

BIOCHEMIE I - SEMINÁŘ

Vyučující:

Doc. Mgr. Pavel Bouchal, Ph.D.

Mgr. Kateřina Dadáková, Ph.D.

Mgr. Zdeněk Farka, Ph.D.

Mgr. Marta Pelcová, Ph.D.

Mgr. Vojtěch Sedláček, Ph.D.

Garant předmětu:

Doc. Mgr. Pavel Bouchal, Ph.D.

PROGRAM SEMINÁŘE

- Úvod, přehled aminokyselin 14.9.2021
- Acidobazické vlastnosti AK, peptidy 21.9.
- Bílkoviny I 5.10.
- Bílkoviny II 12.10.
- Test 1 19.10.
- Termodynamika enzymových reakcí 26.10.
- Úvod do enzymové kinetiky 2.11.
- Sacharidy a lipidy – struktura 9.11.
- Test 2 16.11.
- Metabolismus sacharidů 23.11.
- Metabolismus lipidů, citrátový cyklus 30.11.
- Respirační řetězec a fotosyntéza 7.12.
- Test 3 14.12.

LITERATURA

- Elektronická skripta Úlohy z biochemie, V. Mikeš
- Prezentace
(IS MU: Studijní materiály/Učební materiály)

PODMÍNKY ZÍSKÁNÍ ZÁPOČTU

- Účast ve výuce: povolena 1 neomluvená absence (další případné absence => omluva **přes studijní oddělení**)
- Testy (3), min. 70 % z **celkového** počtu bodů => zápočet v řádném termínu
- V případě omluvené absence v době testu nárok na nahrazovací termín testu – jeden termín první týden v lednu
- Souhrnný test z učiva celého předmětu => zápočet v 1. (2.) opravném termínu

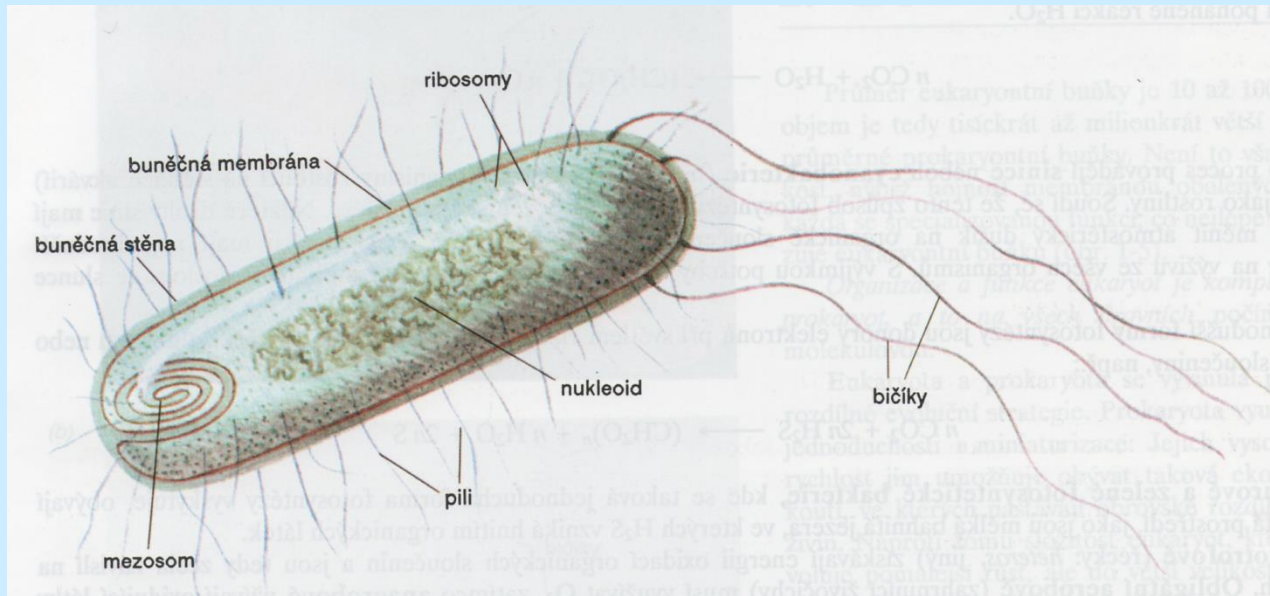
Zdroje obrázků:

Voet D., Voetová J.G.: Biochemie. Victoria Publishing Praha, 1995.

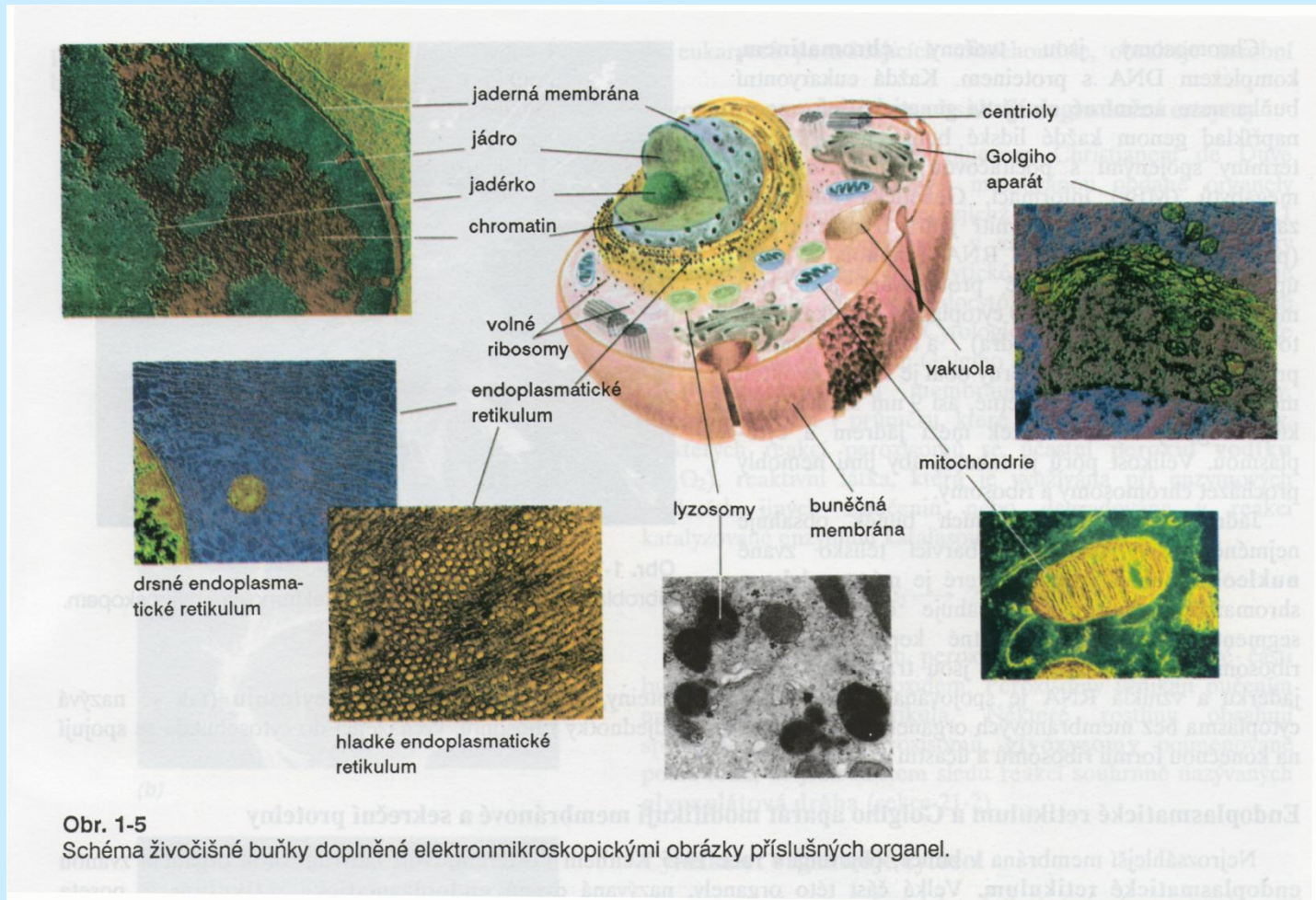
Potáček, M.: Organická chemie pro biology. Masarykova univerzita, Brno 1995.

Mikeš, V.: Úlohy z biochemie. Elektronická skripta.

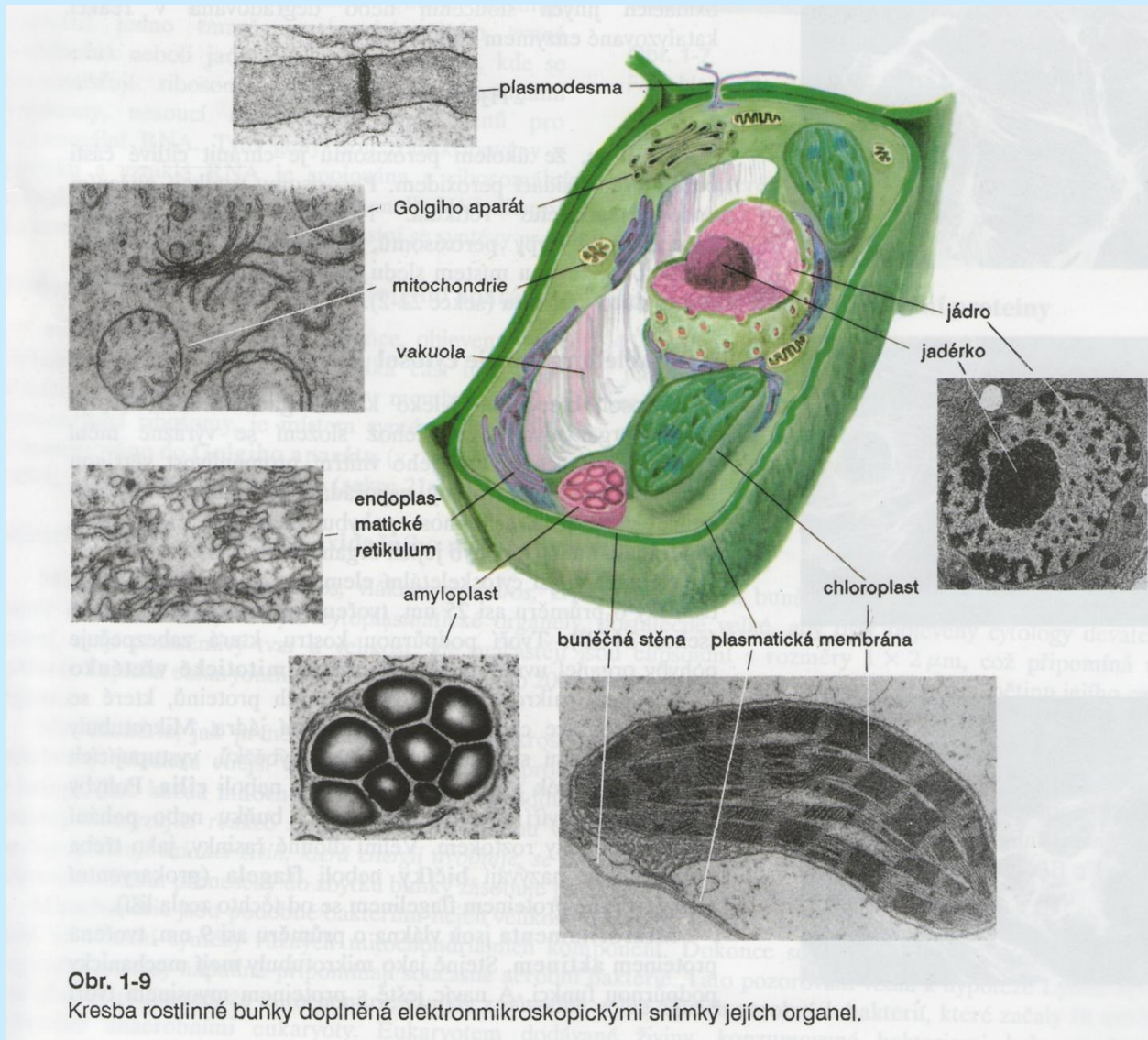
PROKARYOTICKÁ BUŇKA



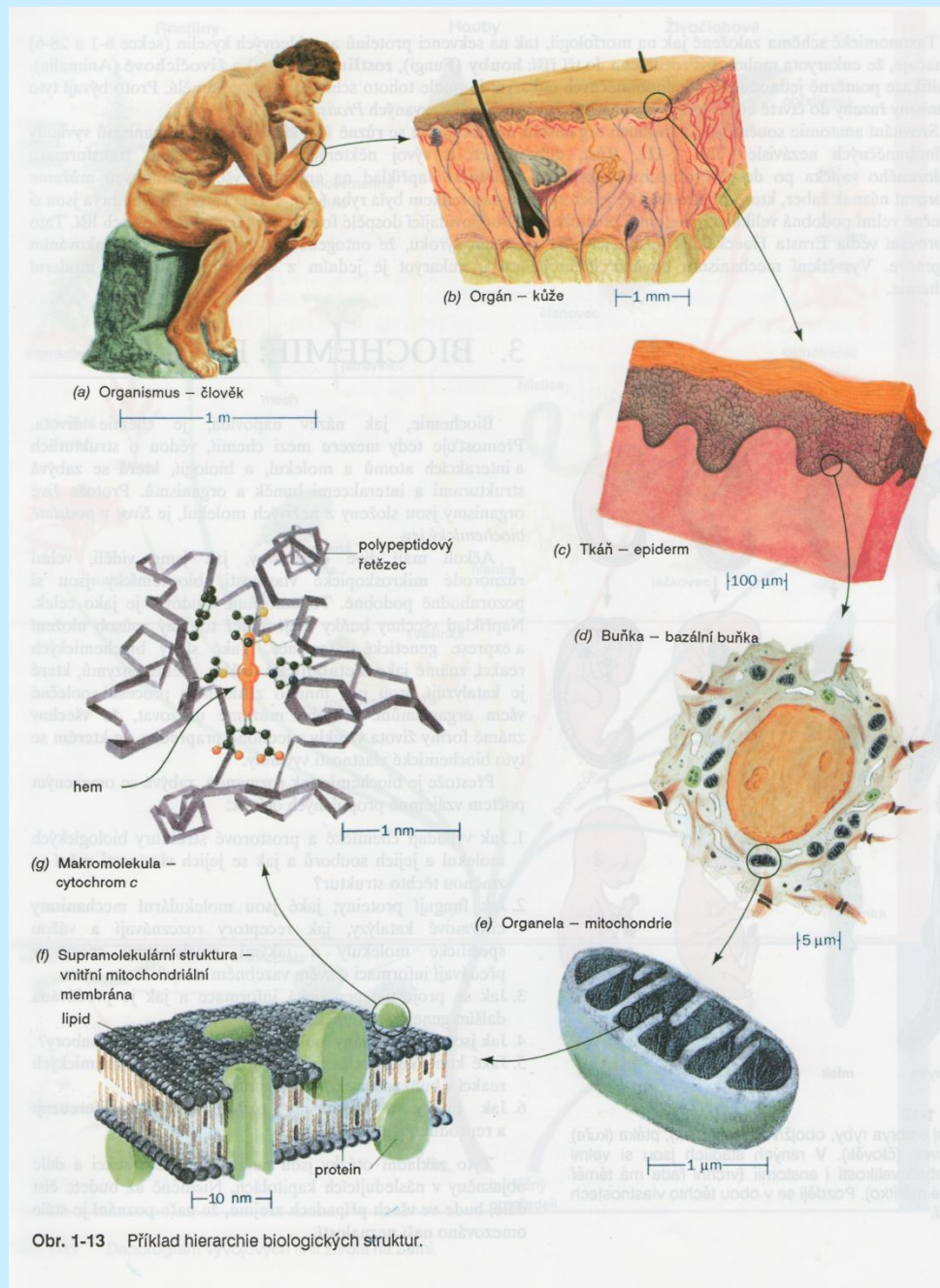
EUKARYOTICKÁ BUŇKA - ŽIVOČIŠNÁ



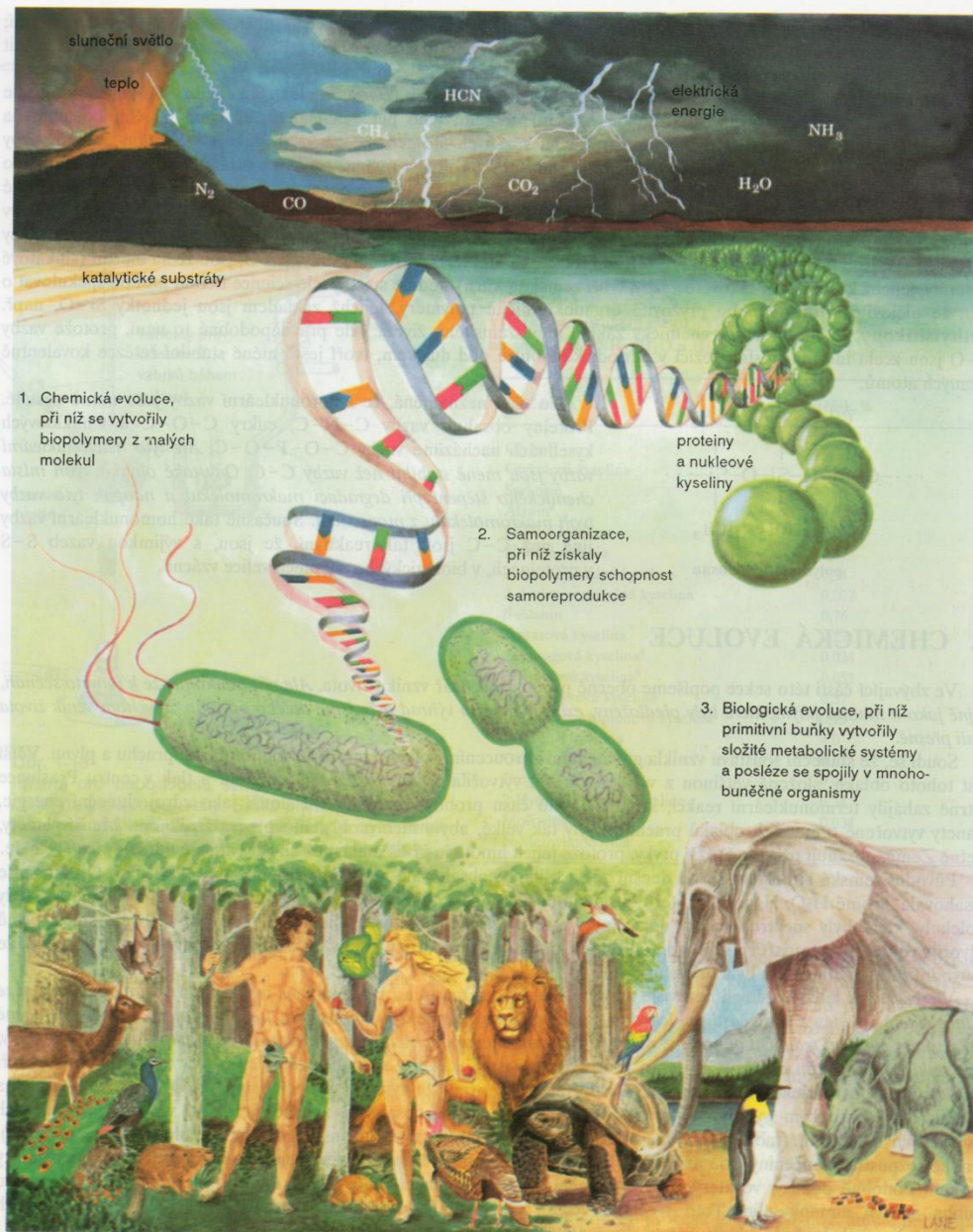
EUKARYOTICKÁ BUŇKA - ROSTLINNÁ



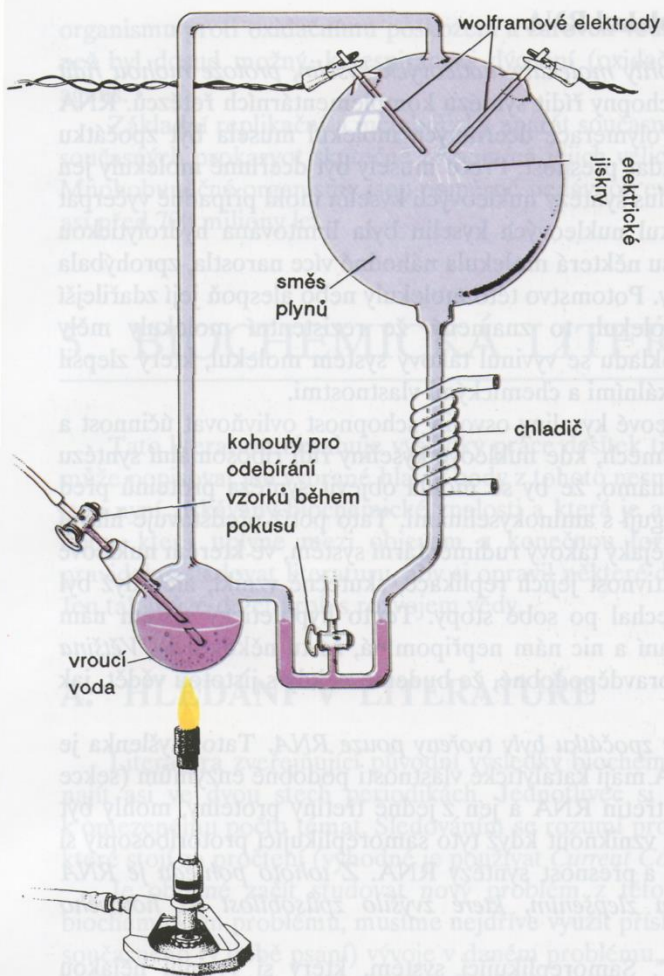
HIERARCHIE BIOLOGICKÝCH STRUKTUR



Obr. 1-13 Příklad hierarchie biologických struktur.



Obr. 1-17 Život vznikl? Pravděpodobná odpověď je, že byl řízen Davidaovým principem: přežít schopnějšího, podobně jako v přírodě. Tři stadia vývoje života. molekularní úroveň.



Obr. 1-18

Přístroj pro napodobení syntézy organických sloučenin na prebiotické Zemi. Směs plynů připomínající primitivní redukční zemskou atmosféru je vystavena elektrickým výbojům, které simulují účinek blesků, zatímco voda v systému cirkuluje tak, aby se nově vytvořené sloučeniny v ní rozpouštěly a akumulovaly.

Báze nukleových kyselin se také tvořily za předpokládaných prebiotických podmínek. Adenin vzniká kondenzací HCN, hojně složky prebiotické atmosféry, v reakci katalyzované NH_3 (sumární vzorec adeninu je $(\text{HCN})_5$). Ostatní báze byly syntetizovány podobnými reakcemi, jichž se účastnily HCN a H_2O . Cukry vznikly polymerací formaldehydu (CH_2O) v reakcích katalyzovaných dvojmocnými kationty, oxidem hliníovým, nebo jíly. Asi není náhoda, že tyto látky jsou základními složkami biologických molekul. Zjevně to byly nejobvyklejší organické sloučeniny v prebiotických časech.

Tabulka 1-3

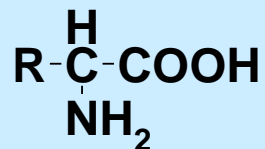
Výtěžky po působení elektrických výbojů na směs CH_4 , NH_3 , H_2O a H_2

Sloučenina	Výtěžek, %
Glycin ^a	2,1
Glykolová kyselina	1,9
Sarkosin	0,25
Alanin ^a	1,7
Mléčná kyselina	1,6
N-Methylalanin	0,07
2-Aminomáselná kyselina	0,34
2-Aminoisomáselná kyselina	0,007
β -Alanin	0,76
Jantarová kyselina	0,27
Asparagová kyselina ^a	0,024
Glutamová kyselina ^a	0,051
Iminodioxetová kyselina	0,37
Iminoacetopropionová kyselina	0,13
Mravenčí kyselina	4,0
Octová kyselina	0,51
Propionová kyselina	0,66
2-Hydroxymáselná kyselina	0,34
Močovina	0,034
N-Methylmočovina	0,051

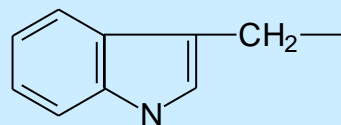
^aPřirozené složky proteinů.

Tabulka 1-1
Molekulové složení *E. coli*

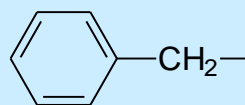
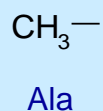
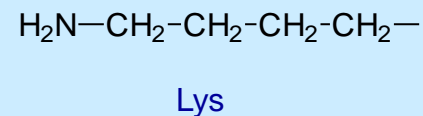
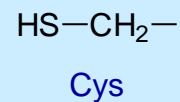
Složka	Hmotnostní procento
H ₂ O	70
Proteiny	15
DNA	1
RNA	6
Polysacharidy a jejich prekurzory	3
Lipidy a jejich prekurzory	2
Ostatní malé organické molekuly	1
Anorganické ionty	1



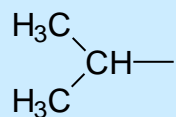
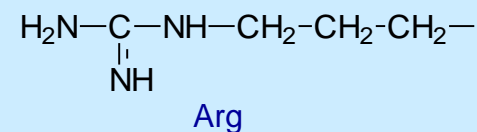
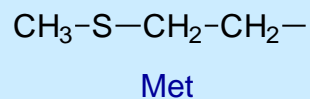
PŘEHLED AMINOKYSELIN



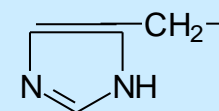
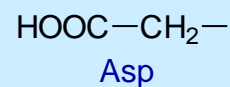
Trp



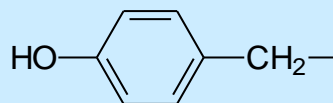
Phe



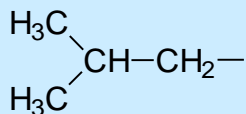
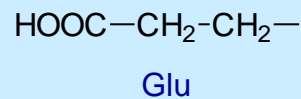
Val



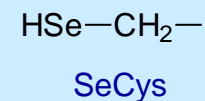
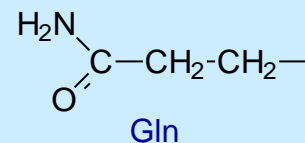
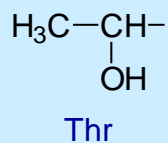
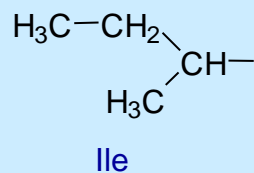
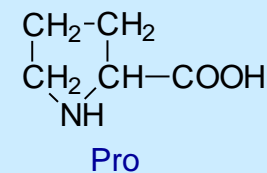
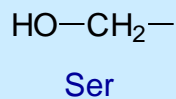
His



Tyr



Leu



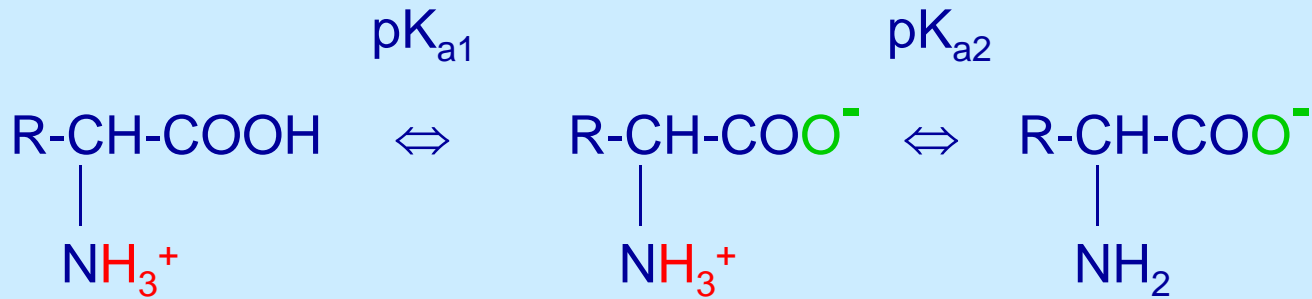
JEDNO- A TŘÍPÍSMENNÉ ZKRATKY AMINOKYSELIN

Aminokyselina	Třípísmenná zkratka	Jednopísmenná zkratka ^a	Aminokyselina	Třípísmenná zkratka	Jednopísmenná zkratka ^a
Alanin	Ala	A	Histidin	His	H
Arginin	Arg	R	Isoleucin	Ile	I
Asparagin	Asn	N	Leucin	Leu	L
Asparagová kys.	Asp	D	Lysin	Lys	K
Asparagin nebo asparagová kys.	Asx	B	Methionin	Met	M
Cystein	Cys	C	Prolin	Pro	P
Fenylalanin	Phe	F	Serin	Ser	S
Glutamin	Gln	Q	Threonin	Thr	T
Glutamová kys.	Glu	E	Tryptofan	Trp	W
Glutamin nebo glutamová kys.	Glx	Z	Tyrosin	Tyr	Y
Glycin	Gly	G	Valin	Val	V

^a Písmenem X se značí jednak neurčené aminokyseliny, jednak aminokyseliny nepatřící mezi základní.

