

Biochemie

Česká studijní literatura

- *Biochemie*. Zdeněk Vodrážka. *Biochemie*. 2. opr. vyd. Praha : Academia, 1996.
- Šípal, Zdeněk. *Biochemie*. 1. vyd. Praha : Státní pedagogické nakladatelství, 1992.
- Voet, Donald - Voet, Judith G. *Biochemie*. Translated by Arnošt Kotyk. 1. vyd. Praha : Victoria Publishing, 1995.

Biochemie

Anglická studijní literatura

- Voet, Donald - Voet, Judith G. *Biochemistry*. 3rd ed. Hoboken : John Wiley & Sons, 2004
- Voet, Donald - Voet, Judith G. - Pratt, Charlotte W. *Fundamentals of biochemistry : life at the molecular level*. 3rd ed. Hoboken, N.J. : John Wiley & Sons, 2008.
- Boyer, Rodney. *Concepts in biochemistry*. 2nd ed. New York : John Wiley & Sons, 2002.

Biochemie

1. ÚVOD

2. BÍLKOVINY - Struktura, vlastnosti a funkce

3. NUKLEOVÉ KYSELINY - Struktura, vlastnosti a funkce

4. SACHARIDY - Struktura, vlastnosti a funkce

5. LIPIDY - Struktura, vlastnosti a funkce

6. ENZYMOLOGIE

7. METABOLISMUS A BIOENERGETIKA

8. METABOLISMUS SACHARIDŮ

9. FOTOSYNTÉZA

10. METABOLISMUS LIPIDŮ

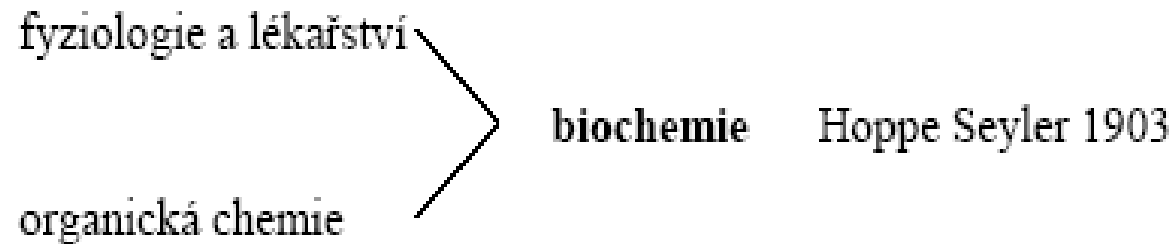
11. METABOLISMUS BÍLKOVIN

12. REGULACE BIOCHEMICKÝCH PROCESŮ

Biochemie

- chemická disciplína, která studuje chemické složení živé hmoty a chemické procesy, které v ní probíhají
- je hraniční vědní disciplínou, na pomezí mezi chemií a biologií, zkoumá biologické objekty chemickými metodami

Historický úvod



Synonyma : Biological Chemistry
Physiologische Chemie

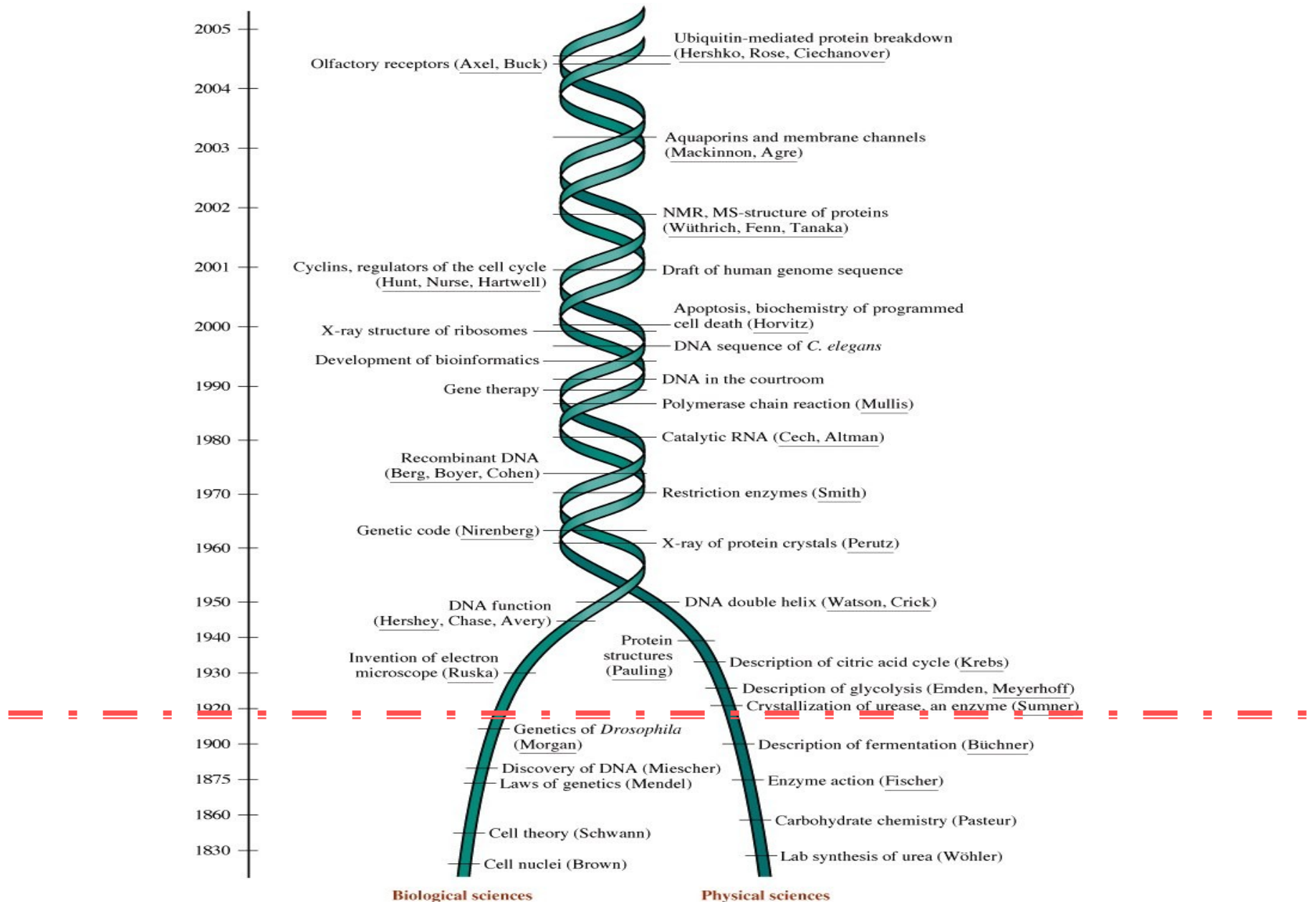
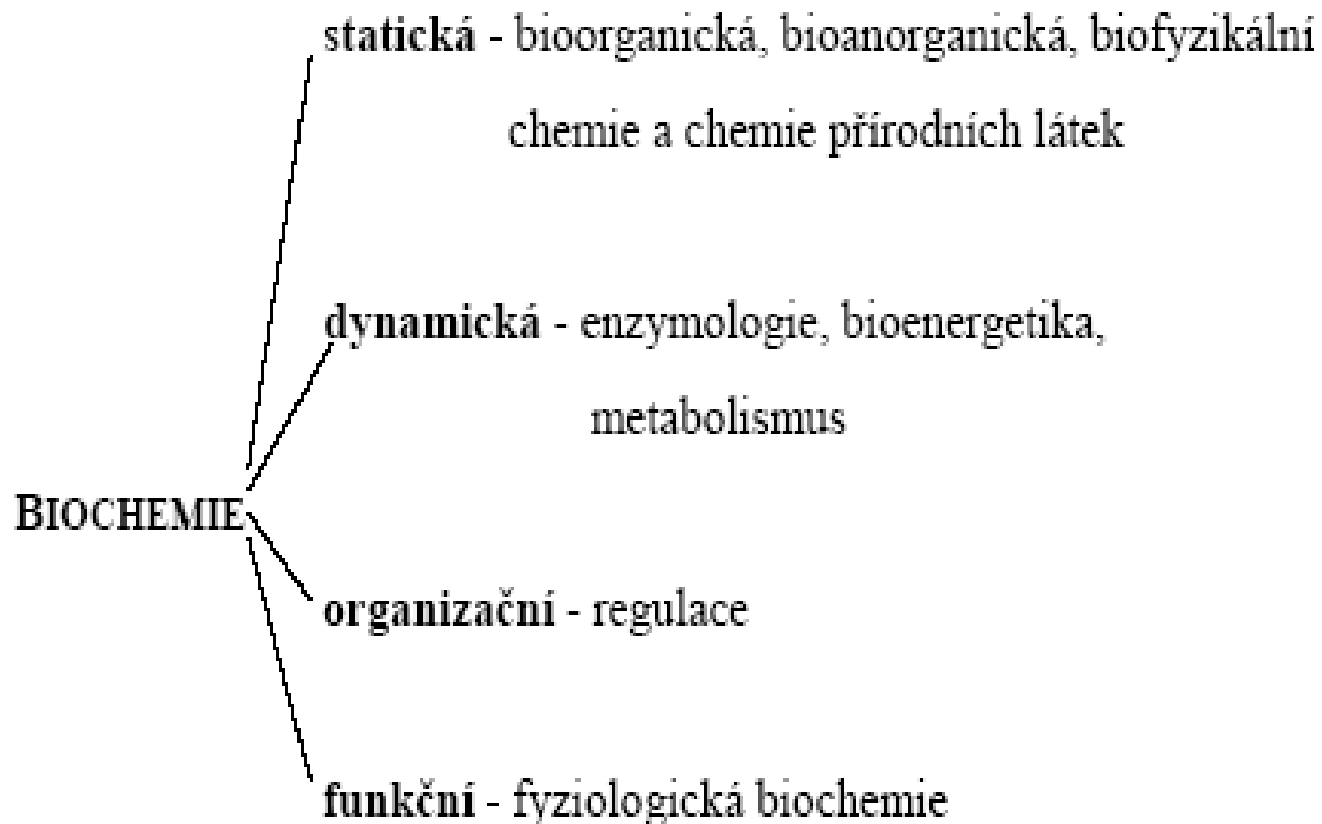
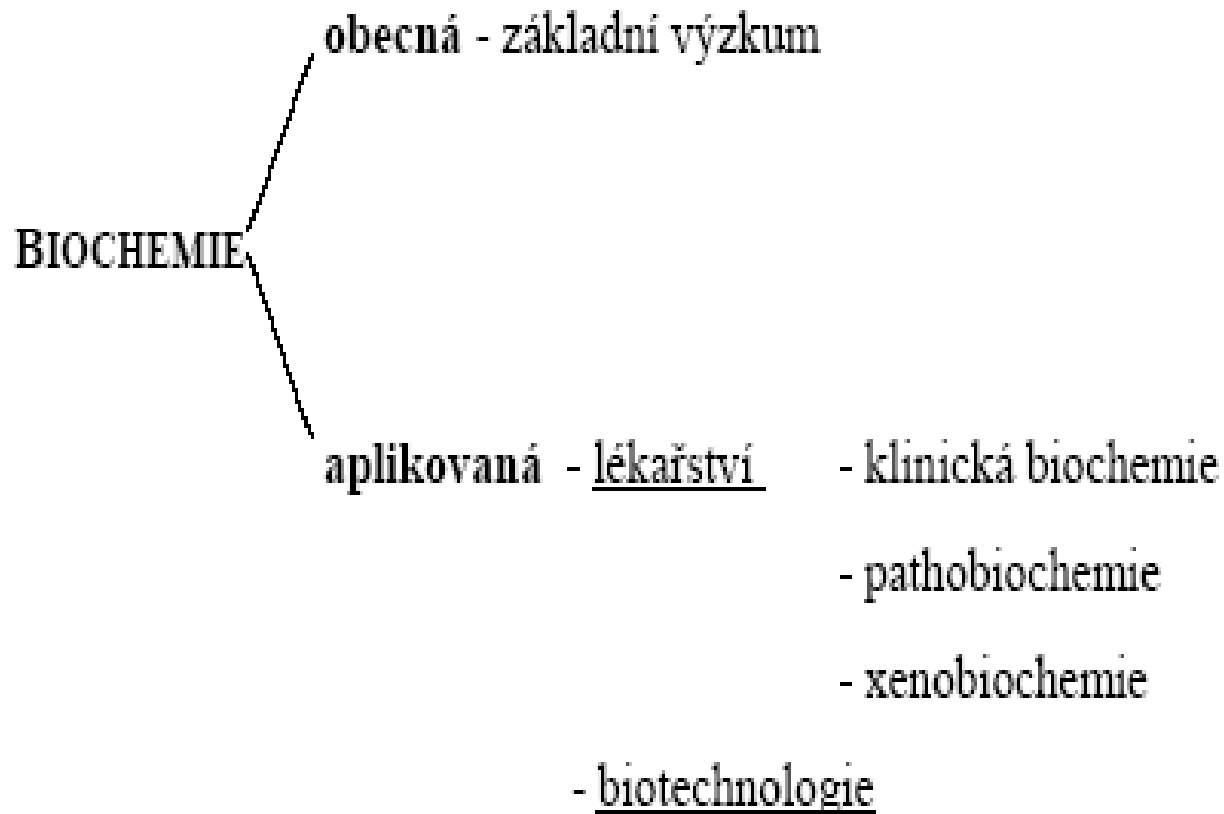


Figure 1-2 Concepts in Biochemistry, 3/e
 © 2006 John Wiley & Sons

Dvě období : A. období statické biochemie

B. období dynamické biochemie





Molekulární biologie - W.T. ASTBURY - 60.léta

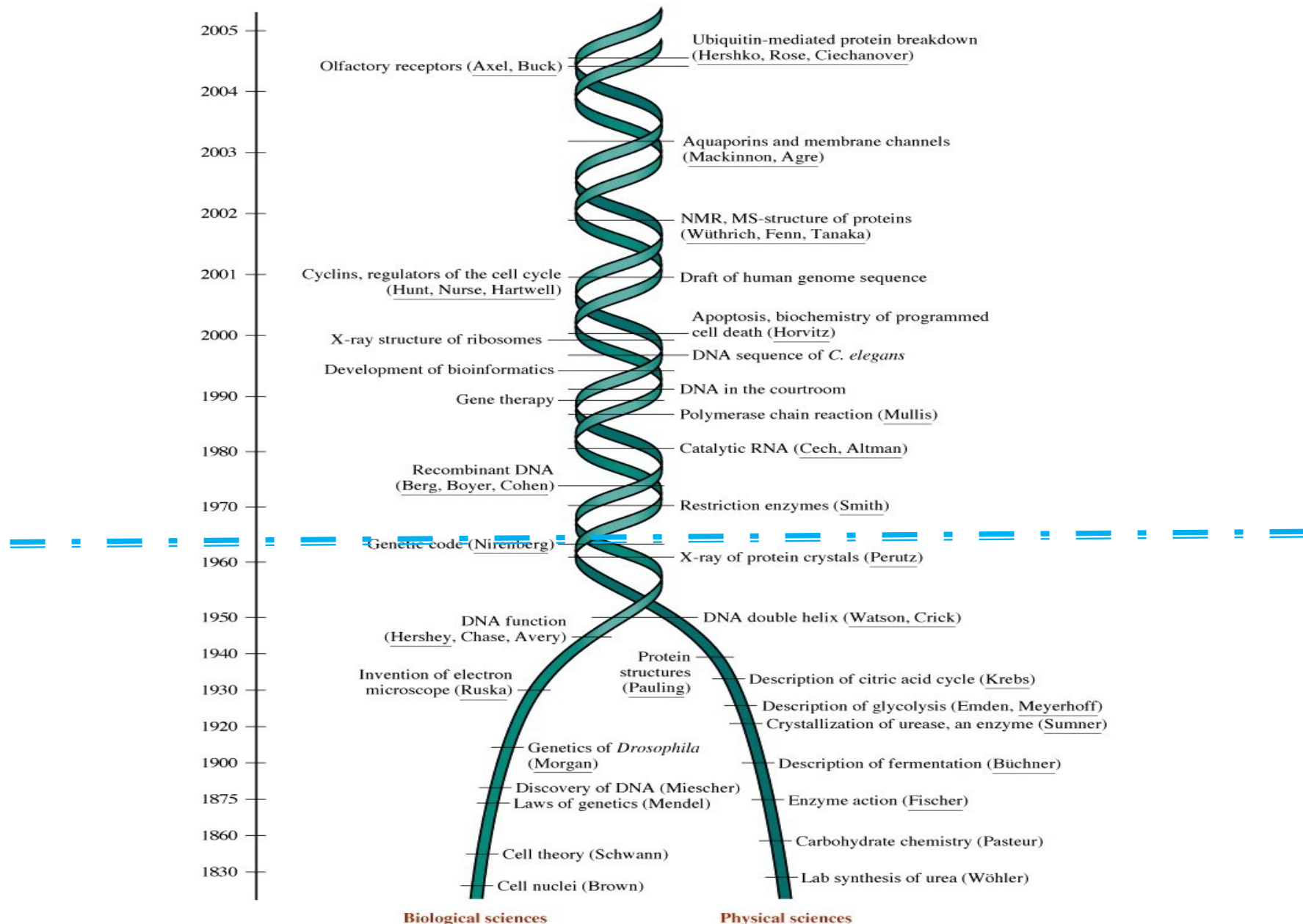
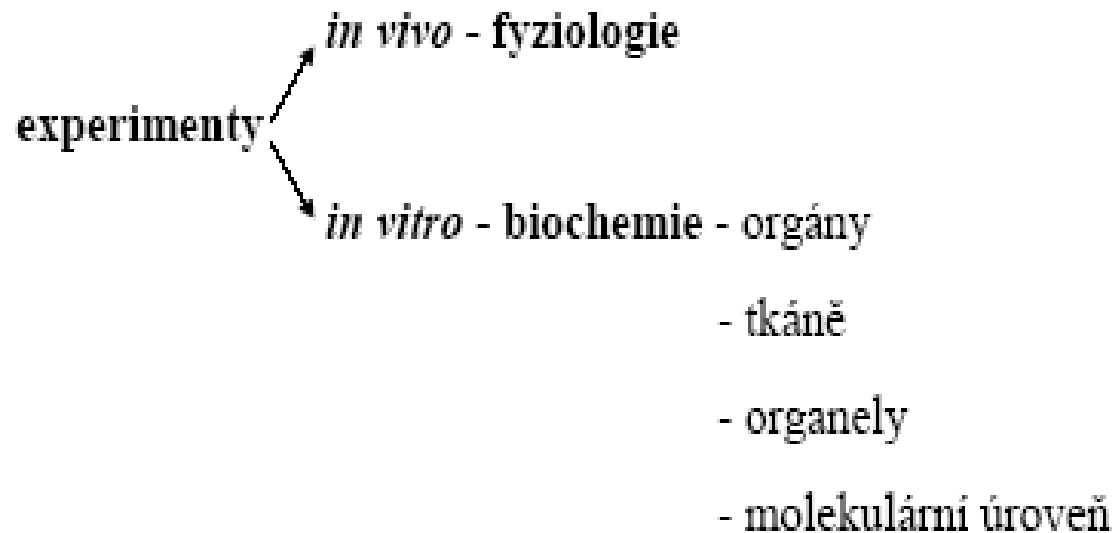


Figure 1-2 Concepts in Biochemistry, 3/e
 © 2006 John Wiley & Sons

Biochemické metody :



Biochemické metody - metody anorganické, organické, fyzikální a analytické chemie

- biologické metody

Problémy se vzorkem - práce s komplexními vzorky

- práce s labilním biologickým materiálem
- práce s malým množstvím látek

**P. Anzenbacher, J. Kovář - Metody chemického výzkumu pro
biochemiky - Dočasná vysokoškolská
učebnice 1986**

**M. Ferencík, B. Škárka - Biochemické laboratorné metody, SNTL
1981**

Látkové složení

	Group IA	Group IIA	TRANSITION METALS										Group IIIB	Group IVB	Group VB	Group VIB	Group VIIB	Group VIII	Group 0
Period 1	1 H hydrogen																		2
Period 2	3	4											5 B boron	6 C carbon	7 N nitrogen	8 O oxygen	9 F fluorine		10
Period 3	11 Na sodium	12 Mg magnesium											13 Al aluminum	14 Si silicon	15 P phosphorus	16 S sulfur	17 Cl chlorine		18
Period 4	19 K potassium	20 Ca calcium	21	22	23 V vanadium	24 Cr chromium	25 Mn manganese	26 Fe iron	27 Co cobalt	28 Ni nickel	29 Cu copper	30 Zn zinc	31 Ga gallium	32	33 As arsenic	34 Se selenium	35 Br bromine		36
Period 5						42 Mo molybdenum						48 Cd cadmium					53 I iodine		
Period 6						74 W tungsten													
Period 7																			

Figure 1-3 Concepts in Biochemistry, 3/e
© 2006 John Wiley & Sons

Prvkové složení vesmíru, zemské kůry a člověka

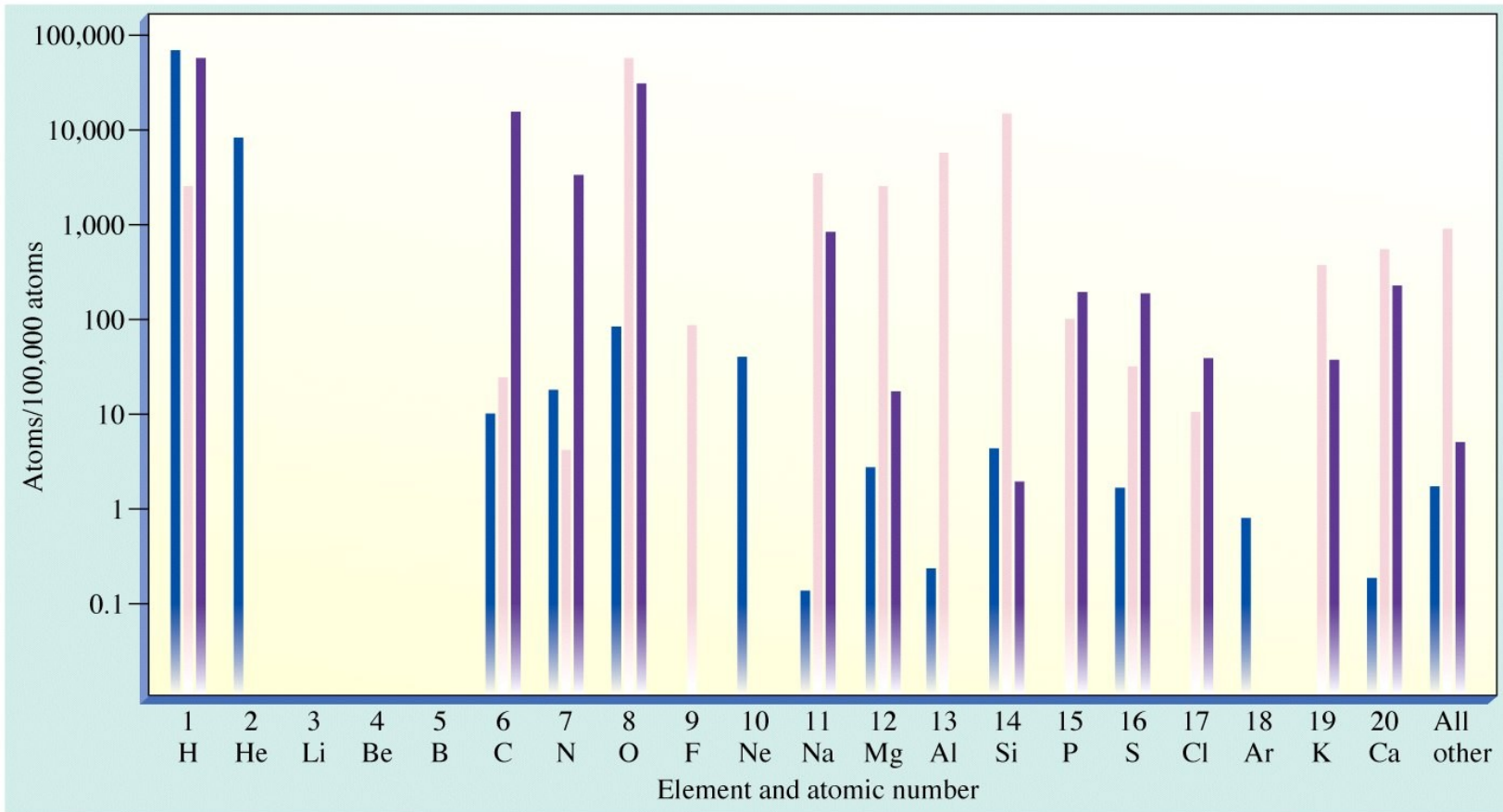


Figure 1-4 Concepts in Biochemistry, 3/e
© 2006 John Wiley & Sons

LÁTKOVÉ SLOŽENÍ ORGANISMŮ

Látka	člověk	rostliny	bakterie
voda	60	75	70
bílkoviny	18	4	15
nukleové k.	1.5	1	7
sacharidy	0.5	16	3
lipidy	16	1	2
org. látky	1	1	2
anorg. látky	3	2	1

Anorganické látky

- voda

- Na, K, Cl⁻, SO₄⁻, HCO₃⁻, HPO₄²⁻,

Ca, Mg, Fe, Zn, Va, Cu, Mo, Ni, Mn, Se

- plyny - O₂, N₂, CO₂, NO

Organické látky

- vysokomolekulární - biopolymery

- bílkoviny

- nukleové kyseliny

- sacharidy

- lipidy

Obecný princip výstavby biopolymerů :

1. Jsou tvořeny monomery
2. Monomery vytvářejí lineární řetězce
3. Monomery jsou spojovány jediným typem vazby

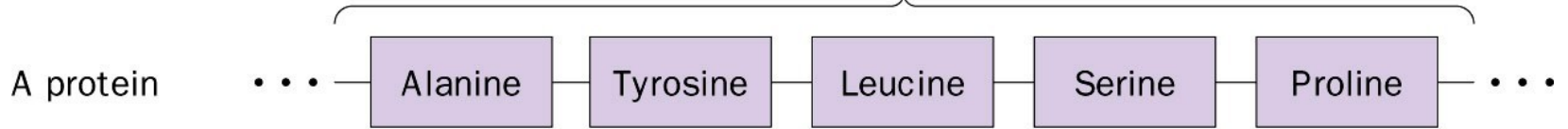
mono, di-, tri- , tetra-,...

oligo < 10

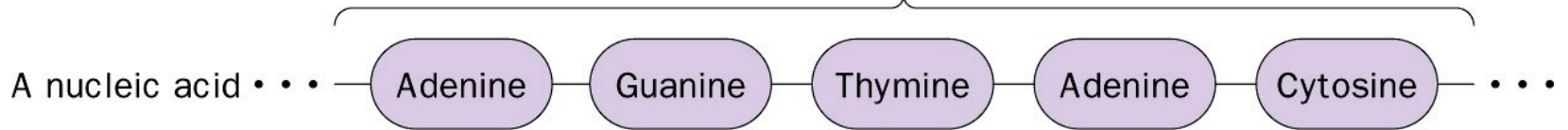
poly > 10

	bílkoviny	nukleové kyseliny	polysacharidy
monomery	aminokyseliny 20	nukleotidy 4	monosacharidy 5
vazba	peptidická	3,5-diesterová	glykosidická

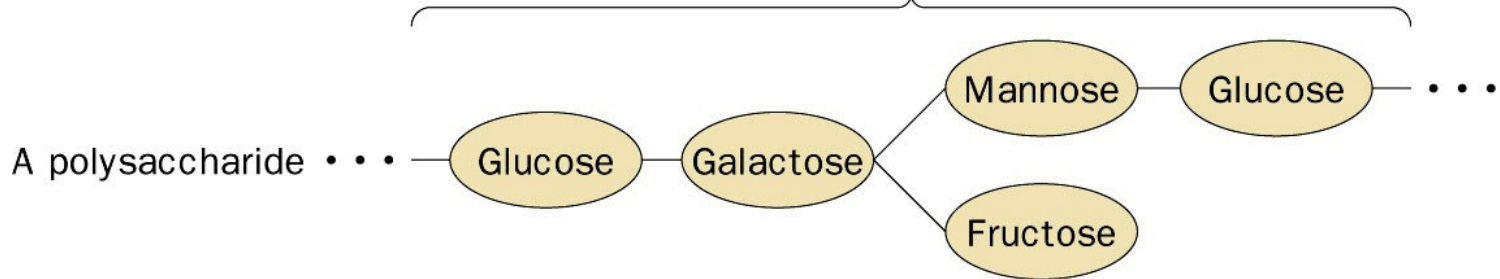
Amino acid residues

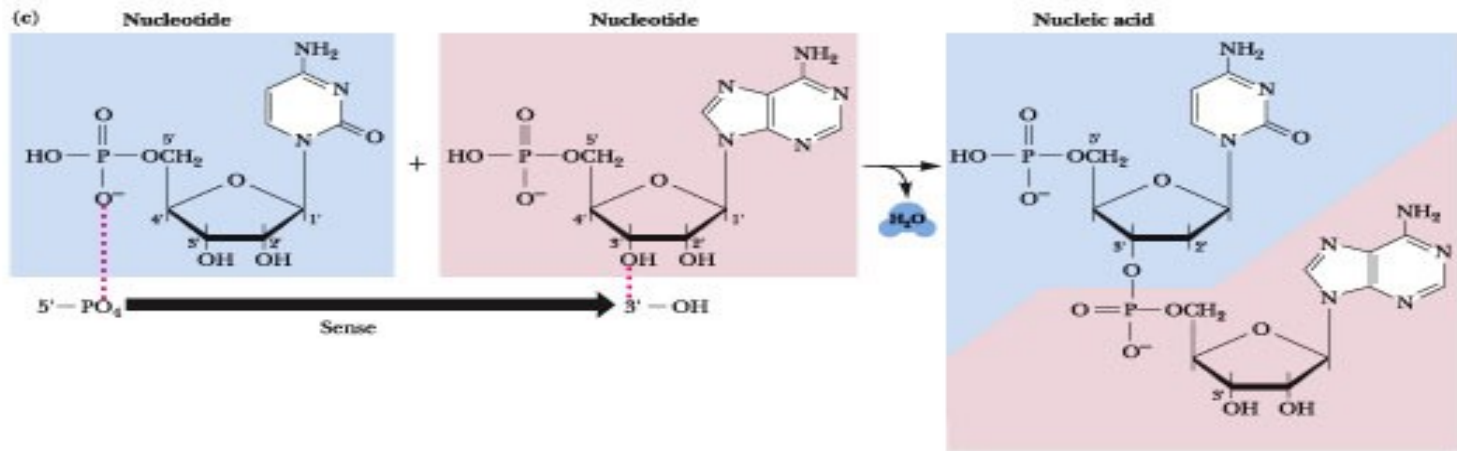
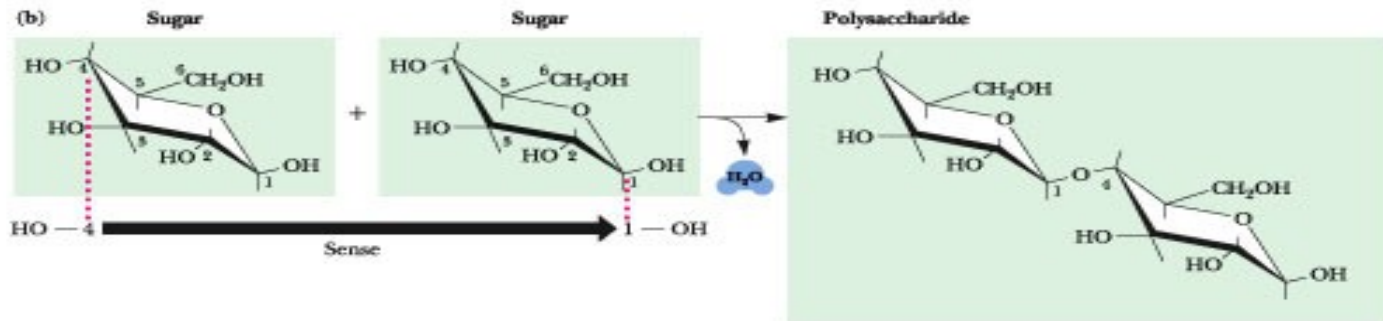
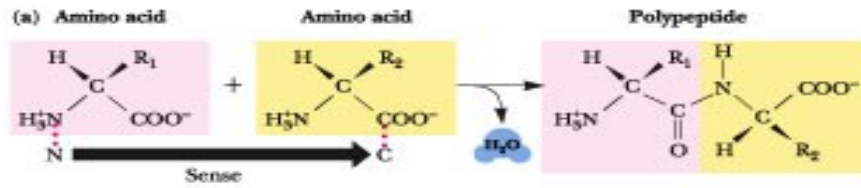


Nucleotides



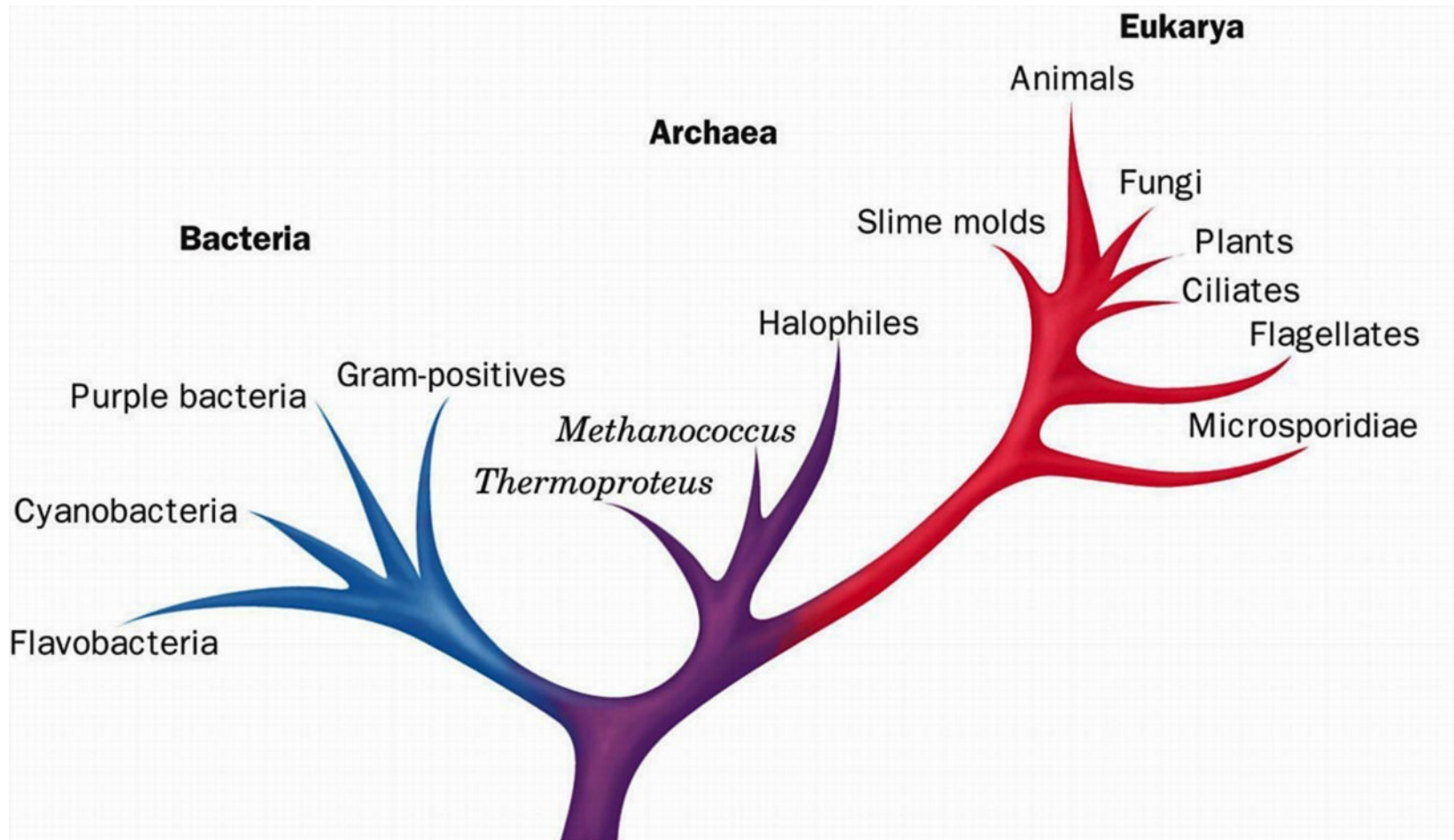
Sugar residues



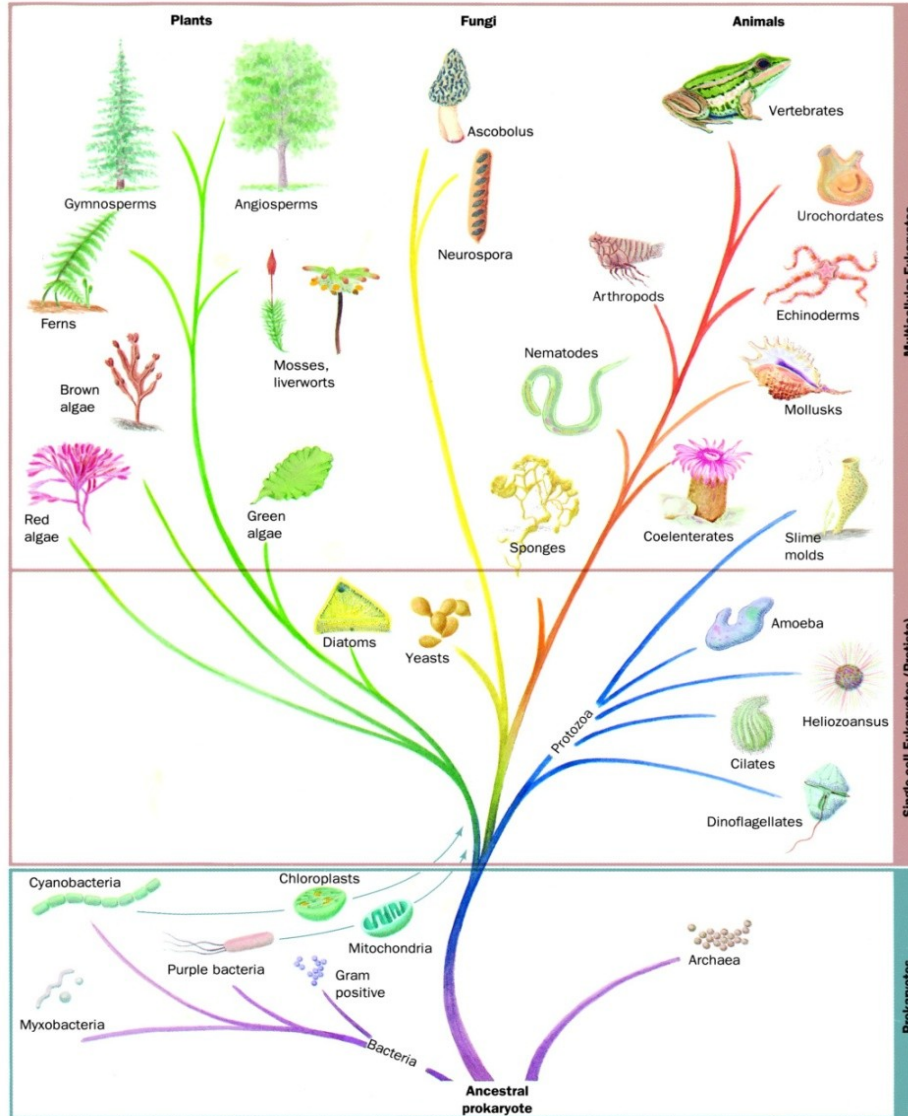


- **nizkomolekulární** - produkty meziprodukty metabolismu
- sekundární metabolity
- regulační látky

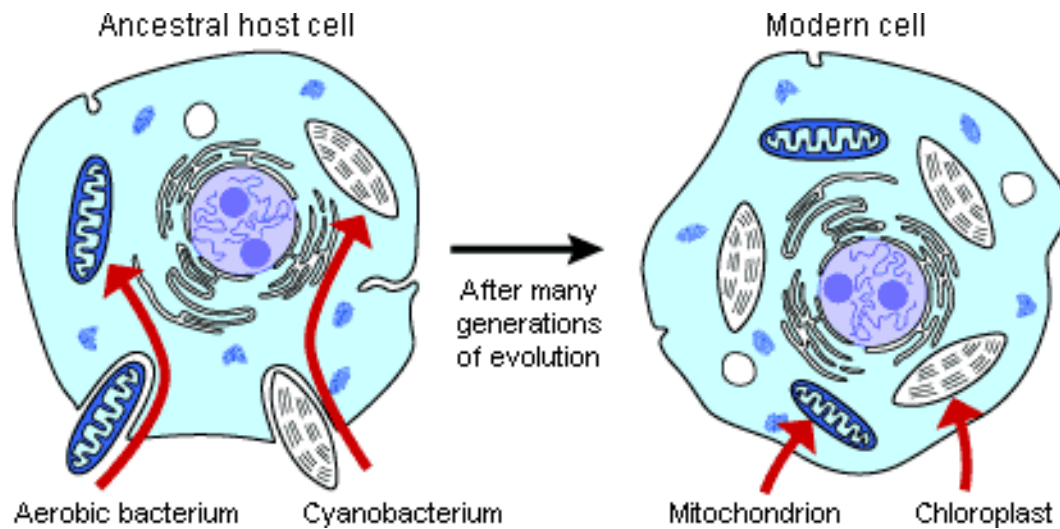
Fylogenetický strom



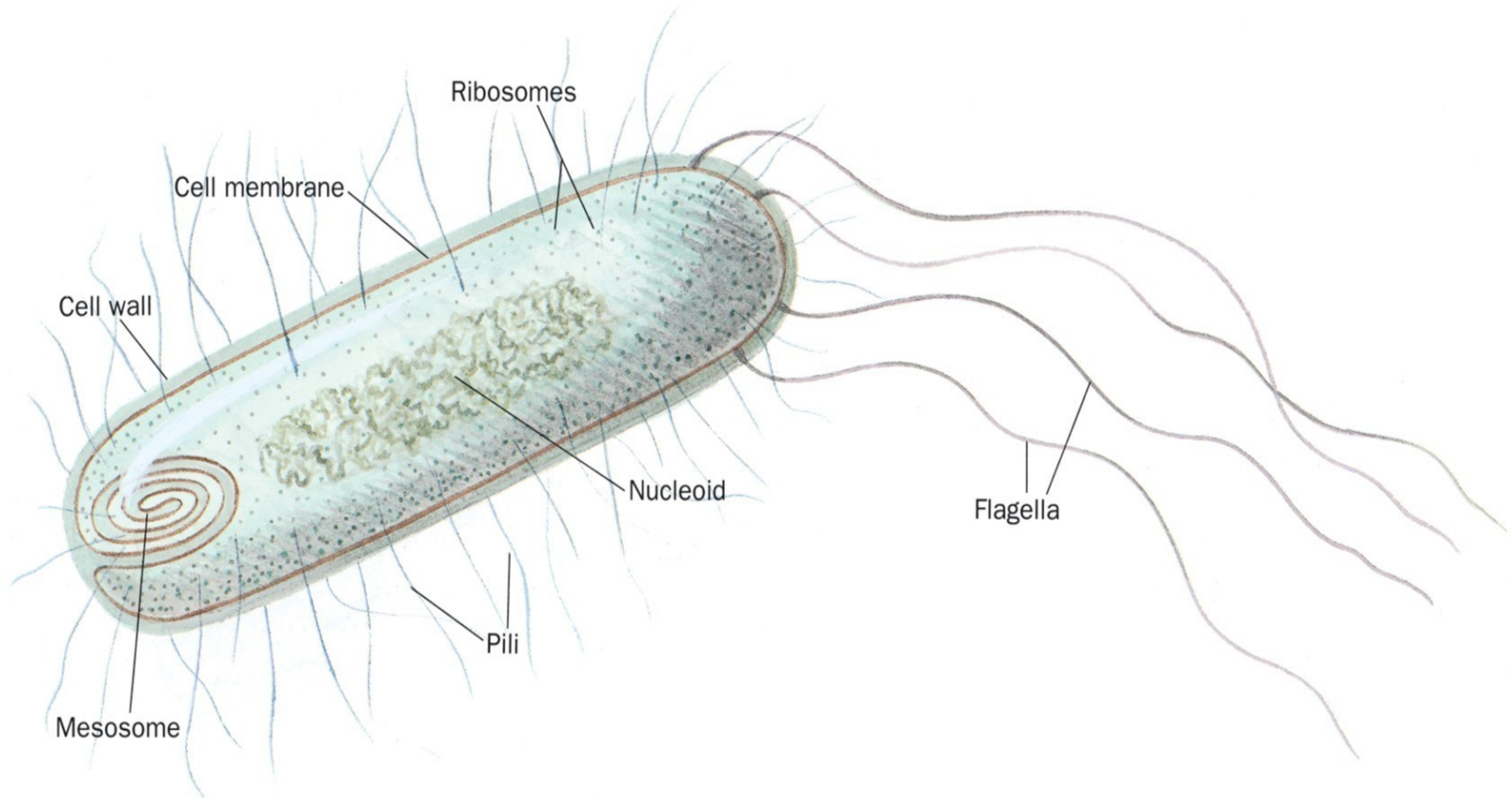
Fylogenetický strom



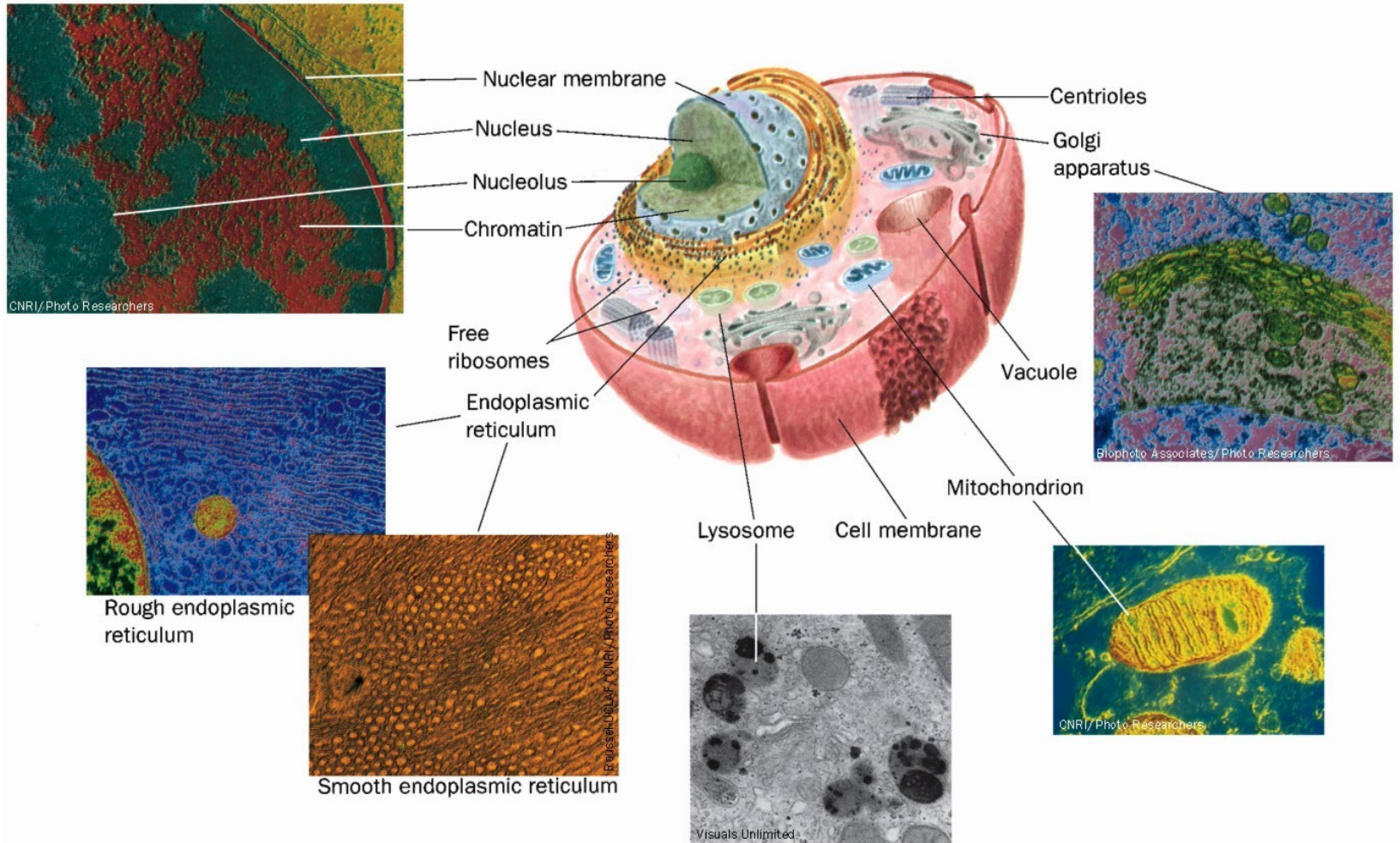
Margolis – endosymbiotická teorie



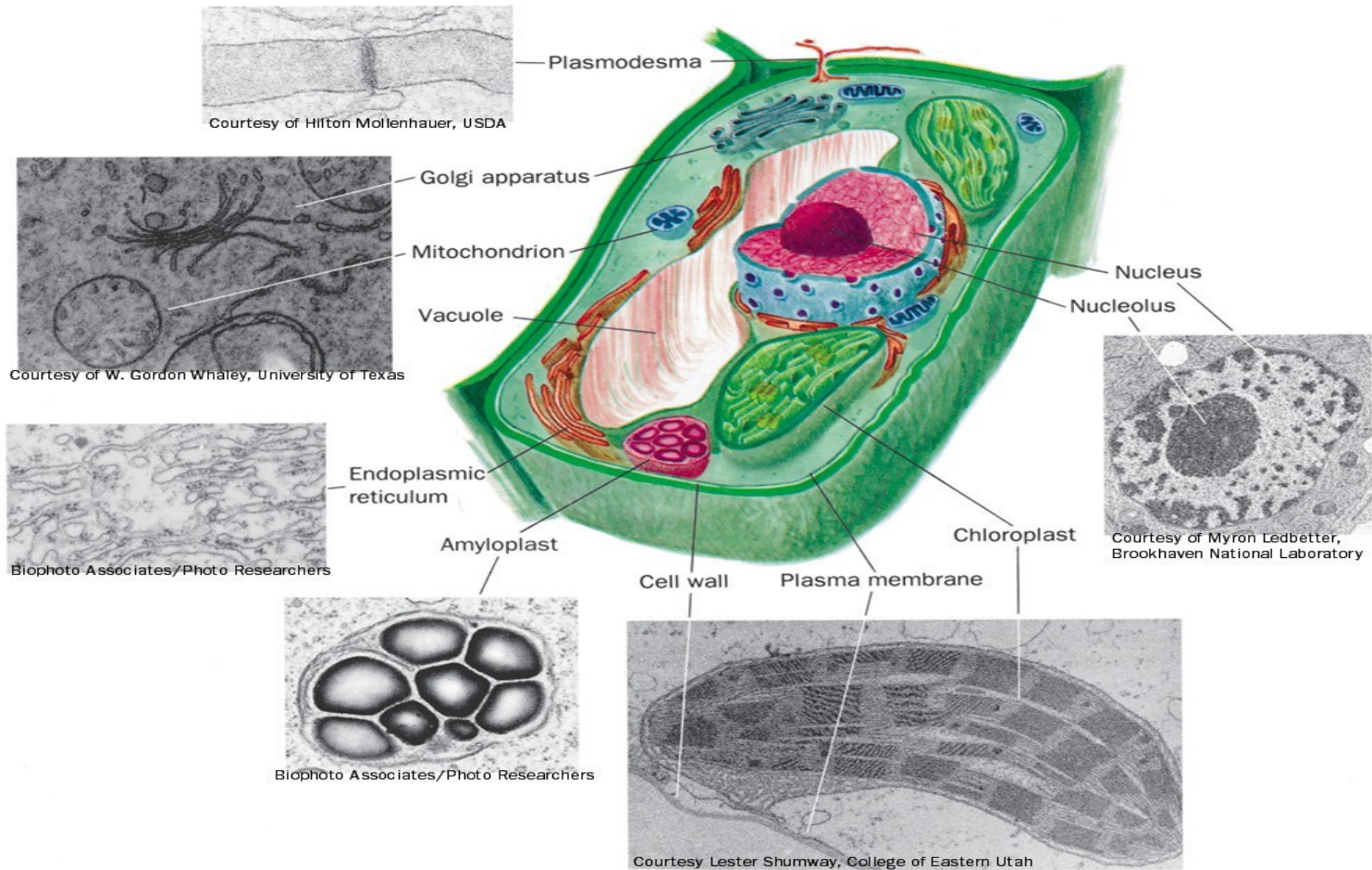
Prokaryontní bakteriální buňka



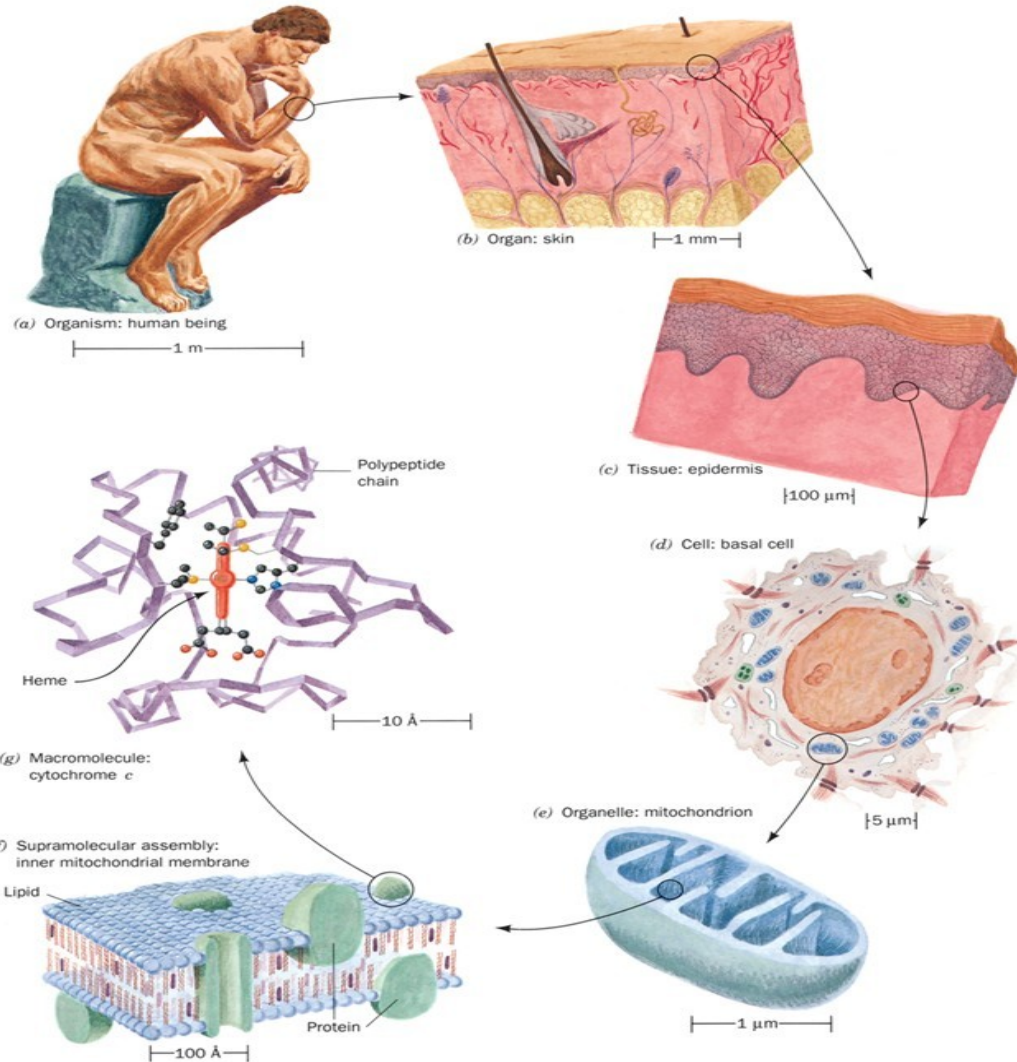
Eukaryontní živočišná buňka



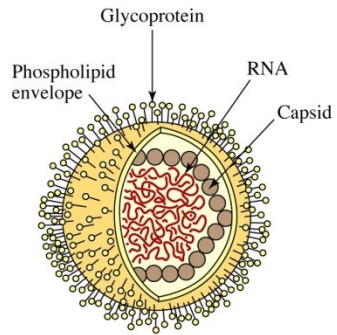
Eukaryontní rostlinná buňka



Organizace biologických struktur

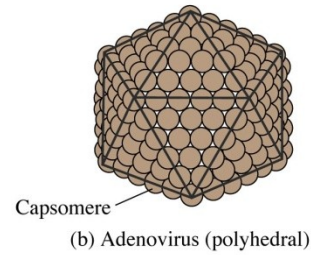
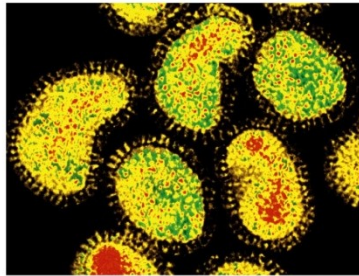


Viry



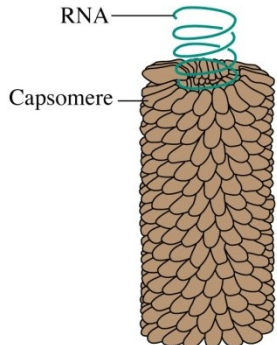
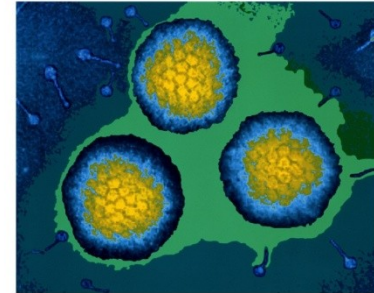
(a) Influenza virus (globular)

Figure 1-7a Concepts in Biochemistry, 3/e



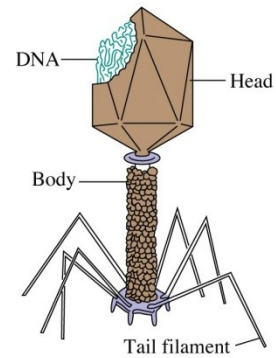
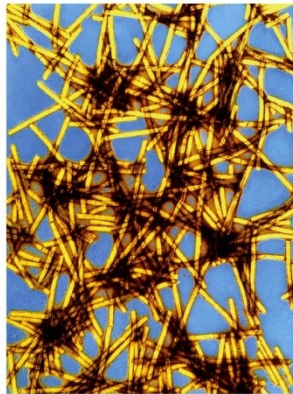
(b) Adenovirus (polyhedral)

Figure 1-7b Concepts in Biochemistry, 3/e



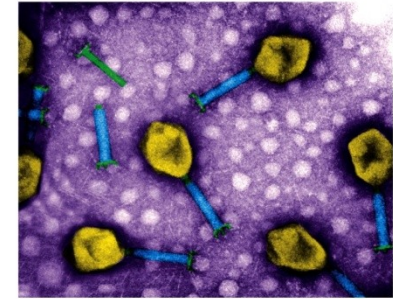
(c) Tobacco mosaic virus (cylindrical)

