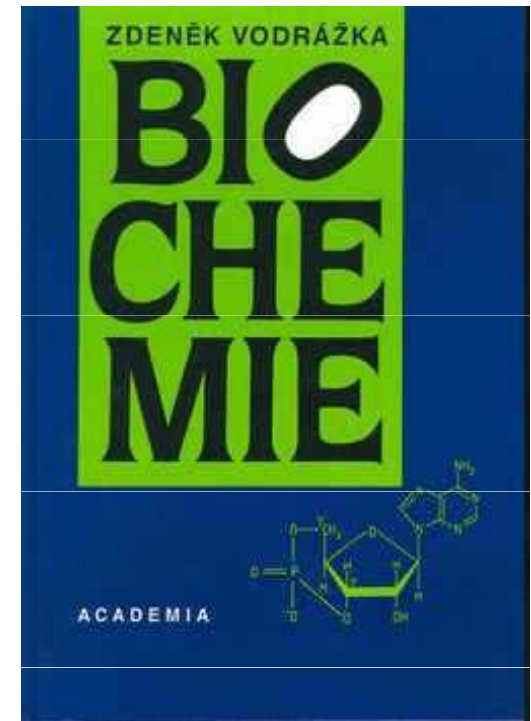


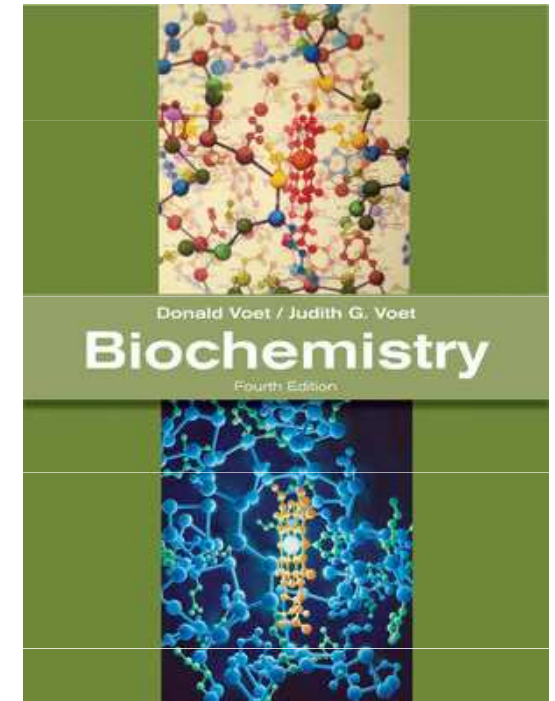
# Biochemie

## Česká studijní literatura

- Zdeněk Vodrážka. *Biochemie*.  
3. opr. vyd. Praha : Academia, 2007.
- 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*. 4th ed. Hoboken :  
John Wiley & Sons, 2011
- 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

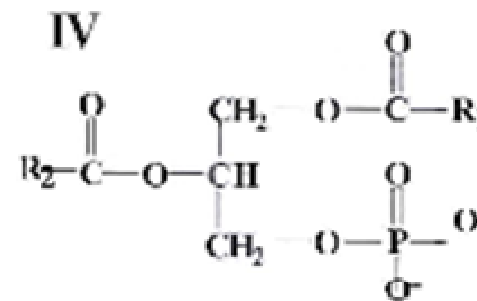
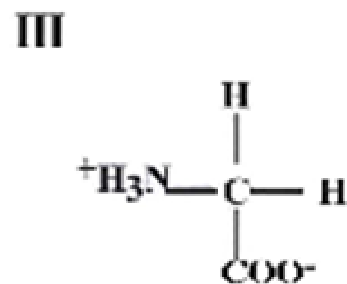
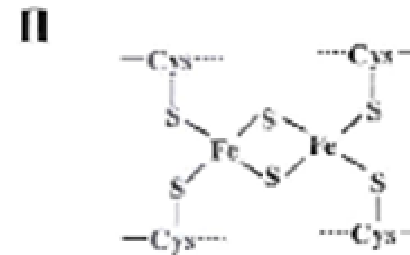
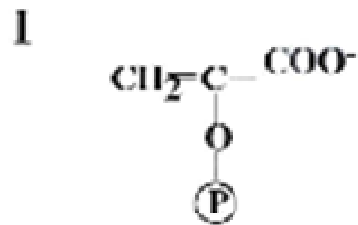
11. METABOLISMUS BÍLKOVIN

12. REGULACE BIOCHEMICKÝCH PROCESŮ

13. MOLEKULÁRNÍ FYZIOLOGIE

14. XENOBIOCHEMIE

# Zkouška z biochemie



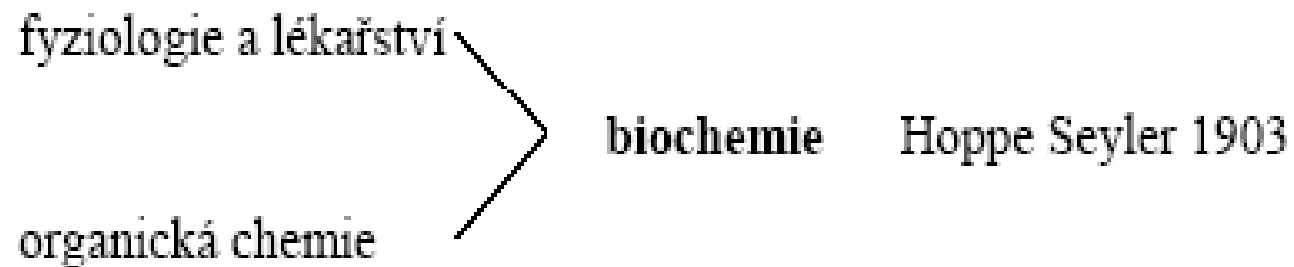
1. Metody purifikace bílkovin
2. Kinetika jednosubstrátové enzymové reakce
3. Biosyntéza mastných kyselin



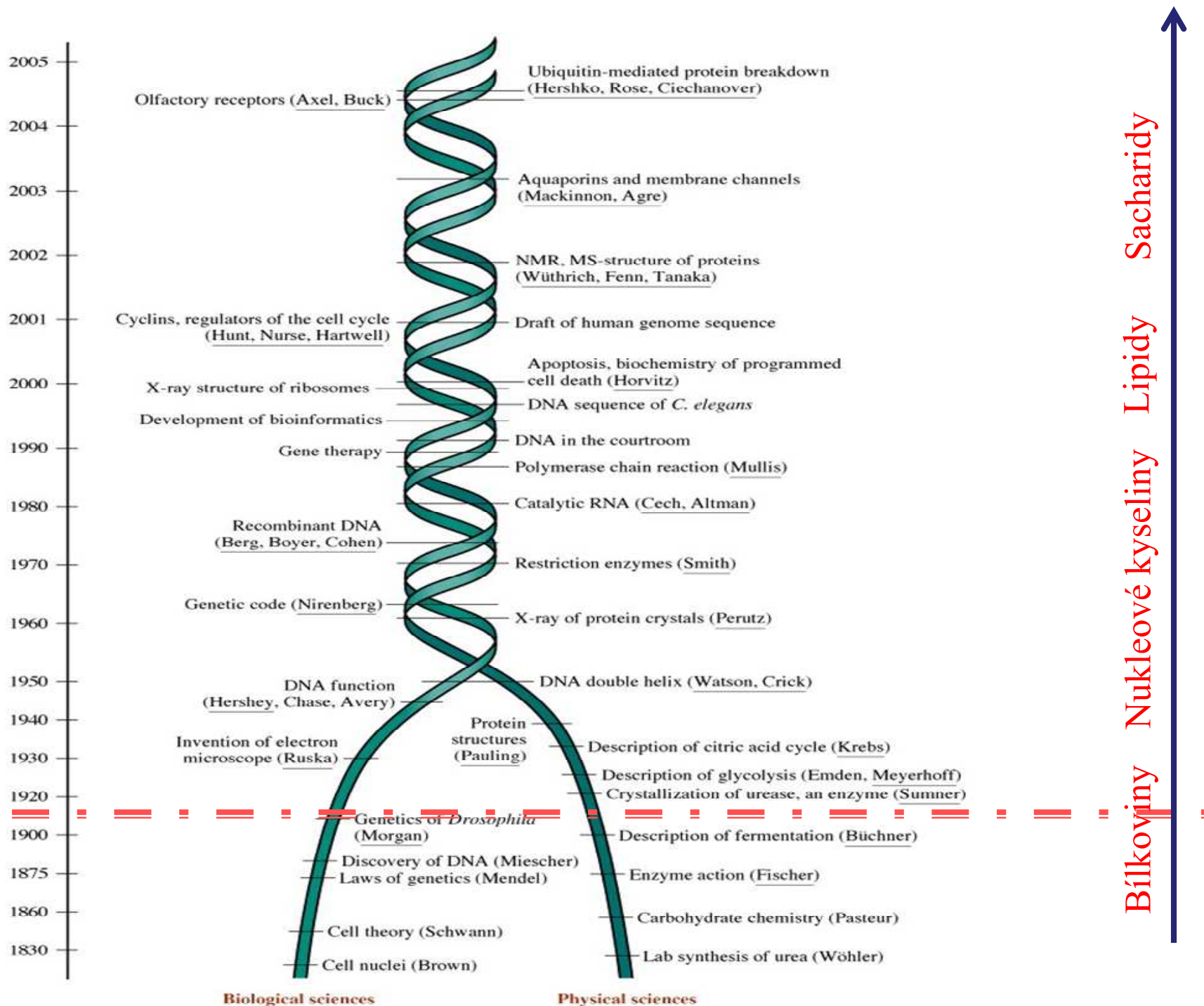
# Biochemie

- 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



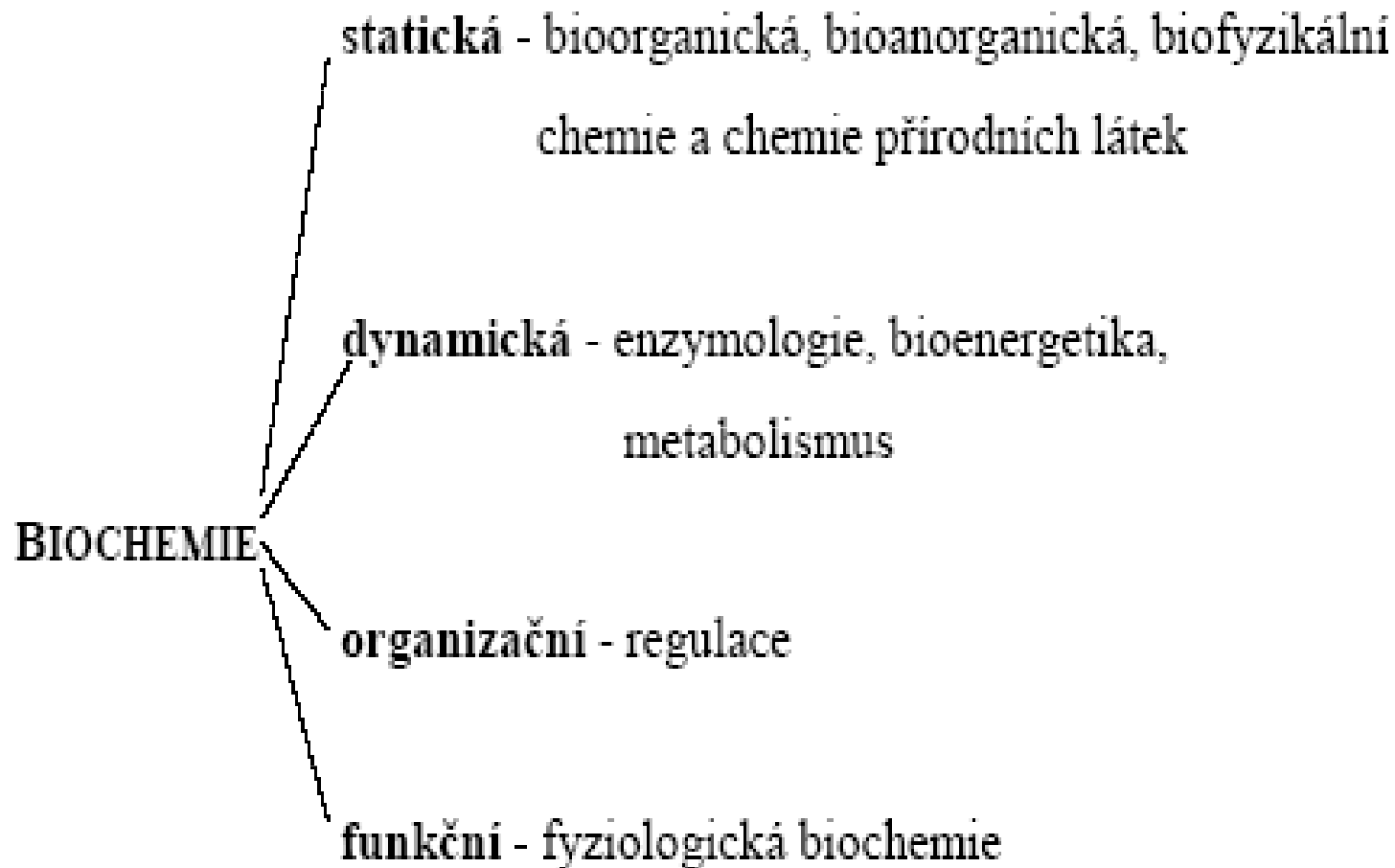
Synonyma : Biological Chemistry  
Physiologische Chemie