DISOCIACE AMINOKYSELIN

I. DISOCIACE KARBOXYLOVÉ SKUPINY A AMINOSKUPINY



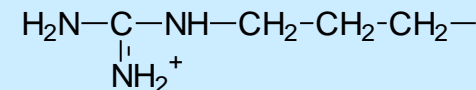
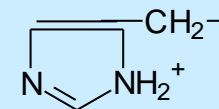
II. DISOCIACE BOČNÍHO ŘETĚZCE

- pK_{a3}
1. -R nedisociuje
 2. $-\text{RH} \rightleftharpoons -\text{R}^-$ KYSELÉ AK: protonovaná forma je nenabitá
 3. $-\text{RH}^+ \rightleftharpoons -\text{R}$ BAZICKÉ AK: protonovaná forma je kladně nabitá

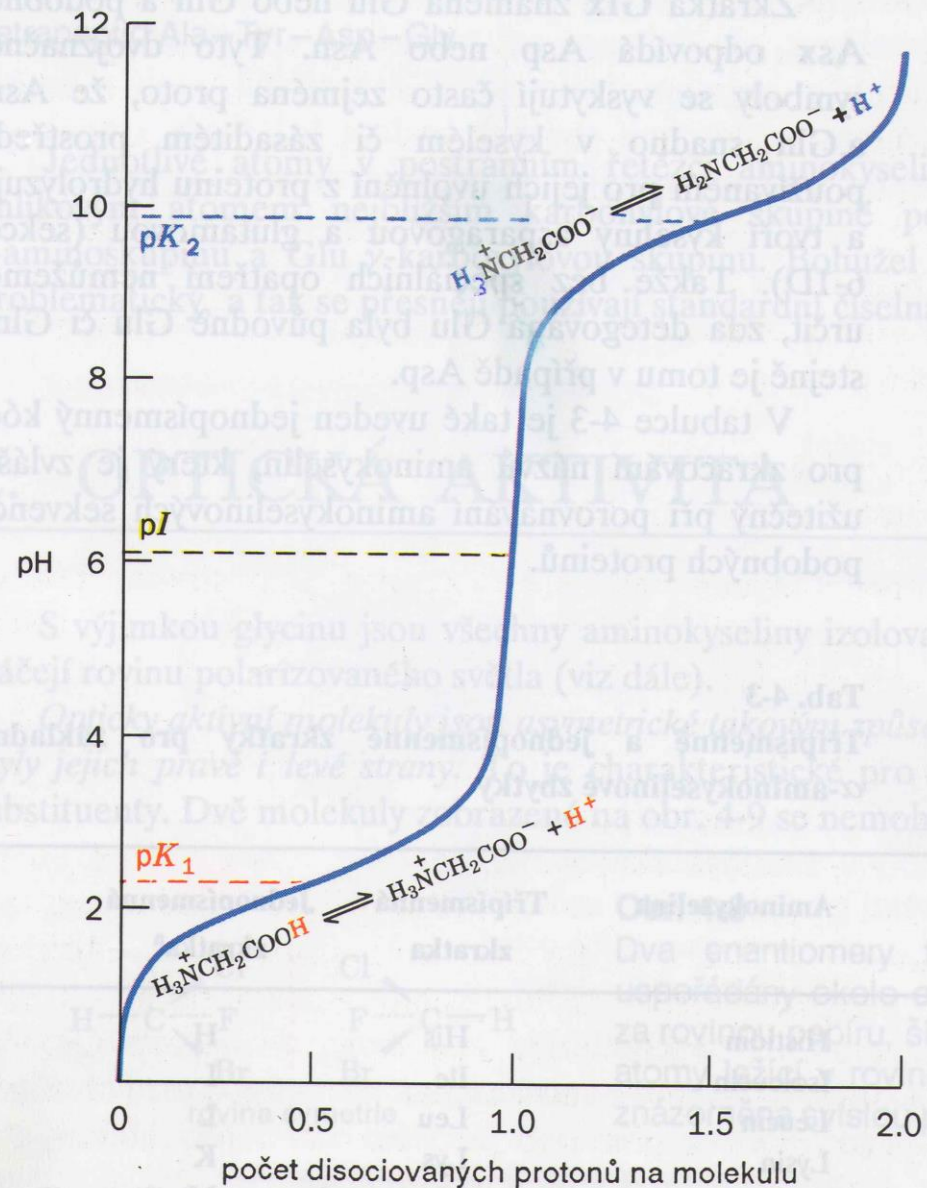
Typ disociace bočního řetězce a jeho náboj při daném pH lze rozlišit pouze na základě znalosti jeho chemické struktury!!!

DISOCIAČNÍ KONSTANTY AMINOKYSELIN

AK	pK_{a1}	pK_{a2}	$pK_{a3}=pK_a$ bočního řetězce	
• Ala	2.3	9.9		
• Gly	2.4	9.8		
• Phe	1.8	9.1		
• Ser	2.1	9.2		
• Val	2.3	9.6		
• Asp	2.0	10.0	3.9	-COOH
• Glu	2.2	9.7	4.3	-COOH
• His	1.8	9.2	6.0	-imidazolium
• Cys	1.8	10.8	8.3	-SH
• Tyr	2.2	9.1	10.9	-fenol
• Lys	2.2	9.2	10.8	-NH ₃ ⁺
• Arg	1.8	9.0	12.5	-guanidinium
• Asn	2.0	8.8		
• Gln	2.2	9.1		
• Trp	2.4	9.4		
• Leu	2.4	9.6		
• Ile	2.3	9.6		
• Met	2.3	9.2		
• Thr	2.2	9.1		
• Pro	2.0	10.6		



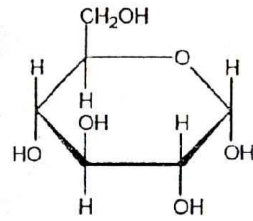
TITRAČNÍ KŘIVKA GLYCINU



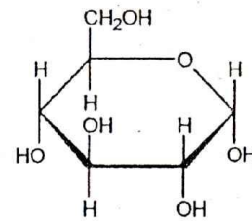
Obr. 4-5

Titrační křivka glycinu. Podobně jsou ionizovány také ostatní monoaminomonokarboxylové kyseliny.

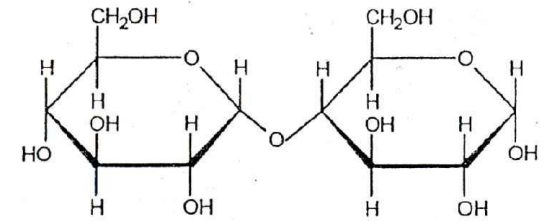
VYBRANÉ DISACHARIDY



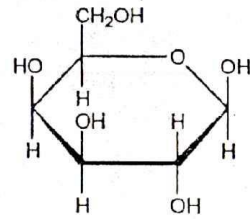
α - D - glukopyranosa



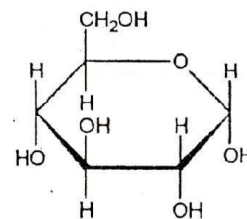
α - D - glukopyranosa



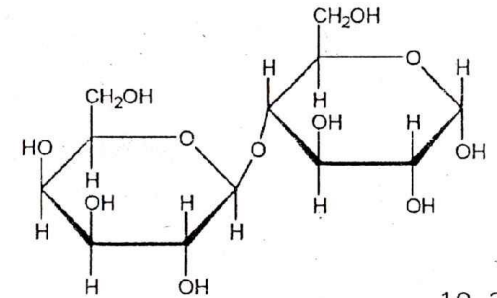
4-O- α -D-glukopyranosyl-D-glukopyranosa
(maltosa)



β - D - galaktopyranosa

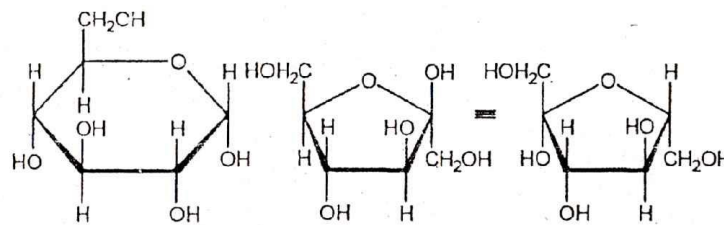


α - D - glukopyranosa



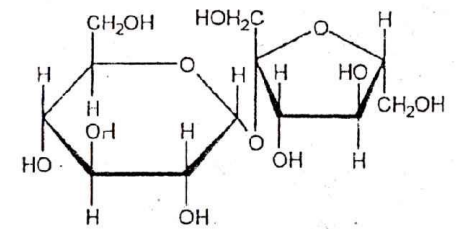
4-O- β -D-galaktopyranosyl-D-glukopyranosa
(laktosa)

19. 3. 1.



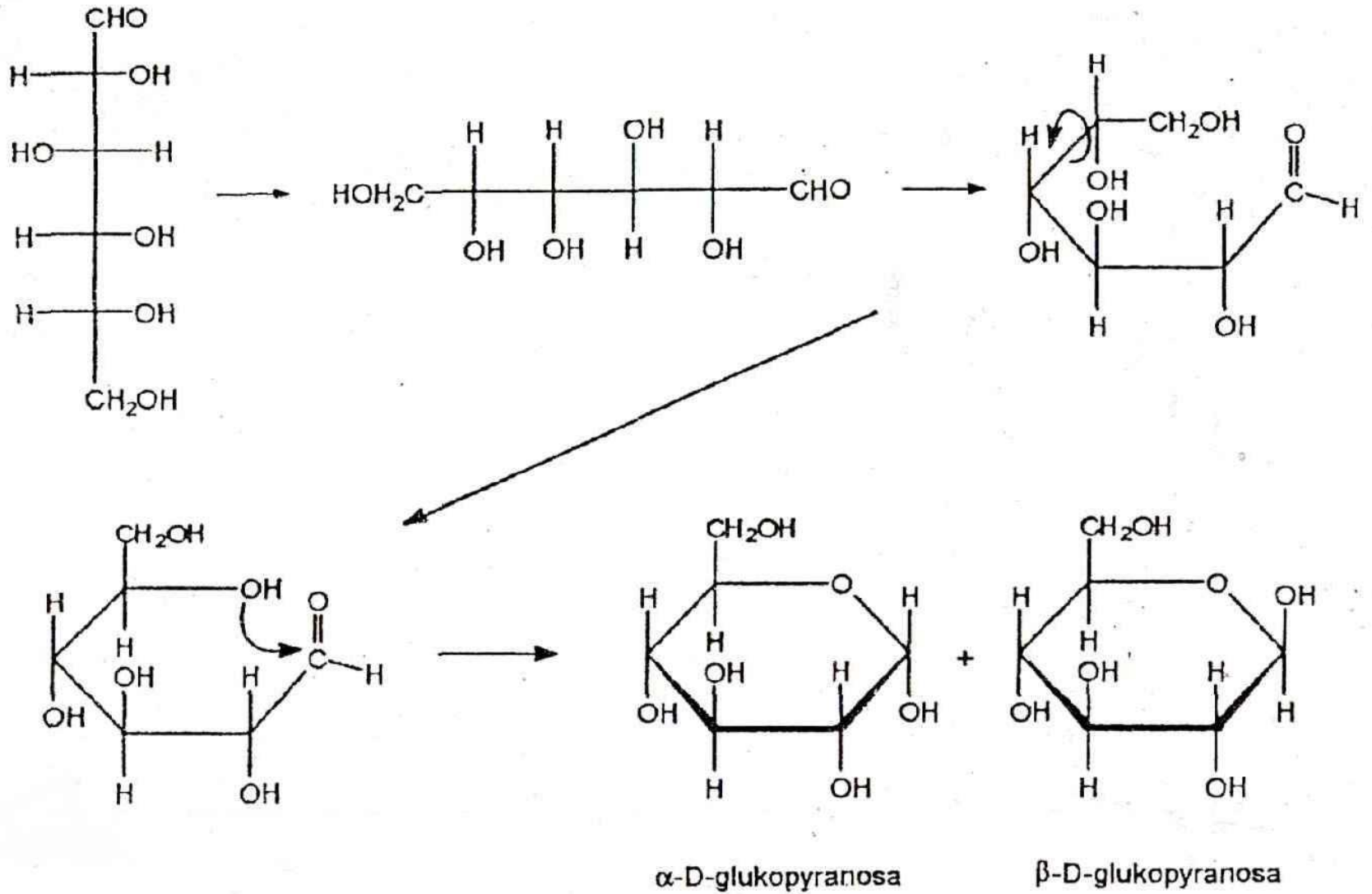
α - D - glukopyranosa

β - D - fruktofuranosa

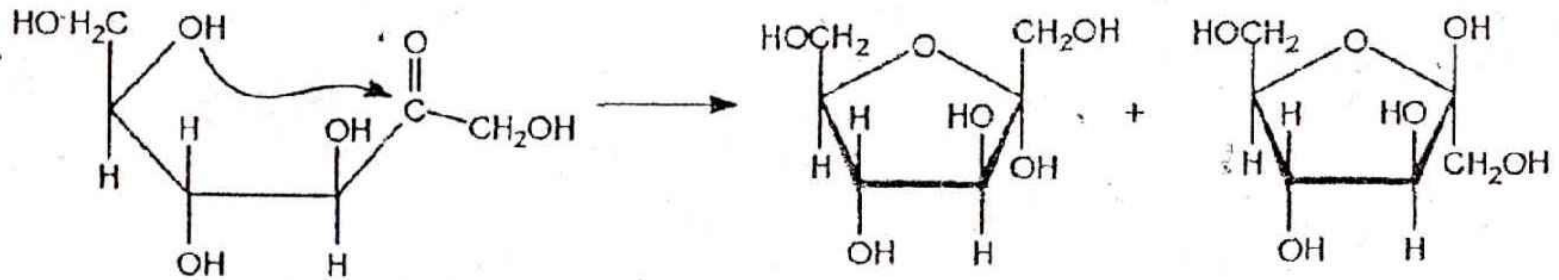
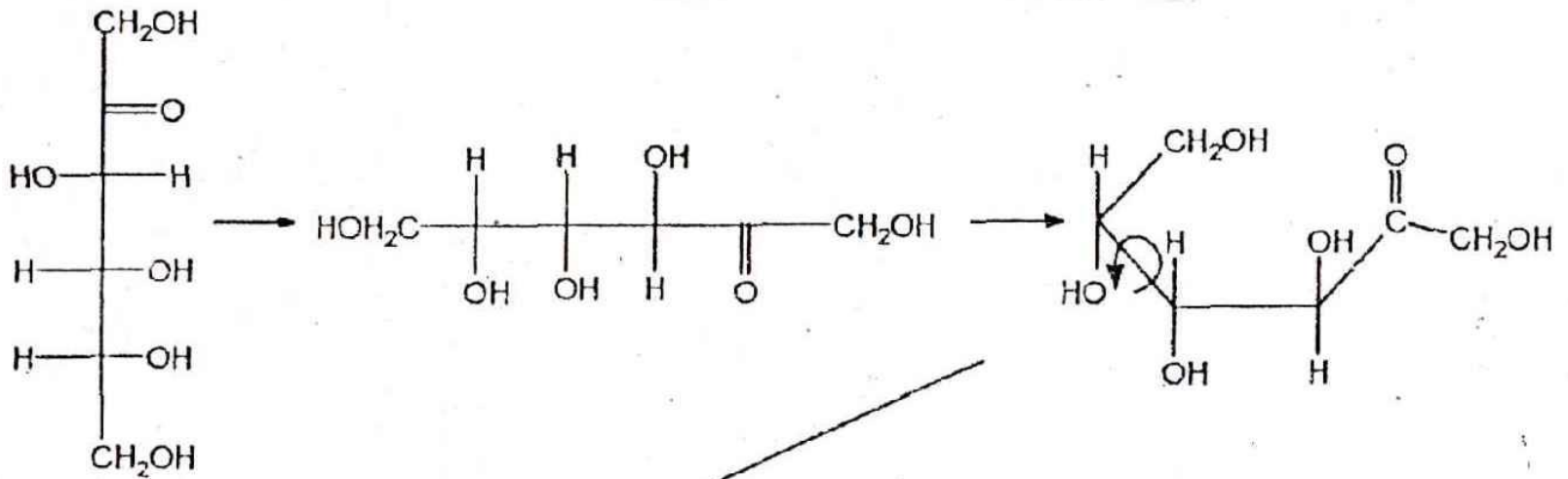


β -D-fruktofuranosyl- α -D-glukopyranosid
(sacharosa)

UZAVÍRÁNÍ CYKLU: ALDOSY



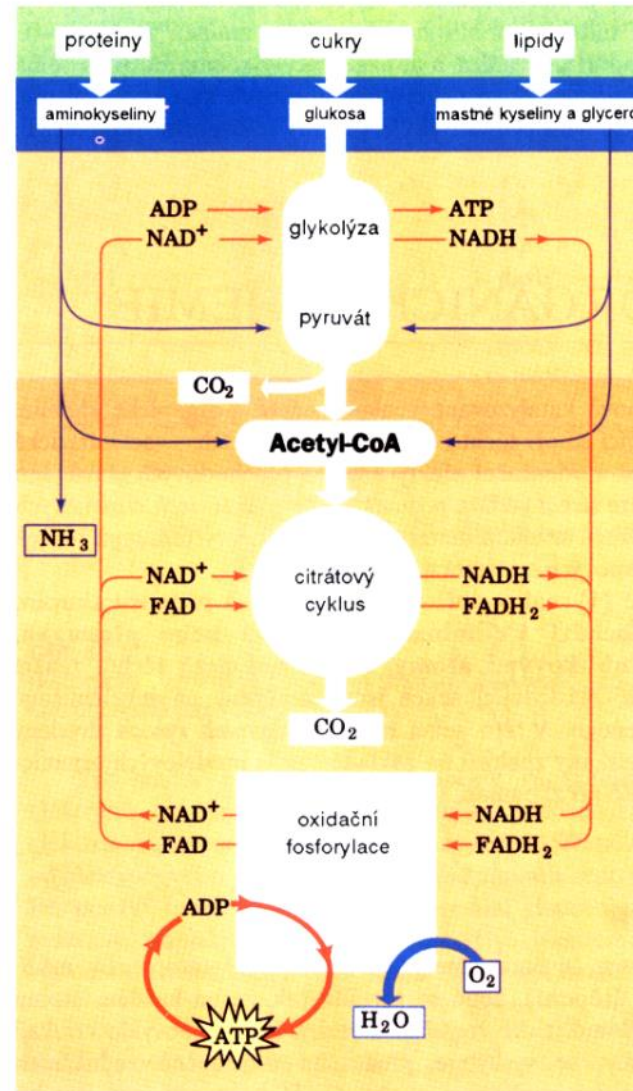
UZAVÍRÁNÍ CYKLU: KETOSY



α -D-fruktofuranosa

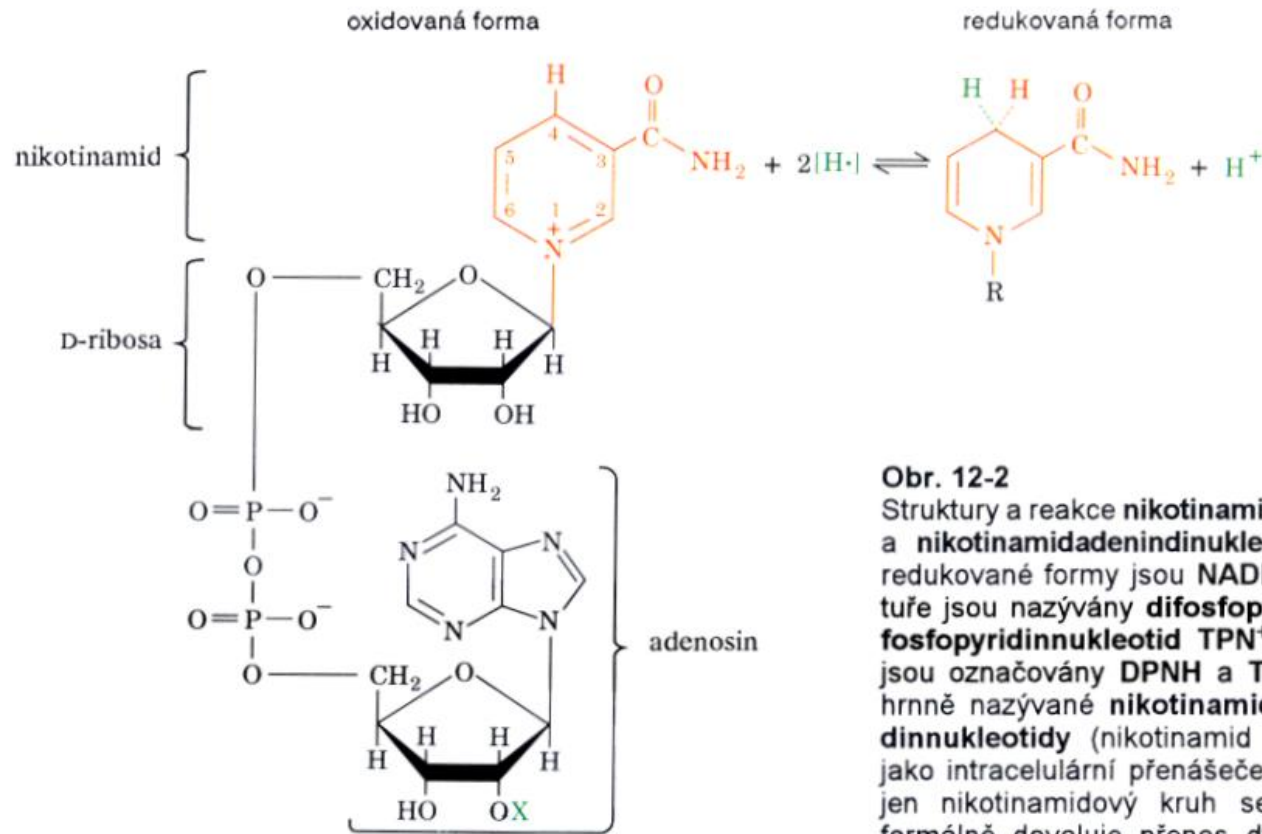
β -D-fruktofuranosa

PŘEHLED AEROBNÍHO METABOLISMU



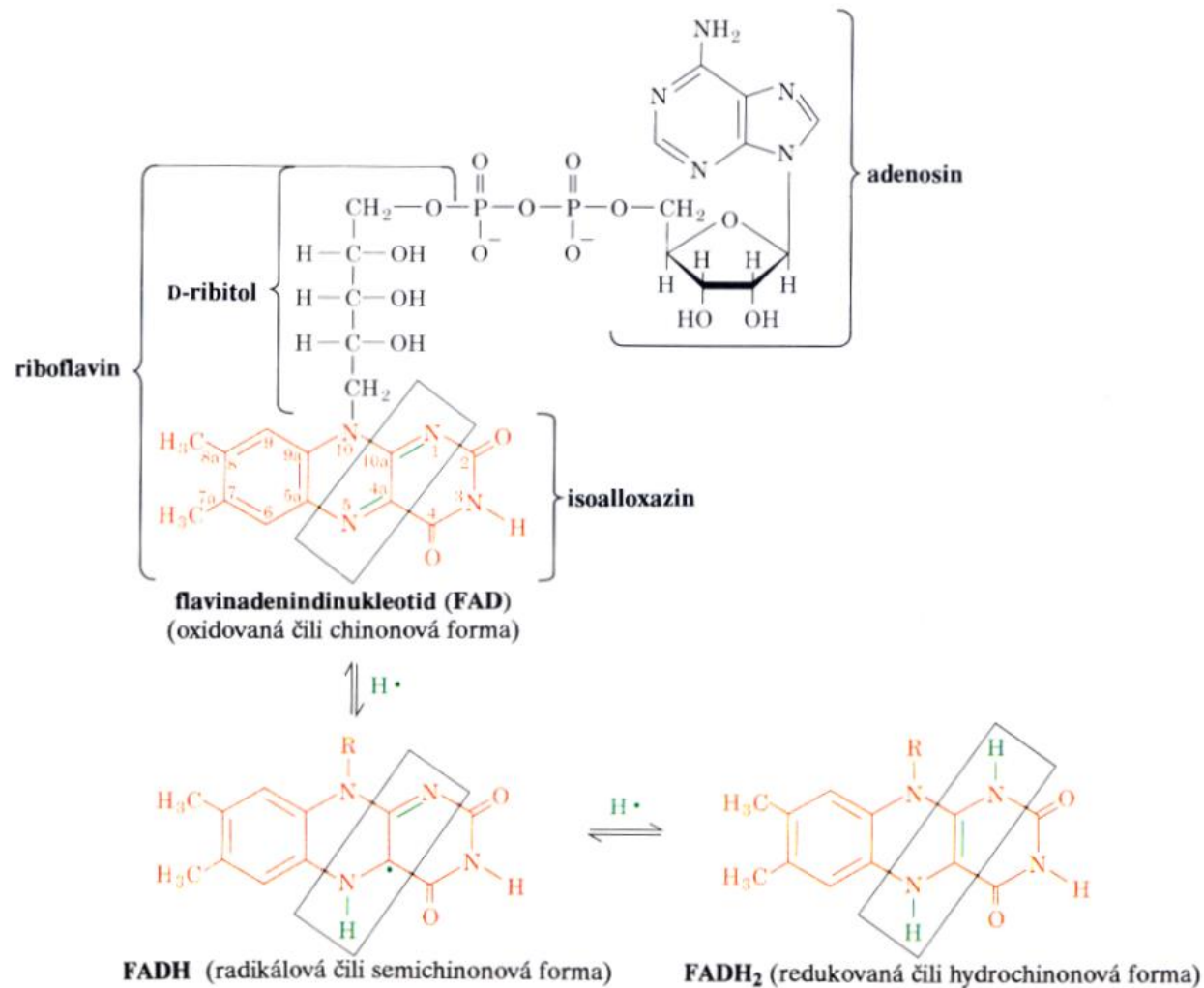
Obr. 15-3

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



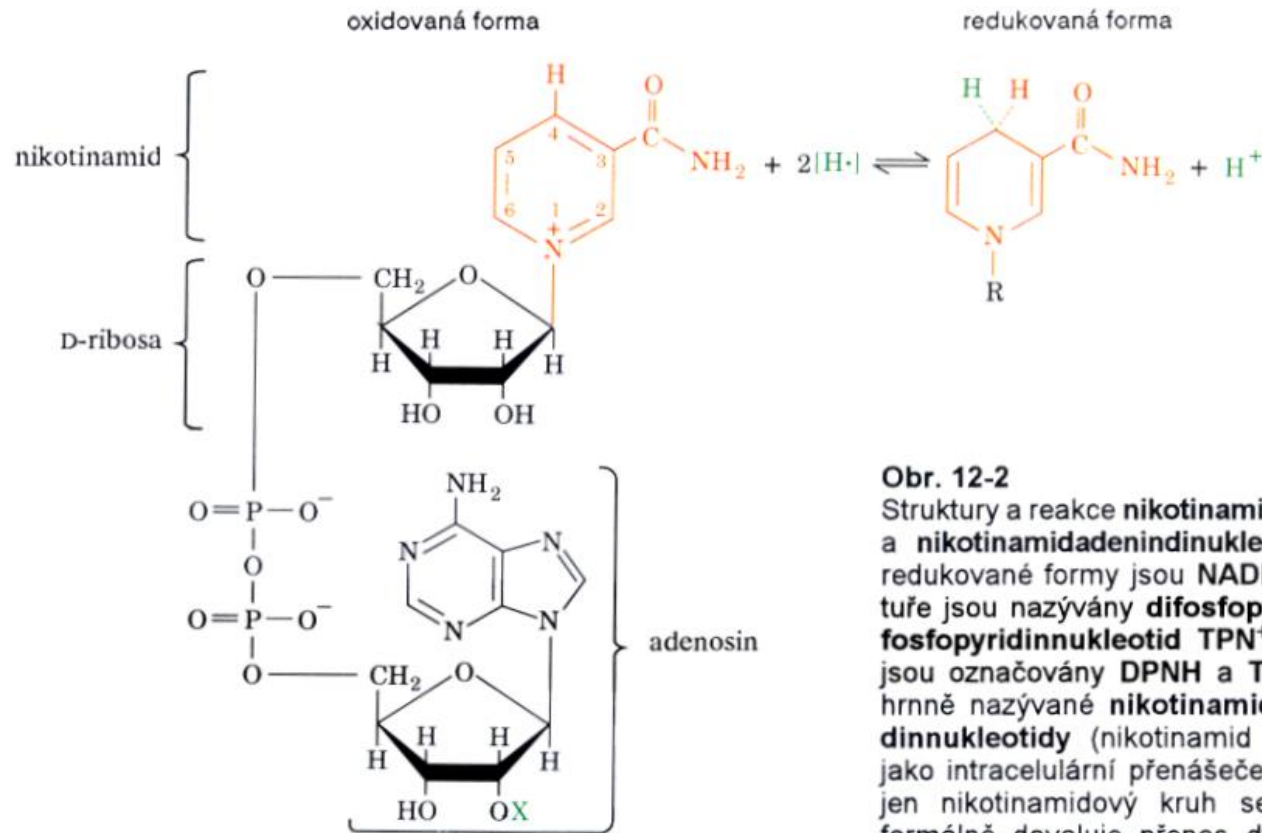
Obr. 12-2

Struktury a reakce **nikotinamidadeninukleotidu (NAD⁺)** a **nikotinamidadeninukleotidfosfátu (NADP⁺)**. Jejich redukované formy jsou **NADH** a **NADPH**. (V starší literatuře jsou nazývány **difosfopyridinnukleotid DPN⁺** a **trifosfopyridinnukleotid TPN⁺** a jejich redukované formy 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.