Figure 1-7c Concepts in Biochemistry, 3/e

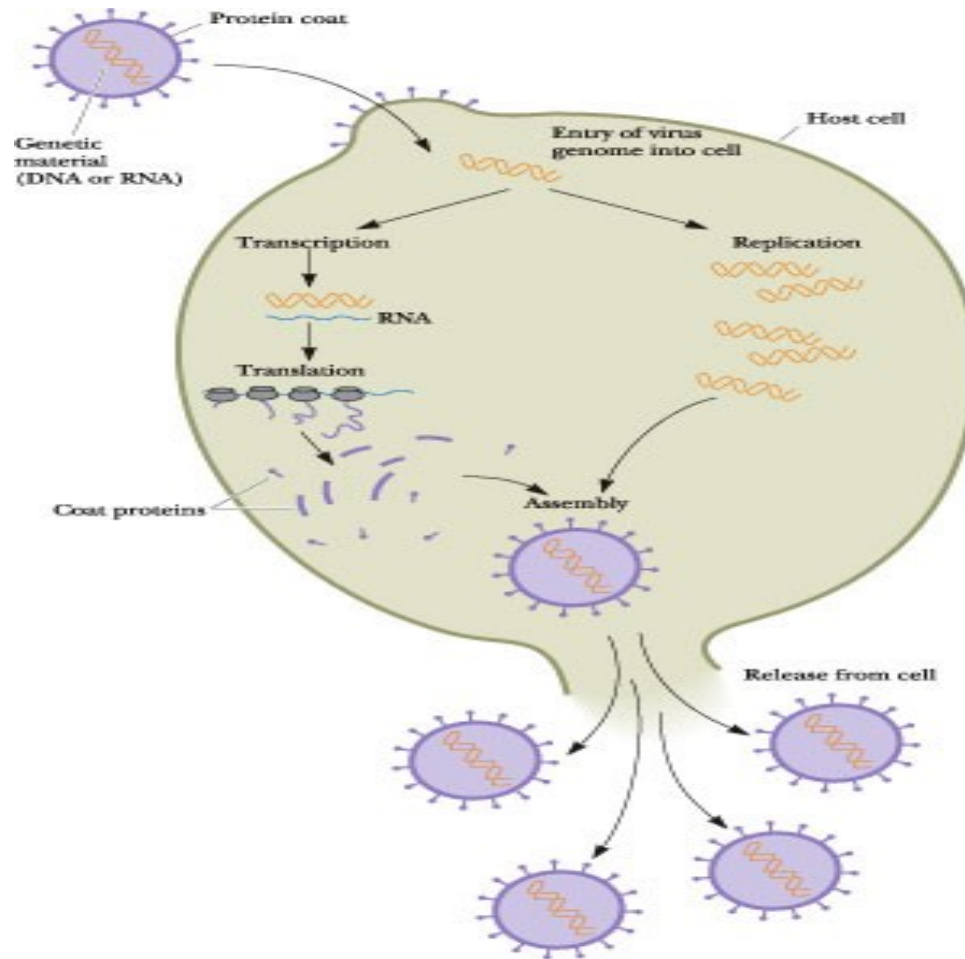


(d) Bacteriophage (complex shape)

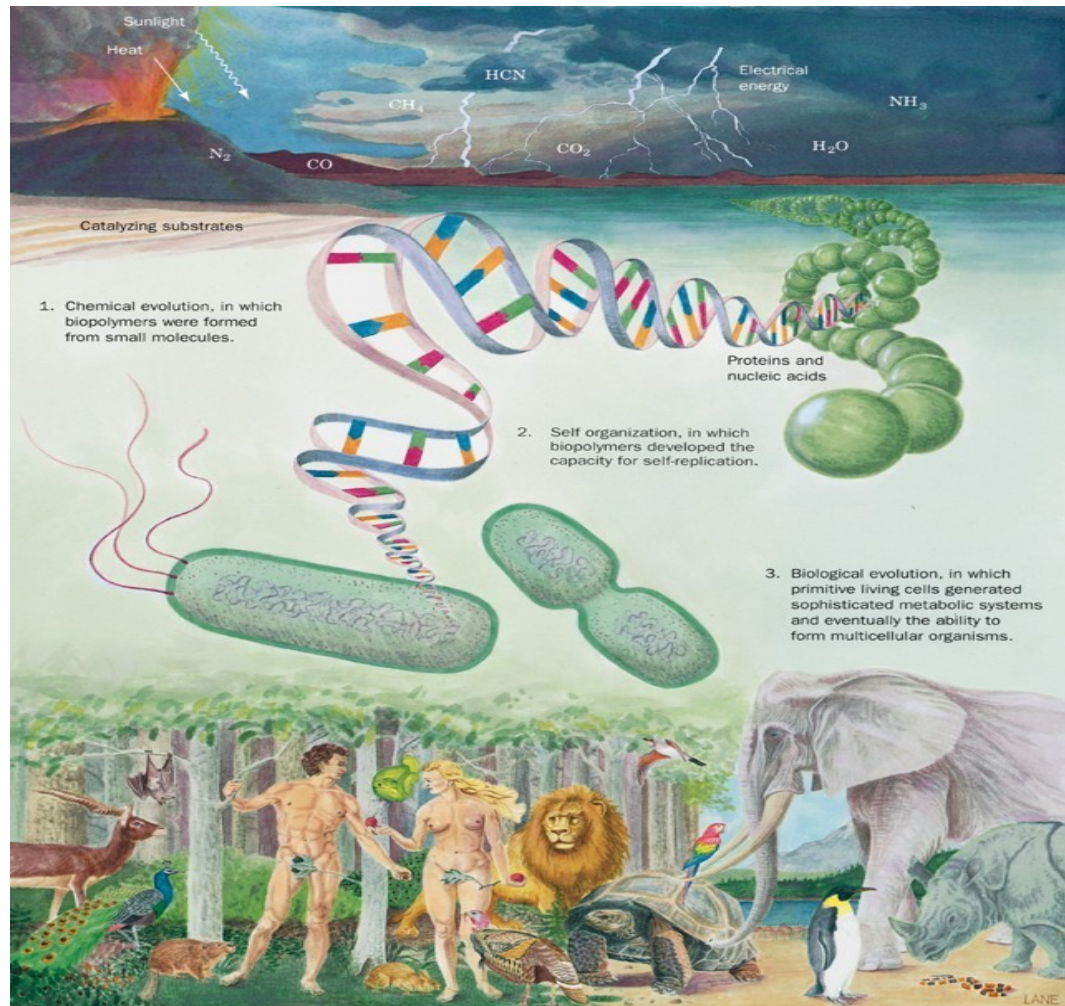
Figure 1-7d Concepts in Biochemistry, 3/e



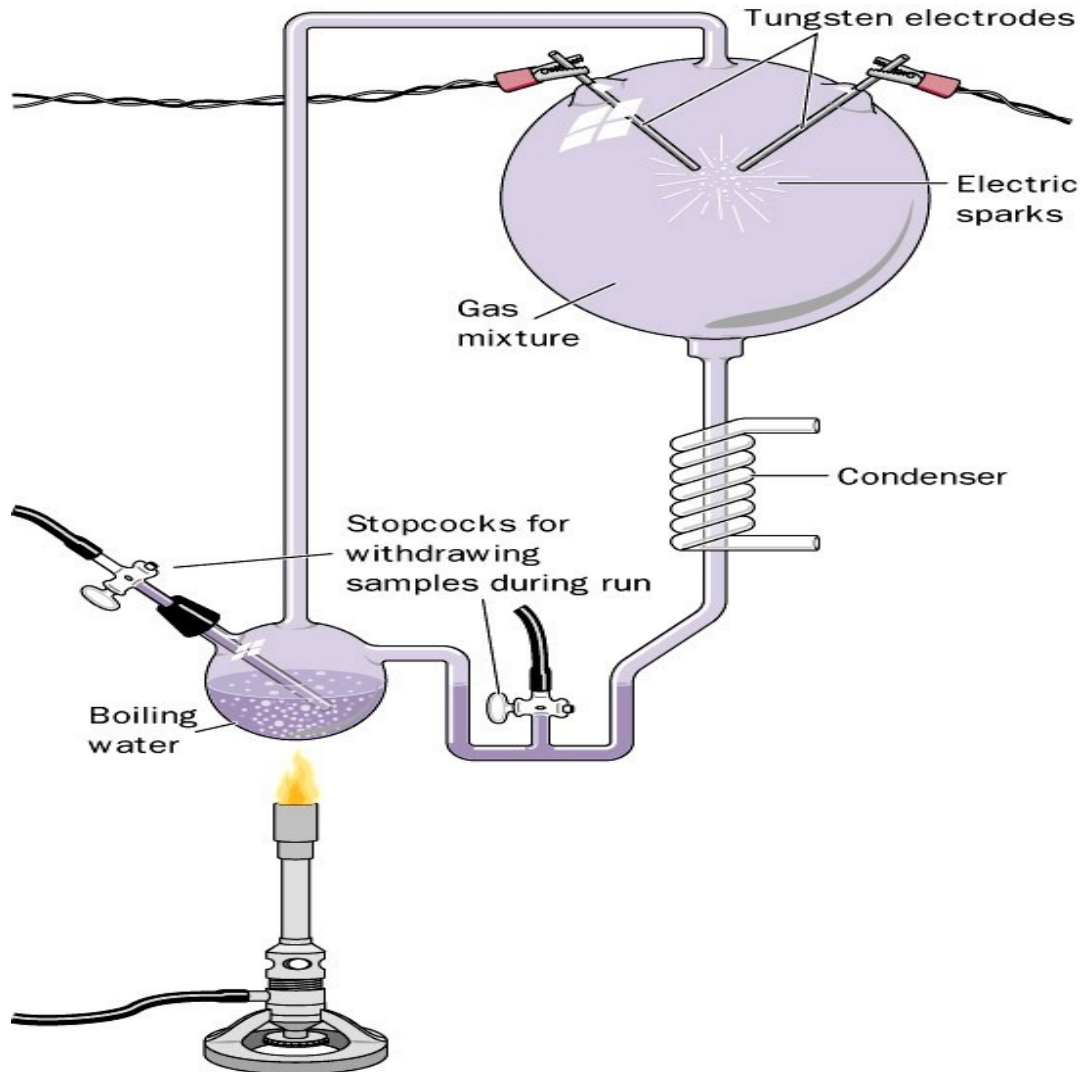
Viry



Evolve života na zemi



Evolve životu na zemi



Evolve života na zemi

Compound	Yield (%)
Glycine ^a	2.1
Glycolic acid	1.9
Sarcosine	0.25
Alanine ^a	1.7
Lactic acid	1.6
<i>N</i> -Methylalanine	0.07
α -Amino- <i>n</i> -butyric acid	0.34
α -Aminoisobutyric acid	0.007
α -Hydroxybutyric acid	0.34
β -Alanine	0.76
Succinic acid	0.27
Aspartic acid ^a	0.024
Glutamic acid ^a	0.051
Iminodiacetic acid	0.37
Iminoaceticpropionic acid	0.13
Formic acid	4.0
Acetic acid	0.51
Propionic acid	0.66
Urea	0.034
<i>N</i> -Methylurea	0.051

^a Amino acid constituent of proteins.

Source: Miller, S.J. and Orgel, L.E., *The Origins of Life on Earth*, p. 85, Prentice-Hall (1974).

BÍLKOVINY - PROTEINY

Protein - MULDER, BERZELIUS (1838)

πρωτεϊνο - „zaujímající první místo“

Funkce - katalýza

transport

pohyb

podpora

imunita

regulace

vznik a přenos nervového vzruchu

AMINOKYSELINY (20 AMK)

MW 50 - 200



2 až 50 AMK PEPTIDY → POLYPEPTIDY

MW < 10 000

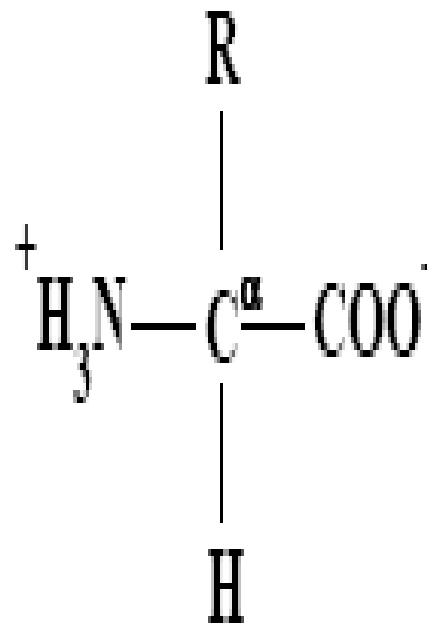


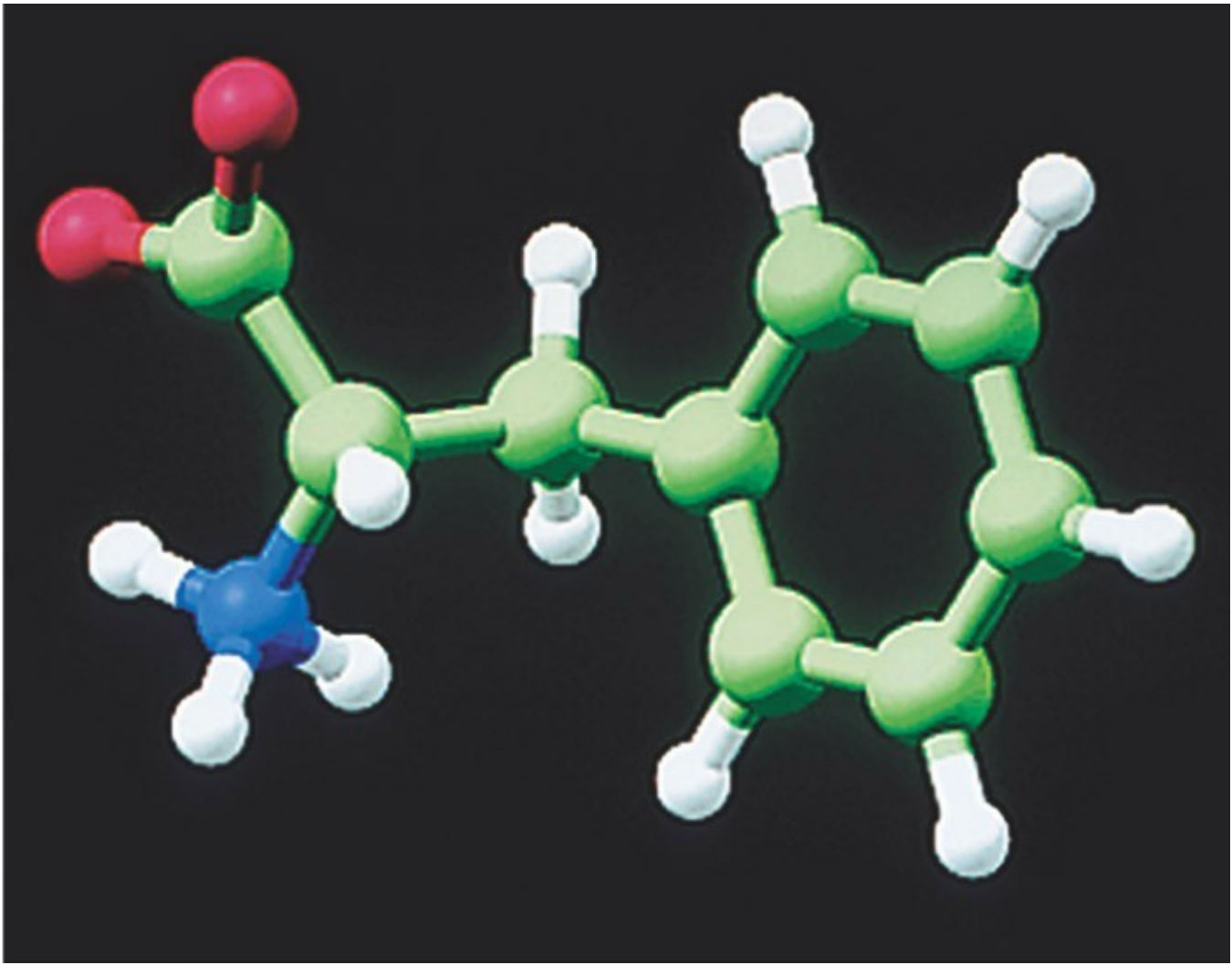
> 50 AMK BÍLKOVINY - PROTEINY

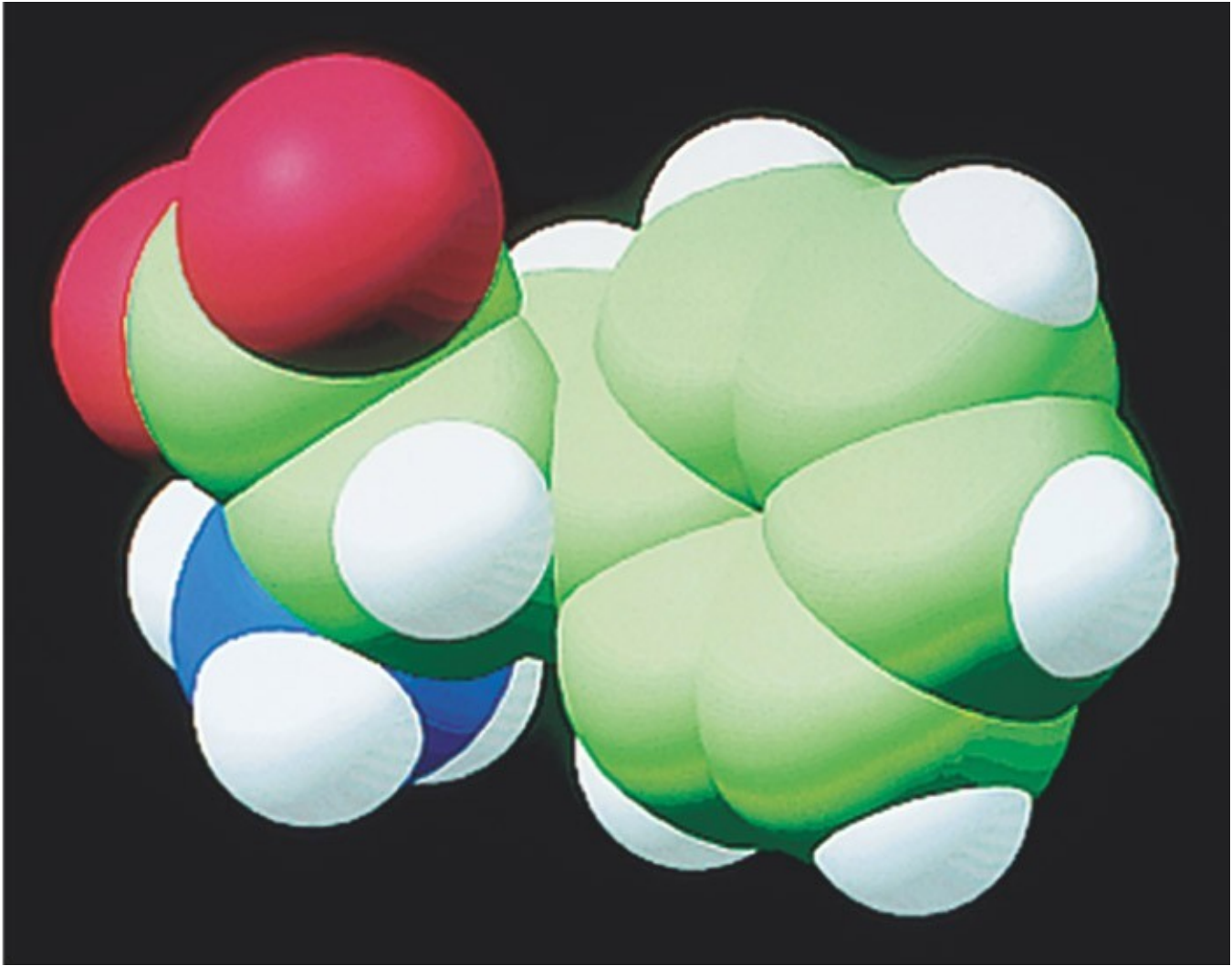
MW > 10 000

Aminokyseliny :

chemicky - substituční deriváty karboxylových kyselin







I. Kódované aminokyseliny

Rozdělení :

A. Nepolární aminokyseliny - Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Phe, Pro

B. Polární aminokyseliny

OH skupinu - Ser, Thr, Tyr

SH skupinu - Cys, Met

indolovou skupinu - Try

CONH₂ skupinu - AspNH₂, GluNH₂

C. Nabité - kyselé COOH skupinu - Asp, Glu

- basické NH₂ skupinu - Lys

guanidinovou skupinu - Arg

imidazolovou skupinu - His

Name, Three-letter Symbol, and One-letter Symbol	Structural Formula ^a	Residue Mass (D) ^b	Average Occurrence in Proteins (%) ^c	pK ₁ α-COOH ^d	pK ₂ α-NH ₃ ^{+d}	pK _R Side Chain ^d
Amino acids with nonpolar side chains						
Glycine Gly G		57.0	6.8	2.35	9.78	
Alanine Ala A		71.1	7.6	2.35	9.87	
Valine Val V		99.1	6.6	2.29	9.74	
Leucine Leu L		113.2	9.5	2.33	9.74	
Isoleucine Ile I		113.2	5.8	2.32	9.76	
Methionine Met M		131.2	2.4	2.13	9.28	
Proline Pro P		97.1	5.0	1.95	10.64	
Phenylalanine Phe F		147.2	4.1	2.20	9.31	
Tryptophan Trp W		186.2	1.2	2.46	9.41	

(continued)

^aThe ionic forms shown are those predominating at pH 7.0 (except for that of histidine^e), although residue mass is given for the neutral compound. The C atoms, as well as those atoms marked with an asterisk, are chiral centers with configurations as indicated according to Fischer projection formulas. The standard organic numbering system is provided for heterocycles.

^bThe residue masses are given for the neutral residues. For molecular masses of the parent amino acids, add 18.0 D, the molecular mass of H₂O, to the residue masses. For side chain masses, subtract 56.0 D, the formula mass of a peptide group, from the residue masses.

^cThe average amino acid composition in the complete SWISS-PROT database (<http://www.expasy.ch/sprot>), Release 40.7.

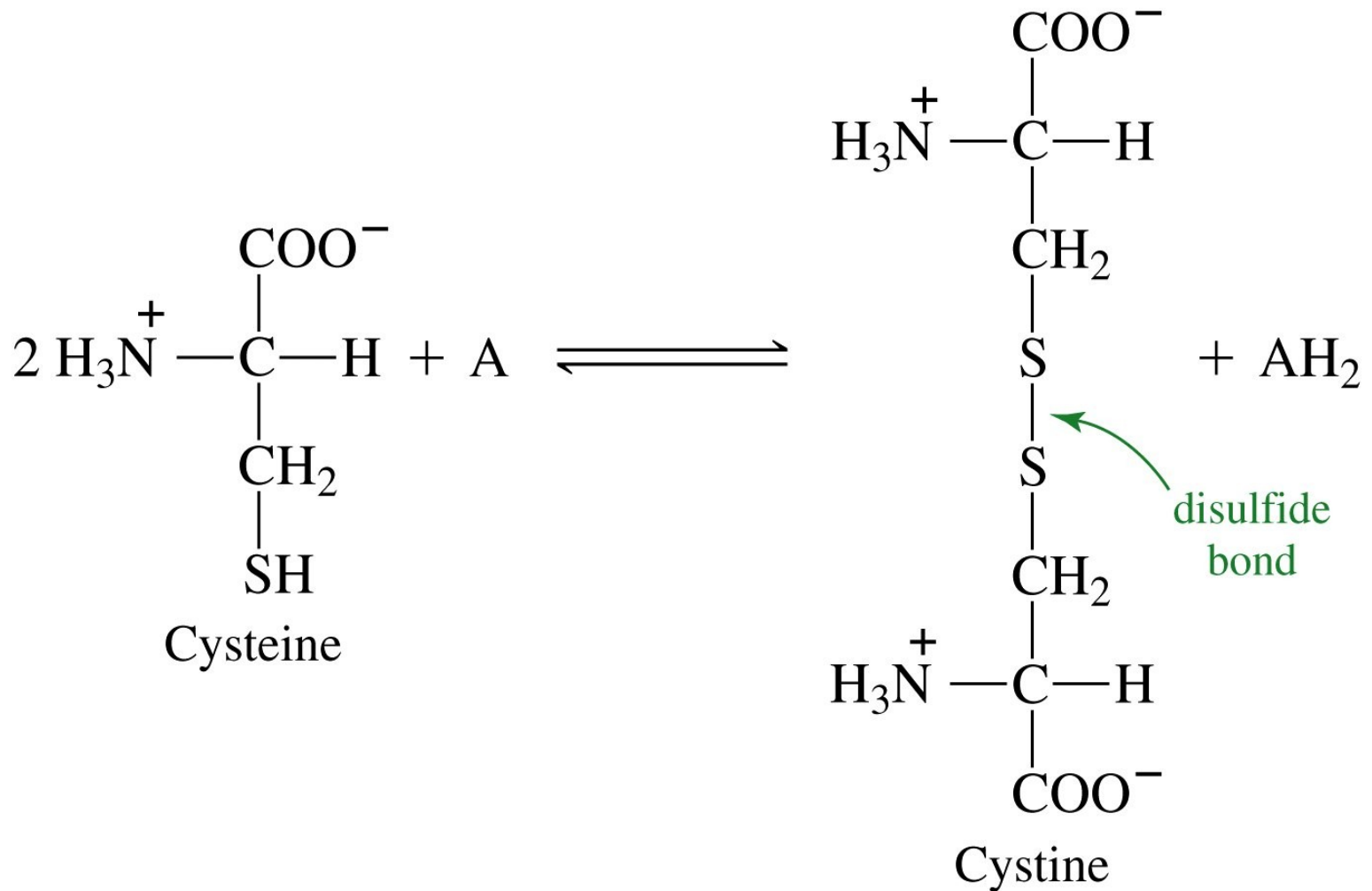
^dFrom Dawson, R.M.C., Elliott, D.C., Elliott, W.H., and Jones, K.M., *Data for Biochemical Research* (3rd ed.), pp. 1–31, Oxford Science Publications (1986).

^eBoth the neutral and protonated forms of histidine are present at pH 7.0 because its pK_R is close to 7.0. The imidazole ring of histidine is numbered here according to the biochemistry convention. In the IUPAC convention, N3 of the biochemistry convention is designated N1 and the numbering increases clockwise around the ring.

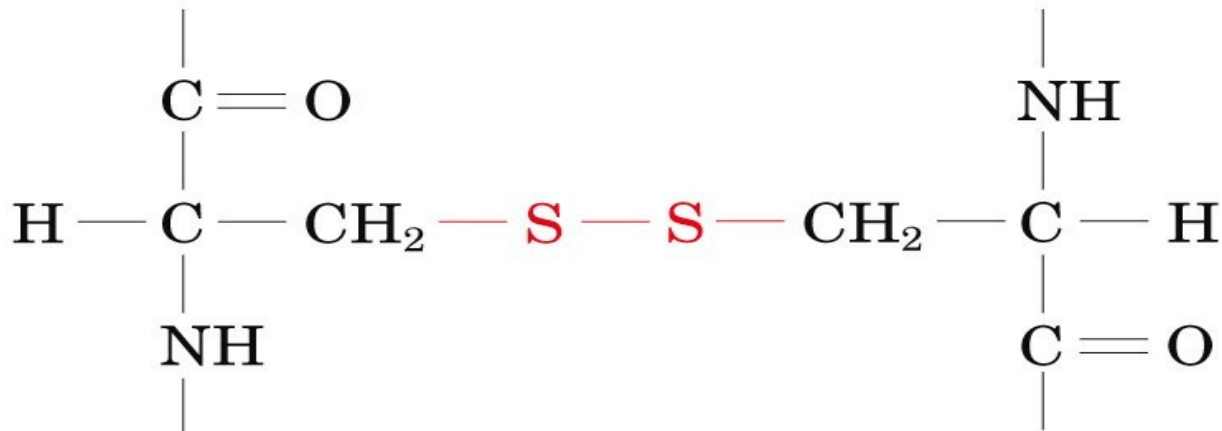
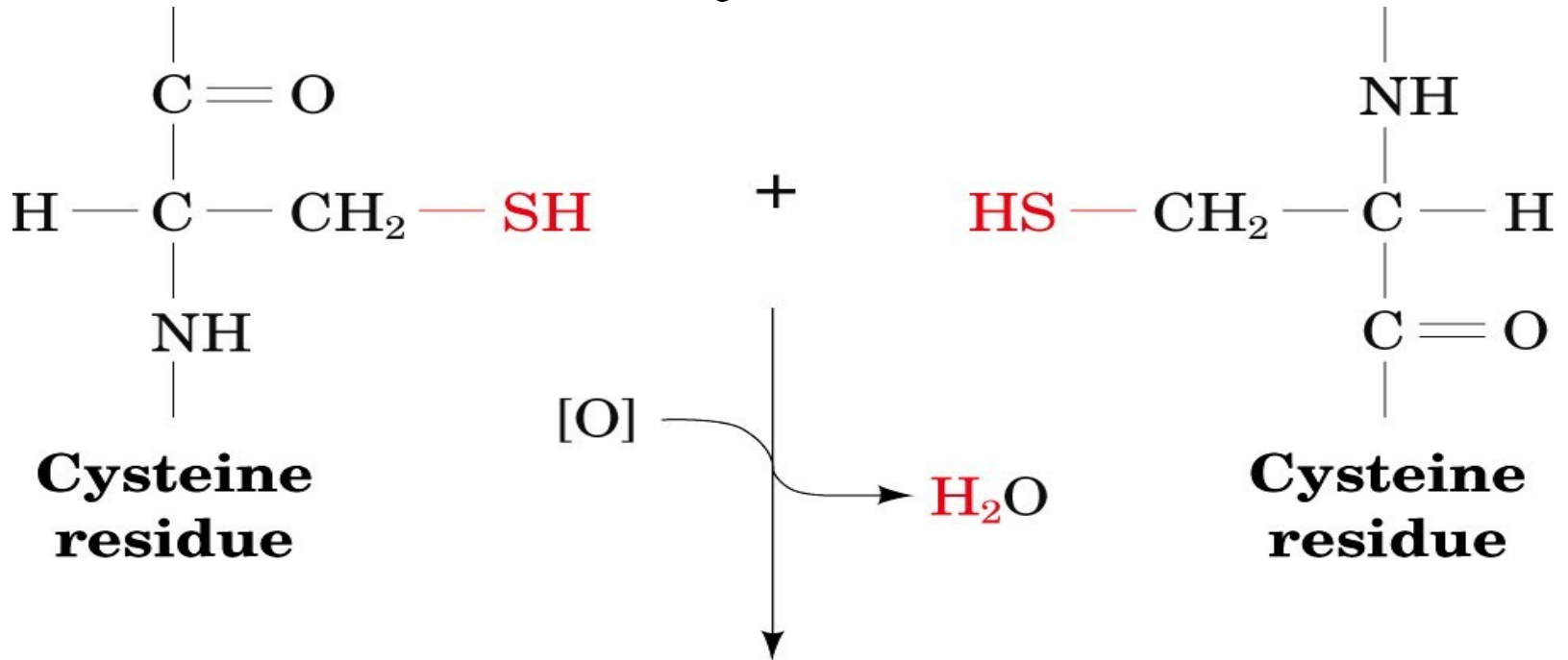
^fThe three- and one-letter symbols for asparagine *or* aspartic acid are Asx and B, whereas for glutamine *or* glutamic acid they are Glx and Z. The one-letter symbol for an undetermined or “nonstandard” amino acid is X.

Name Three-letter Symbol, and One-letter Symbol	Structural Formula ^a	Residue Mass (D) ^b	Average Occurrence in Proteins (%) ^c	pK ₁ -COOH ^d	pK ₂ -NH ₃ ⁺ ^d	pK _R Side Chain ^d
Amino acids with uncharged polar side chains						
Serine Ser S		87.1	7.1	2.19	9.21	
Threonine Thr T		101.1	5.6	2.09	9.10	
Asparagine ^f Asn N		114.1	4.3	2.14	8.72	
Glutamine ^f Gln Q		128.1	3.9	2.17	9.13	
Tyrosine Tyr Y		163.2	3.2	2.20	9.21	10.46 (phenol)
Cysteine Cys C		103.1	1.6	1.92	10.70	8.37 (sulfhydryl)
Amino acids with charged polar side chains						
Lysine Lys K		128.2	6.0	2.16	9.06	10.54 (-NH ₃)
Arginine Arg R		156.2	5.2	1.82	8.99	12.48 (guanidino)
Histidine ^e His H		137.1	2.2	1.80	9.33	6.04 (imidazole)
Aspartic acid ^f Asp D		115.1	5.2	1.99	9.90	3.90 (-COOH)
Glutamic acid ^f Glu E		129.1	6.5	2.10	9.47	4.07 (-COOH)

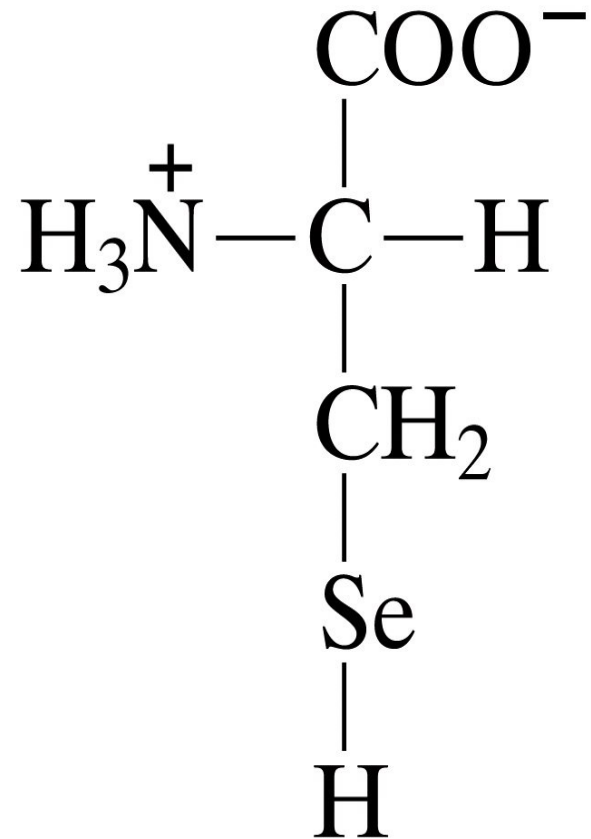
Cystin



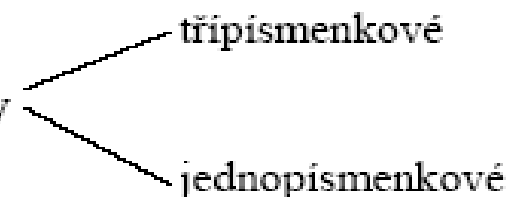
Cystin



Selenocystein



Selenocysteine

Používané zkratky 

- třipísmenkové
- jednopísmenkové

AMK	Symboly		AMK	Symboly	
glycin	Gly	G	methionin	Met	M
alanin	Ala	A	glutamová k.	Glu	E
valin	Val	V	asparagin	Asn	N
leucin	Leu	L	glutamin	Gln	Q
izoleucin	Ile	I	lysin	Lys	K
serin	Ser	S	arginin	Arg	R
threonin	Thr	T	tyrosin	Tyr	Y
cystein	Cys	C	fenylalanin	Phe	F
histidin	His	H	tryptofan	Trp	W
prolin	Pro	P	asparagová k.	Asp	D

Esenciální AMK

- Rostliny + mikroorganismy 0
- Člověk – biosyntéza -12

esenciální - 8 Lys, Try, Phe, Met,
Thr, Ile, Leu, Val, *Arg?*

Esenciální AMK

- Rostliny + mikroorganismy 0
- Člověk – biosyntéza -12

esenciální - 8 Lys, Try, Phe, Met,
Thr, Ile, Leu, Val, *Arg?*

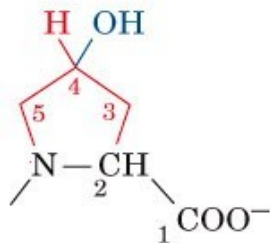
II. Nekódované aminokyseliny

A. v bílkovinách posttranslační modifikací AMK

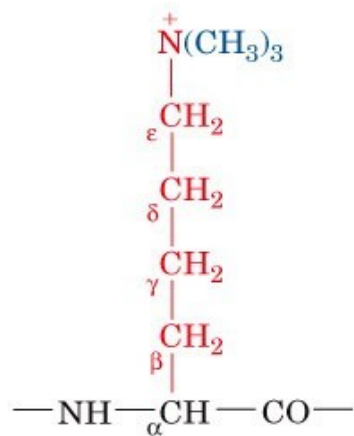
OH-Lys

OH-Pro

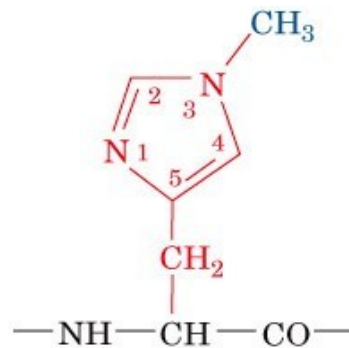
fosfo-Ser



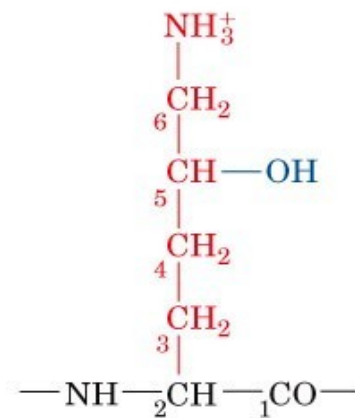
4-Hydroxyproline



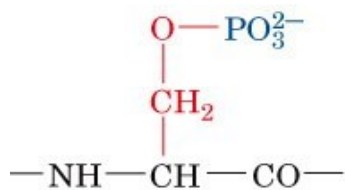
ϵ -N,N,N-Trimethyllysine



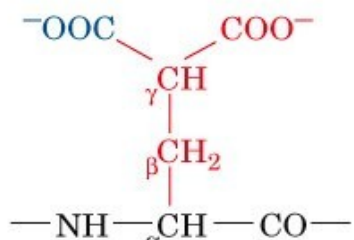
3-Methylhistidine



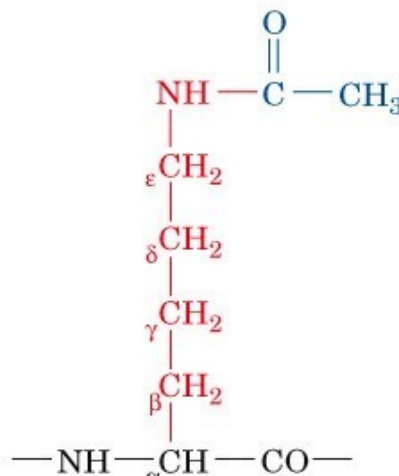
5-Hydroxylysine



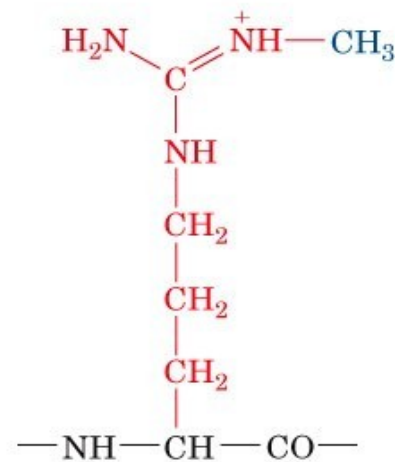
O-Phosphoserine



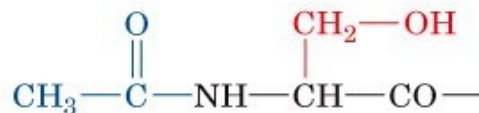
γ -Carboxyglutamate



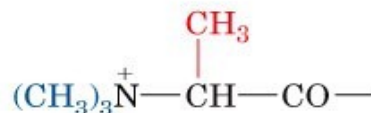
ϵ -N-Acetyllysine



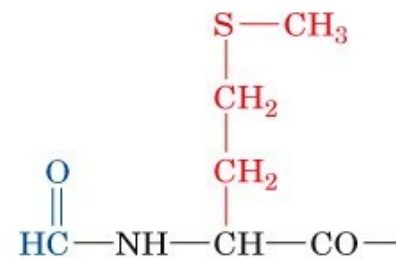
ω -N-Methylarginine



N-Acetylserine



N,N,N-Trimethylalanine



N-Formylmethionine

B. volné s biologickou funkci

β alanin

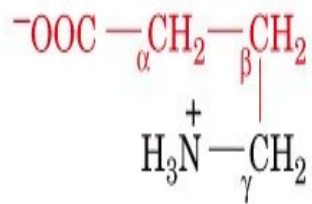
ornitin a citrulin

γ aminomáselná

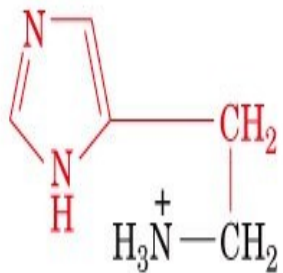
antibiotika - azaserin, cykloserin, chloramfenikol

nervové mediátory - DOPA, dopamin, adrenalin

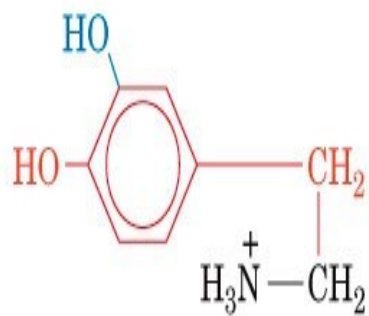
hormony - thyroxin, trijodthyronin



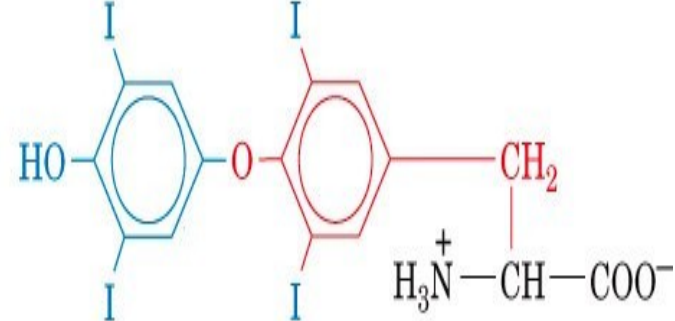
γ -Aminobutyric acid (GABA)



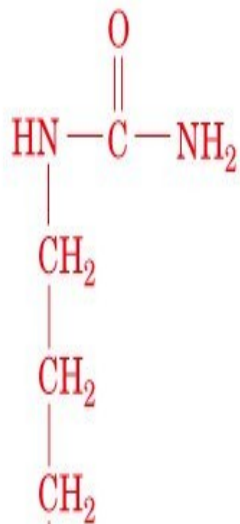
Histamine



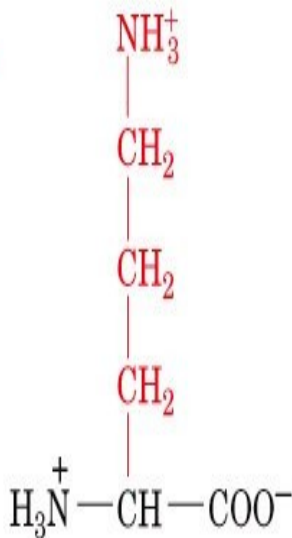
Dopamine



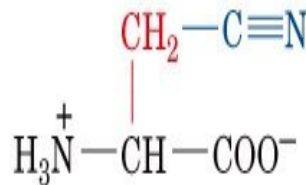
Thyroxine



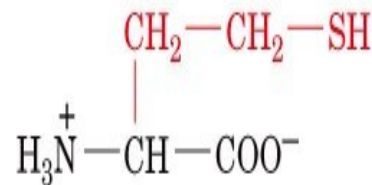
Citrulline



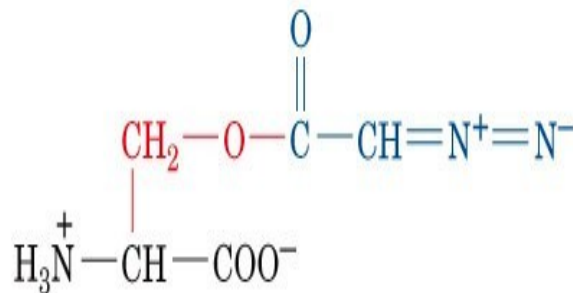
Ornithine



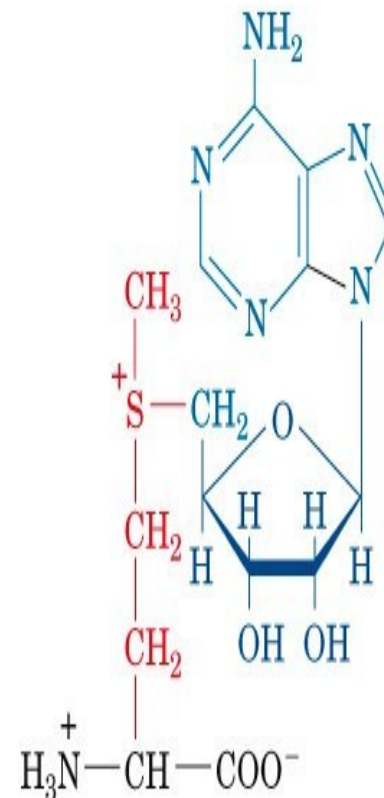
β -Cyanoalanine



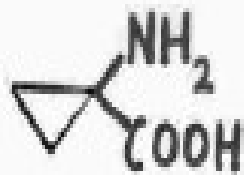
Homocysteine



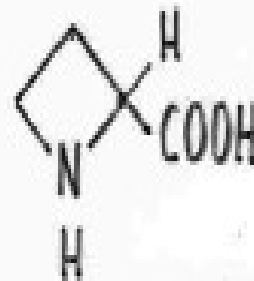
Azaserine



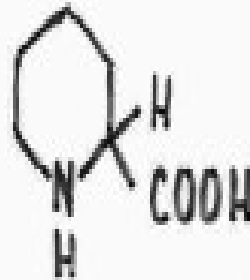
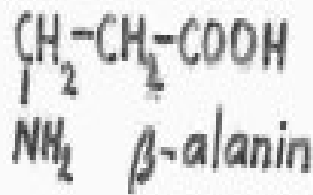
S-Adenosylmethionine



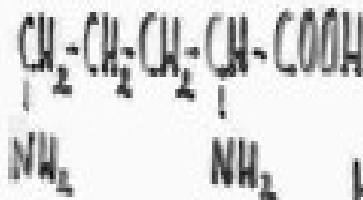
k. aminocyklopropyl-
karboxylová



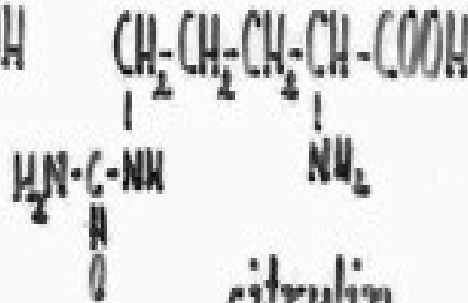
k. azetidinkarboxylová



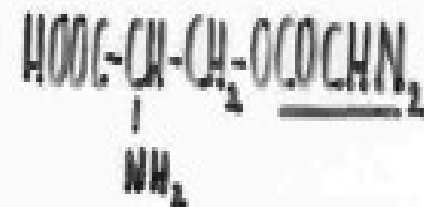
k. piperkolimová



ornithin



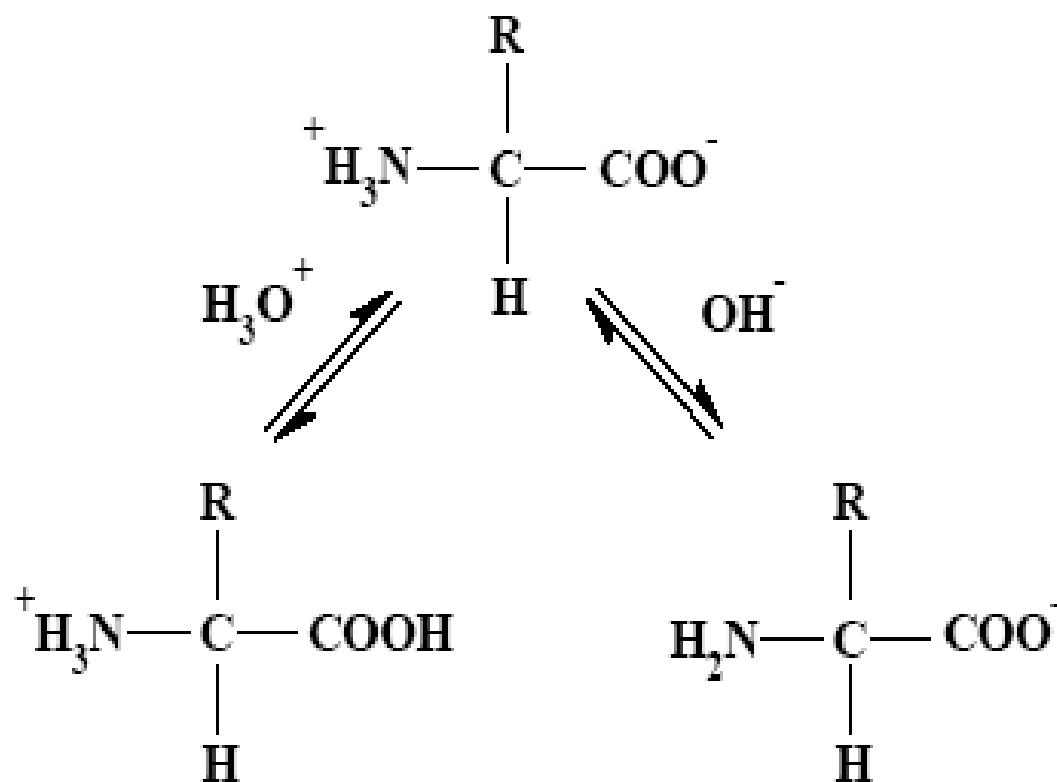
citrulin



azaserin

Vlastnosti aminokyselin

ACIDOBAZICKÉ VLASTNOSTI



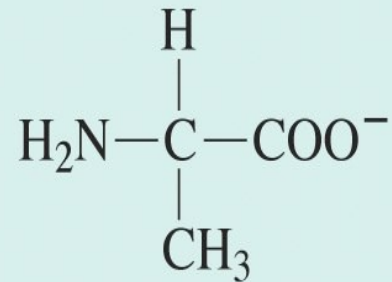
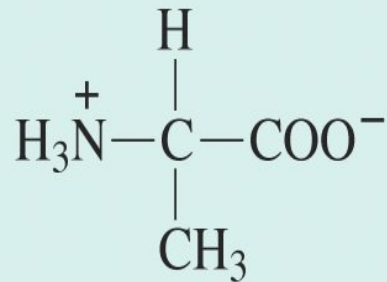
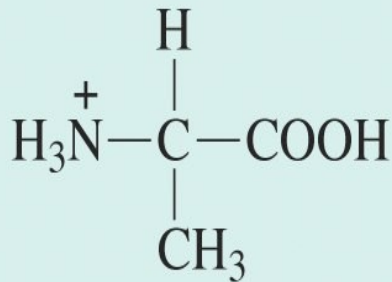
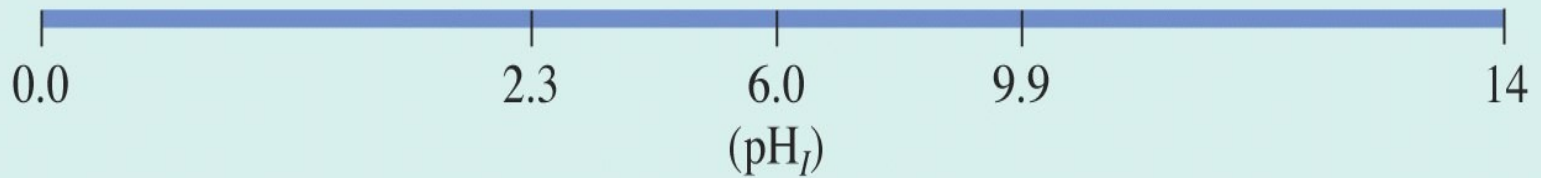
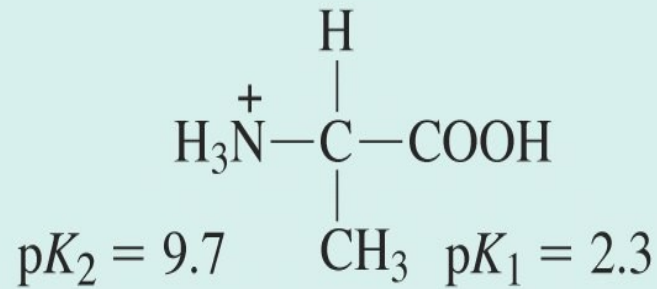


Figure 3-4b Concepts in Biochemistry, 3/e

© 2006 John Wiley & Sons

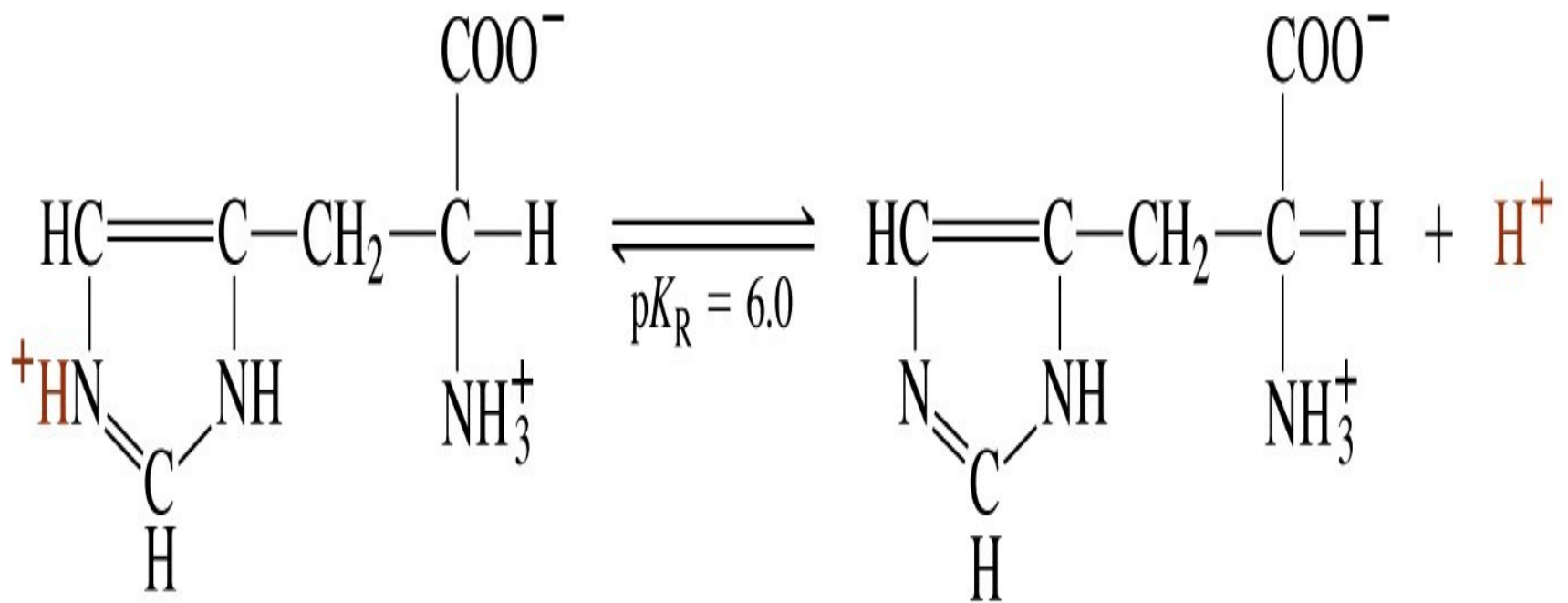
Izoelektrický bod $pI = \frac{pK_{COOH} + pK_{NH_2}}{2}$

Tabulka pK

Skupina	pK	Skupina	pK	Skupina	pK
α COOH	1.8 - 2.5	β COOH	3.9	γ COOH	4.1
α NH₂	9 - 10	ϵ NH₂	10.8	guanidin	12.5
imidazol	6.0	SH	8.3	OH	10.1

Pufrační kapacita

Titrační křivky

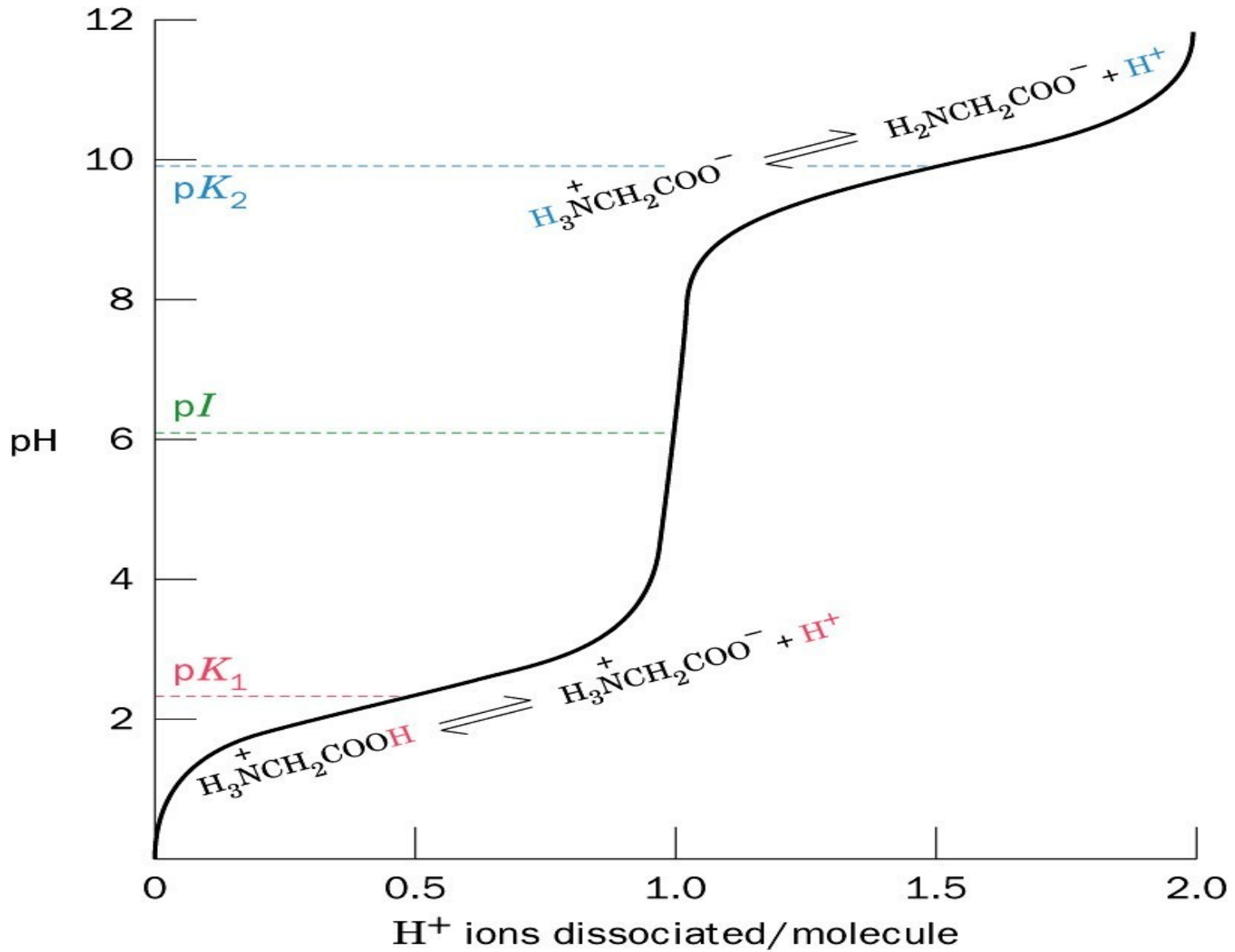


Histidine (His)

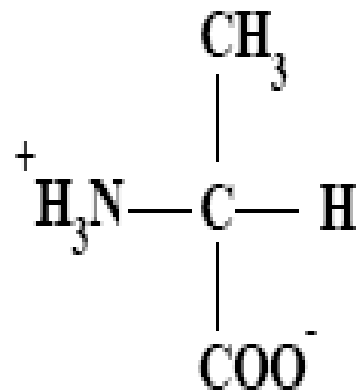
Figure 3-7 Concepts in Biochemistry, 3/e

