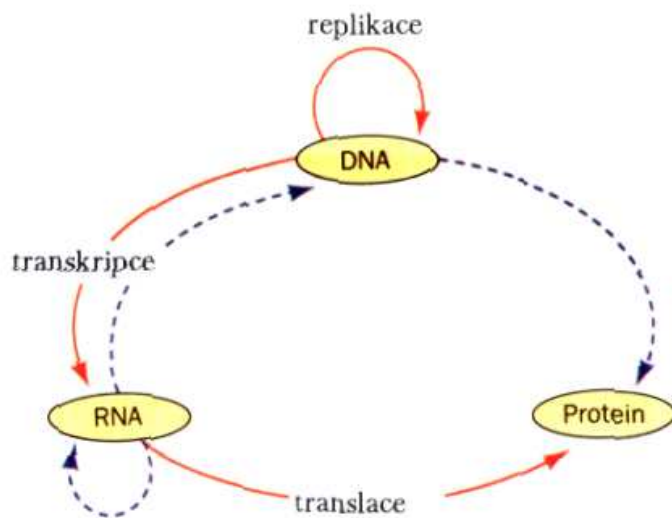
K jiným souborům fragmentů povedou štěpení před G+A, před C a před C+T.

MAXAM-GILBERTOVA METODA SEKVENOVÁNÍ NUKLEOVÝCH KYSELIN

DETEKCE FRAGMENTŮ SEPAROVANÝCH ELEKTROFORÉZOU
NA FOSFOIMAGERU

(detekce radioaktivity - vizualizovány jsou pouze ^{32}P značené fragmenty)





Obr. 29-1

Ústřední dogma molekulární biologie. *Plné červené šipky* označují typy přenosu genetické informace, probíhajícího v buňce. Speciální přenosy jsou označeny *přerušovanými šipkami*: RNA-polymerasa, řízená RNA, je přítomna v jistých virech i v některých rostlinách (kde má neznámou funkci); DNA-polymerasa, řízená RNA (reverzní transkriptasa), se vyskytuje v některých RNA-virech; a DNA přímo určující protein není známa, ale zdá se, že její existence není zcela nereálná. K přenosu informace v jiných než vyznačených směrech, tzn. protein určující DNA nebo RNA, však nedochází. Jinými slovy, *proteiny jsou pouze příjemci genetické informace*.

CHEMICKÁ MUTAGENEZE

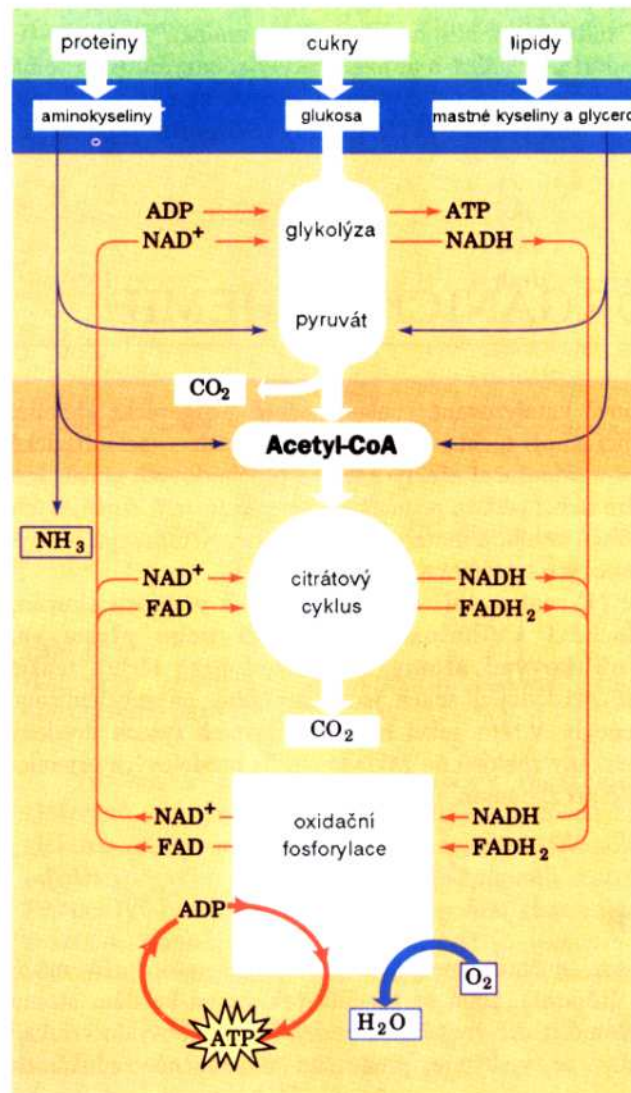
Tripletní charakter genetického kódu byl, objasněn užitím **chemických mutagenů**, které indukují mutace. Před vlastním studiem genetického kódu probereme nejprve tyto látky. Existují dvě hlavní třídy mutací:

1. **Bodové mutace**, při kterých je jeden pár bází nahrazen druhým. Tyto mutace je dále možno rozdělit na:
 - a) **Přechody** (transitions), při kterých je purinová báze nahrazena opět purinem a pyrimidinová báze pyrimidinem.
 - b) **Přesmyky** (transversions), při kterých je purinová báze nahrazena pyrimidinovou a pyrimidinová purinovou.
2. **Inzerčně-deleční mutace**, při kterých dojde k vypadnutí (deleci) nebo vložení (inzerci) jednoho nebo více párů bází ze sekvence DNA.

GENETICKÝ KÓD mRNA U PROKARYOT

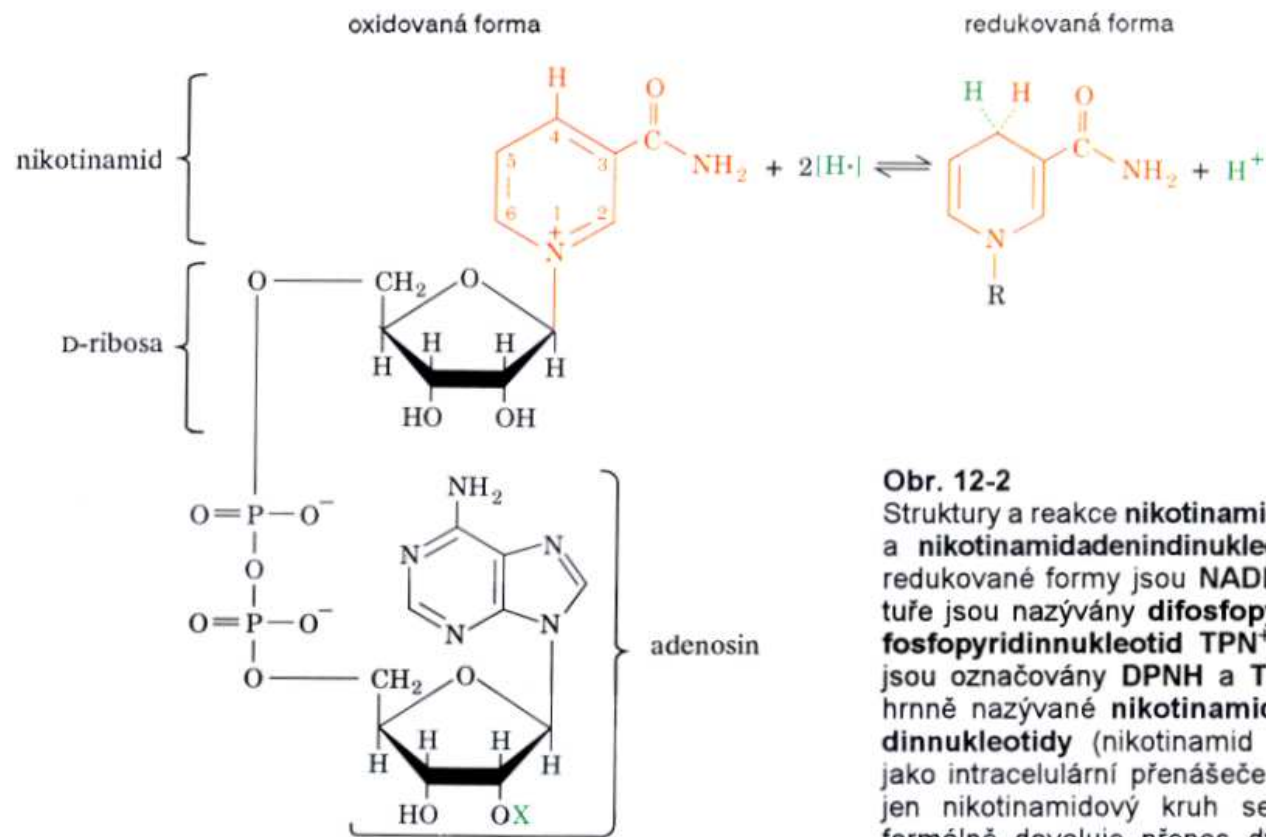
UUU	Phe	UCU	Ser	UAU	Tyr	UGU	Cys
UUC		UCC		UAC		UGC	
UUA	Leu	UCA	Ser	UAA	STOP	UGA	STOP
UUG		UCG		UAG		UGG	Trp
CUU	Leu	CCU	Pro	CAU	His	CGU	Arg
CUC		CCC		CAC		CGC	
CUA	Leu	CCA	Pro	CAA	Gln	CGA	Arg
CUG		CCG		CAG		CGG	
AUU	Ile	ACU	Thr	AAU	Asn	AGU	Ser
AUC		ACC		AAC		AGC	
AUA	Ile	ACA	Thr	AAA	Lys	AGA	Arg
AUG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

PŘEHLED AEROBNÍHO METABOLISMU



Obr. 15-3

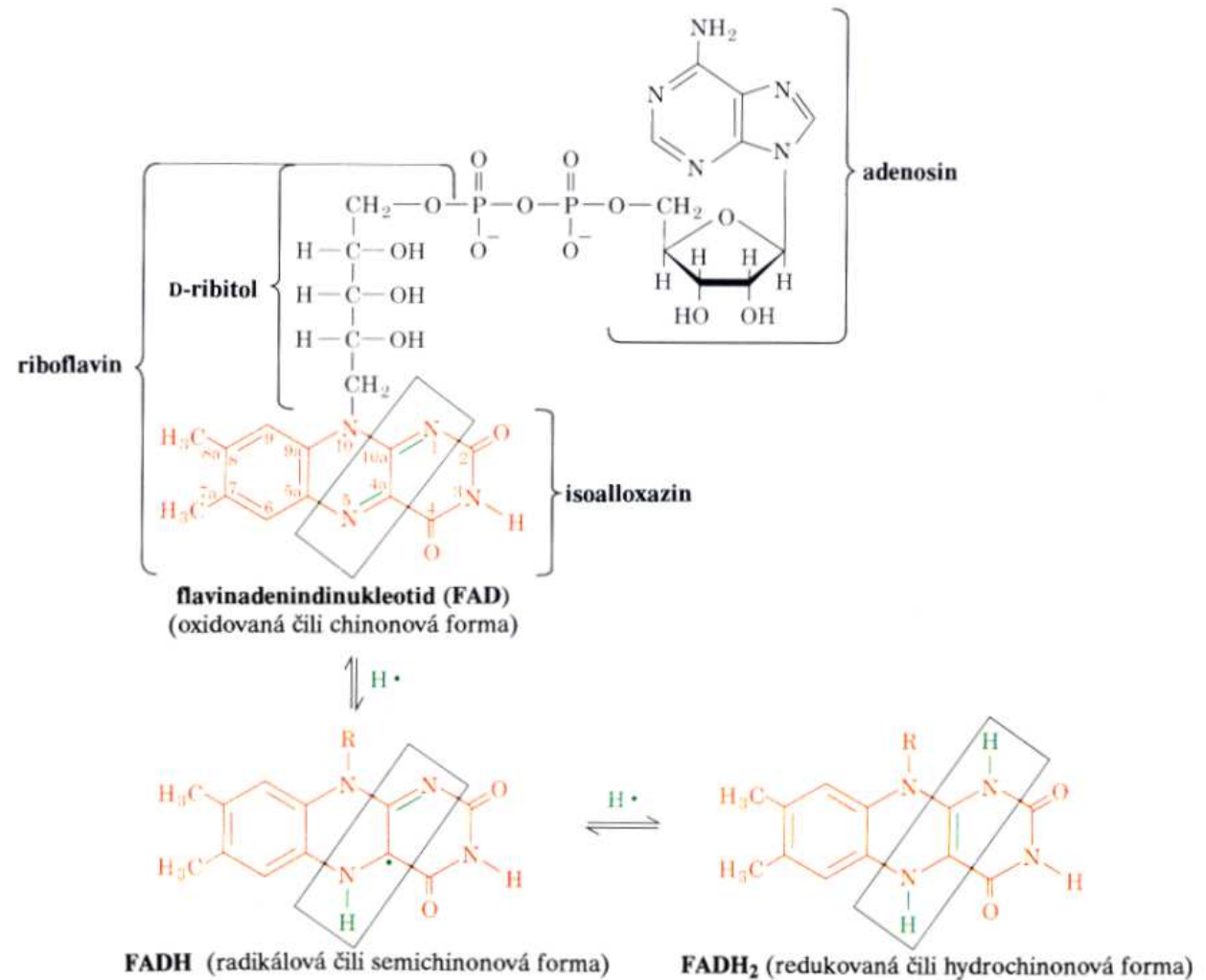
Složité metabolity, jako jsou sacharidy, lipidy a proteiny, jsou nejprve degradovány na své monomerní jednotky, hlavně glukosu, mastné kyseliny a aminokyseliny, a dále na společný meziprodukt – acetyl-CoA. Acetylová skupina je poté oxidována kyslíkem na oxid uhličitý přes citrátový cyklus za současné redukce NAD^+ a FAD . Reoxidace těchto koenzymů přes řetězec přenosu elektronů a oxidační fosforylaci vede ke vzniku vody a ATP.