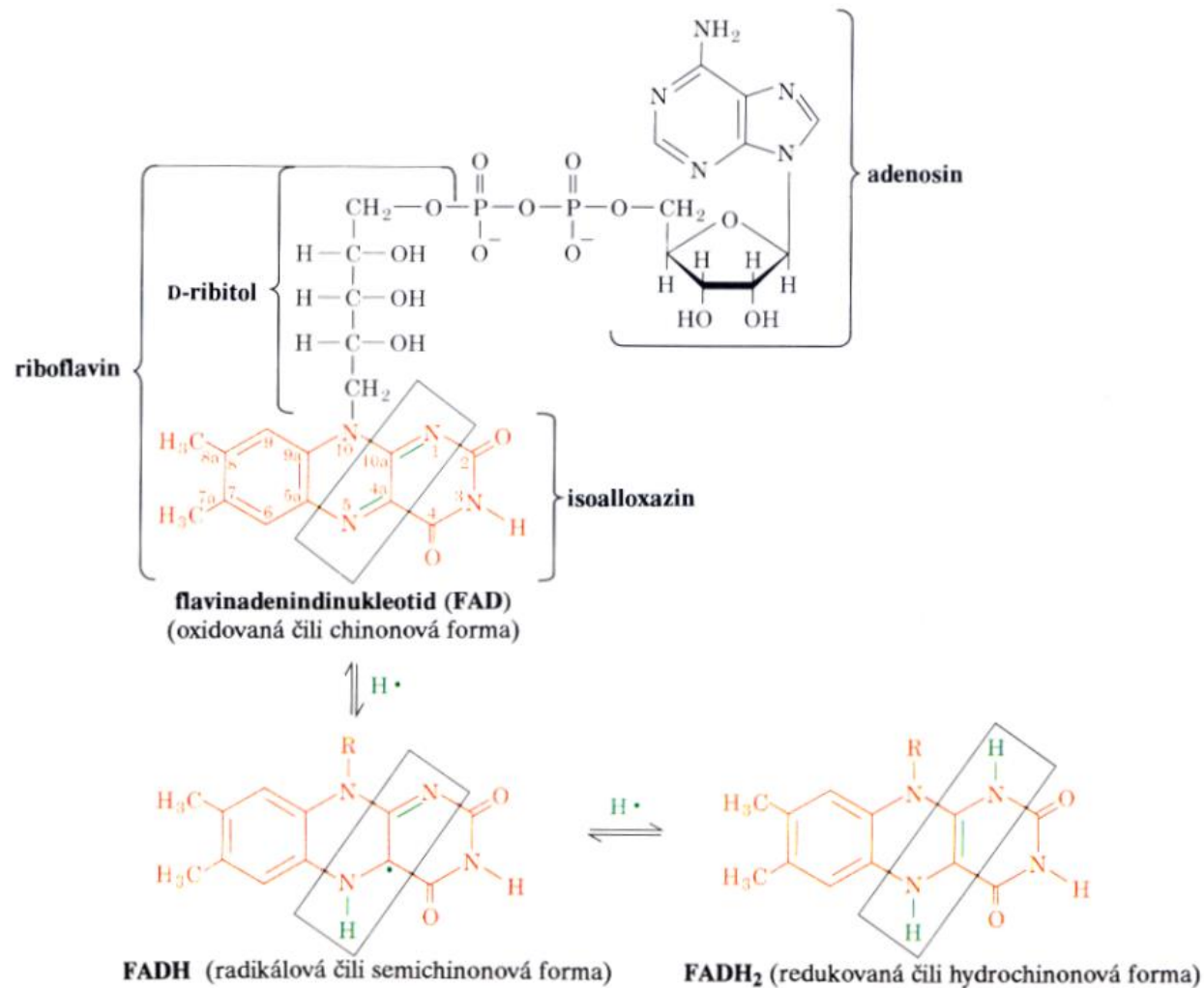
Obr. 14-27

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 (*obdělňáky*). 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⁺.



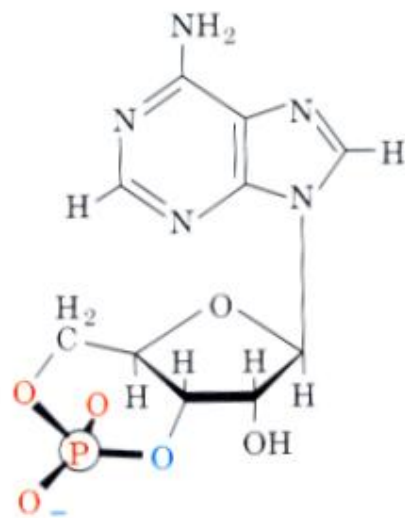
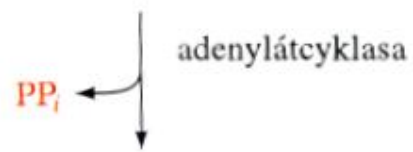
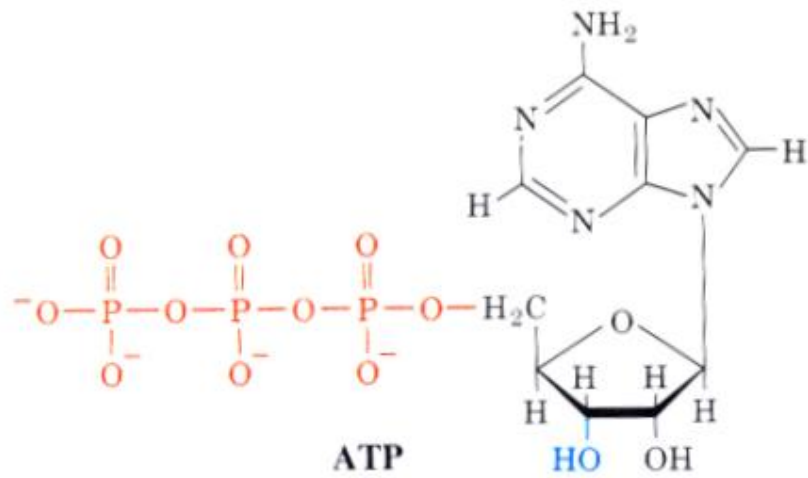
Obr. 12-2

Struktury a reakce **nikotinamidadeninukleotidu (NAD⁺)** a **nikotinamidadeninukleotidfosfátu (NADP⁺)**. Jejich redukované formy jsou **NADH** a **NADPH**. (V starší literatuře jsou nazývány **difosfopyridinnukleotid DPN⁺** a **trifosfopyridinnukleotid TPN⁺** a jejich redukované formy 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.



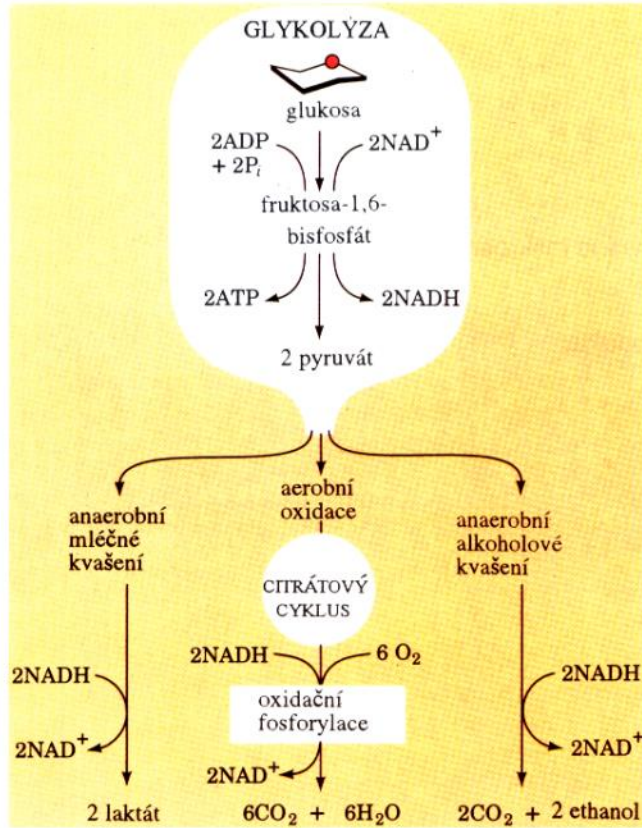
Obr. 14-27

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⁺.



3',5'-cyklický AMP

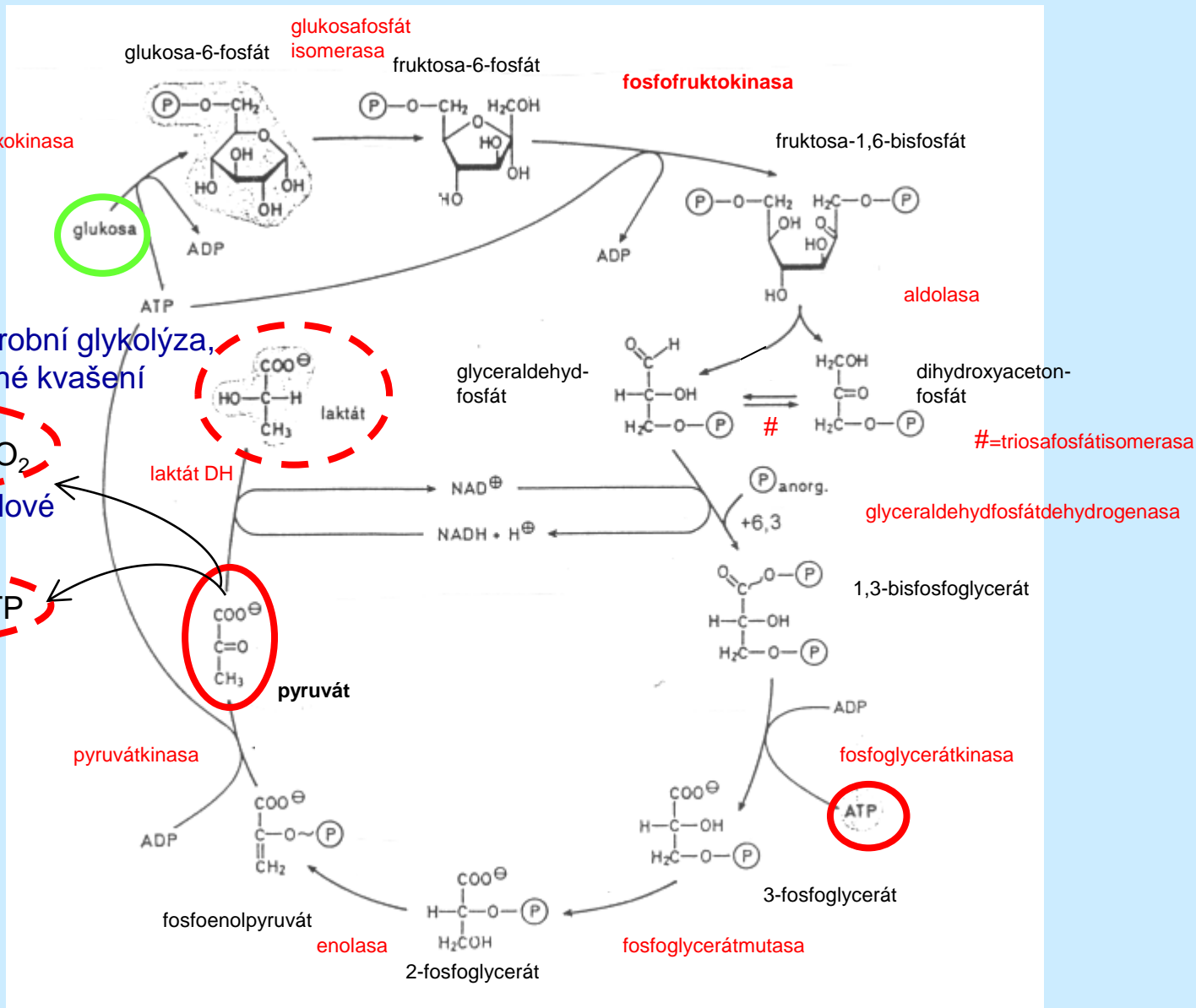
GLYKOLÝZA – VARIANTY A BILANCE



Obr. 16-1

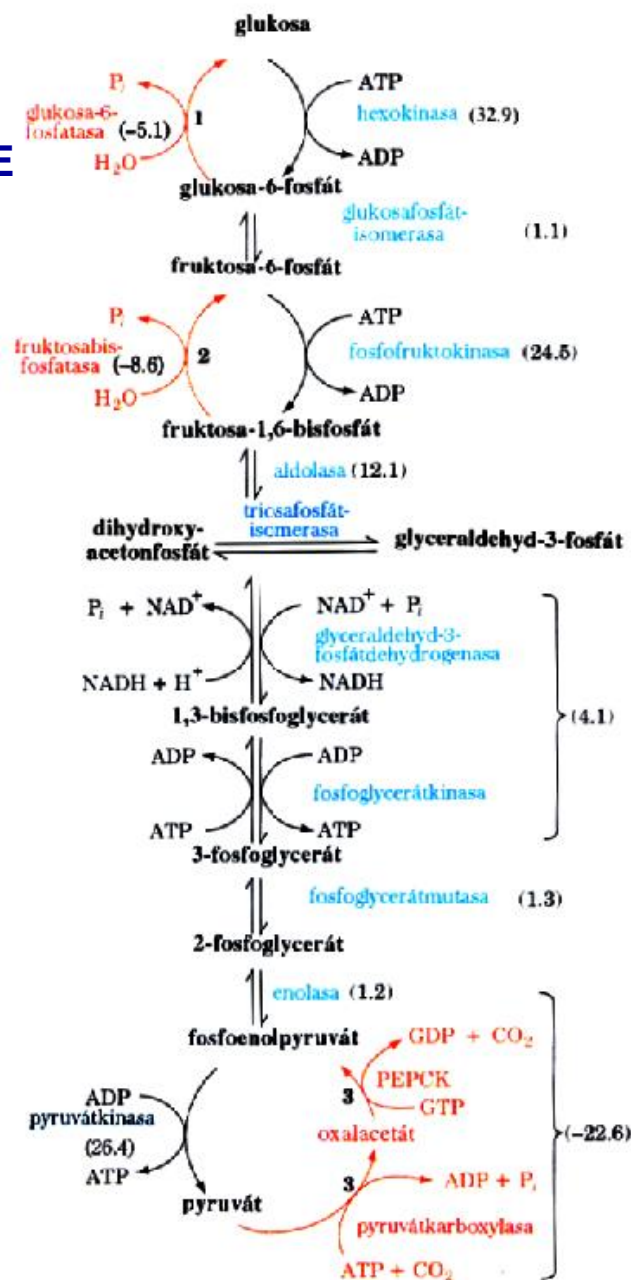
Glykolýza přeměňuje glukosu na pyruvát při současně tvorbě dvou molekul ATP. Za anaerobních podmínek probíhá další degradace pyruvátu jako alkoholové kvašení u kvasinek nebo redukce na mléčnou kyselinu ve svalu. Za aerobních podmínek je pyruvát oxidován na vodu a oxid uhlíčitý přes citrátový cyklus a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

GLYKOLÝZA – PRŮBĚH



Metabolismus a biosyntéza sacharidů

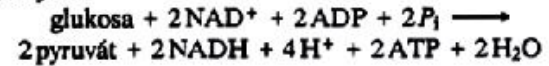
GLYKOLÝZA VS. GLUKONEOGENEZE



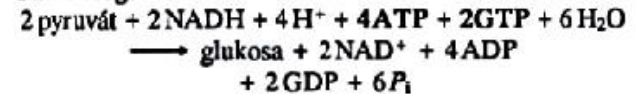
Obr. 21-7

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:

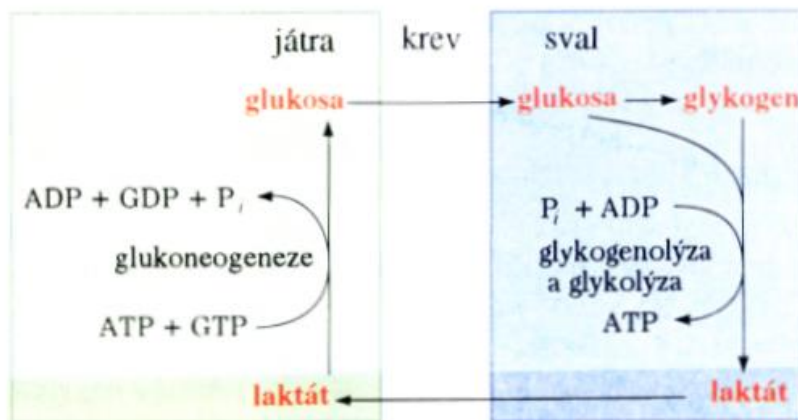


Celkově:



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

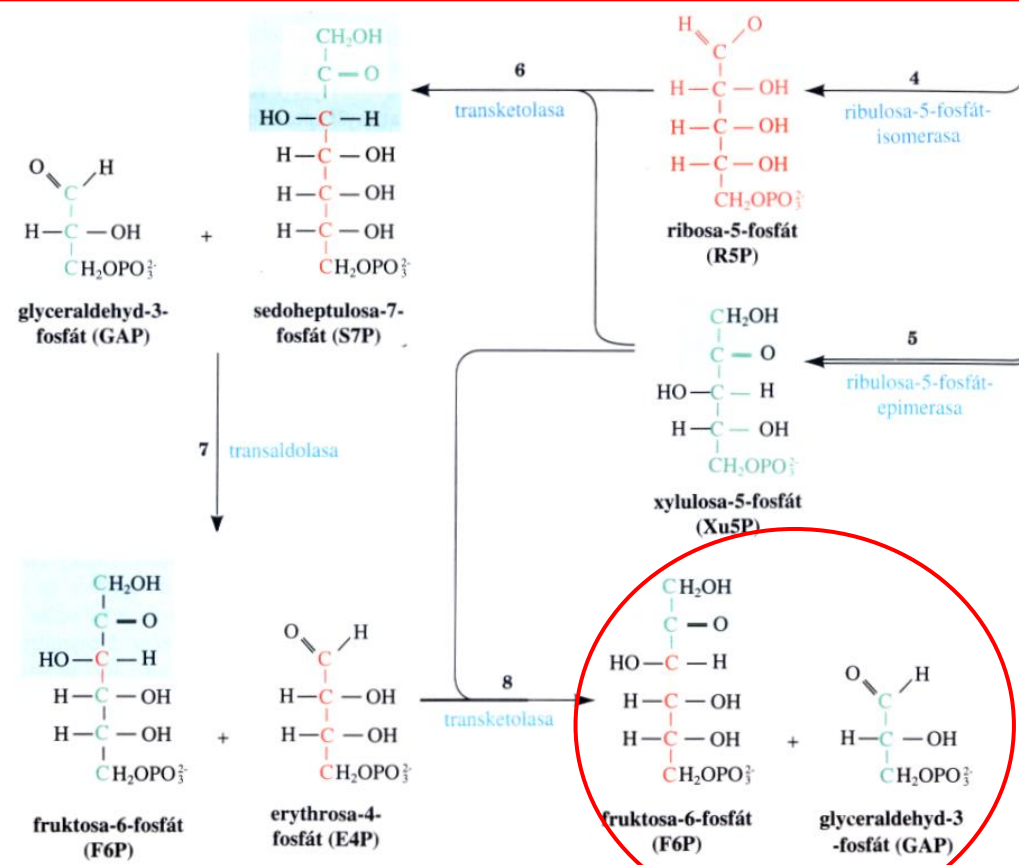
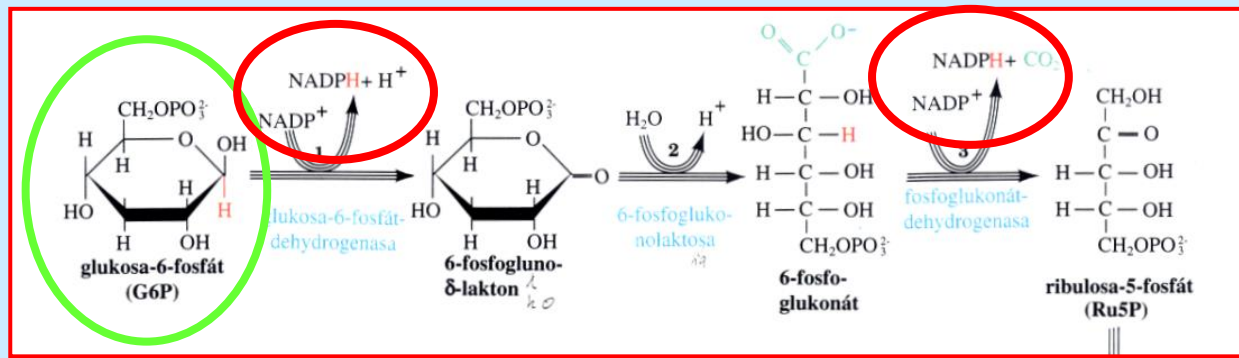
CORIHO CYKLUS



Obr. 21-9

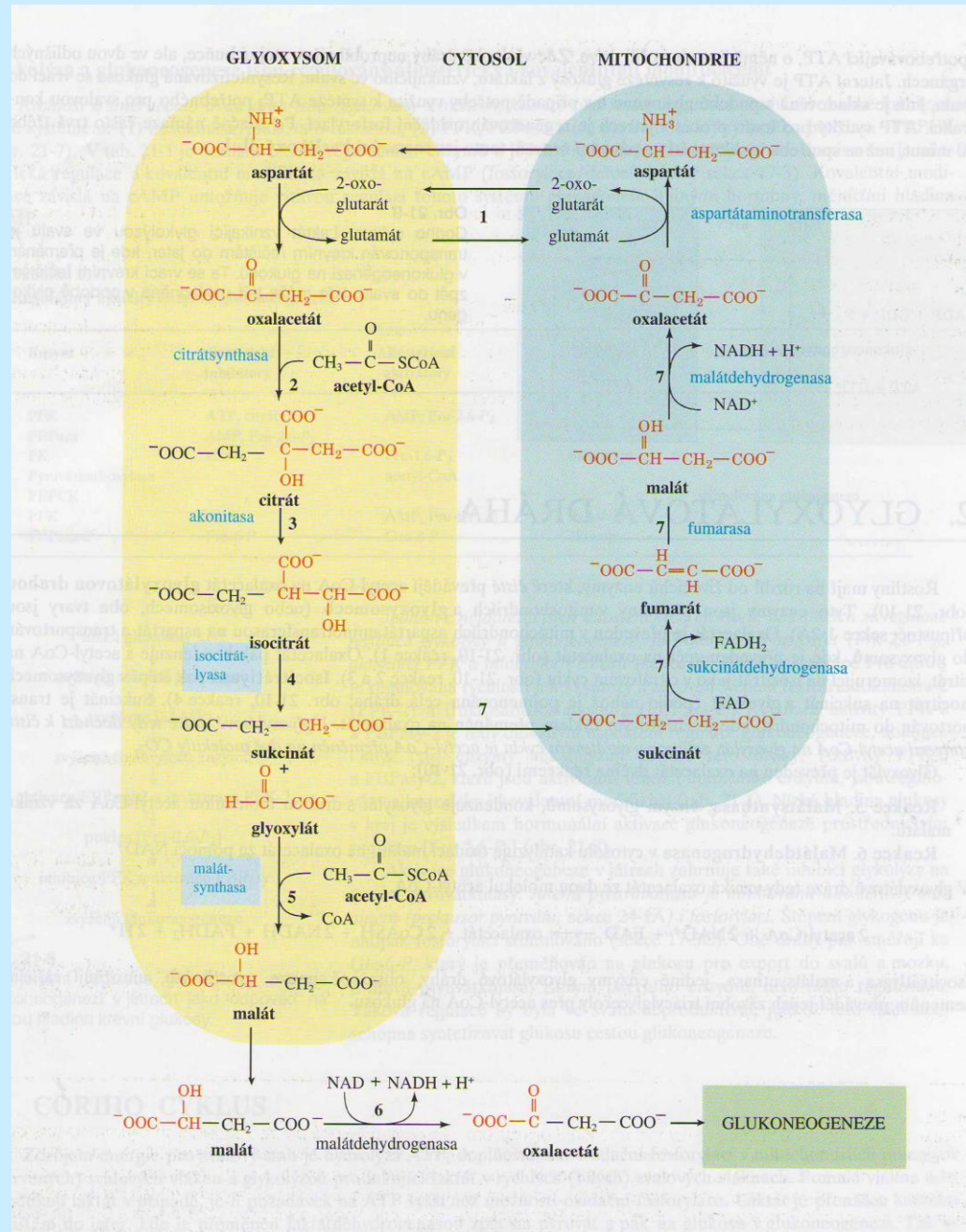
Coriho cyklus. Laktát vznikající glykolýzou ve svalu je transportován krevním řečištěm do jater, kde je přeměněn v glukoneogenezi na glukosu. Ta se vrací krevním řečištěm zpět do svalu, kde může být uskladněna v podobě glykogenu.