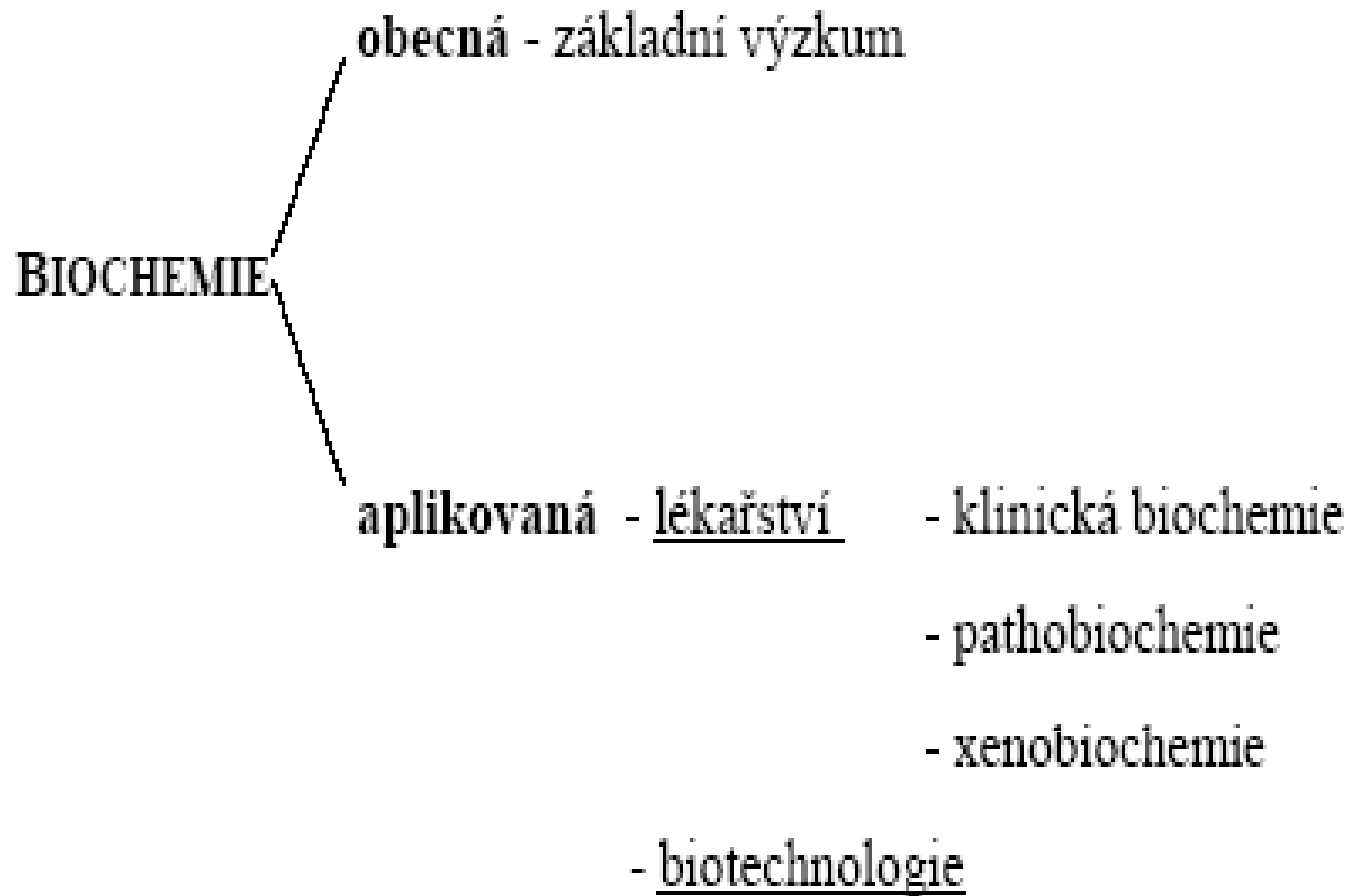


**Figure 1-2 Concepts in Biochemistry, 3/e**  
 © 2006 John Wiley & Sons

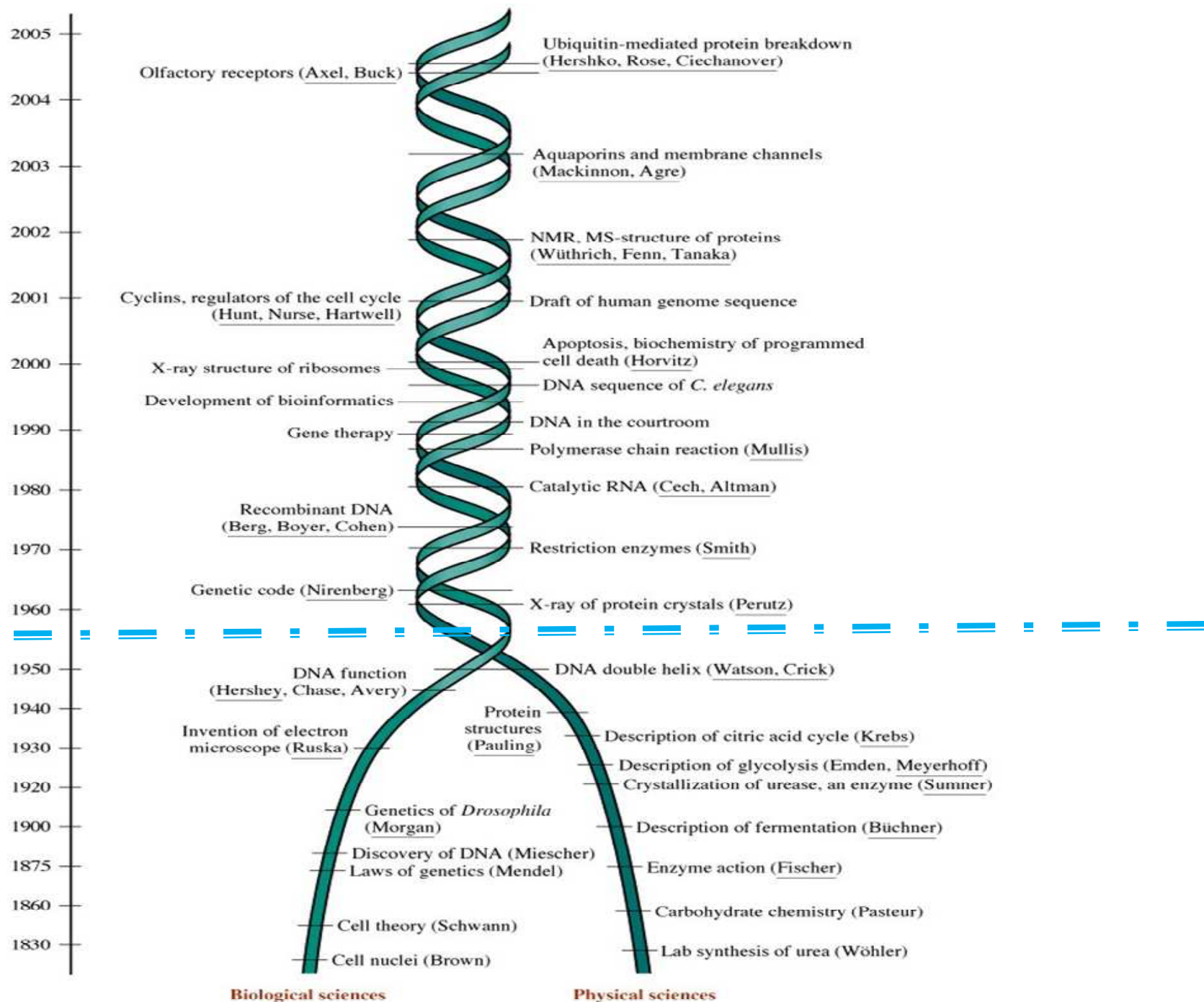
Dvě období : A. období statické biochemie

B. období dynamické biochemie



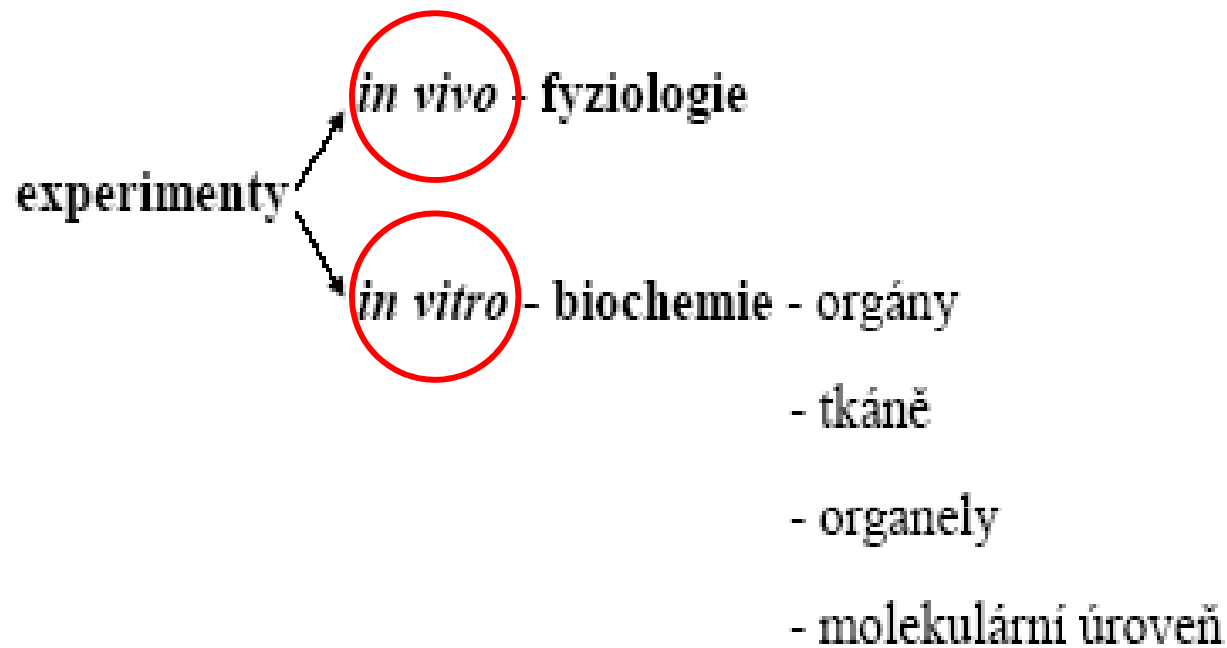


**Molekulární biologie - W.T. ASTBURY - 60.léta**



**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**

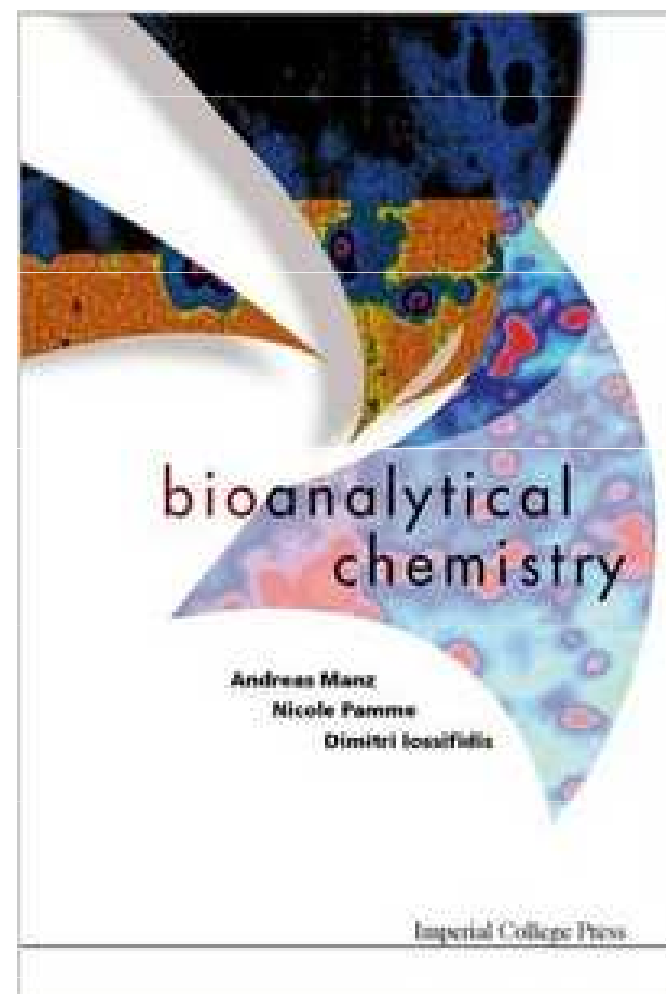
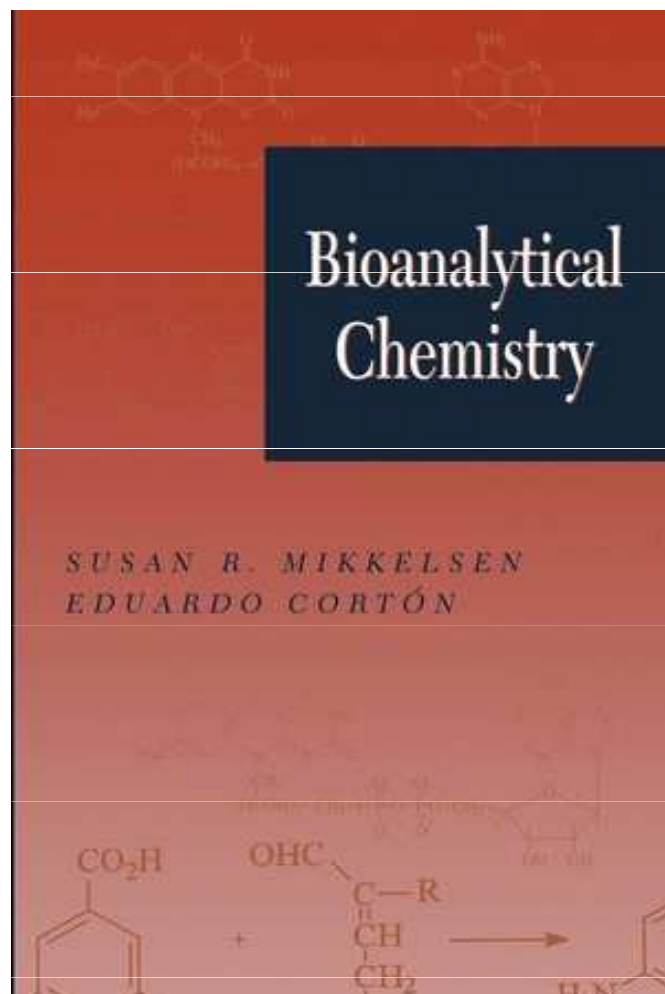
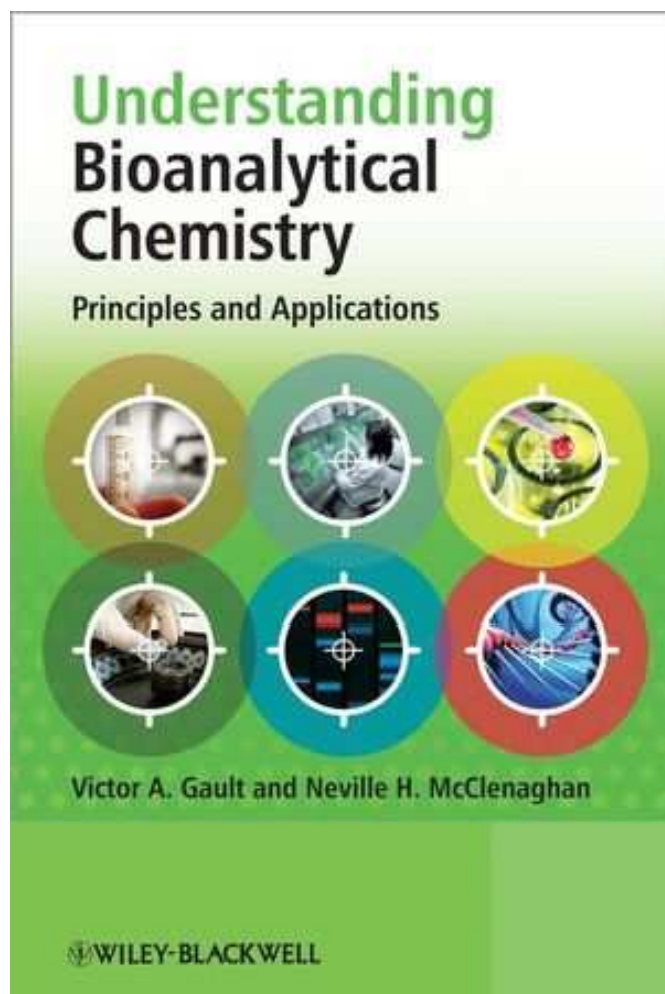
- práce s labilním biologickým materiálem
- práce s malým množstvím látek