© 2006 John Wiley & Sons

Titrační křivka glycinu

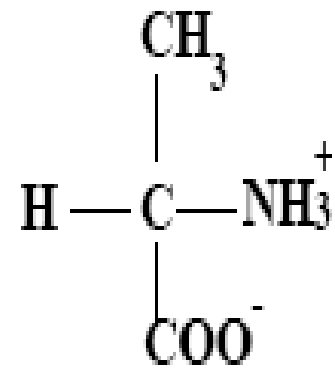


OPTICKÁ AKTIVITA



L -alanin

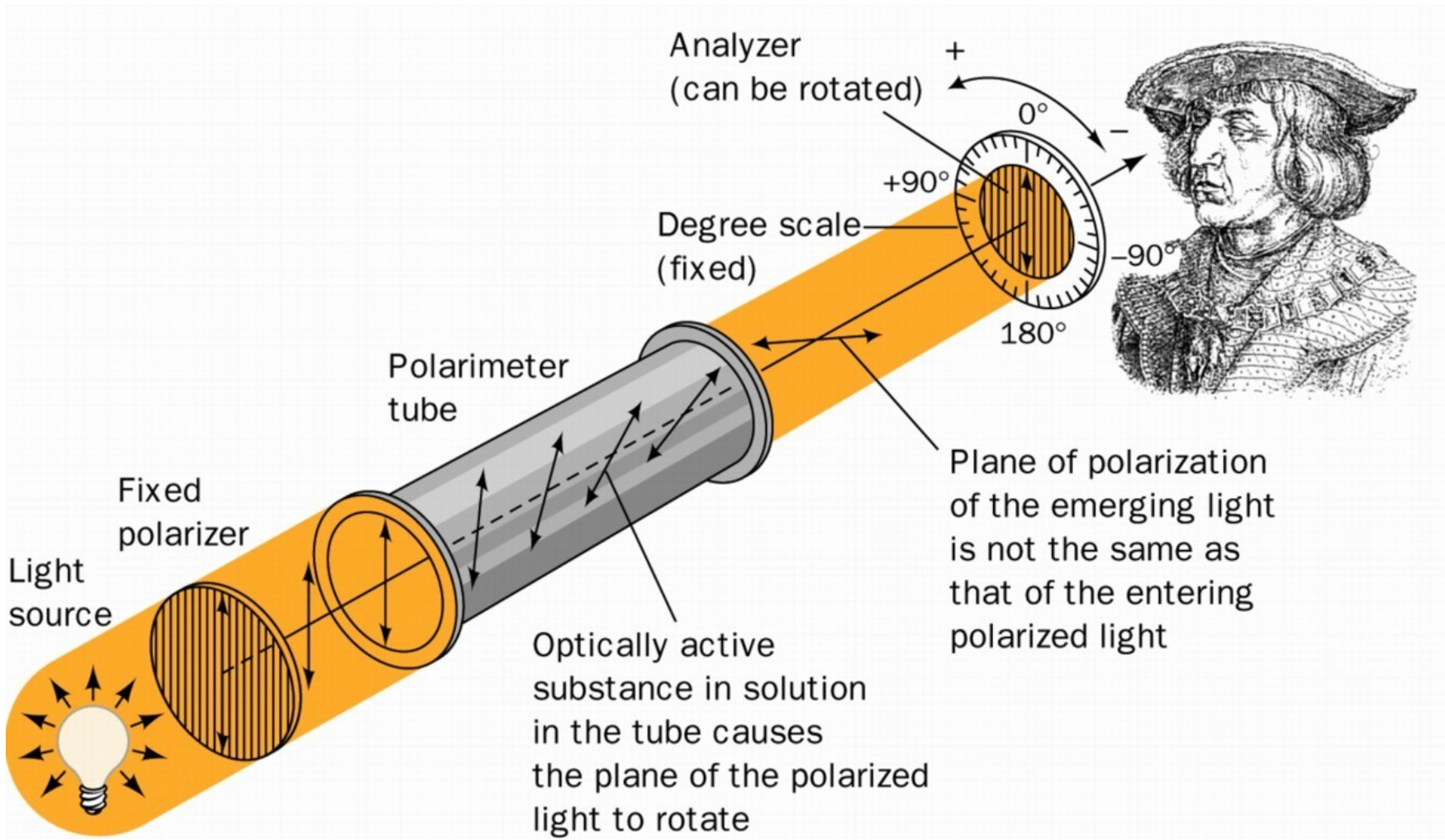
L



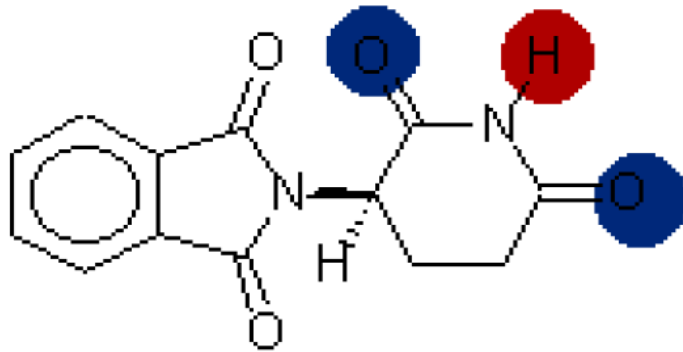
D-alanin

R

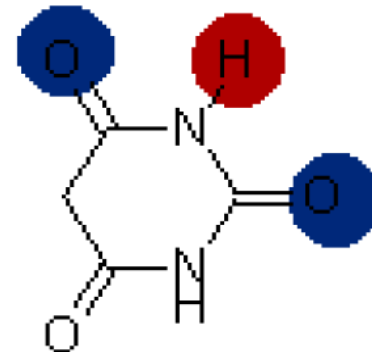
enantiomery



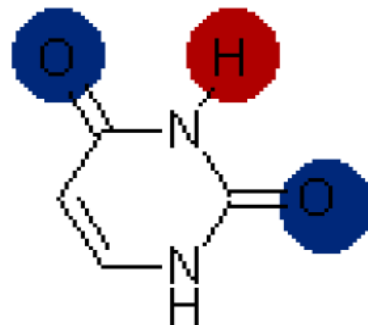
Thalidomid



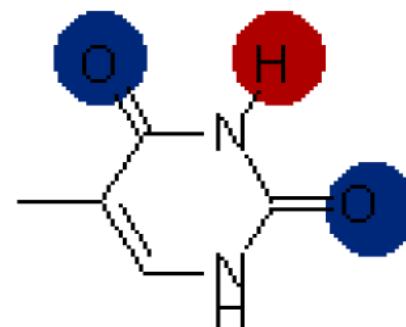
Thalidomid



Barbitursäure



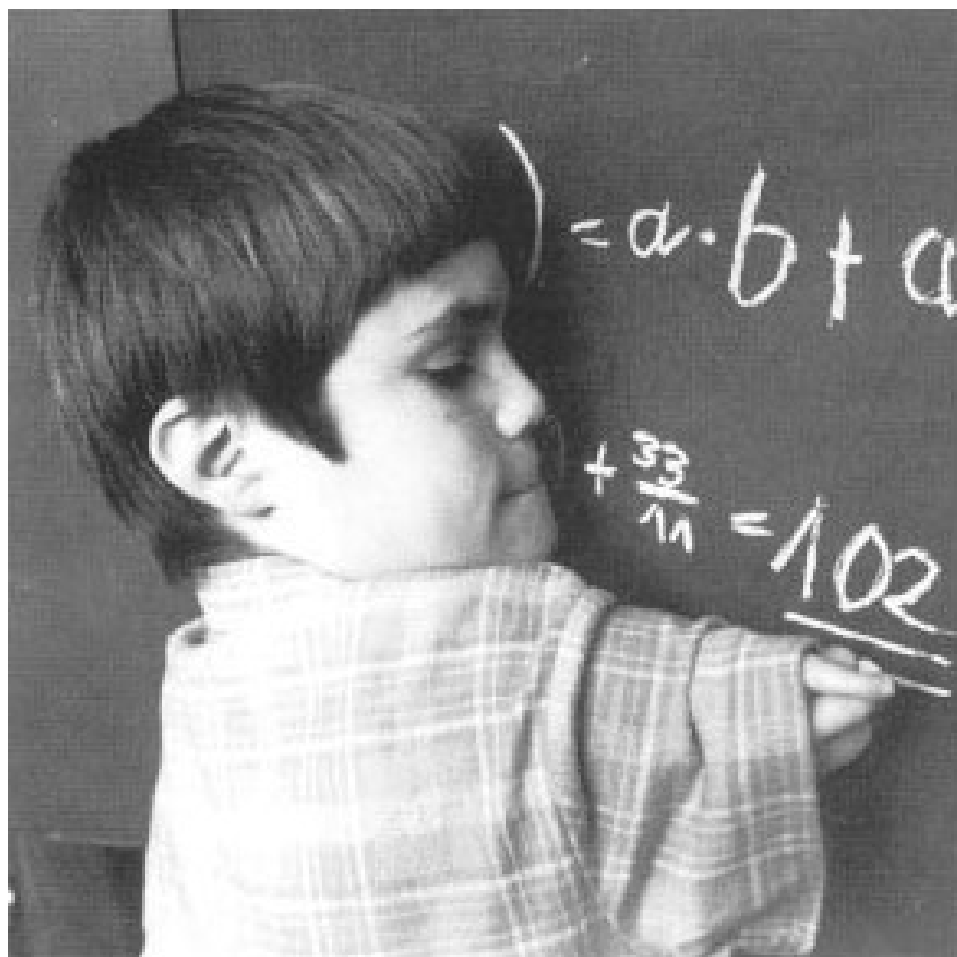
Uracil



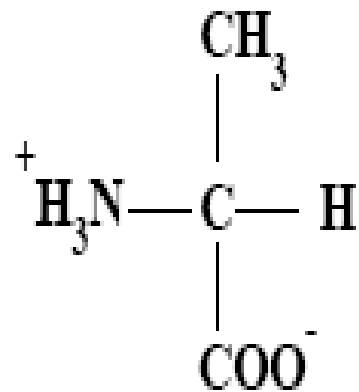
Thymin

Thalidomid



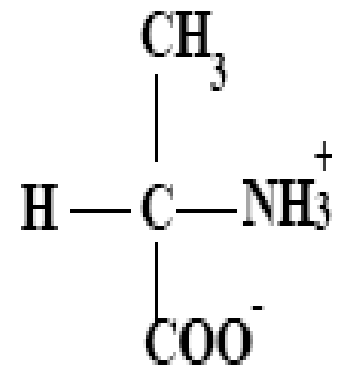


OPTICKÁ AKTIVITA



L -alanin

L

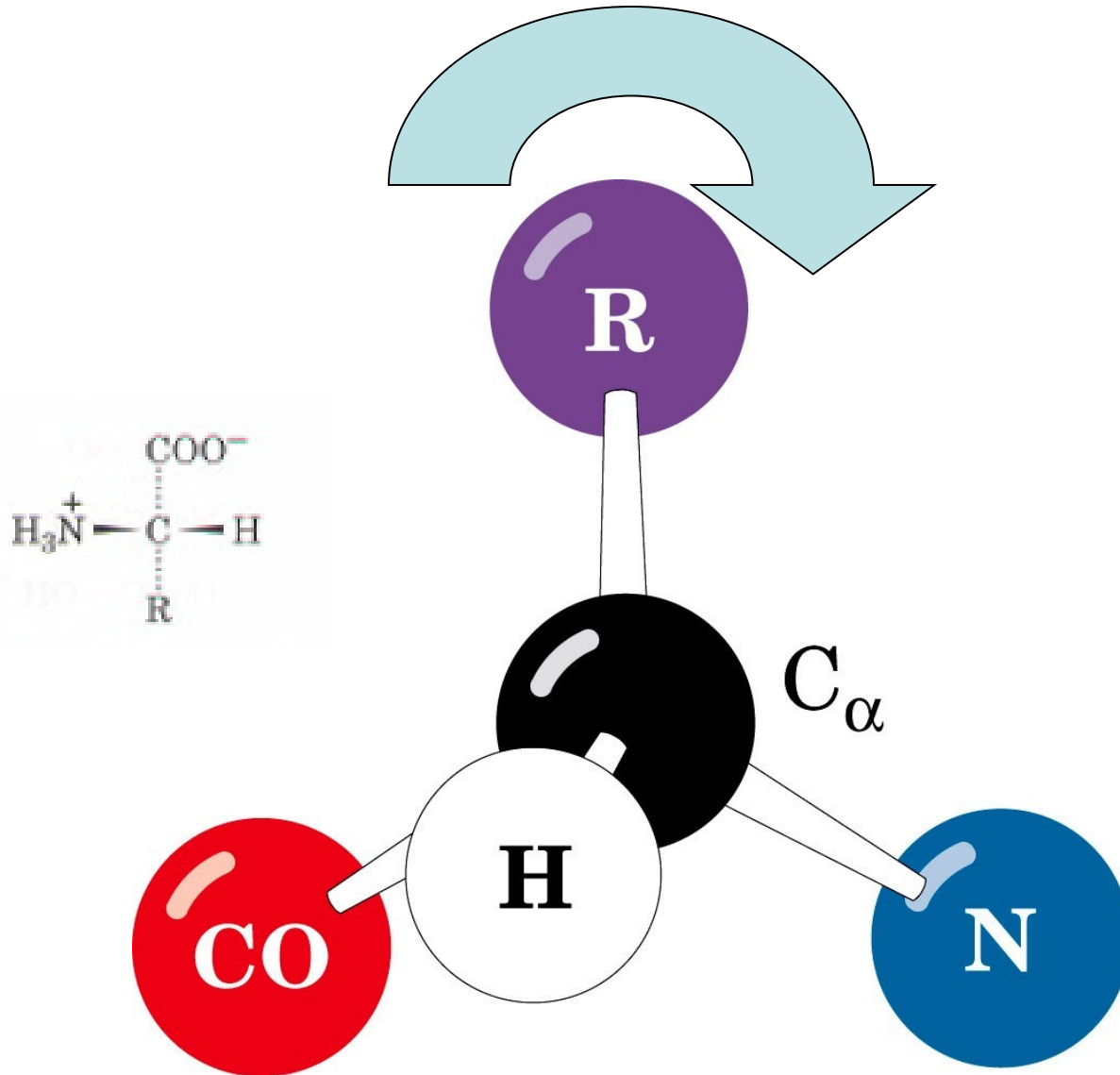


D-alanin

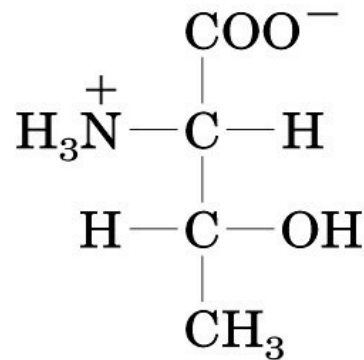
R

enantiomery

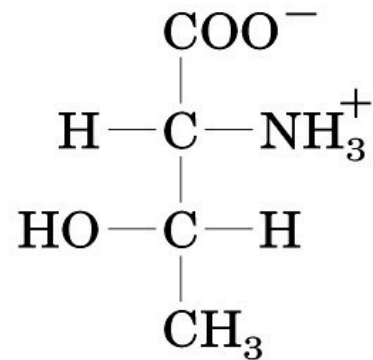
L AMK - CO-R-N



Diastomery threoninu

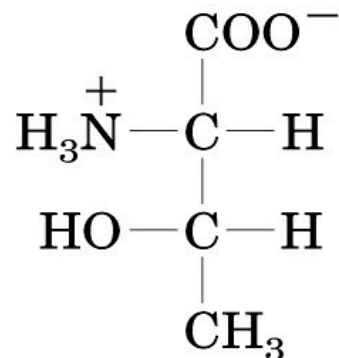


L-Threonine

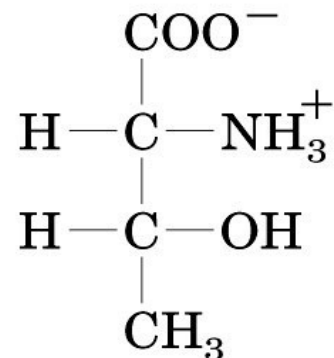


D-Threonine

Mirror
plane



L-*allo*-Threonine



D-*allo*-Threonine

CHEMICKÉ VLASTNOSTI

- reakce dané přítomností COOH a NH₂ skupin

ninhydrinová reakce - NH₂

- reakce vedlejších skupin

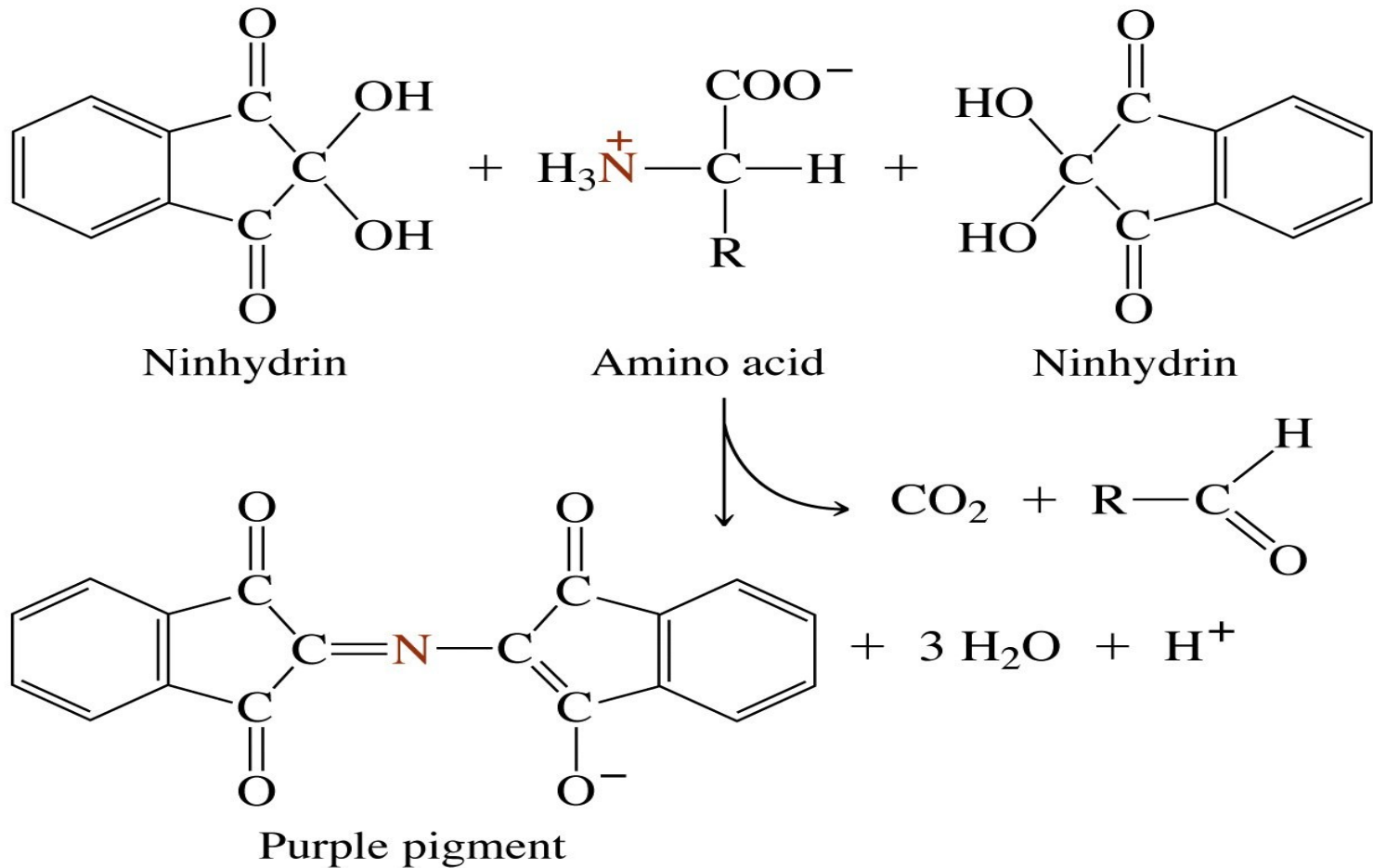
reakce Sakaguchiho - guanidinová skupina

xantoproteinová reakce - aromatické aminokyseliny

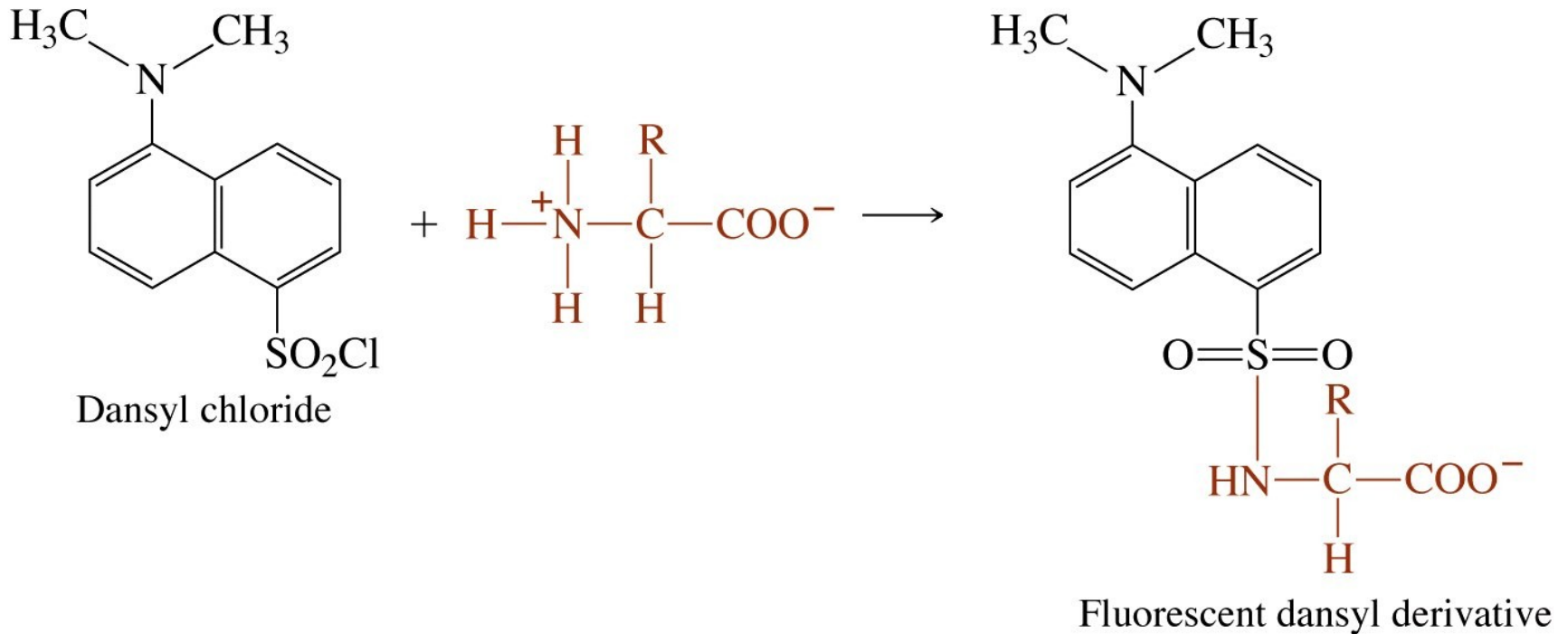
Paulyho reakce - tyrosin

Adamkiewiczova reakce - indol

Ninhydrinová reakce



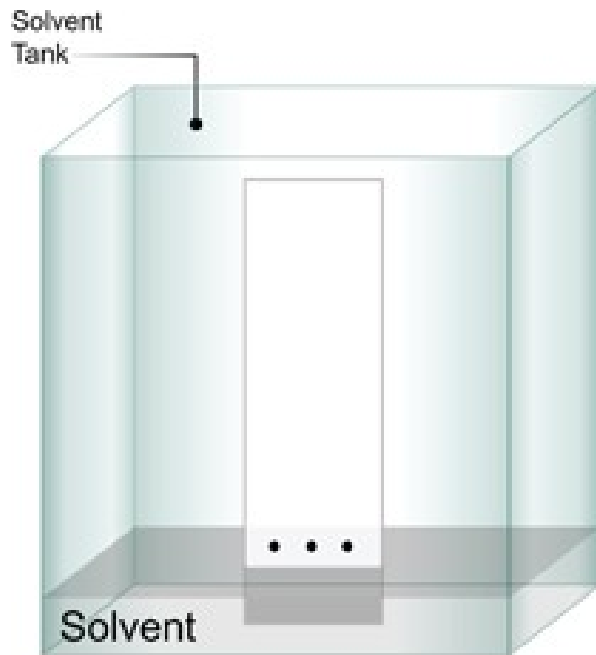
Reakce AMK s dansylchloridem



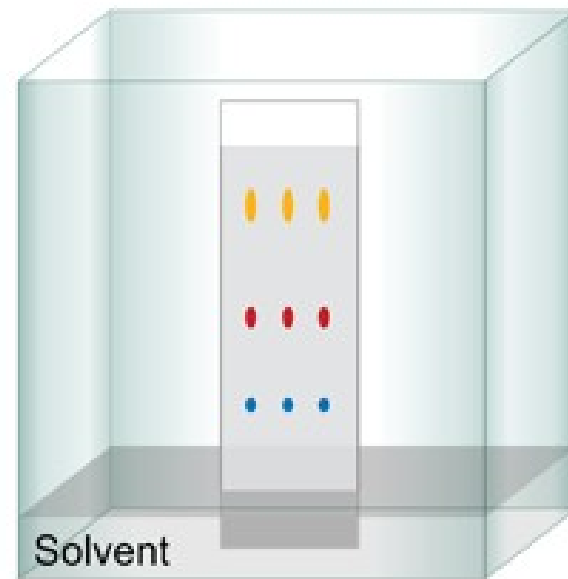
Analýza aminokyselin

- papíroví a tenkovrstvá chromatografie
- ionexová chromatografie
- reverzně fázová chromatografie

Papírová chromatografie AMK

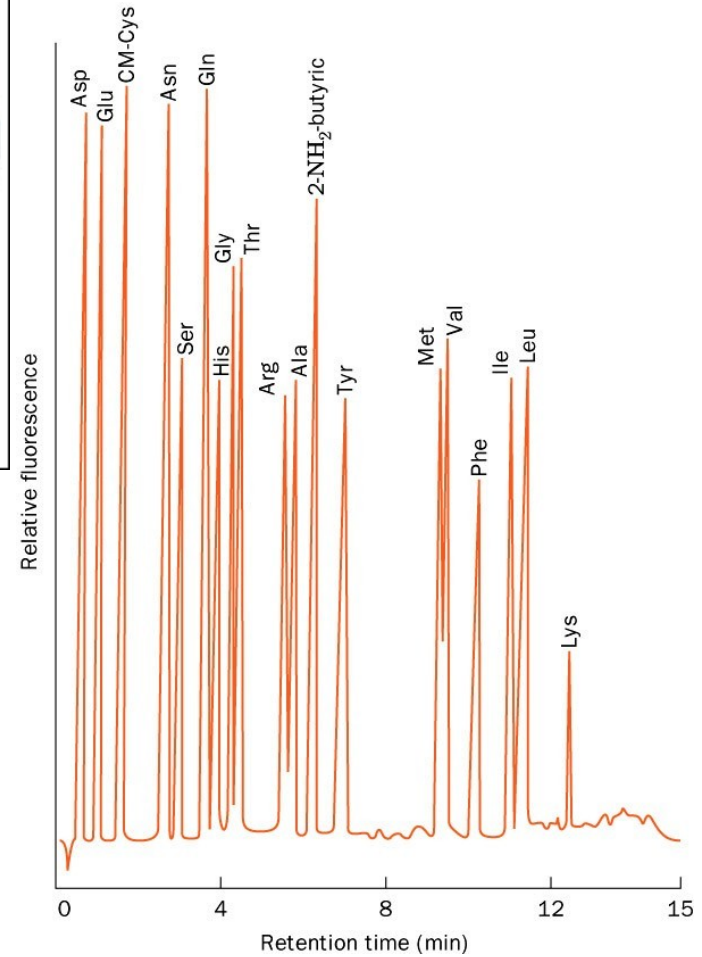
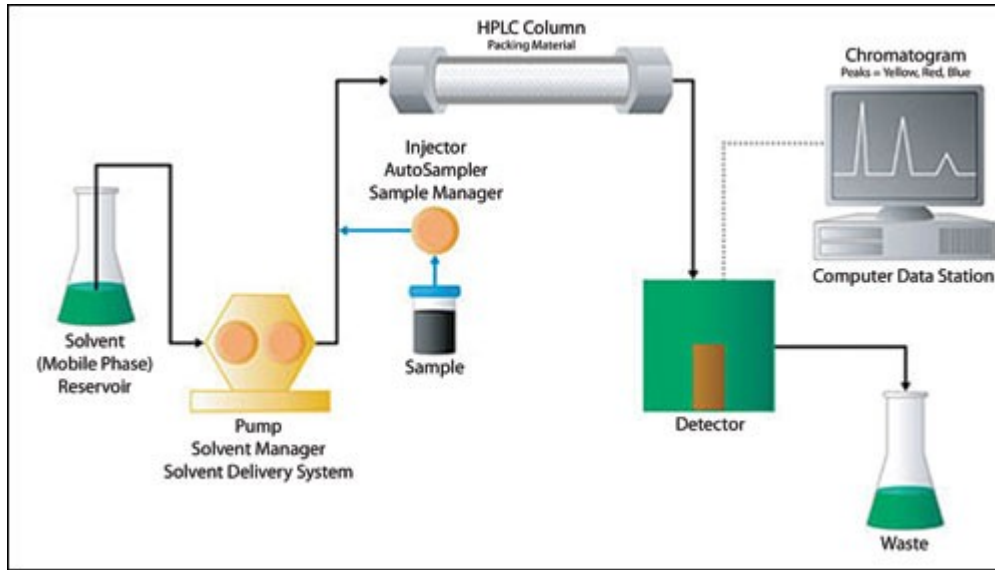


Time Zero



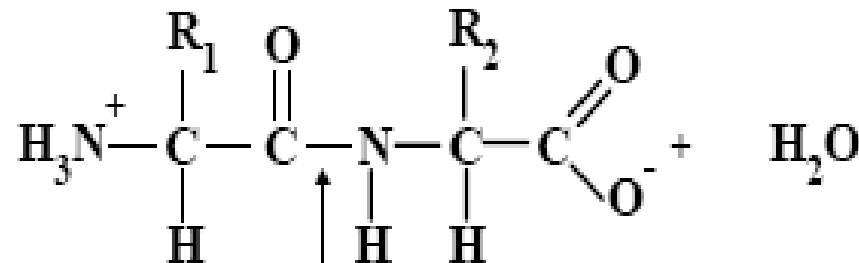
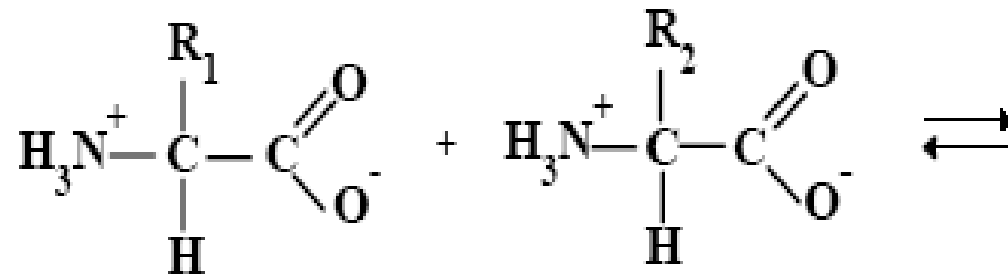
After Ten Minutes

RP HPLC AMK



PEPTIDY :

(E.FISHER 1902)



↑
Peptidická vazba - amidová vazba

di, tri, tetra oligopeptidy.....polypeptidy

Názvosloví peptidů



glycyl-arginyl-histidin

Biosyntéza peptidů - meziprodukty odbourávání bílkovin

- jednoduchá biosyntéza bez proteosyntézy

Přírodní peptidy:

Di - karnosin

anserin

Tri - glutathion GSH

Peptidové hormóny - oxytosin

vasopresin

inzulin

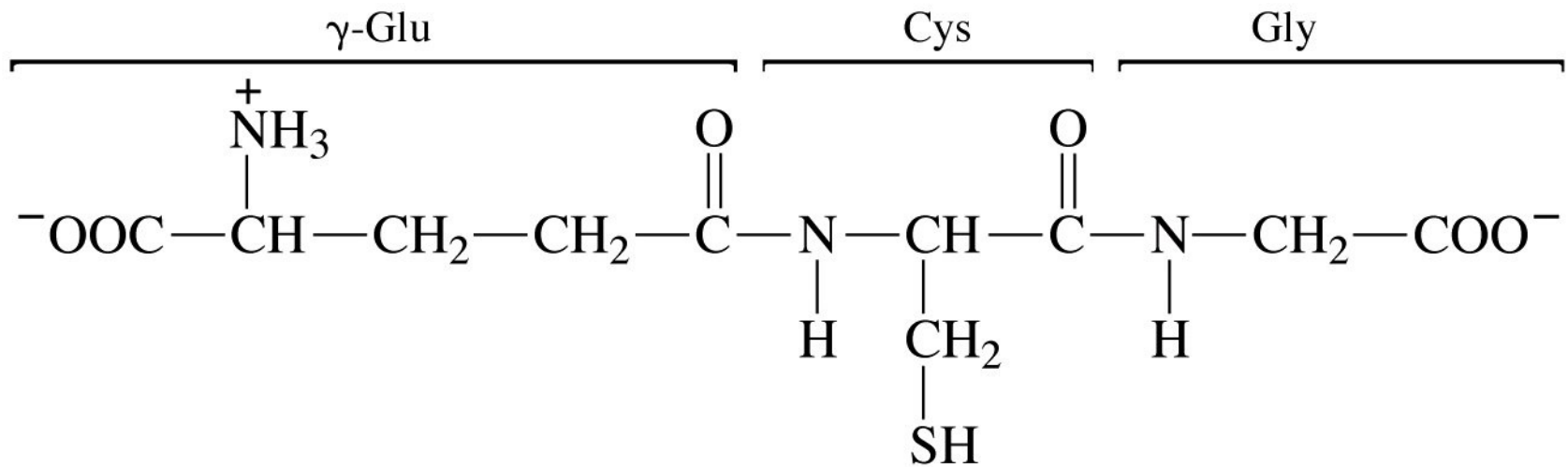
glukagon

Peptidové neuromodulátory - enkefaliny
endorfiny

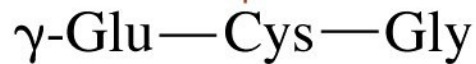
Peptidová antibiotika - penicilin
gramicidin
valinomycin
aktinomycin

Peptidové fyto a zootoxiny - neurotoxiny hadů štírů a včel
mikrocystiny
falloidin
amanitin

Polypeptidy - protaminy



Glutathione (GSH)
(reduced)



Glutathione (GSSG)
(oxidized)

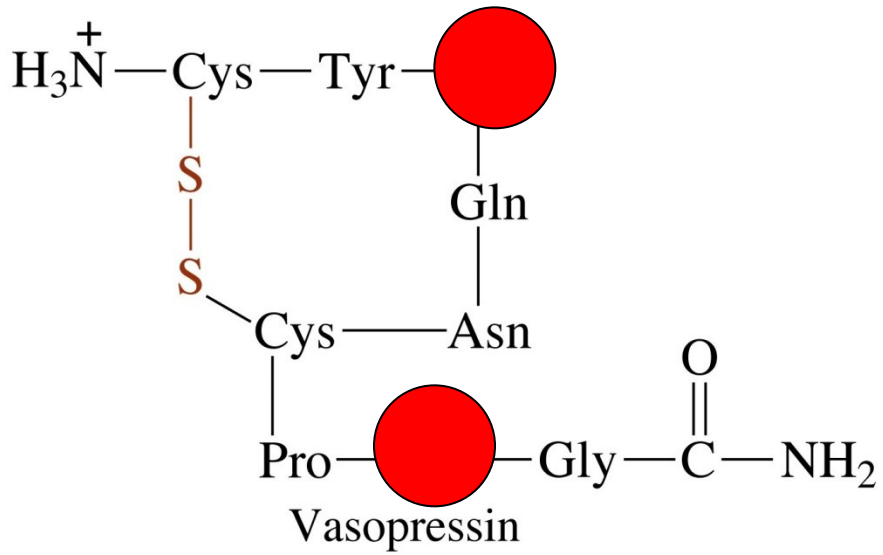


Figure 3-11c Concepts in Biochemistry, 3/e
© 2006 John Wiley & Sons

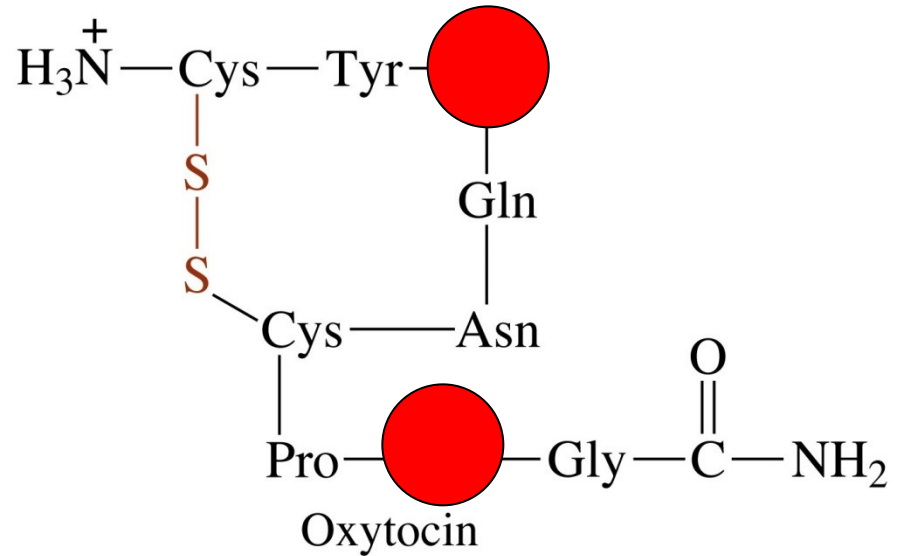
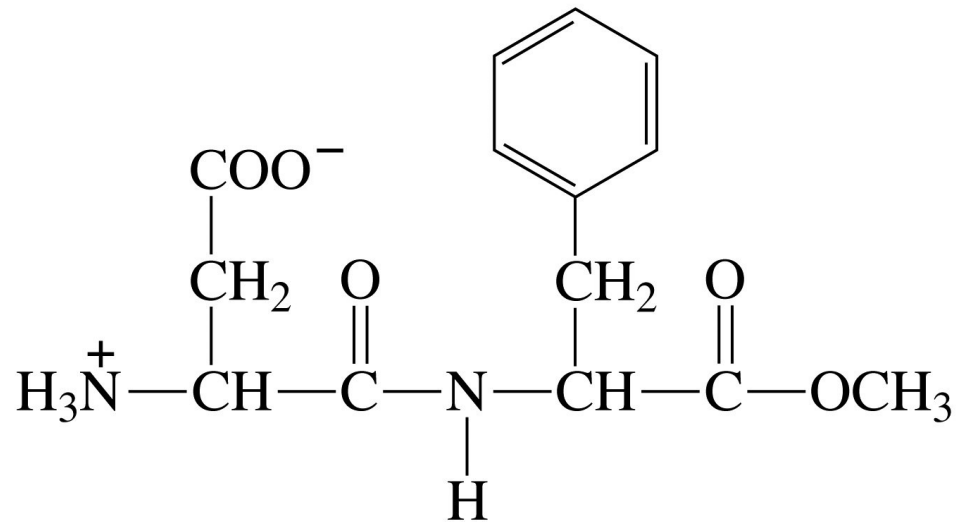


Figure 3-11b Concepts in Biochemistry, 3/e
© 2006 John Wiley & Sons

Tyr—Gly—Gly—Phe—Leu
Leucine enkephalin

Tyr—Gly—Gly—Phe—Met
Methionine enkephalin

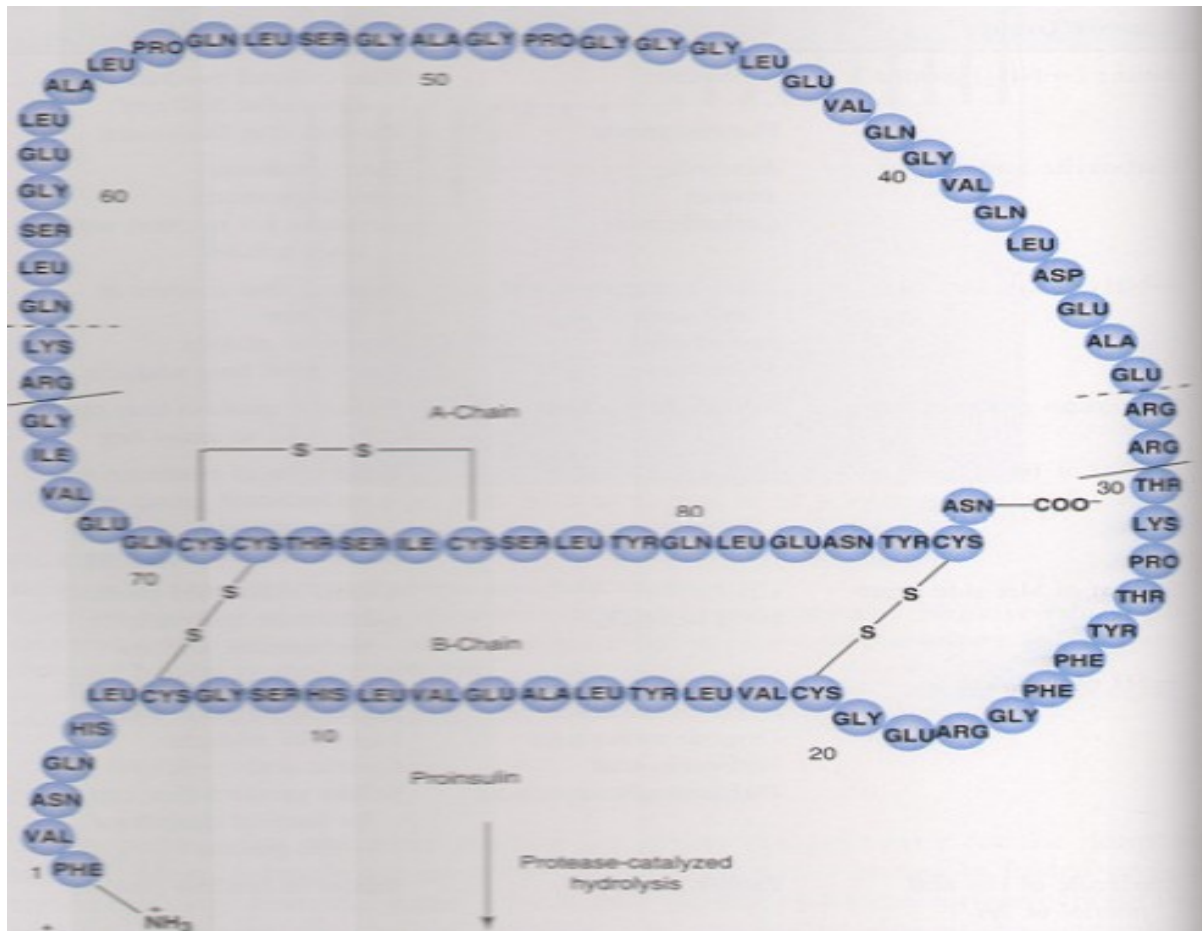
Figure 3-11e Concepts in Biochemistry, 3/e
© 2006 John Wiley & Sons



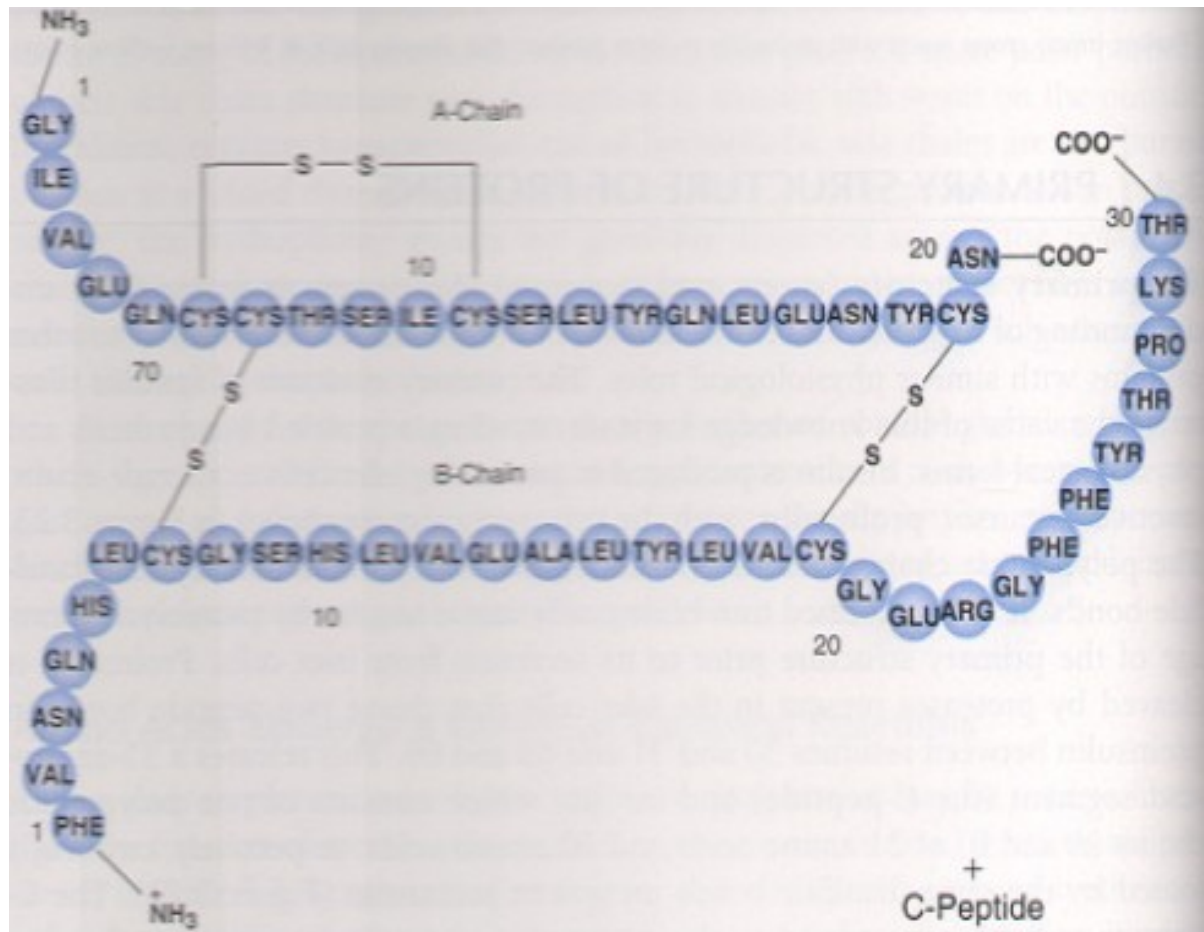
L-Aspartyl-L-phenylalanine methyl ester
(aspartame)

Figure 3-11f Concepts in Biochemistry, 3/e
© 2006 John Wiley & Sons

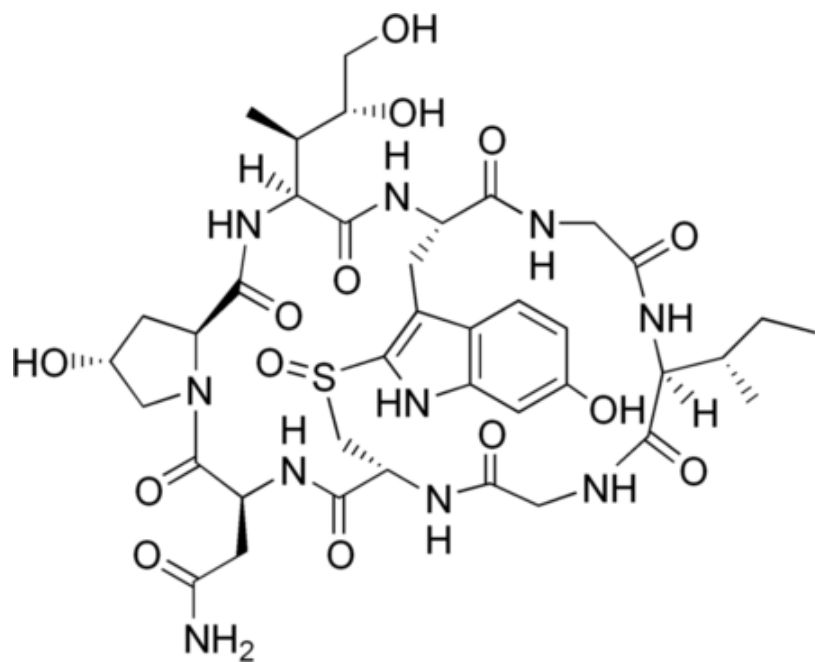
Proinzulín 84 AMK



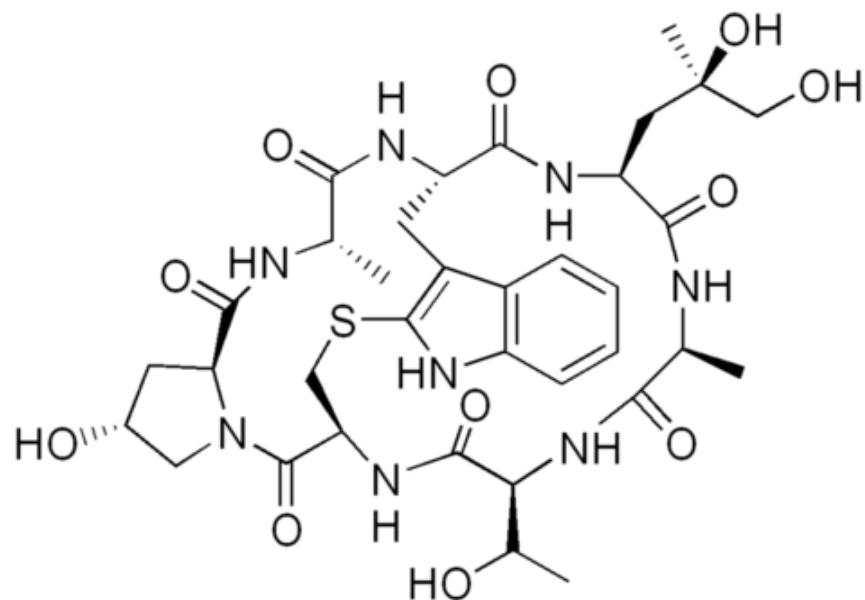
Inzulín – 51 AMK



Amanitin



Faloidin

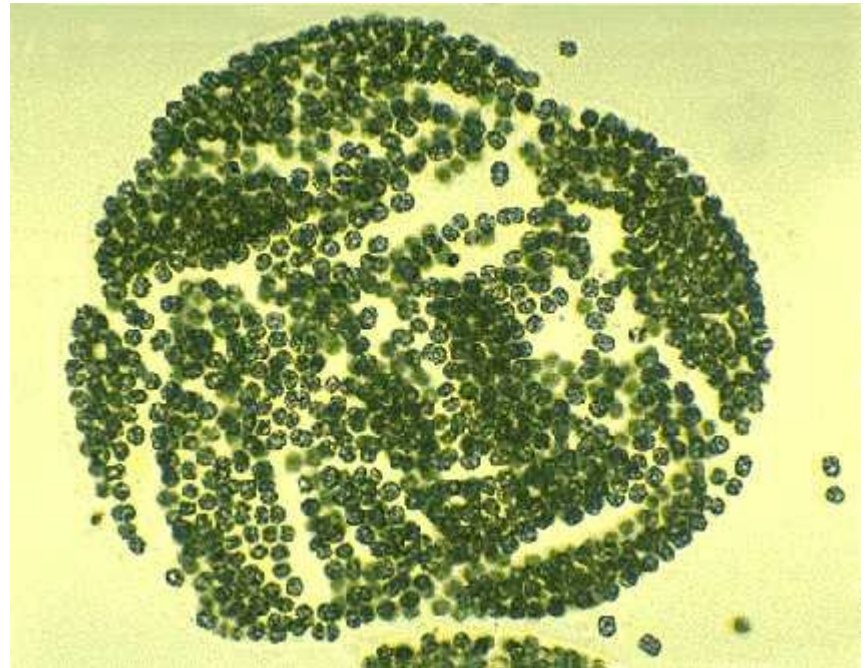


Amanita phalloides



můrka hlízovitá obsahuje několik jedovatých látek. Roku 1937 podařilo se Lynenovi a Wielandovi izolovat z ní v krystalované podobě jedovatou látku, zvanou p h a l l o i d i n. Oba badatelé zjistili, že $\frac{1}{10}$ miligramu této látky usmrtí myš ve 12 hodinách. V roce 1941 izolovali Wieland a Hallermayer hlavní jed muchomůrky hlízovité, tzv. a m a n i t i n, který je tak prudce jedovatý, že jedna dvousetina miligramu

Microcystiny



Microcystiny

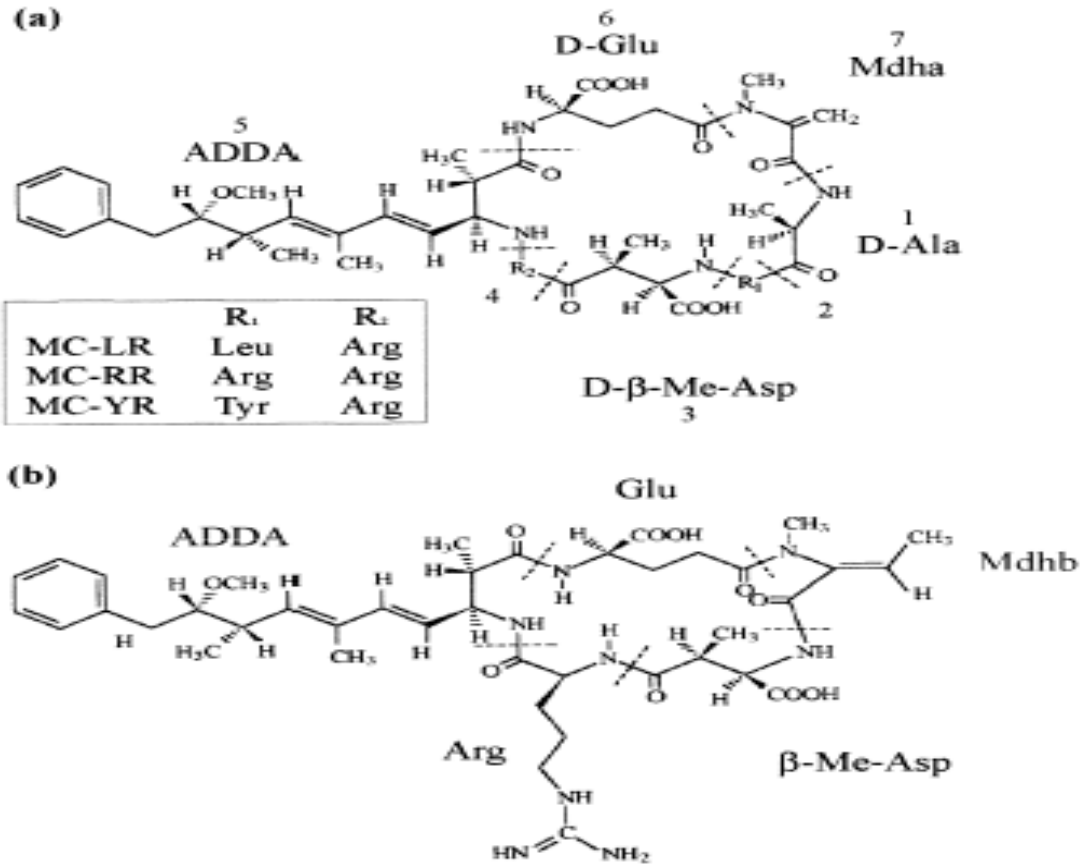


Fig. 1. General chemical structure of (a) microcystins and (b) nodularins.