PENTOSOVÝ CYKLUS



Obr. 21-22
 Pentosový cyklus. Číslo u šipek znamená počet molekul vstupujících do cyklu během jedné obrátky, při přeměně třech molekul Glic-6-P na tři molekuly CO_2 , dvě molekuly Fru-6-P a jednu molekulu Gra-3-P. Počínaje reakci 3 jsou cukry pro větší názornost uvedeny lineárními (Fischerovými) vzorci. Uhlíková kostra Rbs-5-P a atomů od něho odvozených jsou znázorněny červeně. Jednotky C_2 přenášené transketolasou jsou vyznačeny zeleně, jednotky C_3 přenášené transaldolou modře.

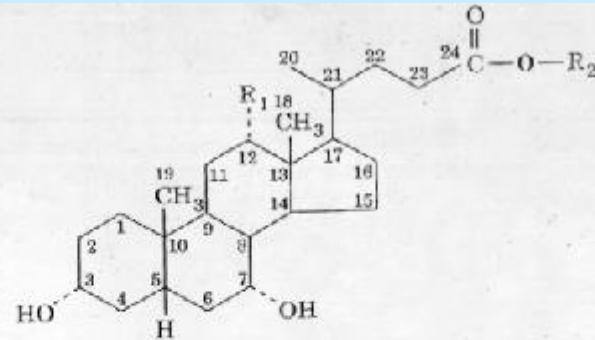
GLYOXYLÁTOVÁ DRÁHA



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

$R_2 = NH - CH_2 - COOH$

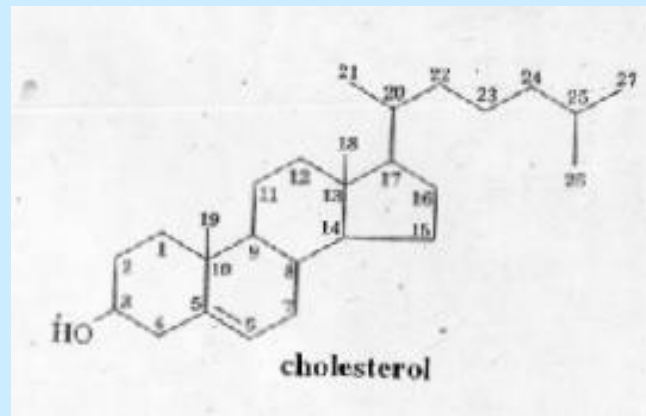
glykocholová kyselina

glykochenodeoxycholová kyselina

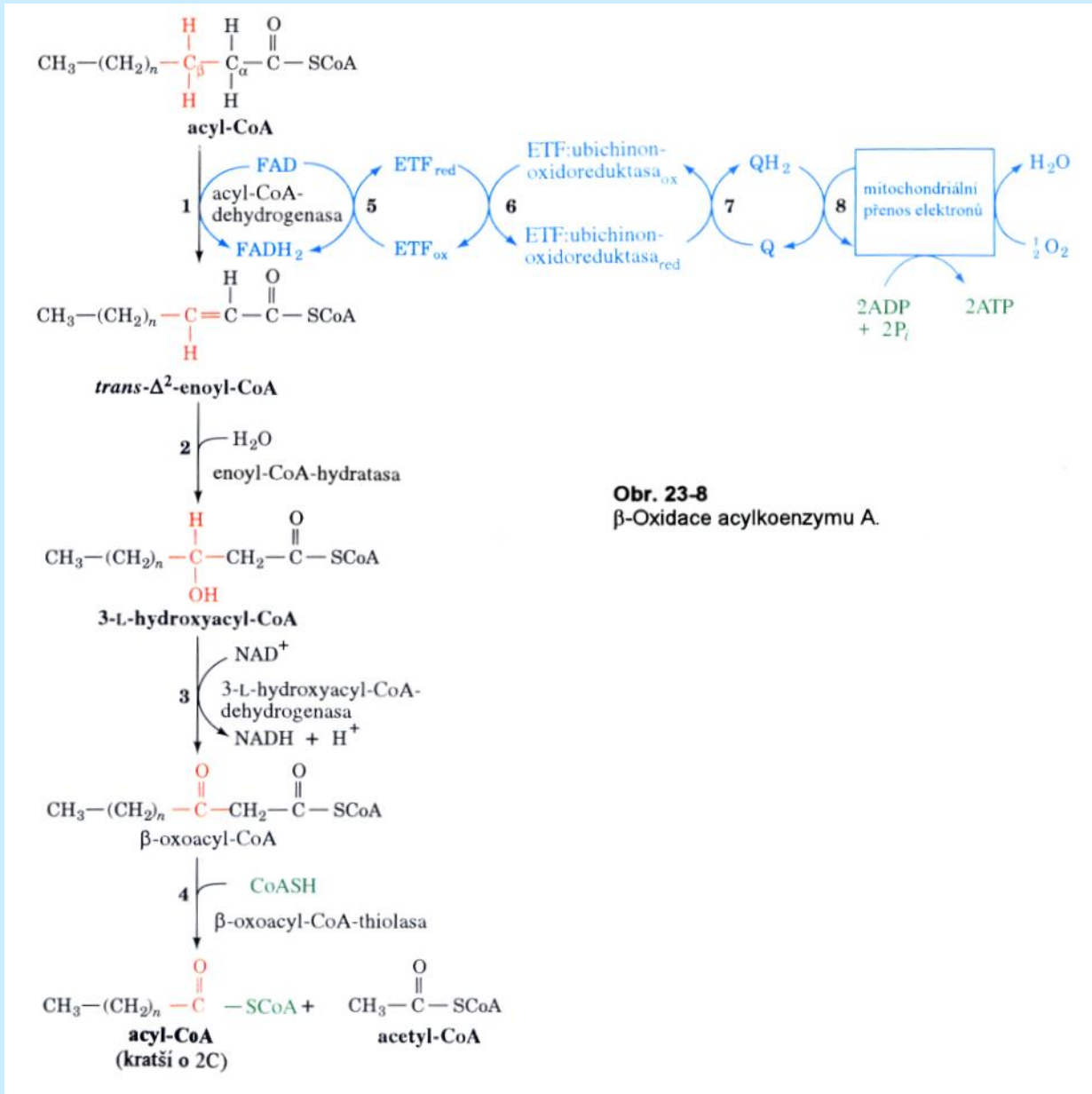
$R_2 = NH - CH_2 - CH_2 - SO_3H$

taurocholová kyselina

taurochenodeoxycholová kyselina

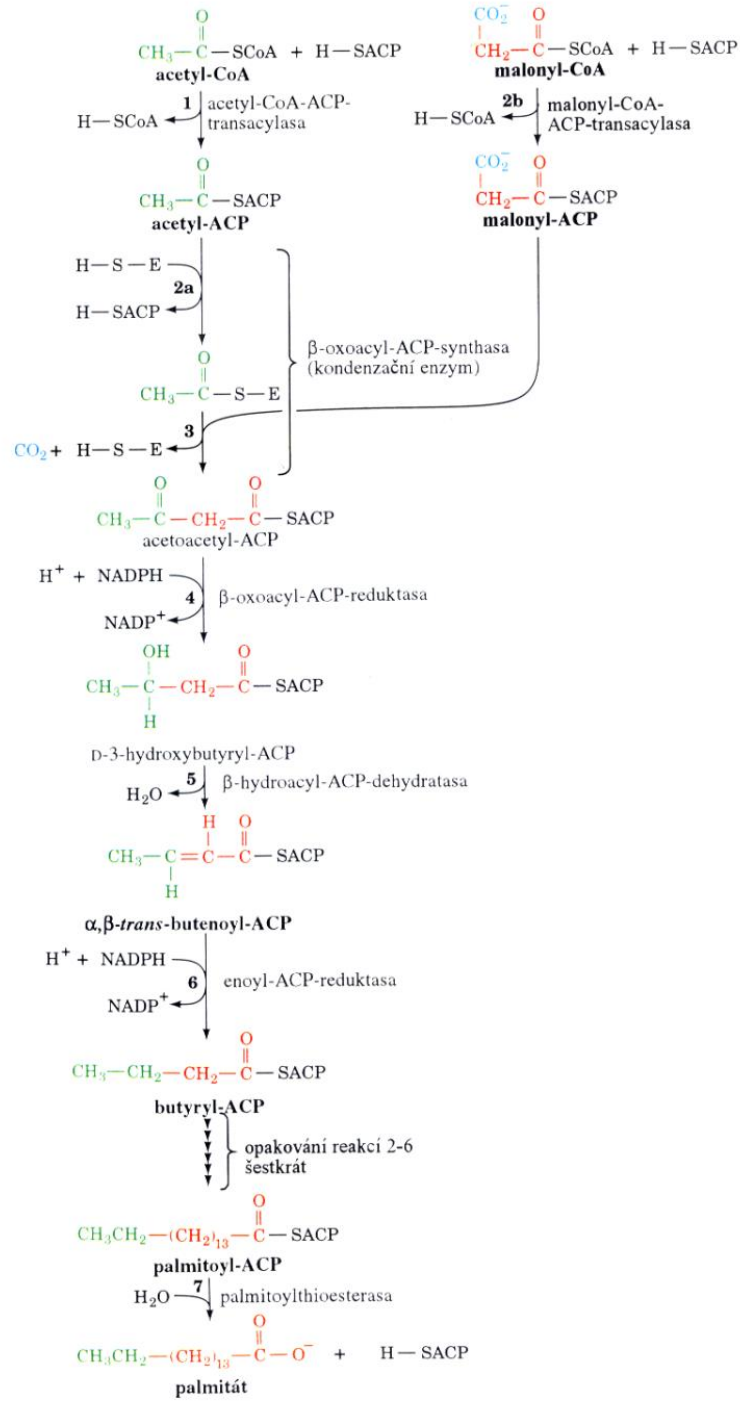


β-OXIDACE MASTNÝCH KYSELIN



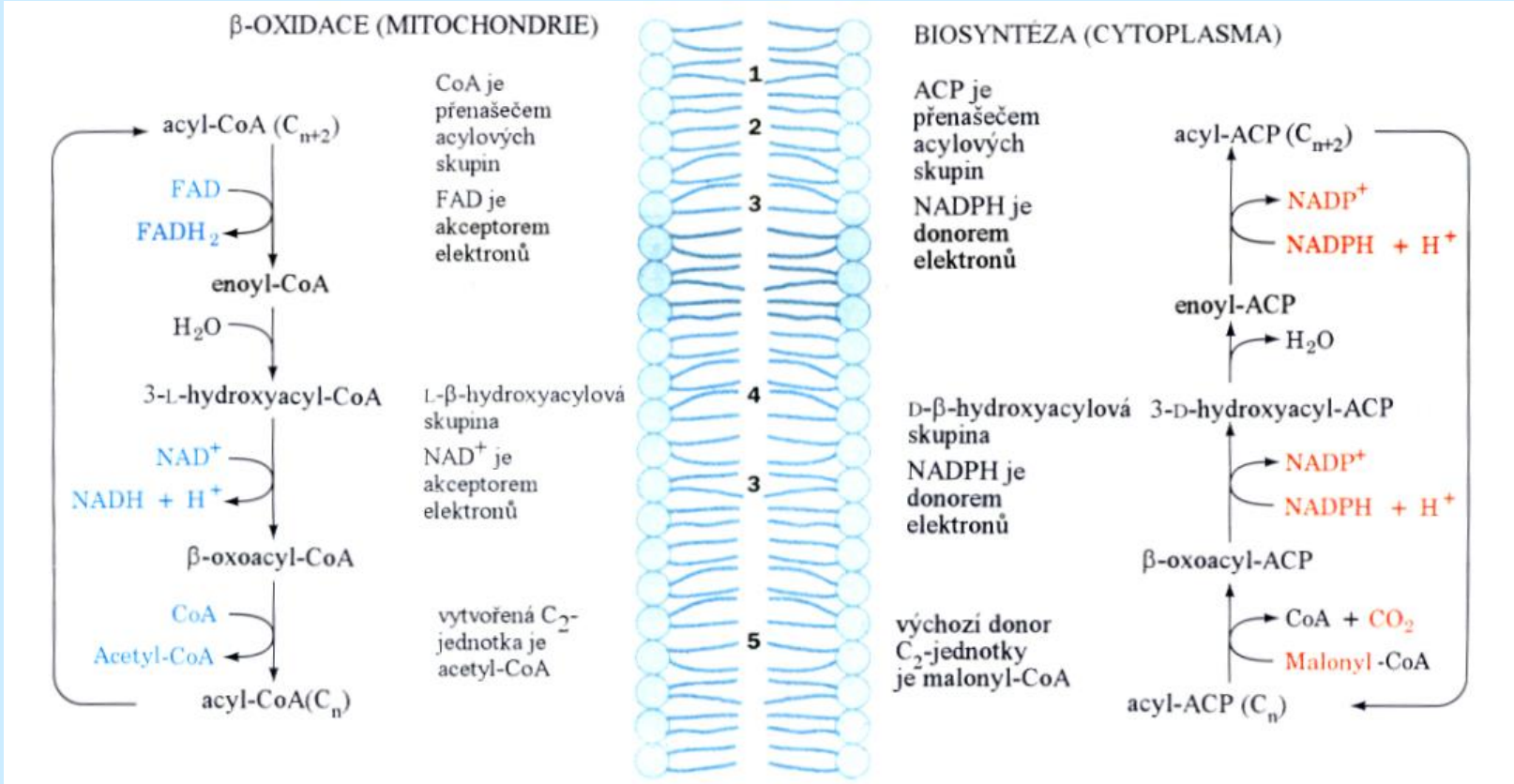
Obr. 23-8 β-Oxidace acylkoenzymu A.

BIOSYNTÉZA MASTNÝCH KYSELIN



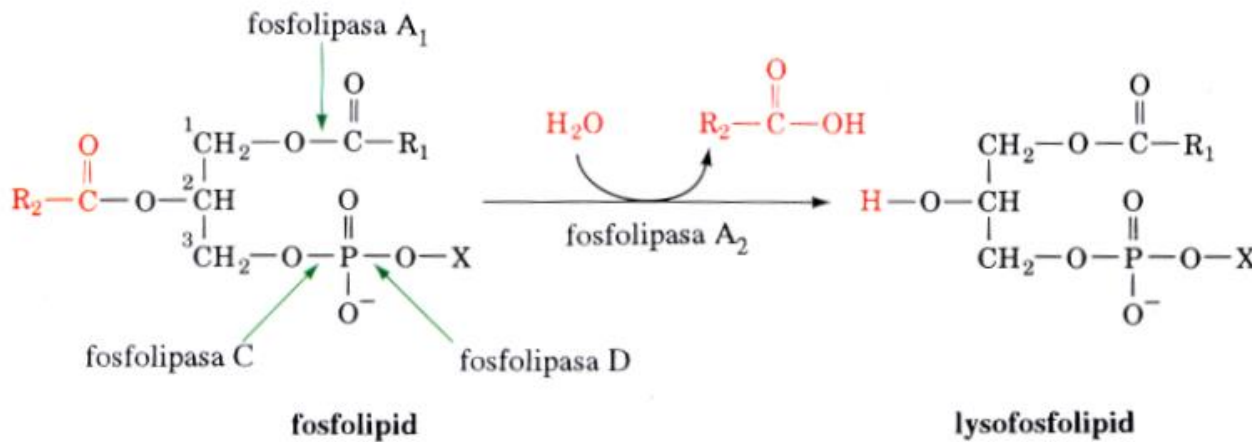
Obr. 23-26
Pořadí reakcí při biosyntéze mastných kyselin. Při tvorbě palmitátu se opakuje sedm cyklů prodloužení řetězce o C₂, načež následuje finální hydrolytický krok.

ROZDÍLY MEZI β -OXIDACÍ A BIOSYNTÉZOU MASTNÝCH KYSELIN



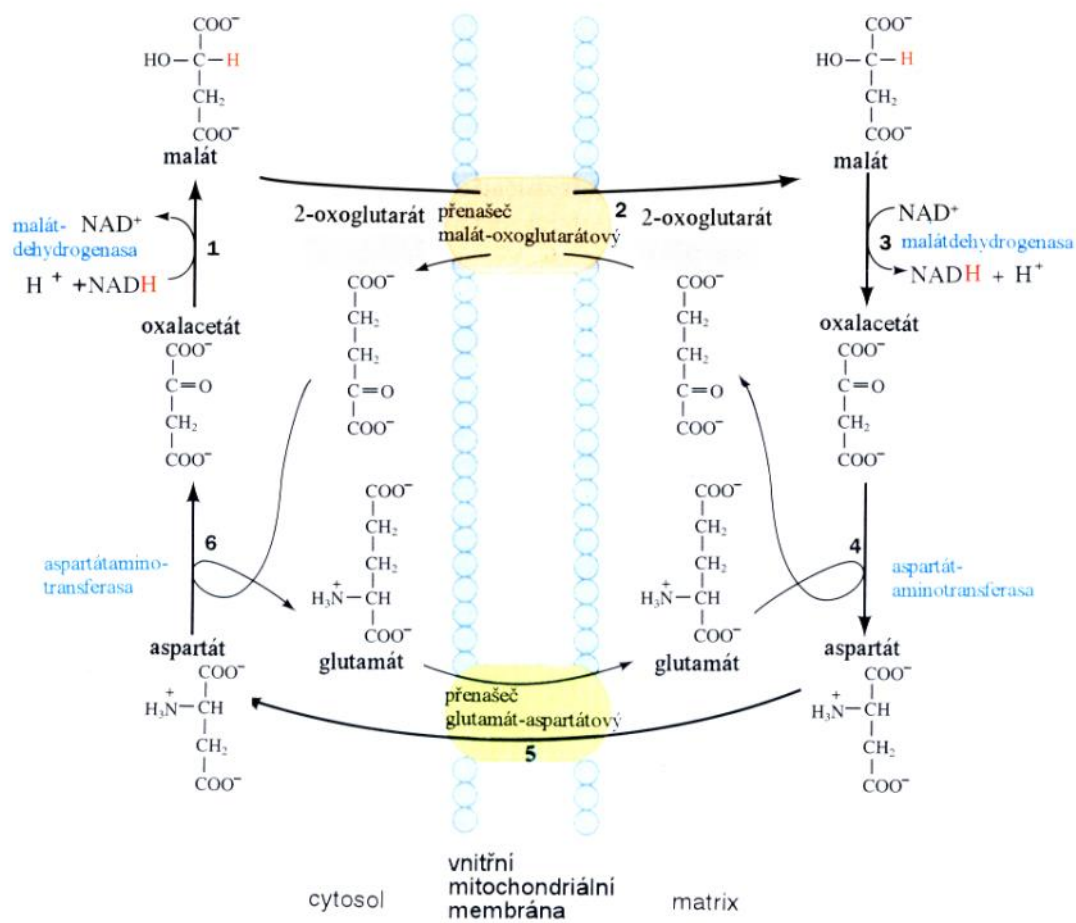
Obr. 23-23
 Znázornění rozdílů mezi drahami β -oxidace a biosyntézy mastných kyselin se zvláštním zřetelem na: **(1)** umístění v buňce, **(2)** přenašeč acylové skupiny, **(3)** akceptor/donor elektronů, **(4)** stereochemii hydratační a dehydratační reakce a **(5)** formu, v jaké jsou tvořeny nebo poskytovány jednotky C₂.

ŠTĚPĚNÍ FOSFOLIPIDŮ: FOSFOLIPASY



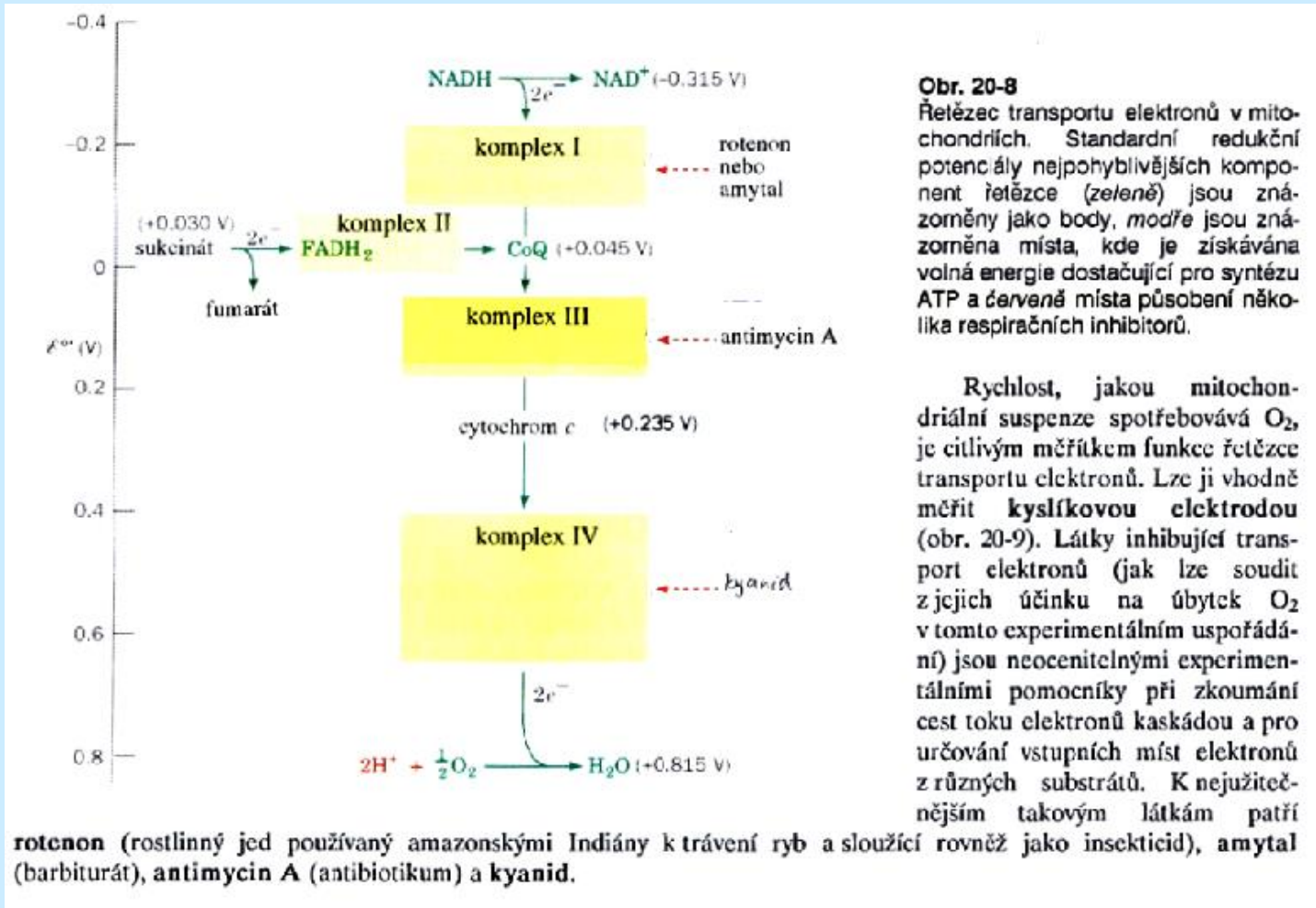
Obr. 23-1
Fosfolipasa A₂ hydrolyticky odštěpuje C₍₂₎-zbytek mastné kyseliny z triacylglycerolu za vzniku odpovídajícího lysofosfolipidu. Jsou vyznačeny také vazby hydrolyzované jinými typy fosfolipas, které jsou nazývány podle jejich účinků.

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.

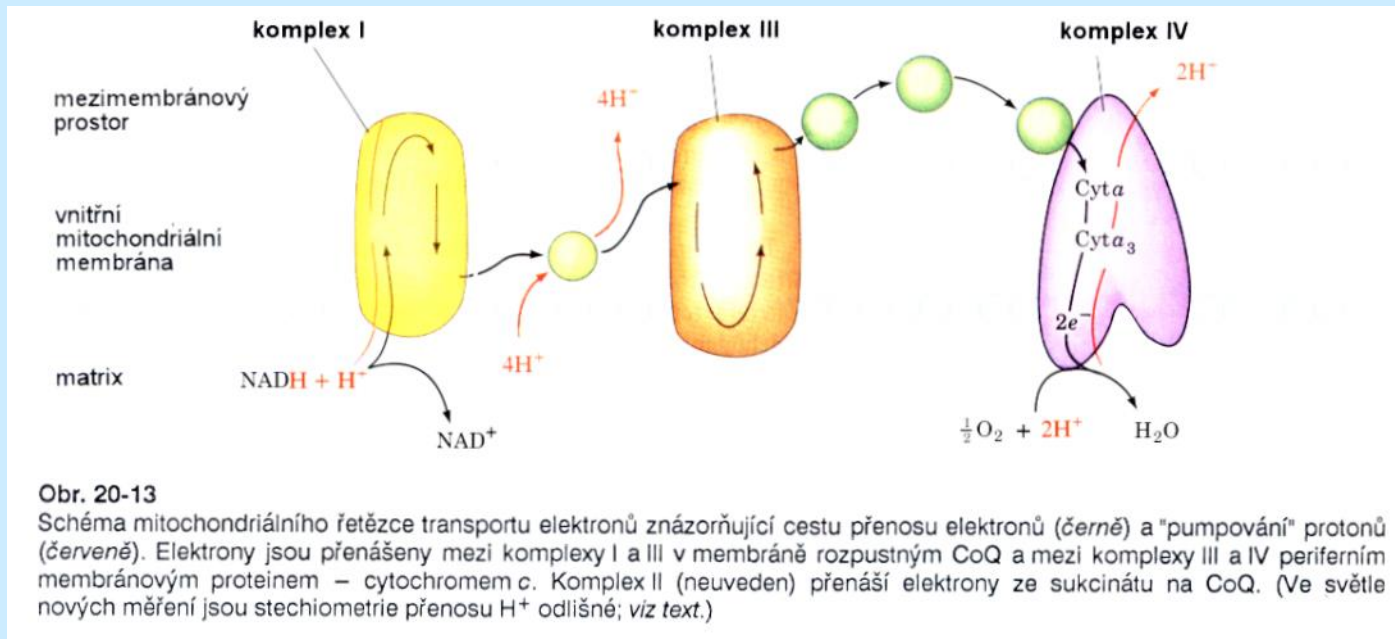
RESPIRAČNÍ ŘETĚZEC



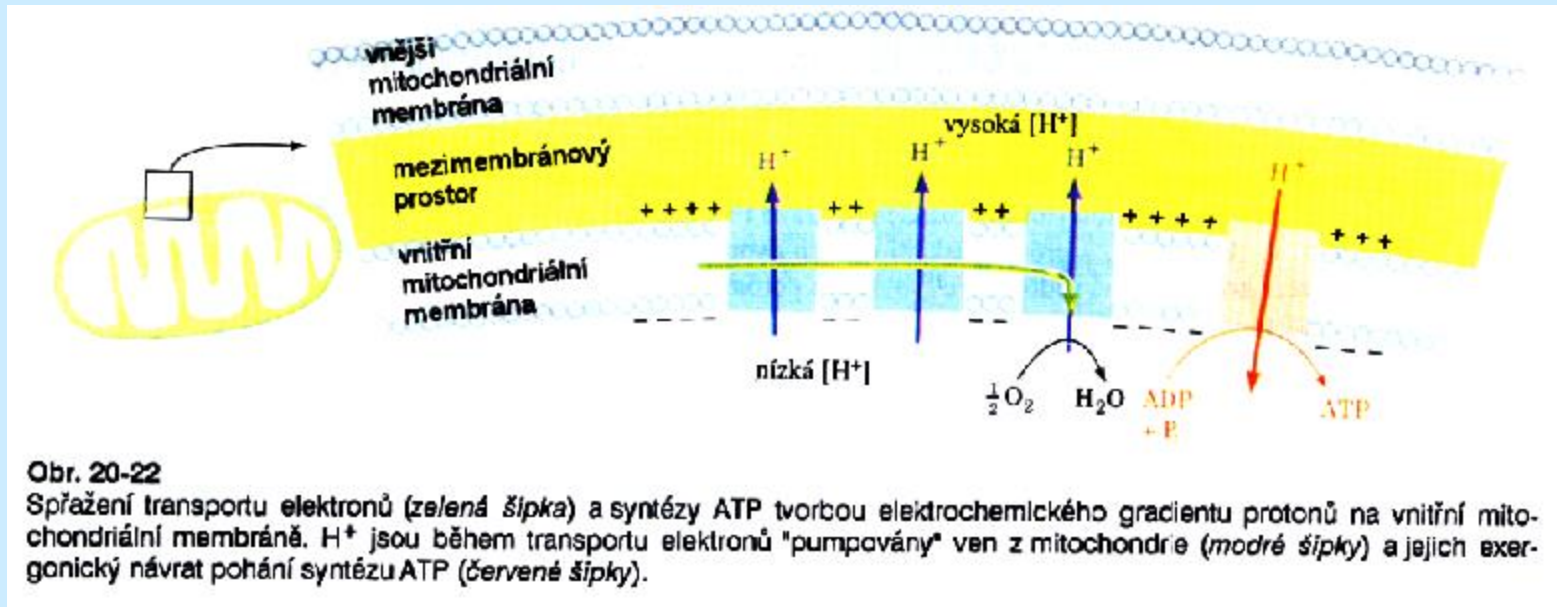
Tvorba ATP probíhá za katalýzy ATPasy díky gradientu $[H^+]$, vytvořenému komplexy I, IV a CoQ