X = H nikotinamidadenindinukleotid (NAD⁺)
 X = PO₃²⁻ nikotinamidadenindinukleotidfosfát (NADP⁺)

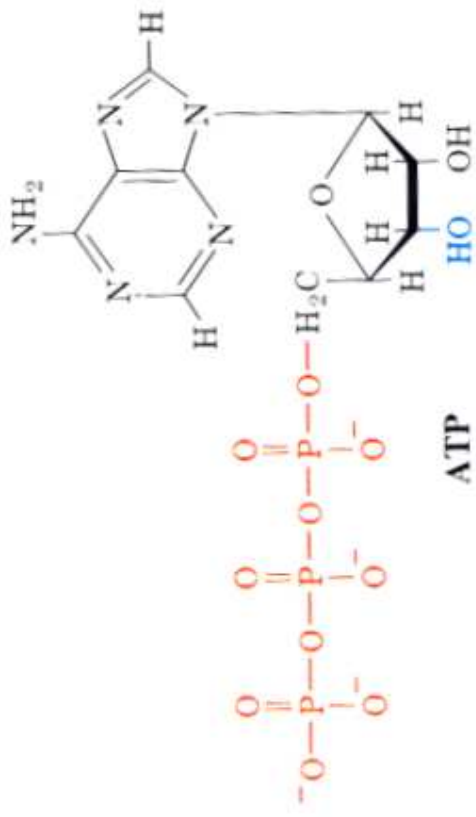
Obr. 12-2

Struktury a reakce **nikotinamidadenindinukleotidu (NAD⁺)** a **nikotinamidadenindinukleotidfosfátu (NADP⁺)**. Jejich redukována forma jsou **NADH** a **NADPH**. (V starší literatuře jsou nazývány **difosfopyridinnukleotid DPN⁺** a **trifosfopyridinnukleotid TPN⁺** a jejich redukována forma jsou označovány **DPNH** a **TPNH**.) Tyto sloučeniny souhrnně nazývané **nikotinamidové koenzymy** nebo **pyridinnukleotidy** (nikotinamid je derivát pyridinu) působí jako intracelulární přenašeče elektronů. Všimněme si, že jen nikotinamidový kruh se v reakci mění. Redukce formálně dovoluje přenos dvou vodíkových atomů (H[·]) ačkoli ve skutečnosti se redukce může uskutečňovat jiným mechanismem.



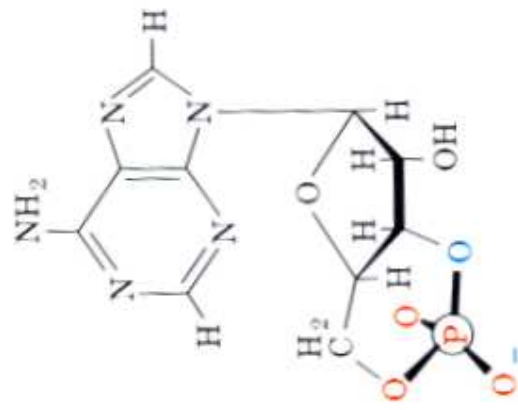
Obr. 14-27

Molekulový vzorec a reakce koenzymu flavinadenindinukleotidu (FAD). Termín "flavin" je totožný s isoalloxazinovým kruhovým systémem. Zbytek D-ribitolu je odvozen od cukru D-ribosy. FAD může být napůl redukován na stabilní radikál FADH[•] nebo plně redukován na FADH₂ (*obdělňky*). Proto každý enzym obsahující FAD se pohybuje mezi dvěma oxidačními stavy FAD. FAD je většinou pevně vázán na své enzymy tak, že tento koenzym je normálně spíše prostetickou skupinou než kosubstrátem, jak je tomu např. v případě NAD⁺.