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

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



# Literatura



# Látkové složení

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

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

# Prvkové složení vesmíru, zemské kůry a člověka

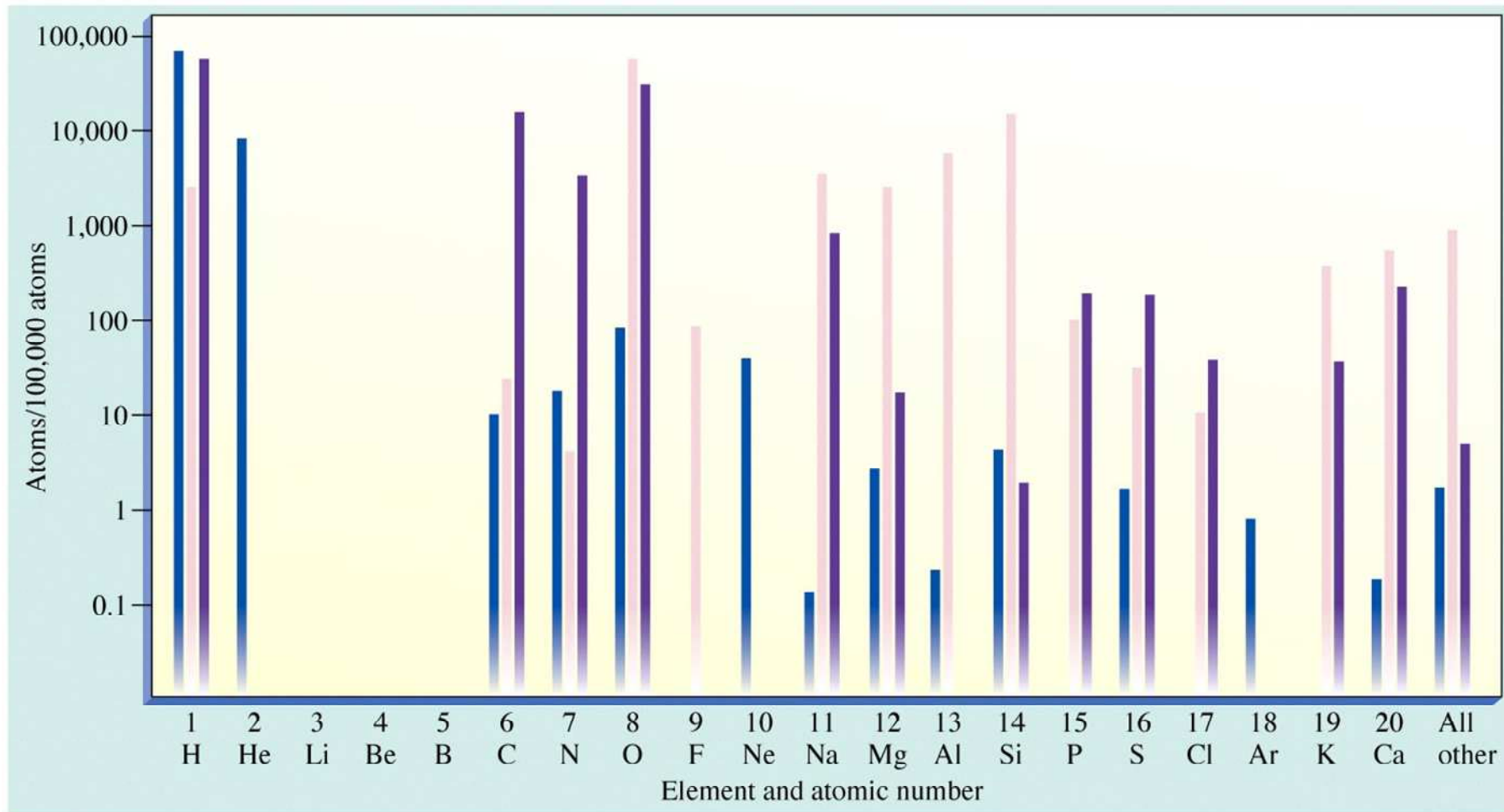


Figure 1-4 Concepts in Biochemistry, 3/e  
© 2006 John Wiley & Sons

# 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<sup>-</sup>, SO<sub>4</sub><sup>-</sup>, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup>,

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

- plyny - O<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, NO

Organické látky - vysokomolekulární - biopolymery

- bílkoviny

- nukleové kyseliny

- sacharidy

- lipidy

# Voda

- Na vodu vázán vznik života
- Je rozpouštědlo
- Má transportní funkci
- Účastní se chemických reakcí
- Udržuje stálost vnitřního prostředí –I, pH, T

# Voda

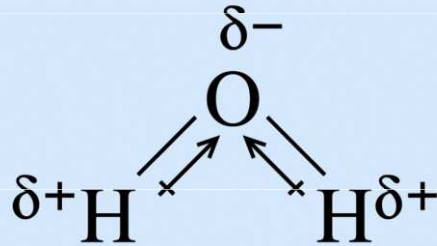


Figure 2-1b Concepts in Biochemistry, 3/e  
© 2006 John Wiley & Sons

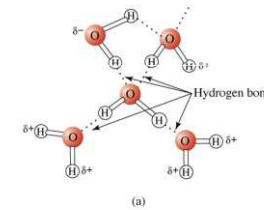
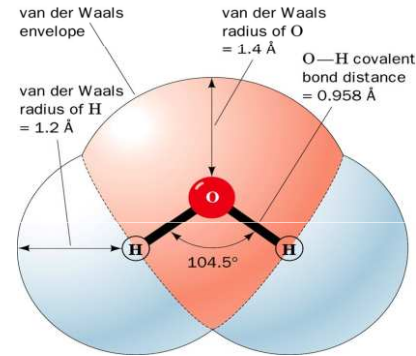
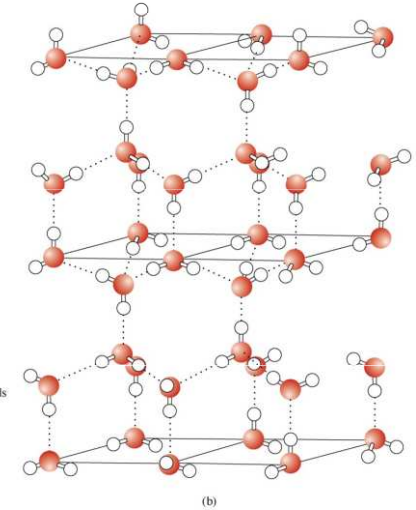


Figure 2-5 Concepts in Biochemistry, 3/e  
© 2006 John Wiley & Sons



## Table 2.3

A comparison of some physical properties of water with hydrides of other nonmetallic elements: N, C, and S

Property	H <sub>2</sub> O	NH <sub>3</sub>	CH <sub>4</sub>	H <sub>2</sub> S
Molecular weight	18	17	16	34
Boiling point (°C)	100	-33	-161	-60.7
Freezing point (°C)	0	-78	-183	-85.5
Viscosity <sup>a</sup>	1.01	0.25	0.10	0.15

<sup>a</sup>Units are centipoise.

Anorganické látky

- voda

- Na, K, Cl<sup>-</sup>, SO<sub>4</sub><sup>-</sup>, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup>,

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

- plyny - O<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, NO

} 5 %

Organické látky

- vysokomolekulární - biopolymery

- bílkoviny

- nukleové kyseliny

- sacharidy

- lipidy

} 95 %



## Obecný princip výstavby biopolymerů :

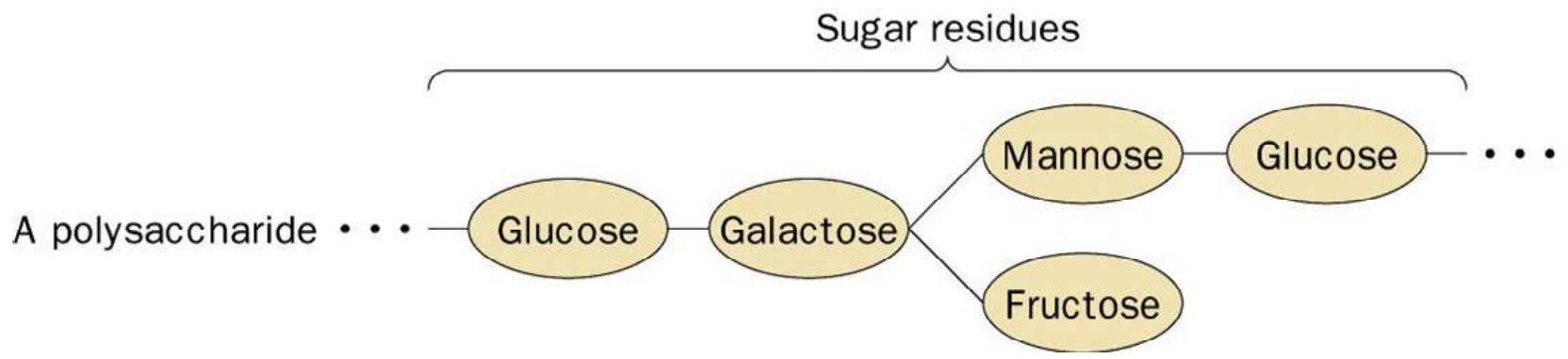
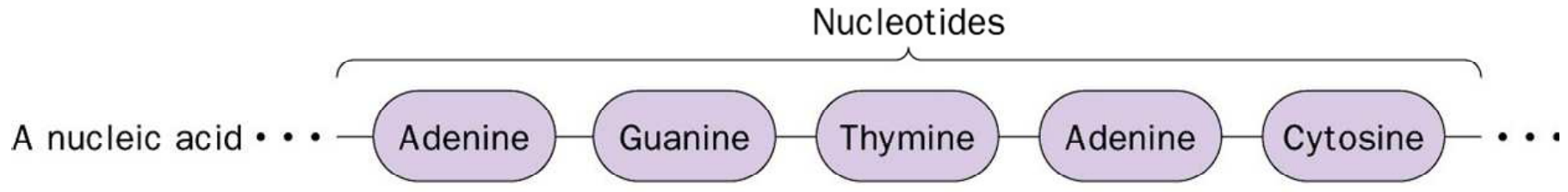
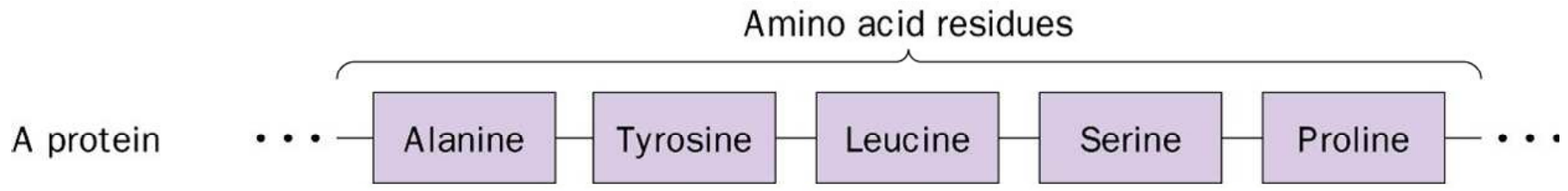
1. Jsou tvořeny monomery
2. Monomery vytvářejí lineární řetězce
3. Monomery jsou spojovány jediným typem vazby