Respirační řetězec

RESPIRAČNÍ ŘETĚZEC



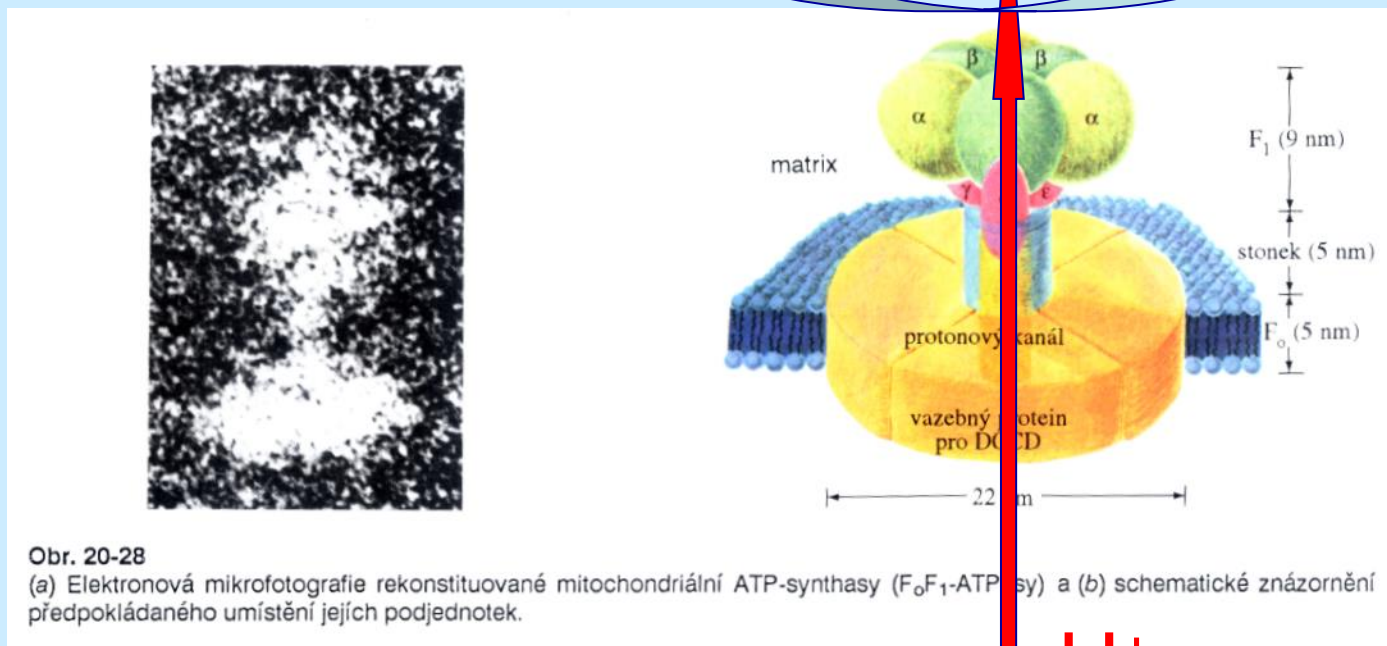
RESPIRAČNÍ ŘETĚZEC



RESPIRAČNÍ ŘETĚZEC – TVORBA ATP

ADP + P_i

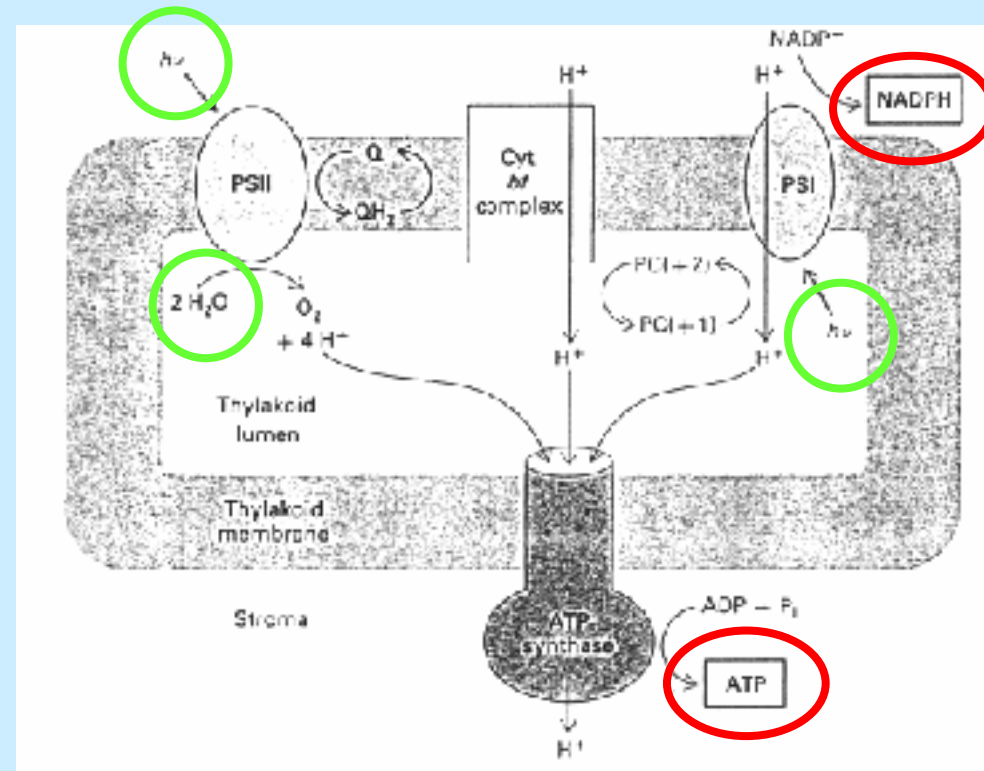
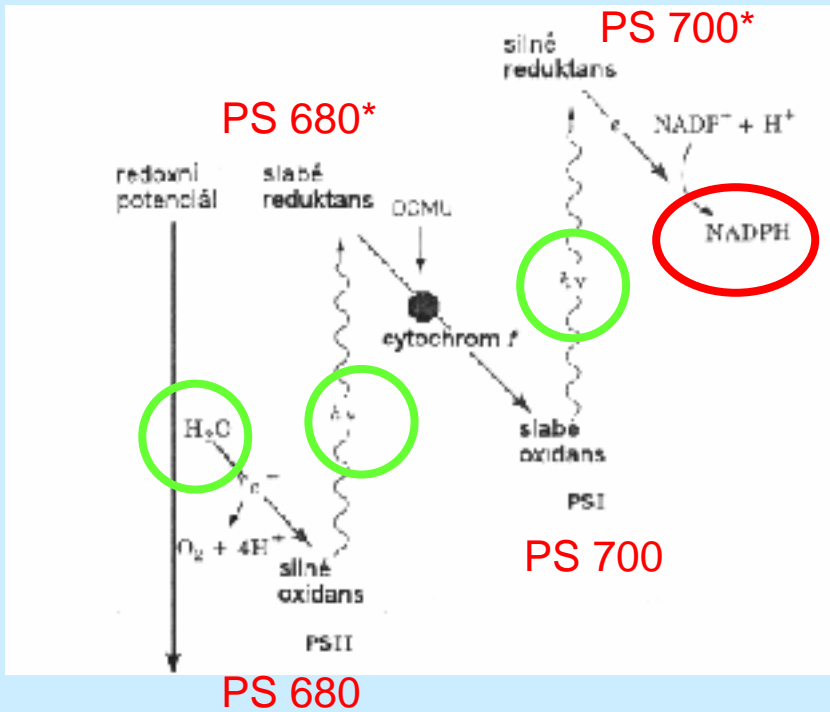
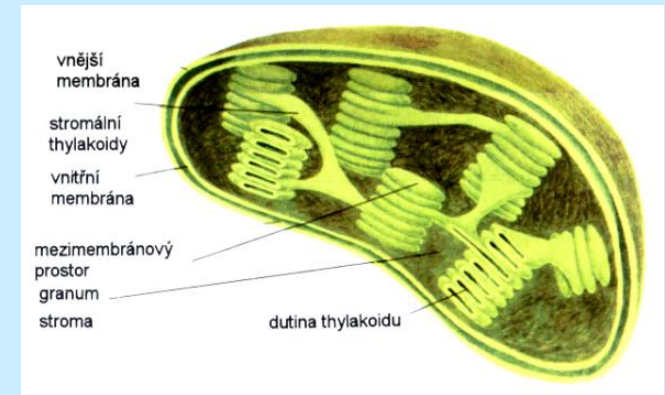
ATP



Obr. 20-28

(a) Elektronová mikrofotografie rekonstituované mitochondriální ATP-synthasy (F₀F₁-ATPasy) a (b) schematické znázornění předpokládaného umístění jejich podjednotek.

FOTOSYNTÉZA: 1. SVĚTELNÁ FÁZE



Fotosyntéza

BIOCHEMIE II - SEMINÁŘ

Vyučující:

Doc. Mgr. Pavel Bouchal, Ph.D.

Mgr. Kateřina Dadáková, Ph.D.

Mgr. Zdeněk Farka, Ph.D.

Mgr. Marta Pelcová, Ph.D.

Garant předmětu:

Doc. Mgr. Pavel Bouchal, Ph.D.

PROGRAM SEMINÁŘE

1. **Nukleové kyseliny:** Nukleové báze, nukleotidy, primární struktura NK. Sekvenování DNA
2. Replikace, transkripce, translace a proteosyntéza. Genetický kód. Úvod do molekulární biologie
3. Polymerázová řetězová reakce (PCR) a její využití. Genové manipulace
4. Test 1
5. **Redoxní reakce**
6. Opakování a výpočty k metabolismu a biosyntéze I
7. Opakování a výpočty k metabolismu a biosyntéze II
8. Test 2
9. Metabolismus **bílkovin a aminokyselin**, močovinový cyklus a metabolismus dusíku
10. Metabolismus 2-oxokyselin a biosyntéza aminokyselin
11. **Principy metabolických regulací**
12. Test 3

Opravné termíny zápočtu

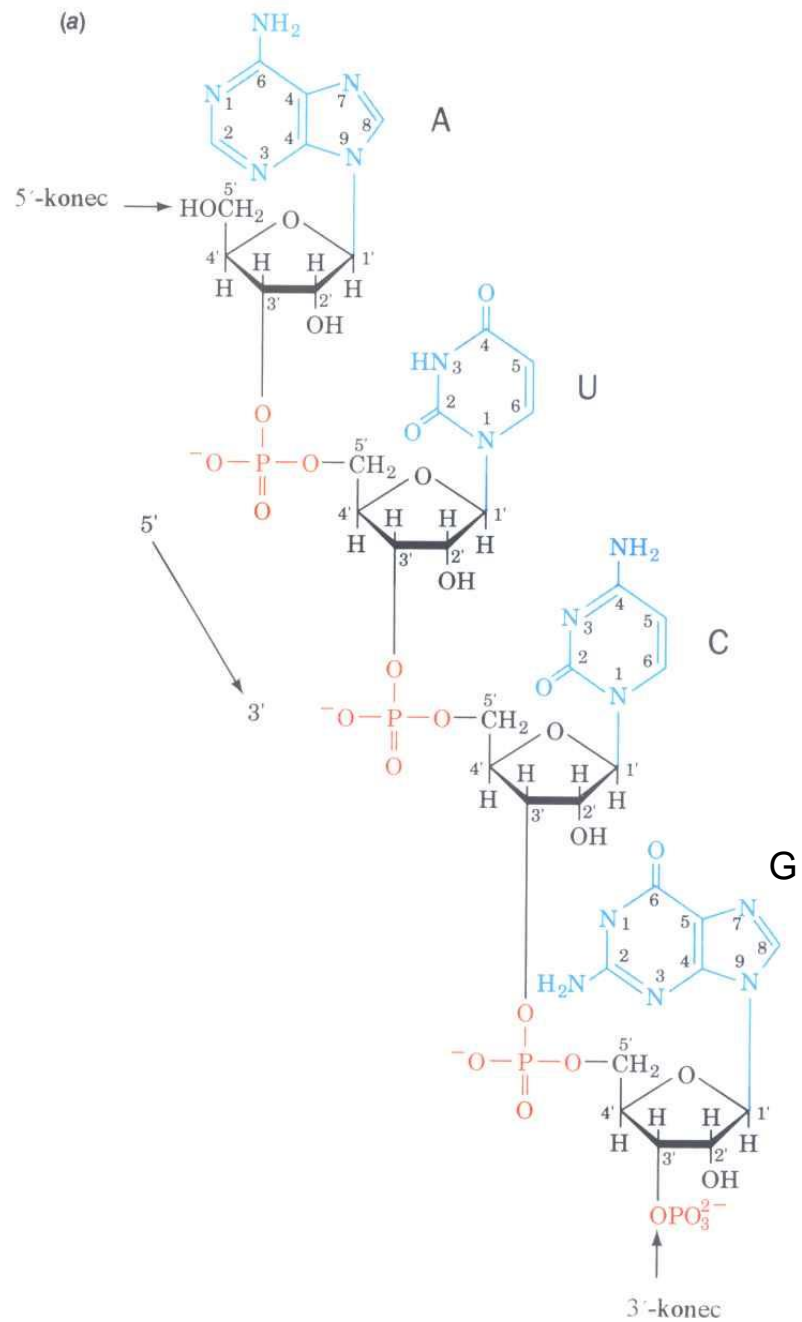
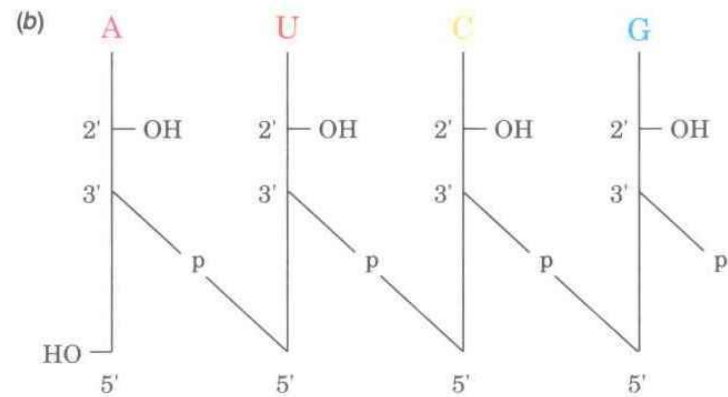
LITERATURA

Vše v IS MU: Studijní materiály/Učební materiály
-prezentace
-skripta V. Mikeš: Cvičení z biochemie

PODMÍNKY ZÍSKÁNÍ ZÁPOČTU

- Účast ve výuce: max. 1 neomluvená absence (více absencí: omluvenka v IS MUNI prostřednictvím studijního oddělení)
- Testy (3), min. 70% z celkového počtu bodů => zápočet v řádném termínu
- Souhrnný test z učiva celého semestru => zápočet v 1. (2.) opravném termínu

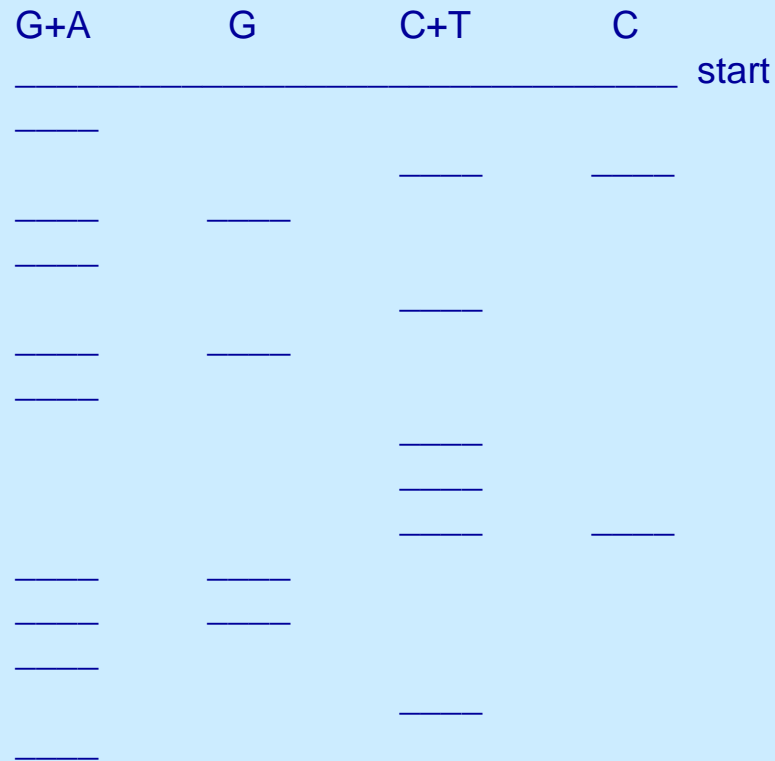
PRIMÁRNÍ STRUKTURA NUKLEOVÝCH KYSELIN

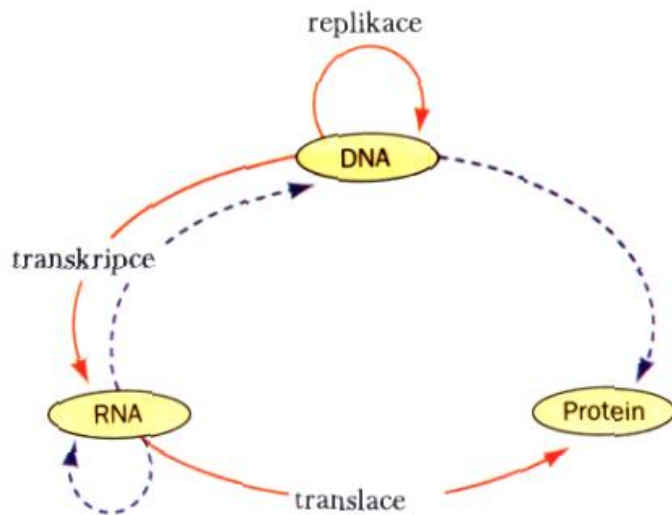


MAXAM-GILBERTOVA METODA SEKVENOVÁNÍ NUKLEOVÝCH KYSELIN

DETEKCE FRAGMENTŮ SEPAROVANÝCH ELEKTROFORÉZOU
NA FOSFORIMAGERU

(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	

RESTRIKČNÍ ENDONUKLEASY

- štěpí dsDNA v místě určité sekvence
 - původně ochrana bakterií proti bakteriofágům – namethyluje si určité sekvence vlastní DNA pomocí specifické methyltransferasy, produkuje restriční endonukleasu, která štěpí v dané sekvenci, pokud není methylována – což u bakteriofága není – jeho DNA bude poškozena
- **typ II** užitečný pro genové inženýrství – štěpí v místě „své“ sekvence dlouhé 4 – 8 bazí (typy I a II štěpí dále od cílové sekvence)
 - vznikají tak „lepivé“ konce; dnes známo 4000 těchto enzymů a popsáno 270 cílových sekvencí, komerčně dostupné
 - název dle produkující bakterie / serotypu a číslo – kolikátý to je

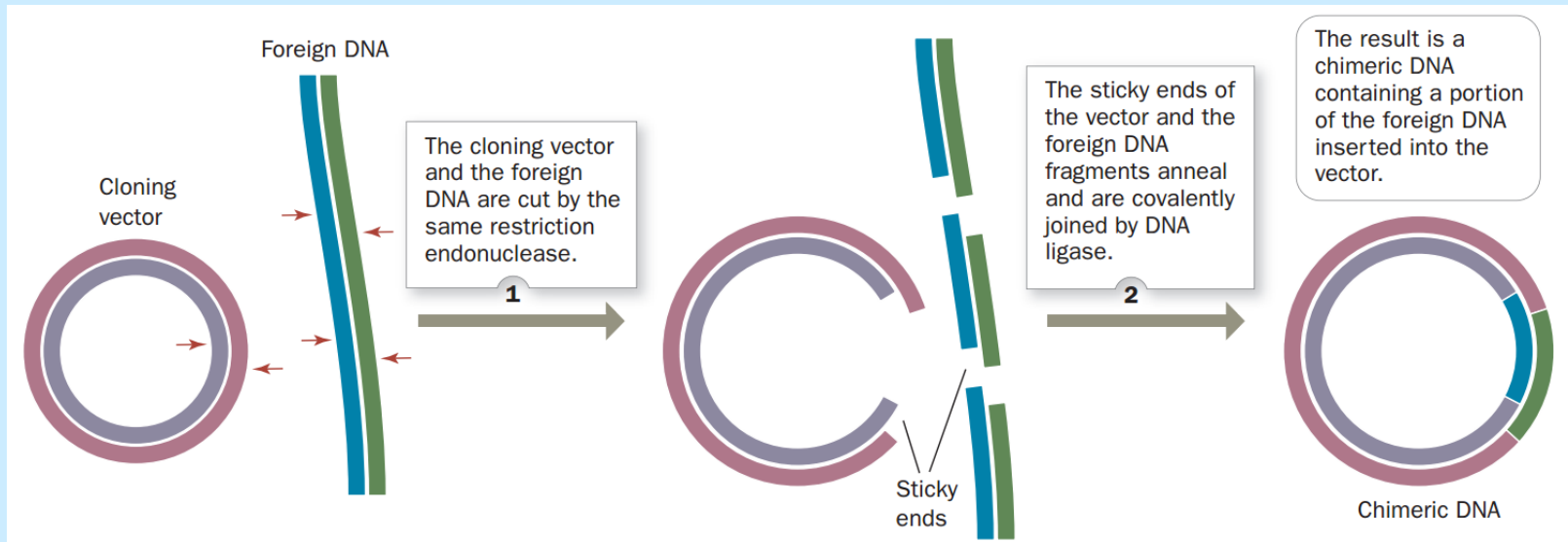
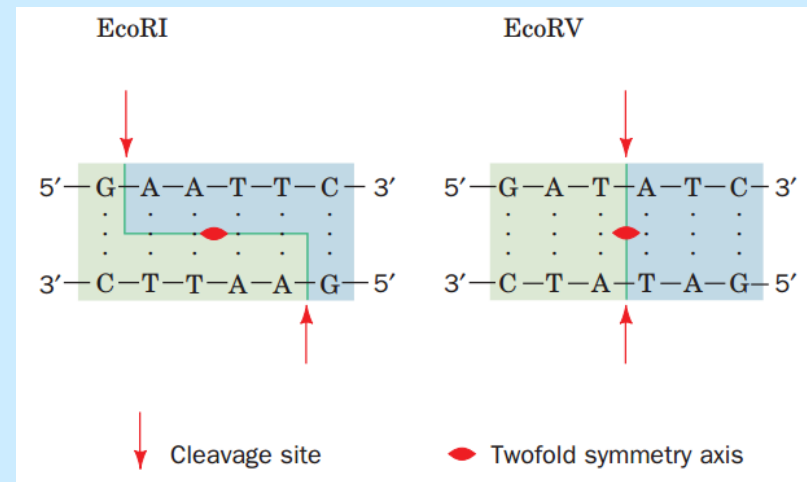
• BamHI	G↓GATCC	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> H
• EcoRI	G↓AATTC	<i>Escherichia coli</i> RY13
• EcoRII	↓CC(T/A)GG	<i>Escherichia coli</i> R245
• EcoRV	GAT↓ATC	<i>Escherichia coli</i> J62 pLG74
• HaeII	RGCGC↓Y	<i>Haemophilus aegyptius</i>
• HindIII	A↓AGCTT	<i>Haemophilus influenzae</i> R _d
• PstI	CTGCA↓G	<i>Providencia stuartii</i> 164

PALINDROM

- rozpoznávané sekvence restriktaas jsou typicky palindromické – čtou se stejně z obou konců dsDNA

EcoRI G↓AATTC

- tím vznikají částečně přečnívající jednořetězcové konce – lze je spojit s jinými fragmenty DNA, připravenými pomocí **stejně** restriktasy
- slouží při klonování pro vpravení cílové DNA do vektorů



- získá se **rekombinantní** DNA; spojení kovalentní vazbou – **DNA ligasa**

GENOVÉ INŽENÝRSTVÍ

- úseky DNA mohou být **klonovány** - reprodukovány v hostitelském organismu
 - **klonování** – produkce mnoha identických jedinců odvozených z jediného společného výchozího předka
 - ovce Dolly – naklonovaná technikou přenosu jádra ze somatické buňky

- **rekombinantní DNA technologie** dokáže změnit geny pro produkci proteinů nebo vytvářet transgenní organizmy
 - **molekulární klonování** či genové inženýrství – umožnily izolovat, zmnožit a měnit specifické DNA sekvence



AMPLIFIKACE ÚSEKU DNA

- určitý fragment DNA vytvořený štěpením restriční enzymem, PCR amplifikací nebo chemickou syntézou
- fragment vnesen do pomocné DNA molekuly – **vektoru**:
 - kruhové DNA molekuly od 1 po 200 kb z bakterií nebo kvasinek
 - molekulární „paraziti“: využívají replikační aparát buňky (i eukaryotické)
 - hostiteli mohou dodat užitečnou funkci, např. rezistenci k antibiotikům u bakterií, čehož se využívá při molekulárním klonování
 - konstrukce v laboratoři – rel. malé, snadná replikace, geny pro selekci pomocí antibiotik, restriční místa pro vpravení DNA fragmentů, komerčně dostupné

viry

- pro infekci buněk cizorodou DNA (např. plasmidem)
- lentiviry, adenoviry – pro infekci eukaryotických buněk
- bakuloviry - pro infekci hmyzích buněk
- bakteriofágy – pro infekci bakterií