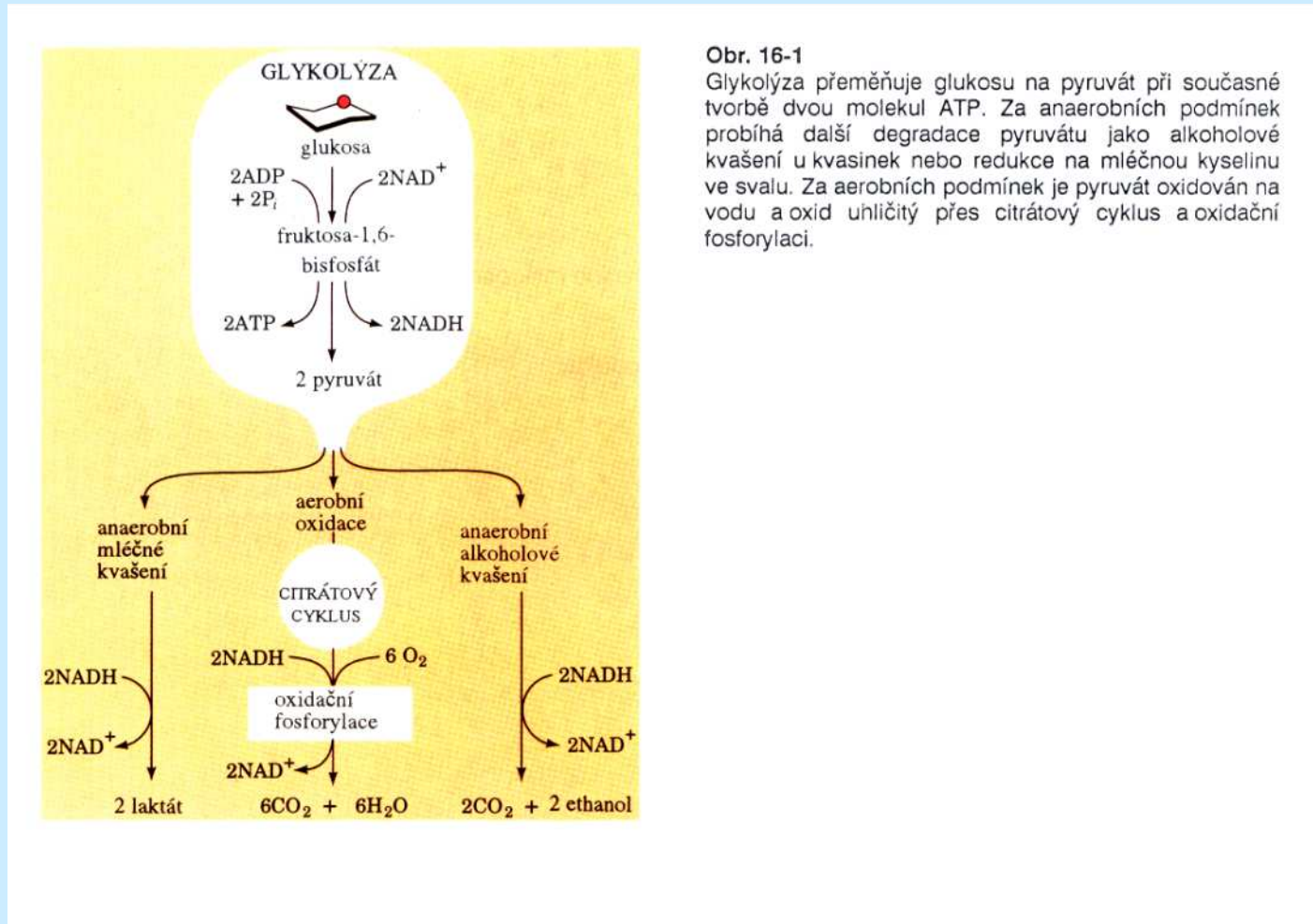
adenylátcyklasa

PP_i



3',5'-cyklický AMP

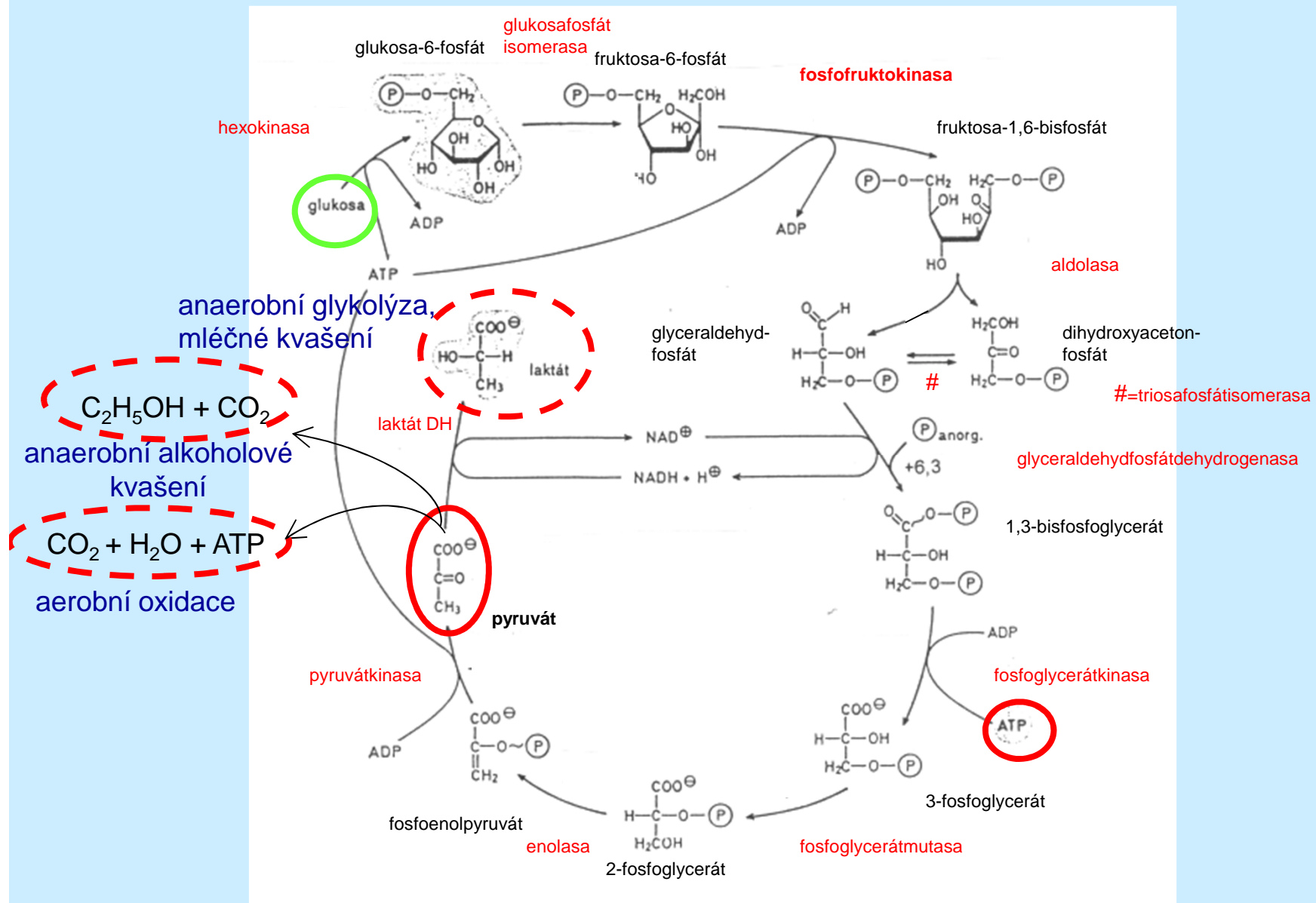
GLYKOLÝZA – VARIANTY A BILANCE



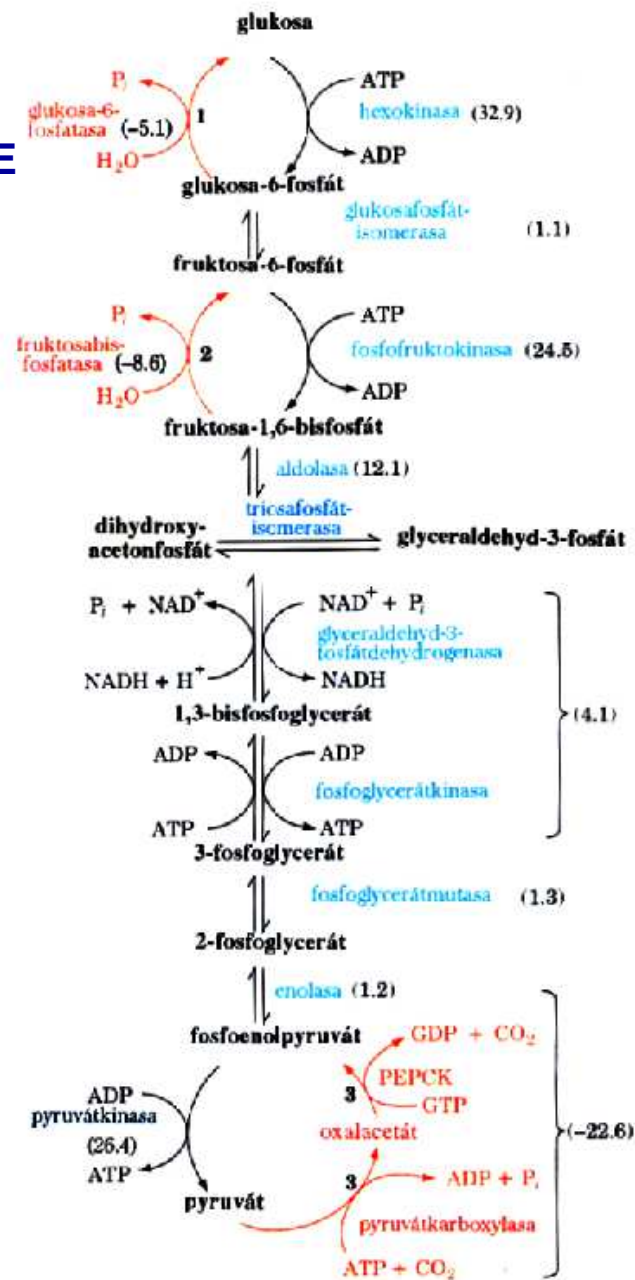
Obr. 16-1

Glykolýza přeměňuje glukosu na pyruvát při současné tvorbě dvou molekul ATP. Za anaerobních podmínek probíhá další degradace pyruvátu jako alkoholové kvašení u kvasinek nebo redukce na mléčnou kyselinu ve svalu. Za aerobních podmínek je pyruvát oxidován na vodu a oxid uhlíčitý přes citrátový cyklus a oxidační fosforylaci.

GLYKOLÝZA – PRŮBĚH



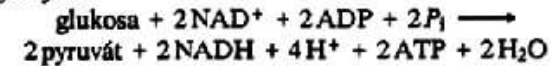
GLYKOLÝZA VS. GLUKONEOGENEZE



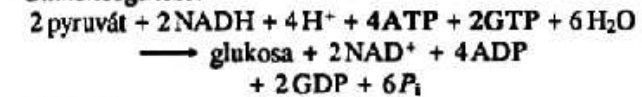
Obr. 21-7

Dráhy glukoneogeneze a glykolýzy. Tři očíslované kroky, které jsou v glukoneogenezi katalyzovány odlišnými enzymy, jsou označeny červenými šipkami. Změny Gibbsovy volné energie reakcí ve směru glukoneogeneze za fyziologických podmínek v játrech jsou uvedeny v závorkách v kJ/mol.

Glykolýza:



Glukoneogeneze:

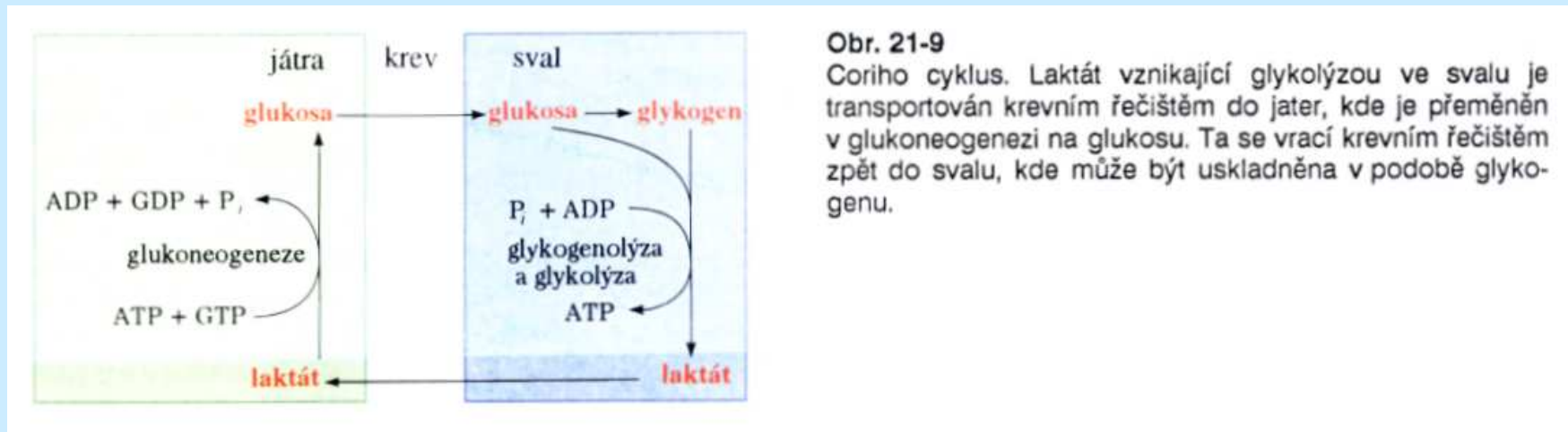


Celkově:



Takové ztráty volné energie v cyklickém procesu jsou termodynamicky nevyhnutelné. Jsou energetickou cenou, která musí být zaplácena za udržení nezávislé regulace obou drah.

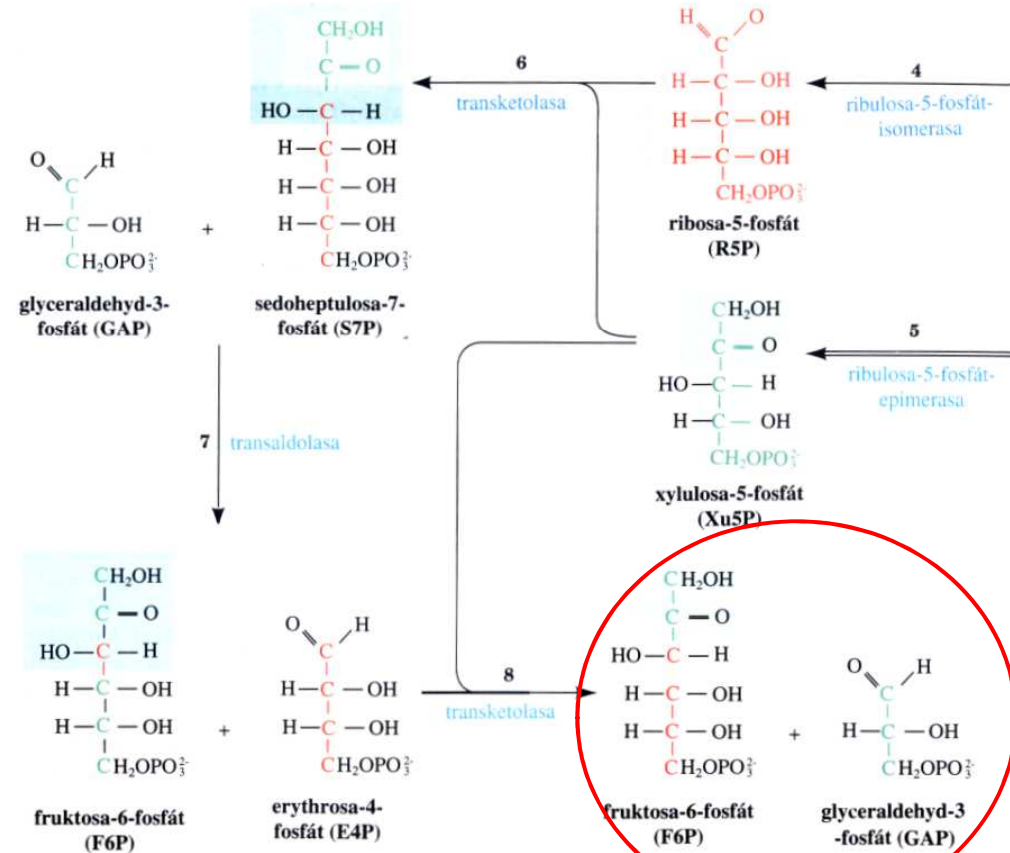
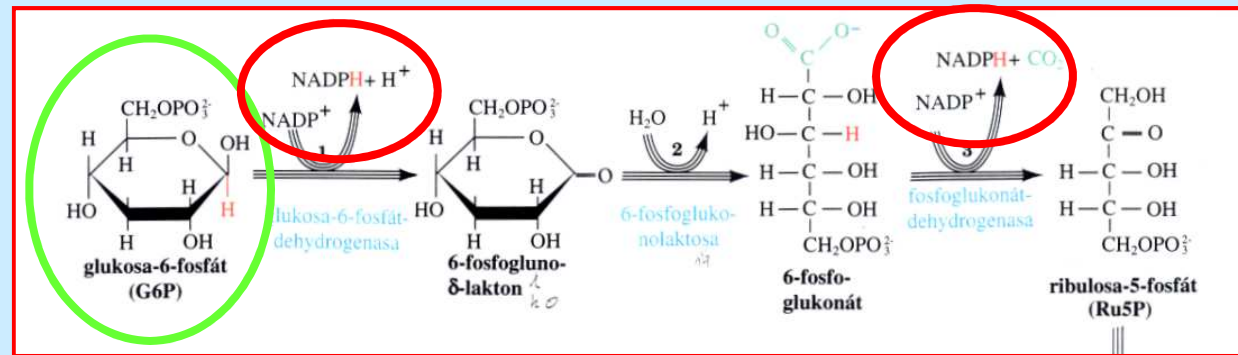
CORIHO CYKLUS



Obr. 21-9

Coriho cyklus. Laktát vznikající glykolýzou ve svalu je transportován krevním řečištěm do jater, kde je přeměněn v glukoneogenezi na glukosu. Ta se vrací krevním řečištěm zpět do svalu, kde může být uskladněna v podobě glykogenu.