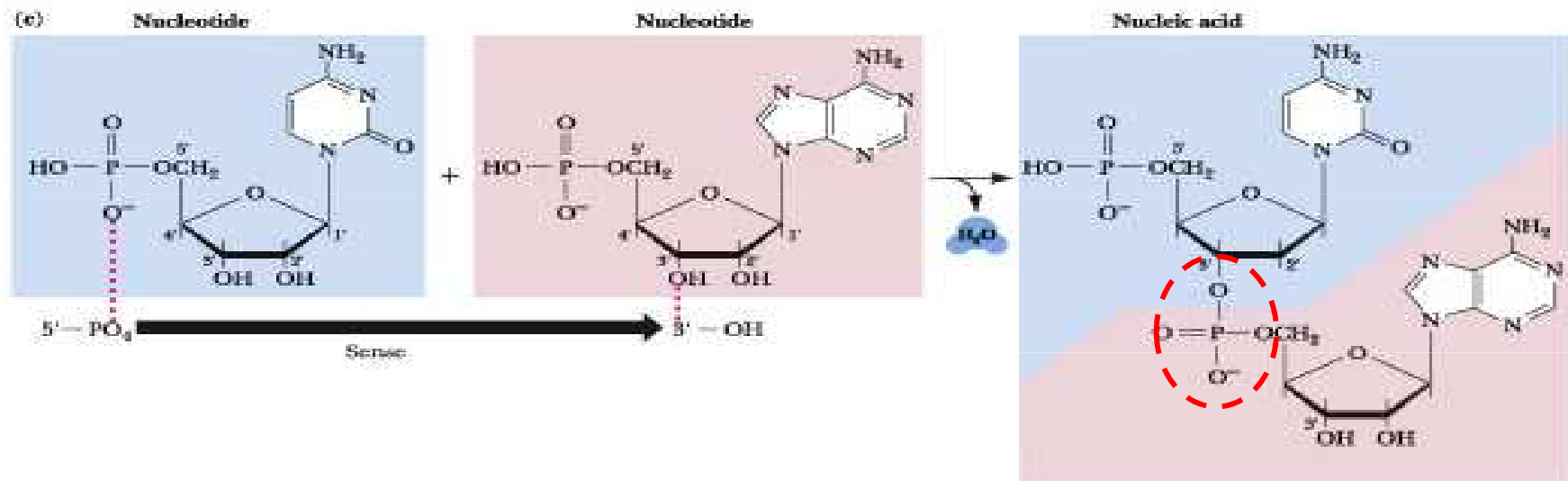
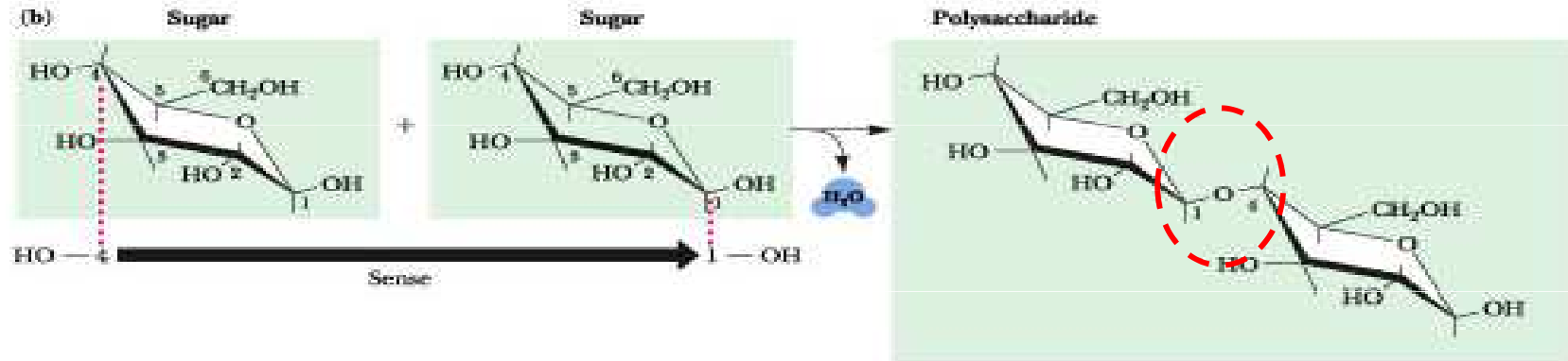
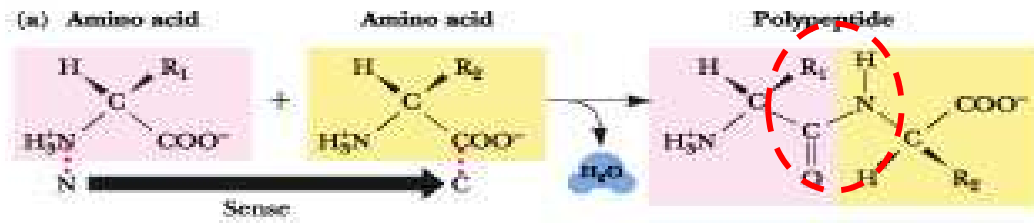
mono, di-, tri- , tetra-,....

oligo < 10

poly > 10

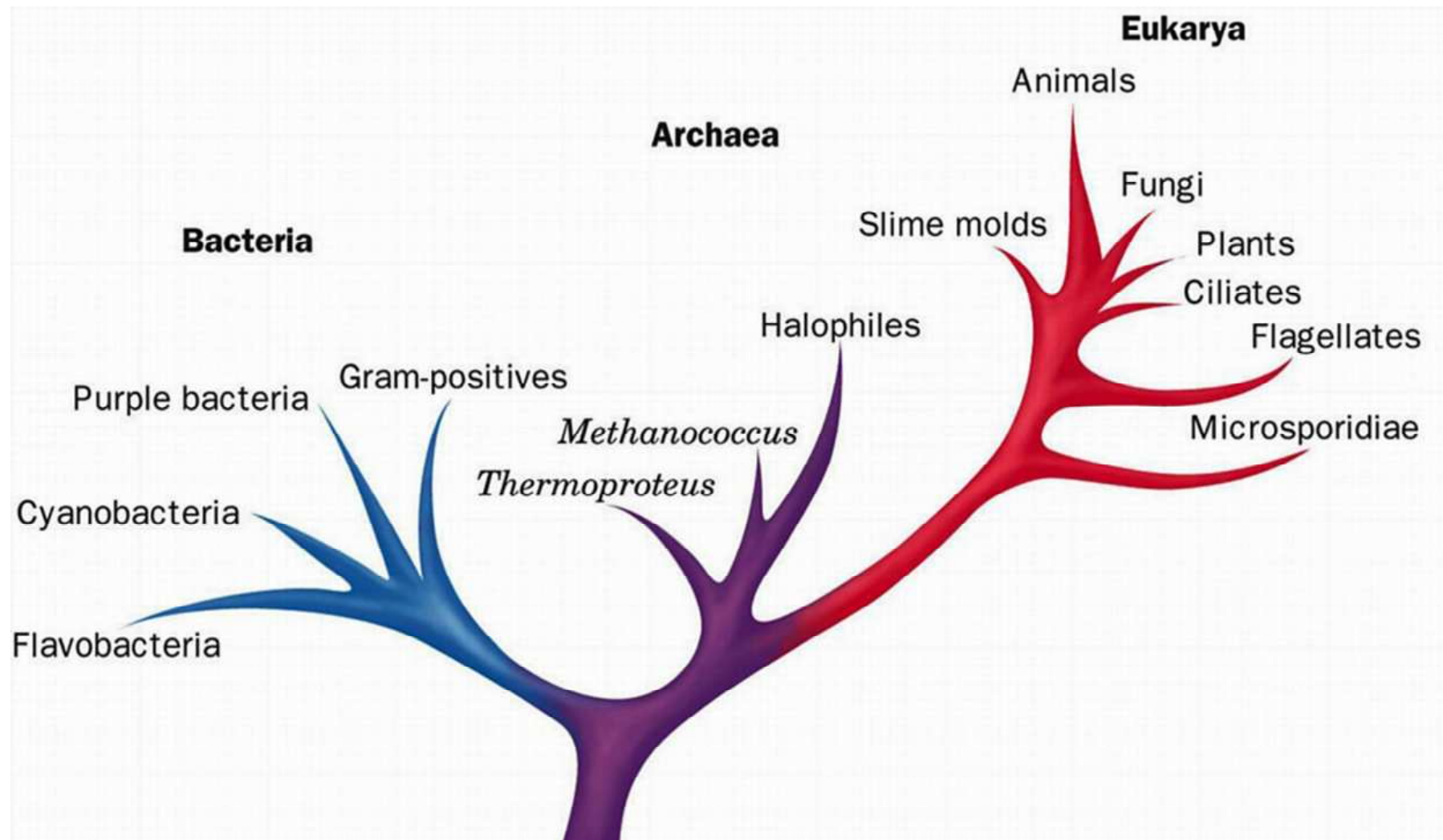
	<b>bílkoviny</b>	<b>nukleové kyseliny</b>	<b>polysacharidy</b>
<b>monomery</b>	aminokyseliny	nukleotidy	monosacharidy
	20	4	5
<b>vazba</b>	peptidická	3,5-diesterová	glykosidická



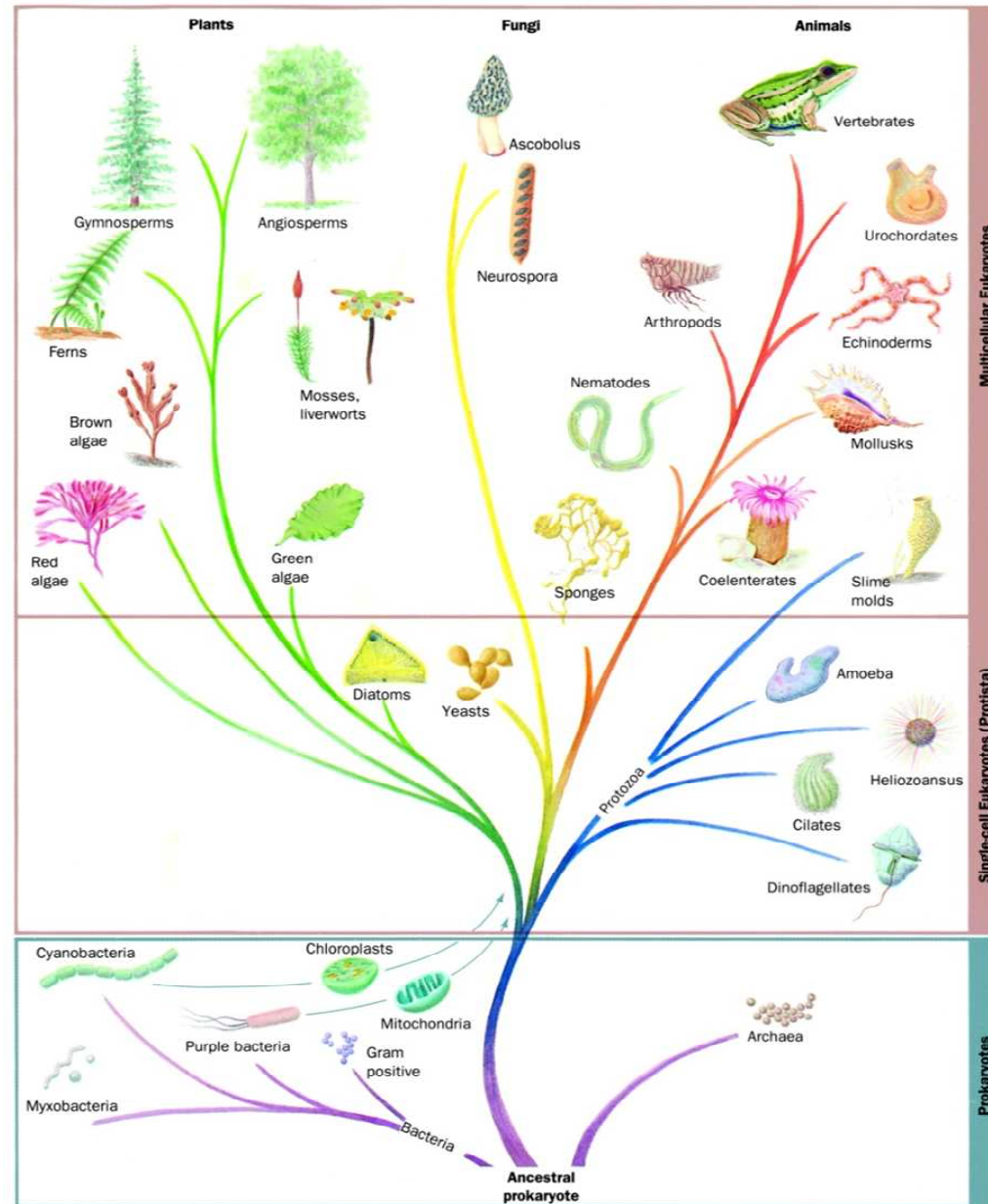


- nízkomolekulární - produkty meziprodukty metabolismu
- sekundární metabolity
- regulační látky