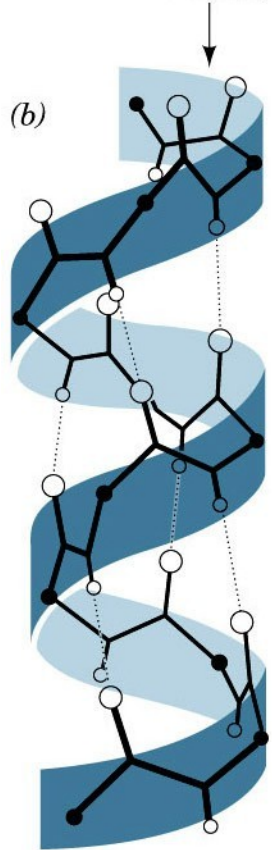
BÍLKOVINY :

Struktura bílkovin

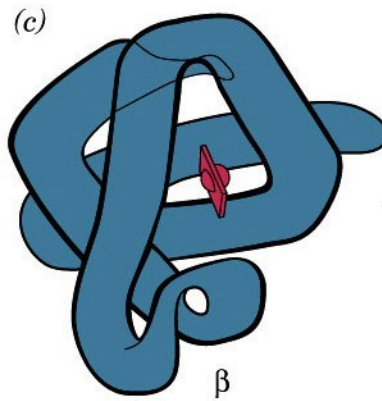
1. primární - sekvence aminokyselin
2. sekundární - uspořádání polypeptidického řetězce
3. terciální - uspořádání polypeptidického řetězce s vedlejšími řetězci
4. kvartetní struktura - podjednotkové složení

sekundární, terciální, kvartetní struktura \Rightarrow konformace

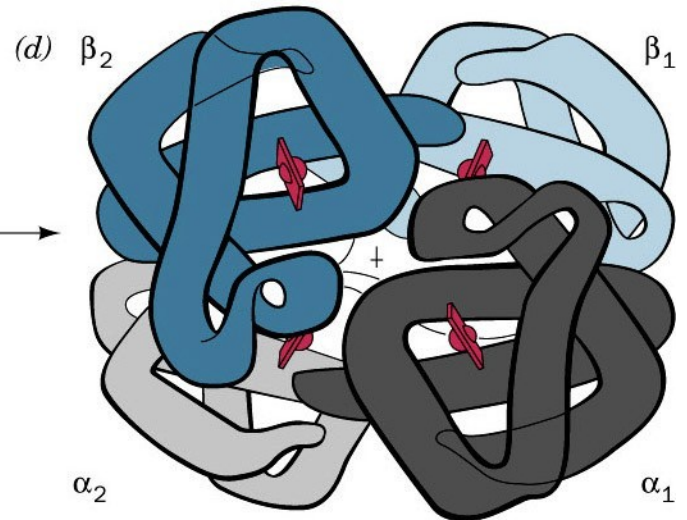
(a) – Lys – Ala – His – Gly – Lys – Lys – Val – Leu – Gly – Ala –
Primary structure (amino acid sequence in a polypeptide chain)



Secondary structure (helix)



Tertiary structure:
one complete protein chain
(β chain of hemoglobin)



Quaternary structure:
the four separate chains
of hemoglobin assembled
into an oligomeric protein

Aminokyselinová analýza

1. Izolace homogenní bílkoviny
2. Úplná hydrolýza - kyselá - 6 M HCl, 100 - 120 °C, 10 - 100 hod.
 - bazická - 2 - 4 M NaOH, 100 °C, 4 - 8 hod.
 - enzymová - Pronasa
3. Aminokyselinová analýza -RP, IEX

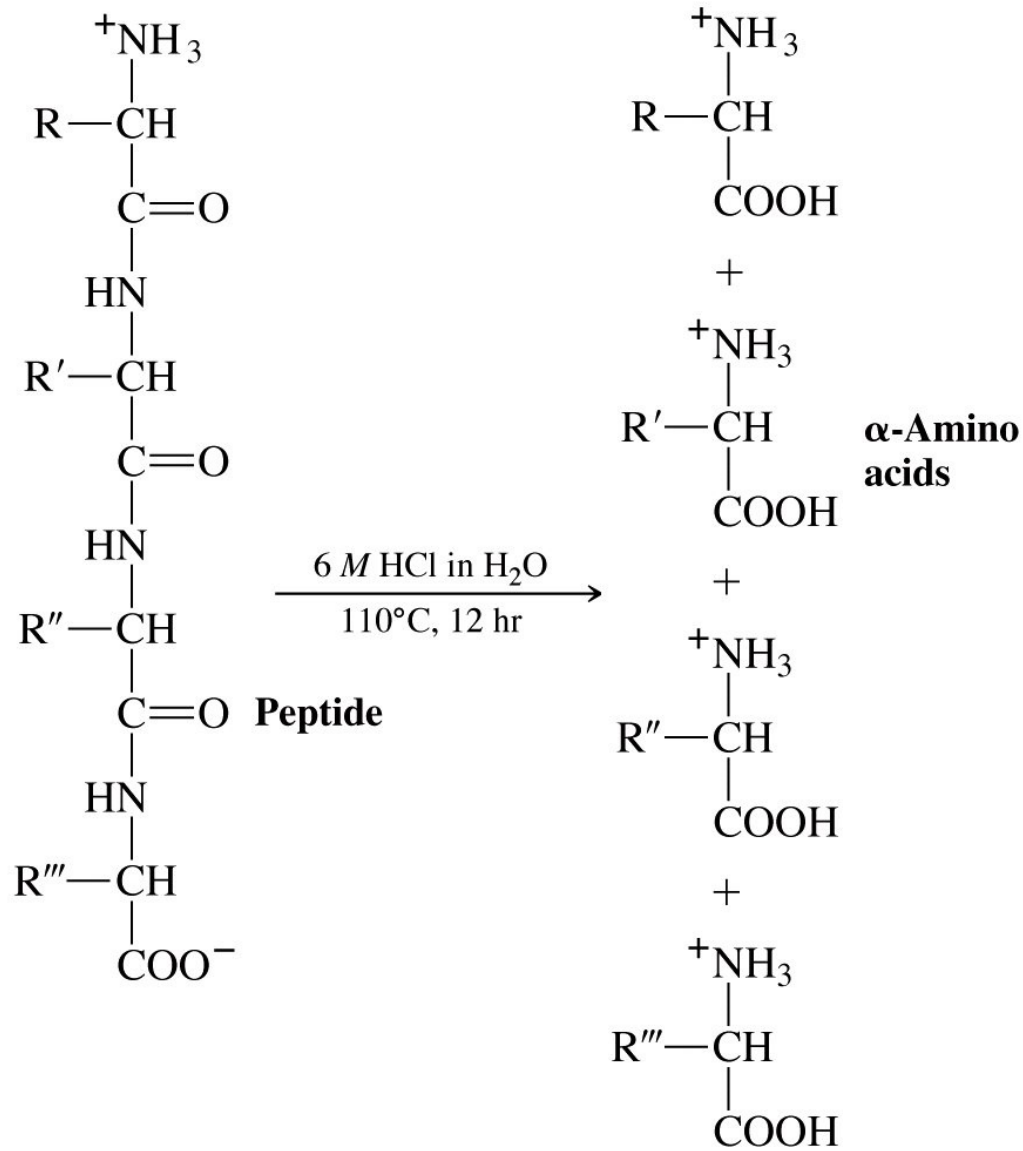
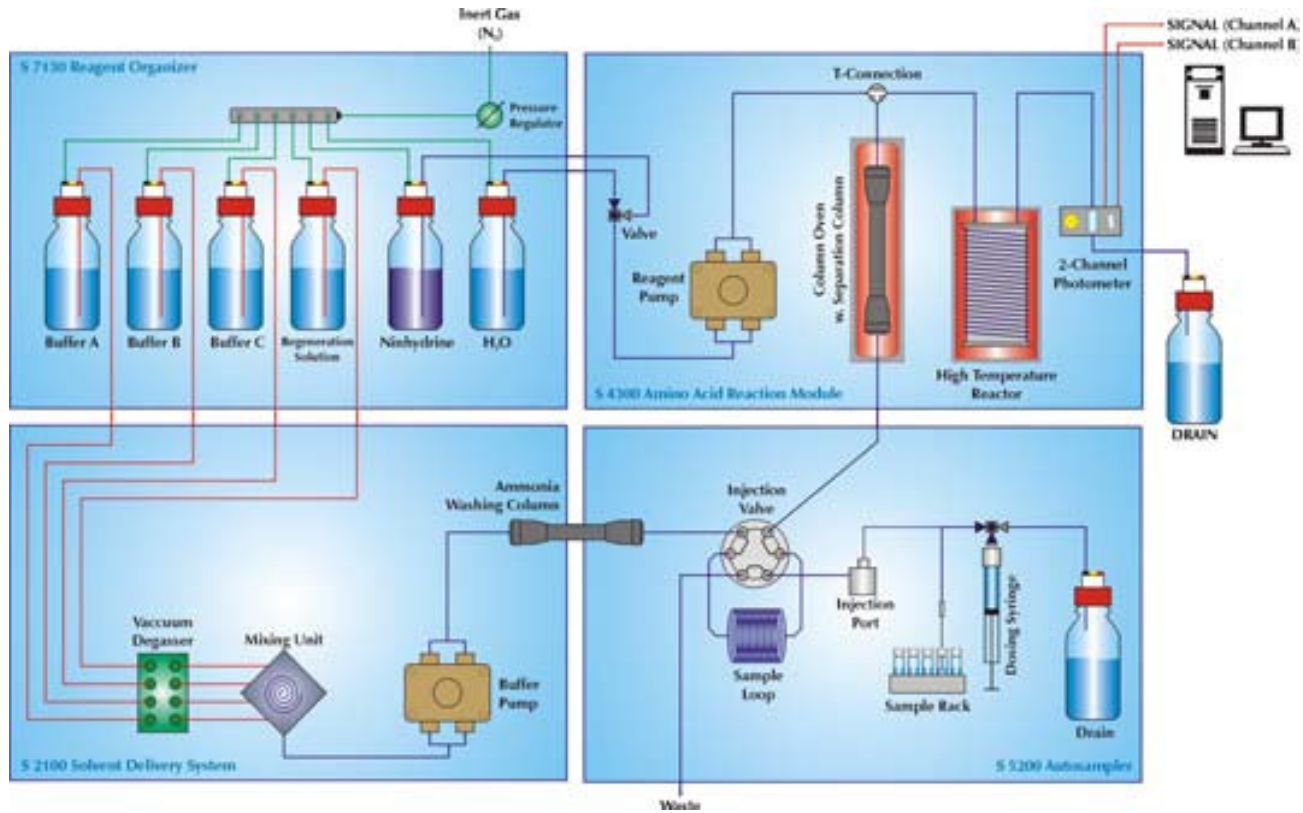


Figure 3-15 Concepts in Biochemistry, 3/e
 © 2006 John Wiley & Sons

AMK analyzátor



AMK analyzátor



Primární struktura

1953 - Sanger - inzulín (51 AMK), 100 g materiálu, 10 let

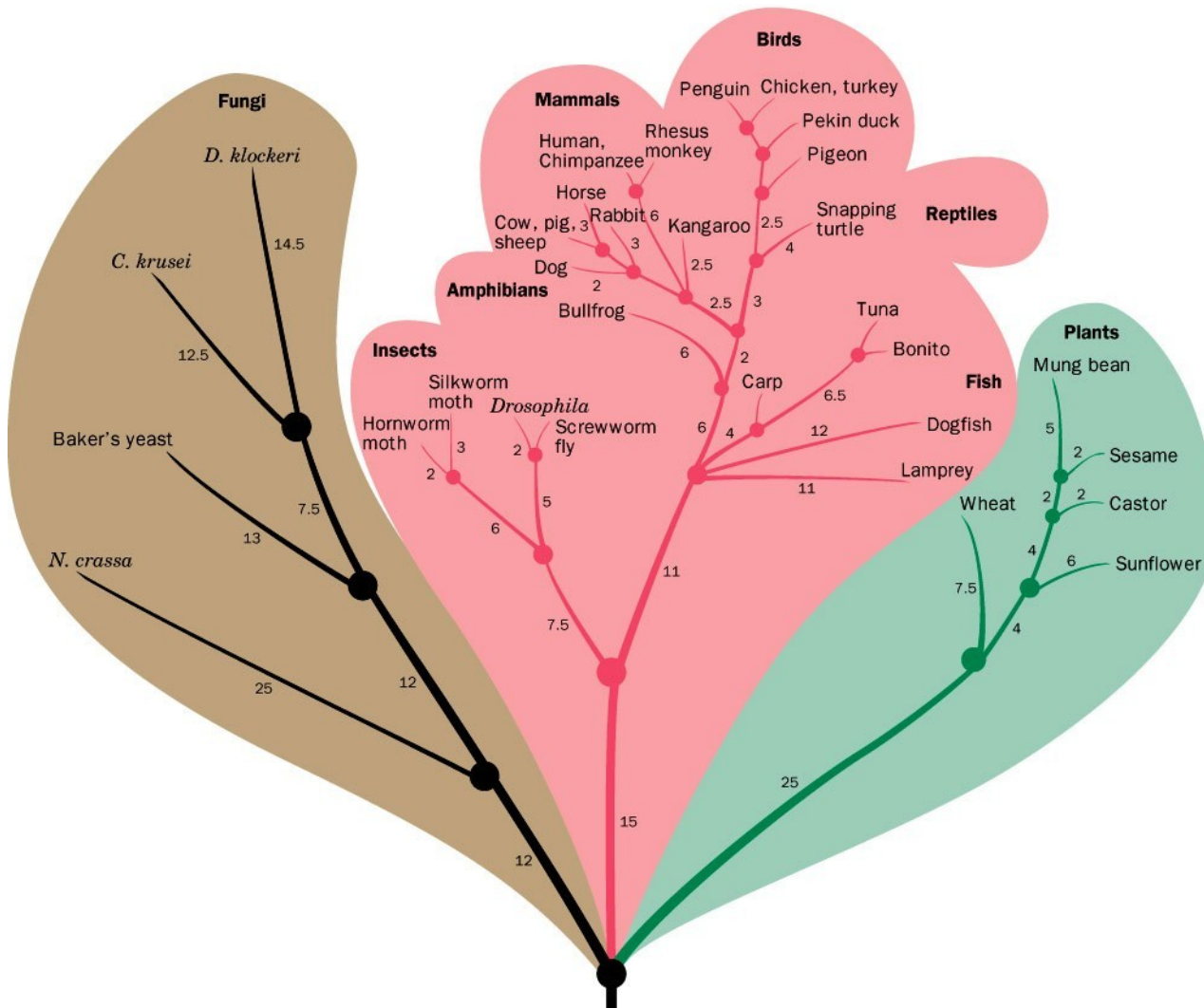
⇒ aminokyselinový sekvenátor

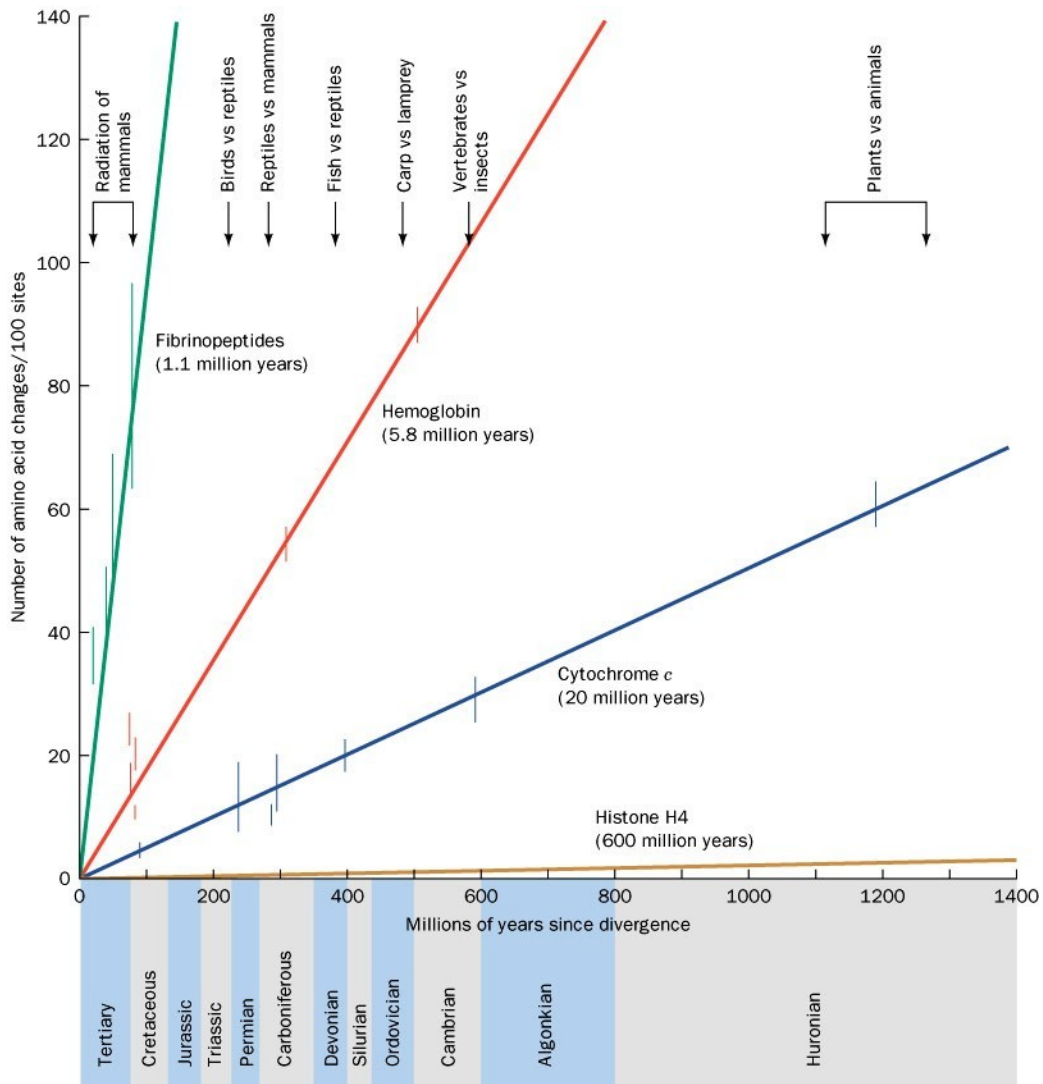
1978 - β -galaktosidasa (1028 AMK), μg materiálu, dny

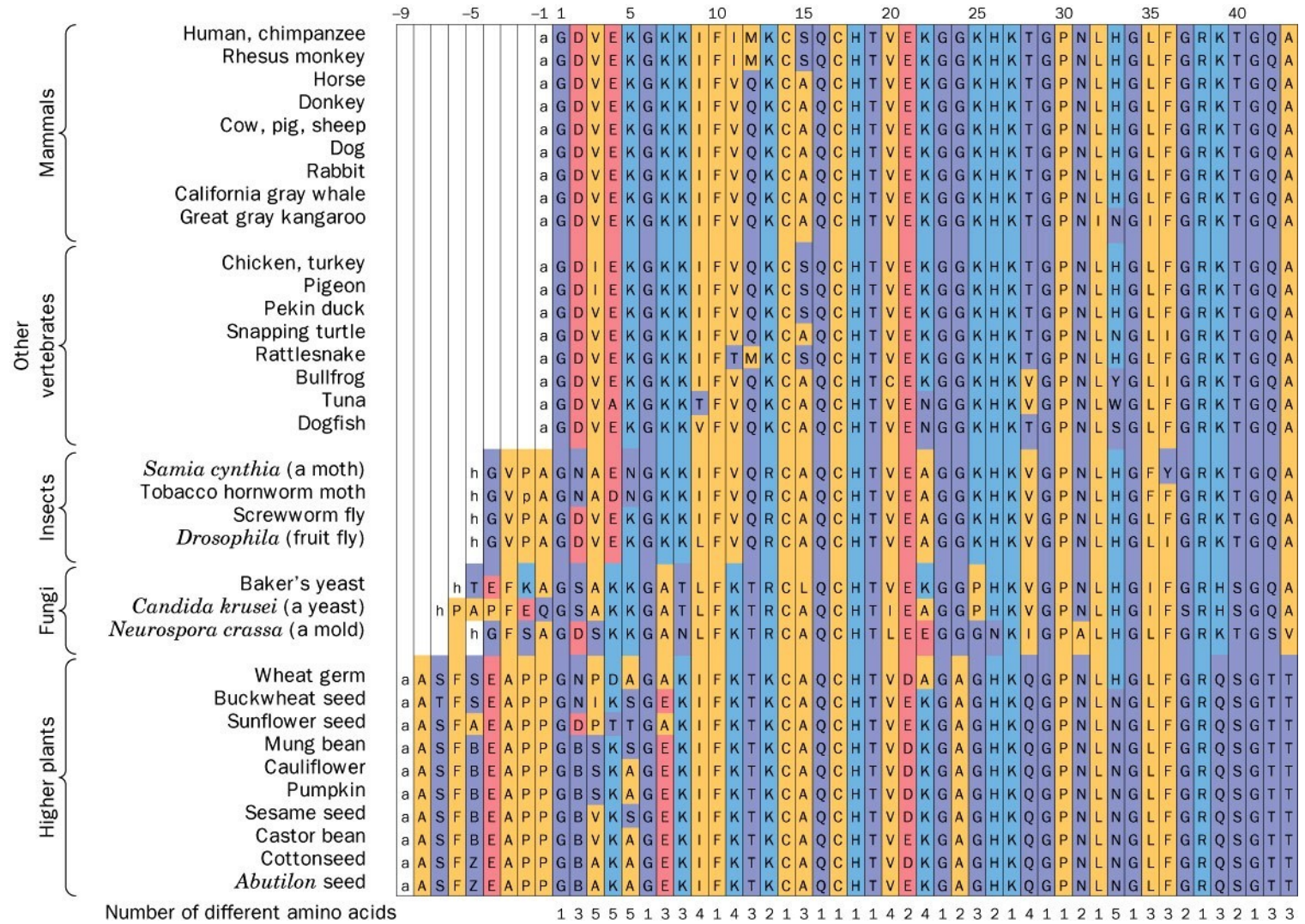
--

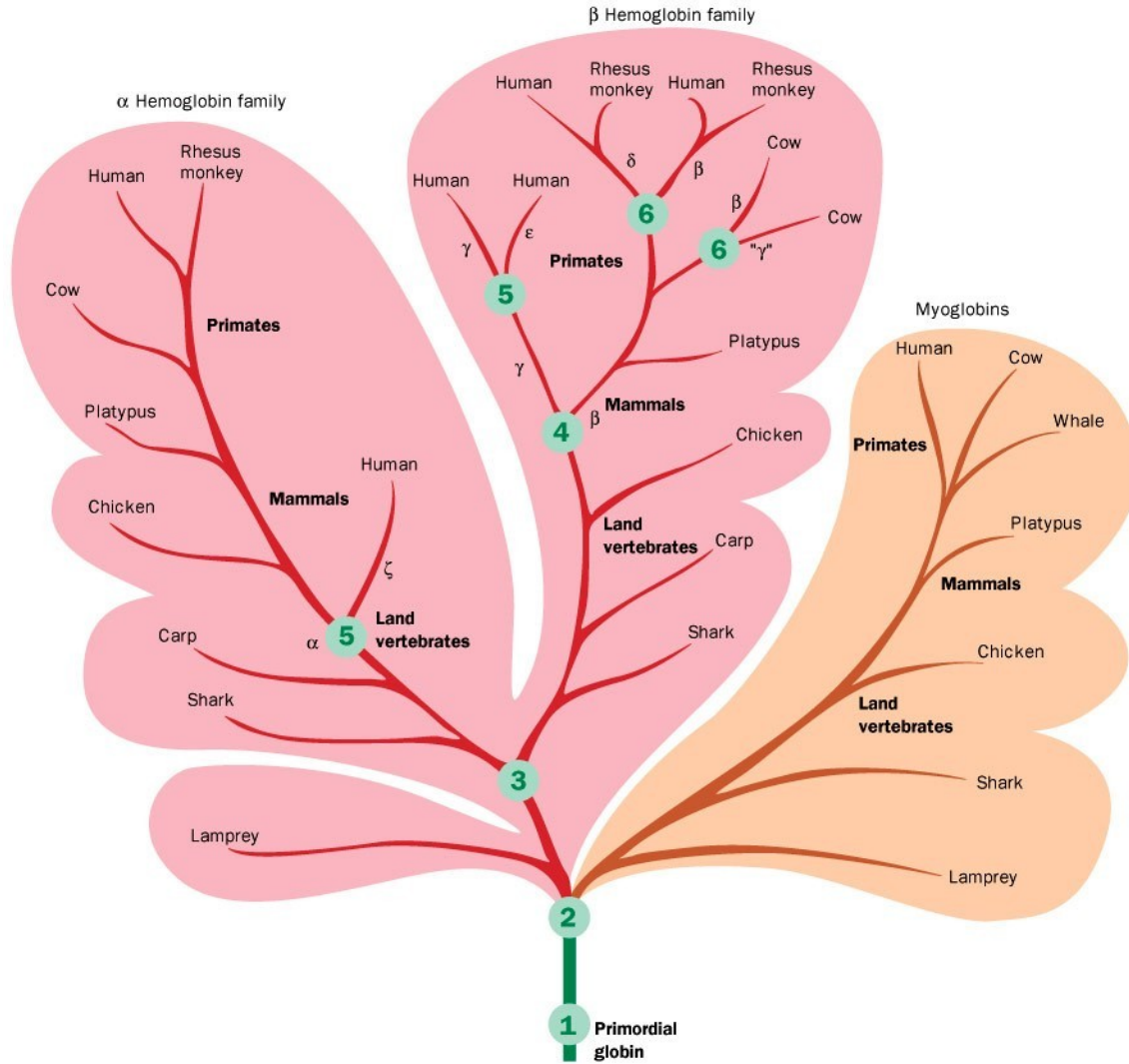
Stanovení sekvence - Edmanovo odbourávání

na základě sekvence nukleových kyselin

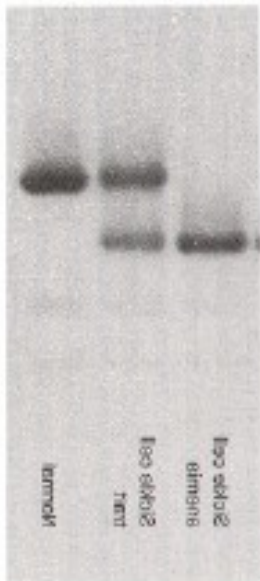








Srpkovitá anémie

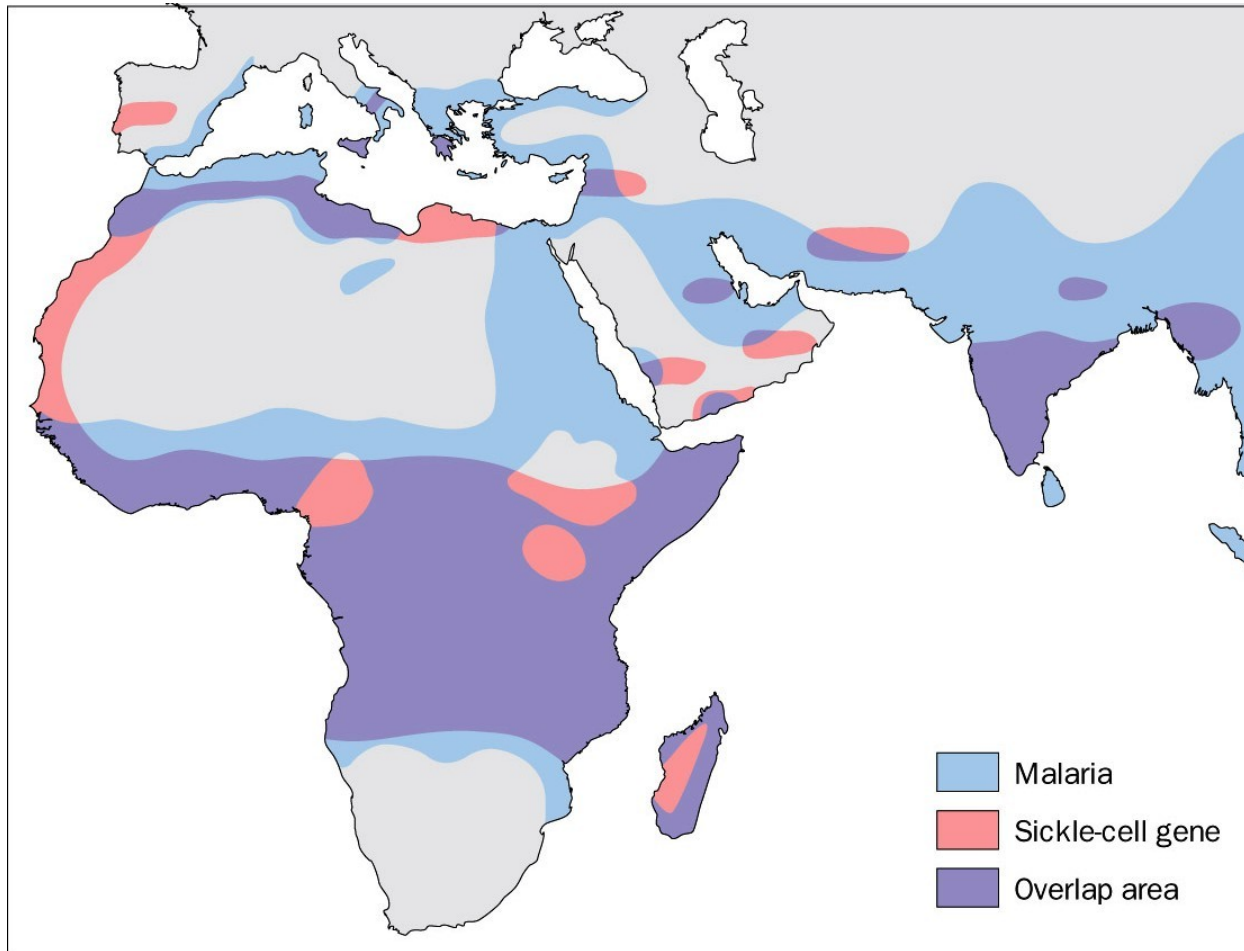


(a)



(b)

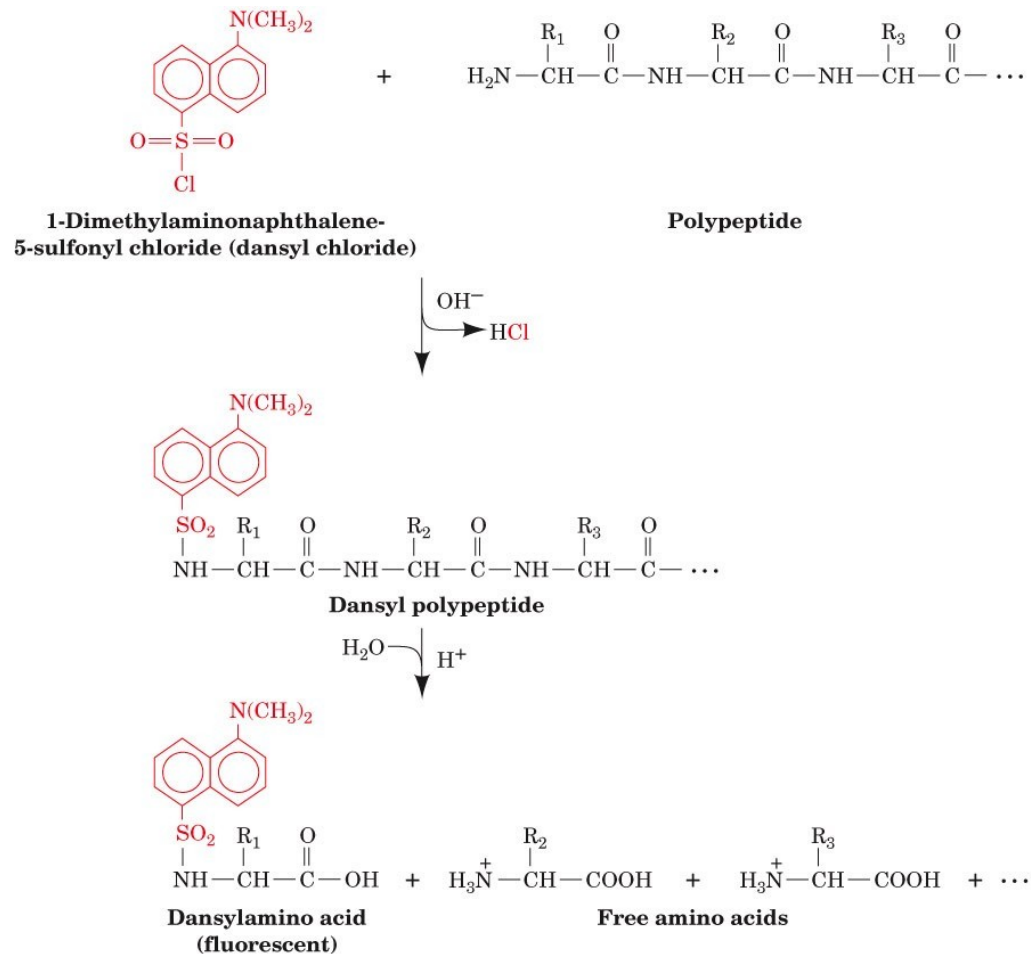
Srpkovitá anémie versus malárie



URČOVÁNÍ PRIMÁRNÍ STRUKTURY

- A. Purifikace bílkoviny – získání homogenn
- B. Aminokyselinové složení – určení počtu jednotlivých AMK zbytků (kyselá hydrolyza 6N HCl, 100 –110 °C, 24 h)
- C. Pořadí aminokyselin:
 1. Oddělit a izolovat jednotlivé řetězce(redukce nebo oxidace disulfidických můstků)
 2. Určit N-konec a C-konec
 3. Určit pořadí aminokyselin Edmanovým odbouráváním(kam až to jde)
 4. 2 nezávislá specifická štěpení → izolovat štěpy (peptidy)
 5. Opakovat bod 3.
 6. Sestavit primární strukturu řetězce
 7. Určit způsob propojení původních řetězců

Zjišťování N-koncových AMK



Možnosti štěpení

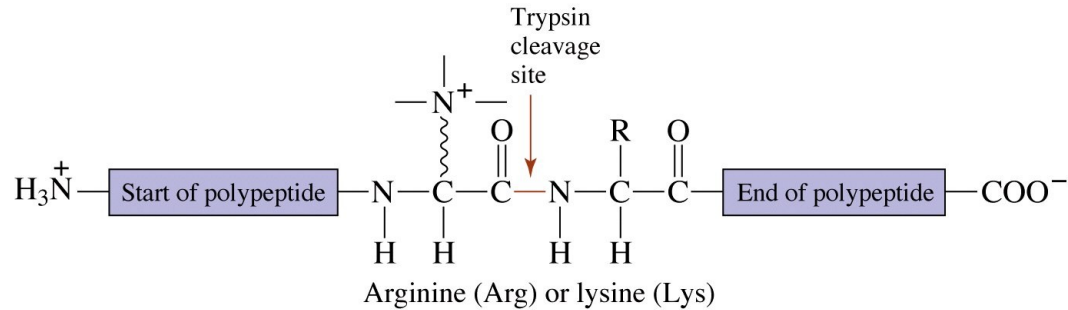


Figure 3-17a Concepts in Biochemistry, 3/e
© 2006 John Wiley & Sons

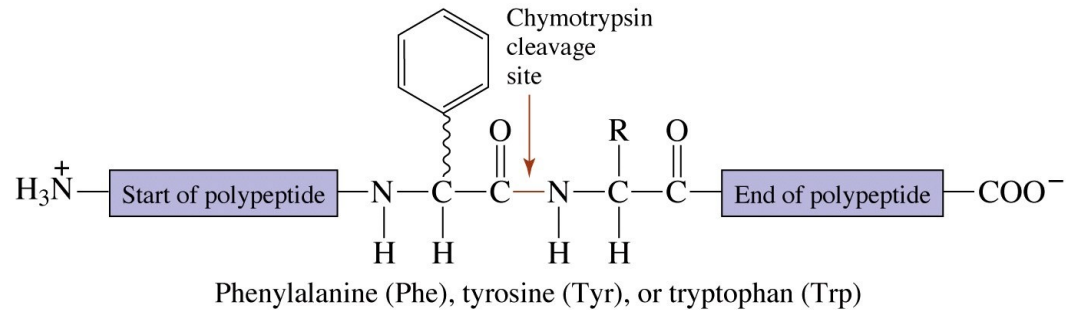


Figure 3-17b Concepts in Biochemistry, 3/e
© 2006 John Wiley & Sons

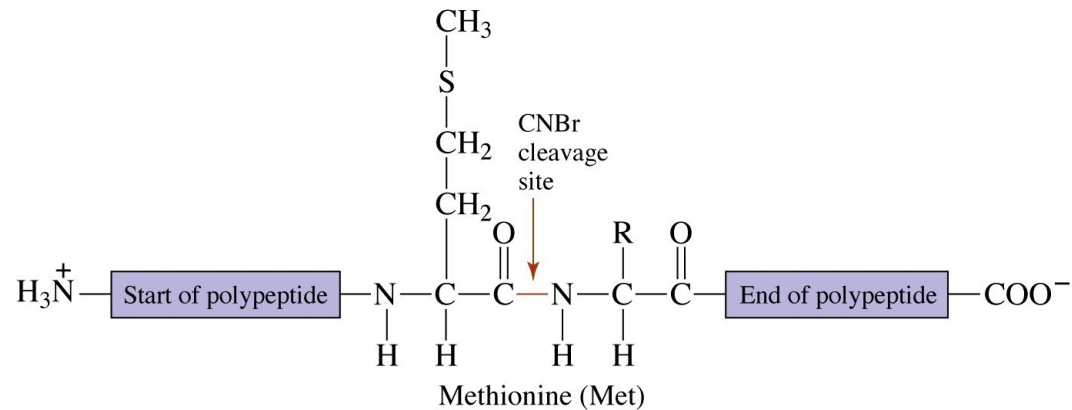
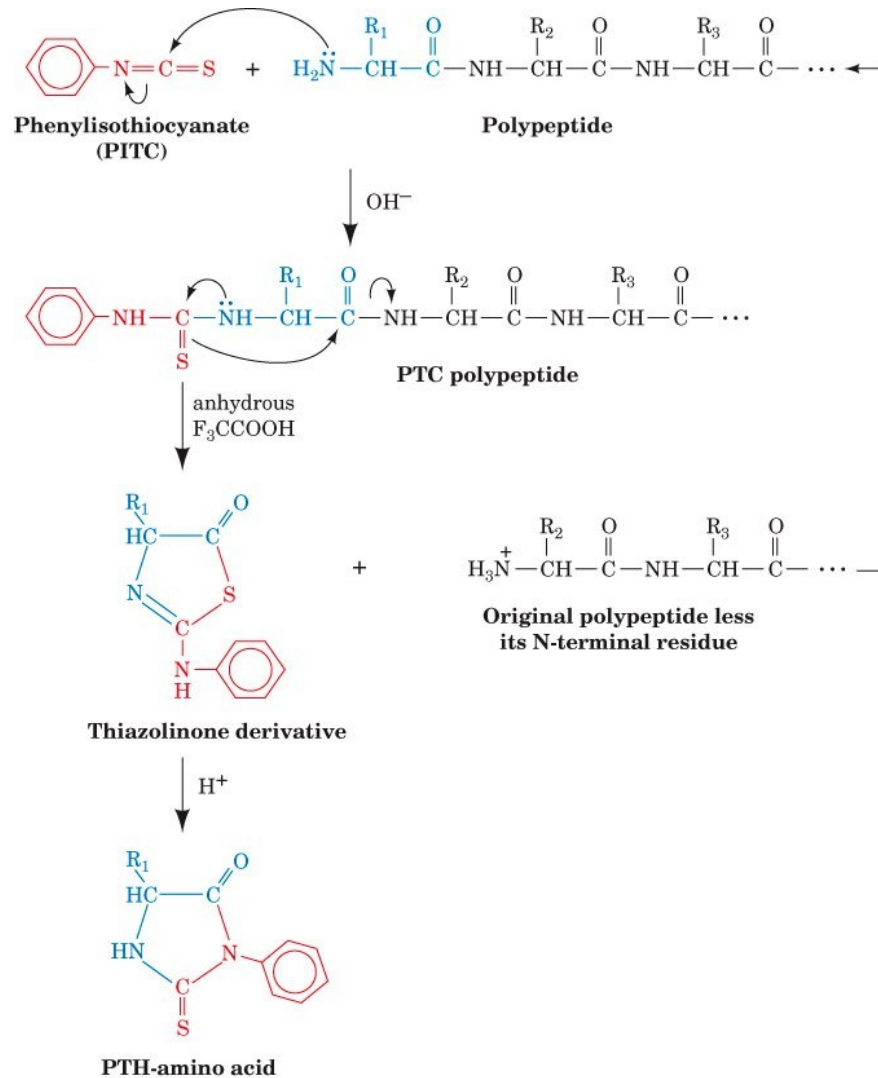
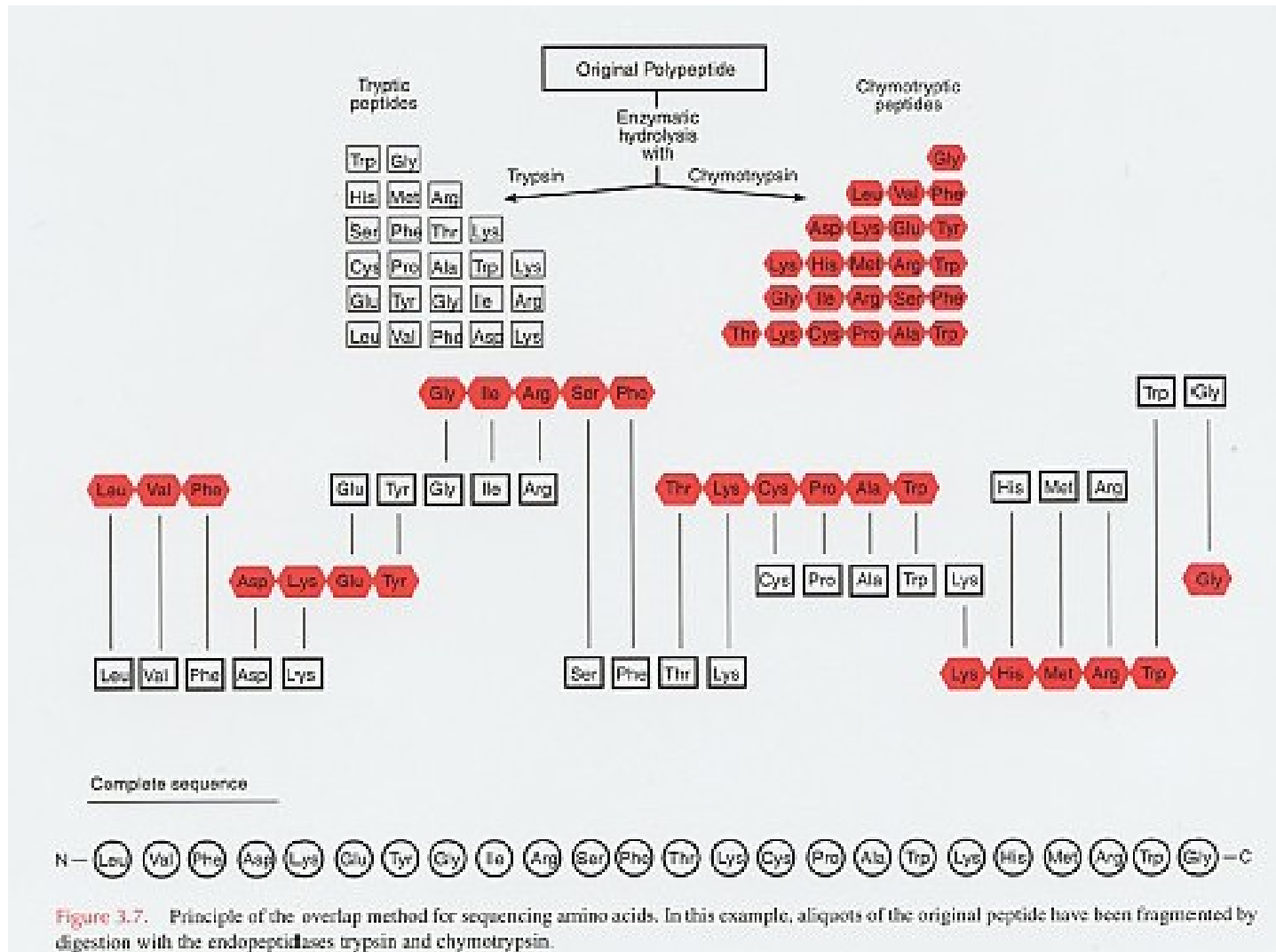


Figure 3-17c Concepts in Biochemistry, 3/e
© 2006 John Wiley & Sons

Edmanovo sekvenování

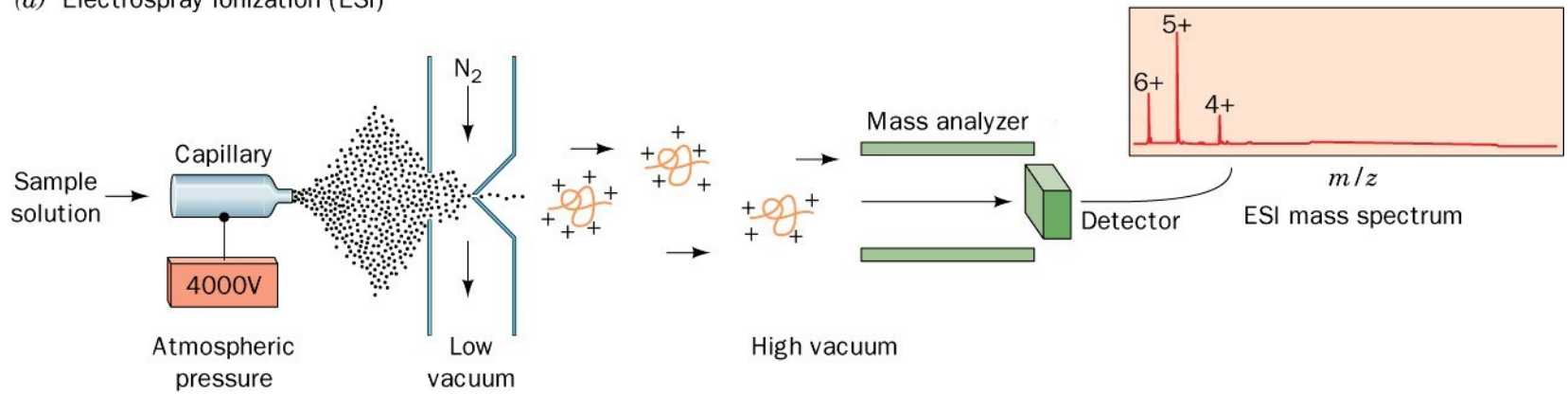


Metoda překrývajících se štěpů

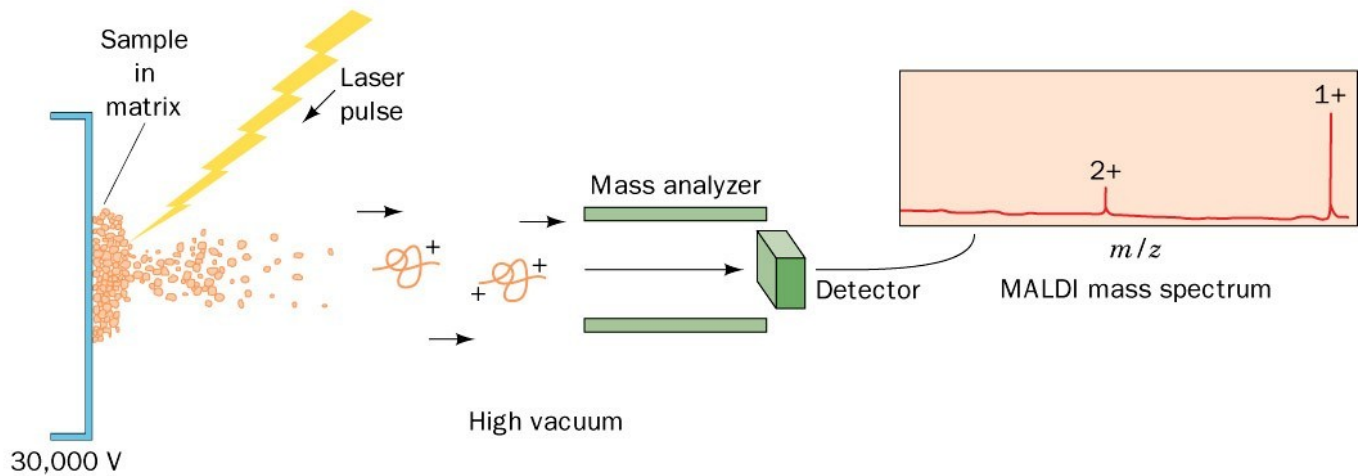


MS

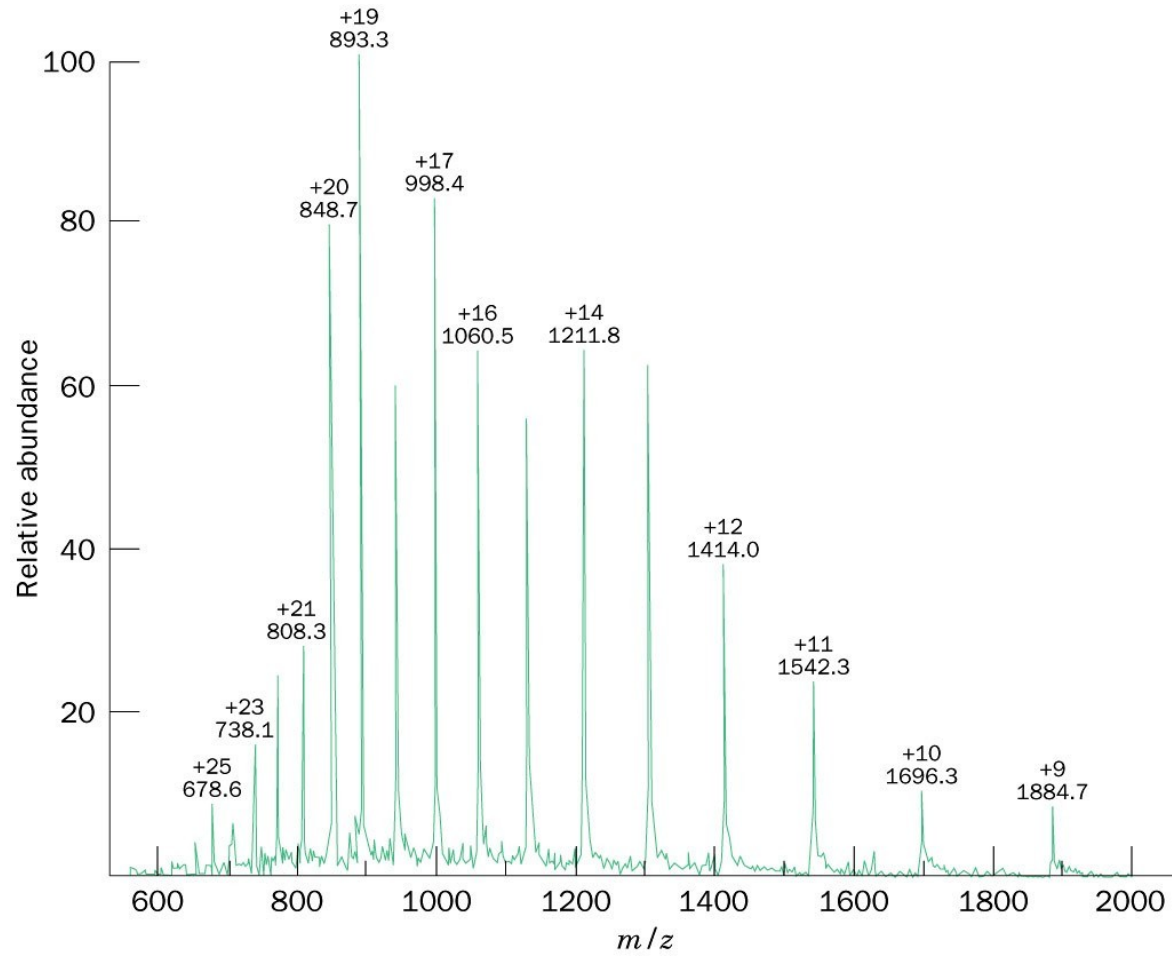
(a) Electrospray ionization (ESI)



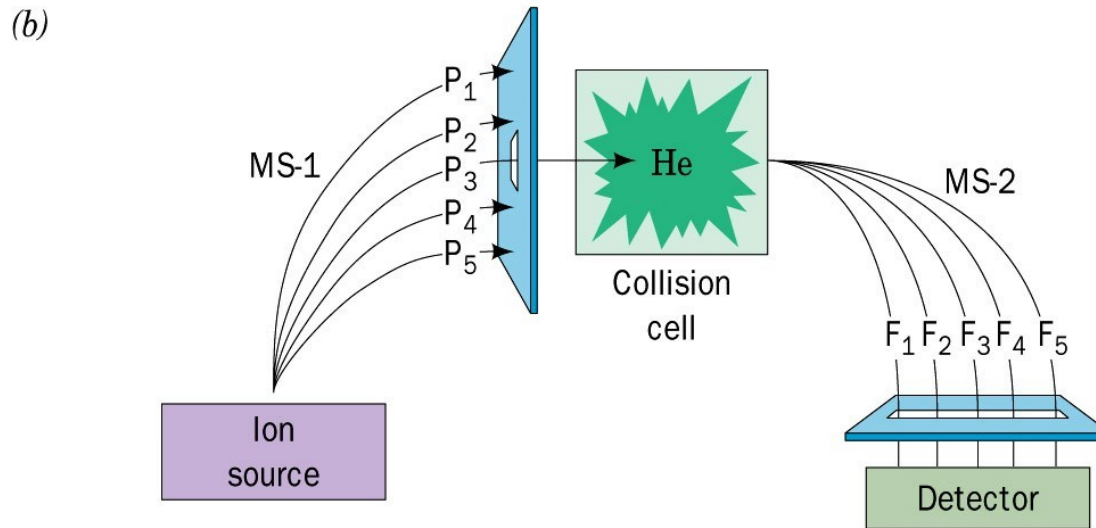
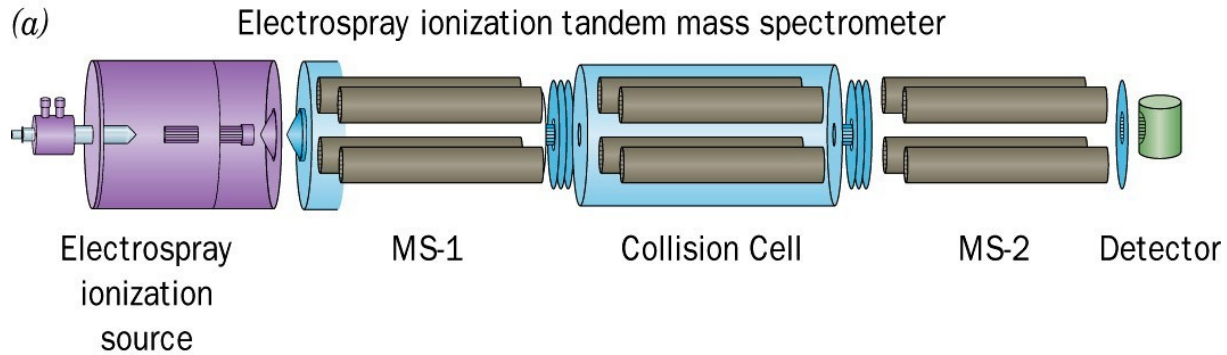
(b) Matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI)



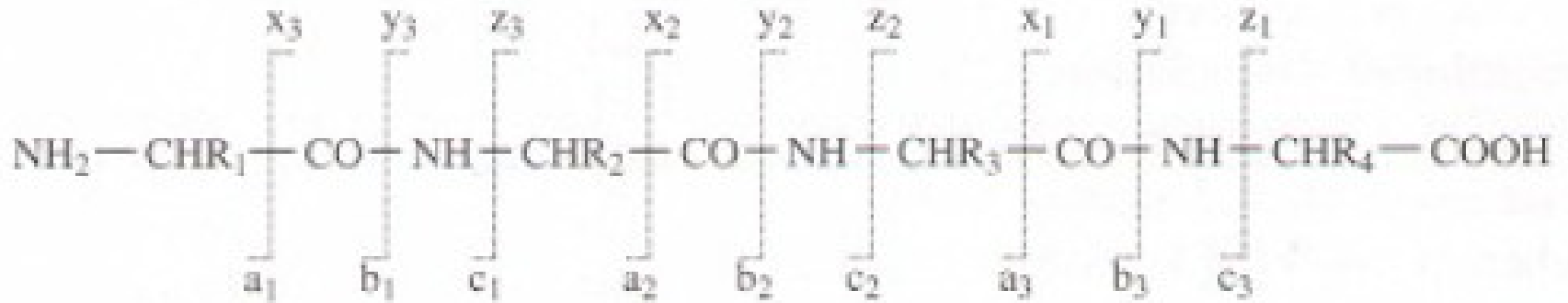
MS



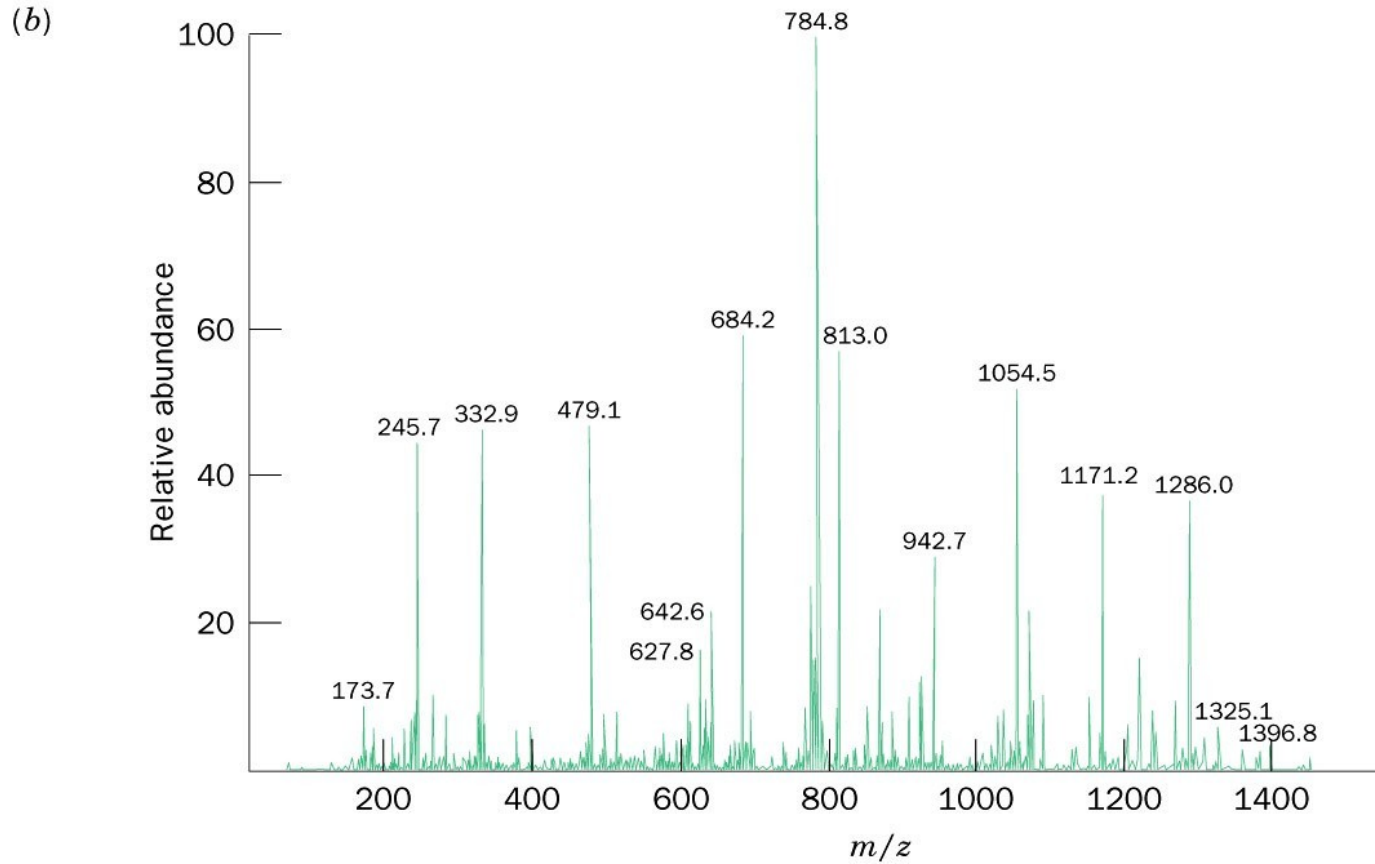
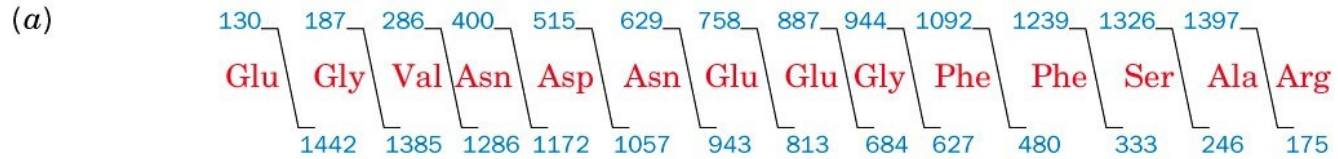
MS-MS



MS-MS



MS-MS

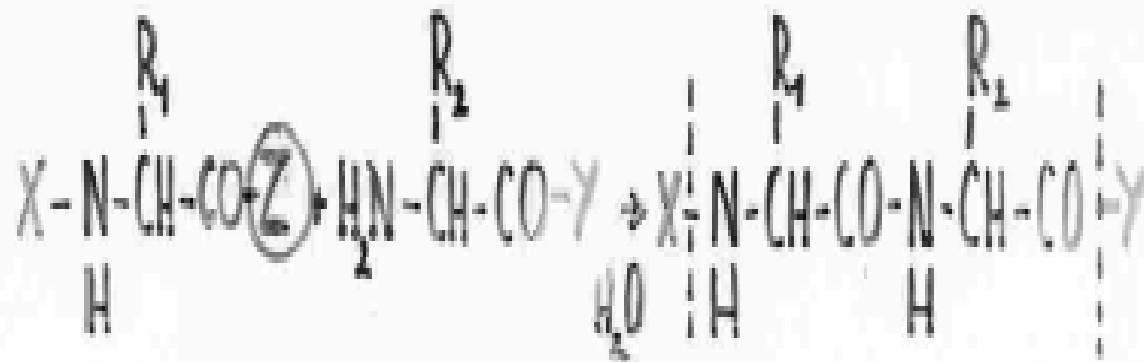


Syntéza peptidů

1953 - oxytosin (9 AMK) DE VIGNEAND

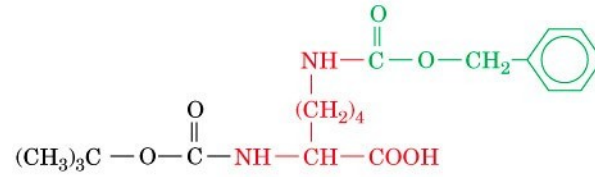
1962 - syntéza na pevné fázi - MERRIFIELD

SYNTÉZA PEPTIDŮ

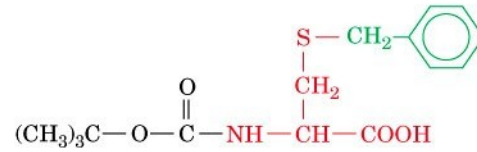


X, Y = chránicí skupiny

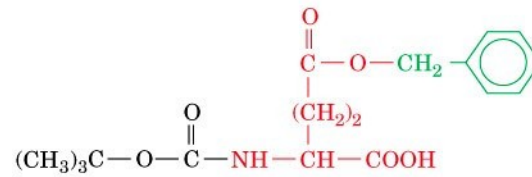
Z = aktivace karboxylu: $-Cl$, $-N_3$, $-O-C_6H_4-NO_2$