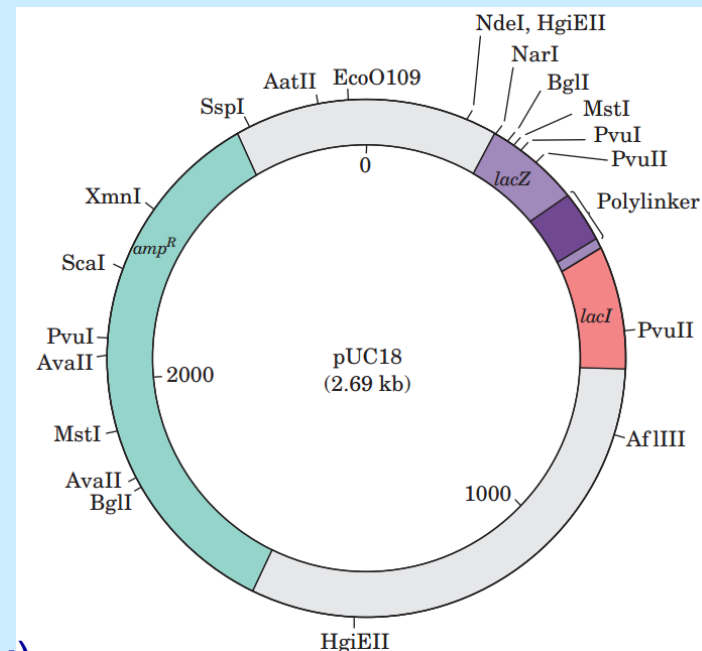
umělé chromosomy z bakterií (BACs) či kvasinek (YACs)

- pro velmi dlouhé DNA
- modifikovaný vektor s vloženou DNA inkorporován do buněk, ty po selekci kultivovány a vektor replikován
- vektor může sloužit také k získání RNA a produkci proteinu

PLASMID (PŘÍKLAD)

- klonovací vektor pUC18 (*E. coli*) pro DNA do 10 kb
 - (pUC .. plasmid Universal Cloning)
- 13 restričních míst, polylinker
 - tam se vpraví úsek DNA

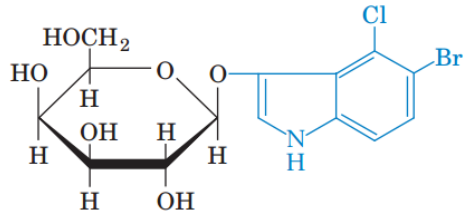
1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	6	
Met	Thr	Met	Ile	Thr	Asn	Ser	Pro	Asp	Pro	Ser	Thr	Cys	Arg	Ser	Thr	Asp	Pro	Gly	Asn	Ser
ATG	ACC	ATG	ATT	ACG	AAT	TCC	CCG	GAT	CCG	TCG	ACC	TGC	AGG	TCG	ACG	GAT	CCG	GGG	AAT	TCA
EcoRI					BamHI			SalI Acl HindII		PstI		SalI Acl HindII		BamHI		EcoRI				



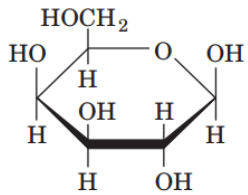
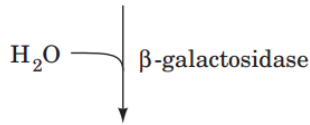
- *amp^R* gen rezistence k ampicilinu
- *lacZ* gen kódující β -galaktosidasu
- transformace bakterie = vstup plasmidu do bakteriální chemokompetentní buňky (teplotní šok)
- v přítomnosti antibiotika přežijí pouze transformované bakterie (díky vektorem vneseným genům rezistence)
- detekce inkorporace úseku DNA: inkorporací úseku do polylinkeru se přeruší gen pro galaktosidasu, který pak produkuje nefunkční enzym, pro ověření se provede test aktivity se substrátem X-gal:
 - aktivní – modré zbarvení – DNA se neinkorporovala
 - neaktivní – bílé kolonie – DNA se inkorporovala a inaktivovala tak β -galaktosidasu

„MODROBÍLÝ“ SCREENING

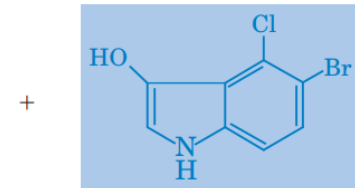
- chromogenní substrát pro Gal



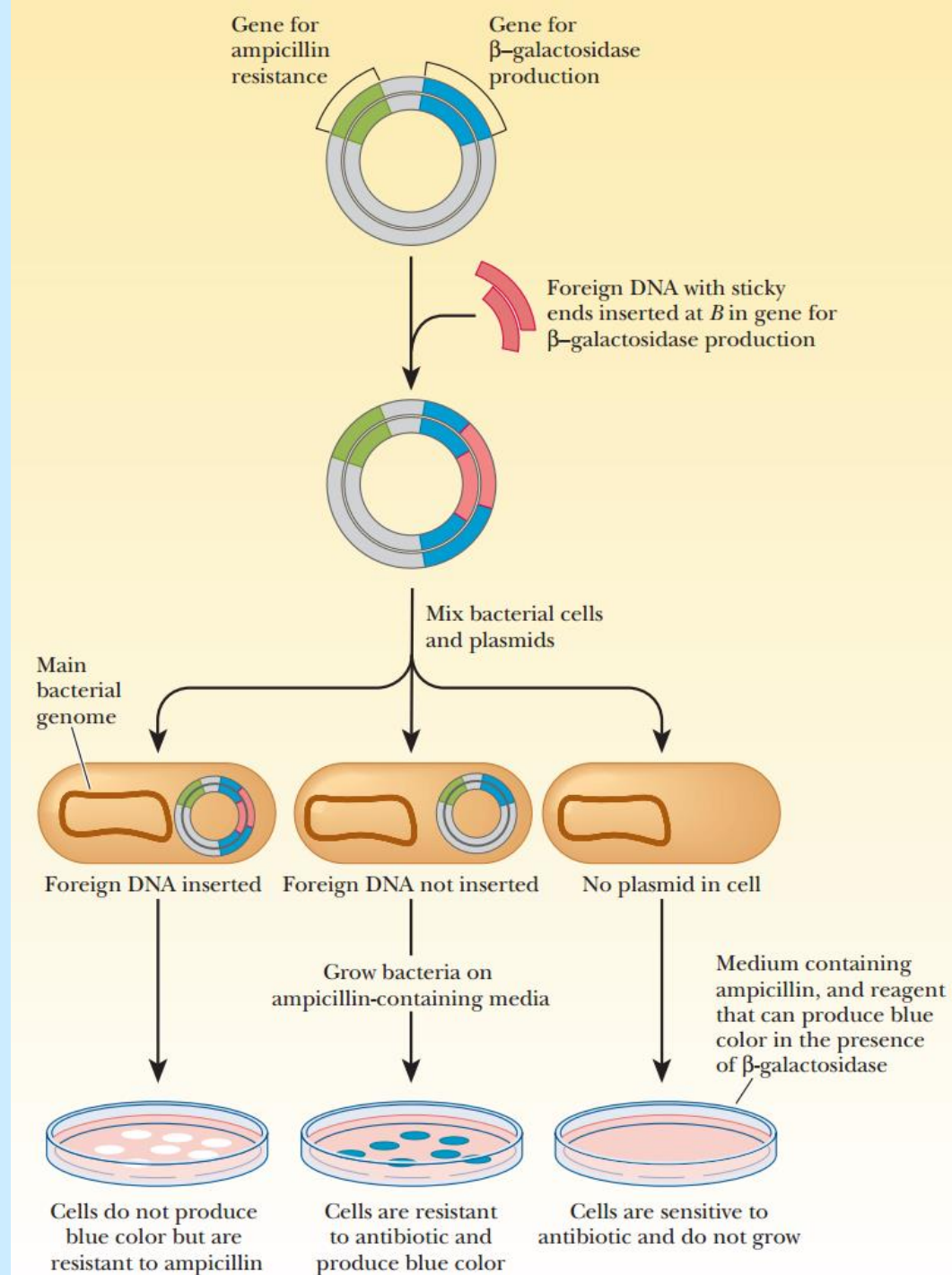
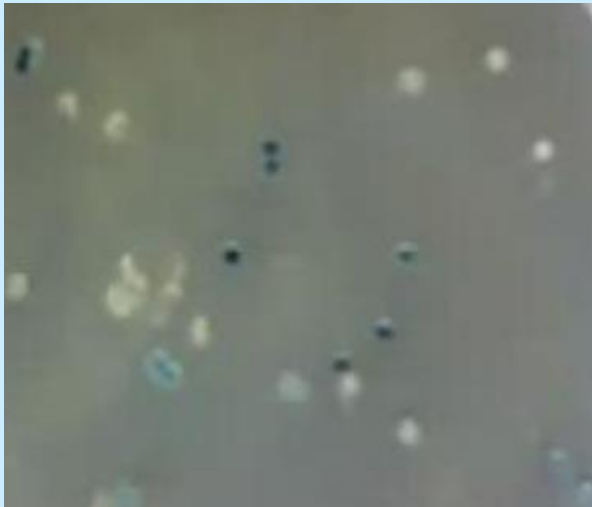
5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside (X-gal)
(colorless)



β-D-Galactose

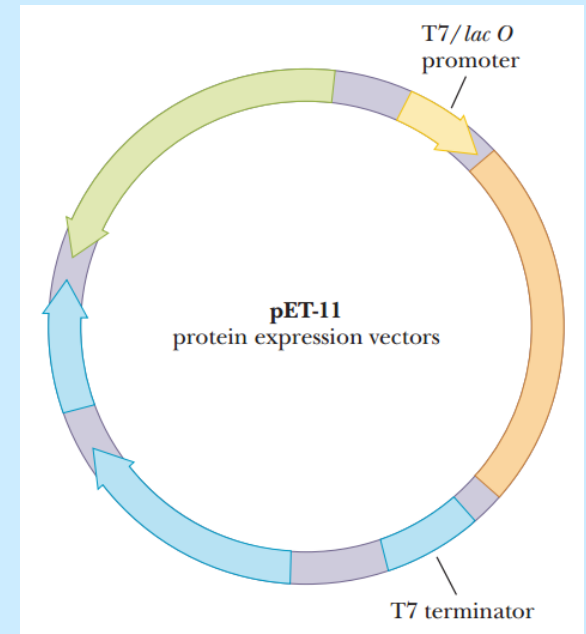


5-Bromo-4-chloro-3-hydroxyindole



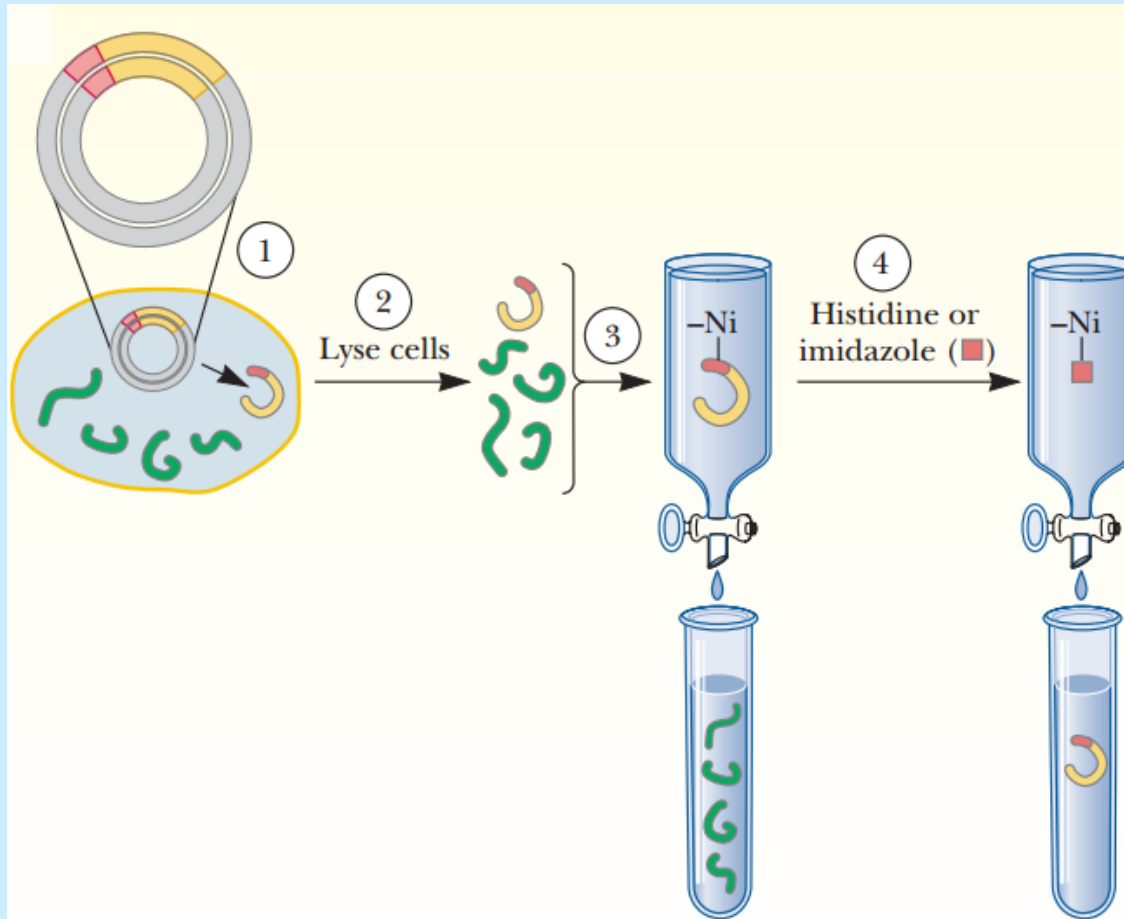
EXPRESSE KLONOVANÝCH GENŮ

- **expresní vektor** je podobný klonovacímu, ale navíc obsahuje sekvence nutné pro transkripci a translaci v hostitelské buňce
 - promotor pro RNA polymerasu, vazebné místo pro ribosom, terminační sekvence
 - inducibilní systémy: vektor obsahuje promotor indukovatelný isopropylthiogalaktosidem (**IPTG**), kterým lze spustit expresi cílového genu
 - následuje transkripce vloženého genu na mRNA a její translace
- vytvářený protein (až 30% podíl) může buňky negativně ovlivnit a je tudíž často ukládán do inkluzních tělísek – bakterie tak inaktivuje cizorodé proteiny
- problém exprese eukaryotických proteinů v bakteriích: chybí posttranslační modifikace (např. glykosylace) - exprese v kulturách hmyzích či živočišných buněk
- využití: produkce proteinů, funkční studie proteinů (transfekce)



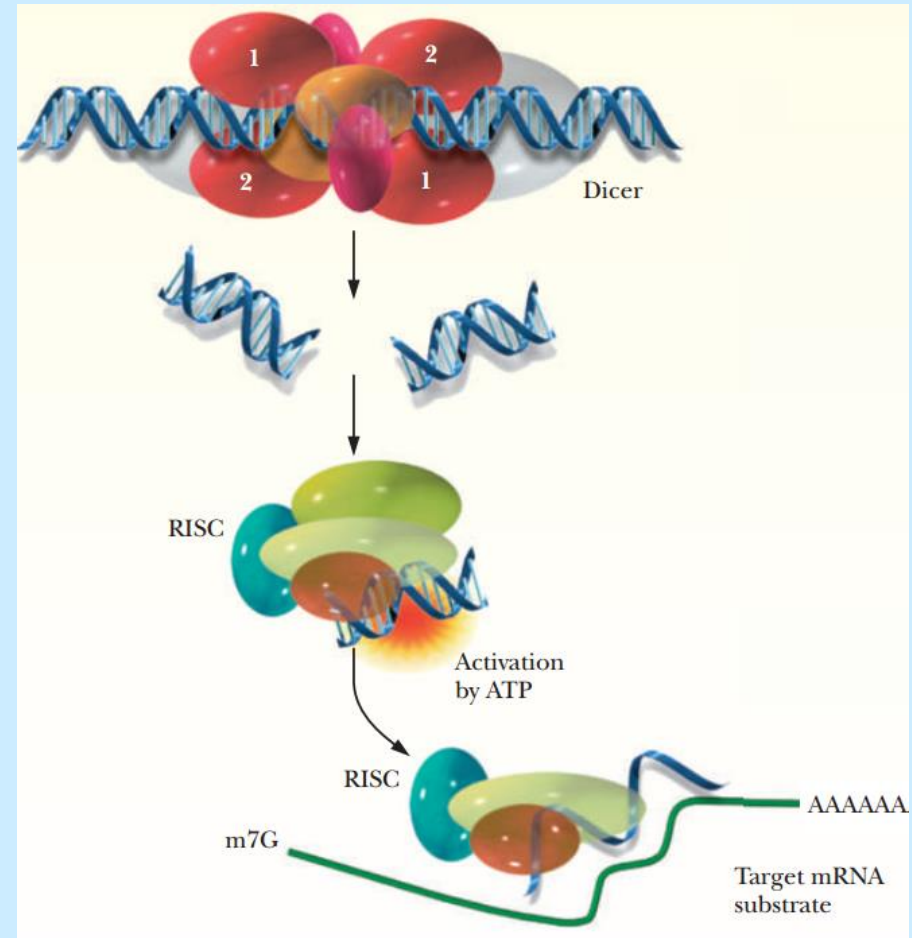
PURIFIKACE REKOMBINANTNÍCH PROTEINŮ

- do genu daného proteinu se na konec přidá sekvence kódující „tag“: např. „**oligohistidine tag (H6)**“ – snadná izolace metaloafinitní chromatografií – chelát s Ni^{2+} ionty vázanými na nosné matrici (afinitní chromatografie na kolonce, magn. částicích, ...)



RNAi (interference)

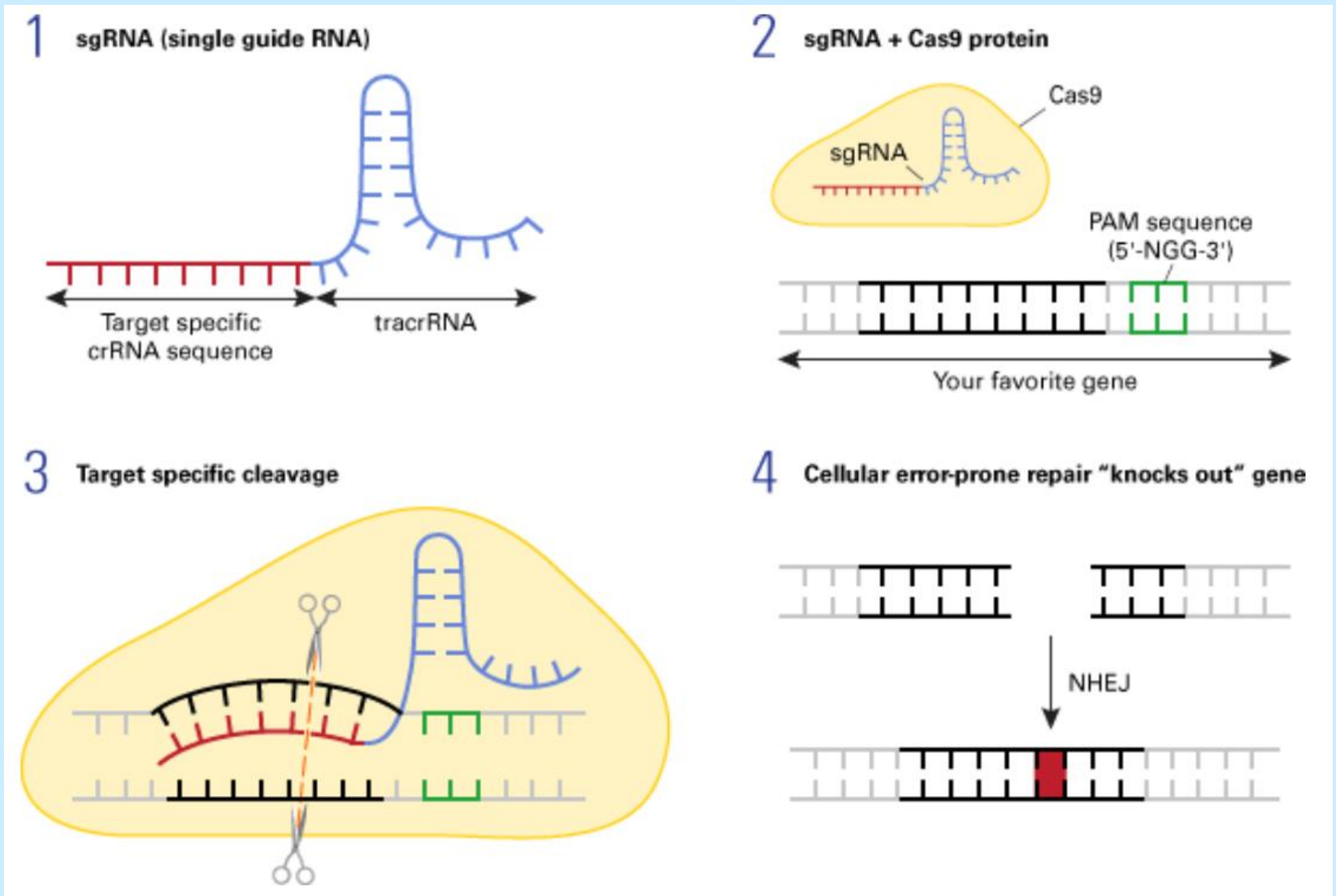
- přirozený mechanismus regulace genové exprese
- dsRNA blokuje expresi genů sekvenčně-specifickým způsobem („gene silencing“)
- **dicer** – RNA nukleasa (RNasa) třídy III se váže na dsRNA a štěpí ji na malé fragmenty siRNA
 - (small interfering, 22 až 25 nt)
- ty potom vytvoří komplex **RISC** s dalšími proteiny (RNA-induced silencing complex), naváží se na mRNA se sekvencí odpovídající siRNA a degradují ji
- využití ve výzkumu: umlčení exprese genů ve funkčních studiích proteinů



CRISPR/Cas9

- pro cílené editování genomu libovolného organismu
 - „clustered regularly interspaced short palindromic repeats“
 - jednoznačné určení místa zásahu, efektivní funkce, snadné, cenově dostupné
- používá „**short guide RNA**“ pro přesné navedení **Cas9 nukleasy** k místně specifickému rozštěpení dsDNA (vybraného genu)
 - pro štěpení je nezbytný **protospacer adjacent motif (PAM)**: 3-nt motiv 5'-NGG-3' bezprostředně na konci cílové oblasti
 - vzniklý dvojřetězcový zlom DNA je pak buňkou opraven pomocí jednoho z následujících mechanismů:
 - NHEJ** (non-homologous end joining DNA repair) vede k inzerční / deleční mutaci
 - posun čtecího rámce – vyřazení genu (gene knock-out);
 - HDR** (homology directed repair) může vložit sekvenci dle dodaného opravného templátu

sgRNA (short guide RNA) obsahuje cílově specifickou crRNA a pomocnou trans-aktivační tracrRNA (váže Cas9 nukleázu)



Genové manipulace

MOŽNOSTI CRISPR/Cas9

- **editace** genomu – inaktivace vybraných genů
- inhibice / aktivace (**CRISPR interference**)
 - použití „mrtvé“ dCas9 eliminuje štěpení DNA, ale zachová schopnosti zacílit požadovanou sekvenci
 - lze přidat různé regulační faktory k dCAS9 a tak zapnout / vypnout gen či nastavit úroveň jeho aktivity
 - CRISPRi inhibuje geny reverzně (podobné RNAi)
- tvorba **modelových organismů** - napodobují onemocnění nebo nesou fenotypové znaky způsobené utlumením genu či jeho mutací
 - na úrovni zárodečné linie pro vytvoření jedinců se změněným genem ve všech buňkách
 - nezárodečné linie buněk - lidské pluripotentní kmenové buňky, zavádění cílených mutací
- **biomedicína** - zacílení virulent. faktorů, genů rezistence na antibiotika
 - nová forma antimikrobiální terapie, manipulace bakteriální populace.
 - omezení replikace herpes virů, odstranění DNA viru Epstein-Barrové (virová deplece)

GENOVÁ TERAPIE

- transfer nového genetického materiálu do buněk jednotlivců pro léčebné účely
 - aby byla změna trvalá, musí se inkorporovat do genomu

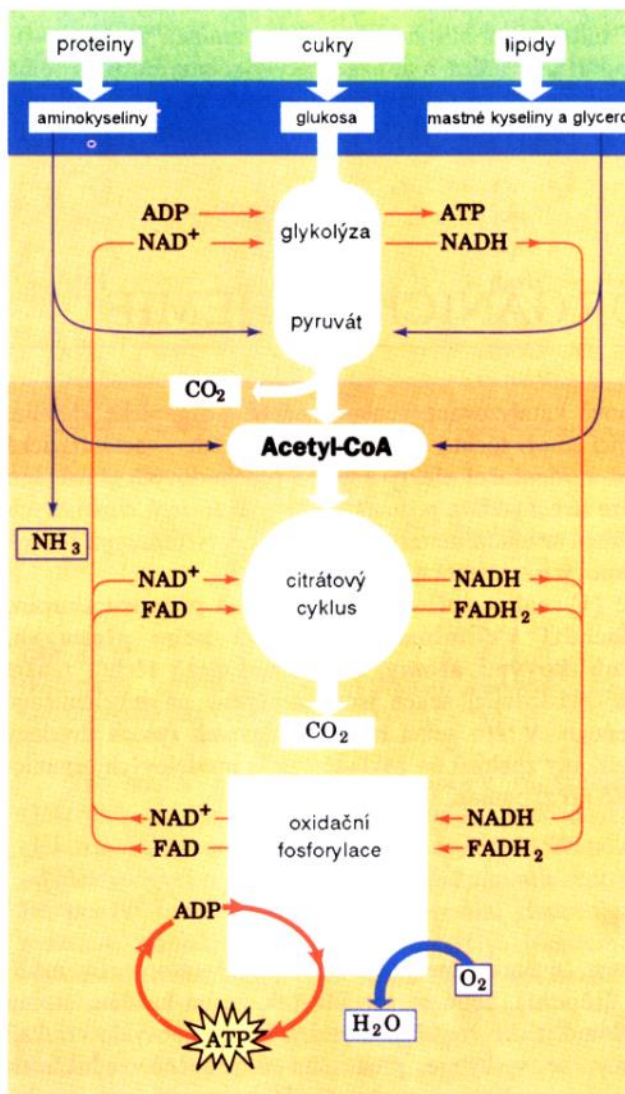
úspěchy:

- posílení nebo fakticky obnovení funkce dětského imunitního systému – „bubble boy syndrome“ – život v izolaci
 - do buněk kostní dřeně pacienta vnesen gen pro γ -C cytokinový receptor, léčba SCID-X1 (severe combined immunodeficiency disease)
 - cytokiny – signalizační peptidy produkované v různých buňkách, v imunitním systému, tam ovlivňují růst, diferenciaci a chování buněk
- Leuberova kongenitální amaurosie – vzácná forma slepoty
- X adrenoleukodystrofie – defektní membránový protein – poškození mozku
- β -thalasemie – forma anemie
- **problémy** – vektor – typicky retrovirus – může ovlivnit imunitní systém, náhodné včlenění může vést až ke zhoubnému bujení
 - 2 děti vyléčené na SCID-X1 dostaly leukemii..

ETICKÉ ASPEKTY

- 1970 – počátky genového inženýrství, o bezpečnosti experimentů málo poznatků – moratorium do vzniku regulačních pravidel a legislativy
- zakázány jasně nebezpečné pokusy
 - vložení genu pro toxin do E. coli – ze symbionta lidského organismu by se stal nebezpečný patogen
- hrozba úniku potenciálně nebezpečných GMO do volného prostředí
 - mnohé potřebují k životu velmi speciální podmínky či živiny a mimo laboratoř nepřežijí
- nicméně řada experimentů napodobuje přirozené procesy – mutace a selekce – šlechtitelství probíhá po staletí
- nové aspekty
 - růstový hormon se rutinně dává dětem s malým vzrůstem; má se dávat také atletům či jiným výkonostním sportovcům pro zvětšení výšky a výkonnosti?
 - léčba geneticky podmíněných onemocnění přijímána jasně pozitivně
 - má se odstranění poruchy ale přenést i na potomky?
 - použít výsledky genetických testů pro výběr studia, selekci uchazečů, nastavení pojistných podmínek, ...?