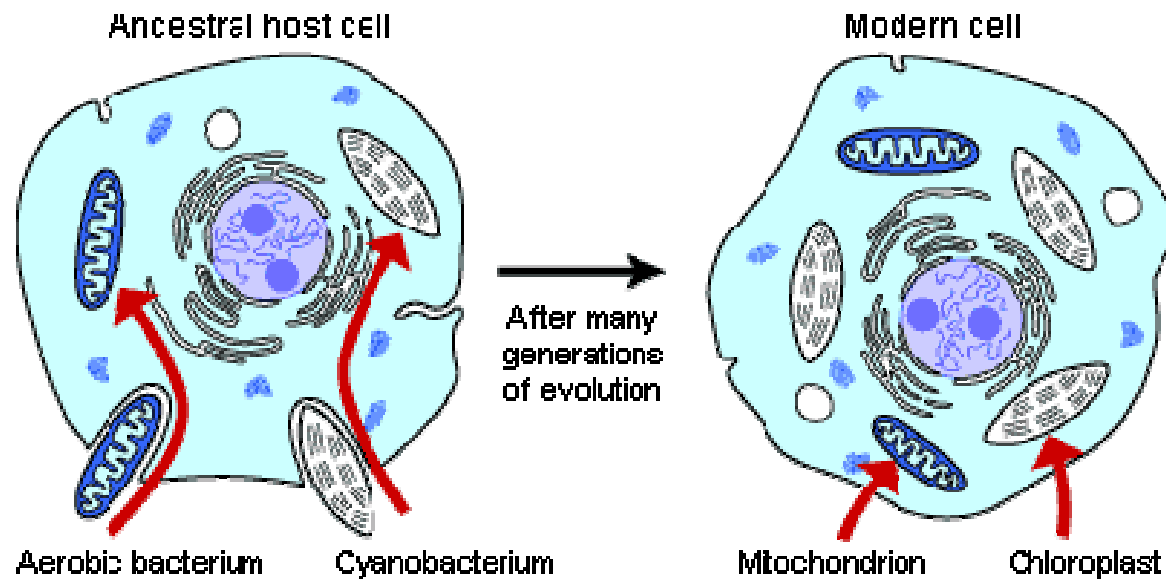
# Fylogenetický strom



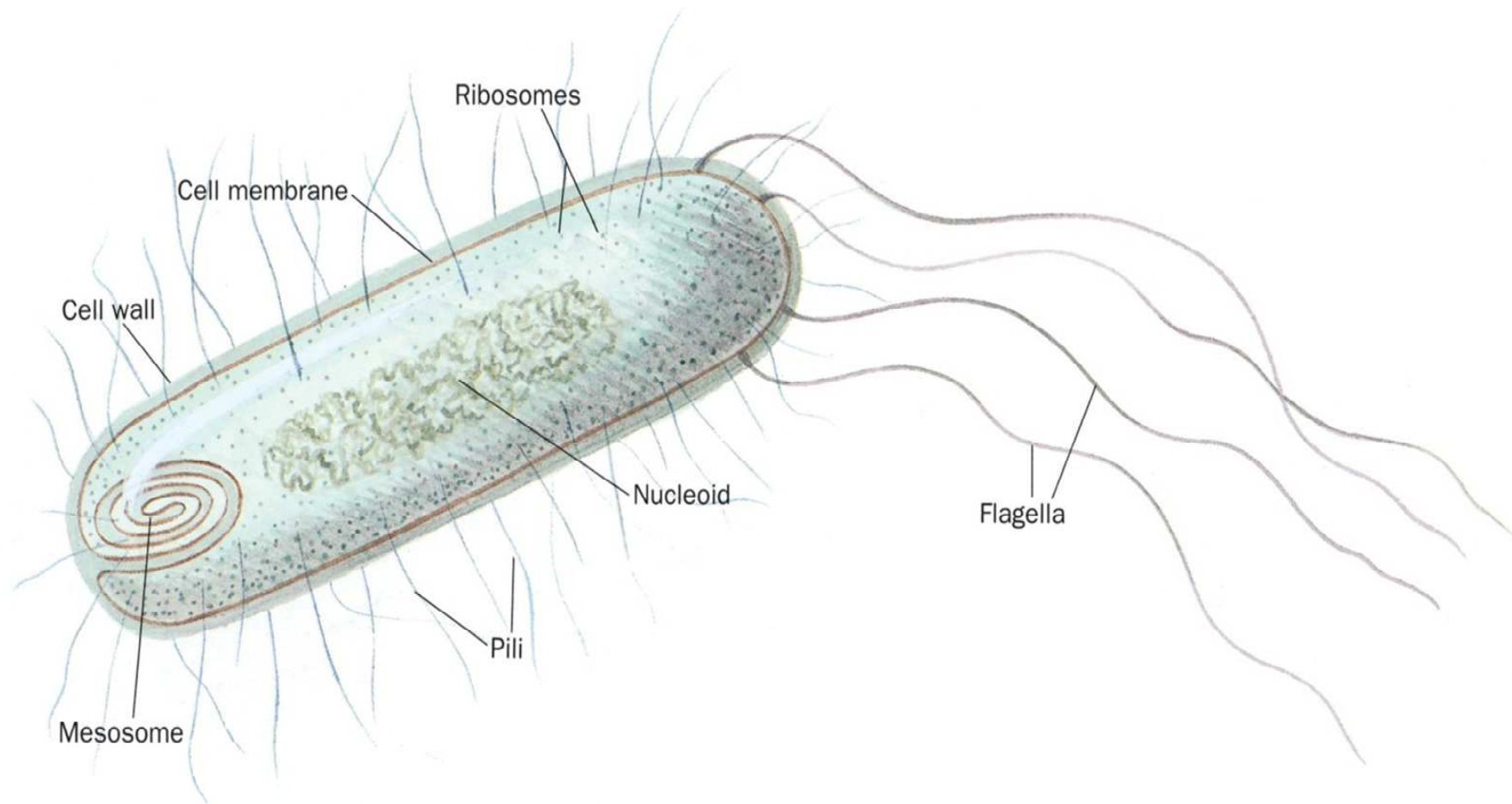
# Fylogenetický strom



# Margulis – endosymbiotická teorie



# Prokaryontní bakteriální buňka





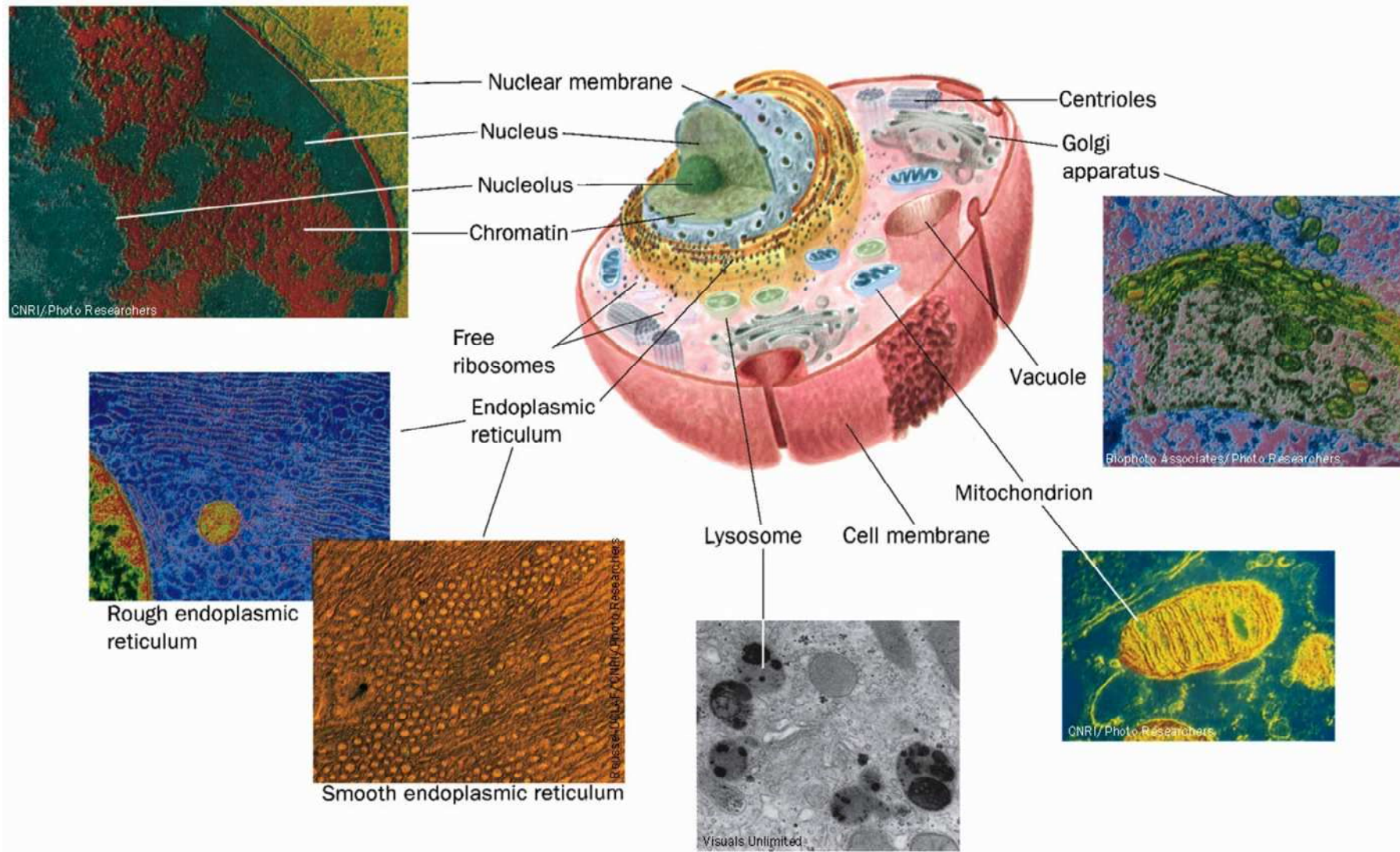
# Prokaryontní bakteriální buňka

**Table 1.1**

**Molecular composition and biological function of prokaryotic cell components**

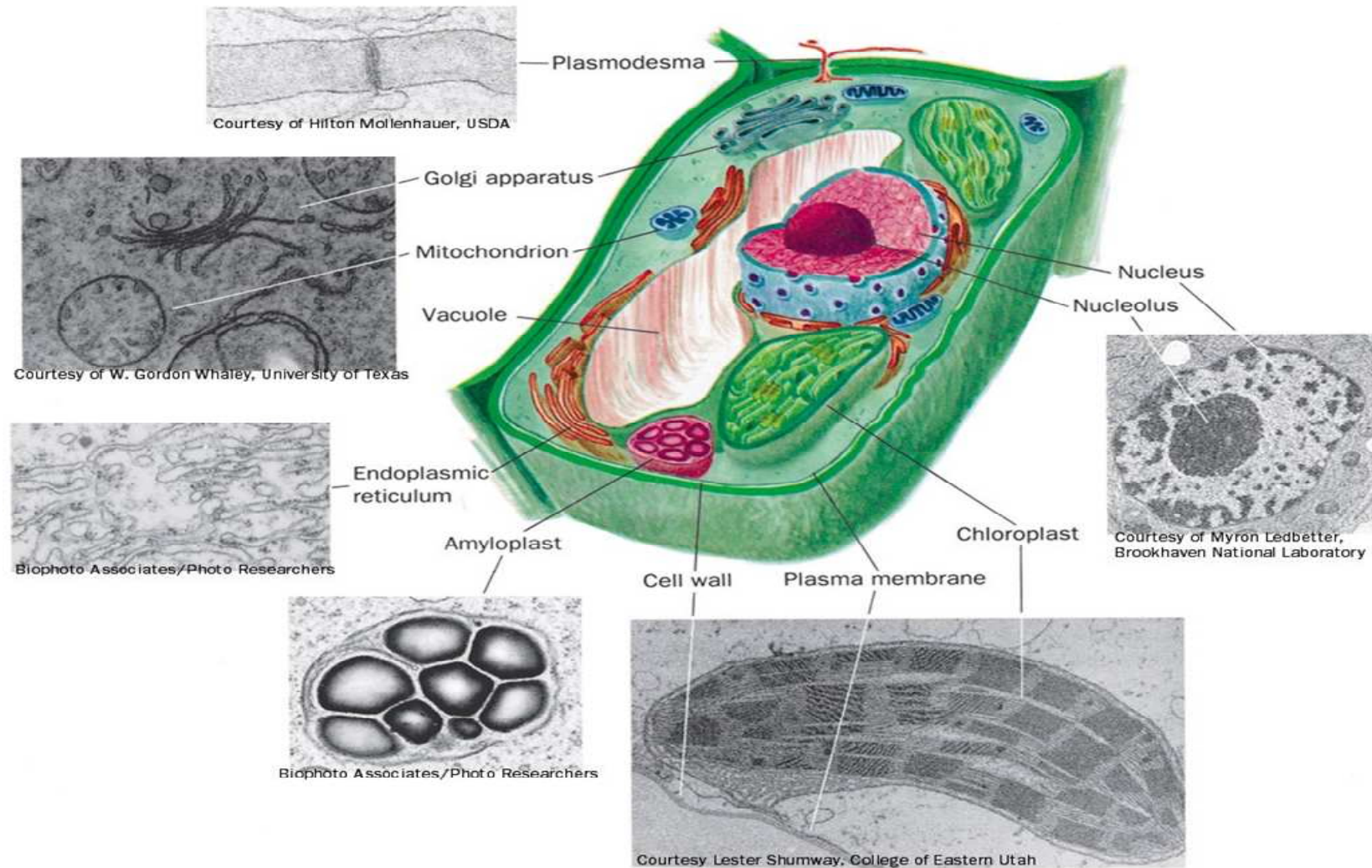
Structural Feature	Molecular Composition	Biological Function
Cell wall, pili, and flagella	Polysaccharide chains cross-linked by proteins; coated with lipopolysaccharide; pili and flagella are extensions of the cell wall	Protection against mechanical and hypertonic stress; flagella assist in movement; pili assist in sexual conjugation
Cell membrane, mesosome	Bilayer of 40% lipid, 60% protein, perhaps some carbohydrate; mesosome is infolded membrane	Permeable boundary that allows for entry and exit of nutrients, waste; mesosome may play role in DNA replication
Nucleoid region	Contains chromatin, a complex of chromosomal DNA and histone proteins	The genome; storage of genetic information; site of DNA replication
Ribosomes	Complexes of RNA (65%) and protein (35%)	Sites of protein synthesis
Vacuoles	Nutrients stored as small molecules or polymers	Storage of fuel molecules for energy metabolism
Cytoplasm	Small molecules, soluble proteins, enzymes, nutrients, inorganic salts; dissolved in aqueous solution	Region where many metabolic reactions occur