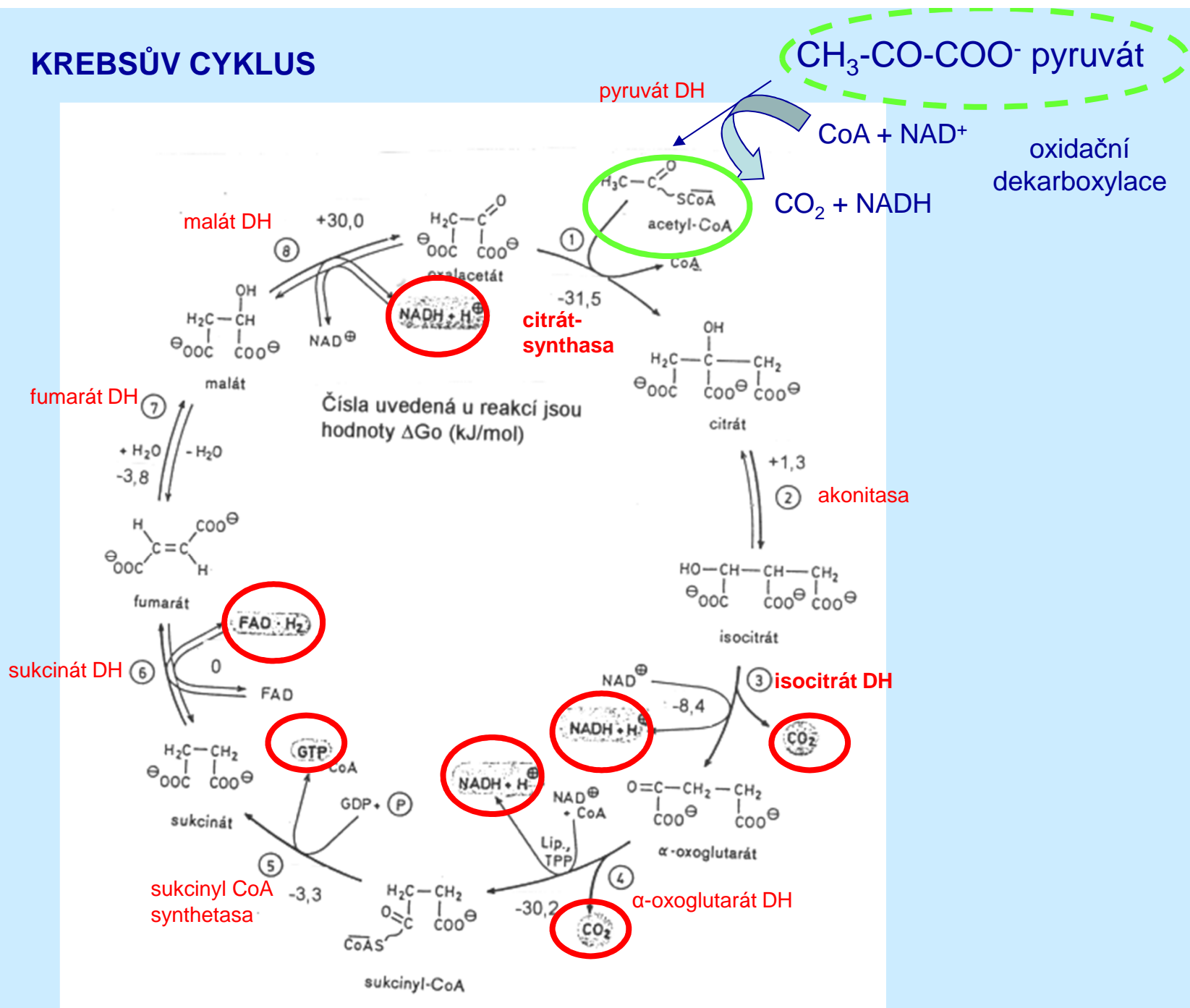
PENTOSOVÝ CYKLUS



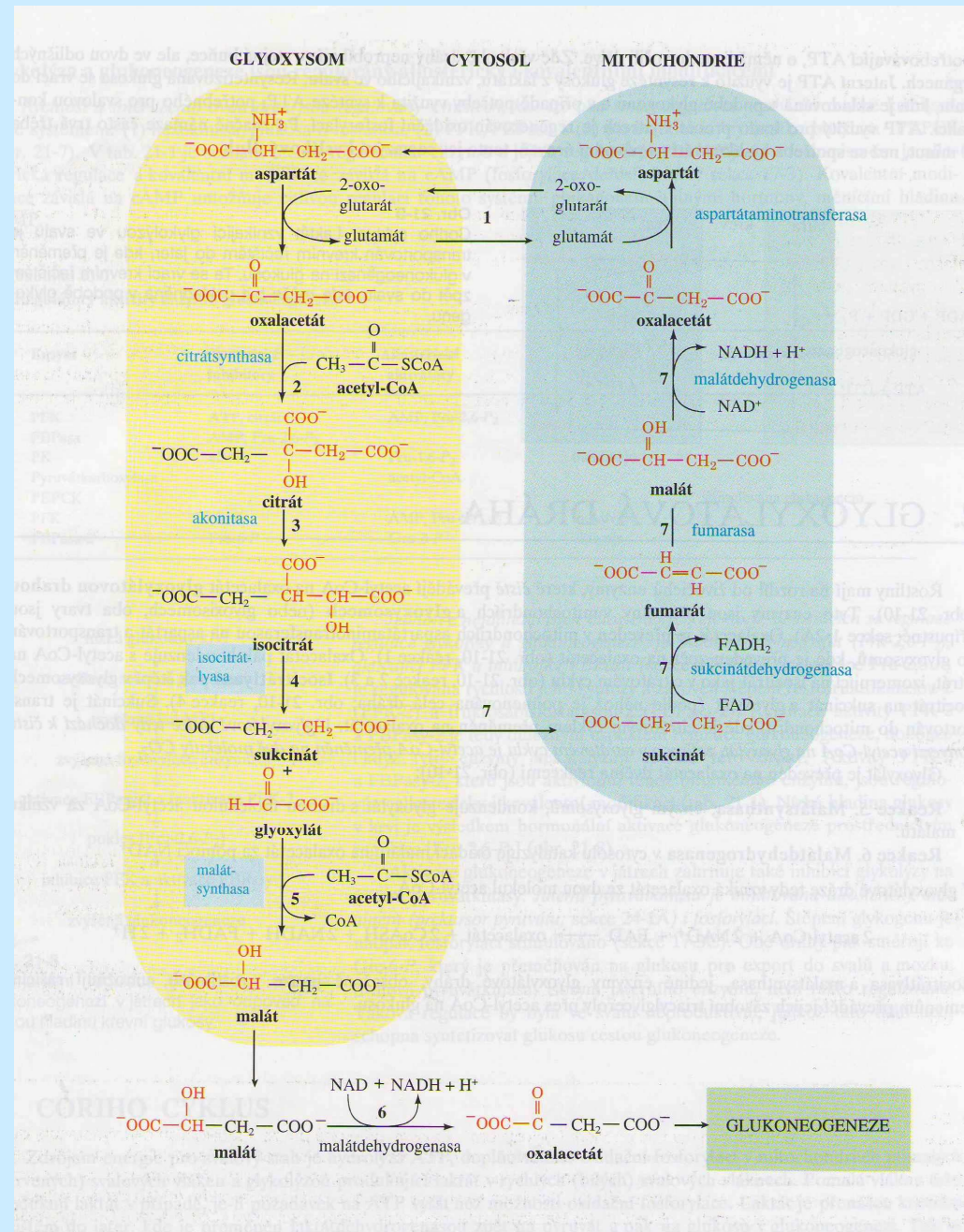
Obr. 21-22

Pentosový cyklus. Číslo u šipek znamená počet molekul vstupujících do cyklu během jedné obrátky, při přeměně třech molekul Glc-6-P na tři molekuly CO₂, dvě molekuly Fru-6-P a jednu molekulu Gra-3-P. Počínaje reakcí 3 jsou cukry pro větší názornost uvedeny lineárními (Fischerovými) vzorci. Uhlíková kostra Rbs-5-P a atomů od něho odvozených jsou znázorněny červeně. Jednotky C₂ přenášené transketolase jsou vyznačeny zeleně, jednotky C₃ přenášené transaldolase modře.

KREBSŮV CYKLUS

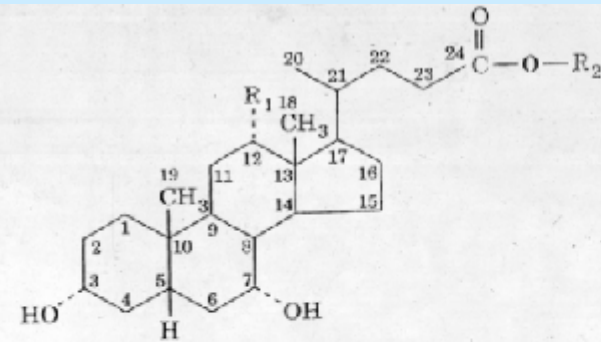


GLYOXYLÁTOVÁ DRÁHA

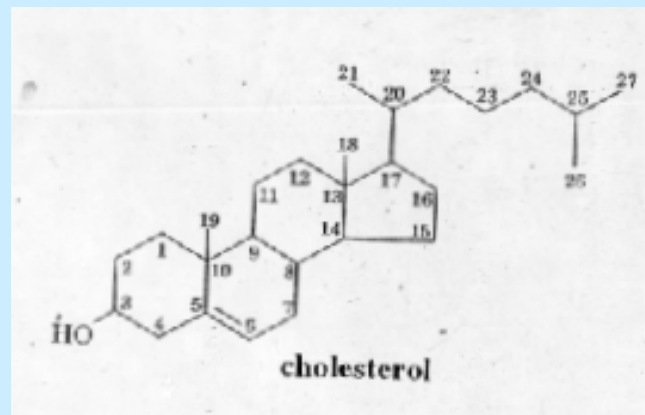


ŽLUČOVÉ KYSELINY A CHOLESTEROL

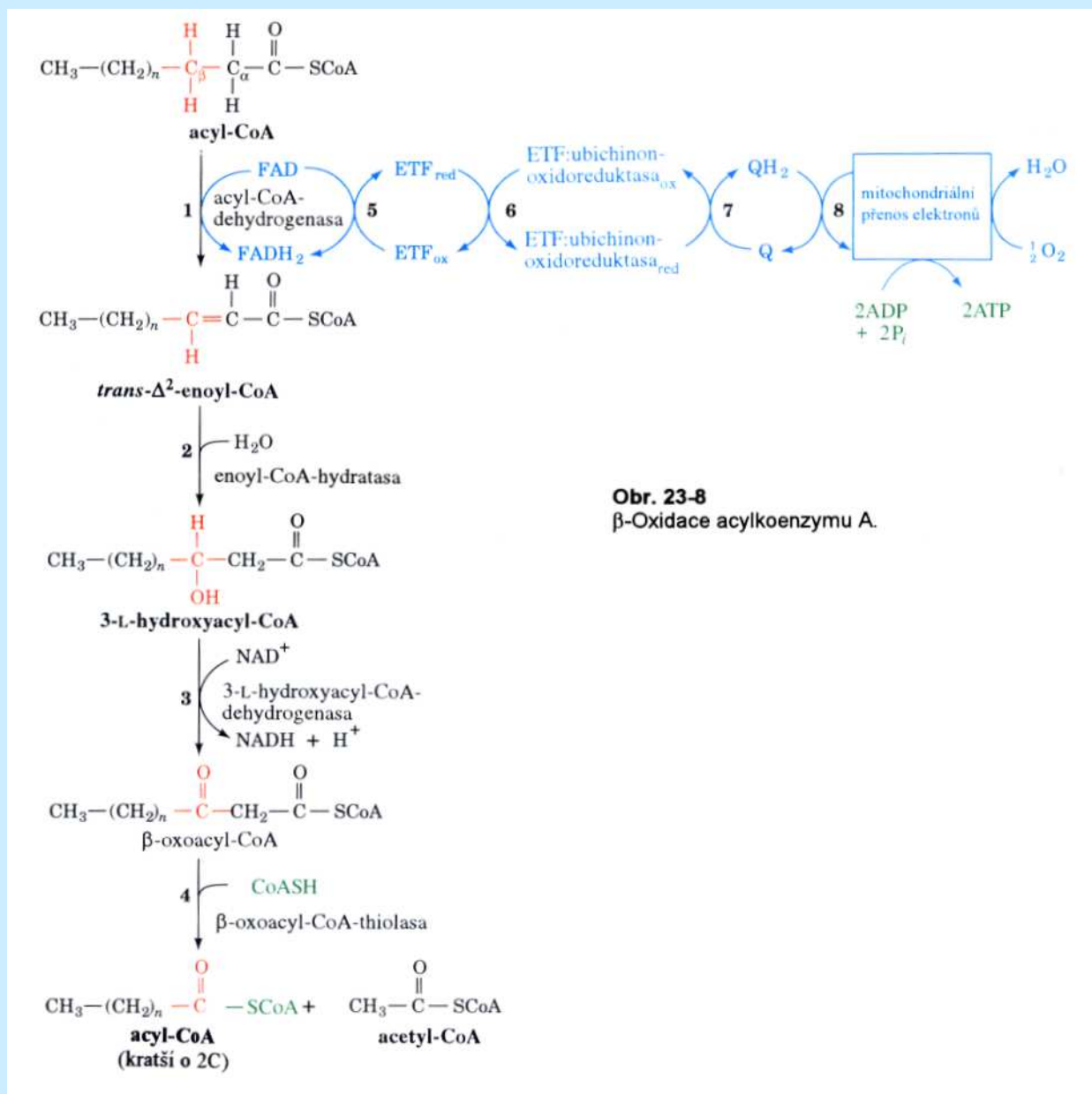
Obr. 23-52
 Struktura hlavních žlučových kyselin a jejich konjugátů s glycinem a s taurinem.