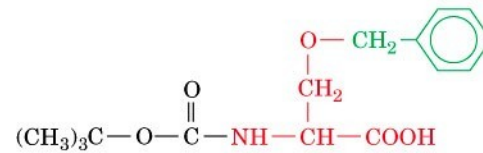
Boc, *N*^ε-benzyloxycarbonyl-Lys



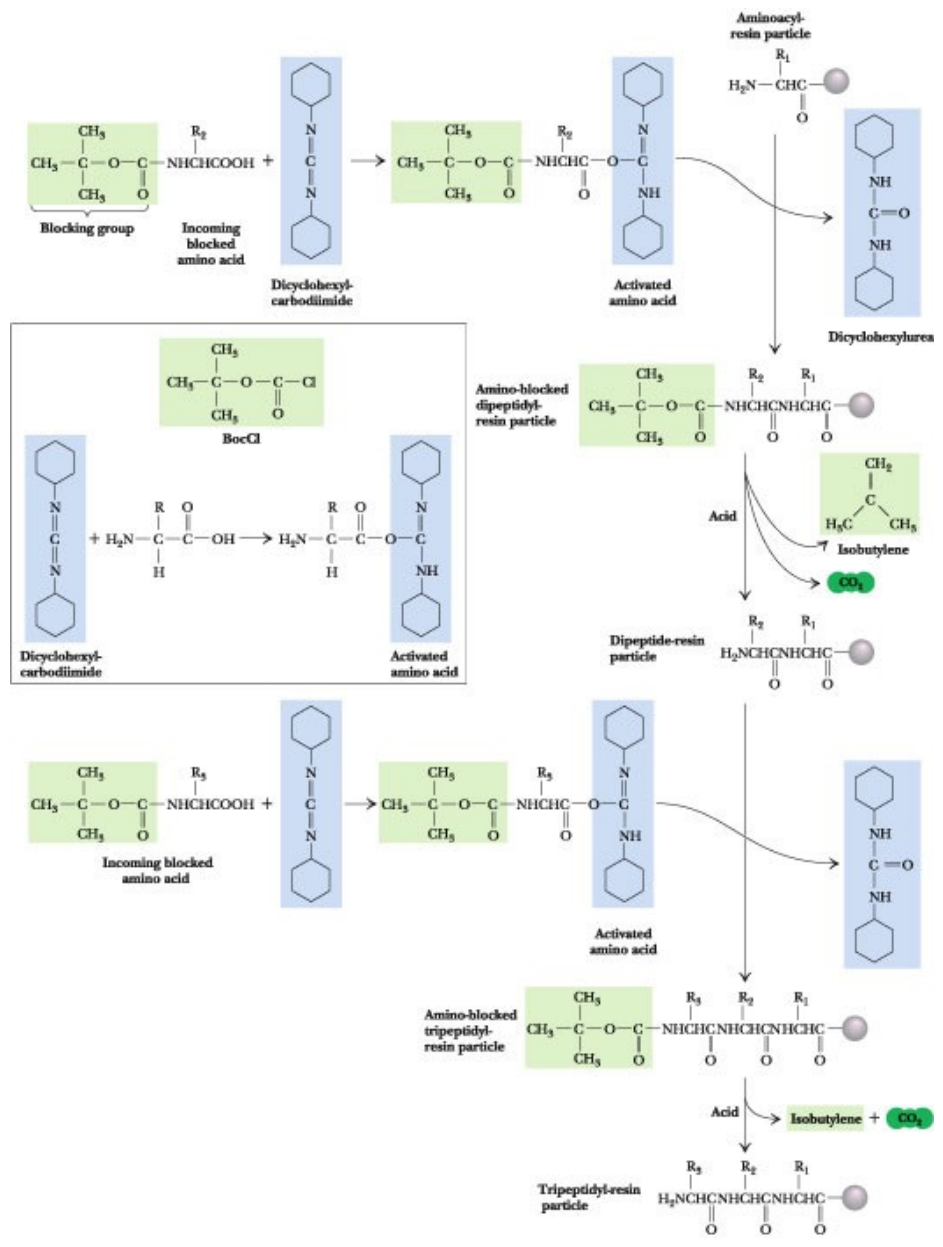
Boc, *S*-benzyl-Cys



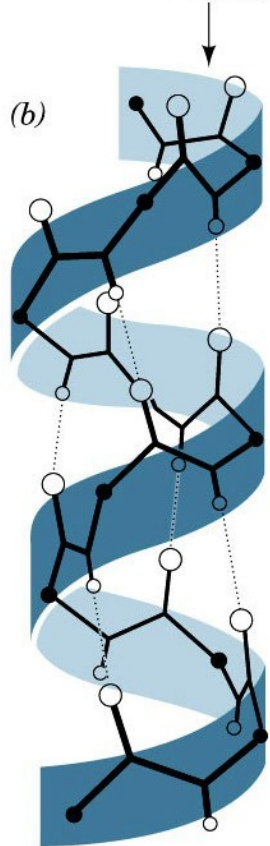
Boc-Glu, *γ*-Benzyl ester



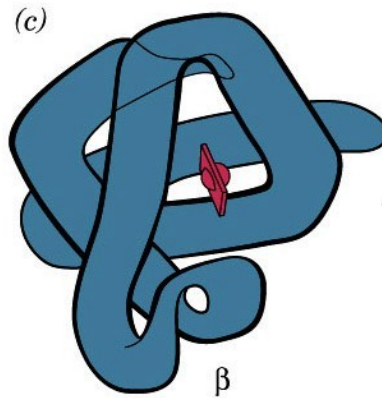
Boc, *O*-benzyl-Ser



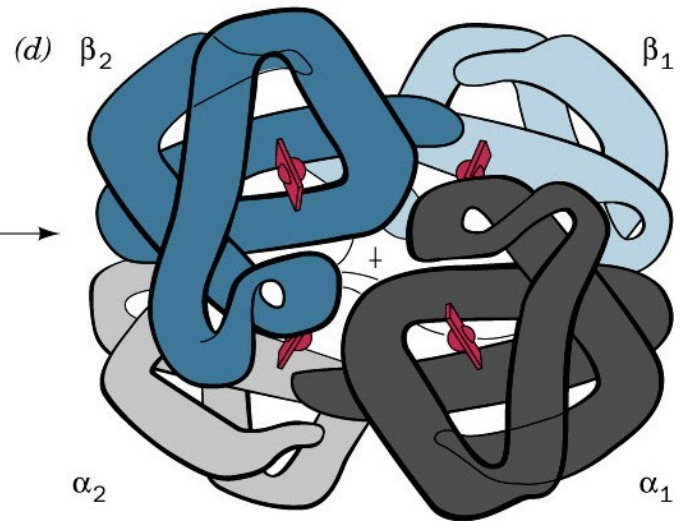
(a) – Lys – Ala – His – Gly – Lys – Lys – Val – Leu – Gly – Ala –
Primary structure (amino acid sequence in a polypeptide chain)



Secondary structure (helix)



Tertiary structure:
one complete protein chain
(β chain of hemoglobin)



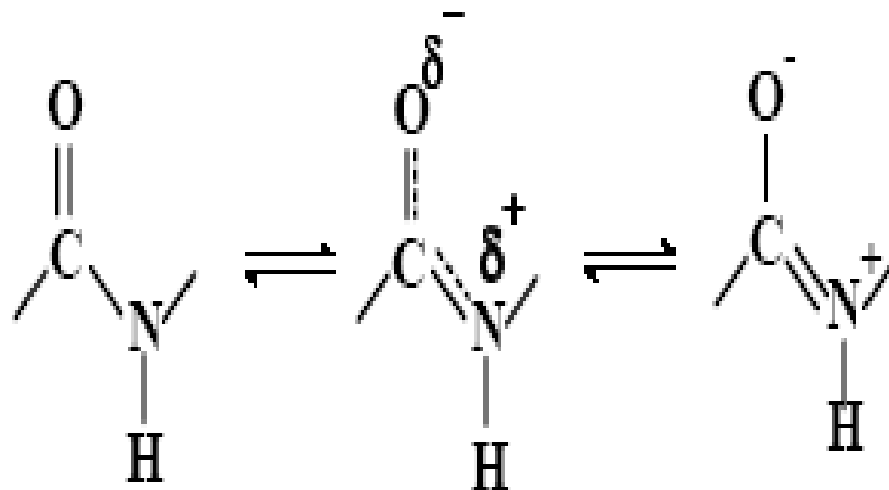
Quaternary structure:
the four separate chains
of hemoglobin assembled
into an oligomeric protein

Sekundární struktura

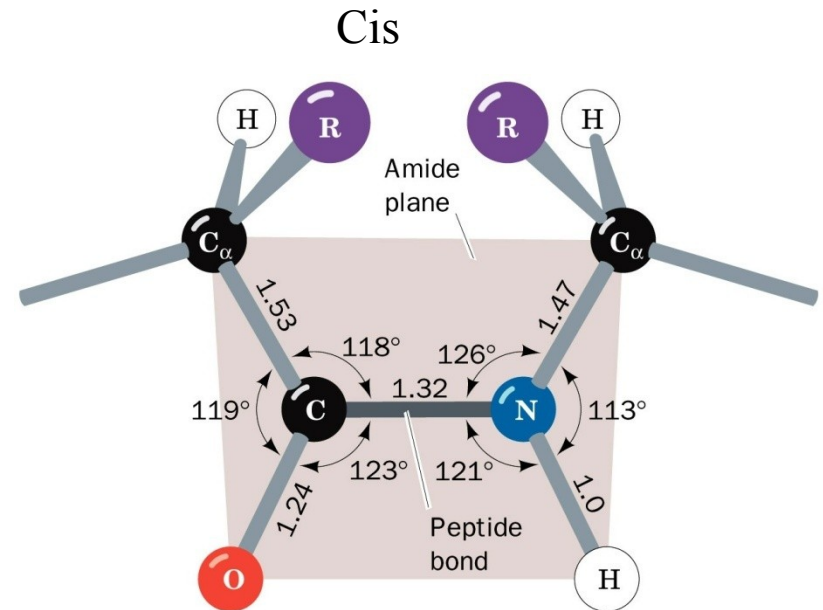
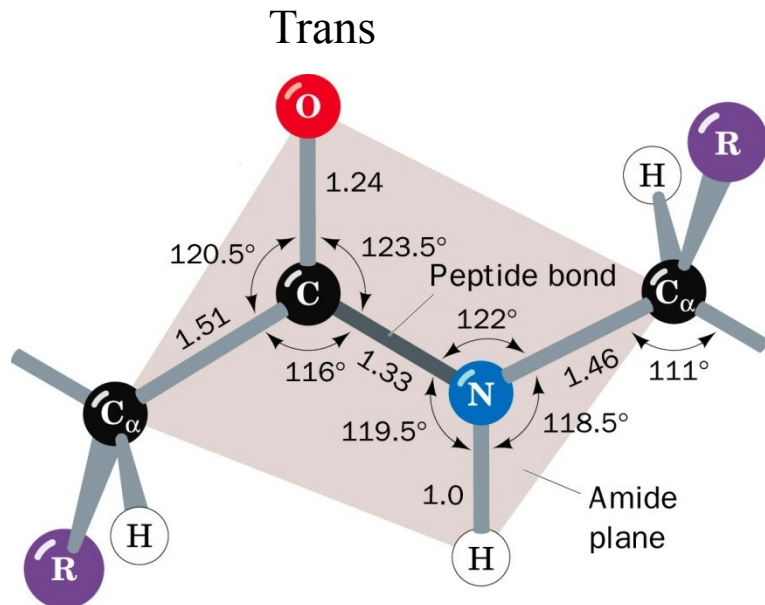
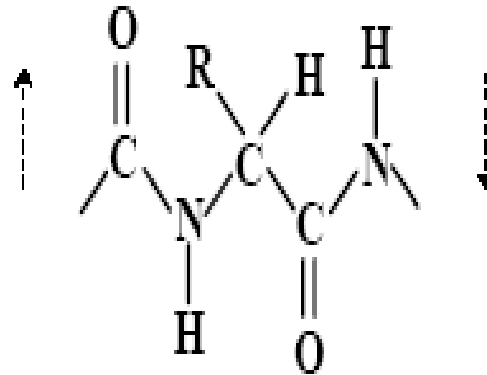
peptidická vazba - PAULING a COREY

30 až 40.léta

A. Peptidická vazba leží v rovině

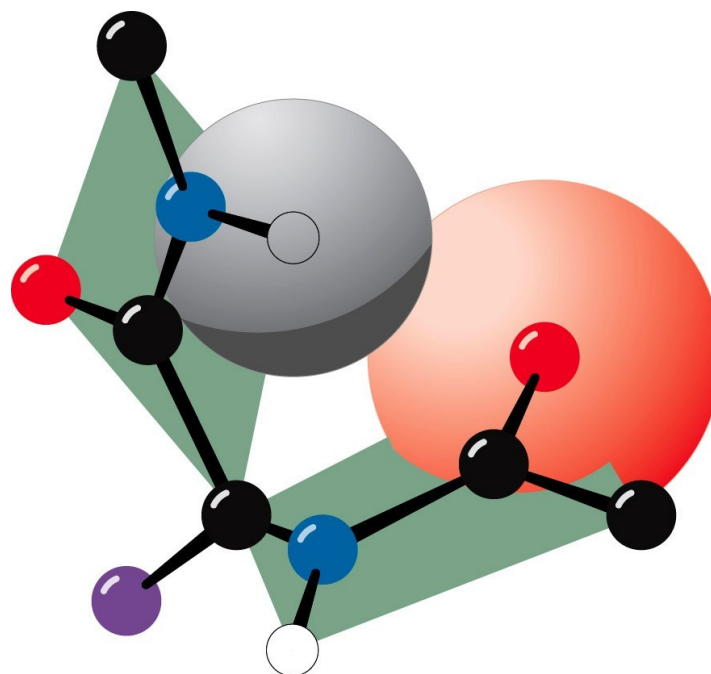
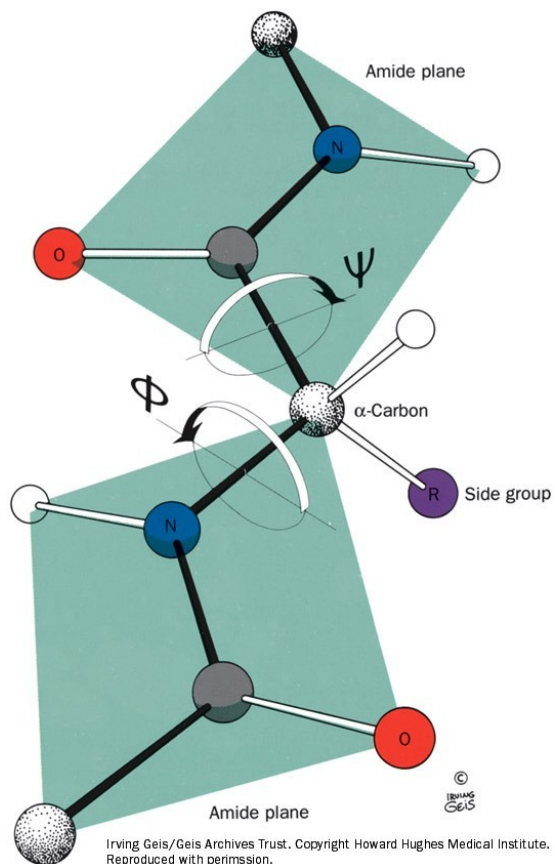
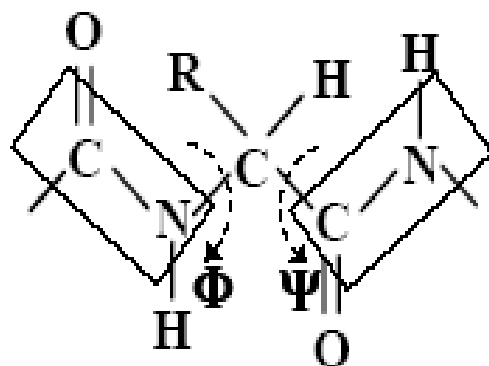


B. Peptidické vazby jsou v trans konfiguraci

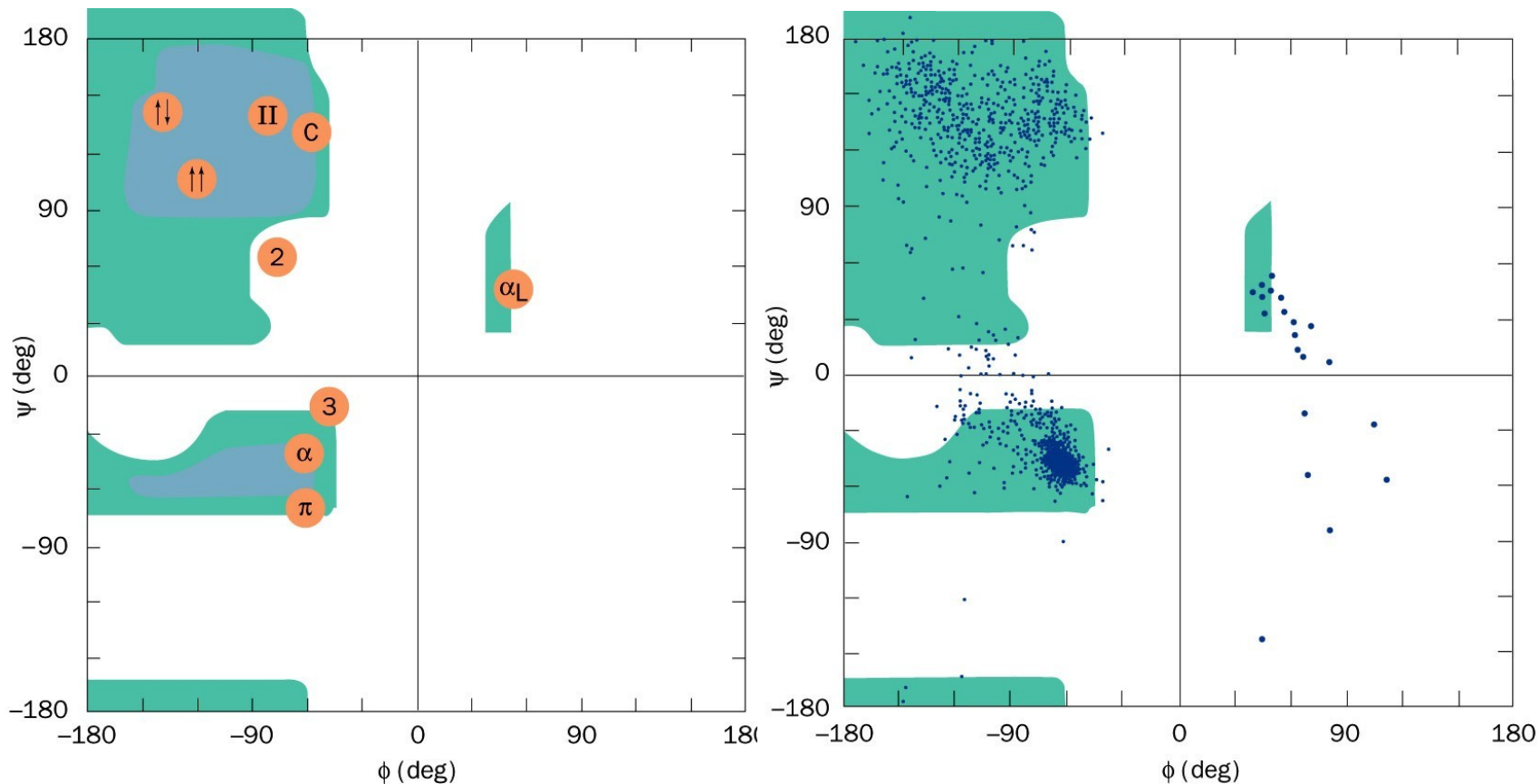


C.Peptidické vazby ležící v rovině mohou svírat určité torzní uhly

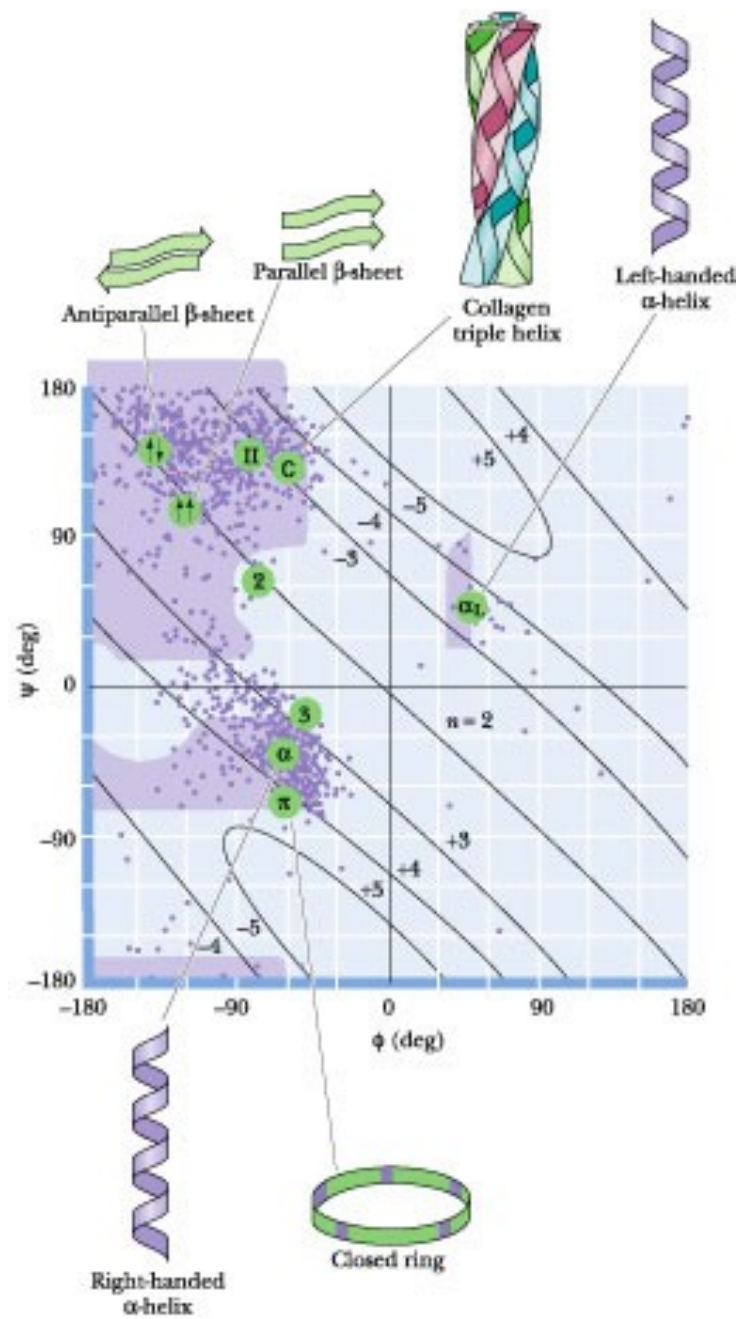
ϕ, ψ



Ramachandrov diagram stability sekundárních struktur bílkovin



D. Řetězec musí umožňovat maximální počet vodíkových vazeb mezi peptidickými vazbami



Typy sekundárních struktur :

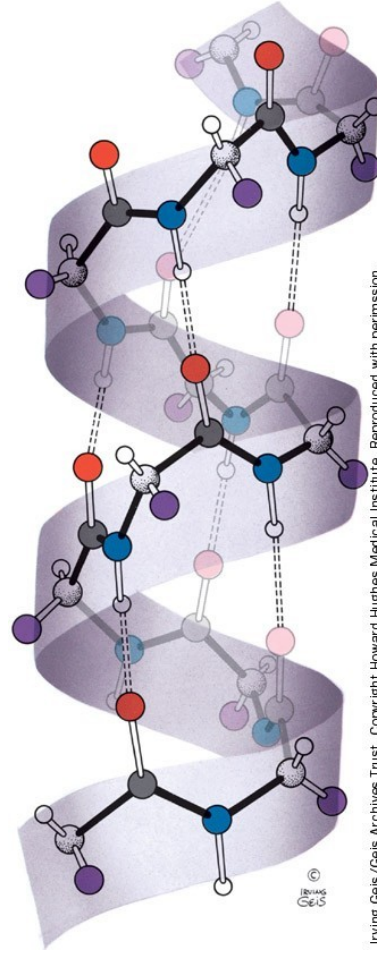
A. Pravidelné - helikální struktury - α helix (-56, -47)

- β struktury - skládaný list - paralelní (-139, +135) a
antiparalelní (-119, +113)

B. Ohybové - β ohyb

C. Nepravidelné

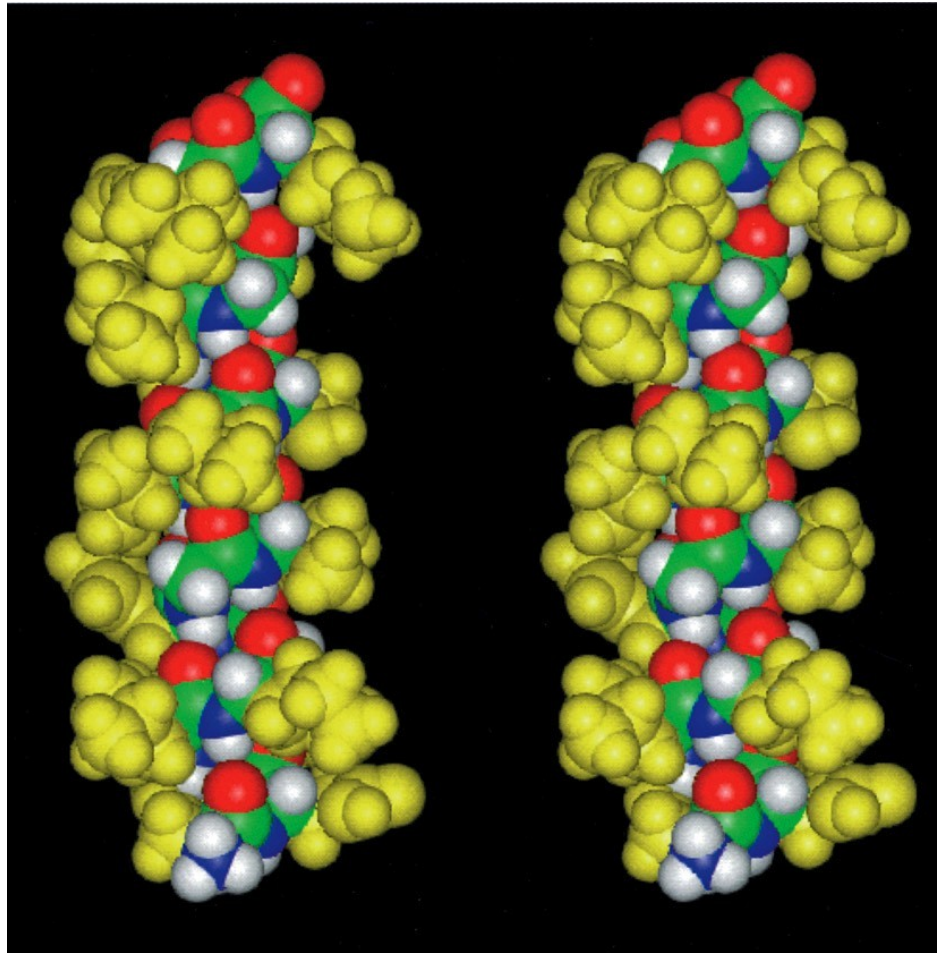
α - helix



Irving Geis/Geis Archives Trust. Copyright Howard Hughes Medical Institute. Reproduced with permission.

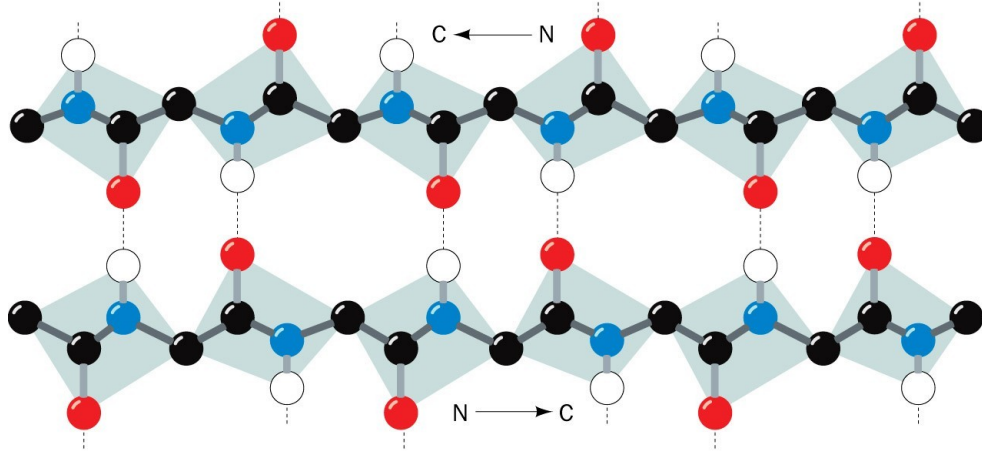
©
1977
H.H.M.I.

α - helix



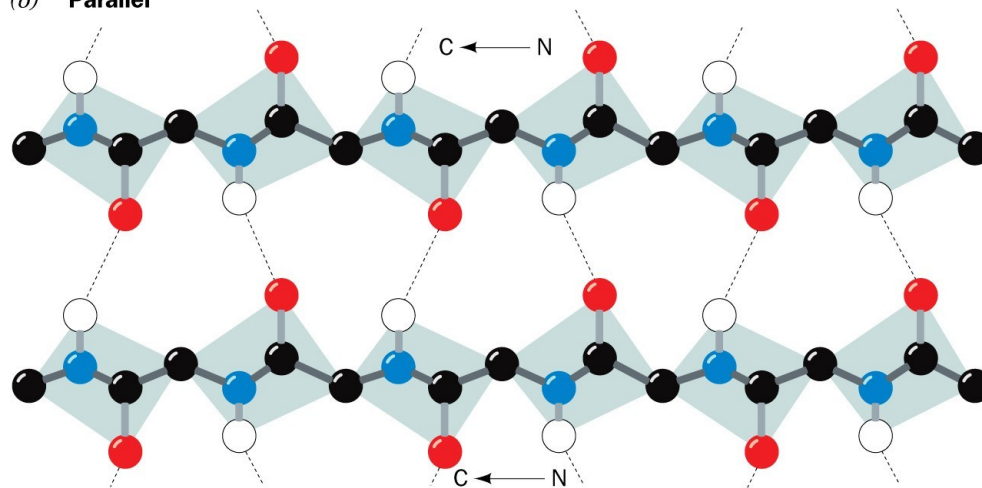
β - sheet

(a) Antiparallel



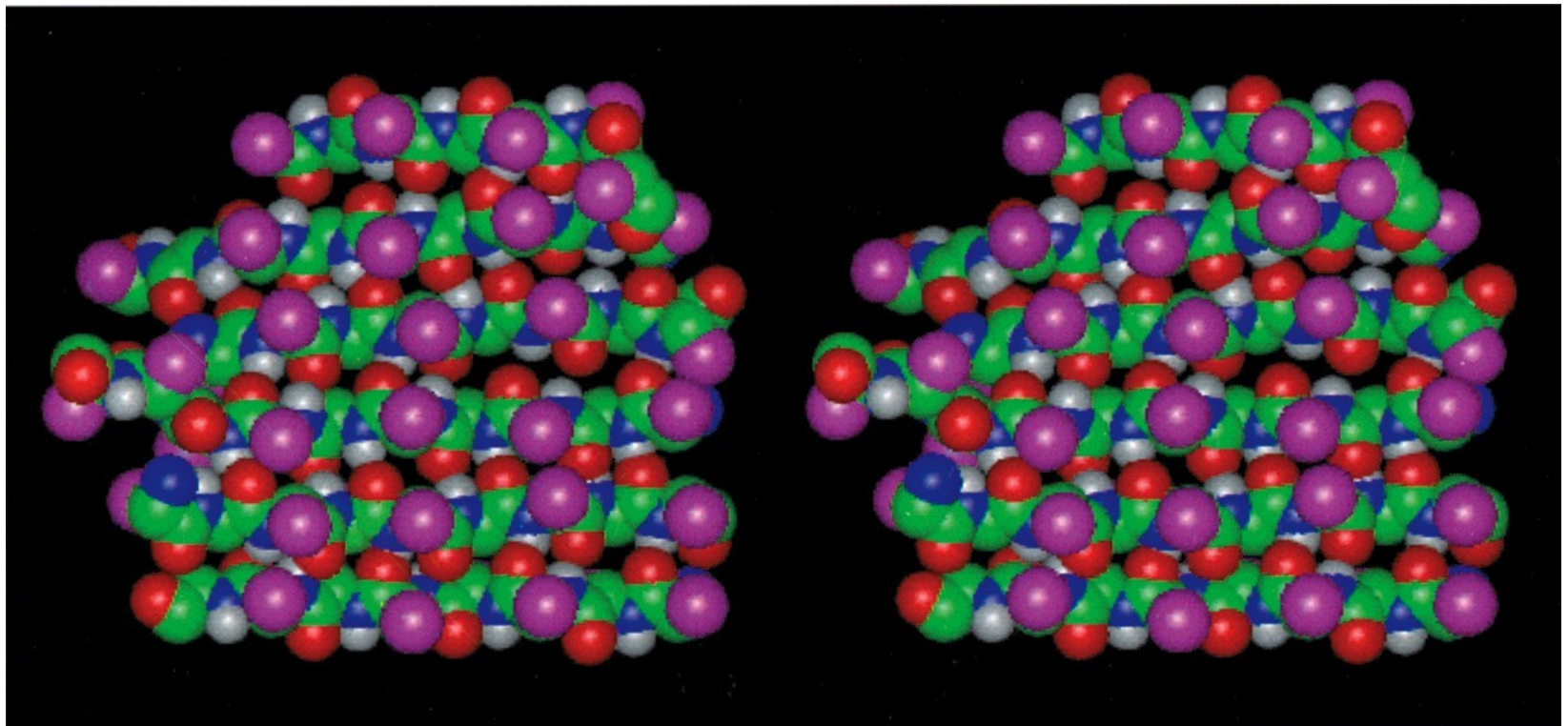
Irving Geis/Geis Archives Trust. Copyright Howard Hughes Medical Institute. Reproduced with permission.

(b) Parallel



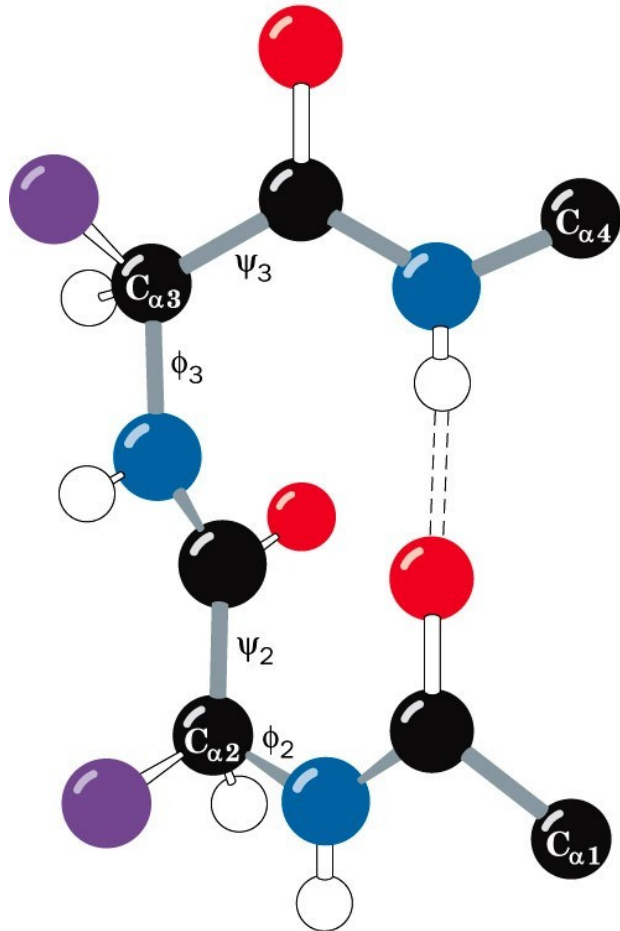
Irving Geis/Geis Archives Trust. Copyright Howard Hughes Medical Institute. Reproduced with permission.

β - sheet

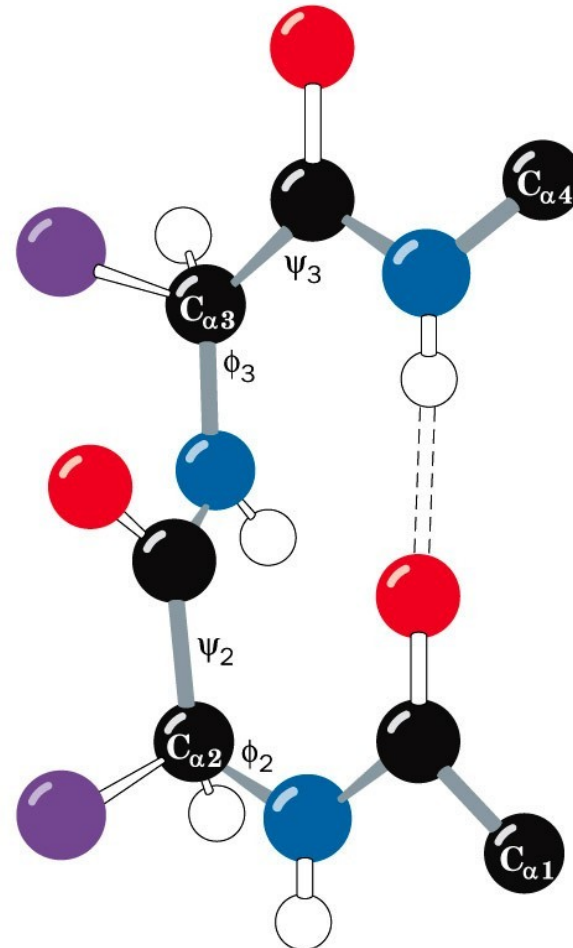


β - turn

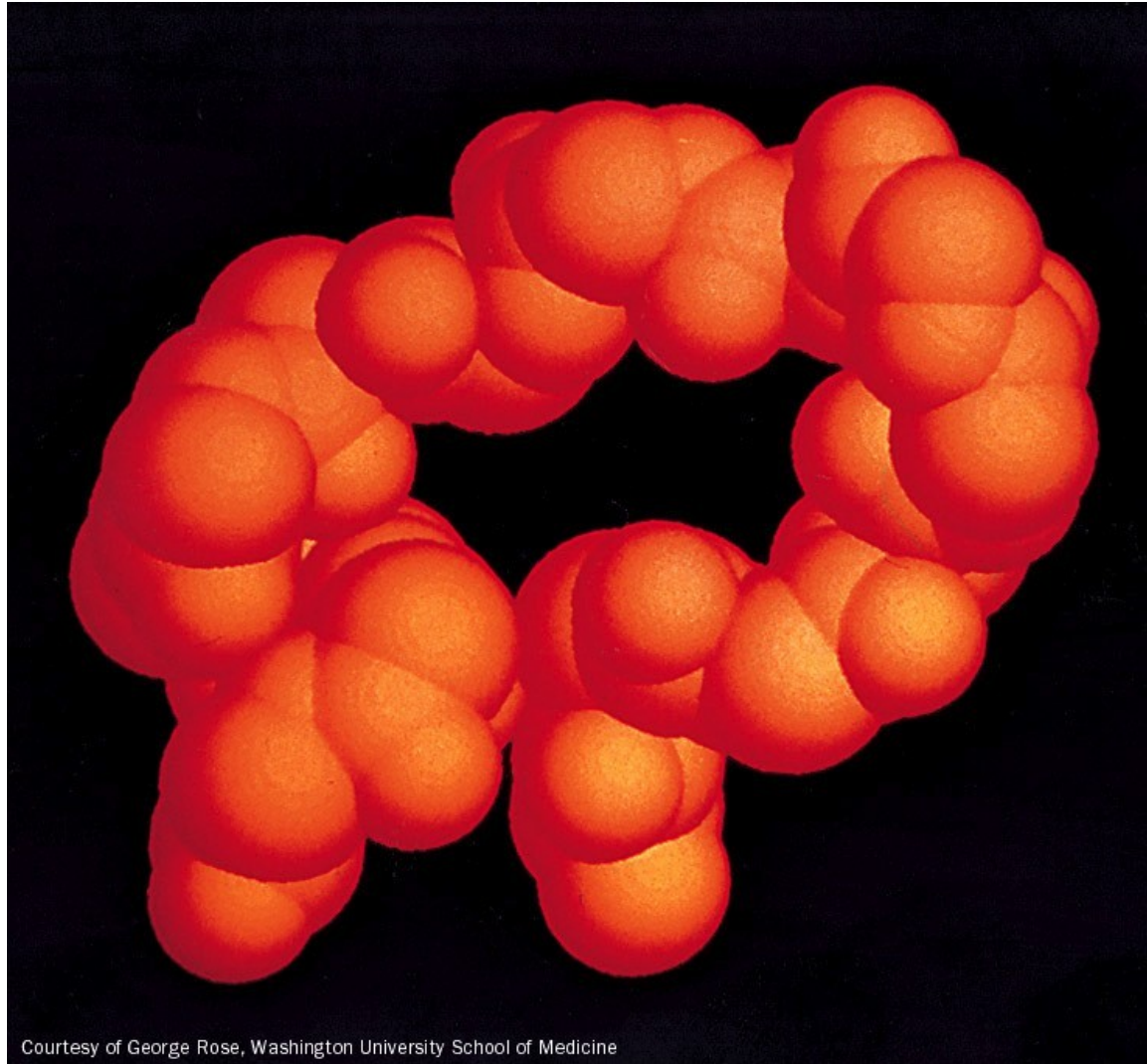
(a) Type I β bend



(b) Type II β bend



β - turn



Terciální struktura

1. Iontové interakce
2. Dipolové interakce
3. Vodíkové můstky
4. Hydrofobní interakce
5. Bisulfidické můstky

Strukturní motivy - domény

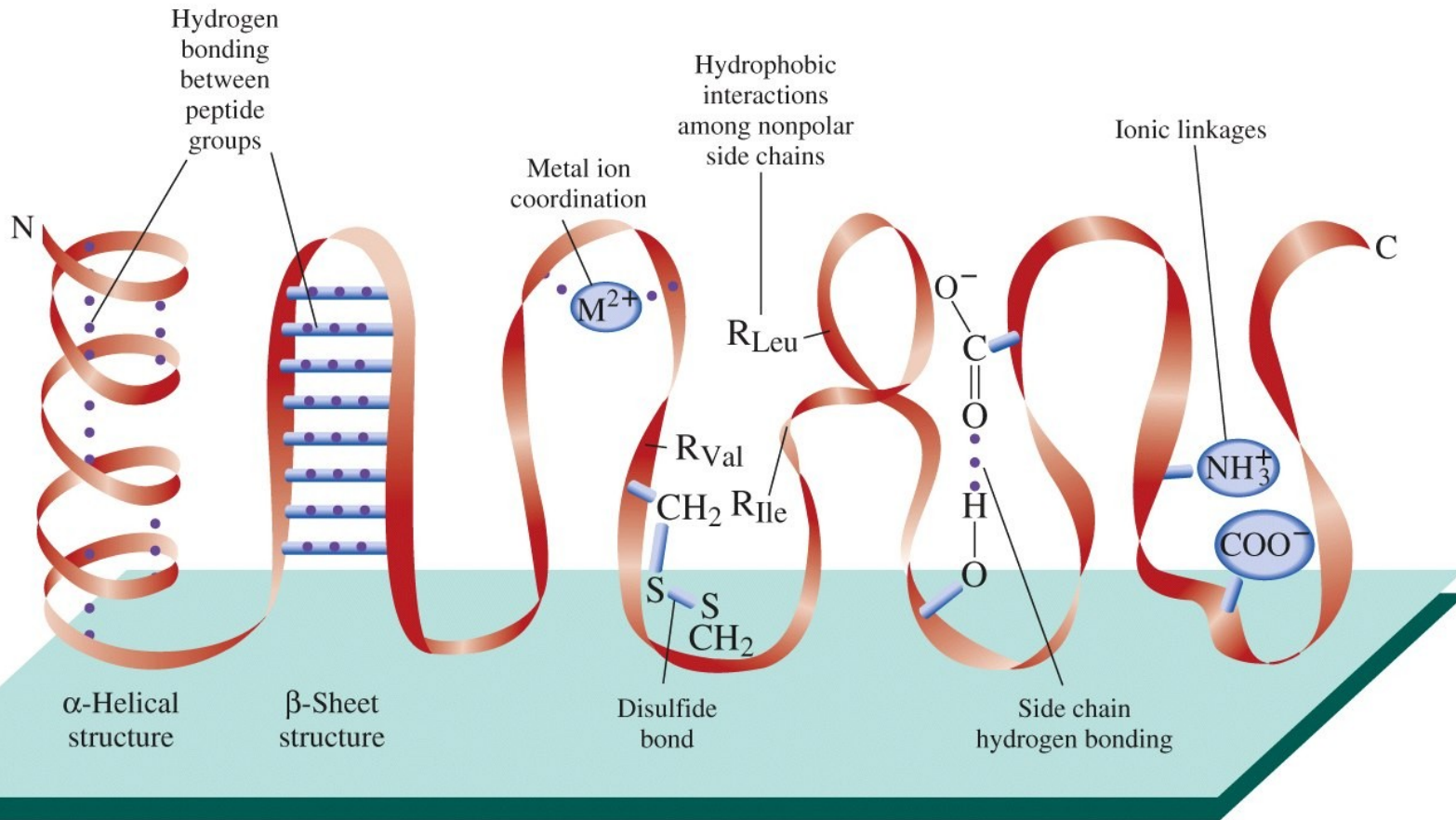
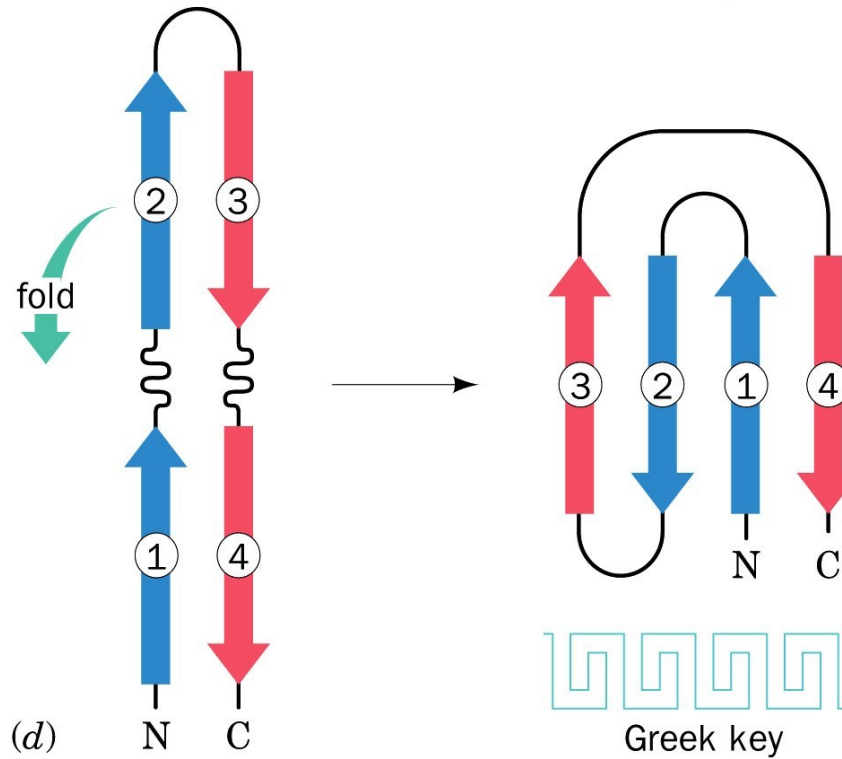
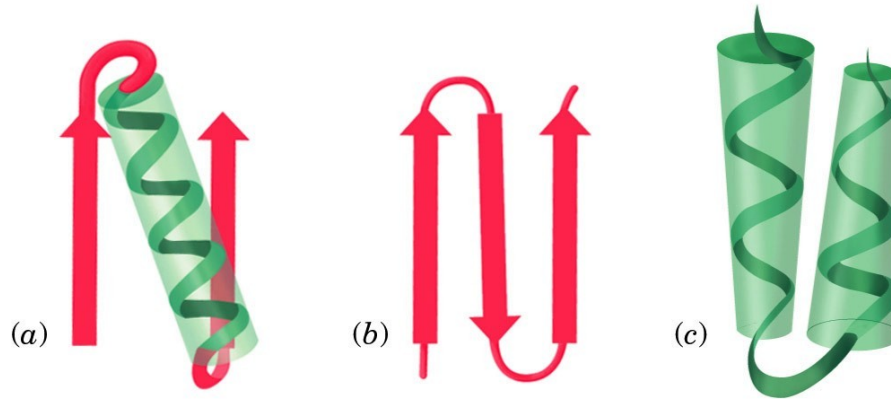
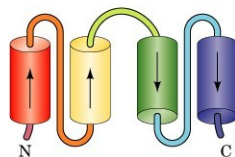
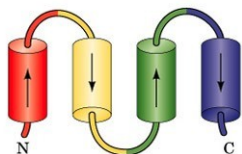
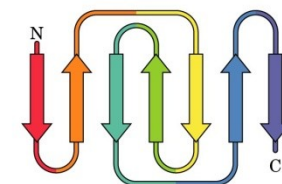
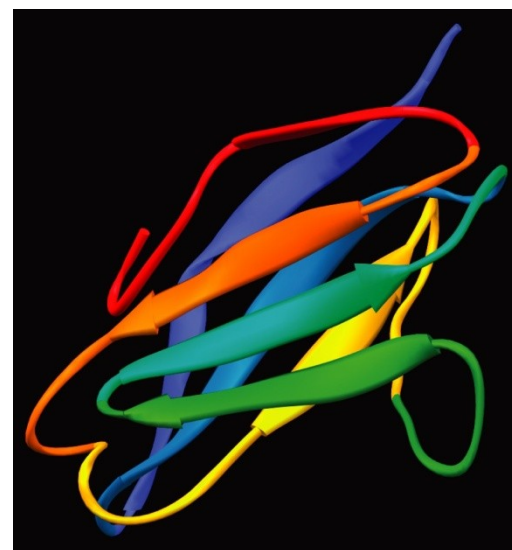
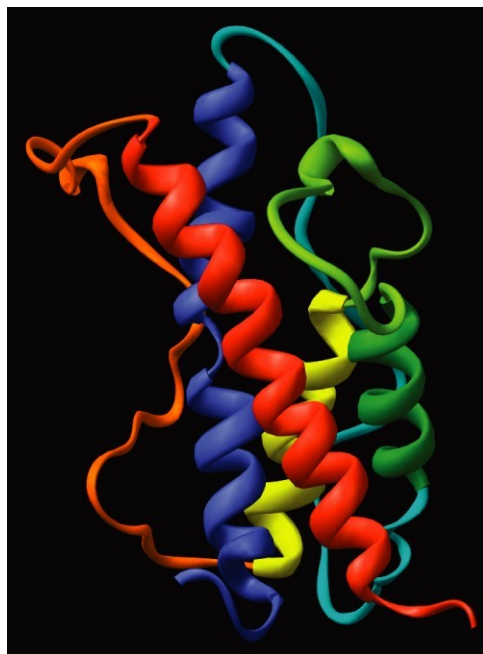
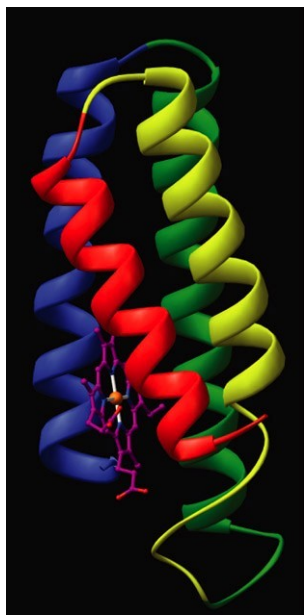


Figure 4-3 Concepts in Biochemistry, 3/e
 © 2006 John Wiley & Sons

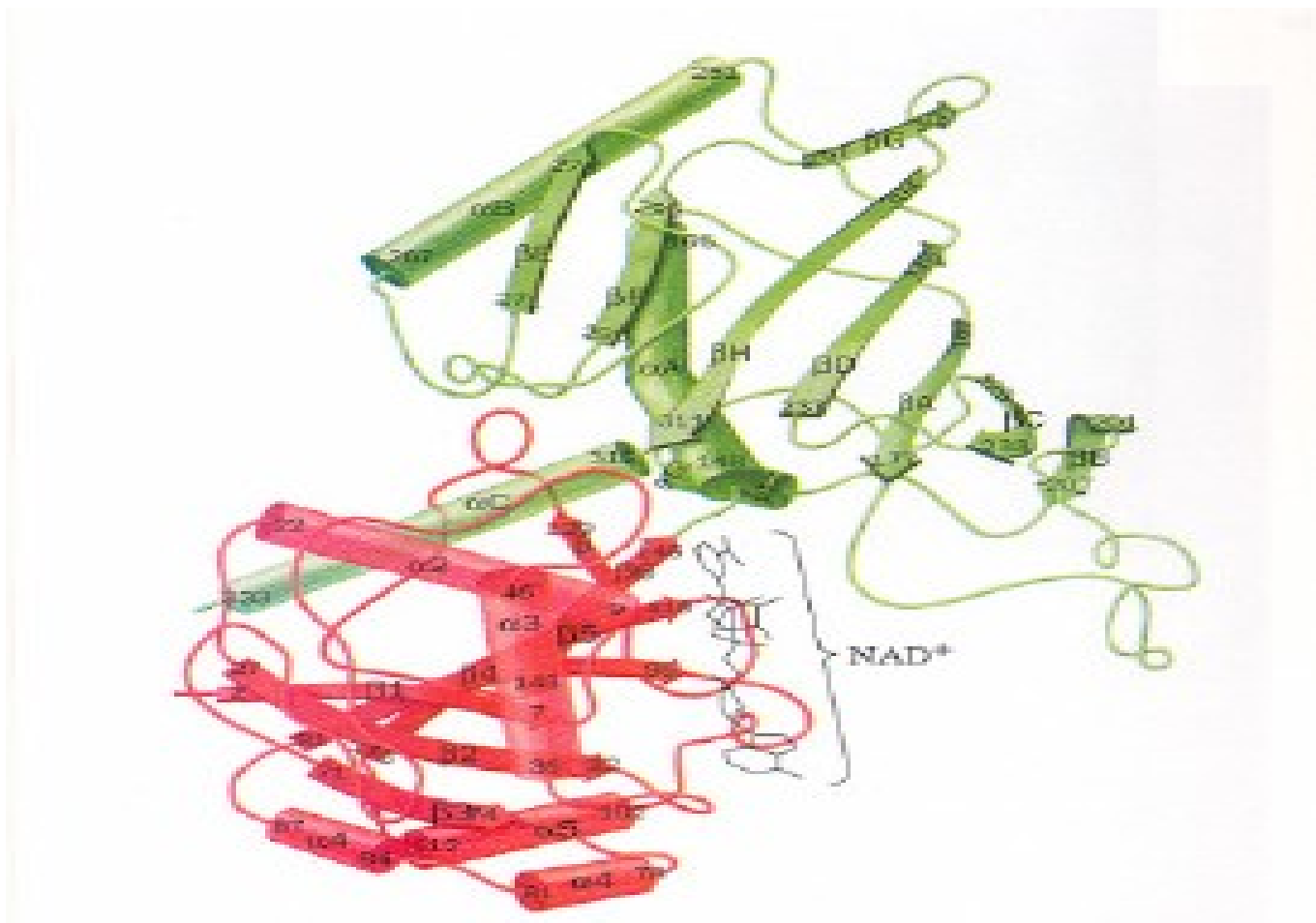
Strukturní motivy

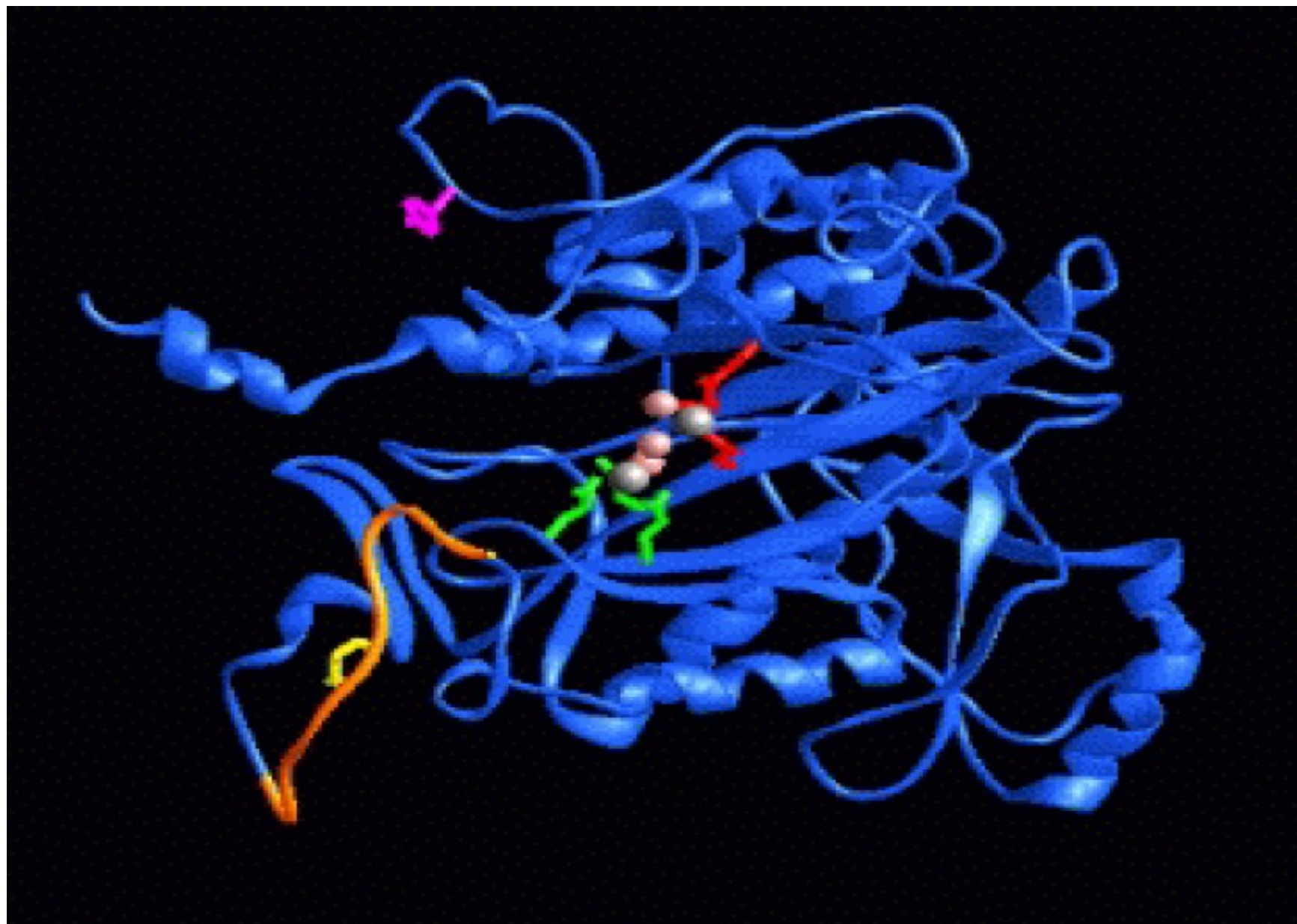


Strukturní motivy



Strukturní domény





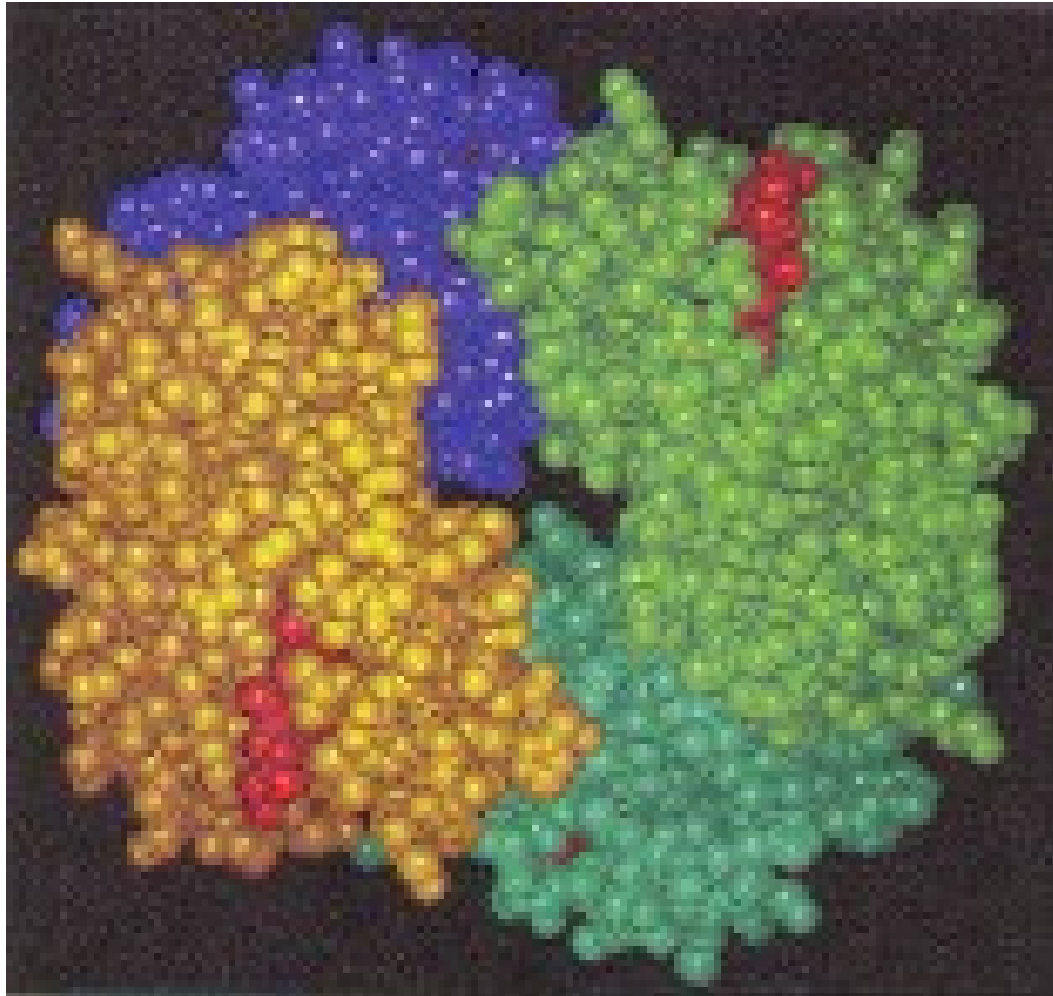
Kvarterní struktura

Podjednotkové složení - nekovalentní spojení - vodíkové můstky

- kovalentní spojení - bisulfidické můstky

Stanovení podjednotkového složení - SDS PAGE

Hemoglobin



Studium konformace bílkovin

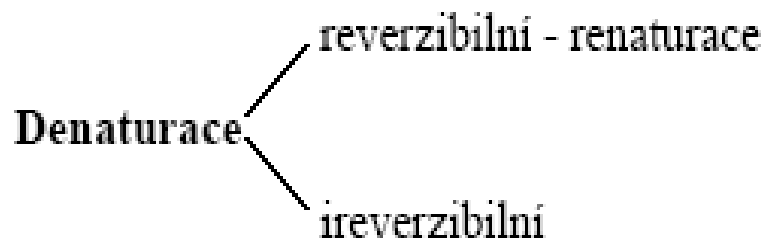
RTG difrakce - studium krystalů - BRAGG 1913