# Eukaryontní živočišná buňka





# Eukaryontní rostlinná buňka



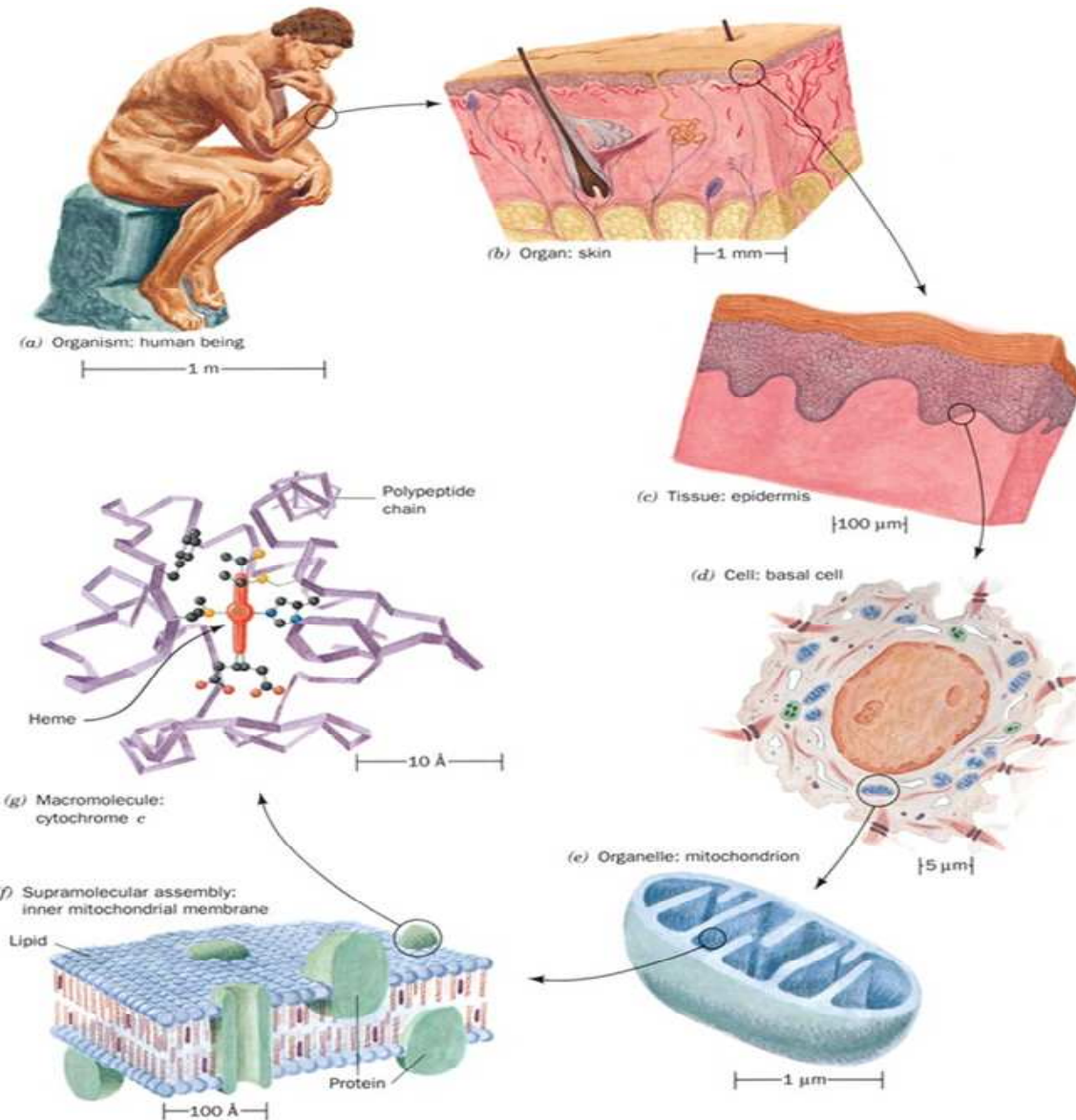
# Eukaryontní buňka

**Table 1.2**  
**Eukaryotic organelles, their constituent biomolecules, and biological function**

Structural Feature	Molecular Composition	Biological Function
Cell membrane	Bilayer of proteins (50%) and lipids (50%) and some carbohydrate	Selectively permeable boundary for entry and exit of nutrients and waste; some important enzyme activities; location of receptors for signaling
Nucleus	Contains genomic DNA, and histone proteins as chromatin; RNA	Storage of genetic information; site of DNA replication and transcription to RNA
Endoplasmic reticulum with ribosomes	Flat, single-membraned vesicles of lipid and protein; ribosomes consist of RNA and proteins	Surfaces on which ribosomes bind for protein synthesis
Golgi apparatus	Flattened vesicles of lipid, protein, and polysaccharide	Secretion of cell waste products; site of protein processing
Mitochondria	Double-membraned with protein and lipids; interior (matrix) contains soluble and insoluble enzymes, RNA, and DNA	Site of energy metabolism and synthesis of high-energy ATP
Lysosomes (animal)	Single-membraned vesicles containing enzymes for hydrolysis	Metabolism of materials ingested by endocytosis
Peroxisomes (animal) or glyoxysomes (plant)	Single-membraned vesicles containing catalase and other oxidative enzymes	Oxidative metabolism of nutrients using O <sub>2</sub> to generate H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Chloroplasts (plant)	Double-membraned organelles containing protein, lipid, chlorophyll, RNA, DNA, and ribosomes	Sites of photosynthesis; convert light energy into chemical energy (ATP)
Cytoplasm	Cytoskeleton made of proteins; small molecules, soluble proteins, enzymes, nutrients, and salts in aqueous solution	Provides shape to cell; region where many metabolic reactions occur

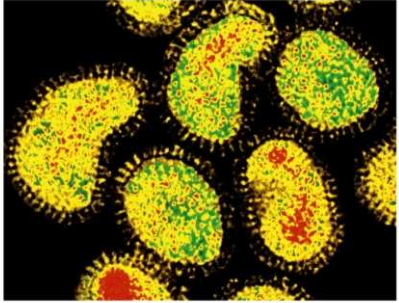
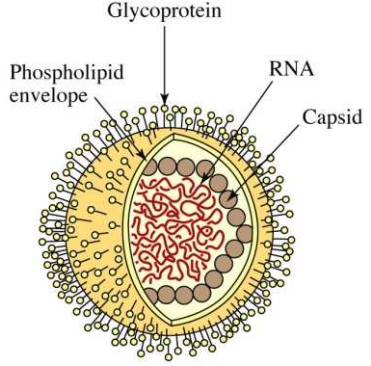
**Table 1-2 Concepts in Biochemistry, 3/e**  
 © 2006 John Wiley & Sons

# Organizace biologických struktur



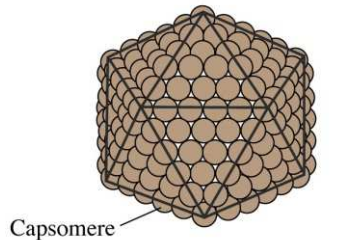


# Viry



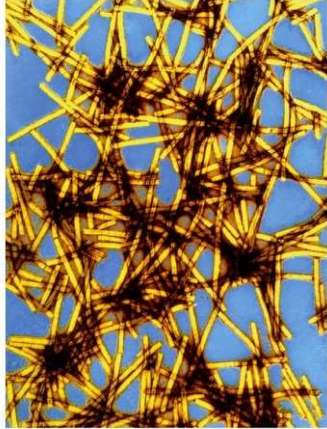
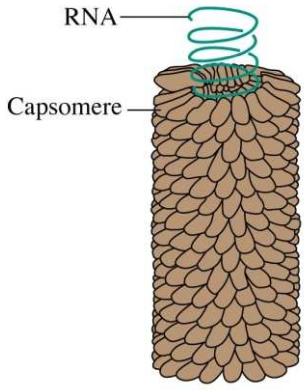
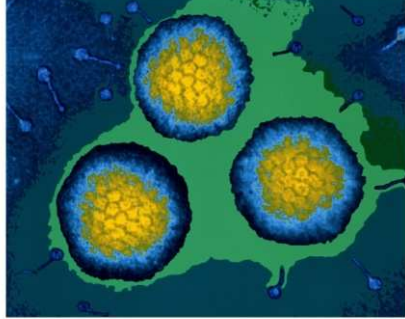
(a) Influenza virus (globular)

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



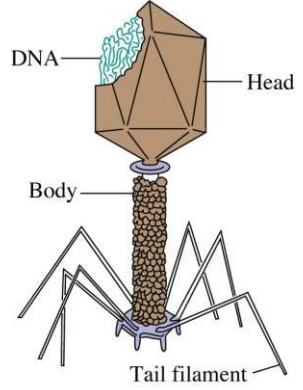
(b) Adenovirus (polyhedral)

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



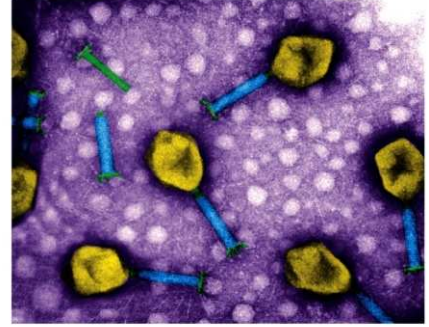
(c) Tobacco mosaic virus (cylindrical)

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

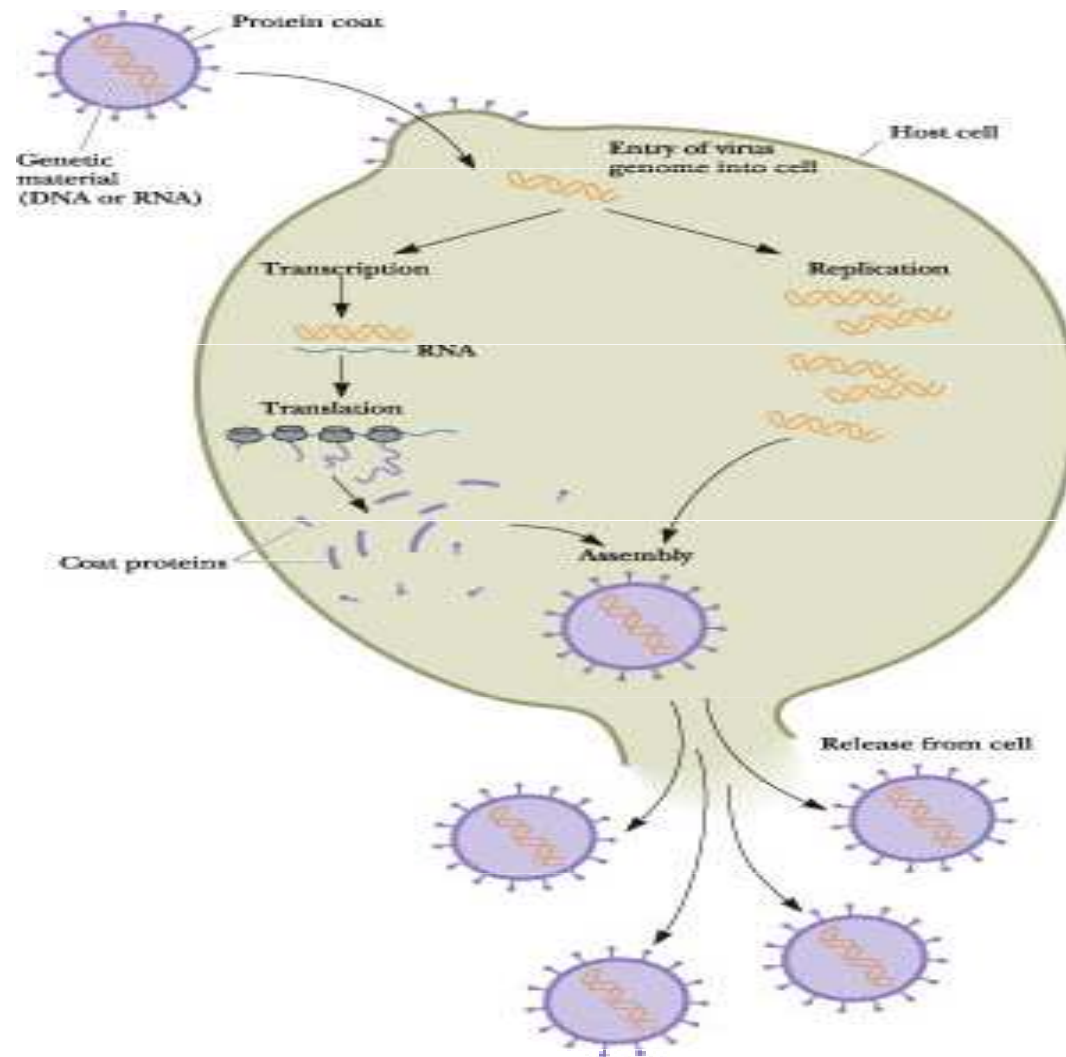


(d) Bacteriophage (complex shape)

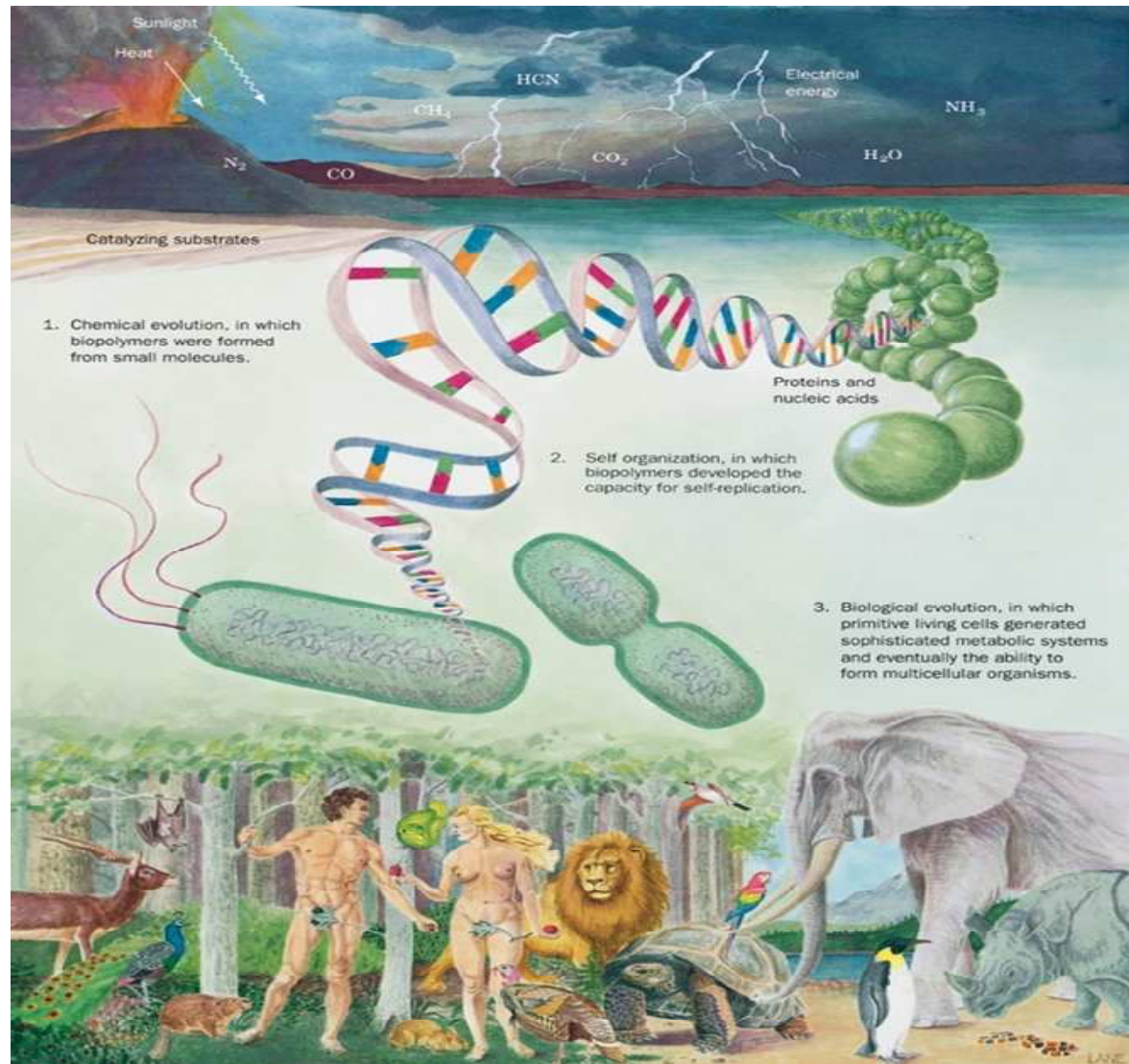
Figure 1-7d Concepts in Biochemistry, 3/e