PŘEHLED AEROBNÍHO METABOLISMU



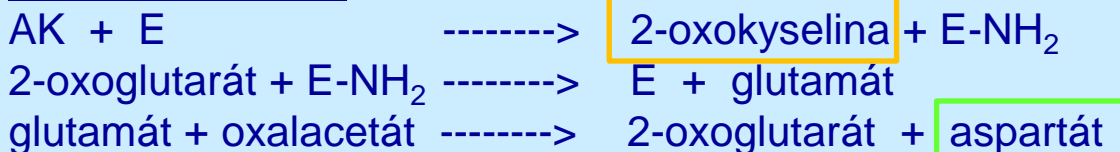
Obr. 15-3

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.

MECHANISMY DEAMINACE

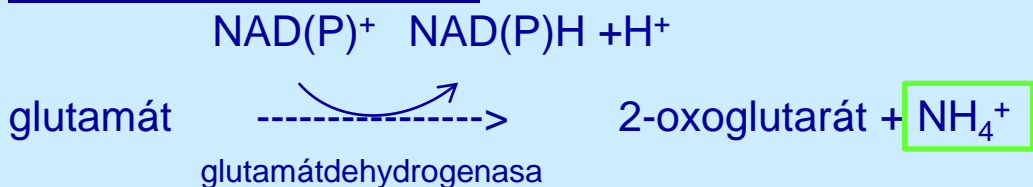
METABOLISMUS 2-OXOKYSELIN

TRANSAMINACE

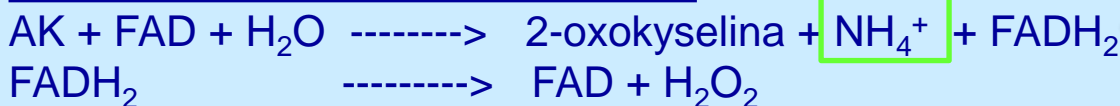


E: ALT ... alaninaminotferasa,
AST ... aspartátaminotferasa,...

OXIDAČNÍ DEAMINACE

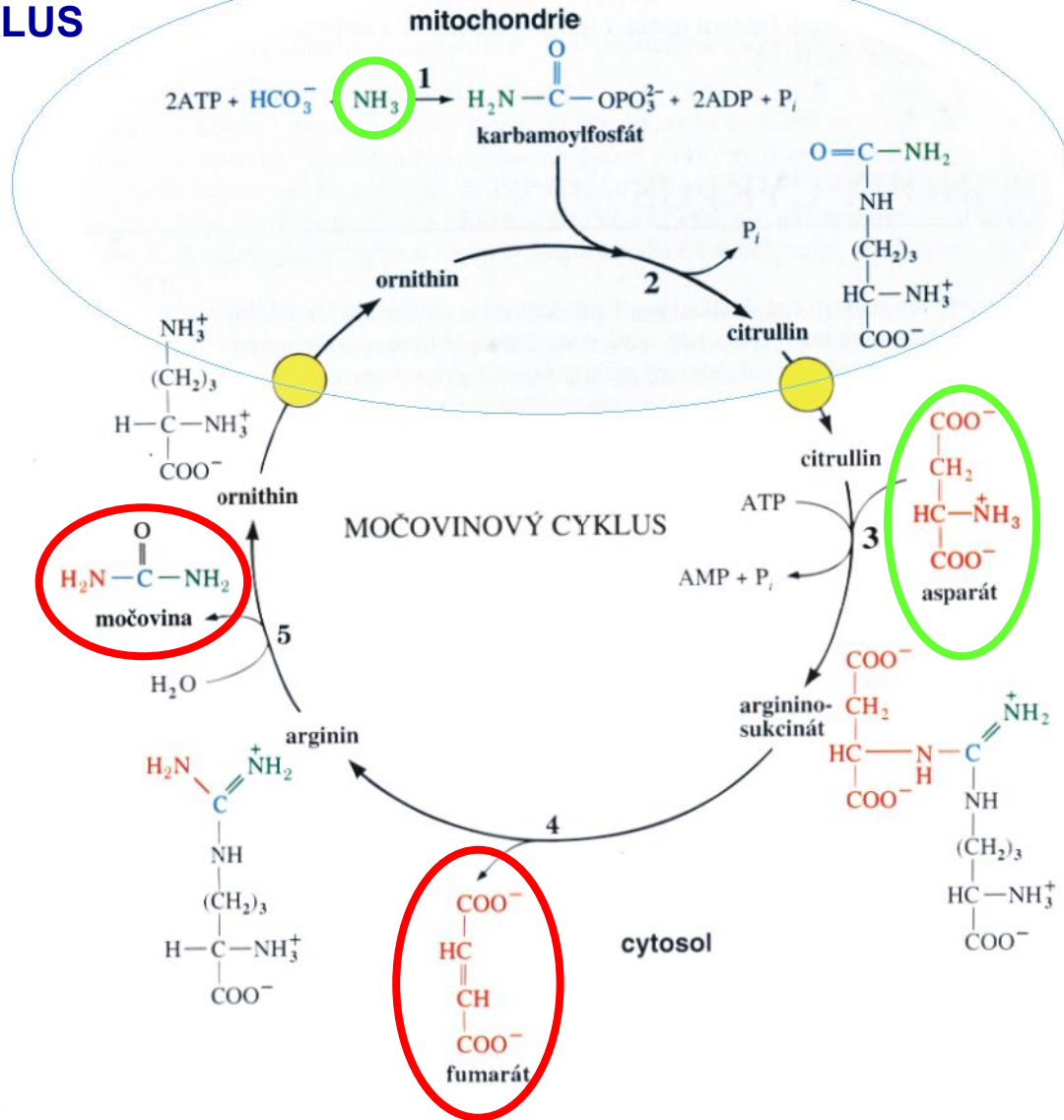


DALŠÍ MECHANISMY DEAMINACE



MOČOVINOVÝ CYKLUS

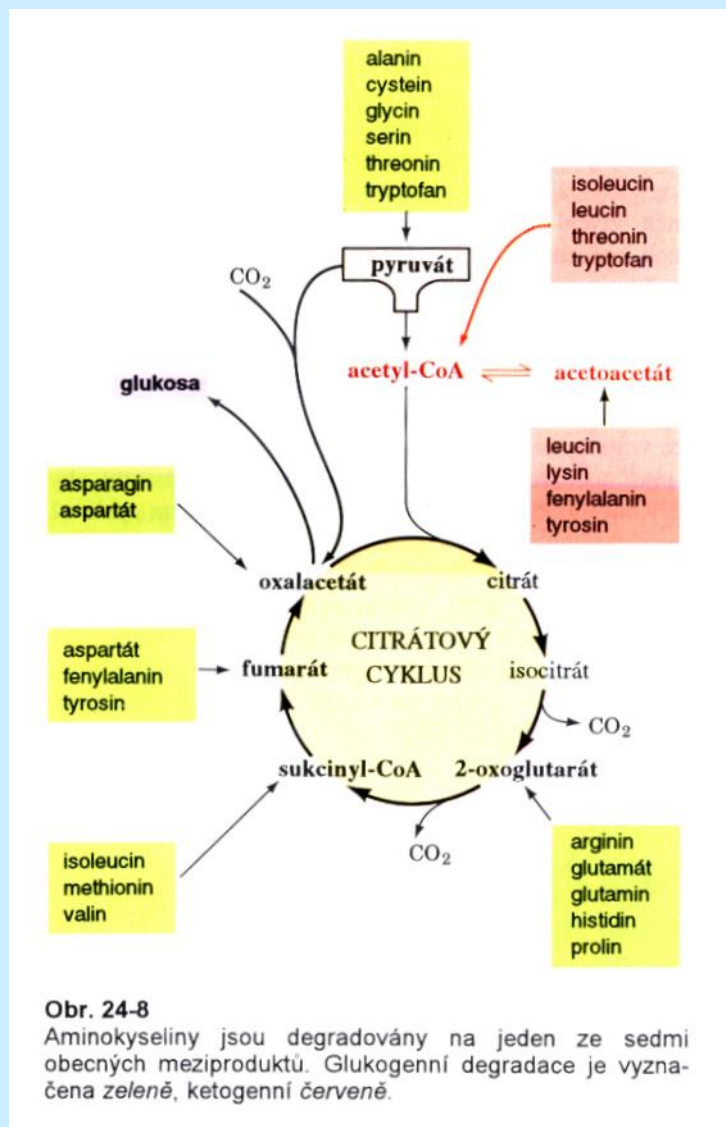
MOČOVINOVÝ CYKLUS



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. Cyklu se účastní pět enzymů: (1) karbamoylfosfátsynthetasa, (2) ornithin-karbamoyltransferasa, (3) argininosukcinátsynthetasa, (4) argininosukcinátlyasa a (5) arginasa.

METABOLISMUS AMINOKYSELIN A JEJICH 2-OXOPRODUKTŮ

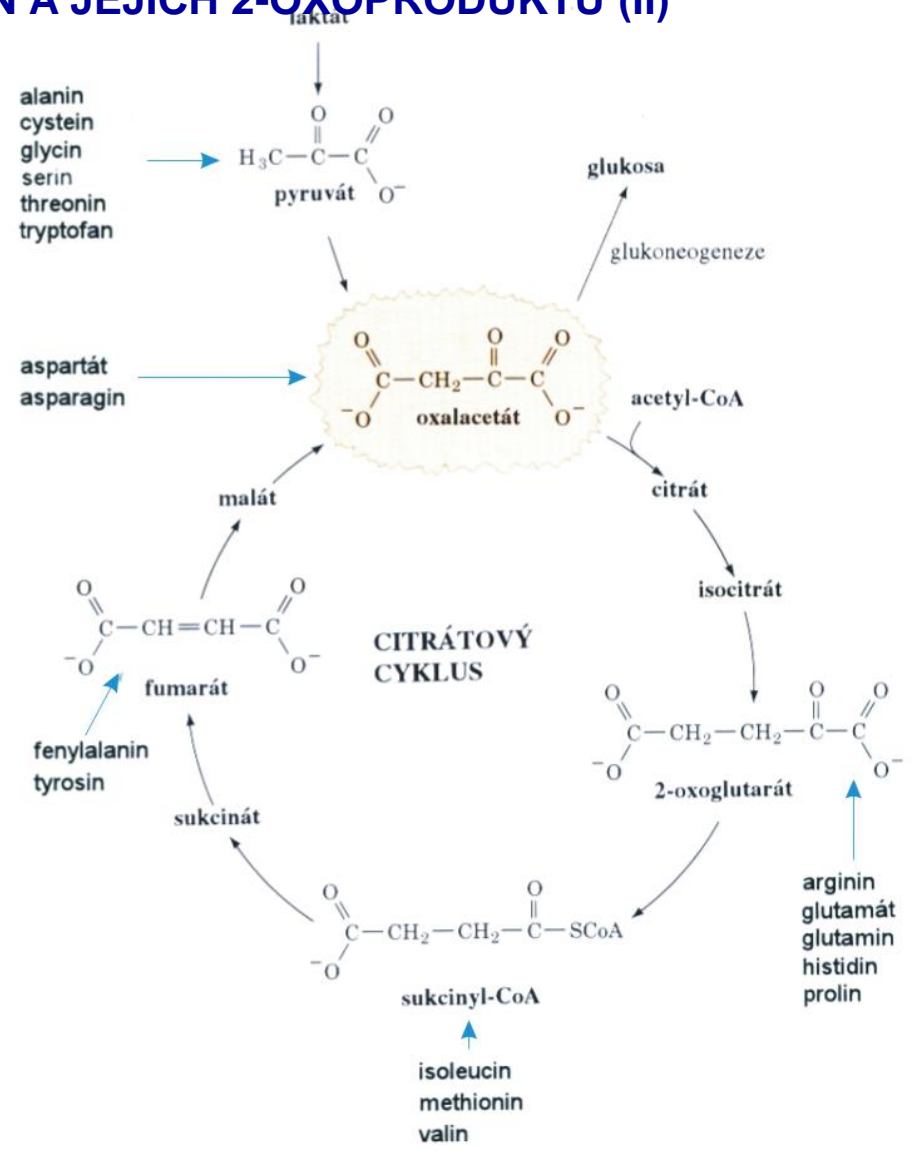


Obr. 24-8

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

Metabolismus bílkovin a
aminokyselin

METABOLISMUS AMINOKYSELIN A JEJICH 2-OXOPRODUKTŮ (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.

AMINOKYSELINY V ROLI BIOLOGICKÝCH PREKURZORŮ

- z Gly+acetátu: **hem**
hem > žlučová barviva
- fyziologicky aktivní aminy
 - z Tyr: **adrenalin** (hormon)
noradrenalin (hormon)
dopamin (neurotransmitter)
 - z Trp: **serotonin** (neurotransmitter)
 - z Glu: **γ-aminomáselná kyselina** (GABA) (neurotransmitter)
 - z His: histidin -----> **histamin** (alergie)
PLP-dependentní histaminkarboxylasa
inhibitory: antihistaminika

AMINOKYSELINY V ROLI BIOLOGICKÝCH PREKURZORŮ

- koenzymy

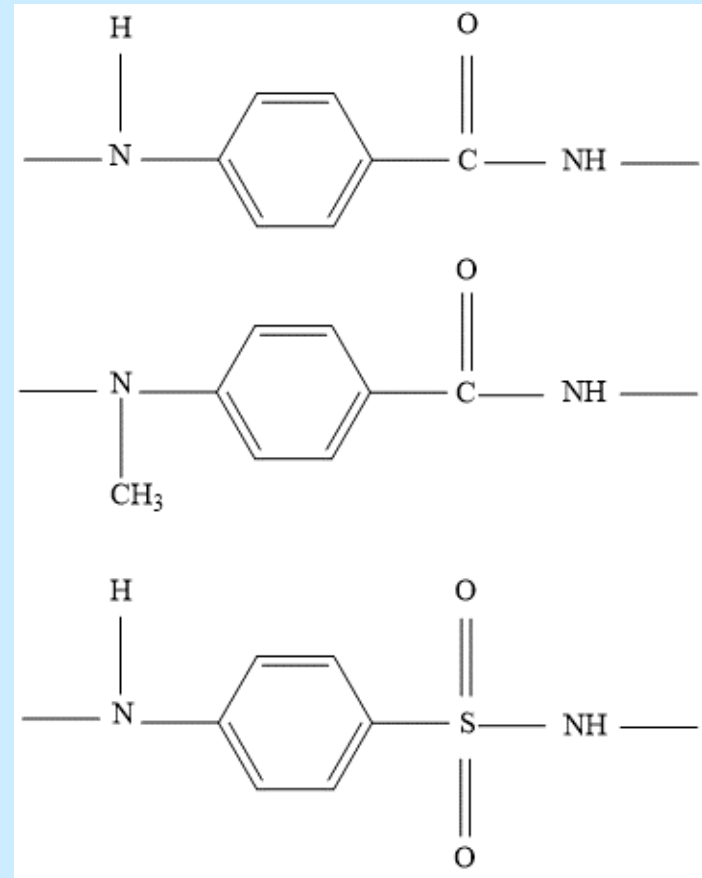
biotin: přenos C1 štěpů v rámci karboxylační reakce oxalacetát > pyruvát

tetrahydrofolát: podobná funkce
součástí THF je:

skupina odvozená od
p-aminobenzoové kyseliny

podvodná analoga (terapeutický přístup):
metotrexát
(cytostatikum)

sulfonamidy
(antibakteriálně působící
chemoterapeutika)



Metabolismus bílkovin a
aminokyselin

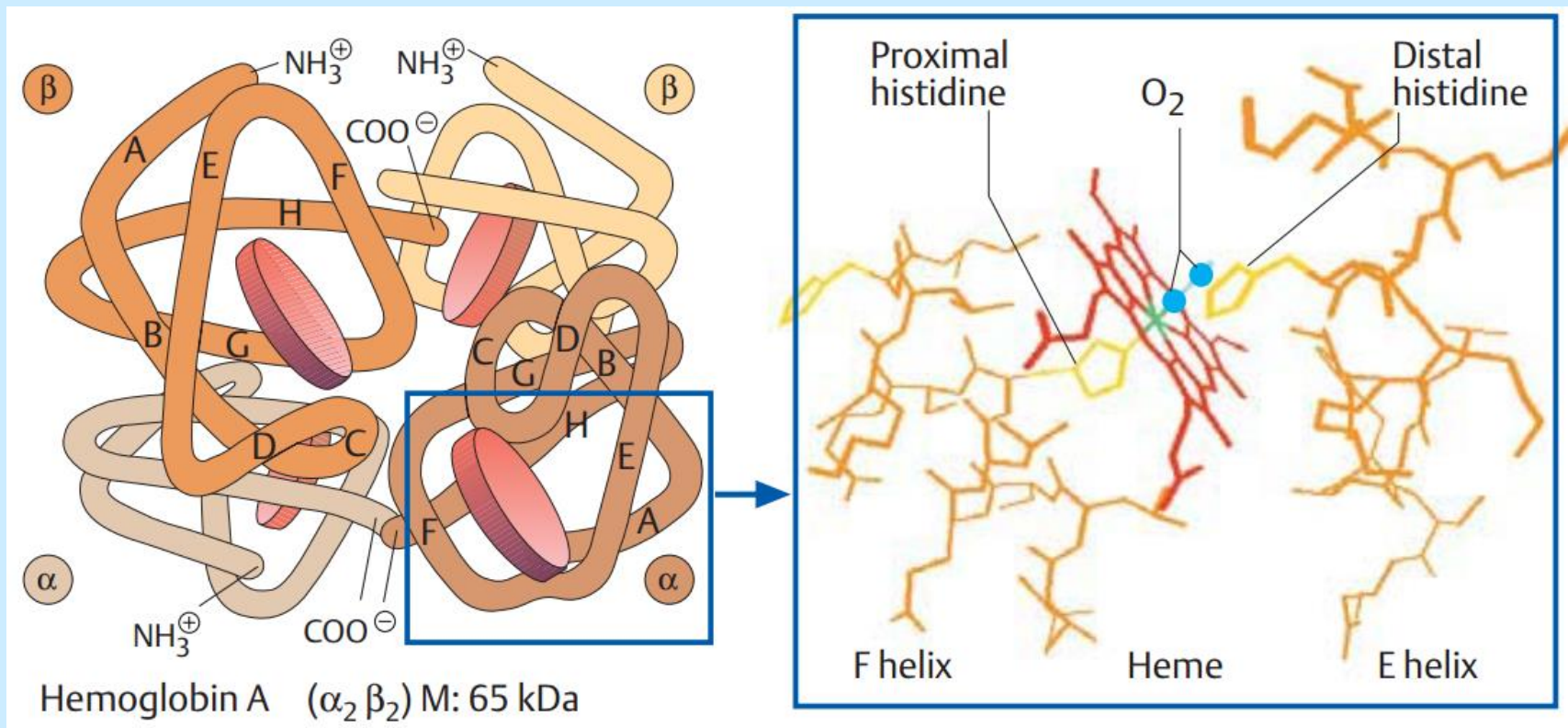
HEMOGLOBIN (Hb)

- přenos kyslíku v krvi – nepolární – málo rozpustný (3,2 ml na 1 l krve)
- hemoglobin = hlavní přenašeč O₂ z plic do tkání a CO₂ z tkání do plic
- v krvi 140-180 (m) / 120-160 g/l (ž), kapacita 220 ml O₂ na 1 l krve
 - ostatních proteinů v plazmě je pouze 50-80 g/l
 - reprezentuje podstatnou část pufrační kapacity krve
- tetramer, 2 podjednotky α (lehké řetězce, 141 AK) a 2 podjednotky β (těžké řetězce, 146 AK)
- symbolicky jako α₂β₂
- označuje se HbA (adult)
 - ev. HbA₁ pro odlišení od minoritního (2,5%) HbA₂ o složení α₂δ₂

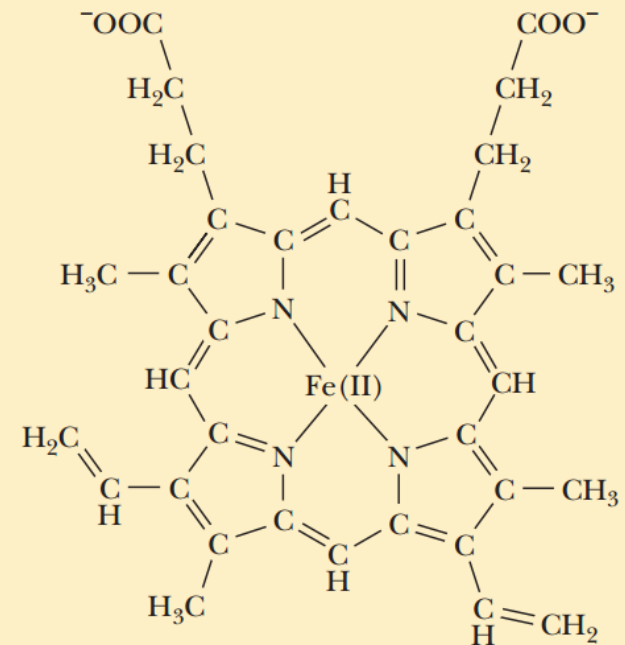
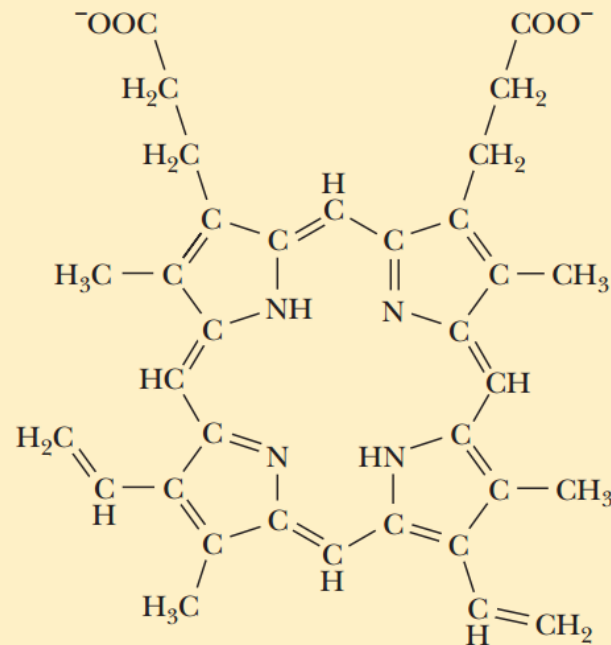
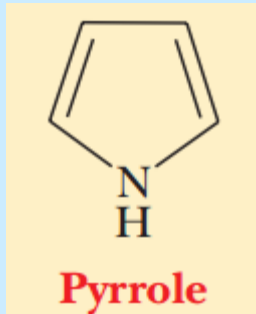
- jiné přenašeče O₂
 - myoglobin – v cytoplasmě, monomerní, bezobratlí

STRUKTURA Hb

- v každé podjednotce je vázán jeden **hem** jako prosthetická skupina
- koordinační vazba Fe^{2+} na zbytky His
- přímo na proximální His 93, zprostředkovaně na distální His 64, tam se alternativně váže molekula kyslíku



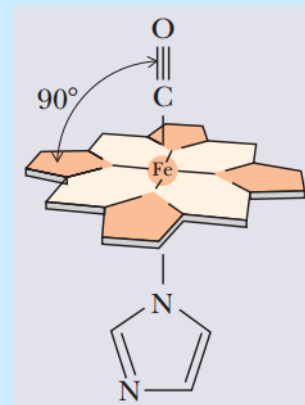
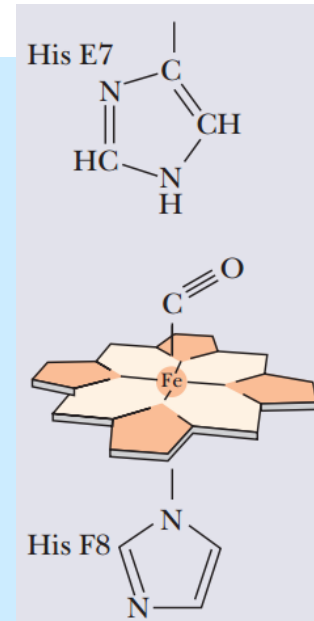
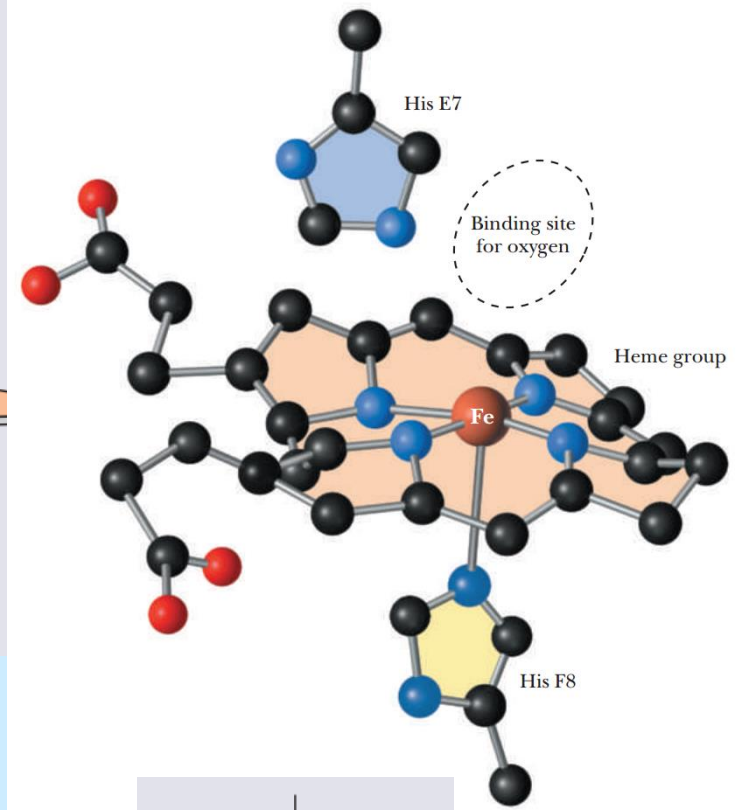
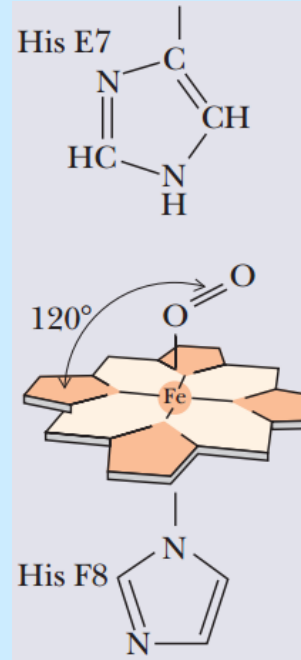
HEM



- 4 spojené pyrolové cykly spojené methinovými můstky = protoporphyrin IX, plus centrální atom železa (Fe^{II}) pak tvoří **hem**
- planární struktura, zapadá do hydrofobní kapsy proteinové části
- oxidací železa na Fe^{III} vzniká hemin, Hb se mění na methemoglobin
- páté koordinační místo železa se váže na His (F8, osmá AK v helikálním segmentu F), proximální His - 93
- šestá pozice Fe slouží k vazbě O_2 , také zde vzdáleně působí další His (E7) – distální - funkce závory regulující vstup O_2