	$R_1 = OH$	$R_1 = H$
$R_2 = H$	cholová kyselina	chenodeoxycholová kyselina
$R_2 = NH - CH_2 - COOH$	glykocholová kyselina	glykochenodeoxycholová kyselina
$R_2 = NH - CH_2 - CH_2 - SO_3H$	taurocholová kyselina	taurochenodeoxycholová kyselina

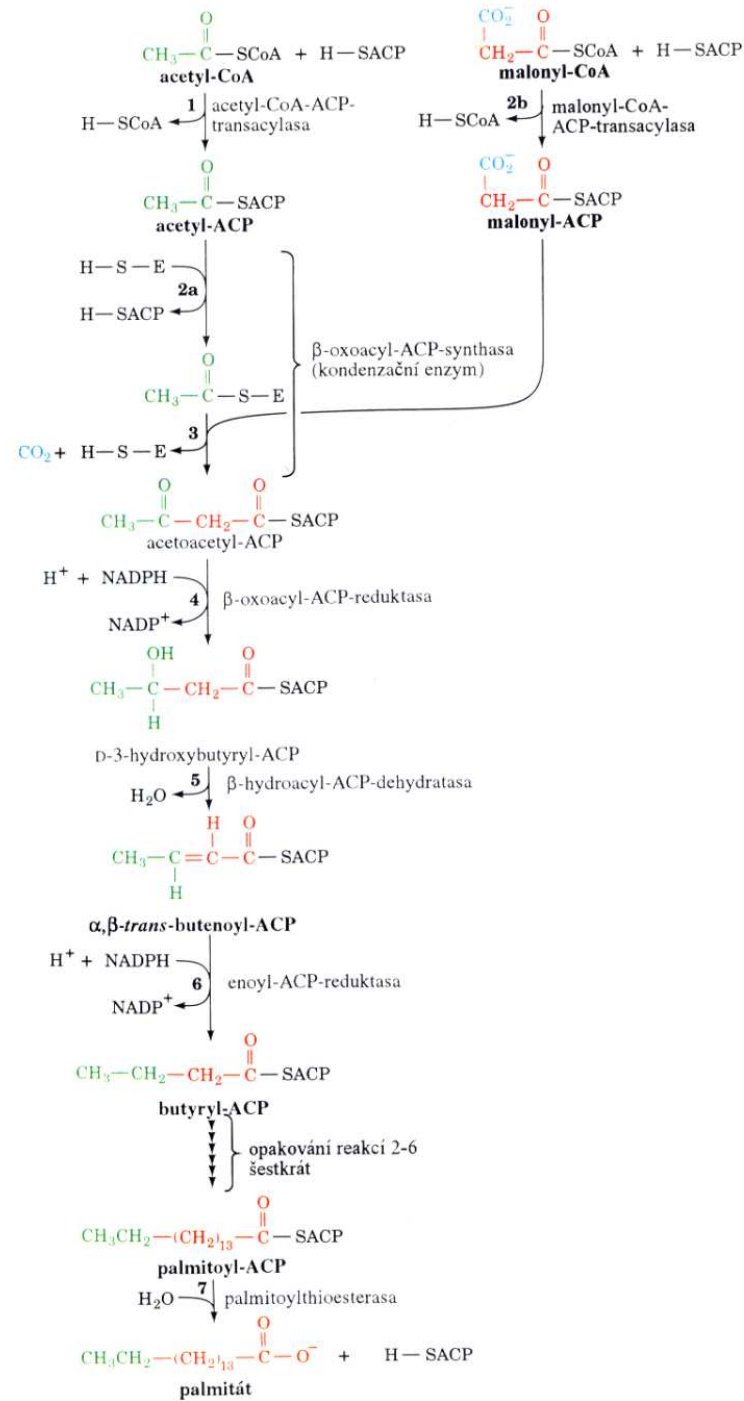


β-OXIDACE MASTNÝCH KYSELIN



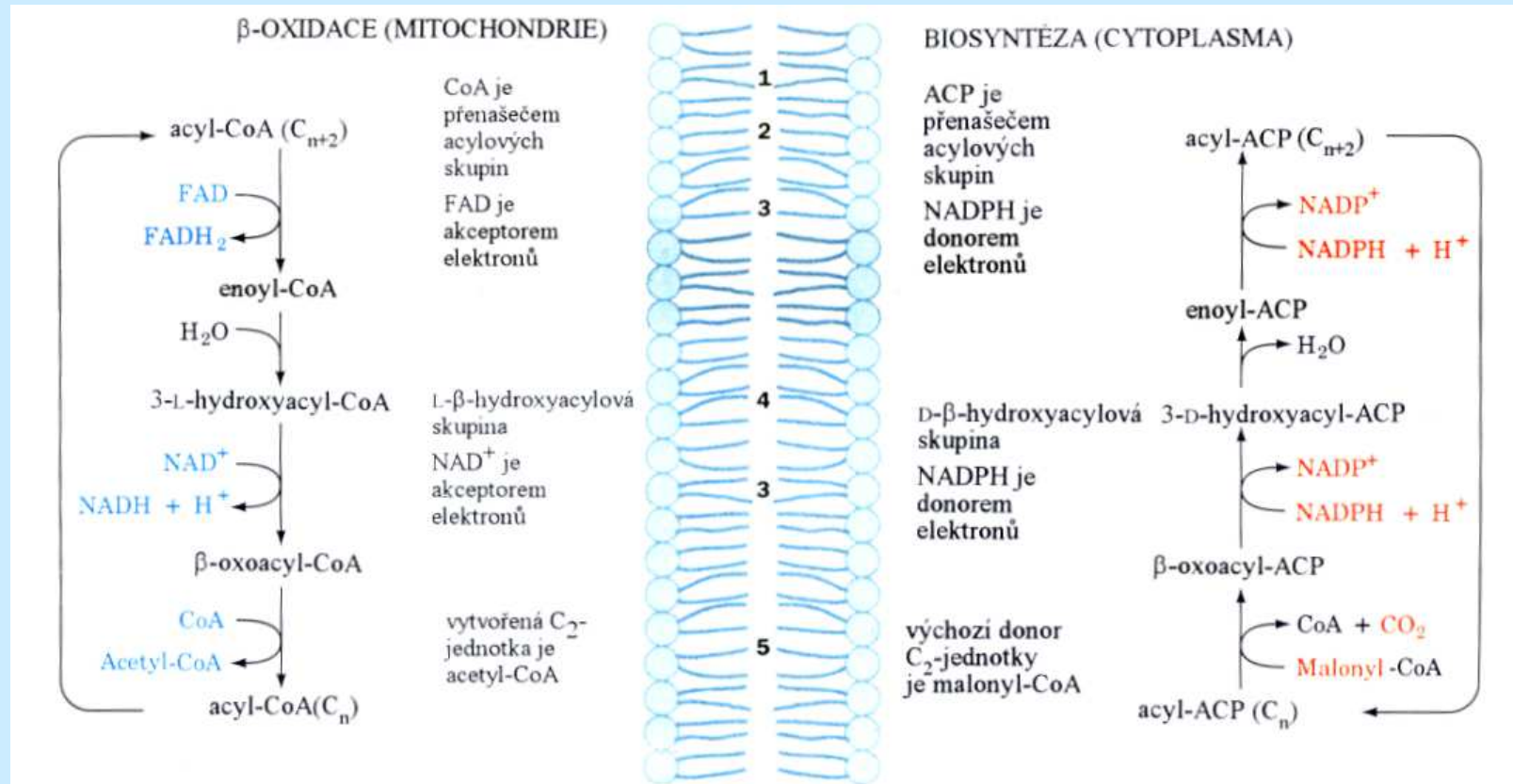
Obr. 23-8
β-Oxidace acylkoenzymu A.

BIOSYNTÉZA MASTNÝCH KYSELIN



Obr. 23-26
Pořadí reakcí při biosyntéze mastných kyselin. Při tvorbě palmitátu se opakuje sedm cyklů prodloužení řetězce o C_2 , načež následuje finální hydrolytický krok.

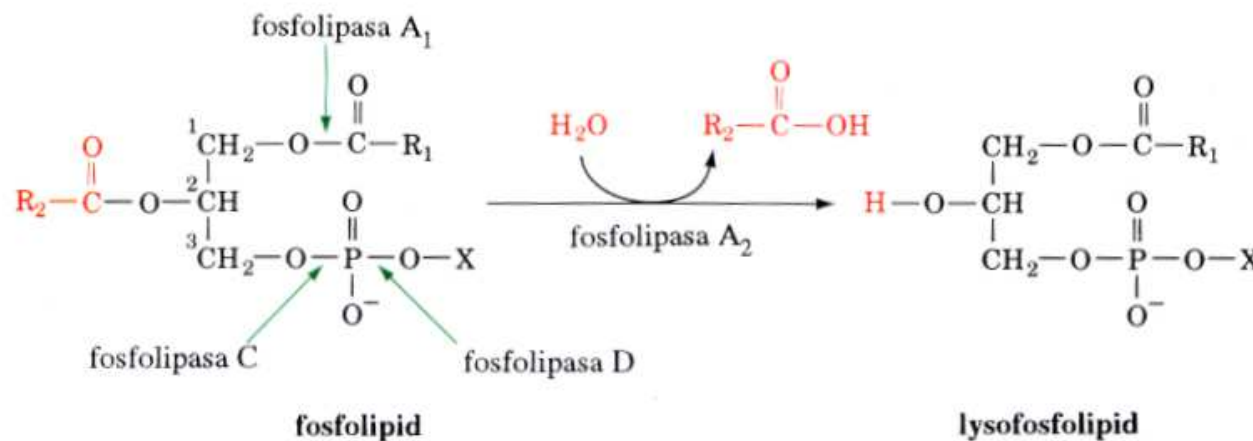
ROZDÍLY MEZI β -OXIDACÍ A BIOSYNTÉZOU MASTNÝCH KYSELIN



Obr. 23-23

Znázornění rozdílů mezi drahami β -oxidace a biosyntézy mastných kyselin se zvláštním zřetelem na: **(1)** umístění v buňce, **(2)** přenašeč acylové skupiny, **(3)** akceptor/donor elektronů, **(4)** stereochemii hydratační a dehydratační reakce a **(5)** formu, v jaké jsou tvořeny nebo poskytovány jednotky C₂.

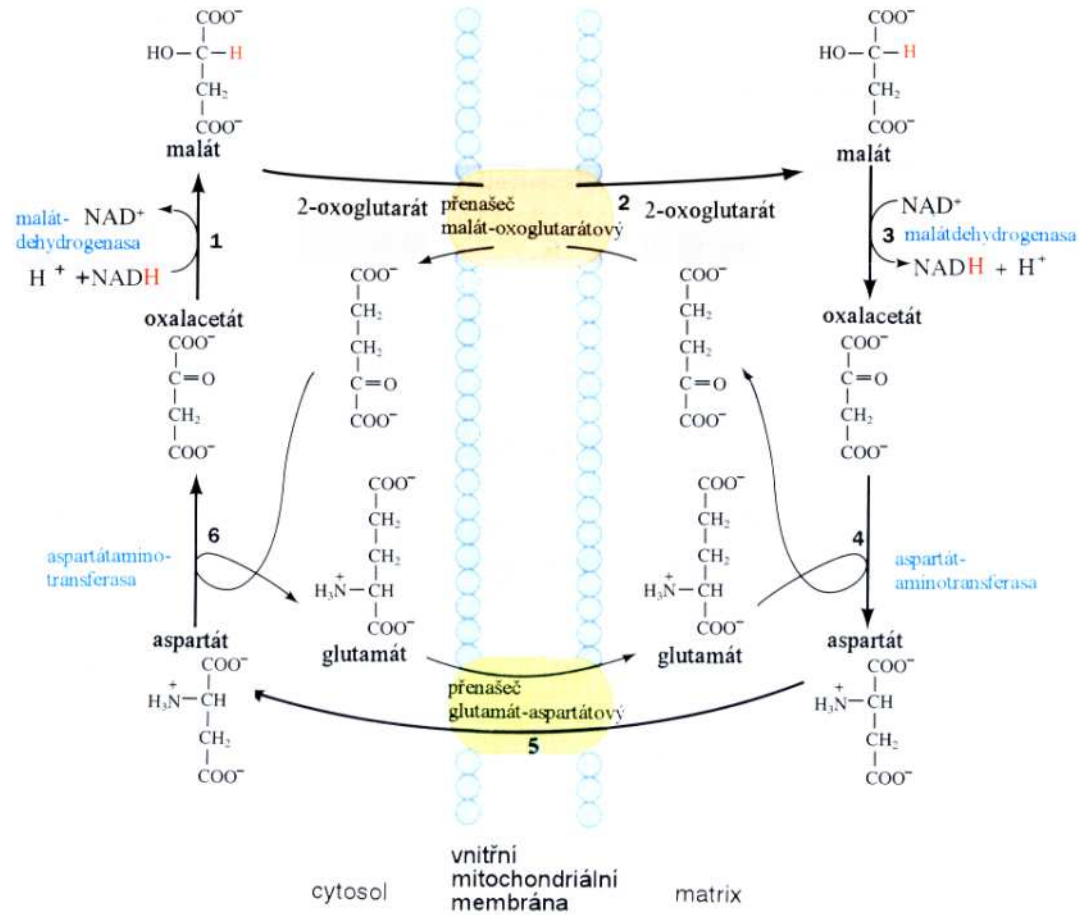
ŠTĚPĚNÍ FOSFOLIPIDŮ: FOSFOLIPASY



Obr. 23-1

Fosfolipasa A₂ hydrolyticky odštěpuje C₍₂₎-zbytek mastné kyseliny z triacylglycerolu za vzniku odpovídajícího lysofosfolipidu. Jsou vyznačeny také vazby hydrolyzované jinými typy fosfolipas, které jsou nazývány podle jejich účinků.