NMR - dvoj- a trojrozměrné - studium roztoků - posledních 15.let

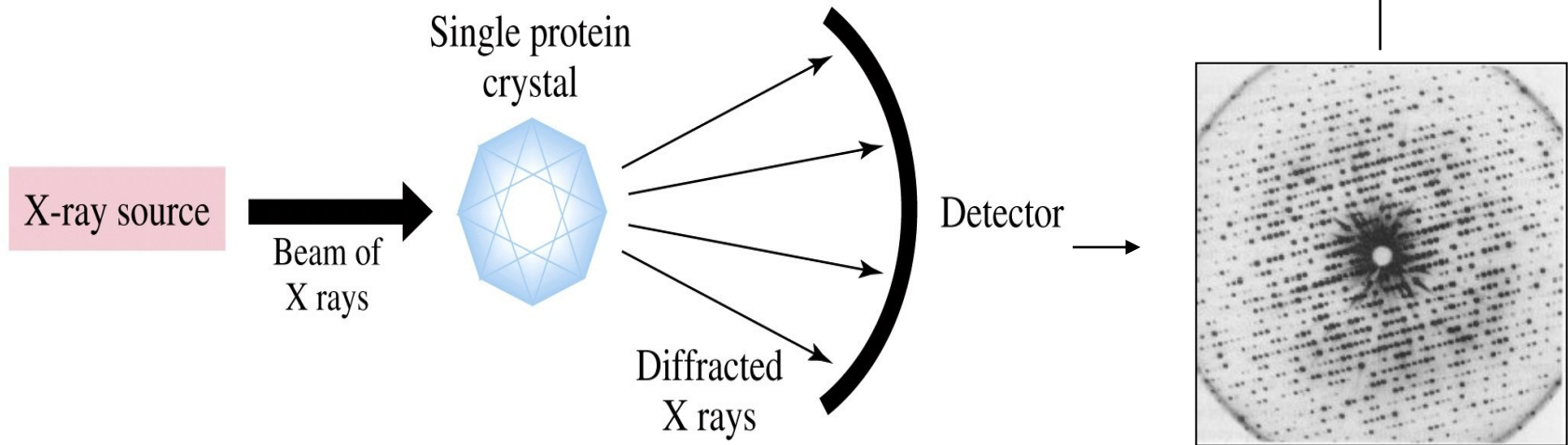
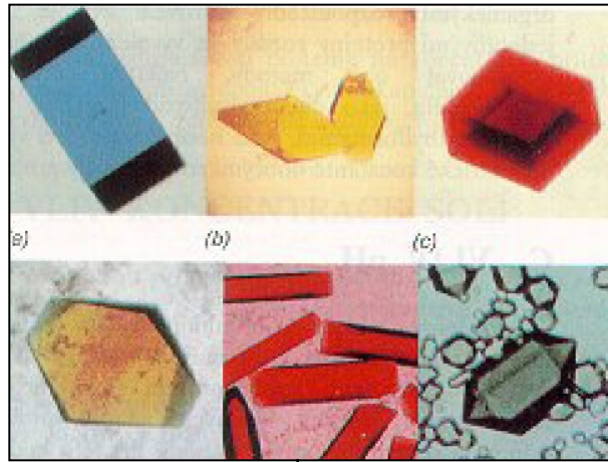
Stabilita konformace

Denaturace - fyzikální faktory - T, záření, tlak,

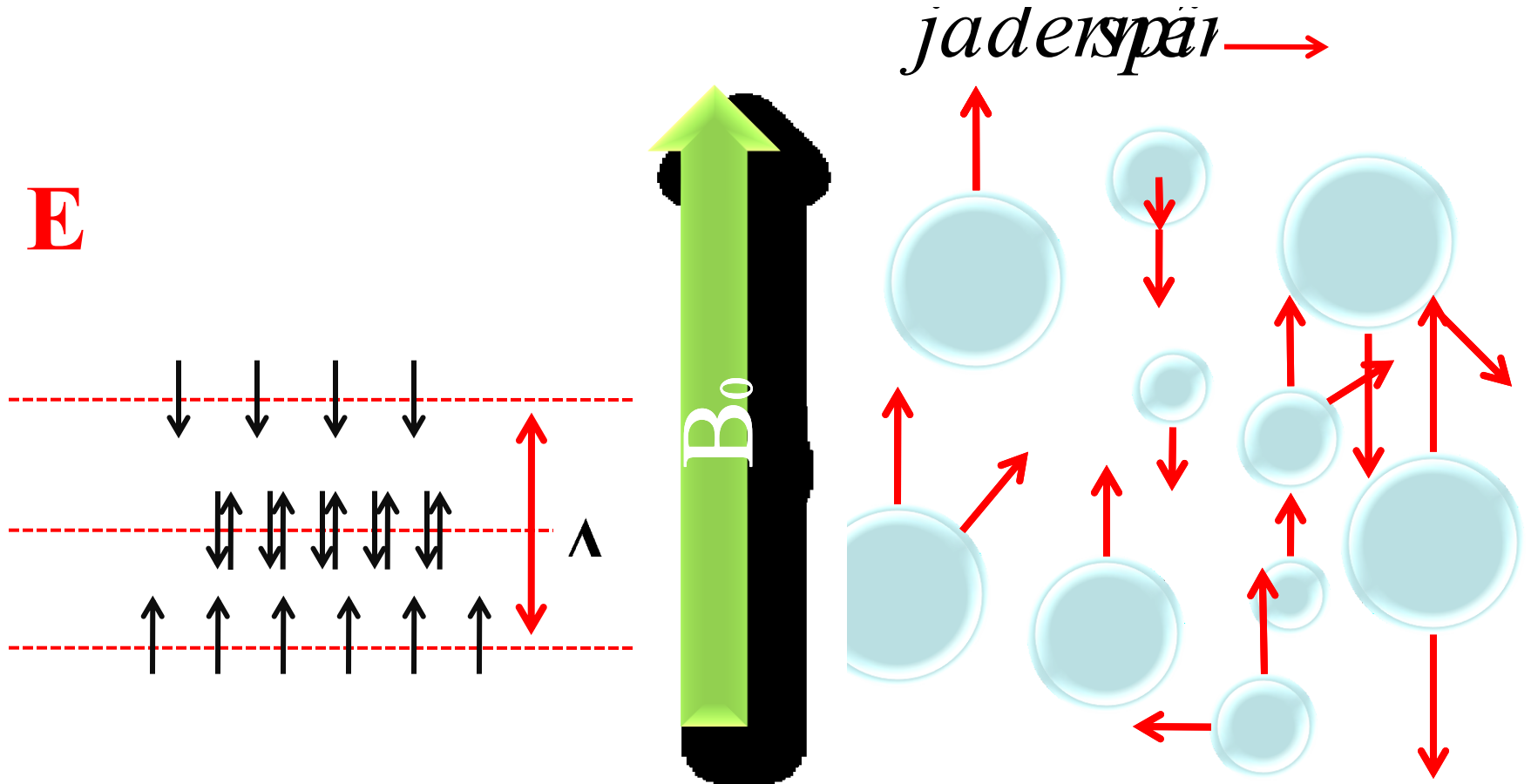
- chemické faktory - pH, organická rozpouštědla,
detergenty, těžké kovy, močovina,



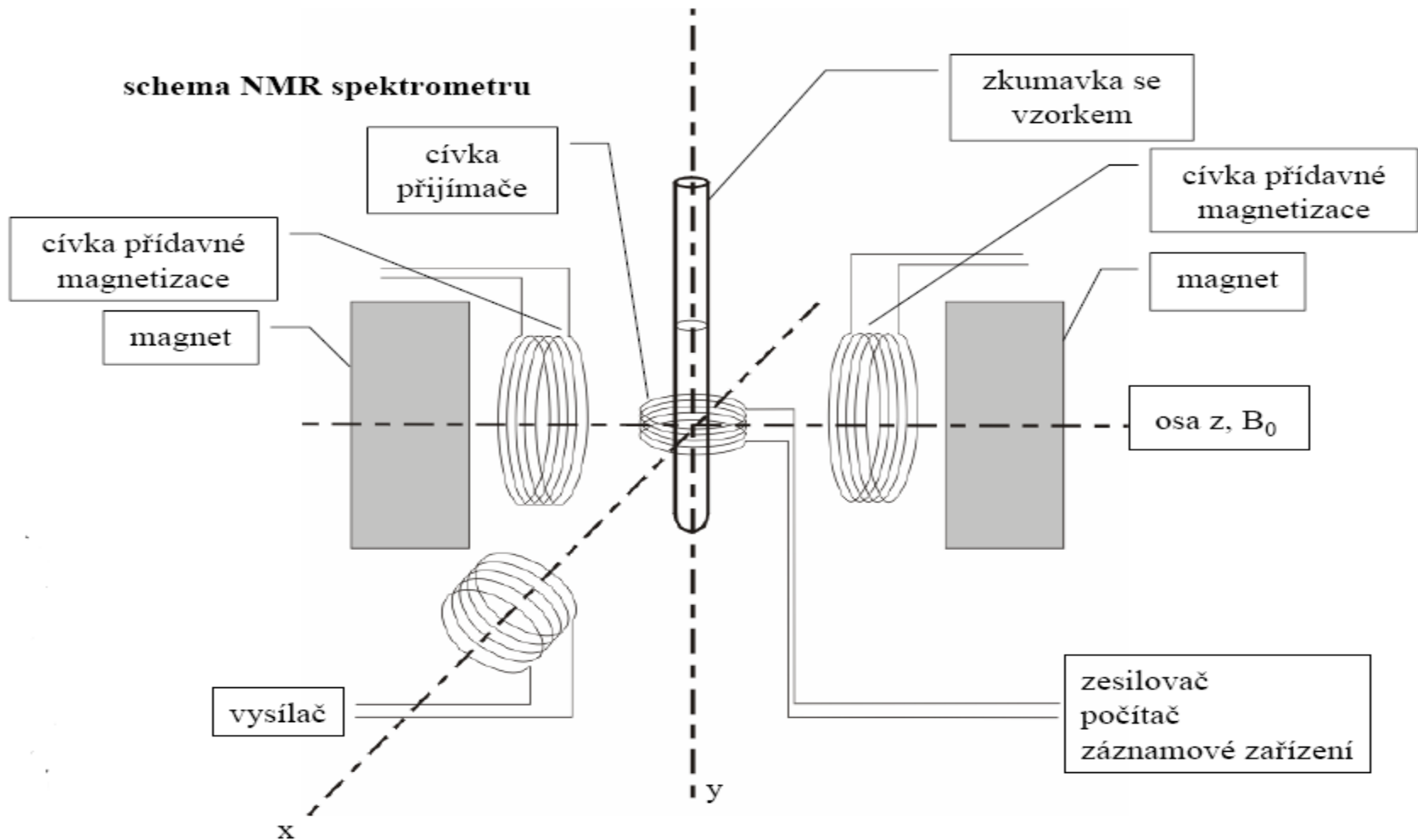
Rtg difrakce



NMR podstata



NMR



NMR

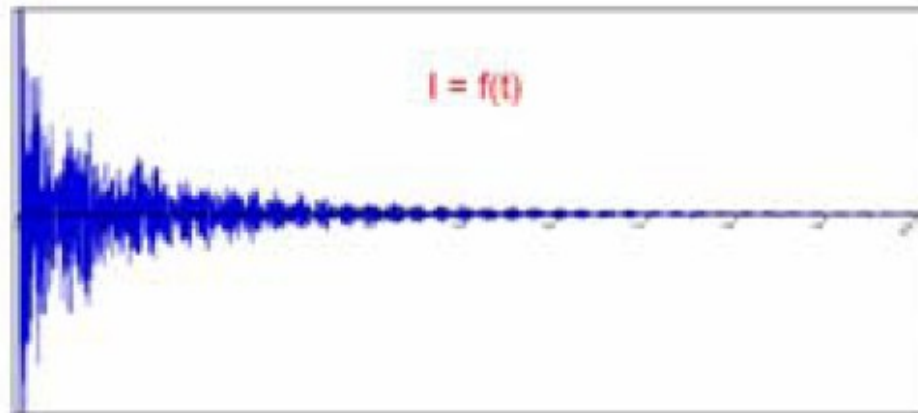
počítač

elektronika

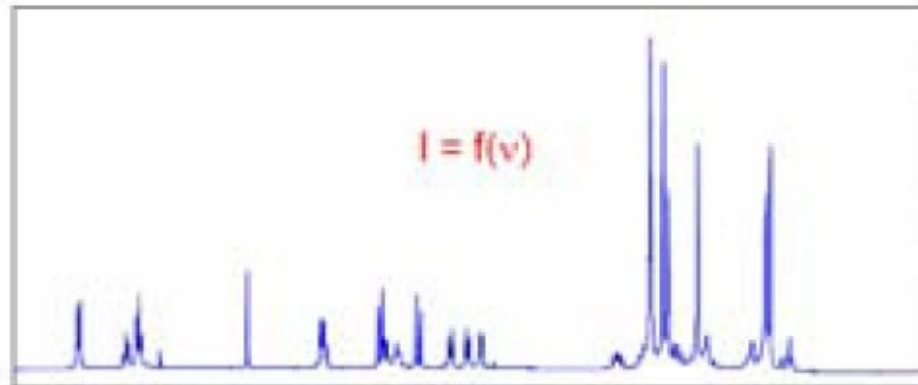
supra-
vodivý
magnet



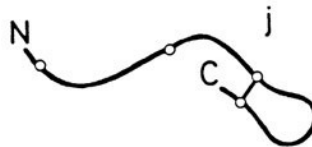
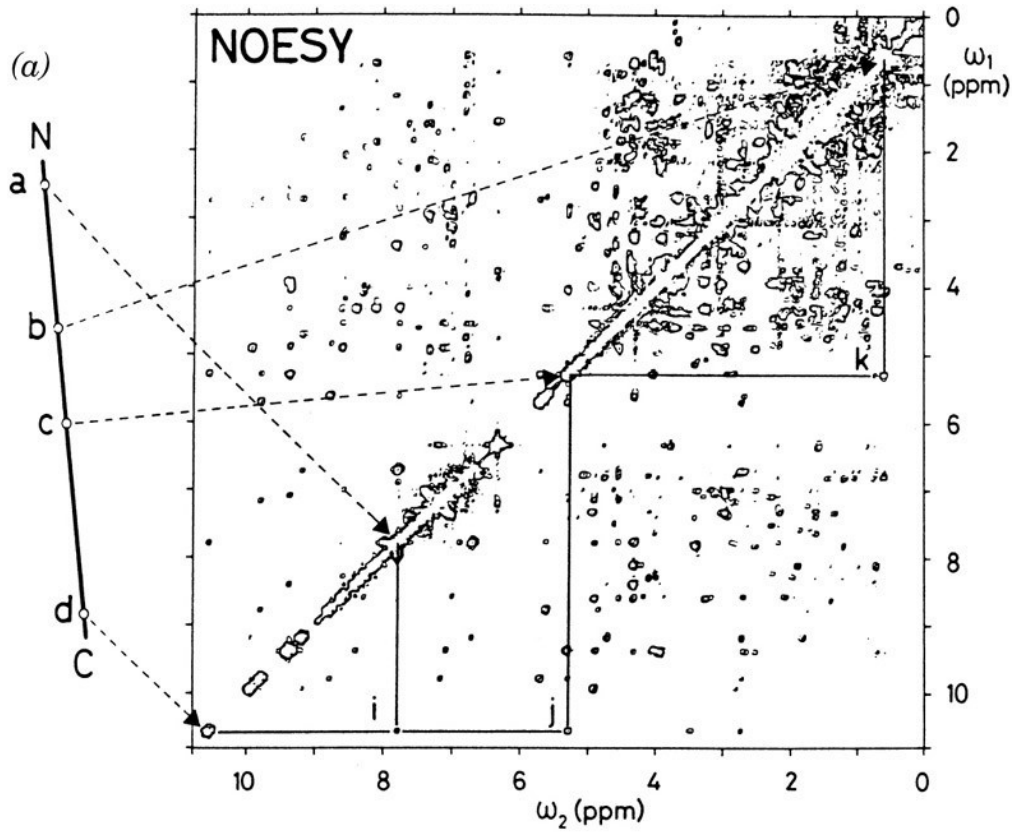
NMR spektrum



Po zpracování Fourierovou transformací dostaneme:



NMR spektrum



After Wuthrich, K. *Science* **243**, 45 (1983)

NMR



Denaturace - renaturace

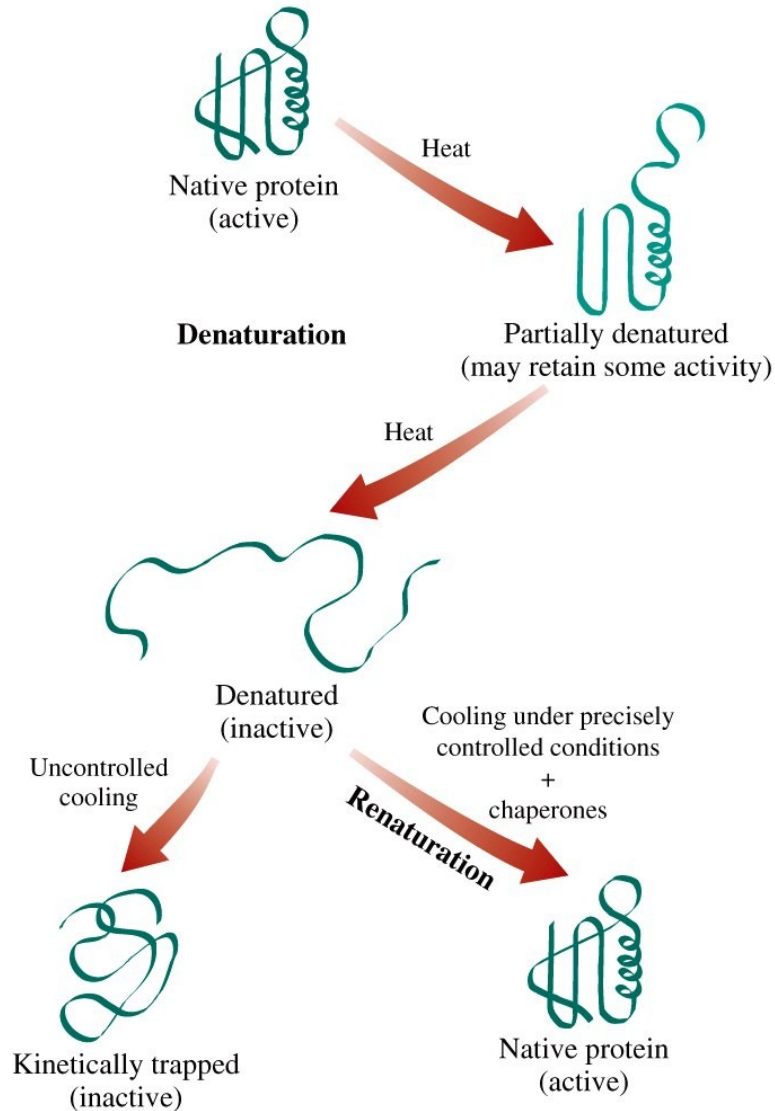
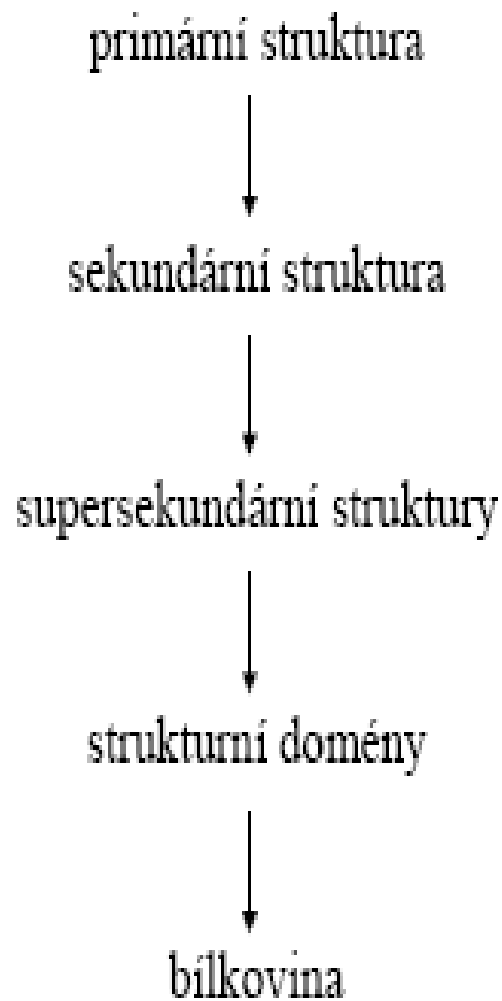


Figure 4-14 Concepts in Biochemistry, 3/e
© 2006 John Wiley & Sons

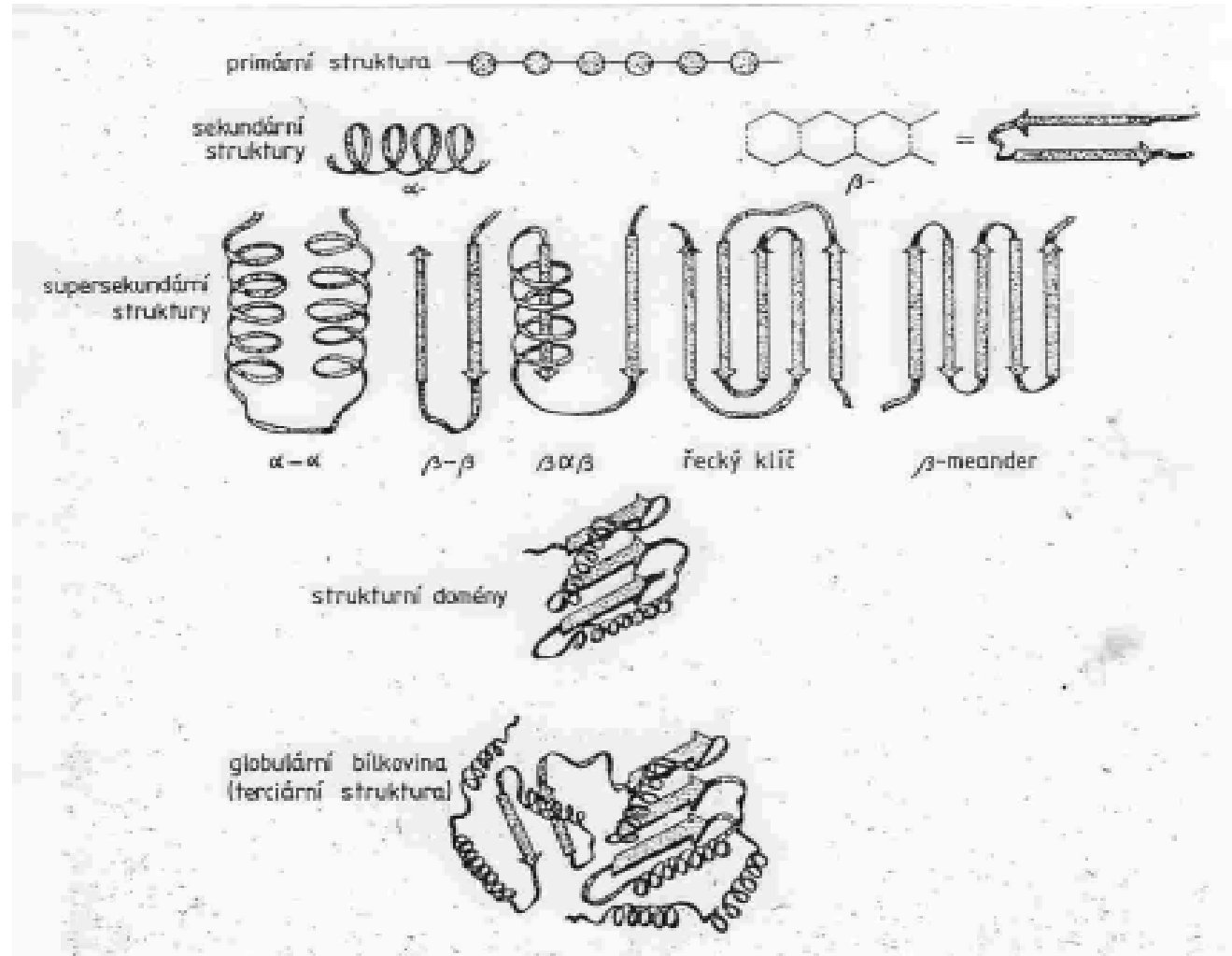
Vznik prostorové struktury - skládání, svinutí - „FOLDING“



Skládání – folding bílkovin

- Neprobíhá náhodným způsobem
- Probíhá postupně:
 - a. malé dočasné periodické struktury
 - b. supersekundární struktury
 - c. strukturní domény a "roztavená" globule
 - d. závěrečné úpravy za účasti enzymů
- Potřebují bílkoviny ke svinování pomocníky?

POSTUP SKLÁDÁNÍ BÍLKOVIN



Levinthal Paradox

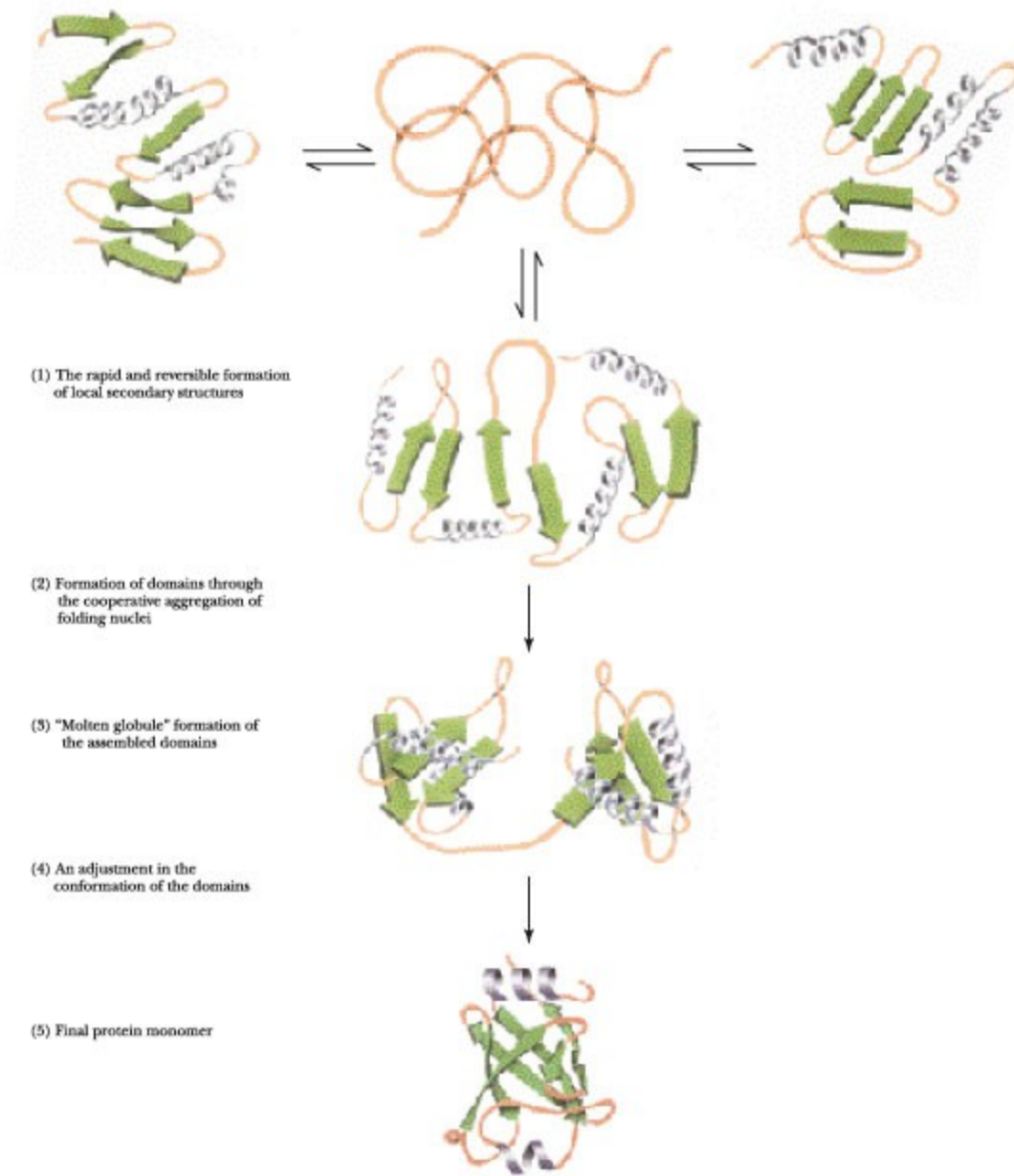
- We assume that there are three conformations for each amino acid (ex. α -helix, β -sheet and random coil). If a protein is made up of 100 amino acid residues, a total number of conformations is :

$$3^{100} = 515377520732011331036461129765621272702107522001 \\ \cong 5 \times 10^{47}.$$

- If 100 psec (10^{-10} sec) were required to convert from a conformation to another one, a random search of all conformations would require

$$5 \times 10^{47} \times 10^{-10} \text{ sec} \cong 1.6 \times 10^{30} \text{ years}.$$

- However, **folding of proteins takes place in msec to sec order**. Therefore, proteins fold not via a random search but a more sophisticated search process.



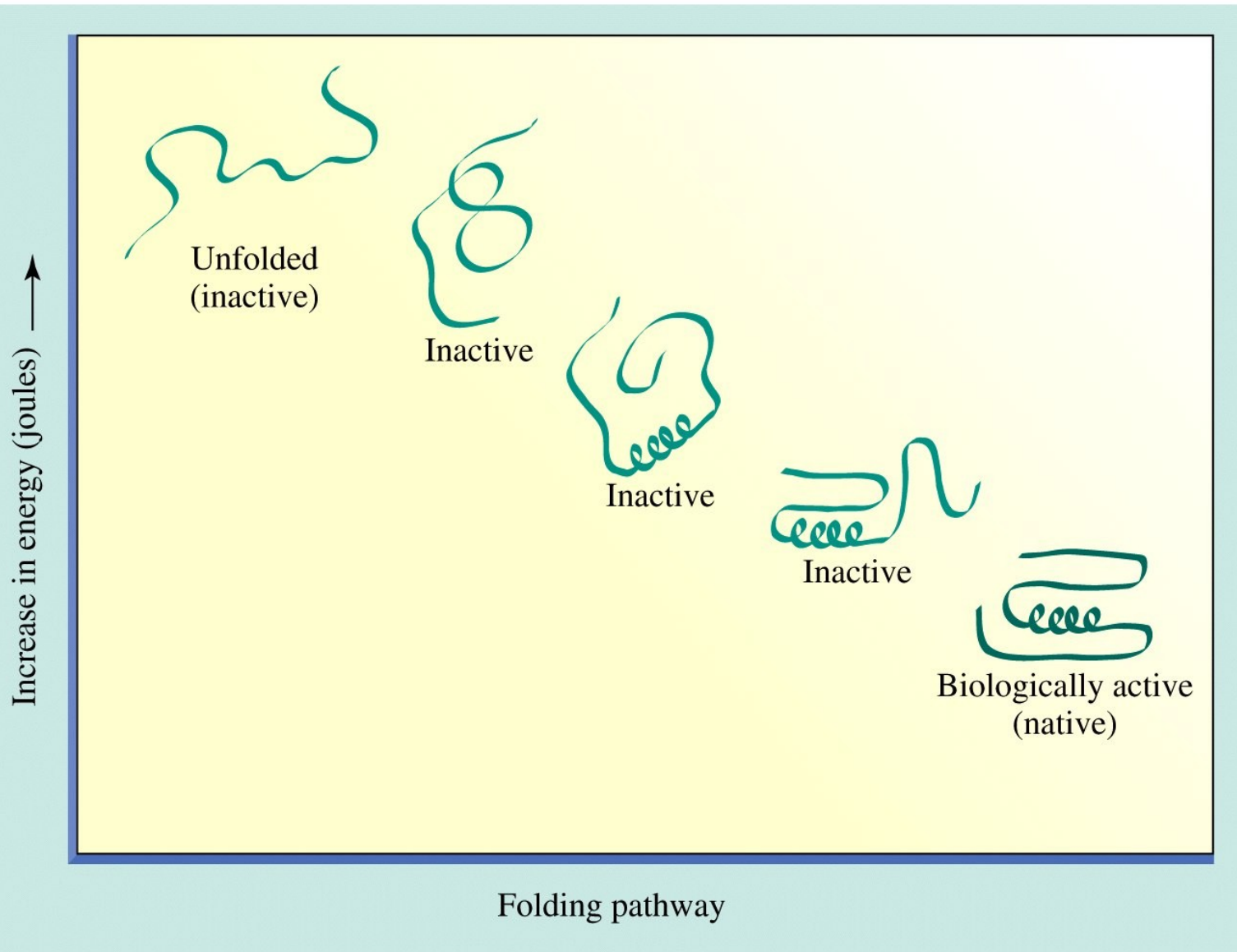
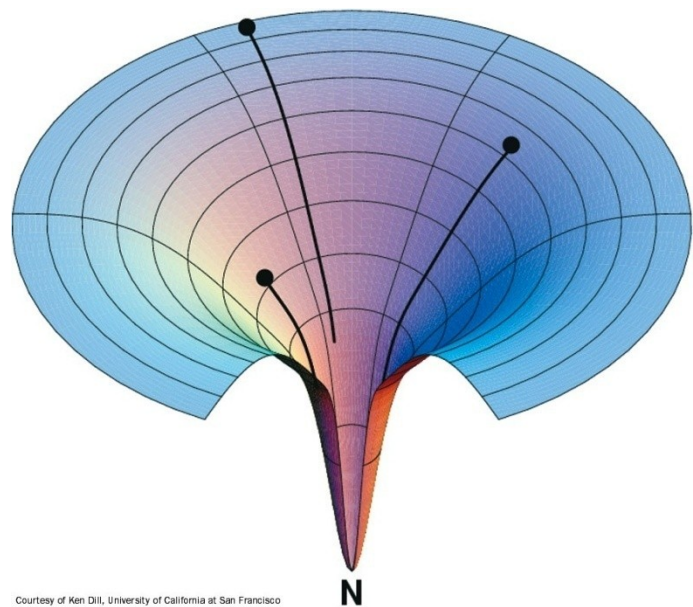
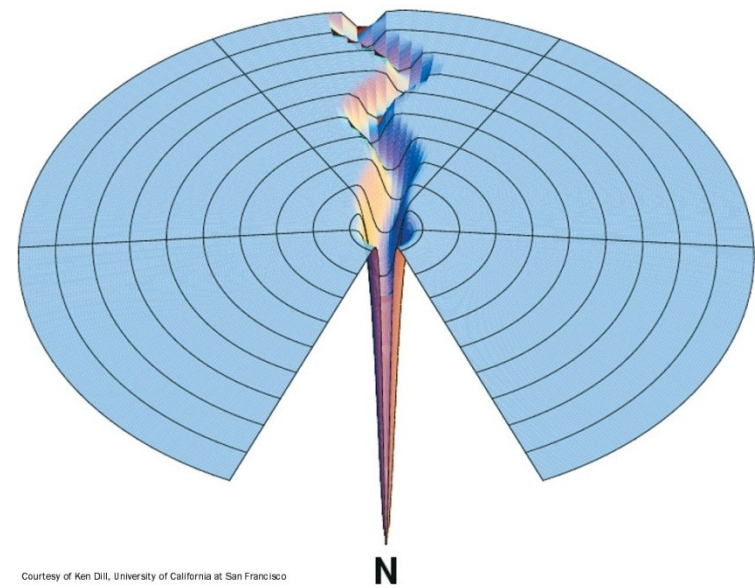


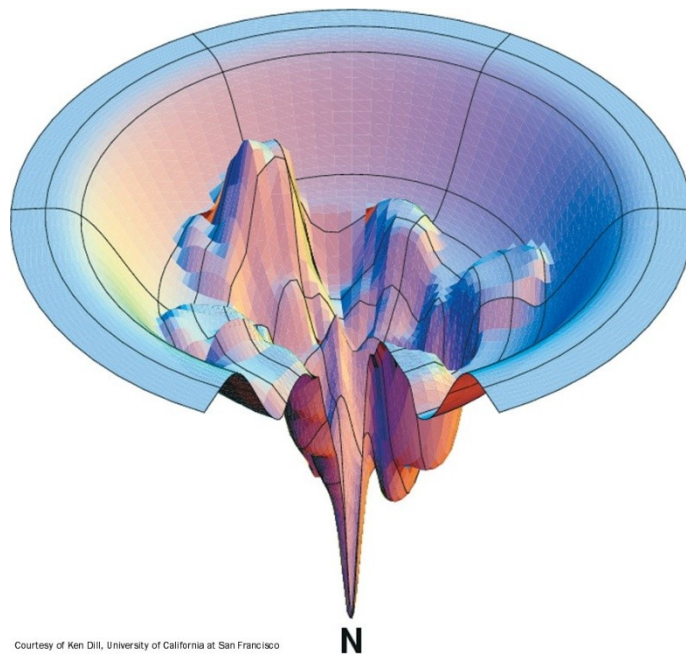
Figure 4-13 Concepts in Biochemistry, 3/e
© 2006 John Wiley & Sons



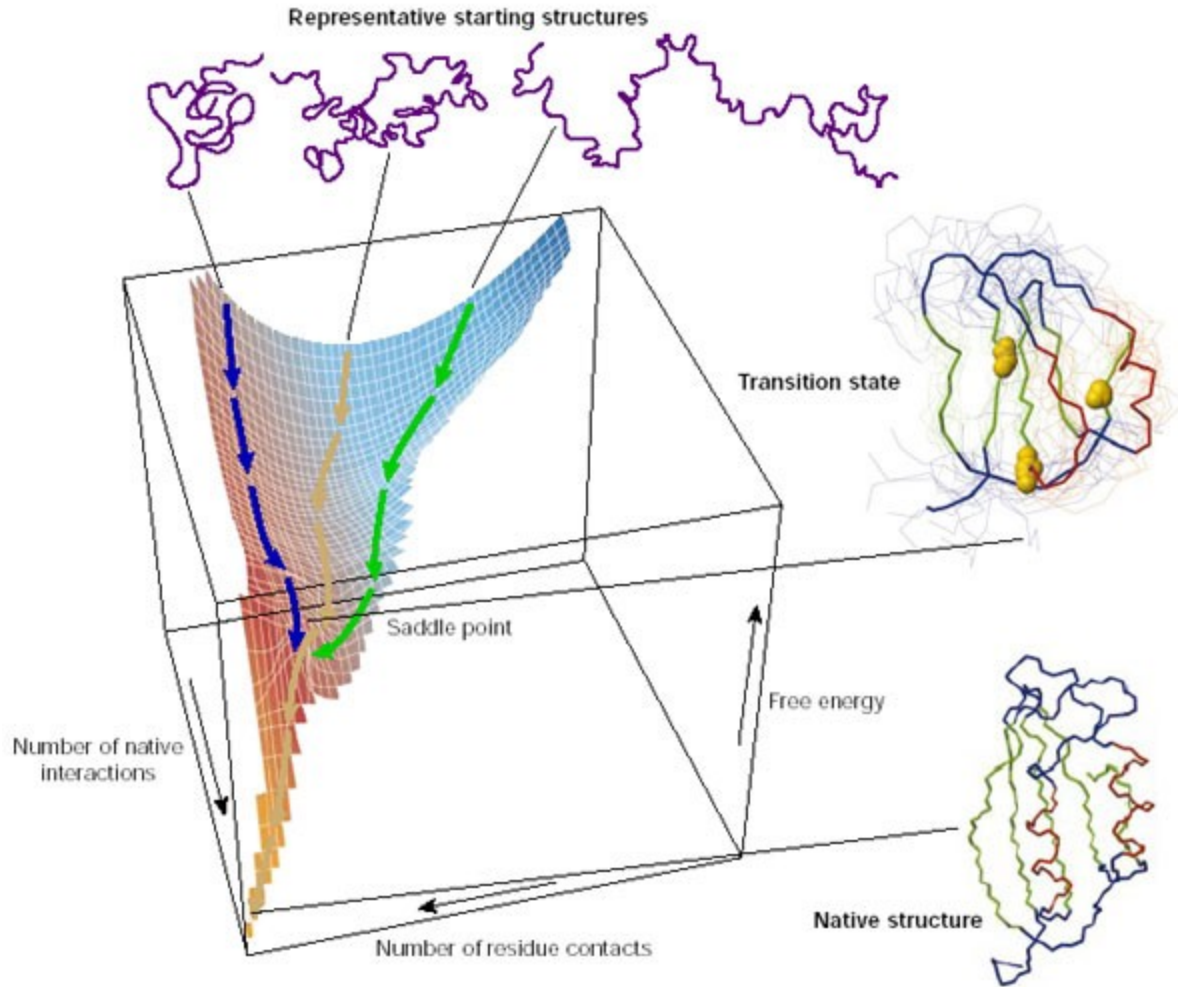
Courtesy of Ken Dill, University of California at San Francisco



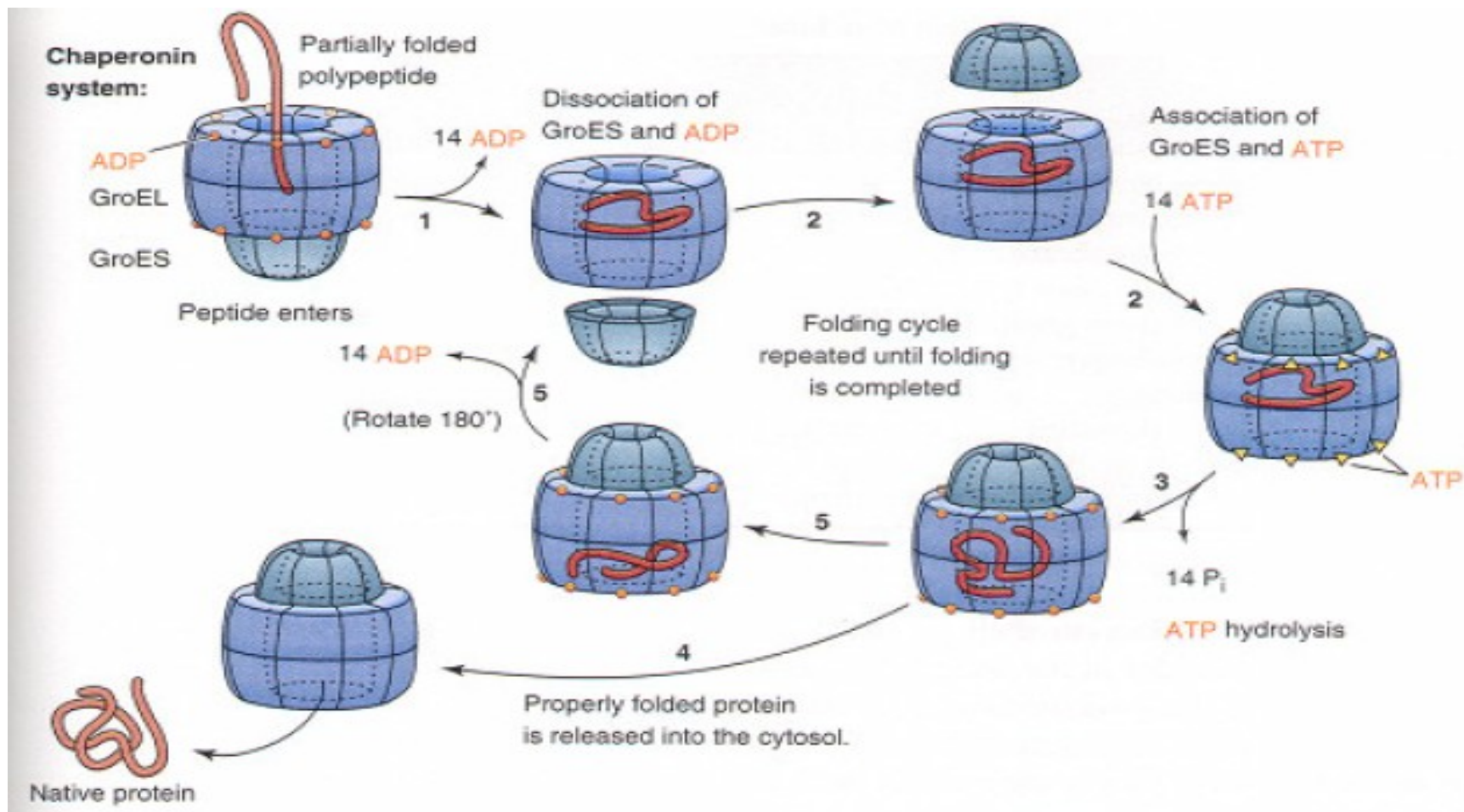
Courtesy of Ken Dill, University of California at San Francisco



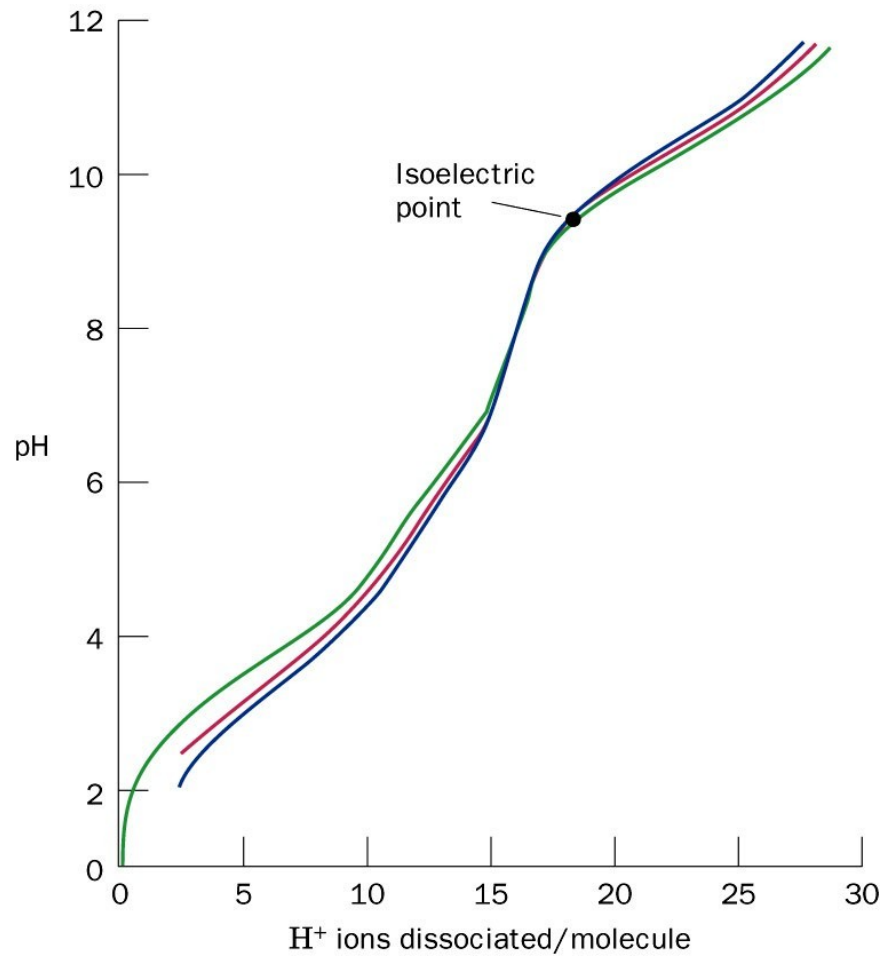
Courtesy of Ken Dill, University of California at San Francisco



Chaperony



Titrační křivka



Izolace bílkovin

1. Účel
 - výzkum - studium struktury, studium biologické aktivity
 - průmyslové použití - farmakologie, čisticí prostředky,

2. Volba vstupního materiálu

3. Extrakce

4. Purifikace

Srážecí metody - srážení neutrálními solemi $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

- srážení organickými rozpouštědly

- pH srážení

Chromatografie - ionexová

- hydrofobní

- gelová permeační

- afinitní

Elektromigrační metody - elektroforéza nativní nebo SDS

- izoelektrická fokusace

Izolace proteinů

Literatura

- *Scopes* : Protein Purification
- *Harris* : Protein Purification Methods – Practical Approach
- *Deutcher* : Guide to Protein Purification
- *Janson* : Protein Purification
- *Kastner* : Protein Liquid Chromatography

Metody separace proteinů

- Vychází z klasických metod chemické analýzy
- Uplatňují se zde i speciální metody

Problémy se vzorkem

- Komplexnost
- Malá množství
- Labilita

Plánování separace bílkovin

Cíl izolace

- Získání homogenní bílkoviny
- Zachování biologické aktivity
- Čistota

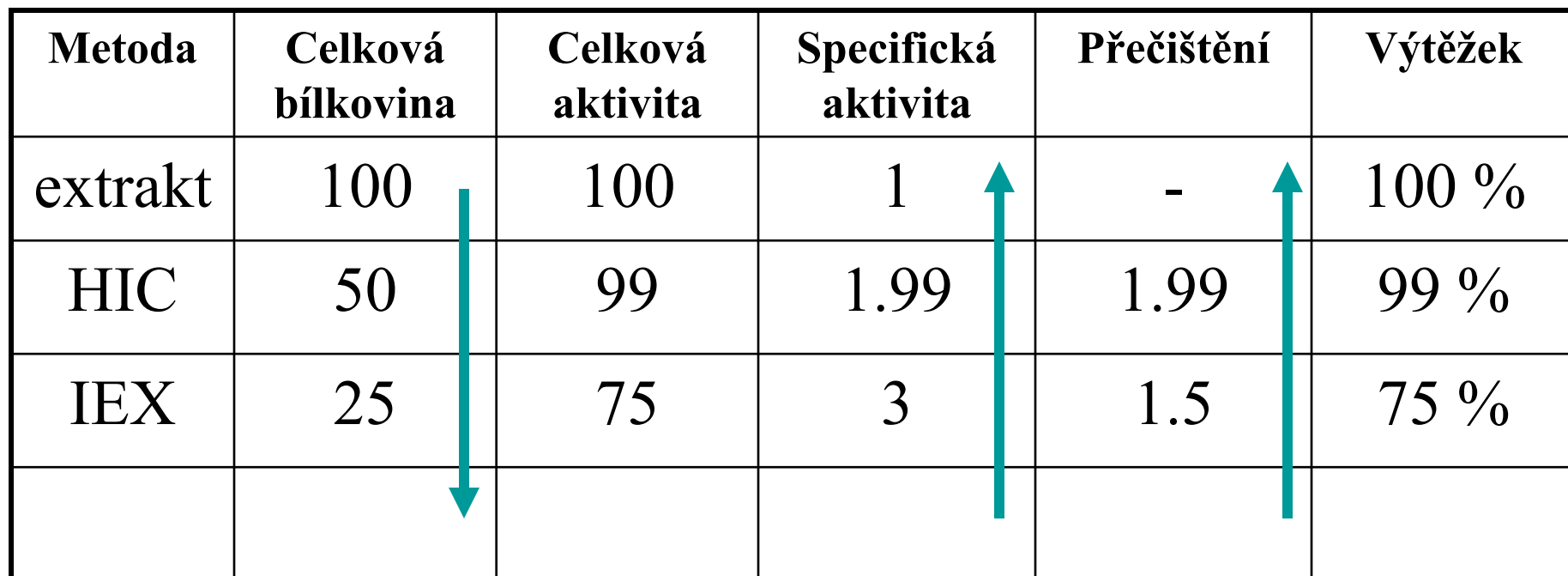
Závěr : získat vzorek o patřičné
čistotě s vynaložením
patřičného úsilí

Volba vstupního materiálu

- Preparát z daného organismu
- Preparát s největším obsahem dané bílkoviny
- Preparát s nejmenším obsahem nečistot

Sledování průběhu separace

Metoda	Celková bílkovina	Celková aktivita	Specifická aktivita	Přečištění	Výtěžek
extrakt	100	100	1	-	100 %
HIC	50	99	1.99	1.99	99 %
IEX	25	75	3	1.5	75 %



Stanovení koncentrace bílkoviny

Metoda založená

na stanovení
koncentrace dusíku

na základě
optických vlastností

na základě
elektrochemických vlastností

Kjeldahlova metoda – stanovení N_2

- Mineralizace vzorku – převedení organického dusíku na NH_4^+
- Stanovení NH_4^+ - titrace, fotometrie, selektivní elektrody

UV spektrofotometrie

- 280 nm – aromatické AMK
interference nukleotidů
- 180 - 230 nm – peptidická vazba

Výhody - nedestruktivní metoda
- není třeba kalibrace

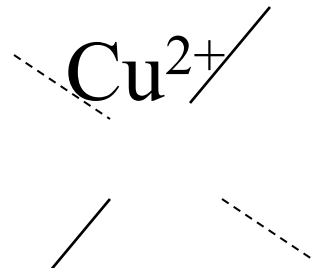
VIS spektrofotometrie

Přídavek činidla → barevný derivát

- Destruktivní metoda
- Nutná kalibrační závislost

Biuretová metoda

Princip : Cu^{2+} vytváří v alkalickém prostředí komplex se 4 N peptidické vazby



Měření : 540 – 560 nm

310 nm

Folinova metoda

Princip : hydroxyfenolová skupina tyrosinu
redukuje fosfomolybdenany na
molybdenovou modř

Měření : 725 nm

Lowryho metoda

Princip : kombinace Folinovy a Biuretové metody

Měření : 600 nm

Metoda dle Bradfordové

Princip : při vazbě Coomassie Brilliant Blue G 250 na bílkovinu dochází k posunu absorpčního maxima z 465 na 595 nm.

Meření : 595 nm

Nejčastěji používané metody

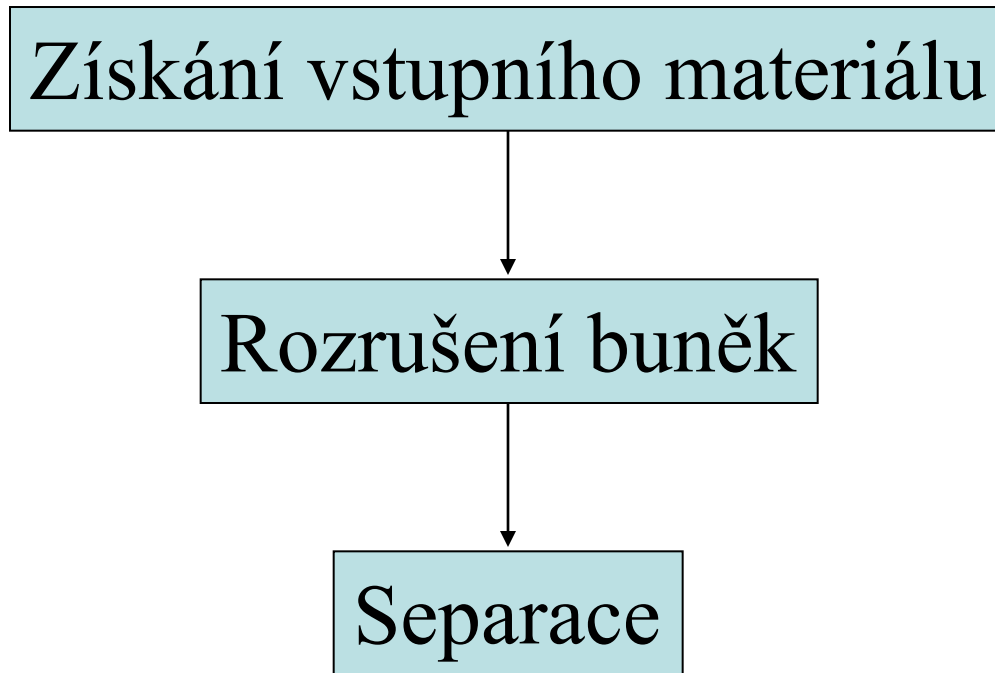
Metoda	Rozsah (ng)	Poznámka
Biuretová	0.5 - 5	okamžitý vývoj
Lowryho	0.05 - 0.5	pomalý vývoj
UV - 280 nm	0.05 - 2	interference
UV – 205 nm	0.01 - 0.05	interference
Bradfordové	0.01 - 0.05	sorpce barviva

Stanovení biologické aktivity

Enzymatické, imunologické, toxické,
hormonální receptorové atdf.