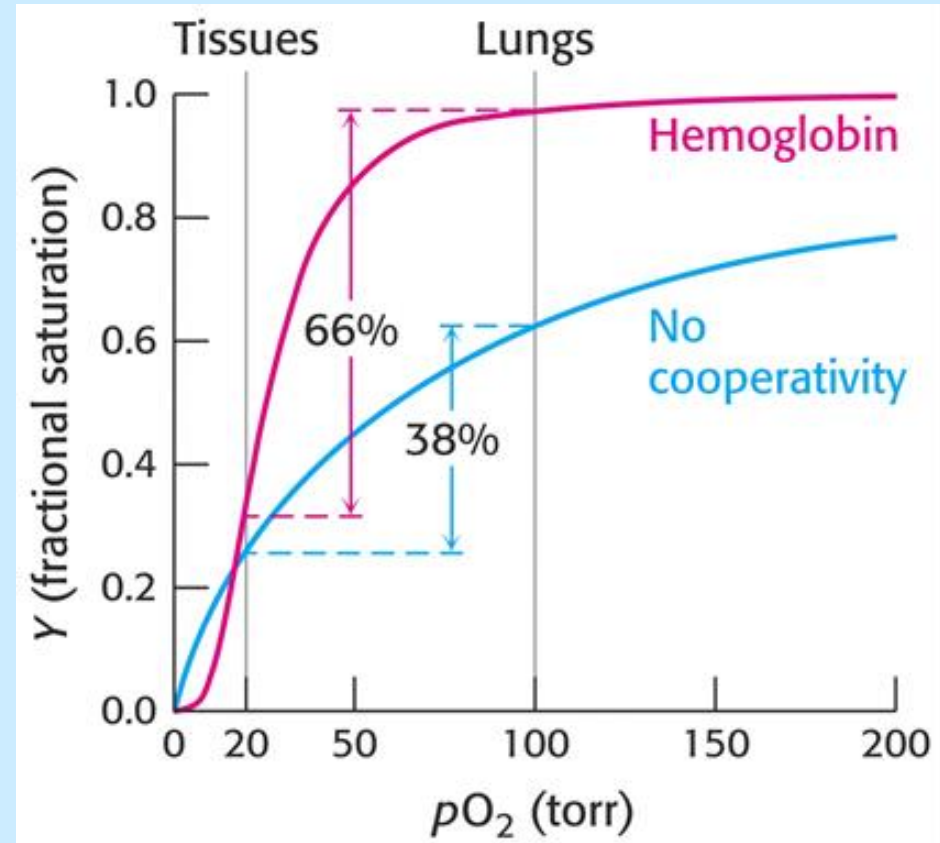
VAZBA O₂

- tak vzniká **oxyhemoglobin**
- kyslík se neváže ideálně kolmo k rovině hemu v Hb, ale pod úhlem asi 120°
 - platí pro Hb – stericky brání His E7; u volného hemu se kyslík váže kolmo
- vratný proces $\text{Hb} + \text{O}_2 = \text{Hb} \cdot \text{O}_2$
- má to význam – snížit pevnost vazby dalších možných molekul – oxid uhelnatý CO
- volný hem má k CO 25 000x vyšší afinitu než k O₂, nutnost k šikmé vazbě CO u Hb to sníží „jen“ na 250x, i tak je ale CO velmi nebezpečný a otravy jsou celkem běžné; Hb.CO – karbonyl-Hb
- výrazné spektrální projevy
- Hb bez kyslíku ... deoxyhemoglobin



PŘENOS O₂

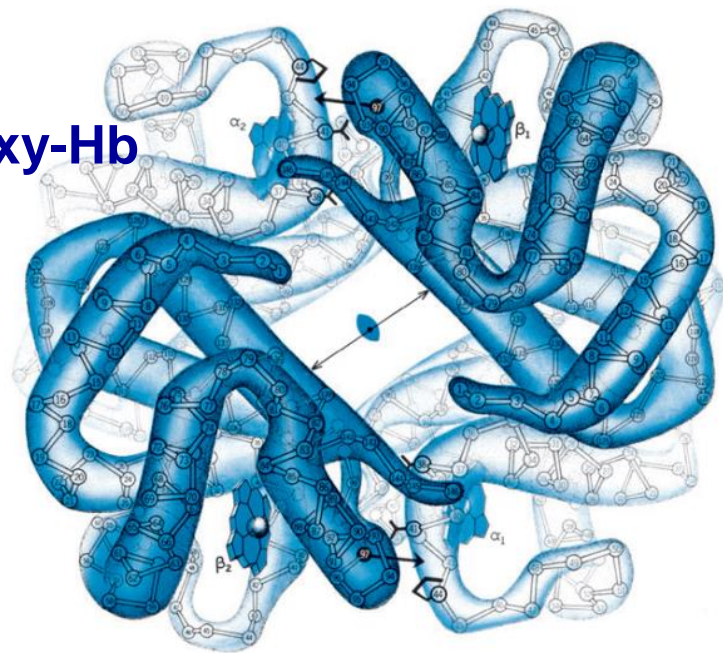
- fyziologickou funkcí Hb je přenos kyslíku v krvi
 - z plic ev. žaber do tkání
- stupeň nasycení Hb kyslíkem – poměr $[\text{HbO}_2]/([\text{HbO}_2] + [\text{Hb}])$ závisí na jeho parciální tlaku $p\text{O}_2$ v okolním prostředí – červená křivka (torr = 133 Pa)
- Hb se sytí kyslíkem v plicích, uvolňuje ho v tkáních
- interakce Hb (tetramer) s kyslíkem je **kooperativní** - vyšší efektivita procesu
- navázáním první molekuly kyslíku na jeden hem dochází ke konformační změně vedoucí ke zvýšení afinity zbylých vazných míst pro kyslík
 - proti monomernímu myoglobinu, ten je bez kooperativity, modrá křivka



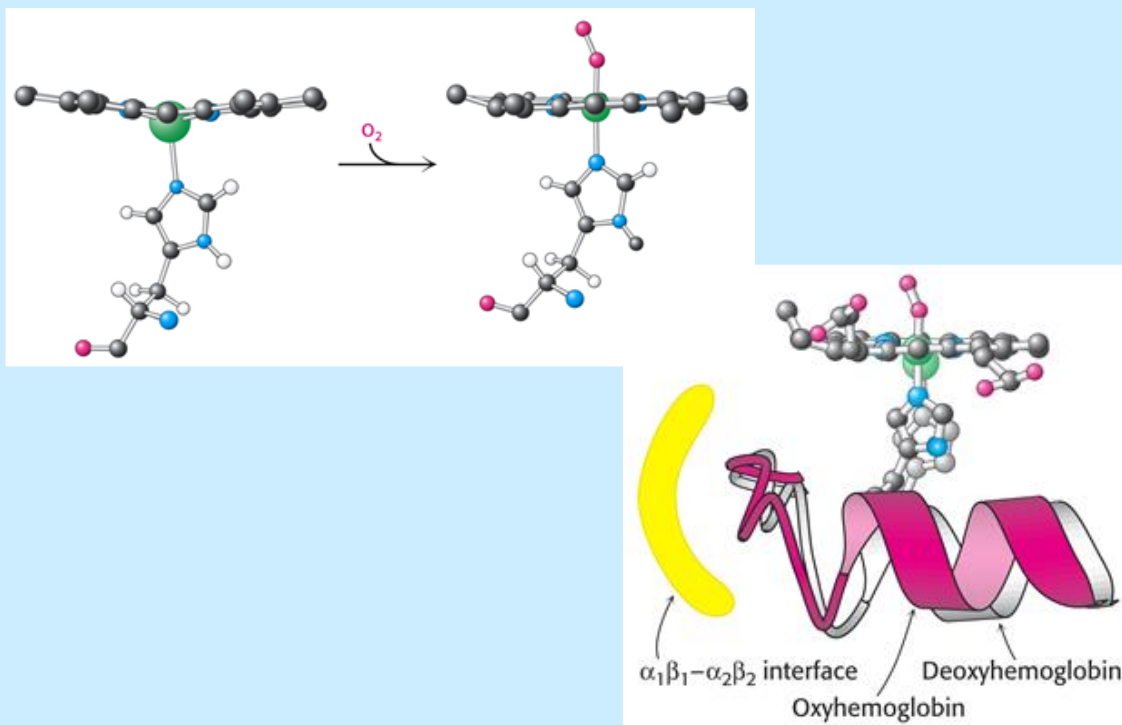
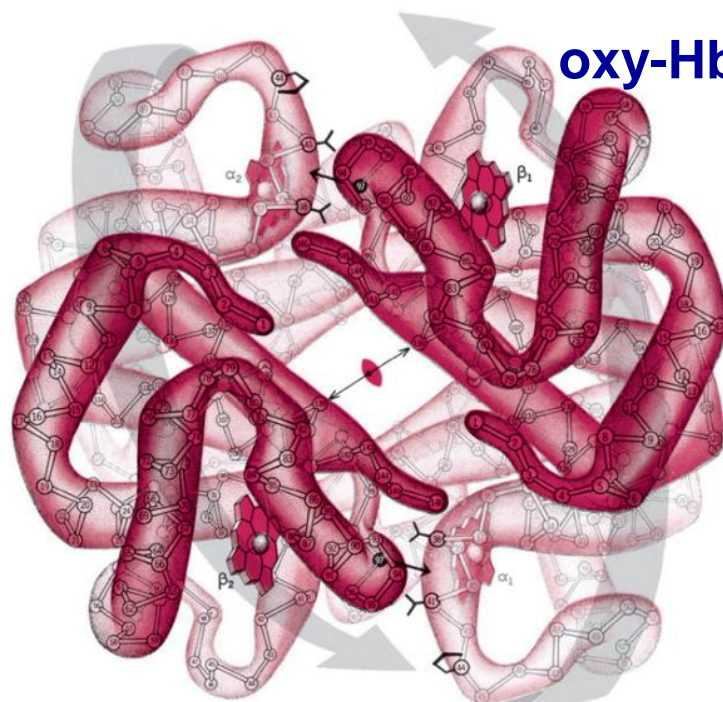
ALOSTERICKÉ CHOVÁNÍ Hb

- oxygenovaná forma Hb – dojde k pootočení $\alpha\beta$ protomer o 15° , a tím se přiblíží β podjednotky
 - základem efektu změna konformace vyvolaná vazbou O_2 na Fe^{II} jedné z podjednotek
 - Fe za sebou táhne His 93 a s ním celé raménko (úsek) F příslušného řetězce, které pak jako páka způsobí konformační změnu celé molekuly hemoglobinu

deoxy-Hb

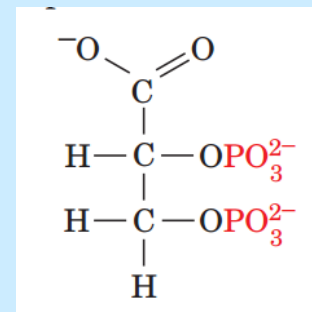
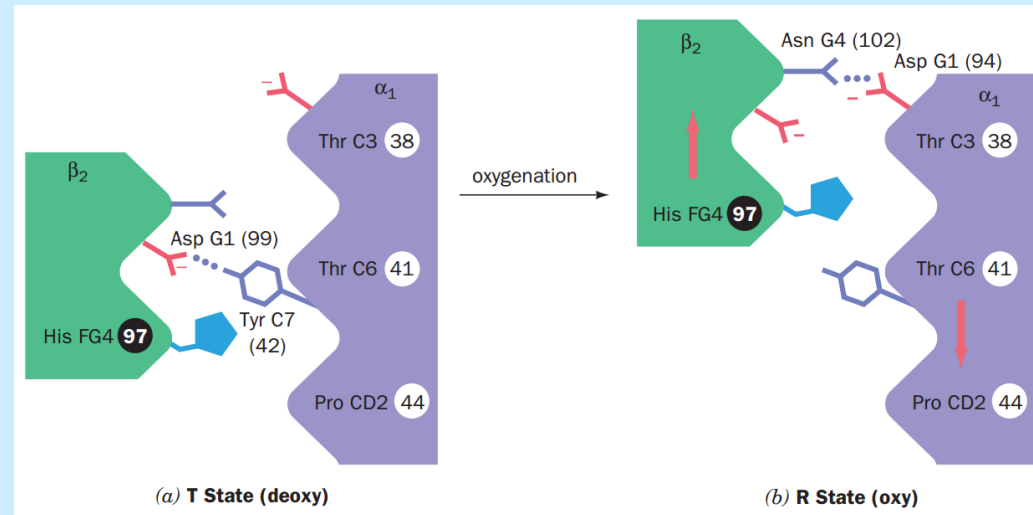
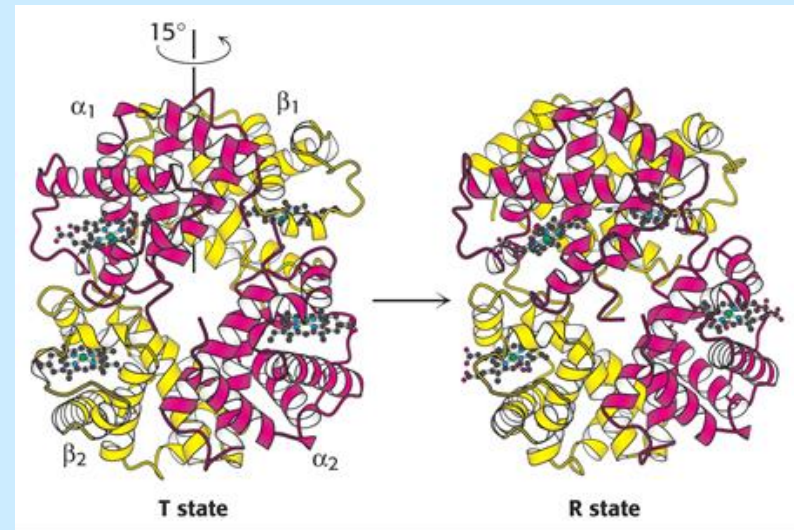


oxy-Hb



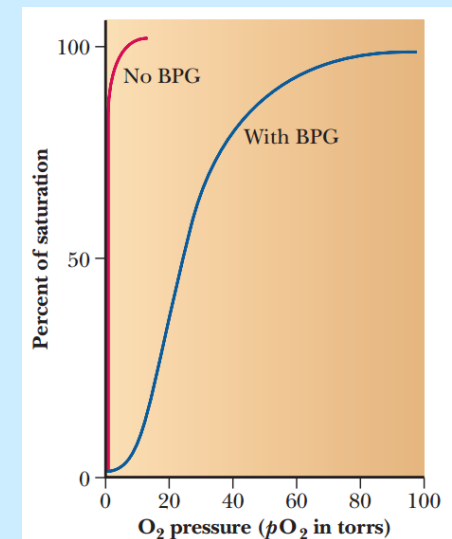
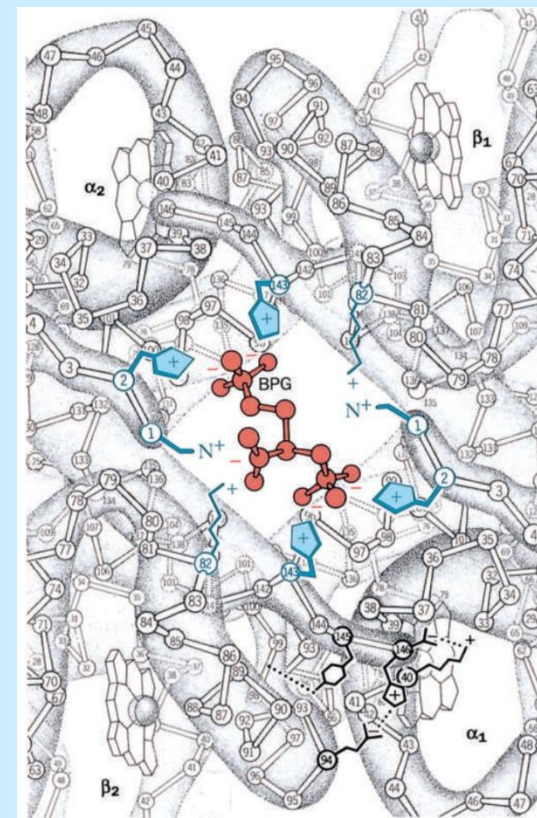
KONFORMAČNÍ STAVY

- změna se přenese na ostatní podjednotky a molekula Hb přechází z těsnější konformace **T** (tense) s nízkou afinitou ke kyslíku do uvolněné **R** (relaxed) s vyšší afinitou
- toto chování je jedním z typů alosterie
- detailní interakce na rozhraní α - β podjednotek při alosterii
- na alosterické chování Hb mají vliv i metabolity – 2,3-bisfosfoglycerát (**BPG**) který se váže na deoxy-Hb
- objeveno tak, že purifikovaný („stripped“) Hb se chová ke kyslíku jinak než Hb v krvi
 - kde jsou přítomny CO_2 , BPG, také vliv pH



VLIV BPG NA Hb

- váže se pevně na deoxy-Hb, ale jen slabě na oxy-Hb, snižuje afinitu Hb ke kyslíku
- fyziologicky důležité – zvýšení kapacity pro přenos
 - v arteriální krvi (pO_2 100 torr), Hb je na 95% saturován O_2 , ale ve venosní krvi (pO_2 30 torr) je pouze 55% saturace
- průchodem přes kapiláry tedy Hb předá **40%** vázaného O_2
 - bez BPG by se vázaného O_2 uvolnilo jen velmi málo, protože afinita Hb k O_2 by byla zvýšená díky posunu saturační křivky k nižším hodnotám pO_2

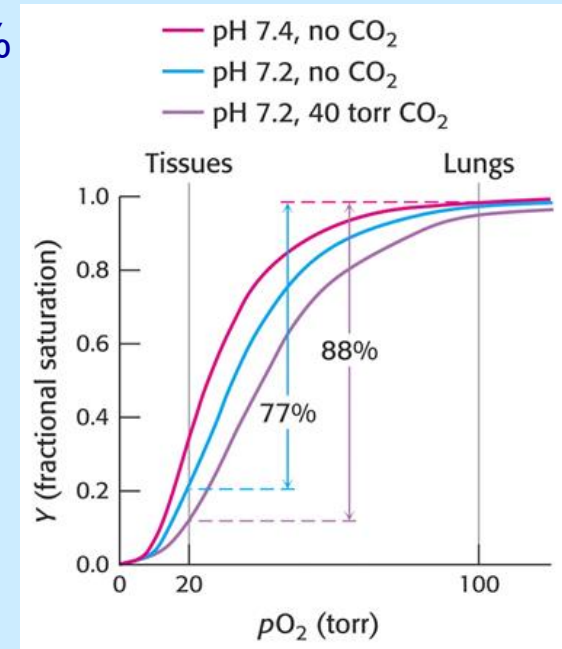


VLIV pH A CO₂

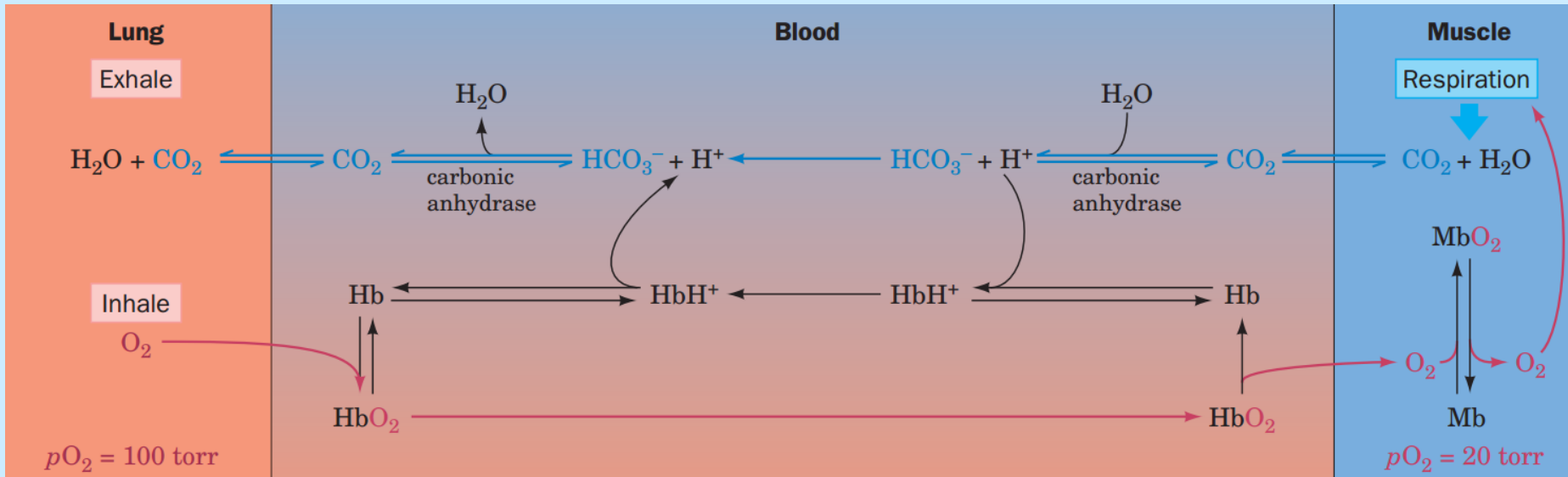
- kromě pH je patrný také vliv CO₂
- množství využitelného kyslíku se zvýší o dalších asi 11%
- Hb je slabší kyselinou než HbO₂
- vazba 1 molekuly O₂ tedy vede k uvolnění asi 0,6 H⁺
- naopak zvýšení pH v plicích dále stimuluje vazbu O₂ - **Bohrův efekt**
- význam i pro transport CO₂
- v metabolismu vznikající CO₂ reaguje velmi pomalu na hydrogenuhličitan:



- reakci významně zrychlí karbonátanhydrasa v erythrocytech
- v kapilárách se uvolnění H⁺ váže na Hb při přechodu na T formu
- v plicích je hodně kyslíku, Hb přechází na R formu, H⁺ se zase uvolní a podpoří vznik CO₂ a jeho uvolnění



BOHRŮV EFEKT

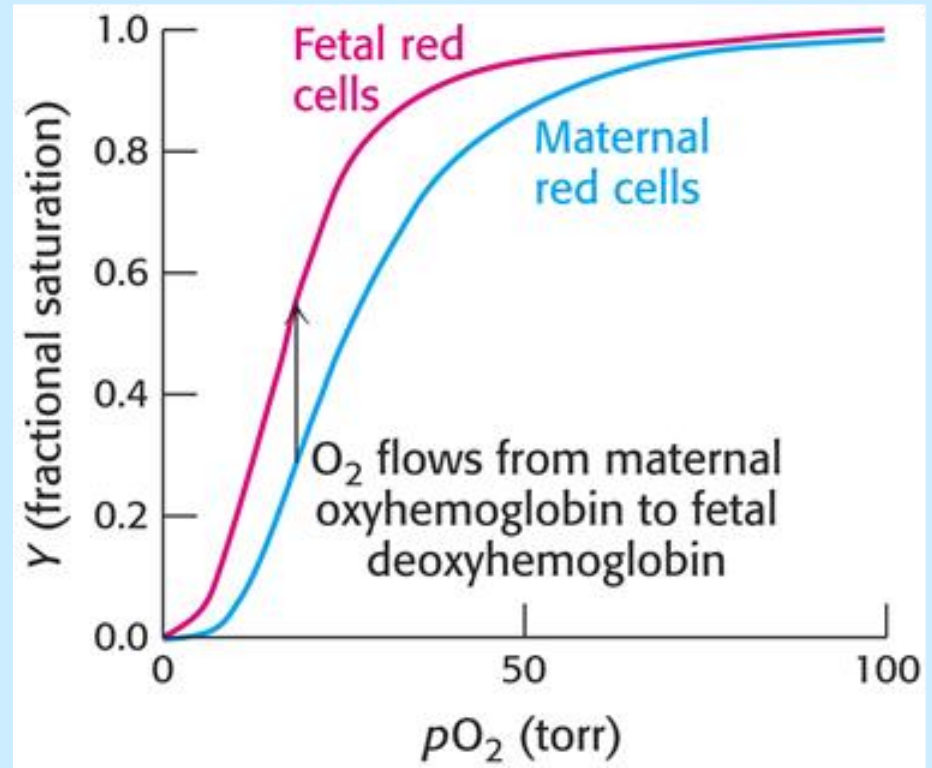


- také to pomáhá u velmi aktivních svalů rychlé uvolňování laktátu – snížení pH u procházející krve ze 7,4 na 7,2 – k dalšímu posunu saturační křivky a uvolnění trochu více kyslíku
- CO_2 se může u krevních proteinů vázat na terminální NH_2 :

$$\text{R}-\text{NH}_2 + \text{CO}_2 \rightleftharpoons \text{R}-\text{NH}-\text{COO}^- + \text{H}^+$$
- T forma Hb váže CO_2 více než R forma, a uvolněné protony opět trochu (5%) přispějí k uvolnění kyslíku

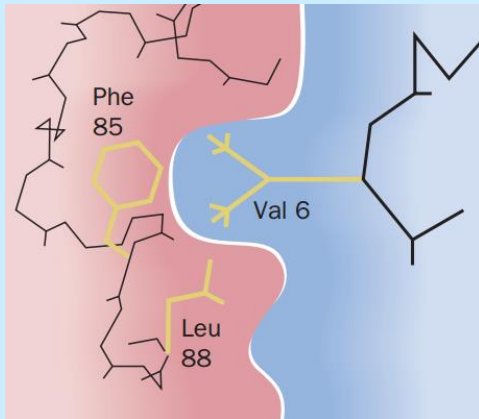
FETÁLNÍ HbF

- vyšší afinita HbF pro kyslík umožňuje jeho přečerpávání z placentární krve do krve plodu
- HbF – $\alpha_2\gamma_2$
- slabší afinita k BPG – vyšší afinita ke kyslíku
 - His 143 nahrazen Ser
- regulace syntézy podjednotek
 - po porodu kyslík – syntéza β

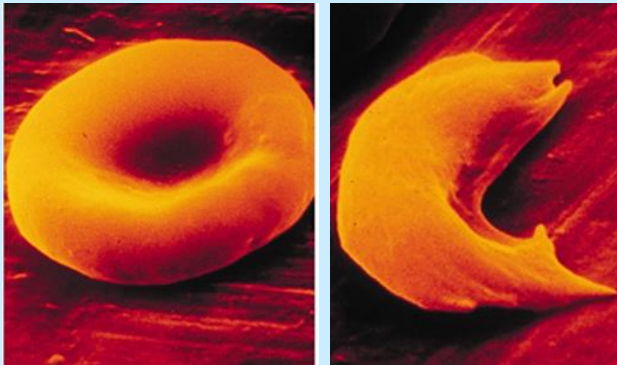


PATOLOGICKÉ Hb

- mutace v řetězcích Hb, například **HbS**:
- záměna Glu-6 za Val vytváří nepolární oblast
- místo tetrameru řetězkové aglomeráty



- projev - změna tvaru erytrocytů na srpkovité
- sickle cells (... anemia)

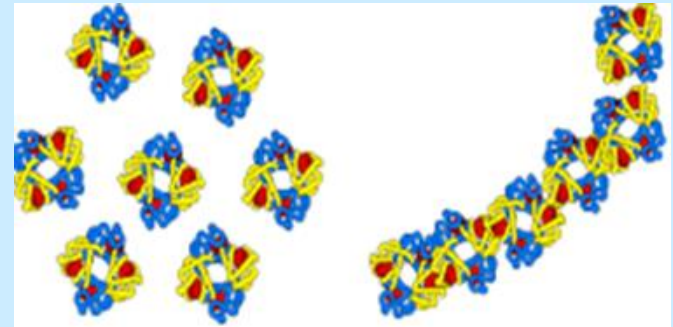


HBB Sequence in Normal Adult Hemoglobin (Hb A):

Nucleotide	CTG	ACT	CCT	GAG	GAG	AAG	TCT
Amino Acid	Leu	Thr	Pro	Glu	Glu	Lys	Ser
	3			6			9

HBB Sequence in Mutant Adult Hemoglobin (Hb S):

Nucleotide	CTG	ACT	CCT	GTG	GAG	AAG	TCT
Amino Acid	Leu	Thr	Pro	Val	Glu	Lys	Ser
	3			6			9



SRPKOVITÁ ANEMIE

- fyziologický projev – 10 odvozených poruch
- nedokonalý transportu kyslíku – odtud název
- nevhodný tvar, životnost jen 20 dní (120 u normálních), blokování cév
- komplikace – malá výkonnost; ale také výhoda – odolnost proti malárii (*Plasmodium falciparum*)
- korelace výskytu genu s rozšířením malárie