TRANSPORT ELEKTRONŮ DO MITOCHONDIÁLNÍ MATRIX

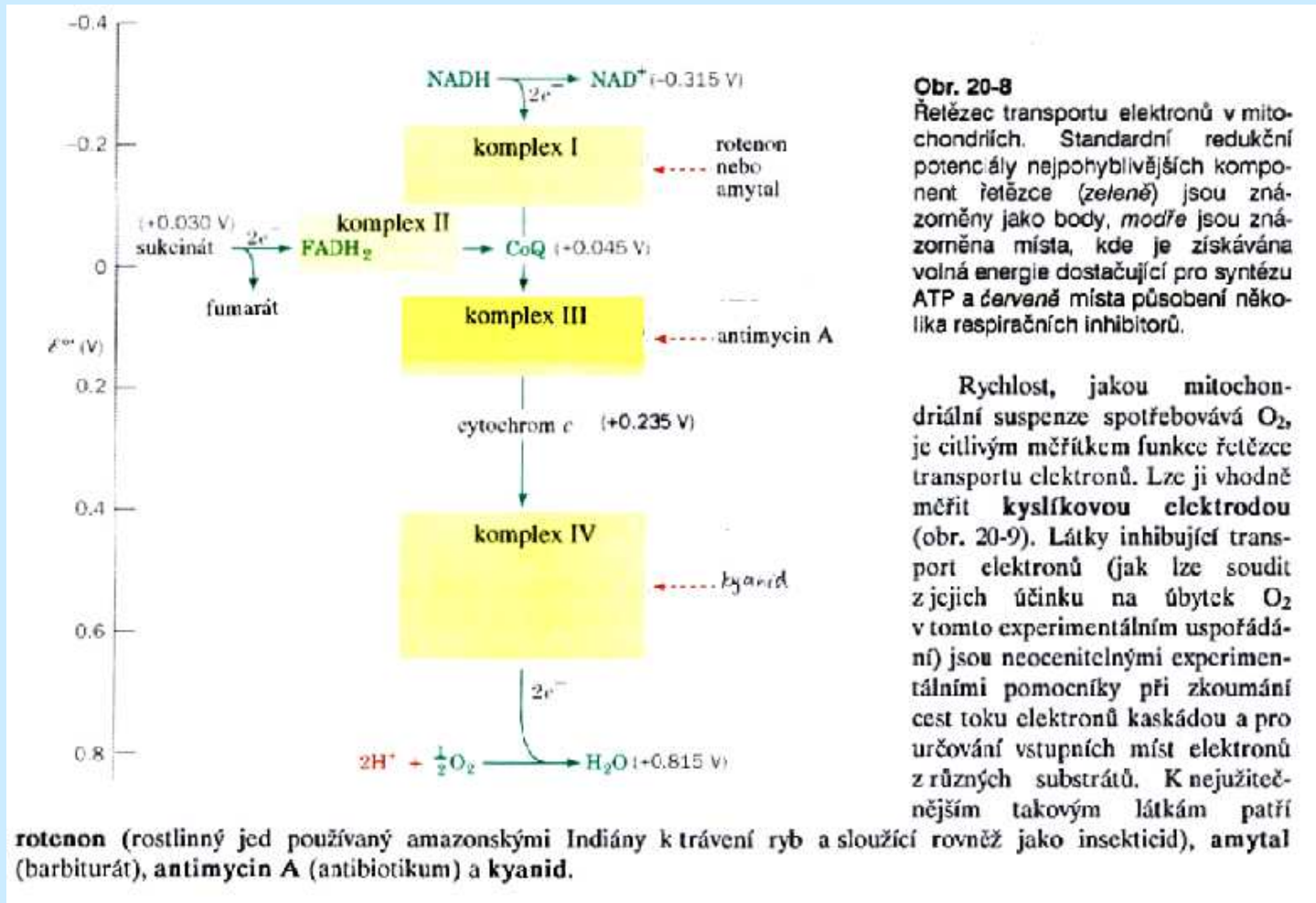


Obr. 20-7

Malát–aspartátové kyvadlo. Transport elektronů z cytosolového NADH na mitochondriální NADH (znázorněno červeně jako přenos hydridu) v krocích 1 až 3. Během kroků 4 až 6 pak dochází k regeneraci cytosolového oxalacetátu.

Respirační řetězec

RESPIRAČNÍ ŘETĚZEC

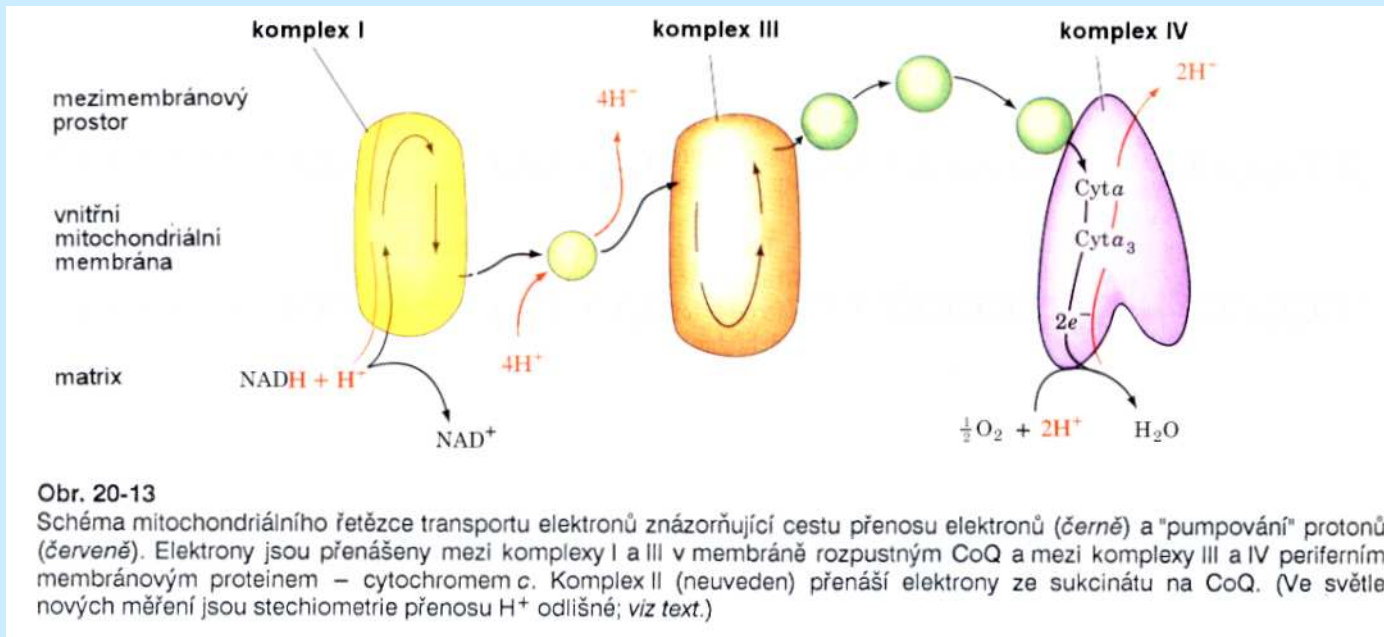


Obr. 20-8
Řetězec transportu elektronů v mitochondriích. Standardní redukční potenciály nepohyblivějších komponent řetězce (zeleně) jsou znázorněny jako body, modře jsou znázorněna místa, kde je získávána volná energie dostačující pro syntézu ATP a červeně místa působení několika respiračních inhibitorů.

Rychlost, jakou mitochondriální suspenze spotřebovává O₂, je citlivým měřítkem funkce řetězce transportu elektronů. Lze ji vhodně měřit kyslíkovou elektrodou (obr. 20-9). Látky inhibující transport elektronů (jak lze soudit z jejich účinku na úbytek O₂ v tomto experimentálním uspořádání) jsou neocenitelnými experimentálními pomocníky při zkoumání cest toku elektronů kaskádou a pro určování vstupních míst elektronů z různých substrátů. K nejužitečnějším takovým látkám patří

Tvorba ATP probíhá za katalýzy ATPasy díky gradientu [H⁺], vytvořenému komplexy I, IV a CoQ

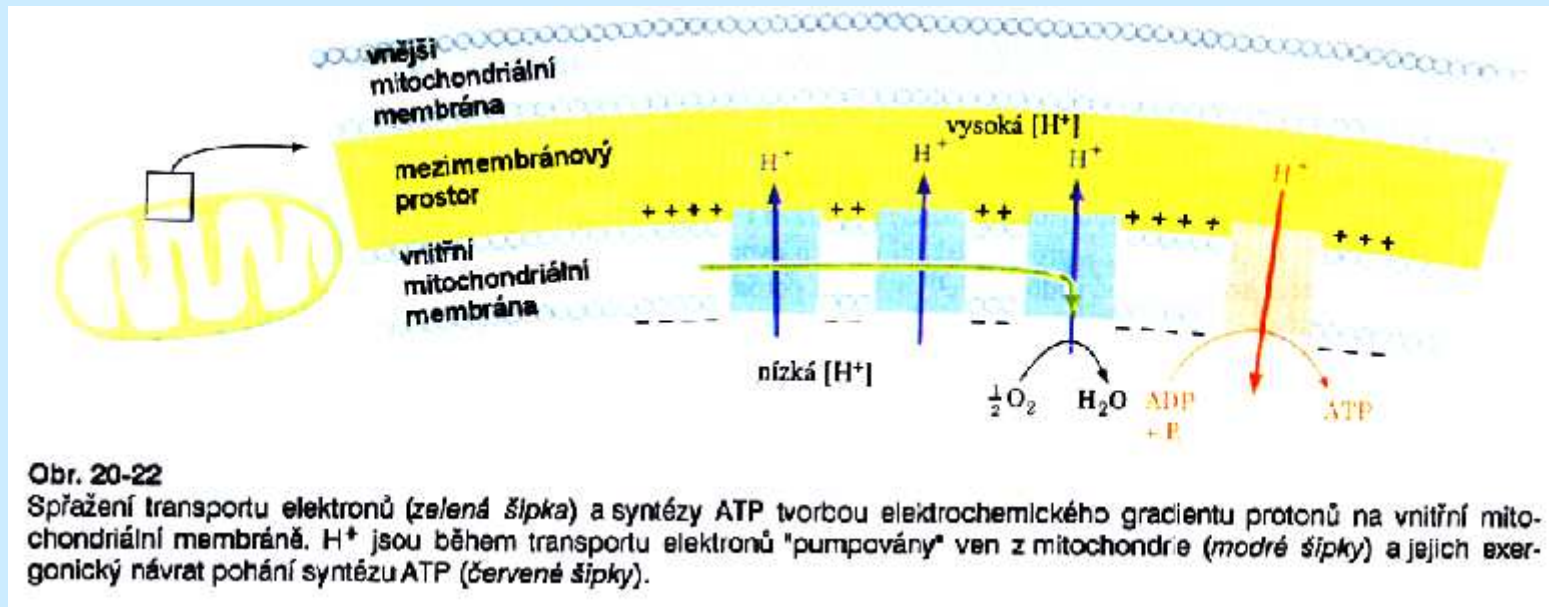
RESPIRAČNÍ ŘETĚZEC



Obr. 20-13

Schéma mitochondriálního řetězce transportu elektronů znázorňující cestu přenosu elektronů (černě) a "pumpování" protonů (červeně). Elektrony jsou přenášeny mezi komplexy I a III v membráně rozpustným CoQ a mezi komplexy III a IV periferním membránovým proteinem – cytochromem c. Komplex II (neuveden) přenáší elektrony ze sukcinátu na CoQ. (Ve světle nových měření jsou stechiometrie přenosu H^+ odlišné; viz text.)