Vlastní separace

Obecné schéma



Vstupní materiál

Mikroorganismy

Bakterie, kvasinky, plísně, řasy

- Výhody - lze je snadno získat v dostatečné množství
- selekce mutantů o požadovaných vlastnostech
 - genetické inženýrství
 - termofilní organismy

Bezobratlí

Hmyz, plži, mlži

Nevýhody - málo se používá, nesnadno se získává

Živočišné tkáně

- Laboratorní zvířata – myši, krysy, králíci
- Jateční zvířata – orgány
- Člověk – tělní tekutiny

Rostlinné tkáně

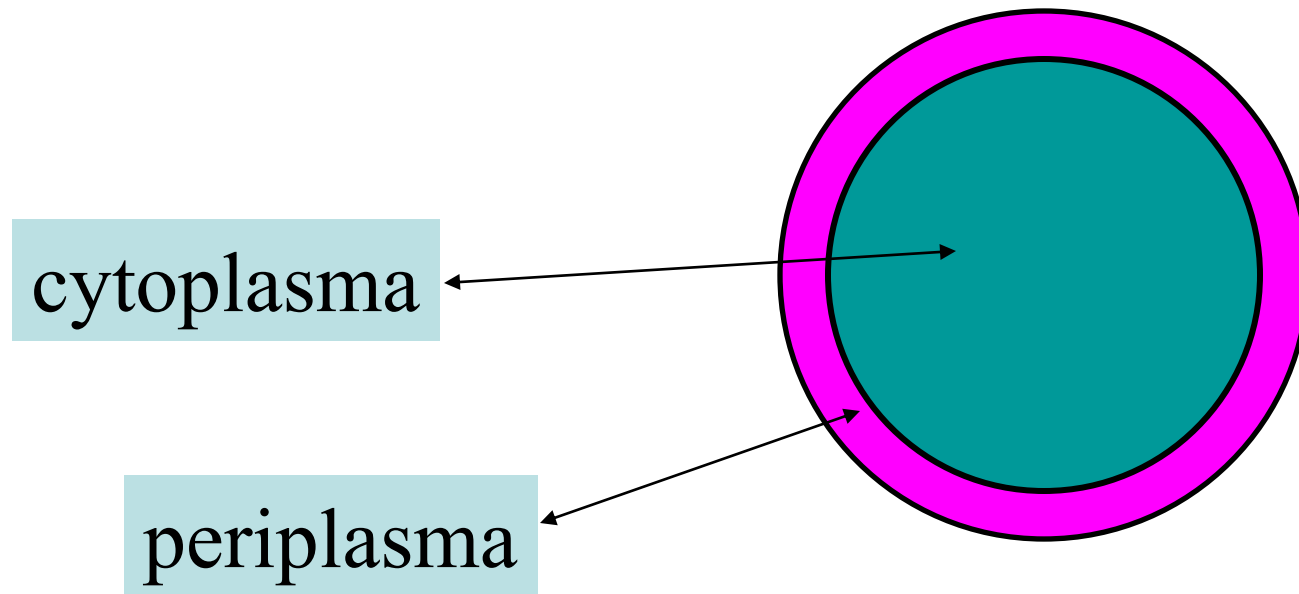
Špenát, řepa, hrách

Nevýhoda – problematický růst za
definovaných podmínek

Rozbití a extrakce

Bakterie

- Záleží na lokalizaci

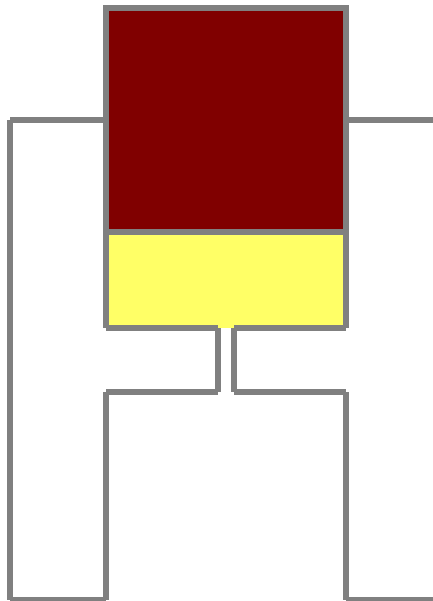


Balotina

Princip – jemné skleněné kuličky přidány do bakteriální suspenze a rychle třepány nebo míchány – nutno chladit

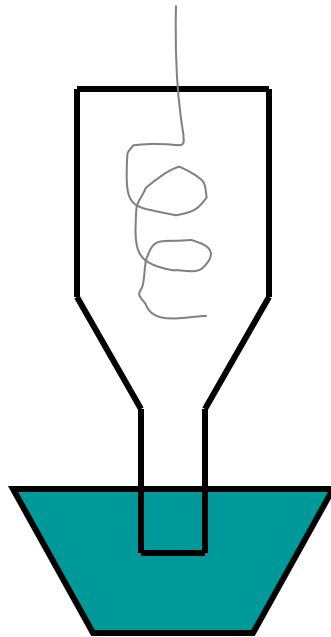
French (X) press

Princip – zmražená bakteriální suspenze
protlačována malým otvorem, přičemž
dochází k rekrystalizaci a rozrušení
buněk



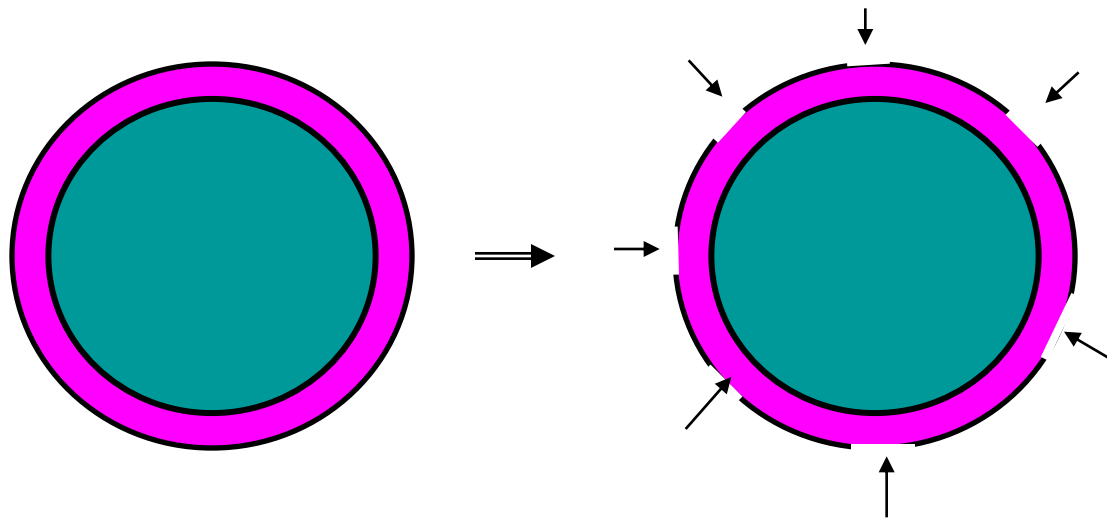
Ultrazvuk

Princip – ultrazvuk (> 20 kHz) v roztoku
vyvolává střižní síly – nutno chladit



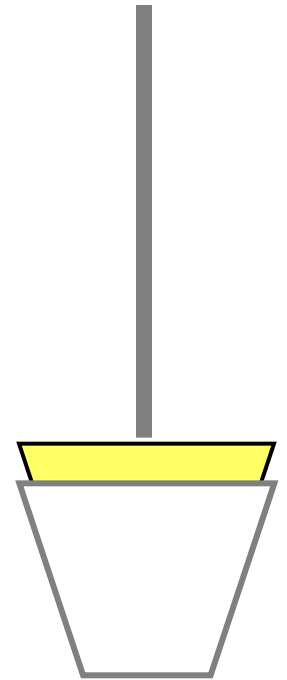
Lysozym + osmotický šok (mírný osmotický šok)

Princip – lysozym rozruší buněčnou stěnu, následně je bakteriální suspenze zředěna destilovanou H₂O – bakterie popraskají



Živočišné tkáně

- Třecí miska s pískem
- Ruční homogenizatory – Potter – Elvehjemův
- Mixery
- Osmotická lyse - erytrocyty



Rostlinné tkáně

- Rozrušení buněčné stěny pomocí celulas,
- Obsahují hodně fenolických látek, které mohou být oxidovány na chinony – melaniny, které mohou modifikovat bílkoviny

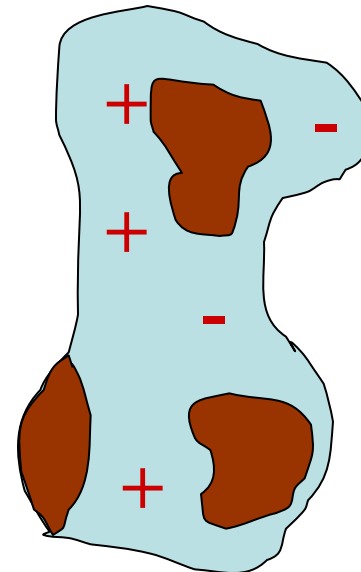
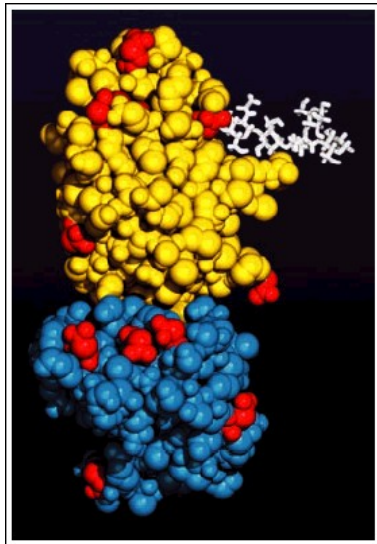
Srážecí metody

Srážení

- Nezaměňovat s denaturací – bílkoviny zůstávají v nativním stavu
- První metody používané pro separaci bílkovin – EtOH, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
- Filtrace nahrazena centrifugací

Rozpusťnost bílkoviny

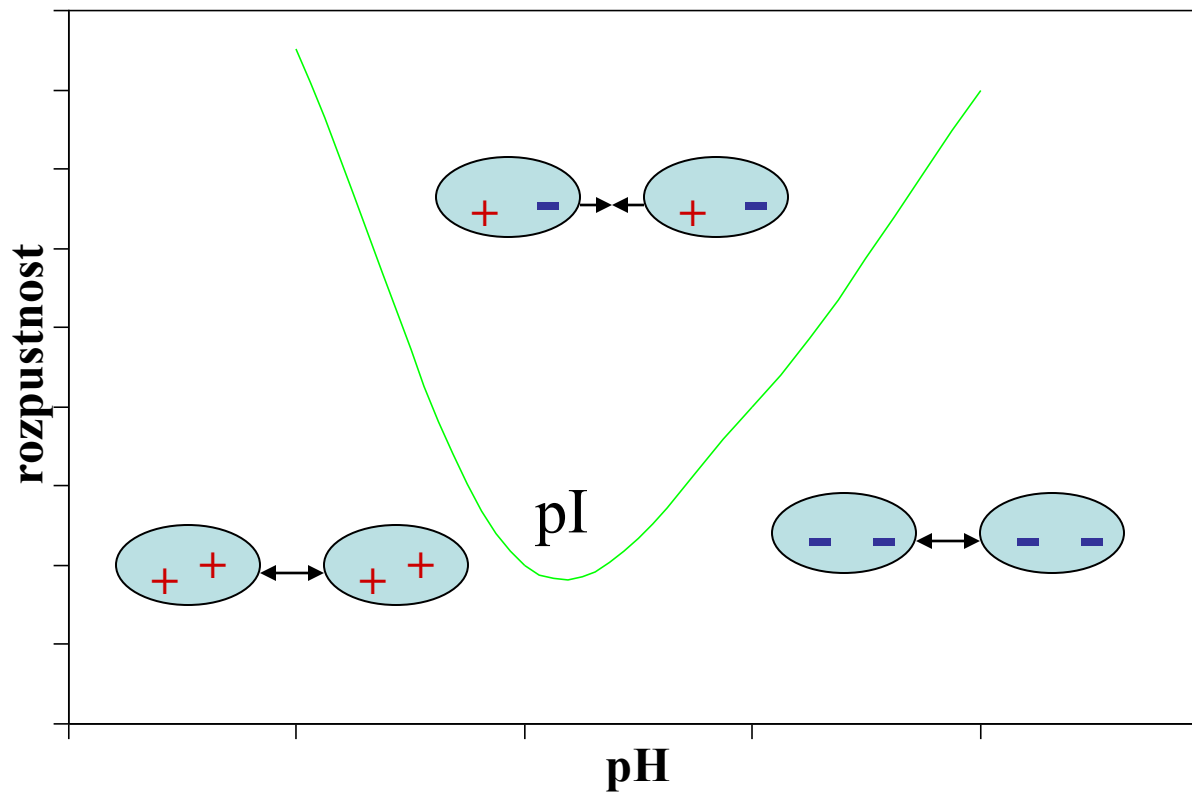
- Vlastnostmi bílkoviny – distribuce hydrofobních a hydrofilních skupin na povrchu bílkoviny



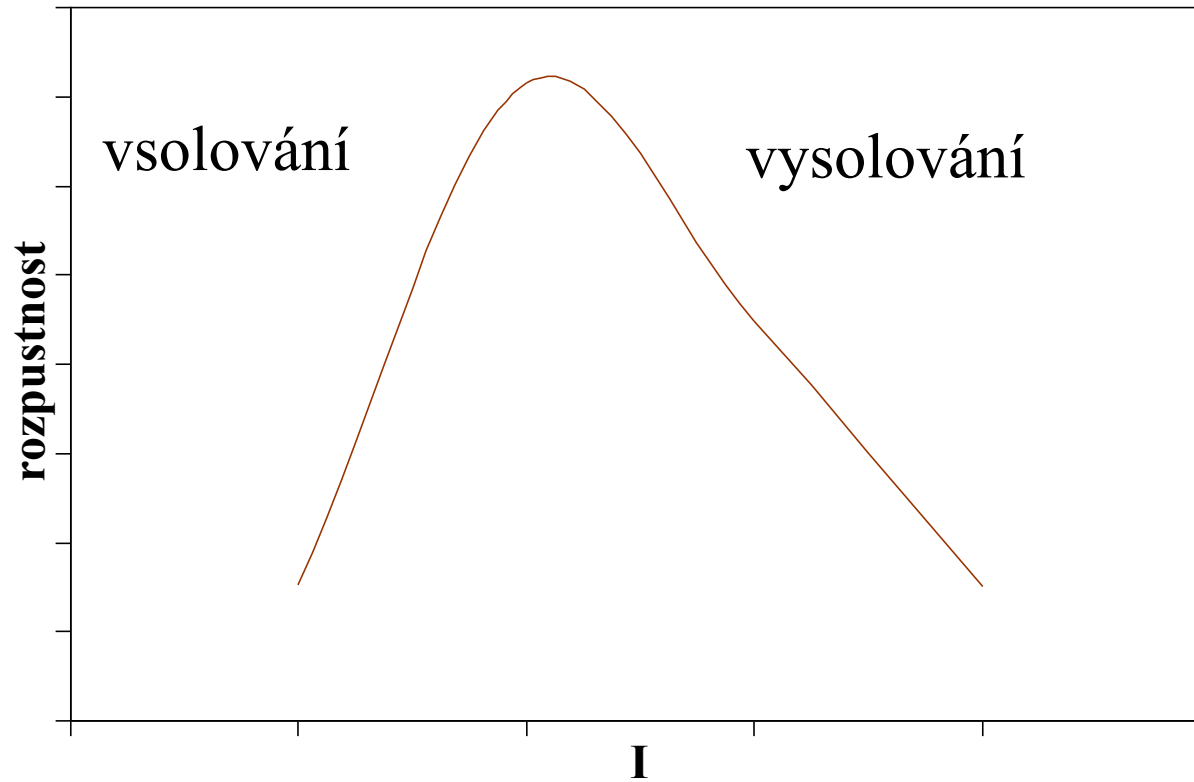
Rozpusťnost bílkoviny

- Vlastnostmi roztoku – pH, iontová síla, org. rozpouštědla, org. polymery, teplota

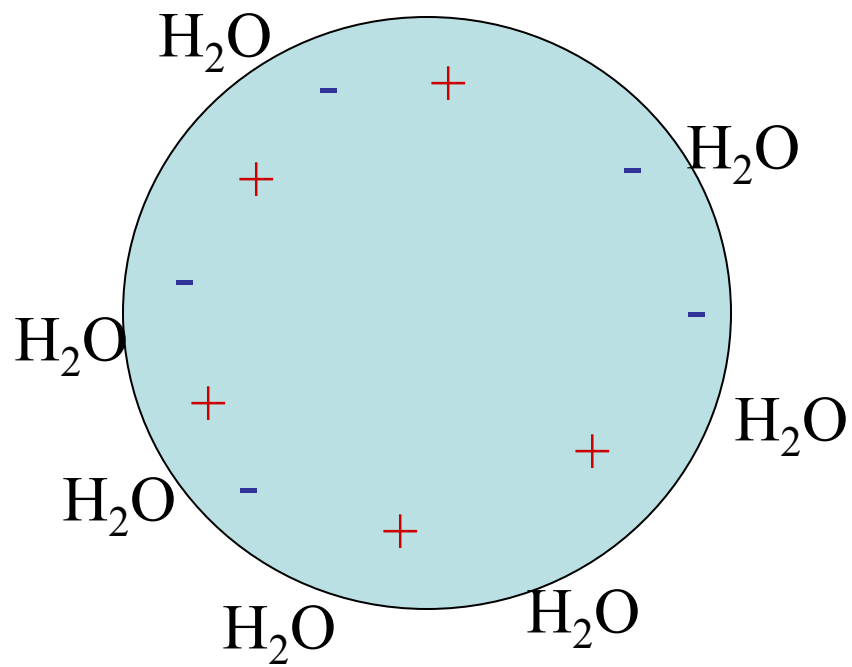
Izoelektrická precipitace



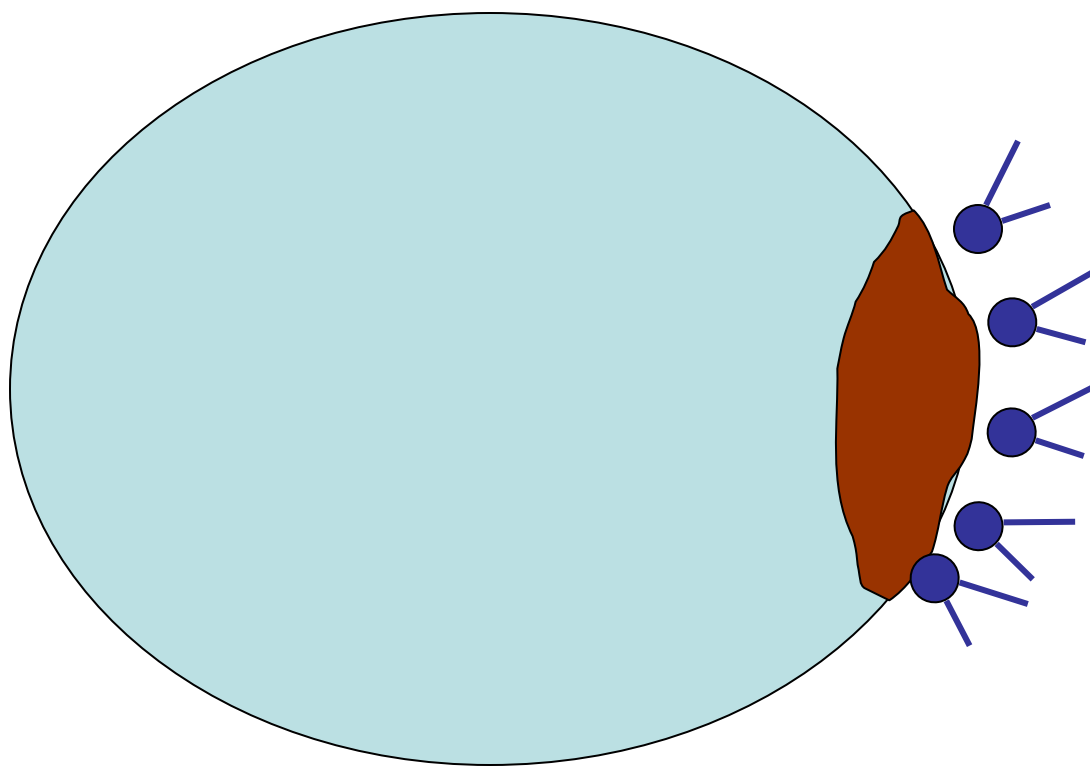
Srážení neutrálními solemi

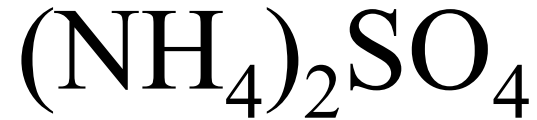


Vsolování



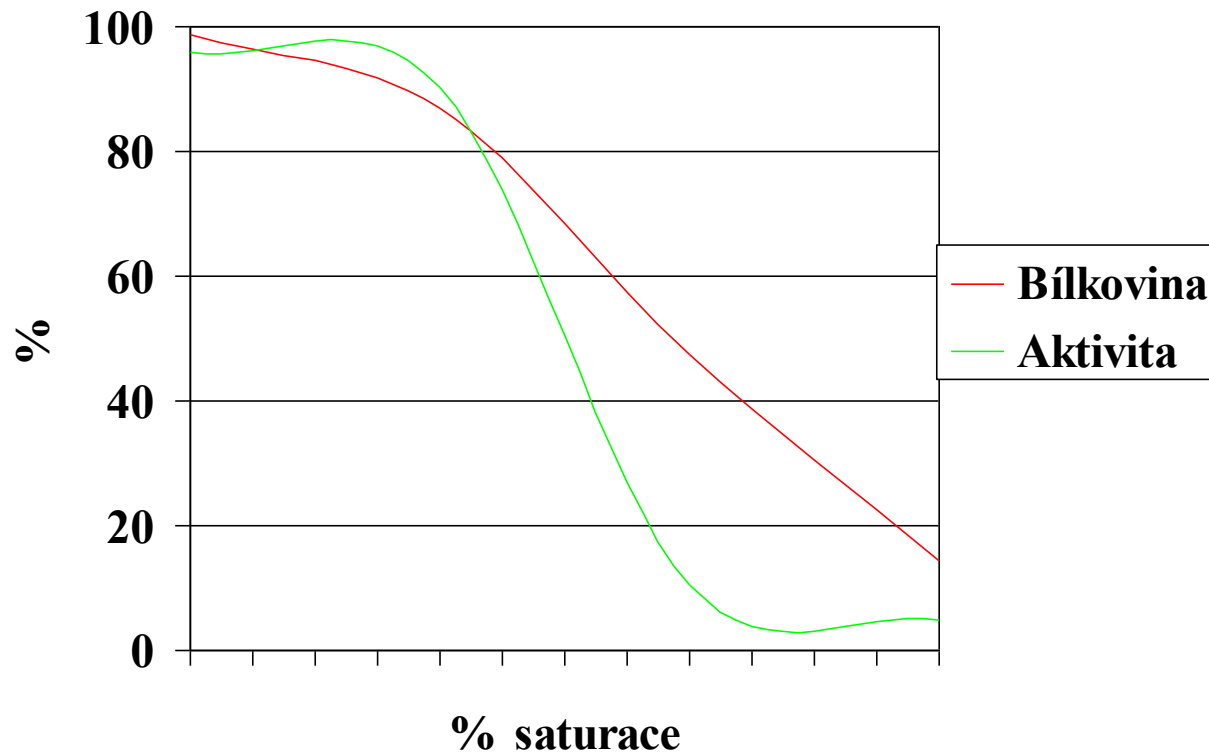
Vysolování





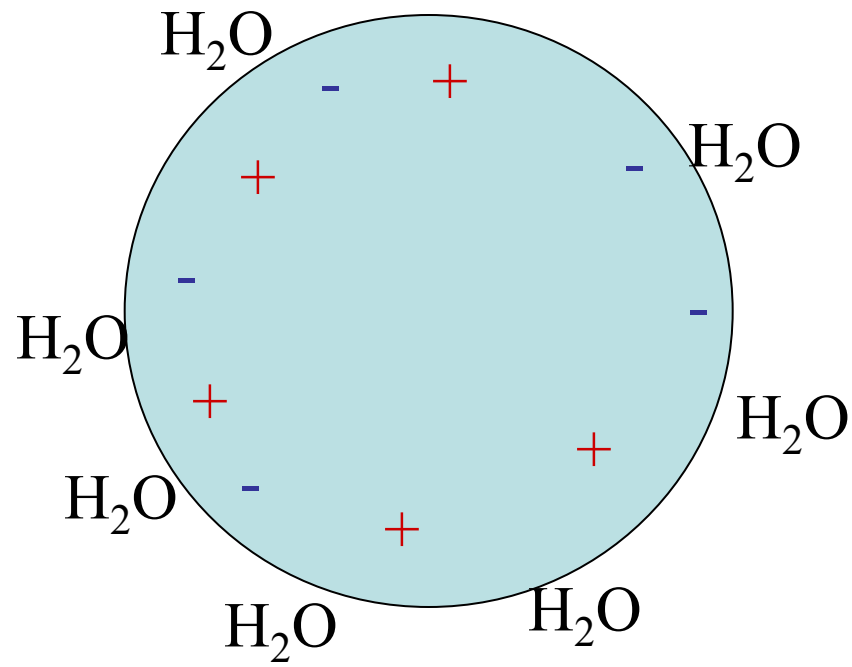
- Rozpustnost se málo mění s teplotou
- Saturevaný roztok 4 M - hustota 1,235g/cm³
umožňuje centrifugaci agregovaných bílkovin
(hustota 1,29 g/cm³)
- Levný
- Stabilizuje bílkoviny
- Relativně čistý

Srážení - dvojstupňově



Srážení org.rozpouštědly mísitelnými s vodou

- Rozpouštědla ruší solvatační obal bílkoviny



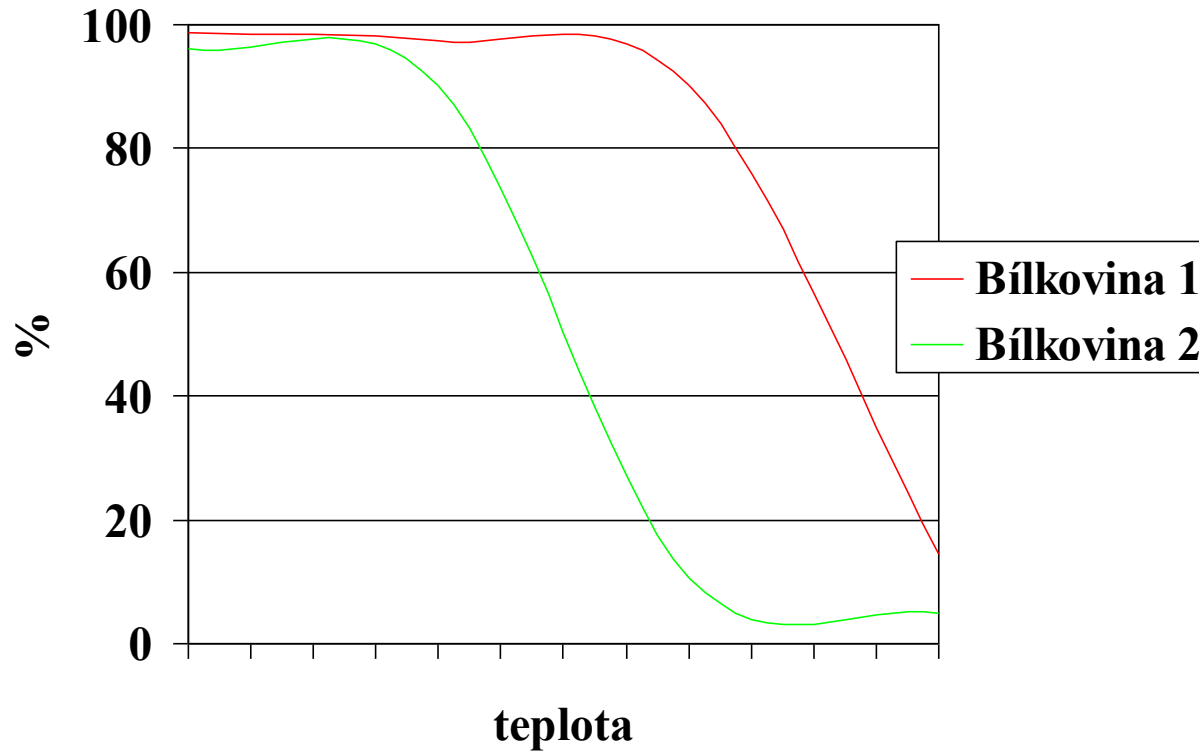
Srážení org.rozpouštědly mísitelnými s vodou

- COHN – separace plazmatických bílkovin
EtOH
- Nutno provádět při $T < 0$ °C, při větší teplotě dochází k denaturaci
- Dvojstupňově
- Přídavky z tabulky nebo podle vzorce

Srážení selektivní denaturací

- Při této metodě denaturujeme balastní bílkoviny, cílová bílkovina musí zůstat z 85 - 90 % v nativním stavu.
- Denaturační vlivy – T, pH, org. rozpouštědla
- Bílkovina musí nejen denaturovat i precipitovat

Tepelná denaturace

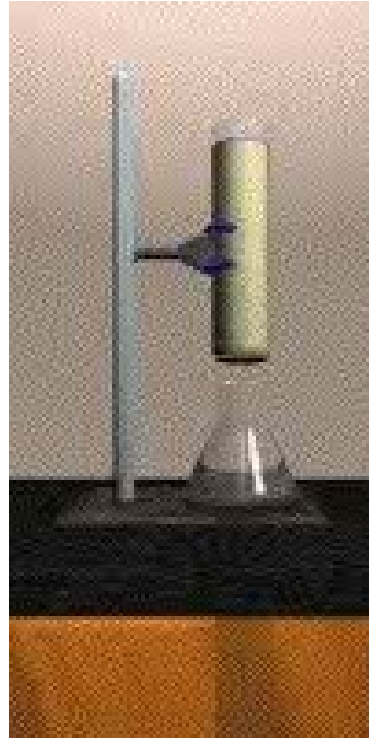


Chromatografické metody

Chromatografie

- Cvet – separace chlorofylů na CaCO_3 1903

Chromatografie



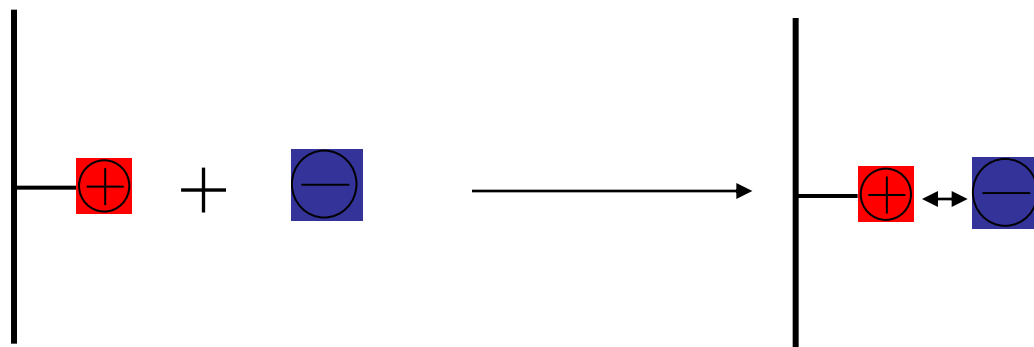
Zařízení pro LPC



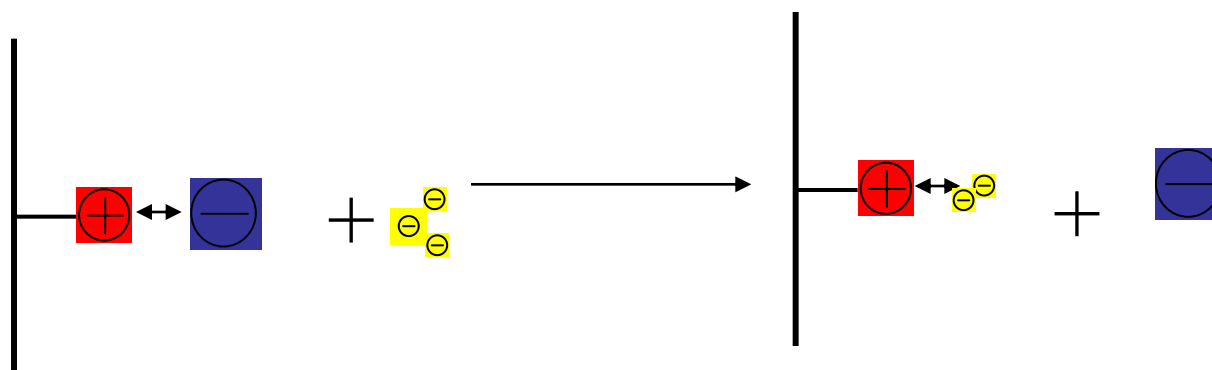
Ionexová chromatografie

elektrostatická interakce

Vazba



Eluce



Ionexy

- Katexy - - vazba kationtů

silné - sulfo(S), sulfopropyl(SP) OSO_3^-

slabé - karboxy(C), karboxymetyl(CM) COO^-

- Anexy - + vazba aniontů

silné - dietylaminoetyl(DEAE)

slabé – trietylaminoetyl(TEAE)

Ionexová chromatografie

- Nanášení vzorku – nízká iontová síla
- Eluce – gradientová
 - Zvyšováním iontové síly
 - Změnou pH
 - Afinitní eluce

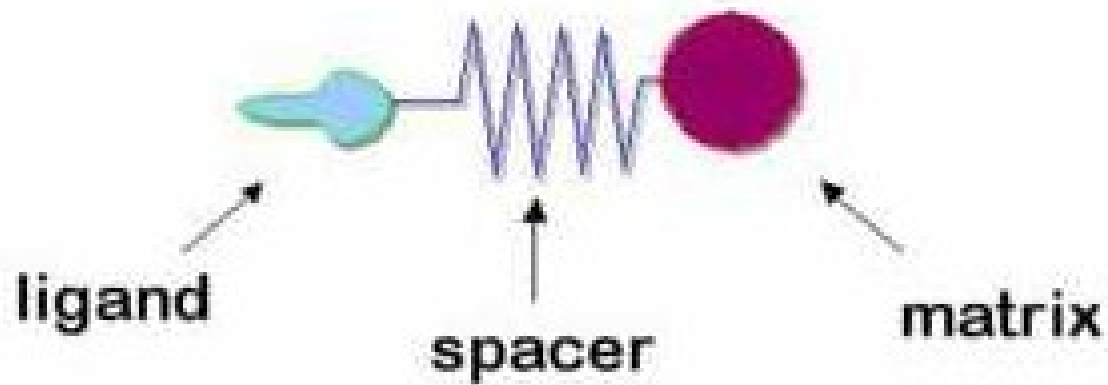
Použití – purifikace, zakoncentrování, výměna pufu

Hydrofobní chromatografie

- Stacionární fáze – - C₈, -fenyl
- Mobilní fáze – vodné roztoky
1.7 M (NH₄)₂SO₄
- Eluce – snižováním iontové síly

Použití : purifikace bílkovin

Afinní chromatografie



Afinitní páry

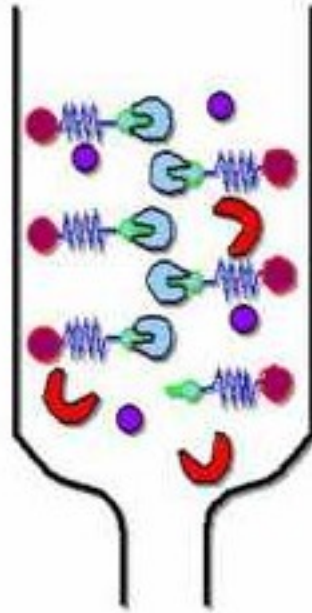
Ligand	Bílkovina	K_D (M)
antigen	polyklonální protilátka	$10^{-8} - 10^{-6}$
antigen	monoklonální protilátka	$10^{-12} - 10^{-8}$
biotin	avidin	10^{-15}
sacharid	lektin	$10^{-6} - 10^{-3}$
hormon, toxin	vazebný protein	$10^{-9} - 10^{-12}$
substrát	enzym	$10^{-7} - 10^{-3}$
inhibitor	enzym	$10^{-14} - 10^{-6}$

$$K_D = 10^{-8} - 10^{-6} \text{ M}$$

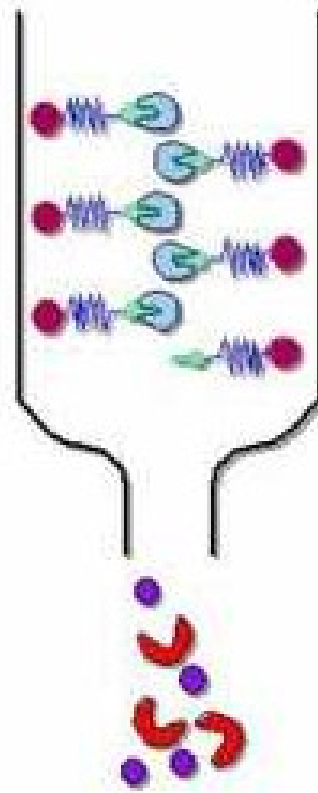
Afinní chromatografie nanesení vzorku



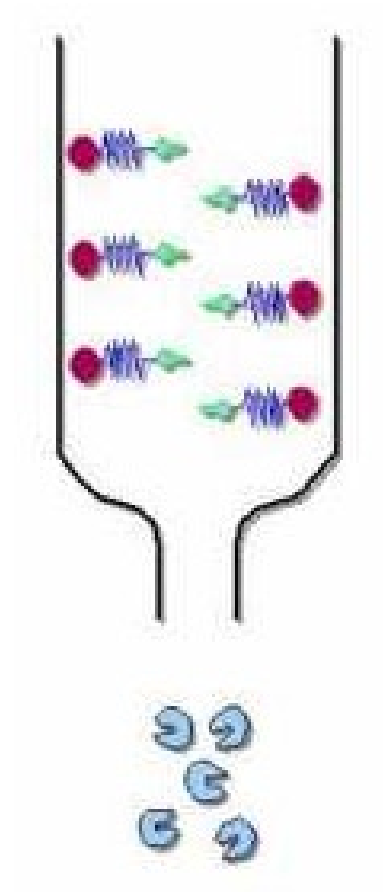
Afinní chromatografie vznik interakce



Afinní chromatografie vymytí balastů



Afinní chromatografie eluce

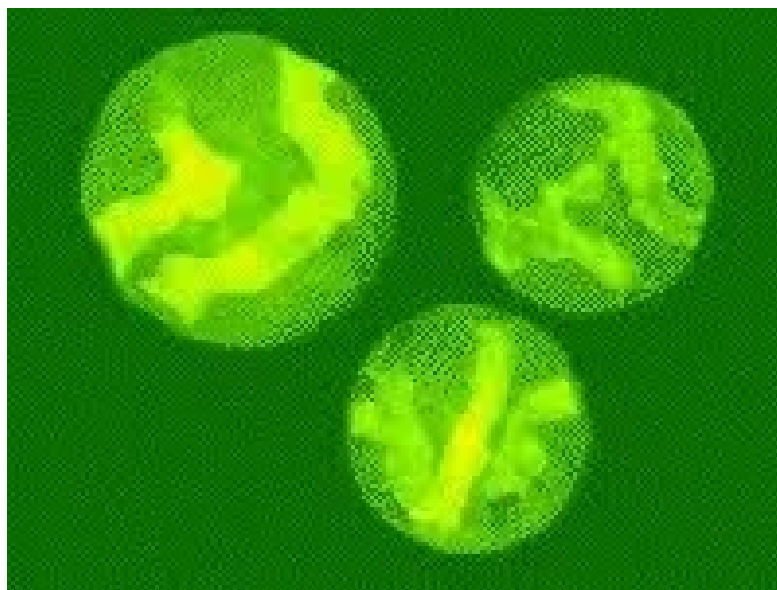


Provedení

- Nanesení vzorku – nízká iontová síla
- Eluce – selektivní - volným ligandem
 - neselektivní - změna pH, iontové síly, polarity

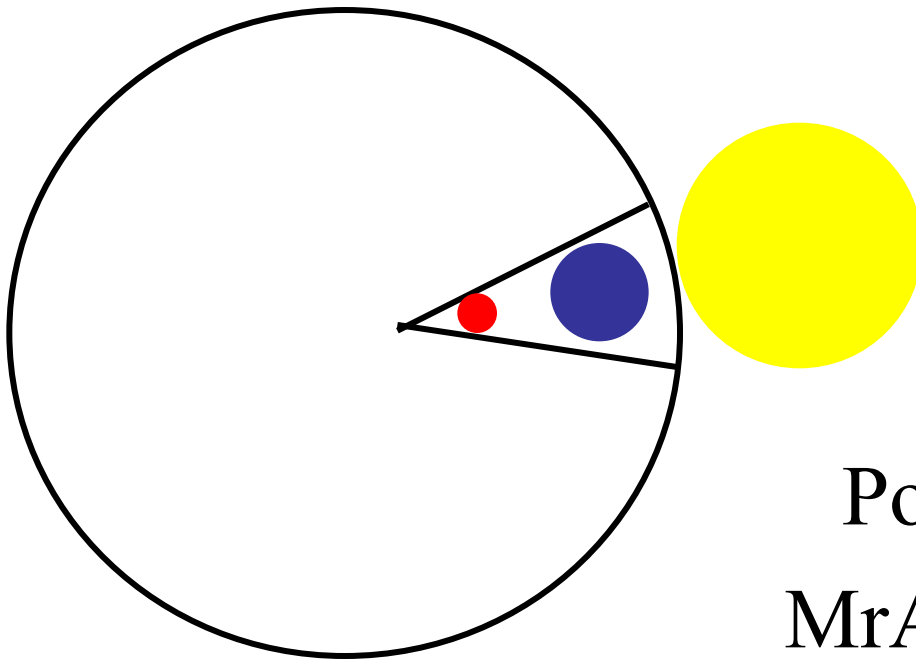
Použití : analytické (stanovení K), purifikace

Gelová permeační chromatografie



Gelová permeační chromatografie

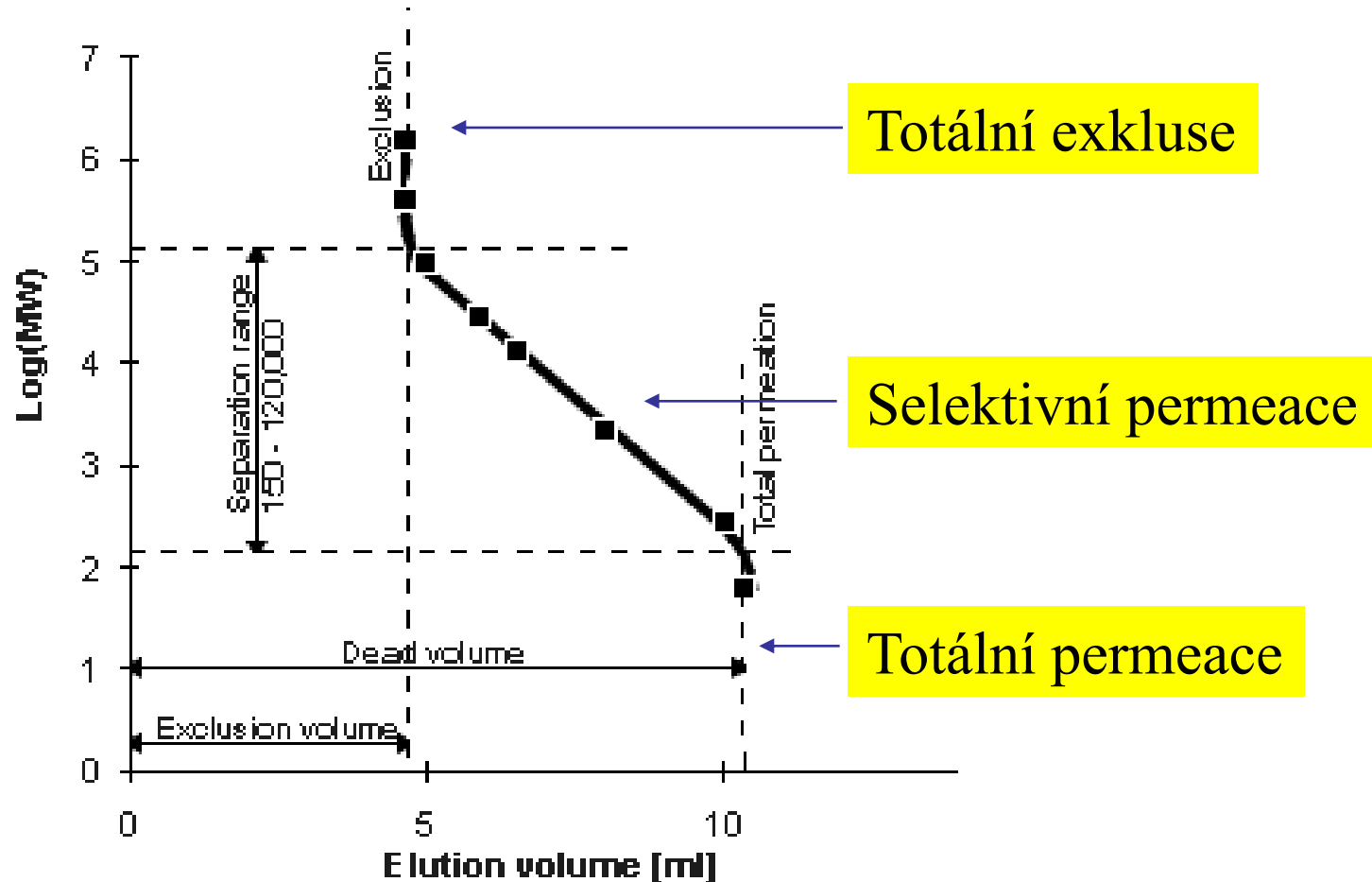
Princip - stérická exkluze
- omezená difuze



Pořadí eluce :

$MrA > MrB > MrC$

Gelová permeační chromatografie



Gelová permeační chromatografie

- Nanášení vzorku – objem vzorku $< 2\%$
objemu kolony
- Eluce – izokratická

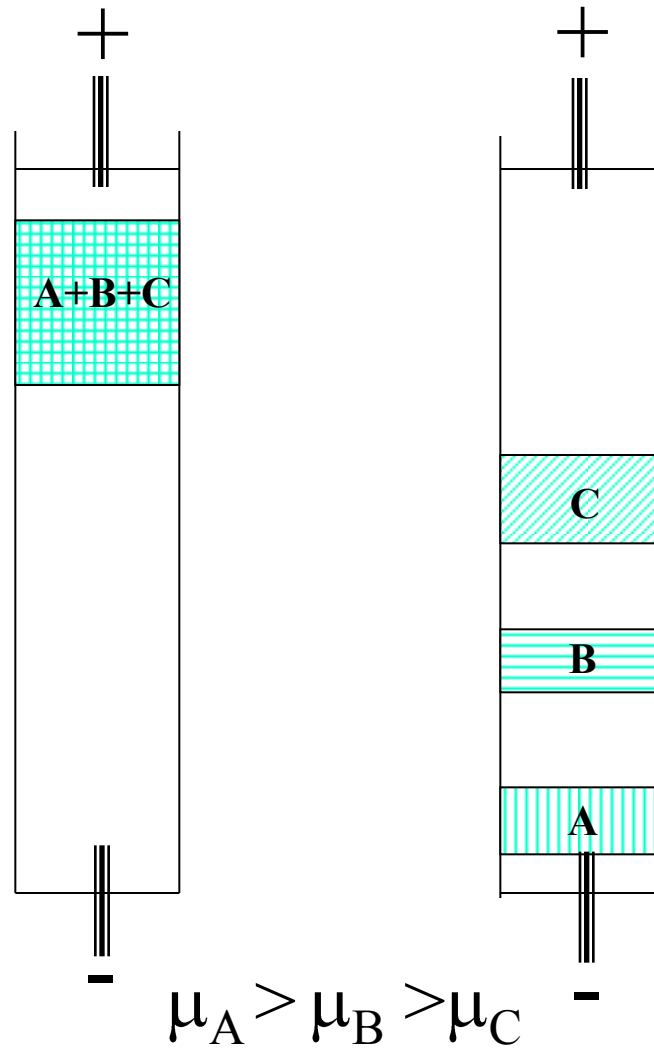
Použití : stanovení Mr, odsolování, purifikace

Elektromigrační metody

Podstata

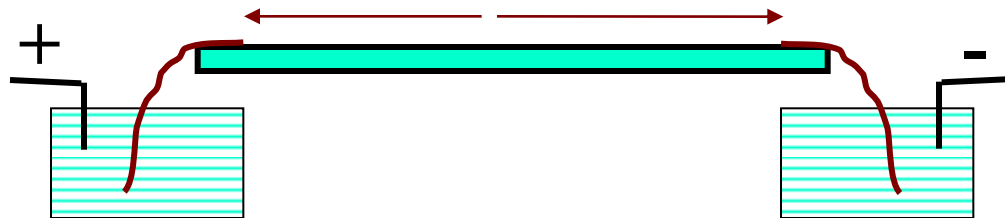
*„Pohyb elektricky nabitých částic
v elektrickém poli“*

Zónová elektroforéza



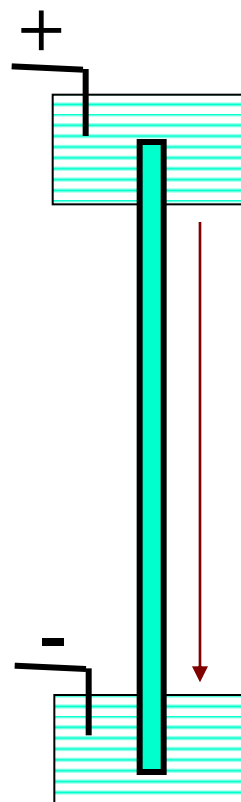
Upořádání

Horizontální



Upořádání

Vertikální



Polyakrylamid

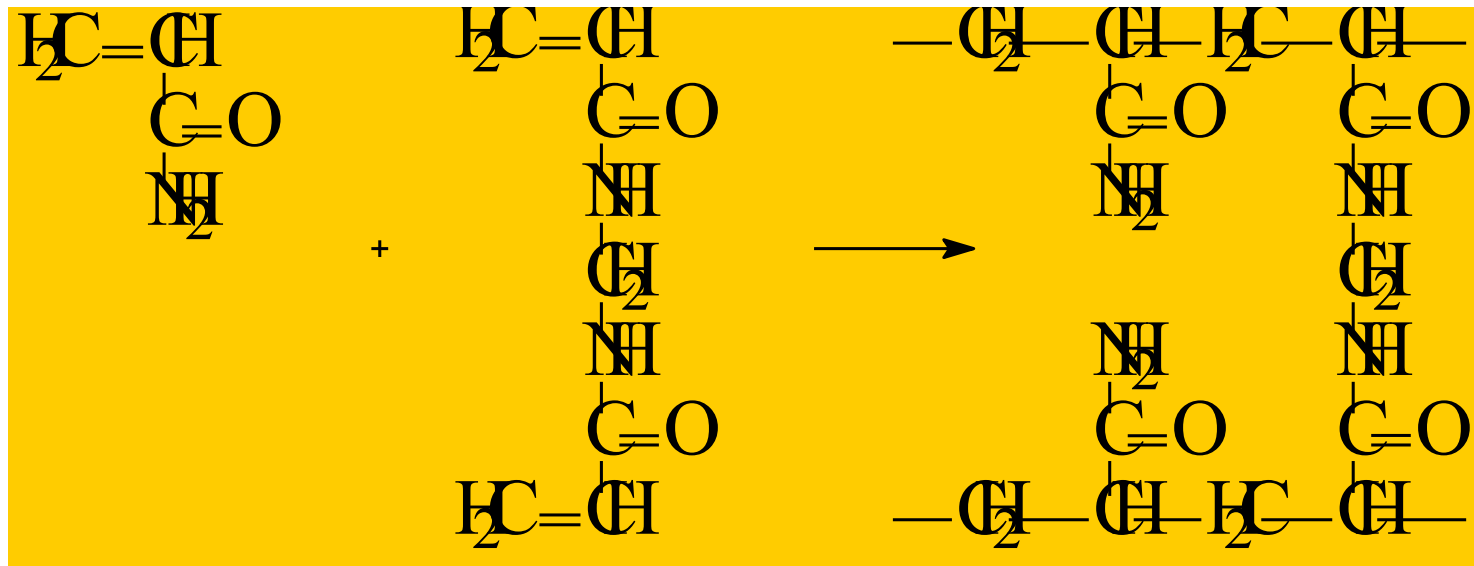
Složení – kopolymer akrylamidu a
N,N,- methylenbisakrylamidu

+ plně splňuje požadavky

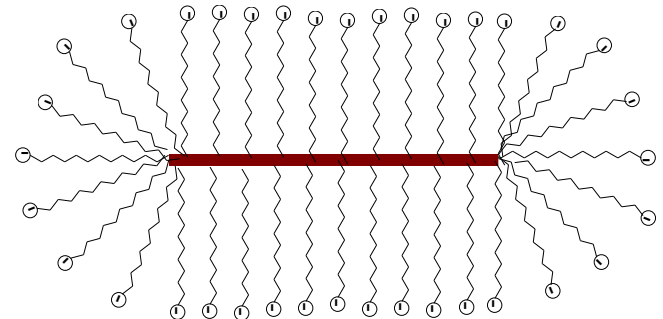
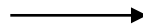
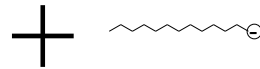
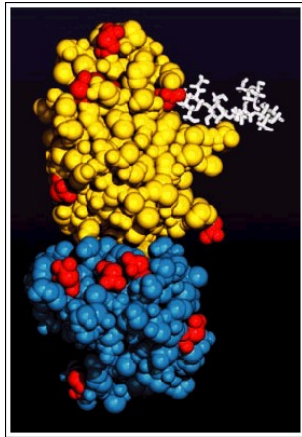
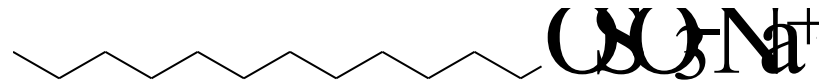
- Monomery jsou neurotoxiny !!!!!