# Viry



# Evolve života na zemi

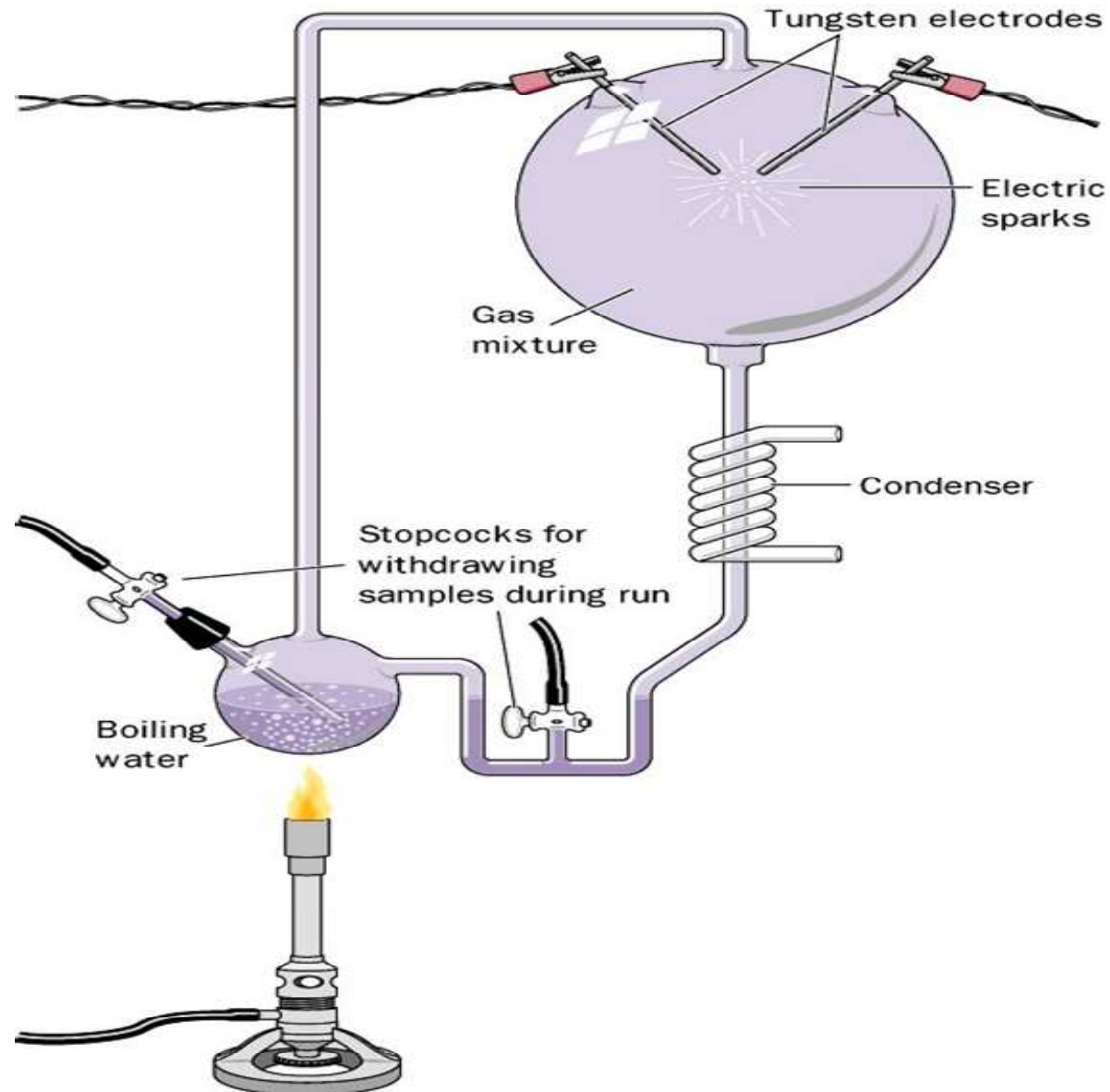




# Evolution of life on earth

1. Chemical evolution — simple inorganic molecules give rise to organic polymers
2. Formation of ordered structures of biopolymers — they are capable of self-replication- RNA
3. Biological evolution — evolution from unicellular to multicellular organisms

# Evolve života na zemi



# Evolve života na zemi

Compound	Yield (%)
Glycine <sup>a</sup>	2.1
Glycolic acid	1.9
Sarcosine	0.25
Alanine <sup>a</sup>	1.7
Lactic acid	1.6
<i>N</i> -Methylalanine	0.07
$\alpha$ -Amino- <i>n</i> -butyric acid	0.34
$\alpha$ -Aminoisobutyric acid	0.007
$\alpha$ -Hydroxybutyric acid	0.34
$\beta$ -Alanine	0.76
Succinic acid	0.27
Aspartic acid <sup>a</sup>	0.024
Glutamic acid <sup>a</sup>	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

<sup>a</sup> 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)

πρωτεΐνη - „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

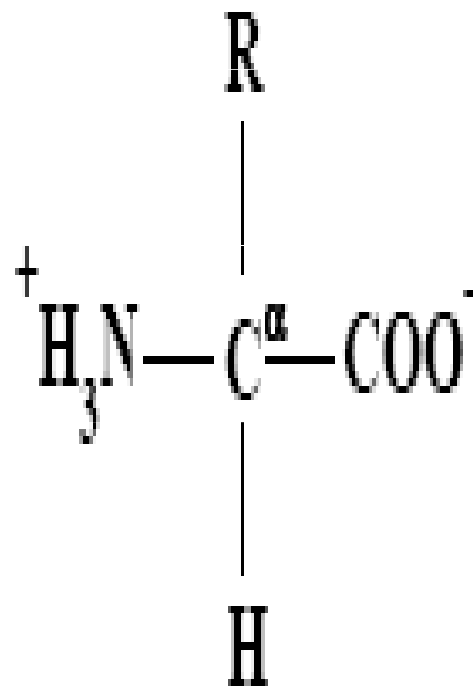


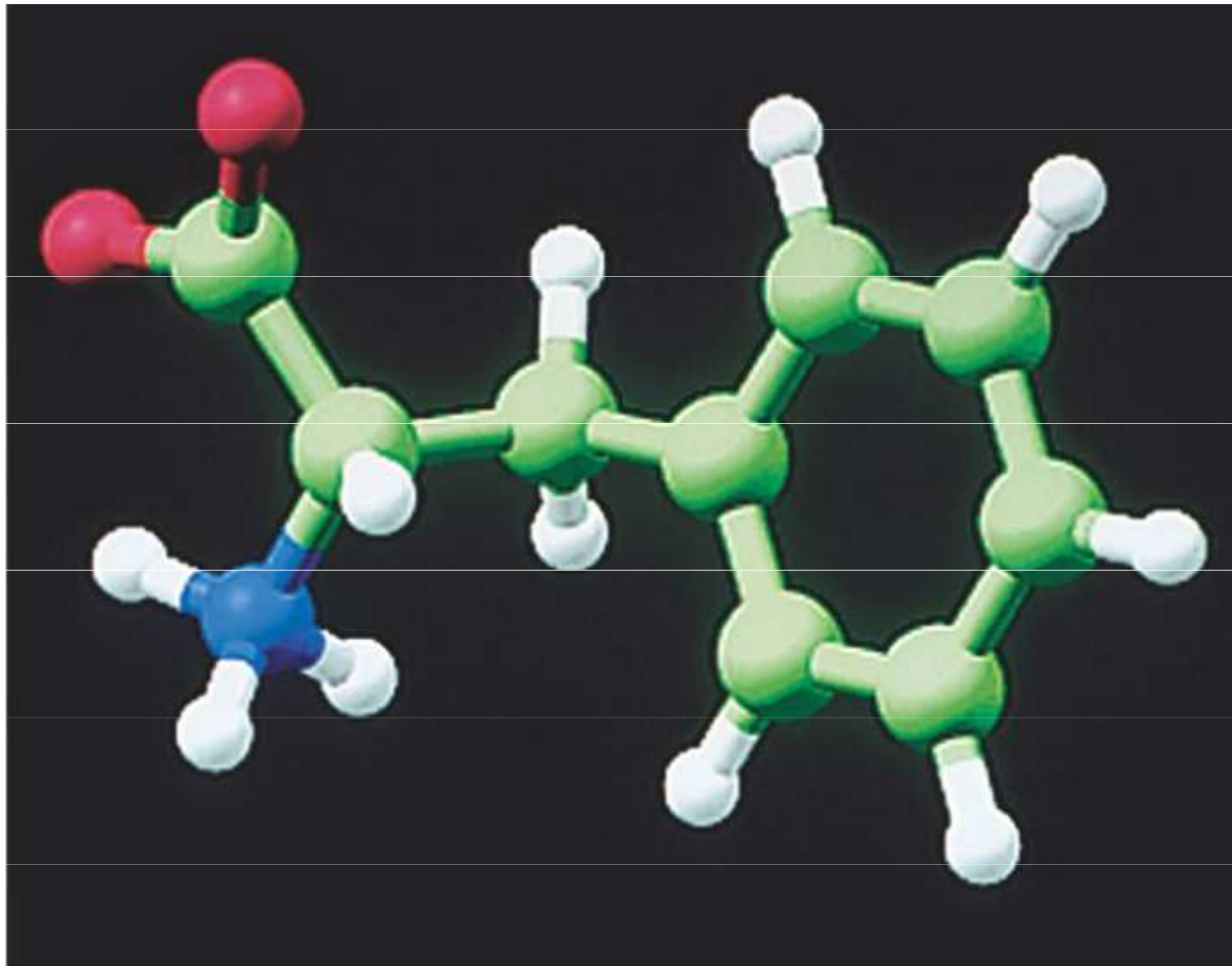
> 50 AMK BÍLKOVINY - PROTEINY

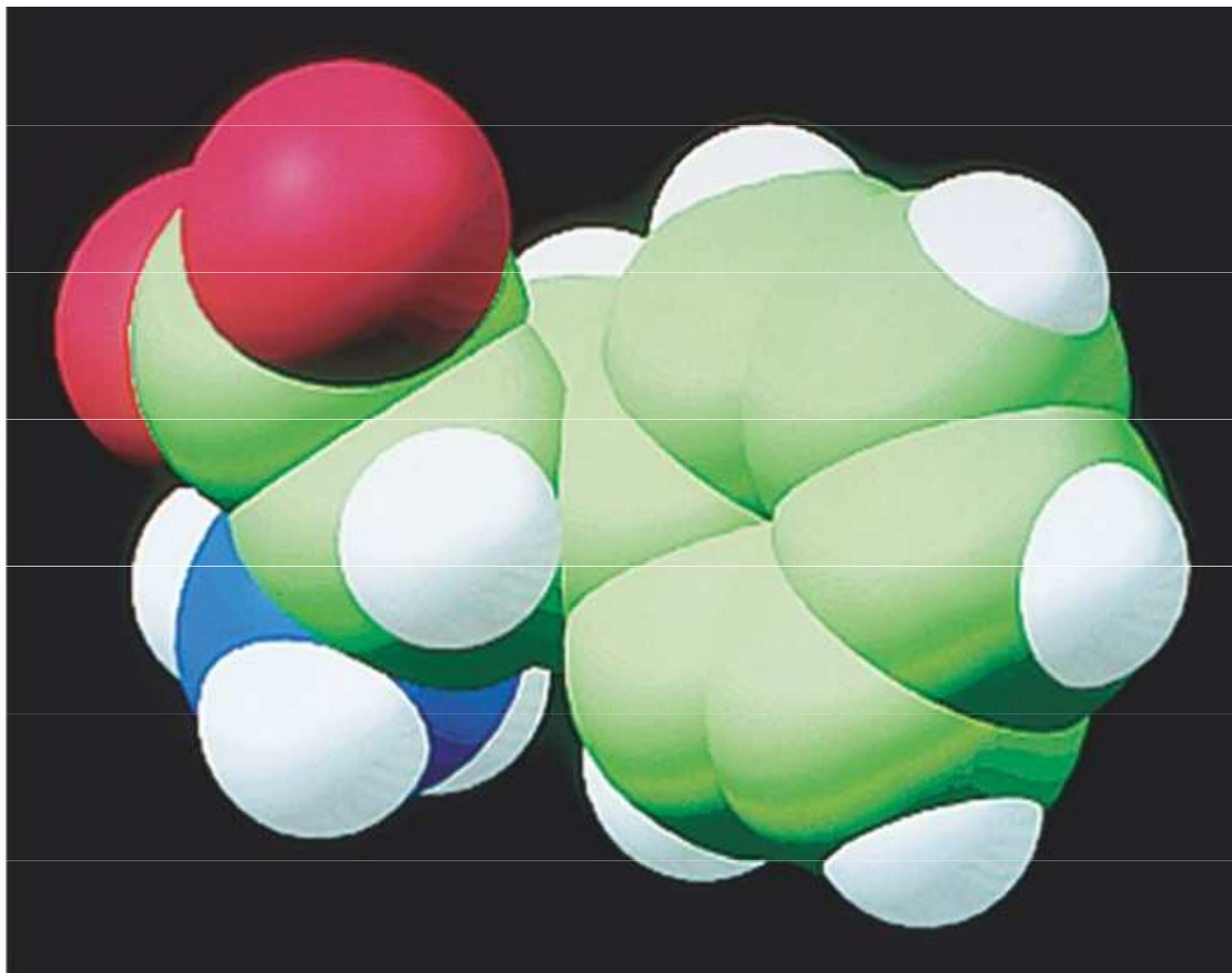
MW > 10 000

# 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

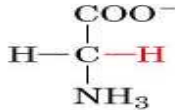


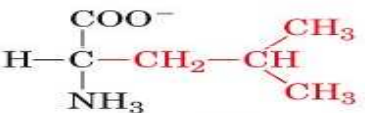
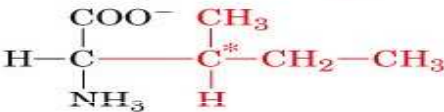
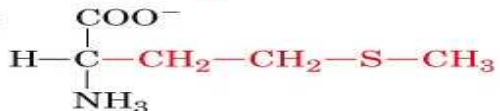
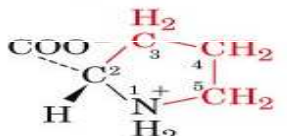
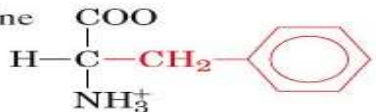
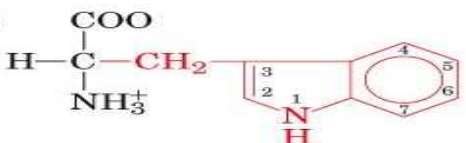
CONH<sub>2</sub> skupinu - AspNH<sub>2</sub>, GluNH<sub>2</sub>