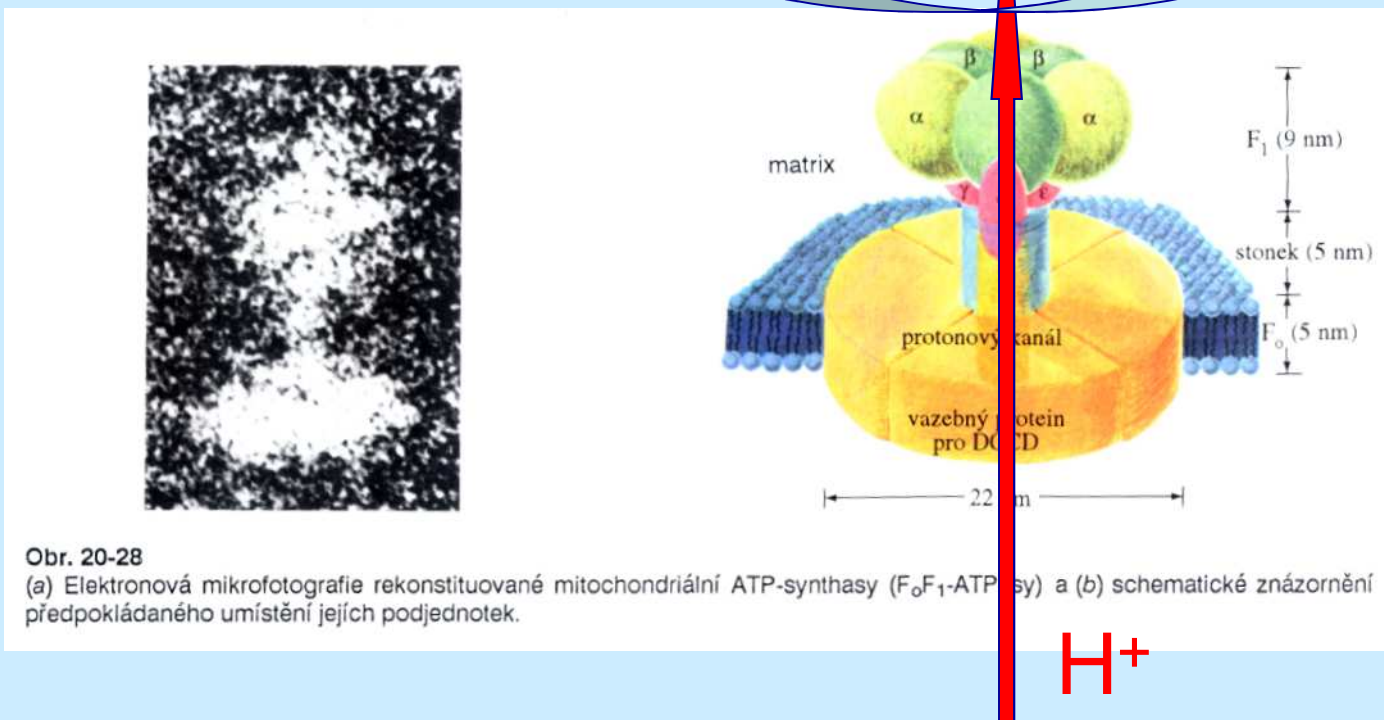
RESPIRAČNÍ ŘETĚZEC



RESPIRAČNÍ ŘETĚZEC – TVORBA ATP

ADP + P_i

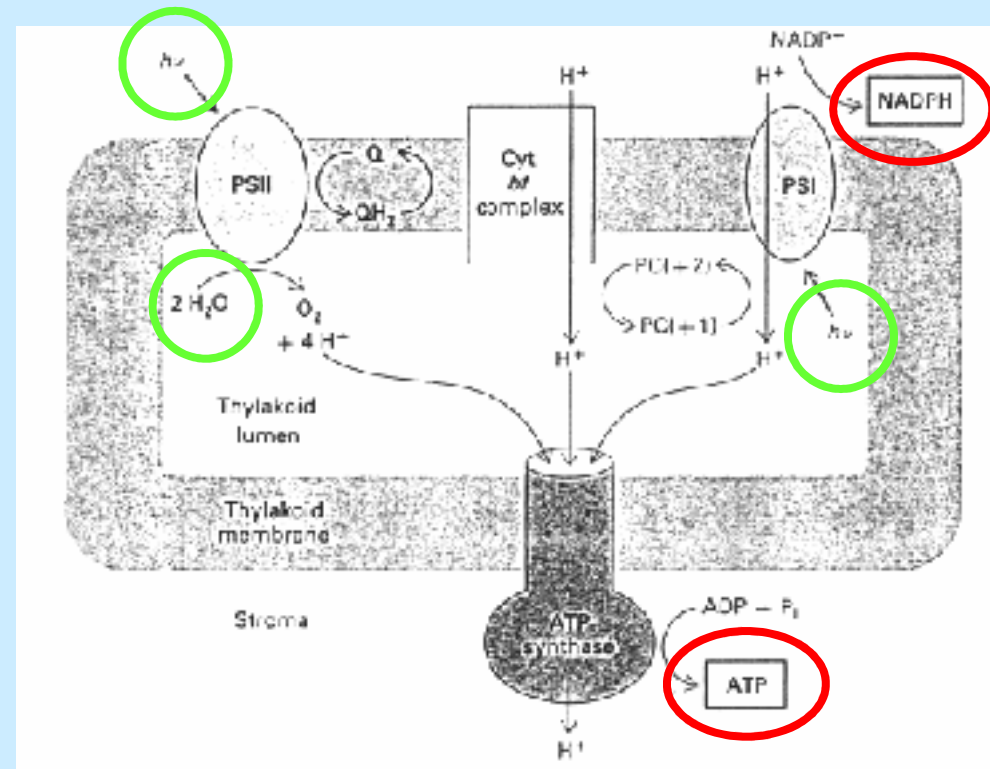
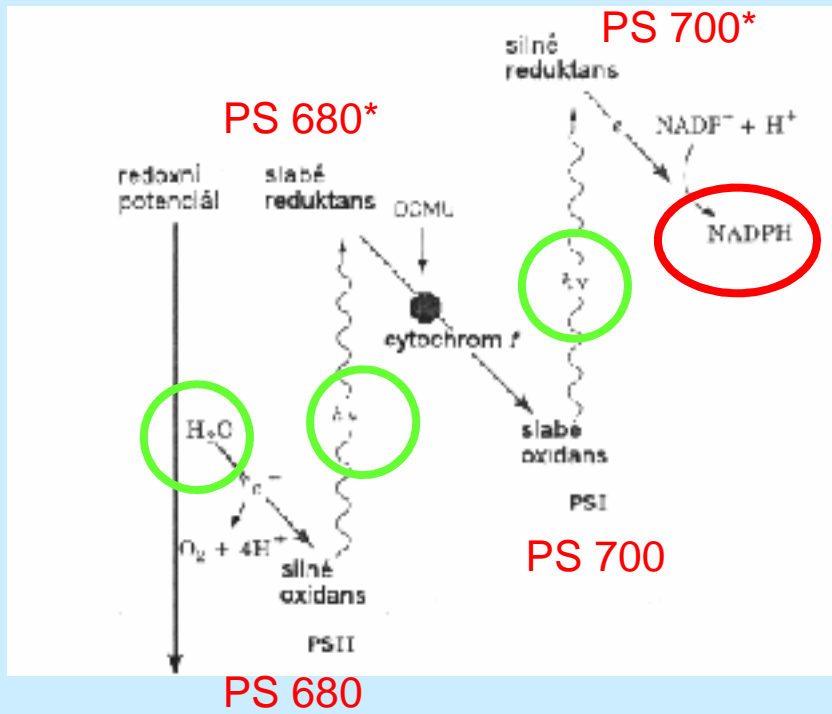
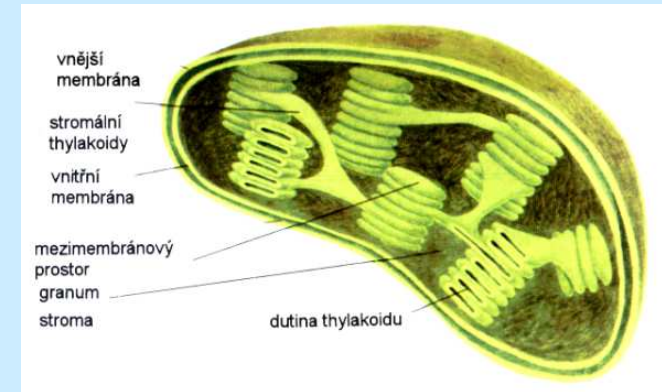
ATP



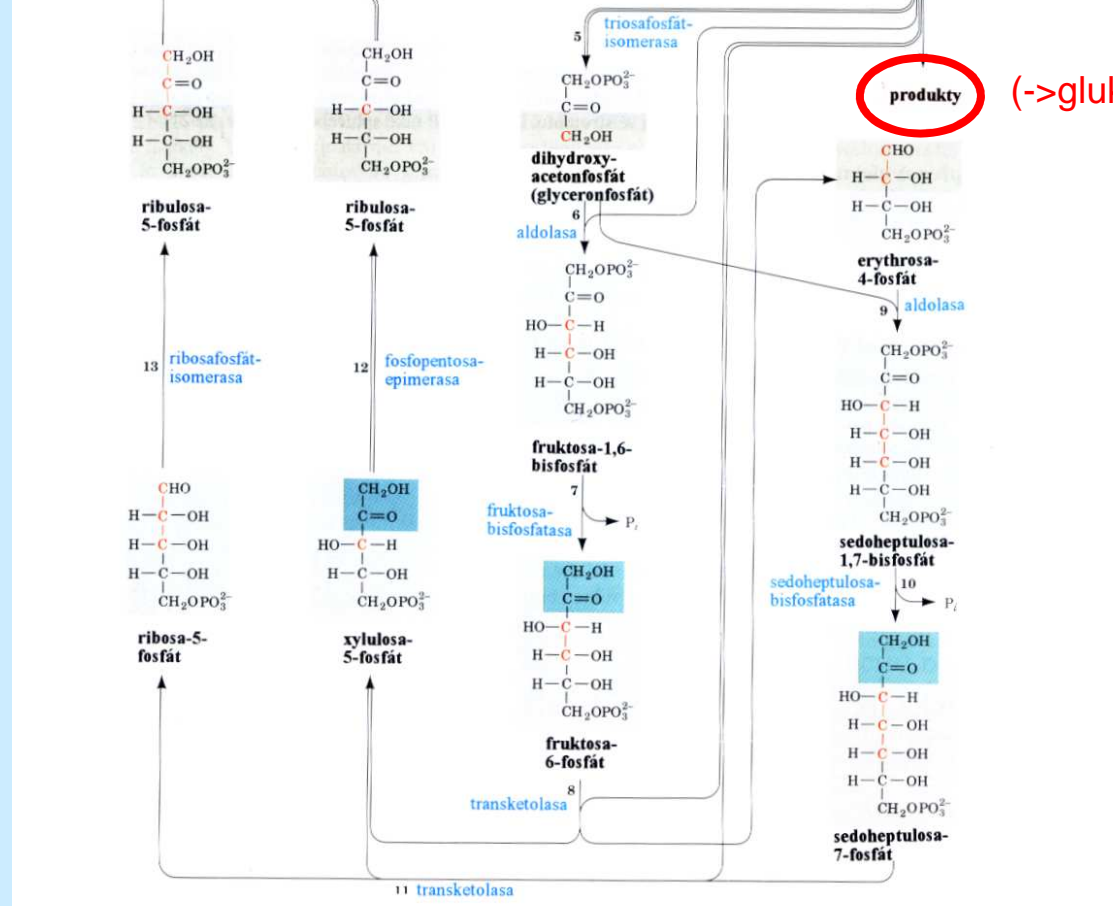
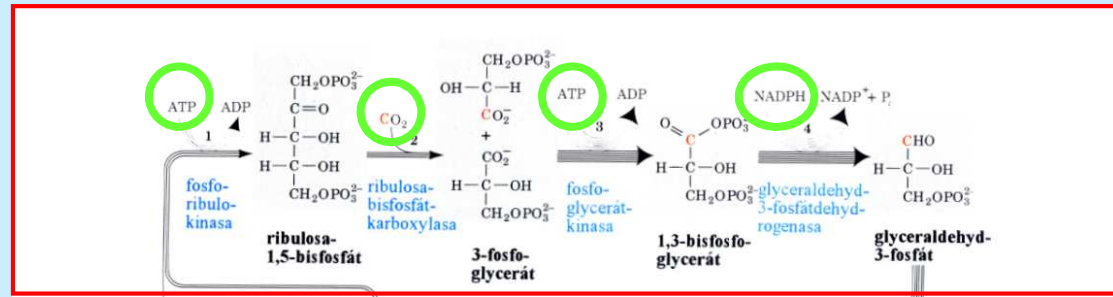
Obr. 20-28

(a) Elektronová mikrofotografie rekonstituované mitochondriální ATP-synthasy (F_oF₁-ATP-asy) a (b) schematické znázornění předpokládaného umístění jejích podjednotek.