Použití : analýza bílkovin

Polyakrylamid

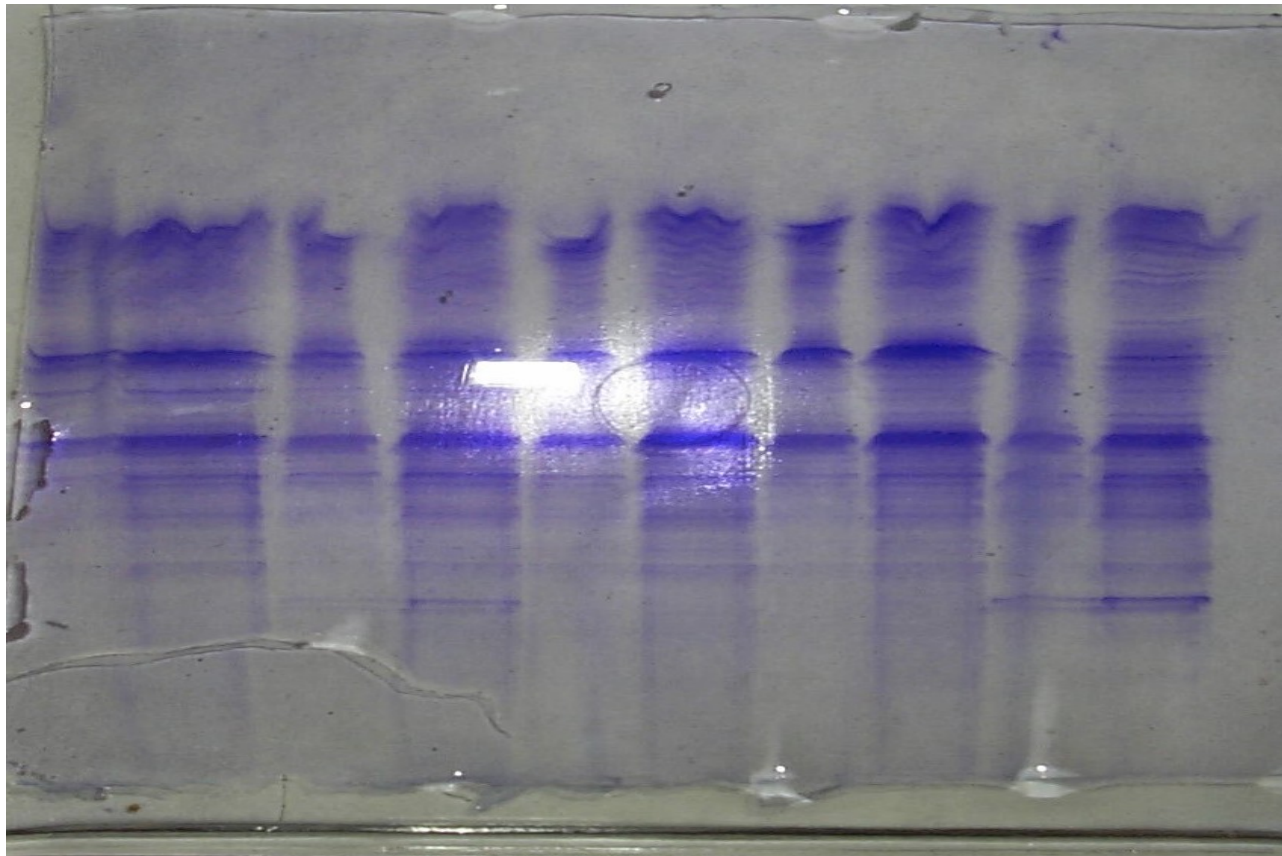


SDS PAGE

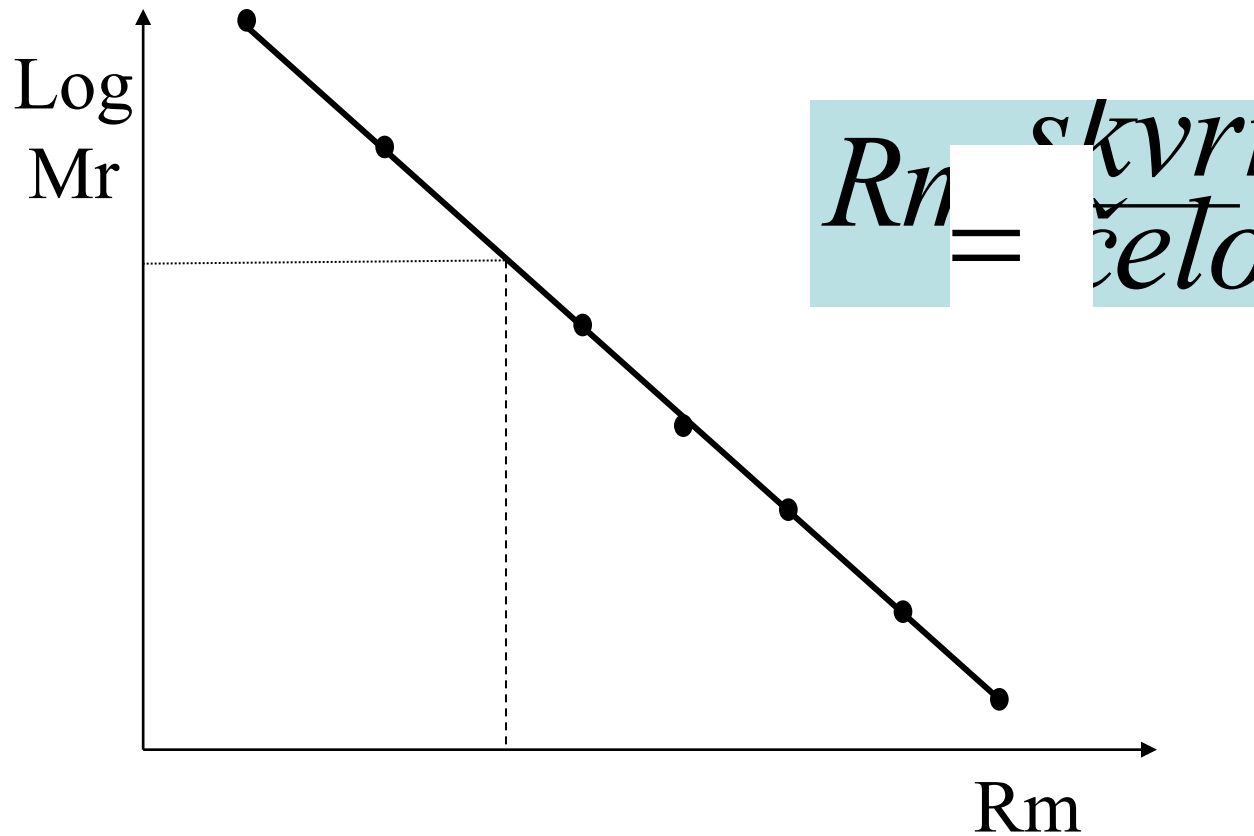


1 g bílkoviny váže 1.4 g SDS \Rightarrow
uniformní náboj na jednotku MW

SDS PAGE



Stanovení Mr pomocí SDS PAGE



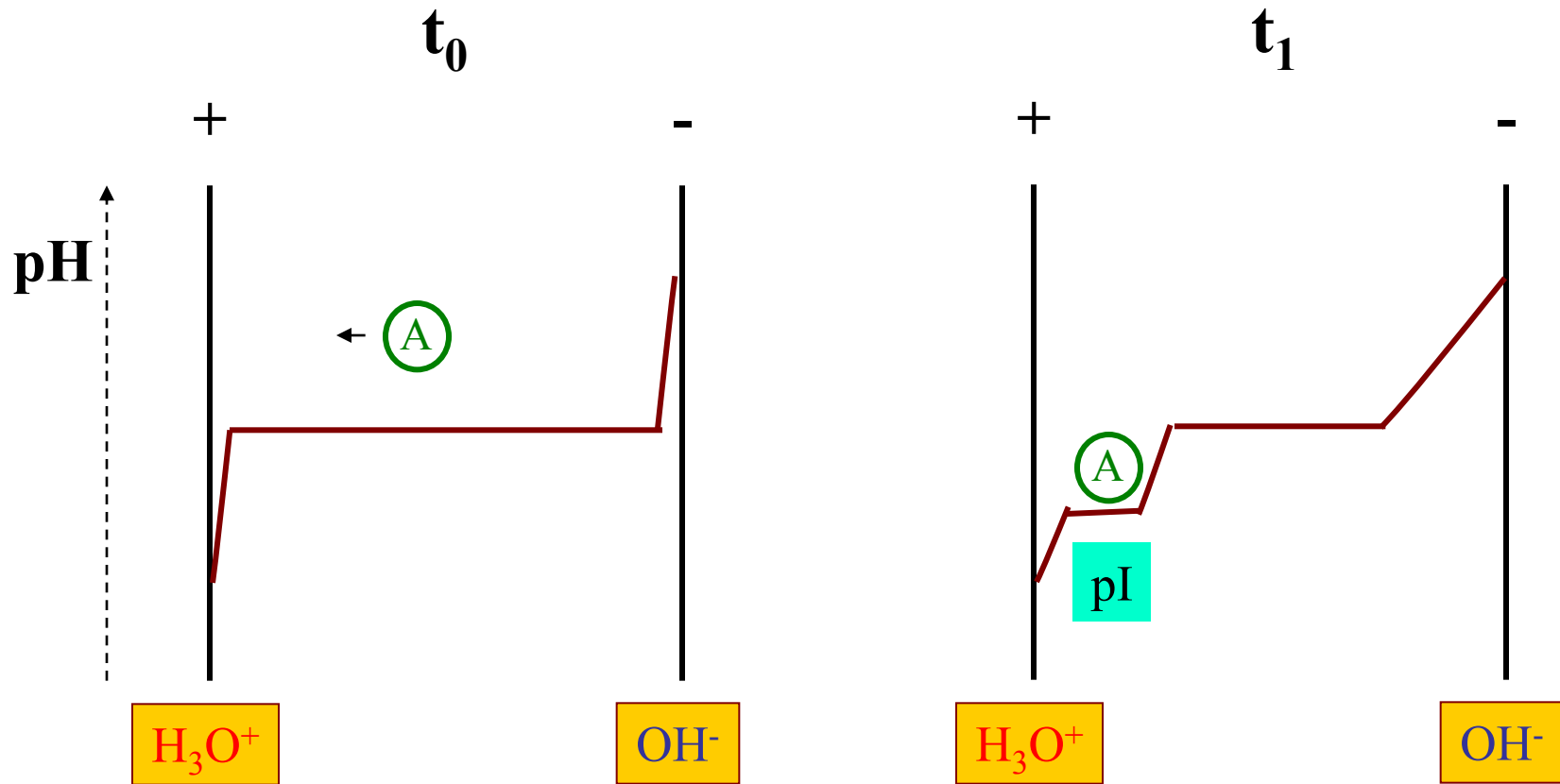
Stanovení Mr pomocí SDS PAGE - standardy



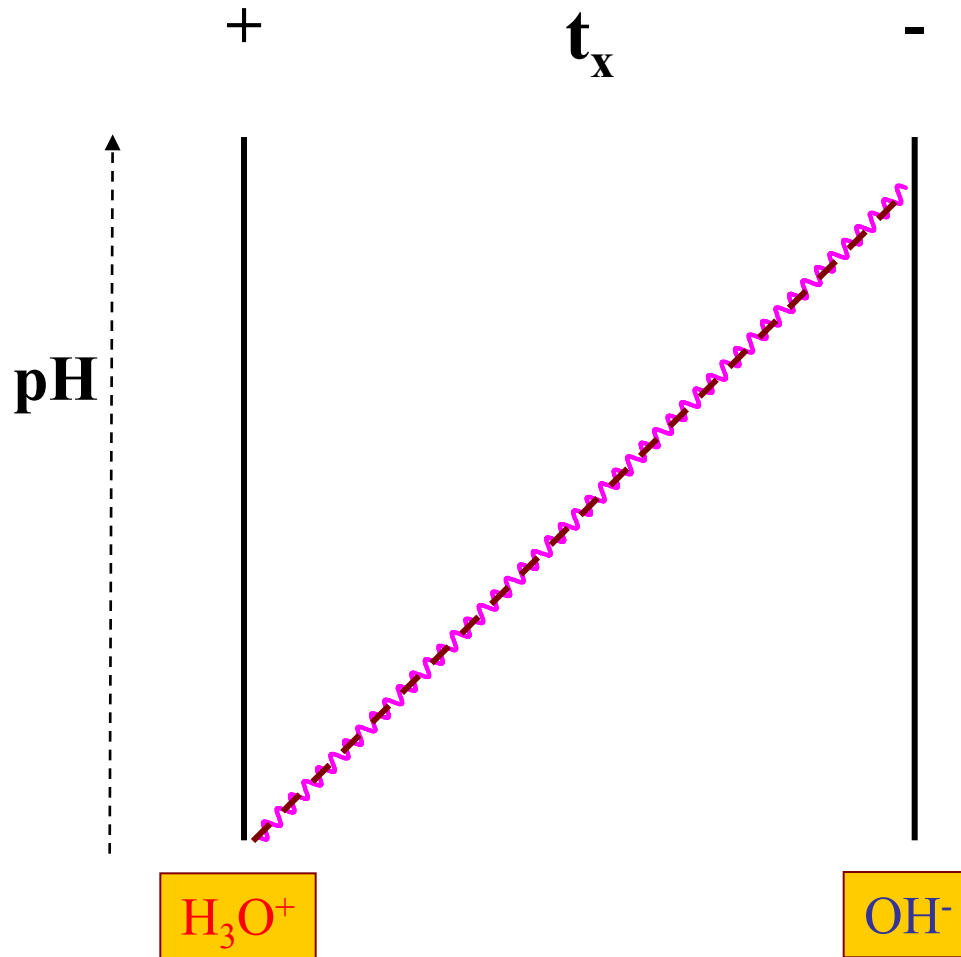
Izoelektrická fokusace

„Elektroforéza v gradientu pH, částice jsou separovány podle svých pI“

Izoelektrická fokusace



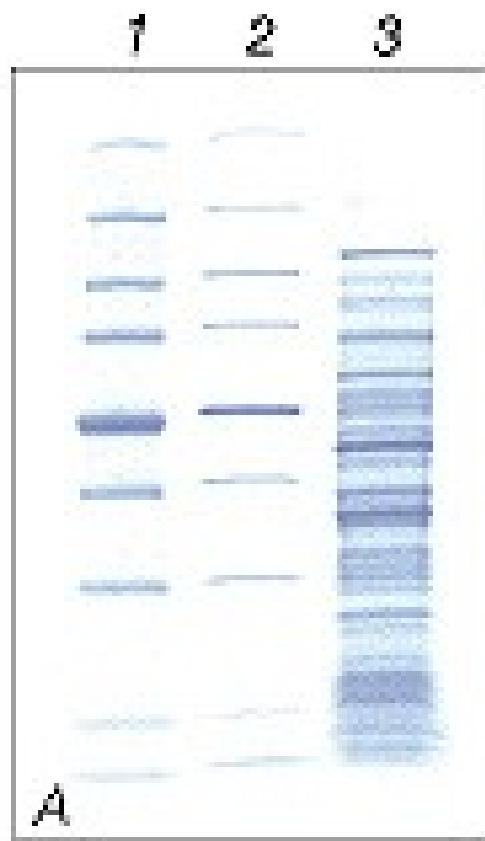
Izoelektrická fokusace



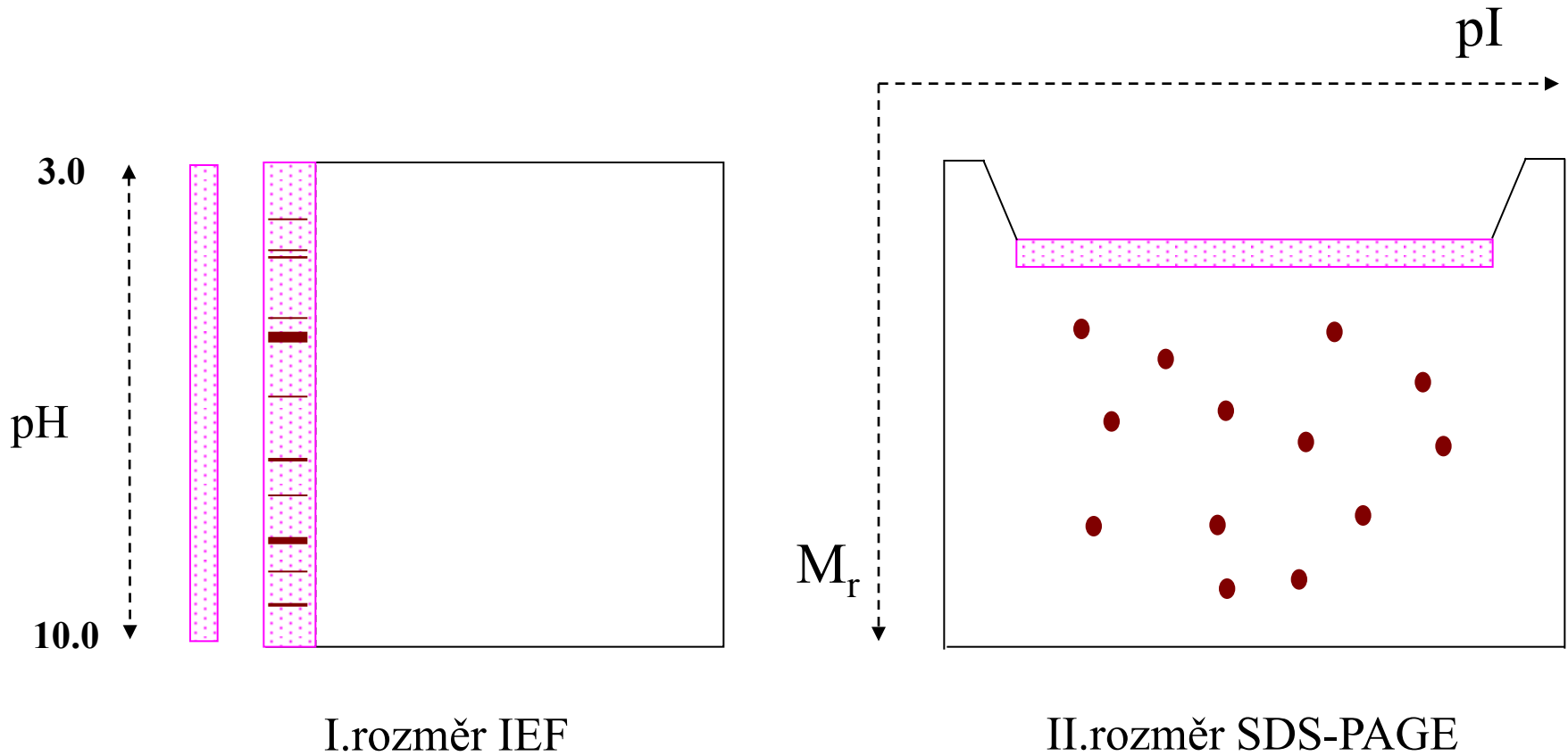
Izoelektrická fokusace analytická

- Provedení - v gelech – PAGE, agarosa
- Použití - sledování komplexních směsí
 - izoenzymové složení
 - stanovení pI – rozřezání a eluce
 - μ pH elektrody
 - pI standardy

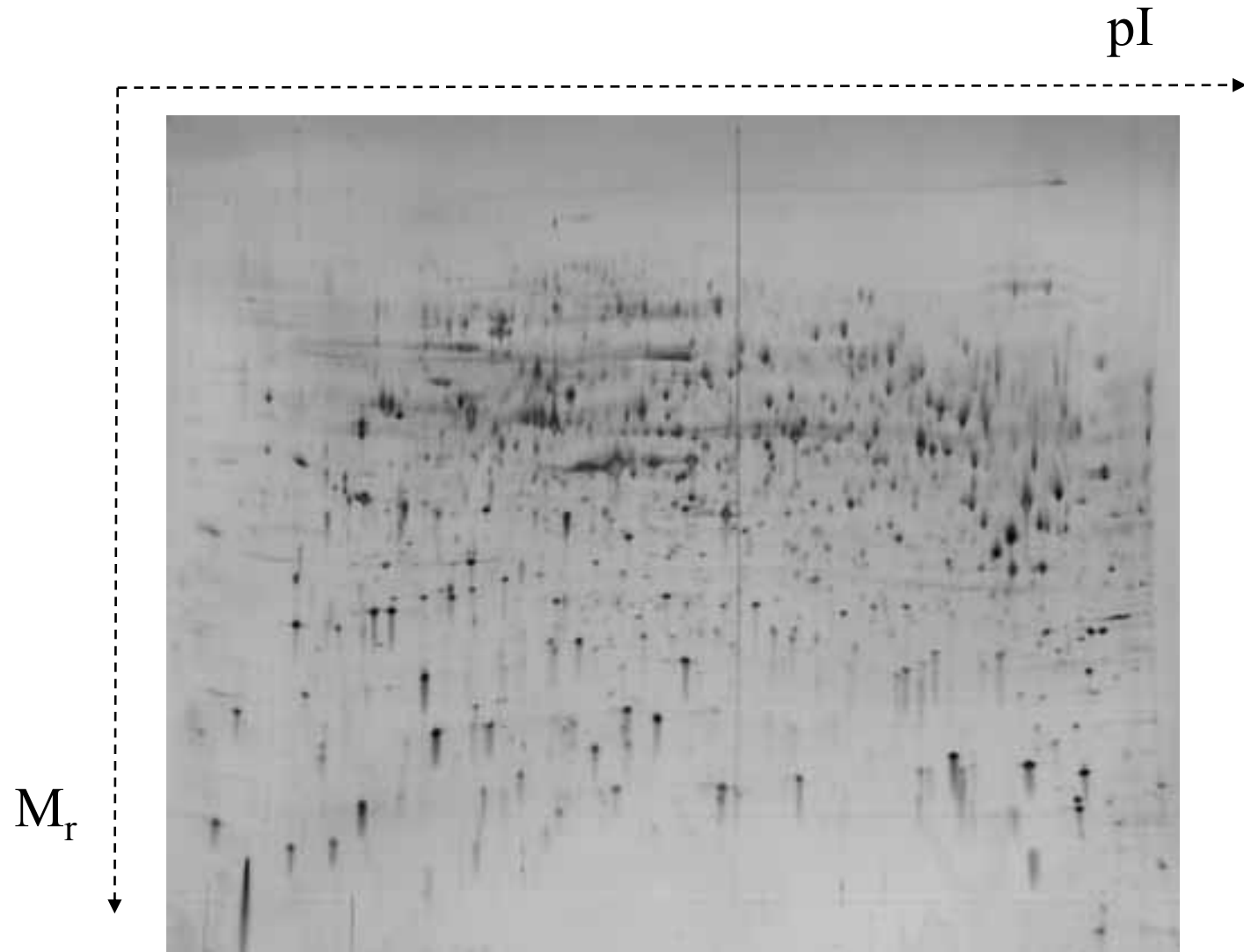
Izoelektrická fokusace analytická



Dvojměrná elektroforéza



Dvojmrozměrná elektroforéza



5. Charakterizace - stanovení pI, MW, UV VIS spektra, CD spektra,
fluorescenční spektra, AMK analýza a sekvenace, krystalizace -
RTG analýza, NMR spektra

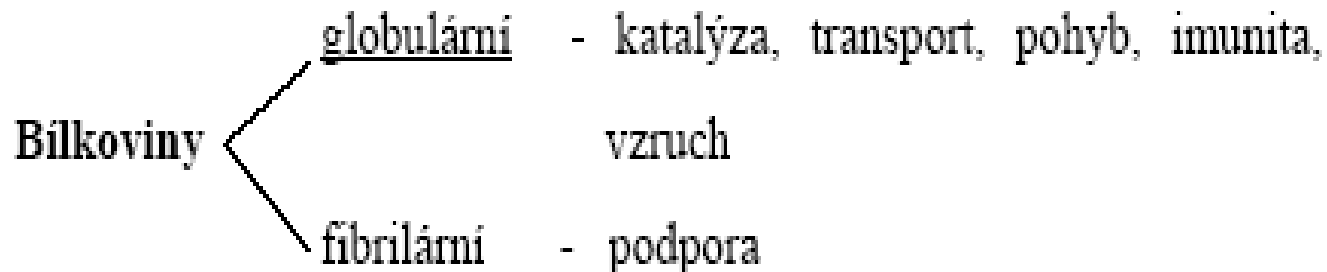
Rozdělení bílkovin

Podle celkového tvaru molekuly

A. Vláknité - fibrilární bílkoviny - SKLEROPROTEINY

kolagen, $\alpha + \beta$ keratin, elastin

B. Kulovité - globulární bílkoviny - SFEROPROTEINY



Podle chemického složení

A. Jednoduché

B. Složené ⇒ prosthetická skupina + apoprotein

Fosfoproteiny - H_3PO_4

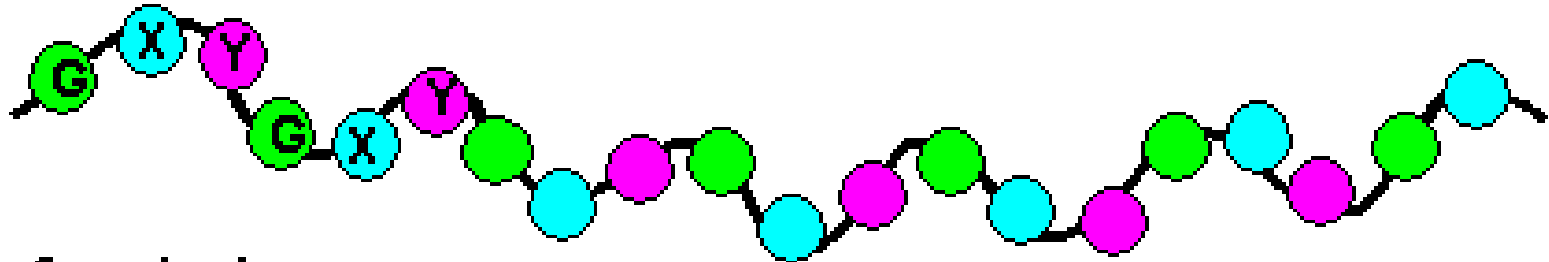
Glykoproteiny - cukry

Metaloproteiny - kovy

Lipoproteiny - lipidy

Nukleoproteiny - nukleové kyseliny

Collagen α -chain primary structure

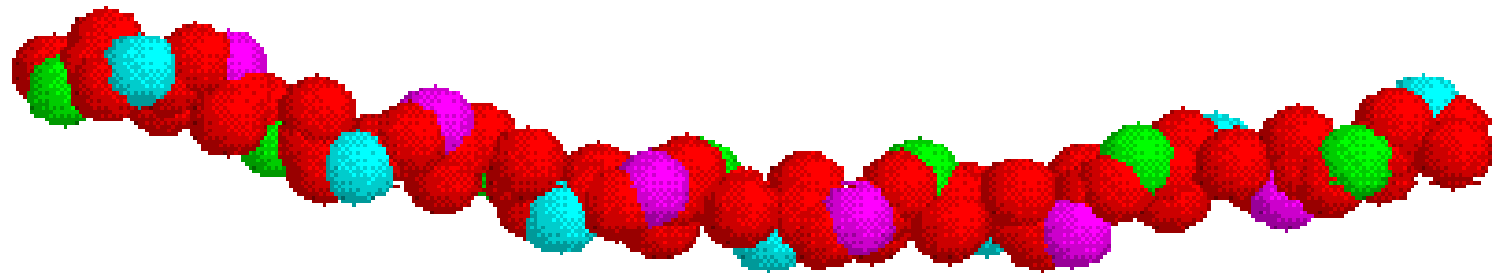


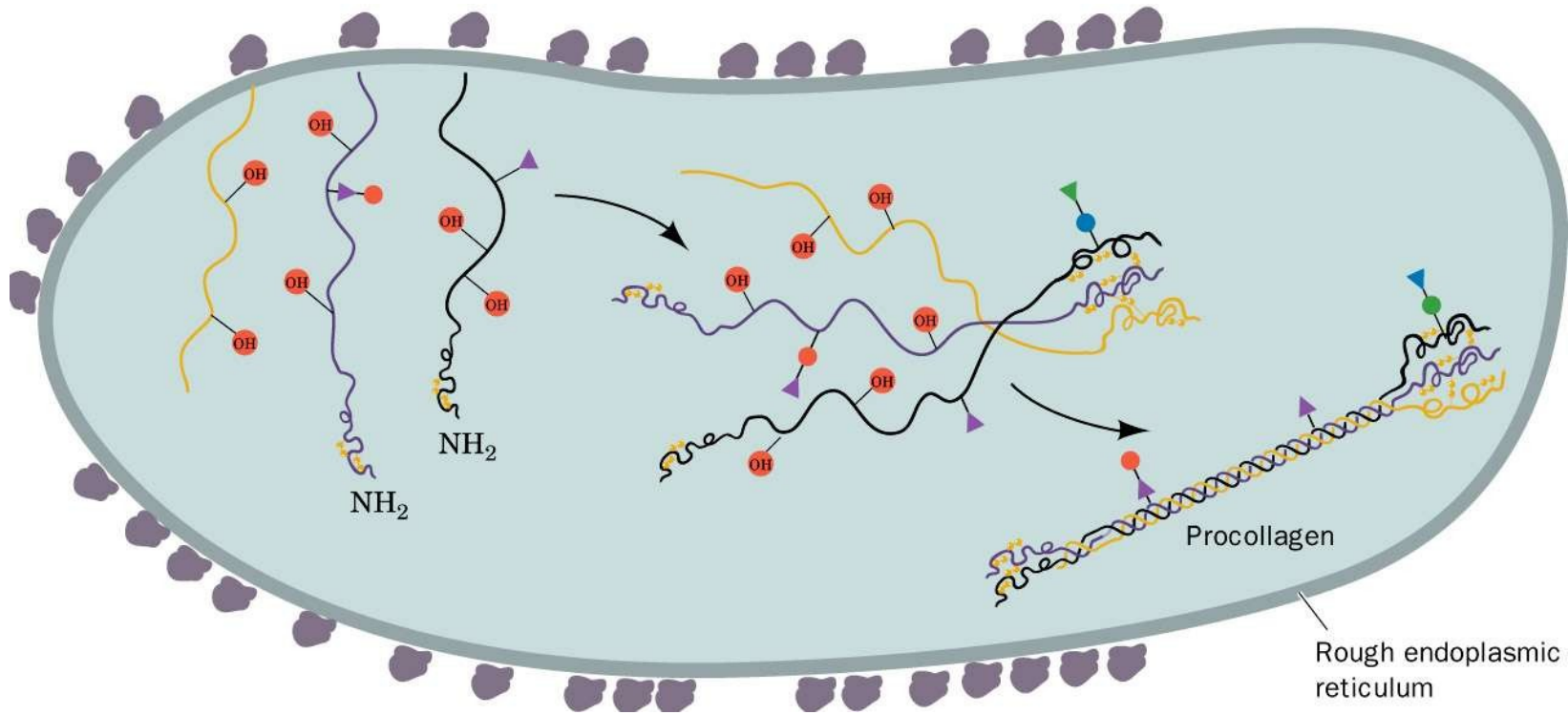
G - glycine

X - proline or other amino acid

Y - hydroxyproline or other amino acid

-Gly-X-Y- triplet repeats

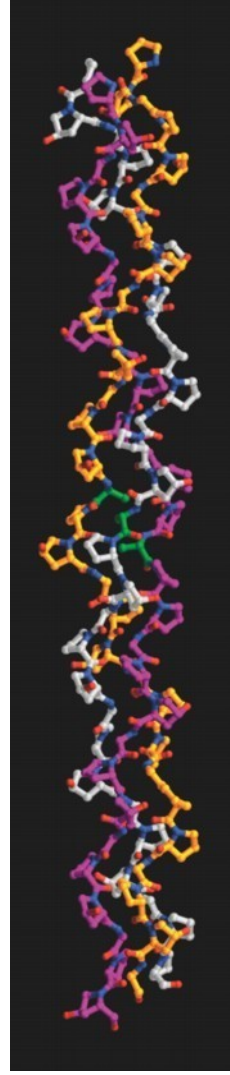




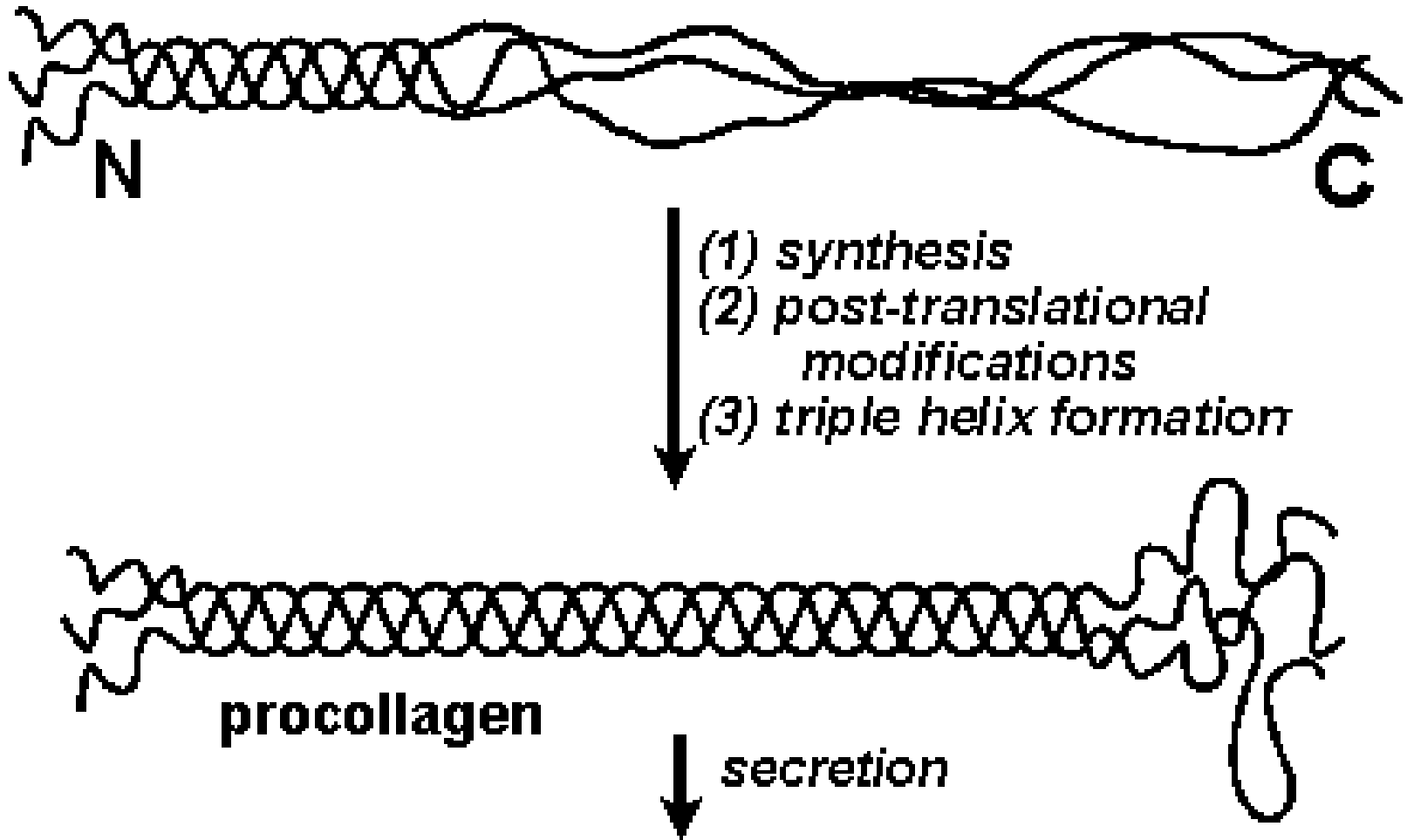


©
IRVING
Geis

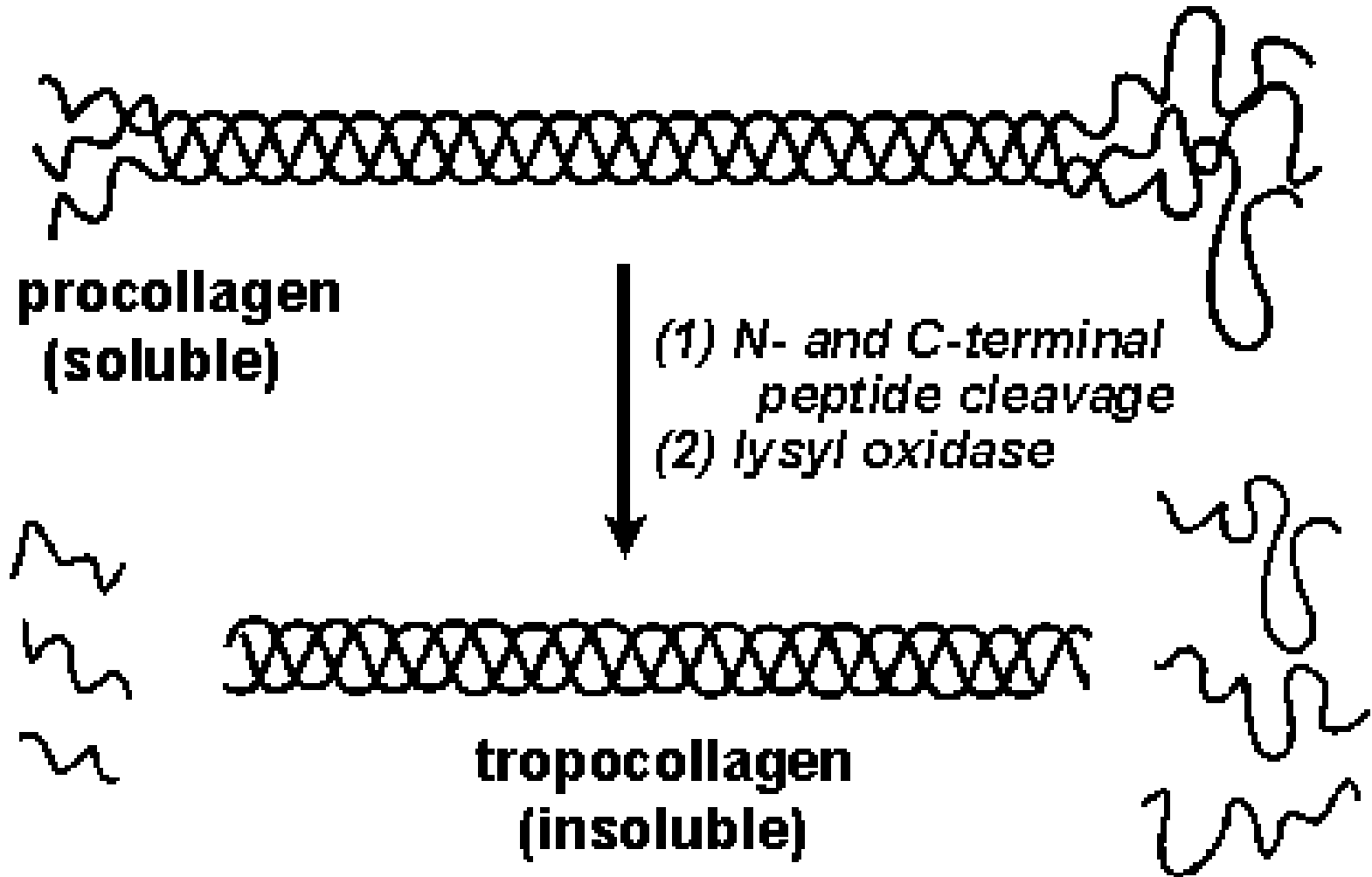
Irving Geis/Geis Archives Trust. Copyright Howard Hughes Medical Institute. Reproduced with permission.



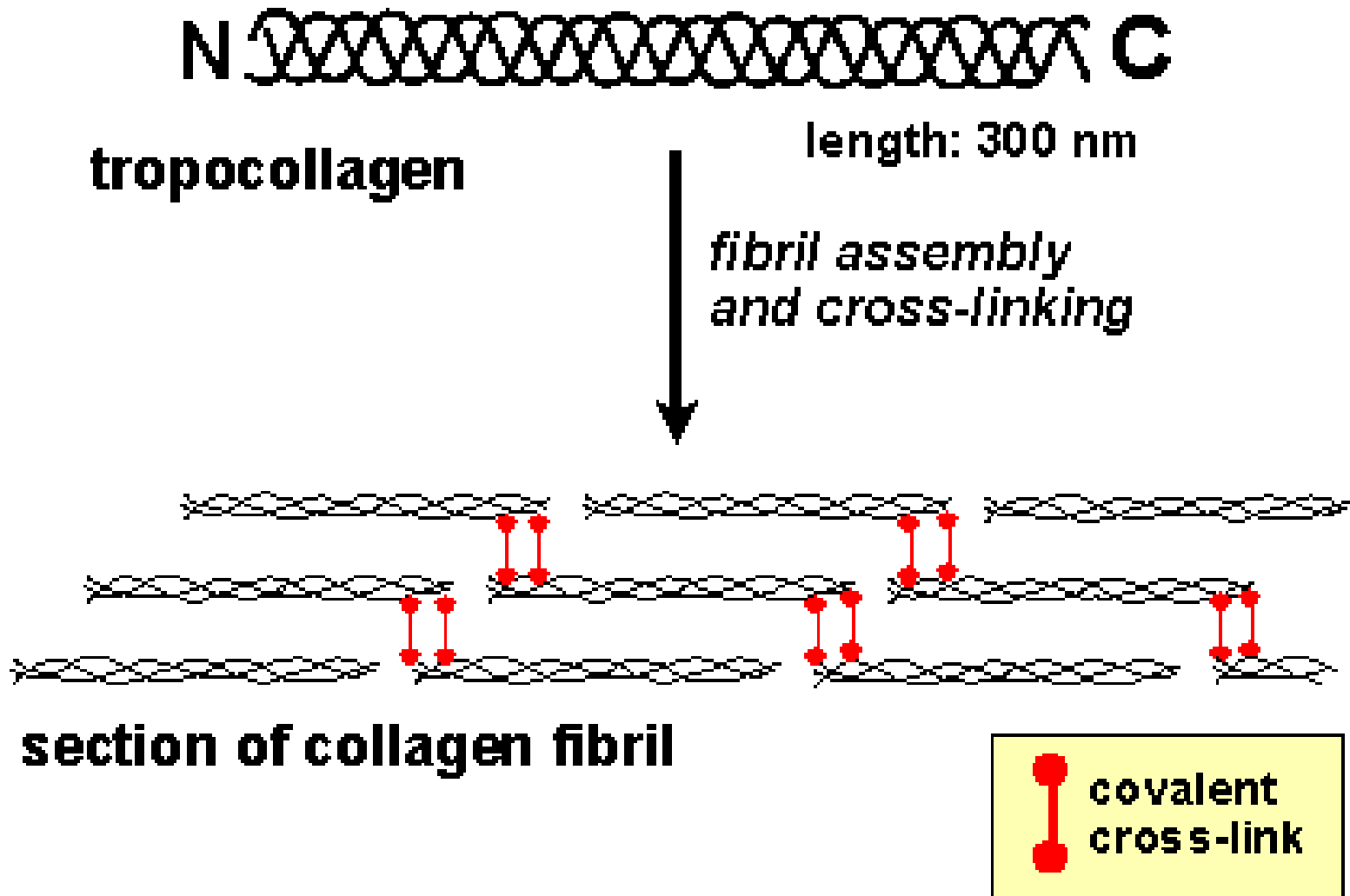
Formation of collagen: intracellular processing



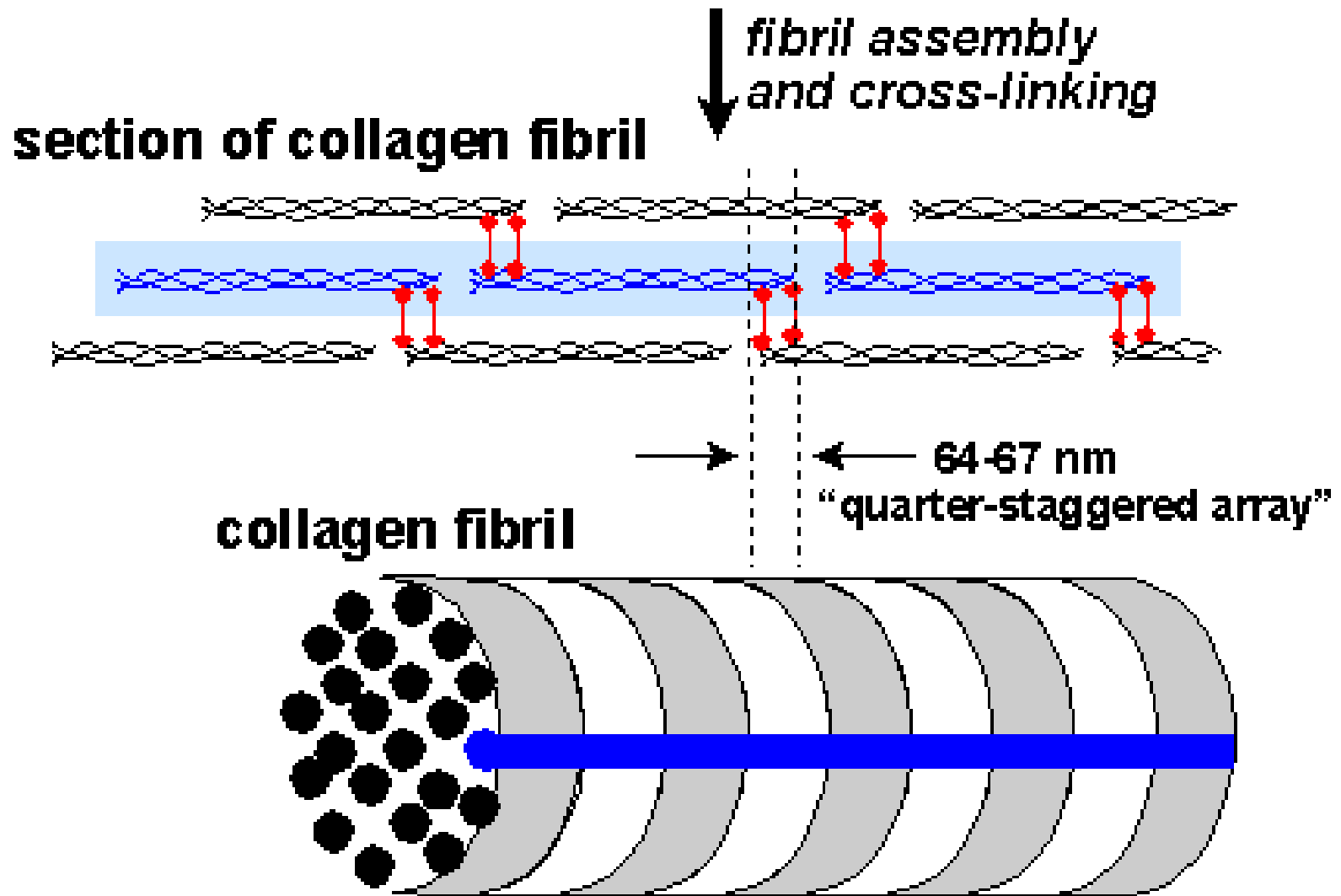
Formation of collagen: extracellular processing



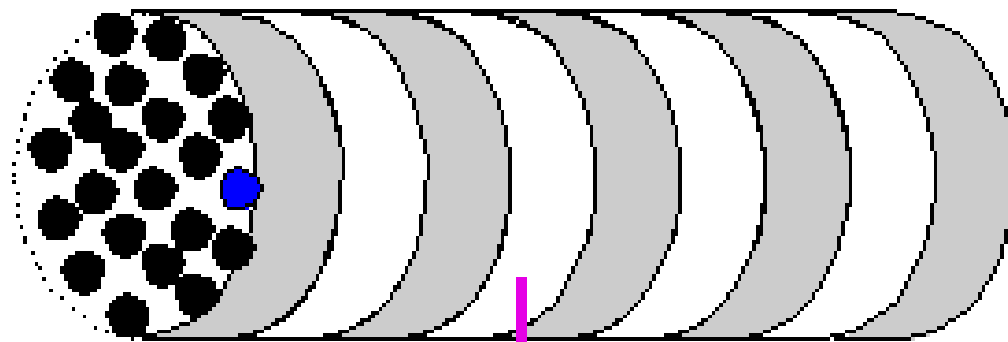
Formation of collagen: extracellular processing



Formation of collagen: extracellular processing



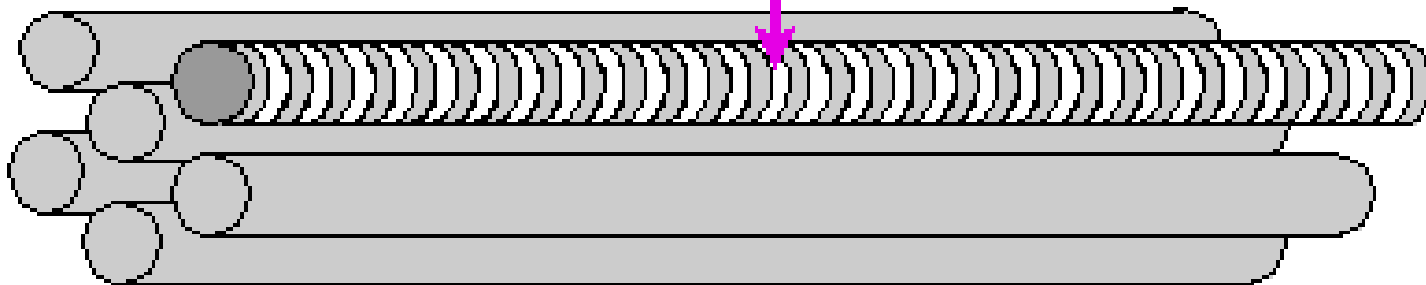
Formation of collagen: extracellular processing



collagen fibril

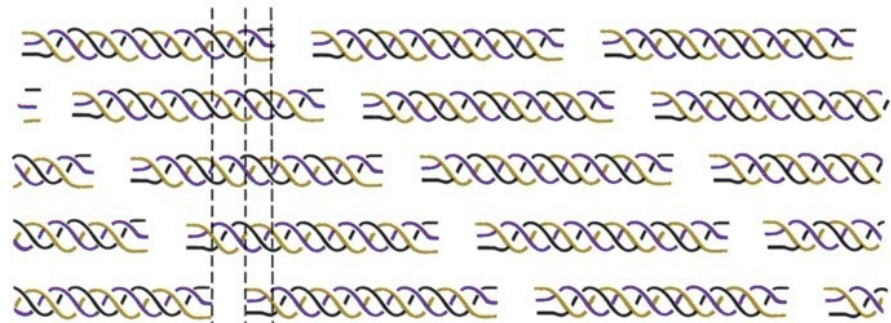
aggregation

collagen fiber

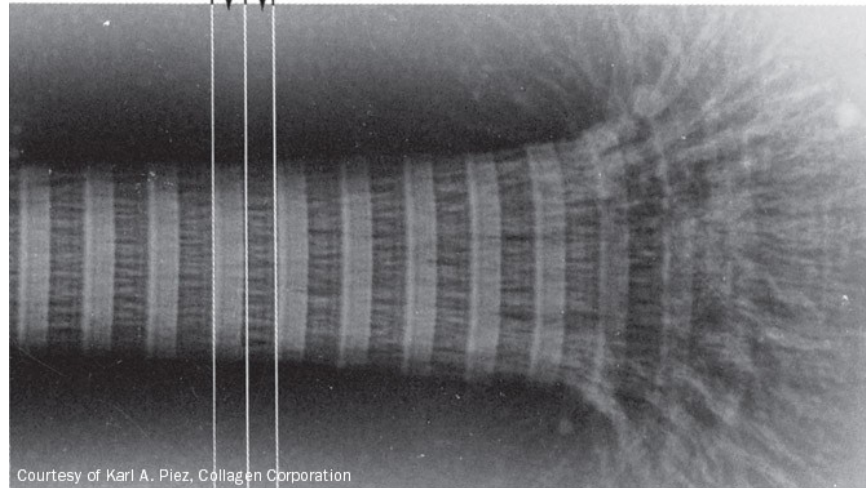


Collagen molecule 

Packing of molecules

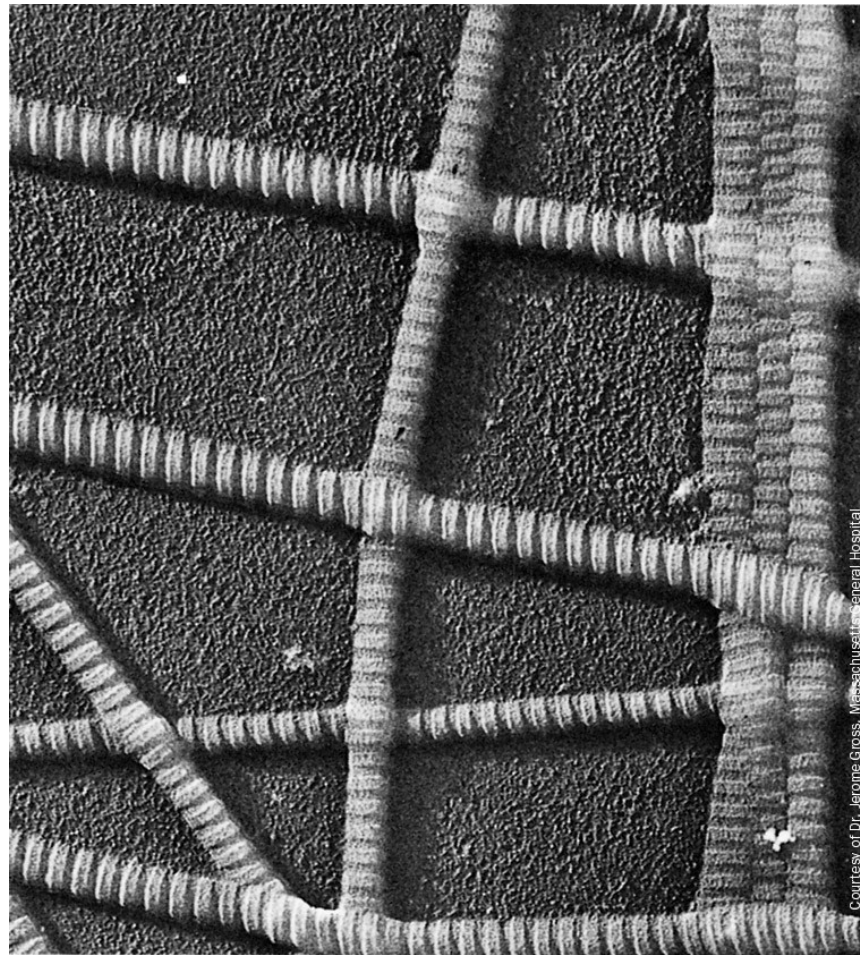


Hole zone ———— 0.6D
Overlap zone ———— 0.4D



Courtesy of Karl A. Piez, Collagen Corporation

Kolagen v kůži



Courtesy of Dr. Jerome Gross, Massachusetts General Hospital

α - keratin

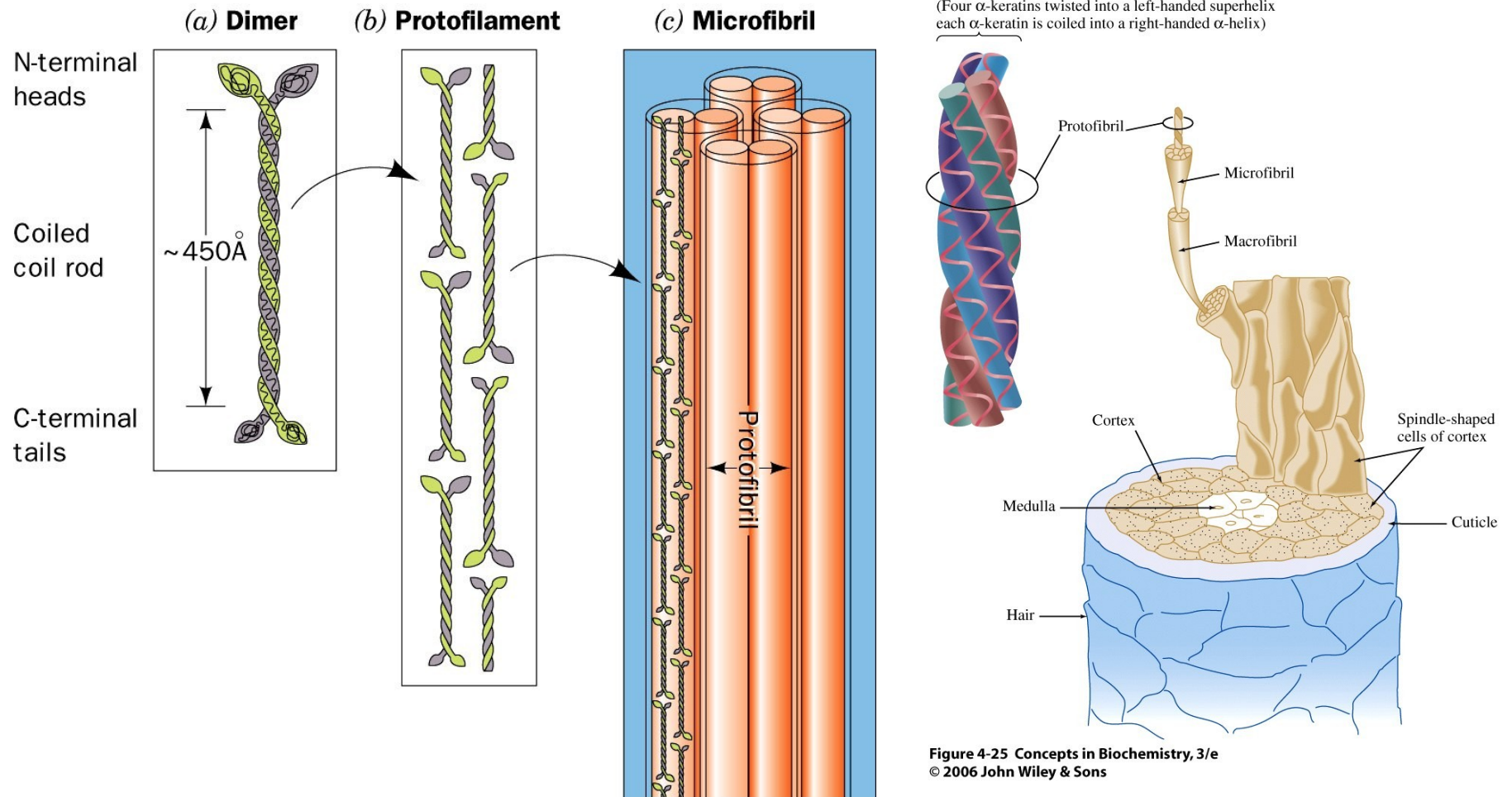
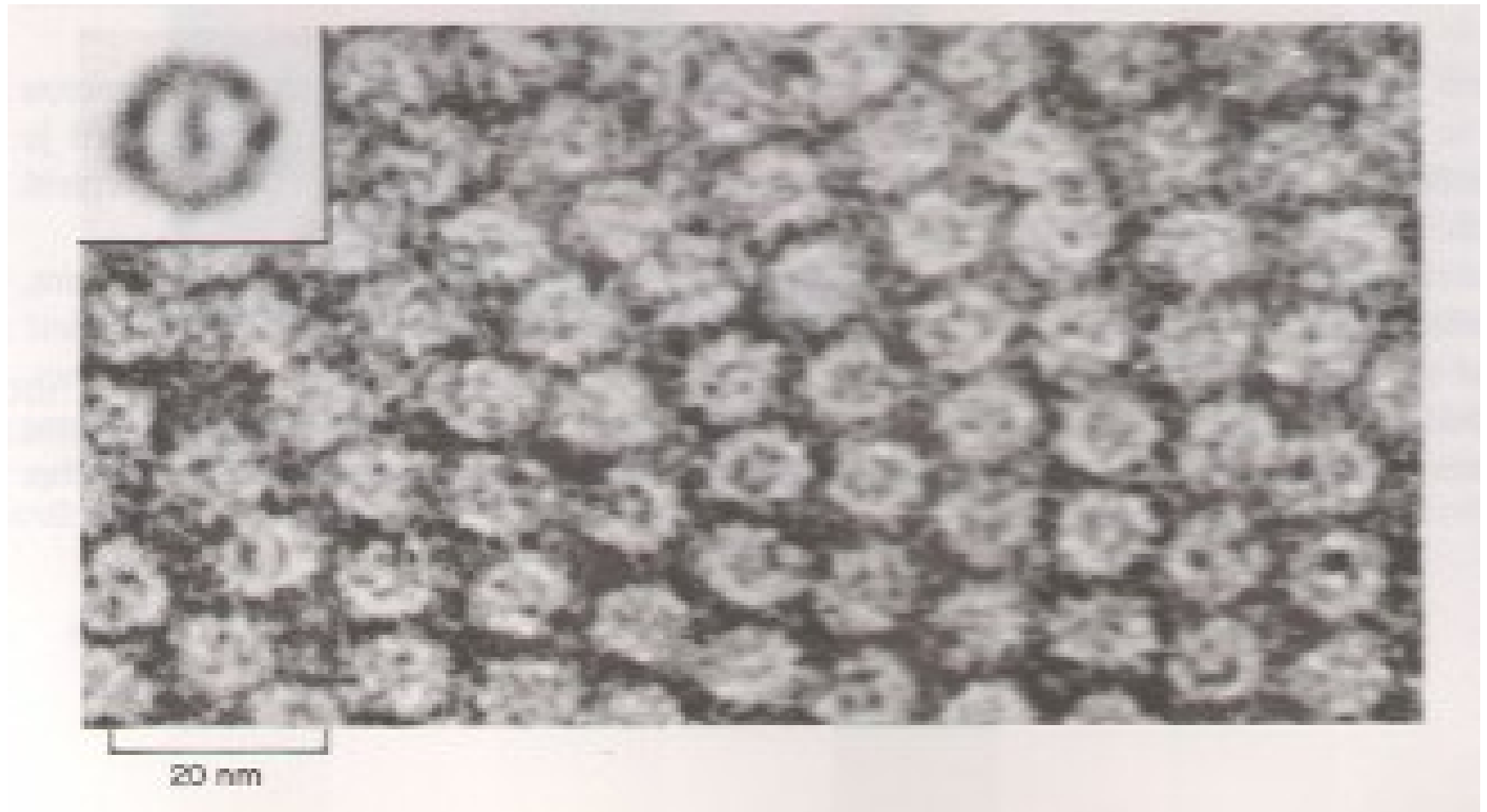
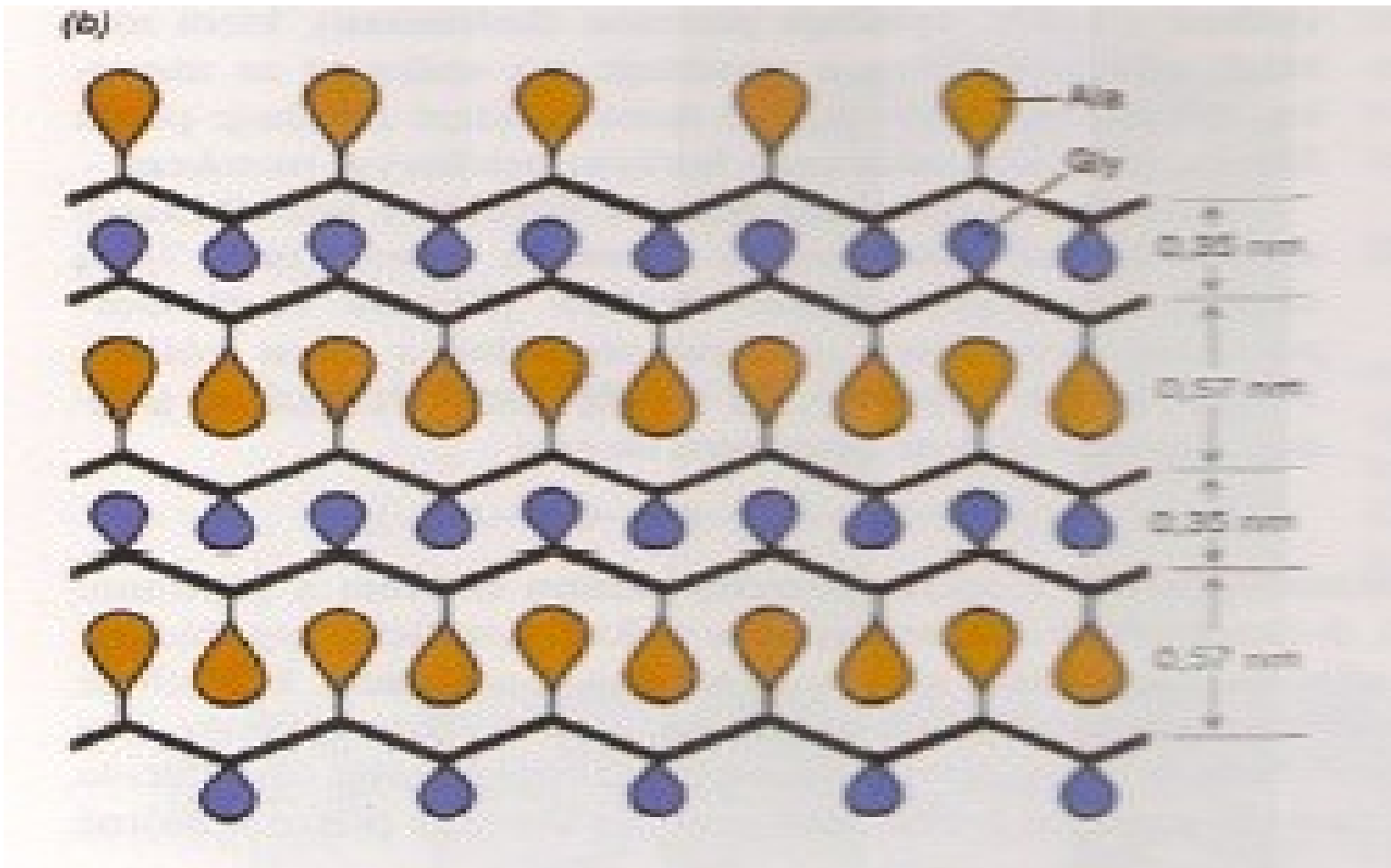


Figure 4-25 Concepts in Biochemistry, 3/e
© 2006 John Wiley & Sons

α – keratin - vlas



β - keratin



β - keratin