FOTOSYNTÉZA: 1. SVĚTELNÁ FÁZE

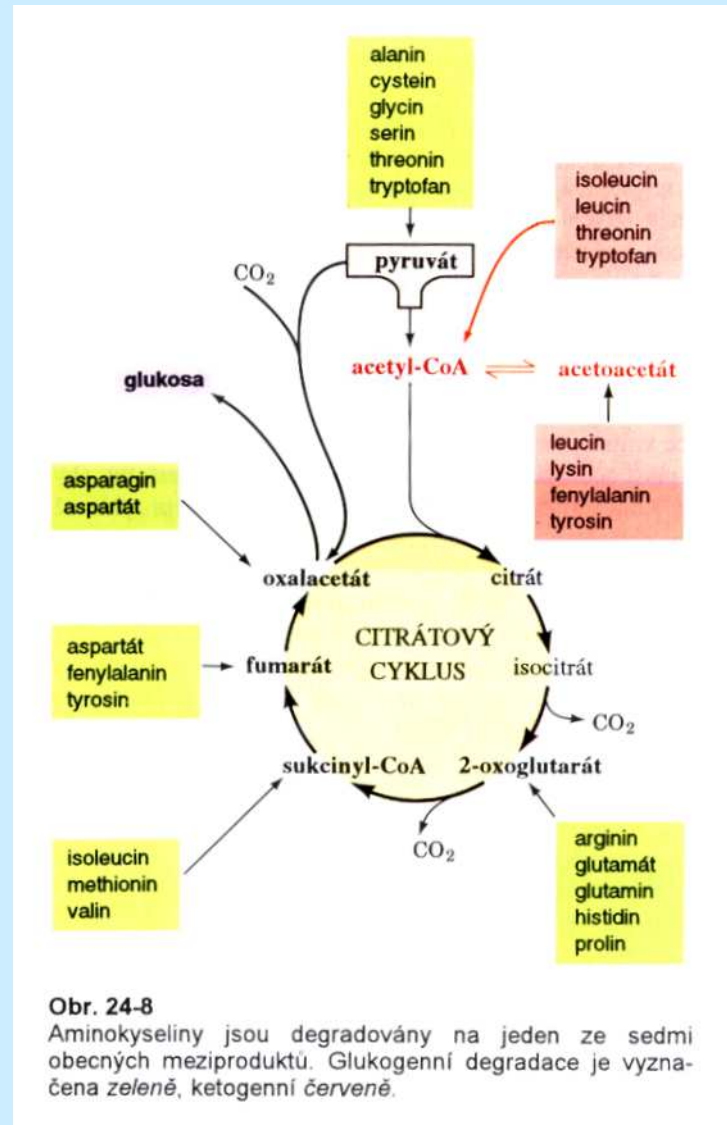


FOTOSYNTÉZA: 2. TEMNOSTNÍ FÁZE= CALVINŮV CYKLUS (tvorba glukosy)



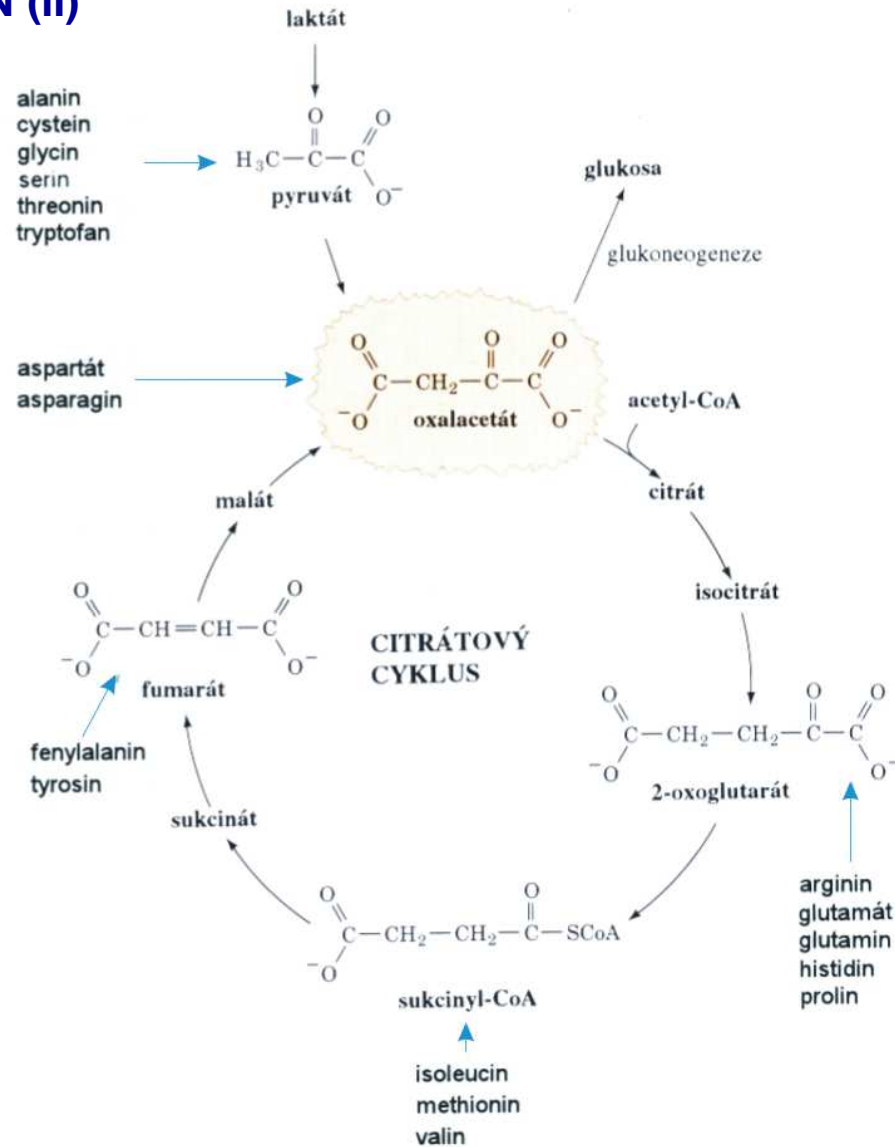
Obr. 22-23 Calvinův cyklus. Počet čar v jednotlivých šipkách udává, kolik molekul musí v daném kroku reagovat, aby se uskutečnila jedna úplná otočka cyklu, která ze tří molekul CO₂ vytvoří jednu molekulu Gra-3-P. Pro přehlednost jsou pro všechny cukry uvedeny lineární vzorce, i když hexosy a heptosy existují převážně v cyklických formách (sekce 10-1B). V polohách, jejichž uhlíky jsou vyznačeny červeně, bude ¹⁴C po jedné otočce cyklu s ¹⁴CO₂ jako substrátem.

METABOLISMUS AMINOKYSELIN



Obr. 24-8
 Aminokyseliny jsou degradovány na jeden ze sedmi obecných meziproduktů. Glukogenní degradace je vyznačena zeleně, ketogenní červeně.

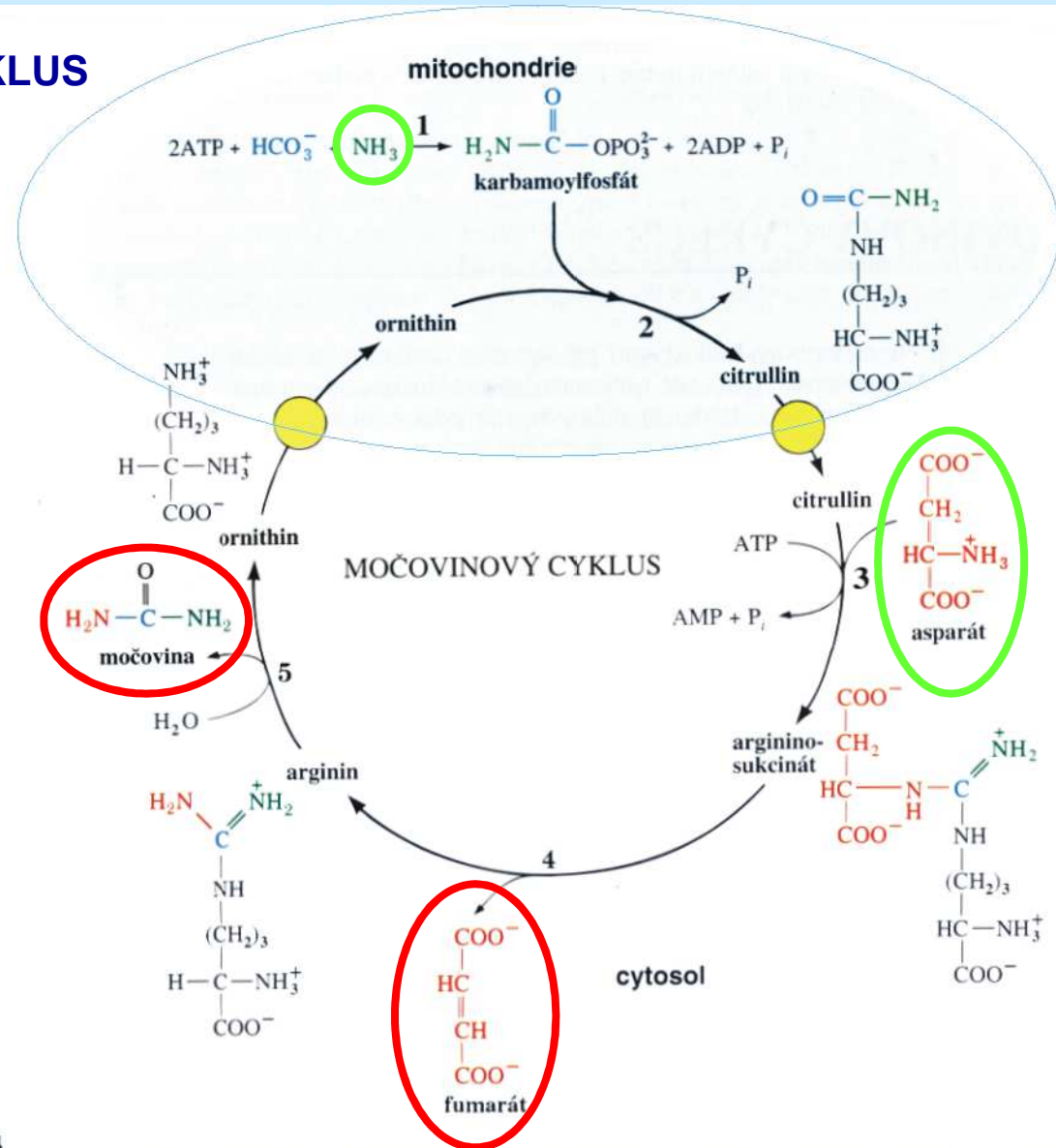
METABOLISMUS AMINOKYSELIN (II)



Obr. 21-1

Metabolické dráhy vzniku oxalacetátu z laktátu, pyruvátu a intermediátů citrátového cyklu. Všechny aminokyseliny kromě leucinu a lysinu mohou být těmito reakcemi převedeny na oxalacetát a dále na glukosu.

MOČOVINOVÝ CYKLUS



Obr. 24-4

Močovinový cyklus probíhá částečně v mitochondriích a částečně v cytosolu, přičemž ornithin a citrullin jsou přes mitochondriální membránu přenášeny specifickými transportními systémy. Cyklus se účastní pět enzymů: (1) karbamoylfosfátsynthetasa, (2) ornithin-karbamoyltransferasa, (3) argininosukcinátsynthetasa, (4) argininosukcinátlyasa a (5) arginasa.