C. Nabité - kyselé COOH skupinu - Asp, Glu

- basické NH<sub>2</sub> skupinu - Lys

guanidinovou skupinu - Arg

imidazolovou skupinu - His

Name, Three-letter Symbol, and One-letter Symbol	Structural Formula <sup>a</sup>	Residue Mass (D) <sup>b</sup>	Average Occurrence in Proteins (%) <sup>c</sup>	pK <sub>1</sub> α-COOH <sup>d</sup>	pK <sub>2</sub> α-NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> <sup>d</sup>	pK <sub>R</sub> Side Chain <sup>d</sup>
<b>Amino acids with nonpolar side chains</b>						
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)

<sup>a</sup>The ionic forms shown are those predominating at pH 7.0 (except for that of histidine<sup>e</sup>), 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.

<sup>b</sup>The residue masses are given for the neutral residues. For molecular masses of the parent amino acids, add 18.0 D, the molecular mass of H<sub>2</sub>O, to the residue masses. For side chain masses, subtract 56.0 D, the formula mass of a peptide group, from the residue masses.

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

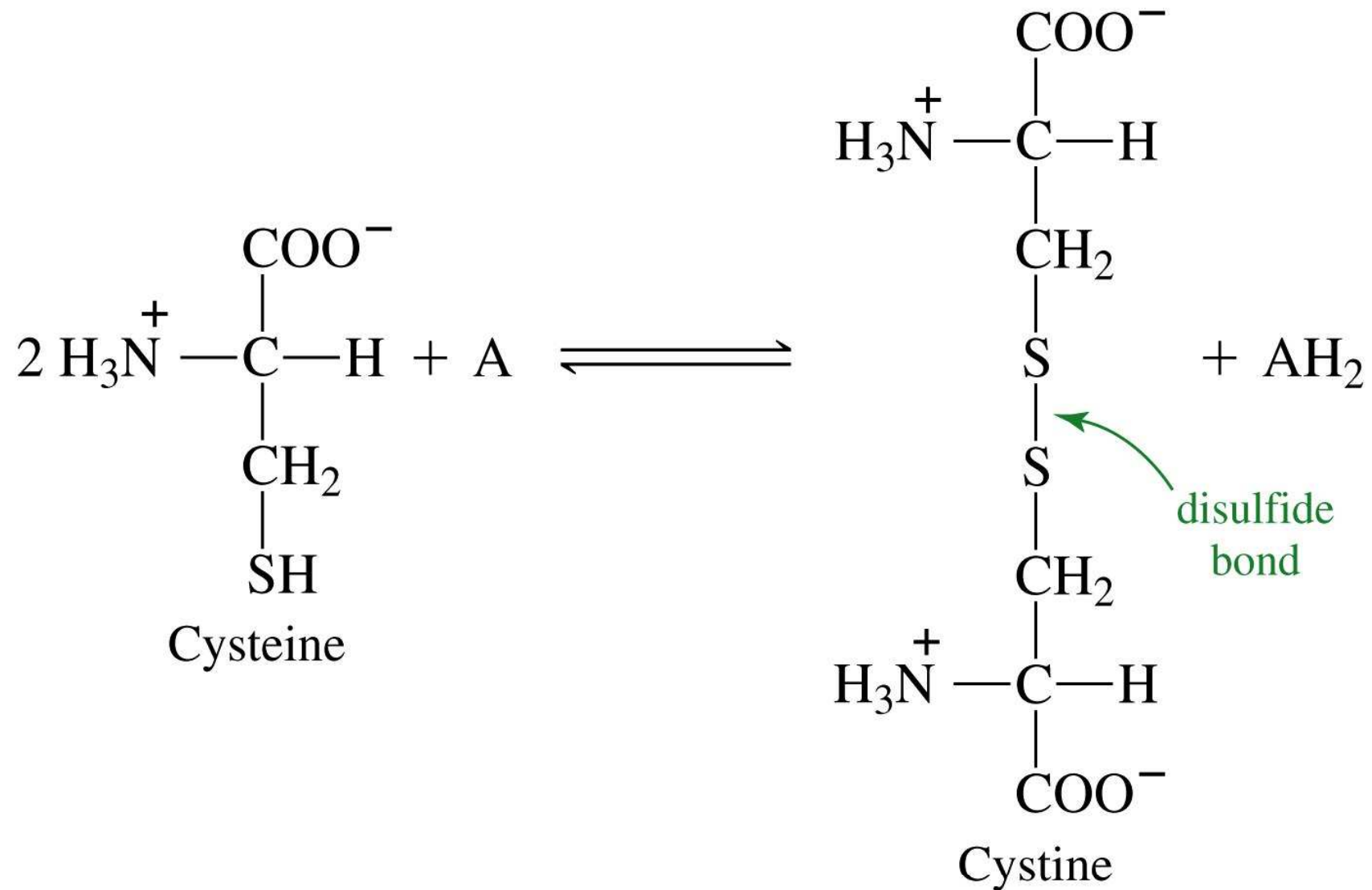
<sup>d</sup>From Dawson, R.M.C., Elliott, D.C., Elliott, W.H., and Jones, K.M., *Data for Biochemical Research* (3rd ed.), pp. 1–31, Oxford Science Publications (1986).

<sup>e</sup>Both the neutral and protonated forms of histidine are present at pH 7.0 because its pK<sub>R</sub> 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.

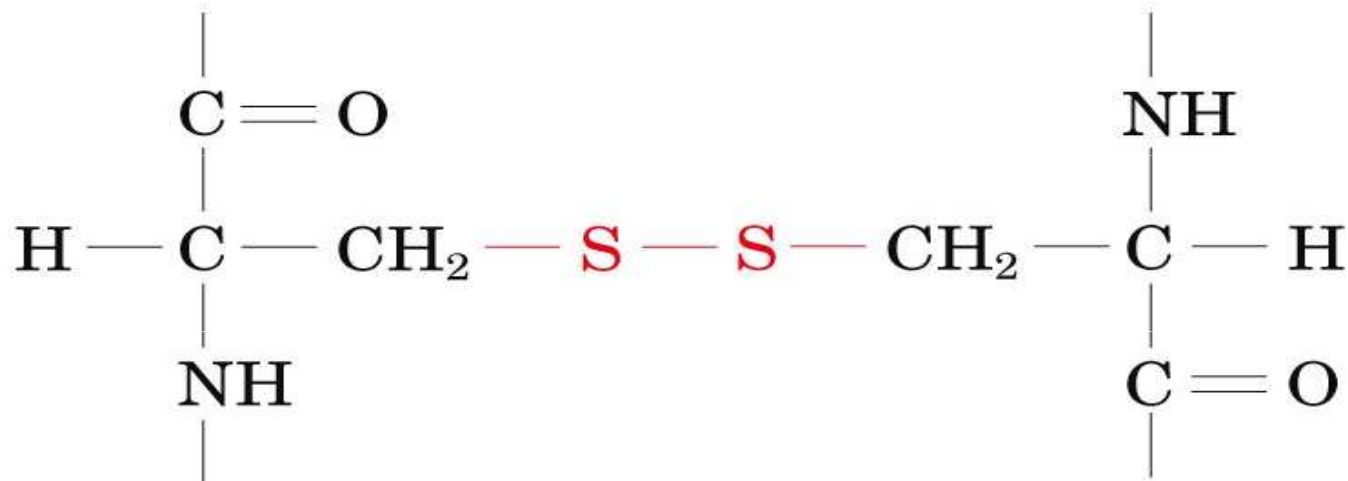
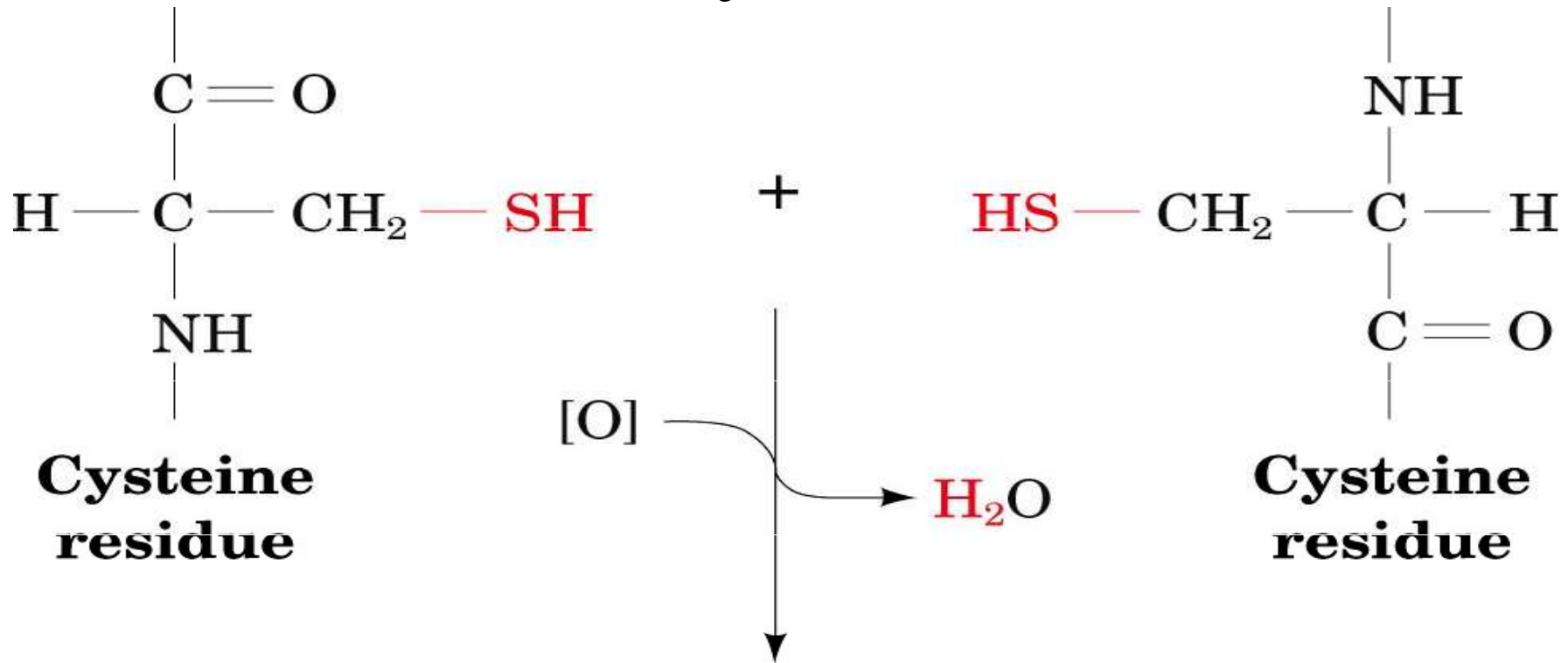
<sup>f</sup>The three- and one-letter symbols for asparagine or aspartic acid are Asx and B, whereas for glutamine or glutamic acid they are Glx and Z. The one-letter symbol for an undetermined or "nonstandard" amino acid is X.

Name Three-letter Symbol, and One-letter Symbol	Structural Formula <sup>a</sup>	Residue Mass (D) <sup>b</sup>	Average Occurrence in Proteins (%) <sup>c</sup>	pK <sub>1</sub> -COOH <sup>d</sup>	pK <sub>2</sub> -NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> <sup>d</sup>	pK <sub>R</sub> Side Chain <sup>d</sup>
<b>Amino acids with uncharged polar side chains</b>						
Serine Ser S		87.1	7.1	2.19	9.21	
Threonine Thr T		101.1	5.6	2.09	9.10	
Asparagine <sup>f</sup> Asn N		114.1	4.3	2.14	8.72	
Glutamine <sup>f</sup> 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)
<b>Amino acids with charged polar side chains</b>						
Lysine Lys K		128.2	6.0	2.16	9.06	10.54 ( -NH <sub>3</sub> )
Arginine Arg R		156.2	5.2	1.82	8.99	12.48 (guanidino)
Histidine <sup>e</sup> His H		137.1	2.2	1.80	9.33	6.04 (imidazole)
Aspartic acid <sup>f</sup> Asp D		115.1	5.2	1.99	9.90	3.90 ( -COOH )
Glutamic acid <sup>f</sup> Glu E		129.1	6.5	2.10	9.47	4.07 ( -COOH )

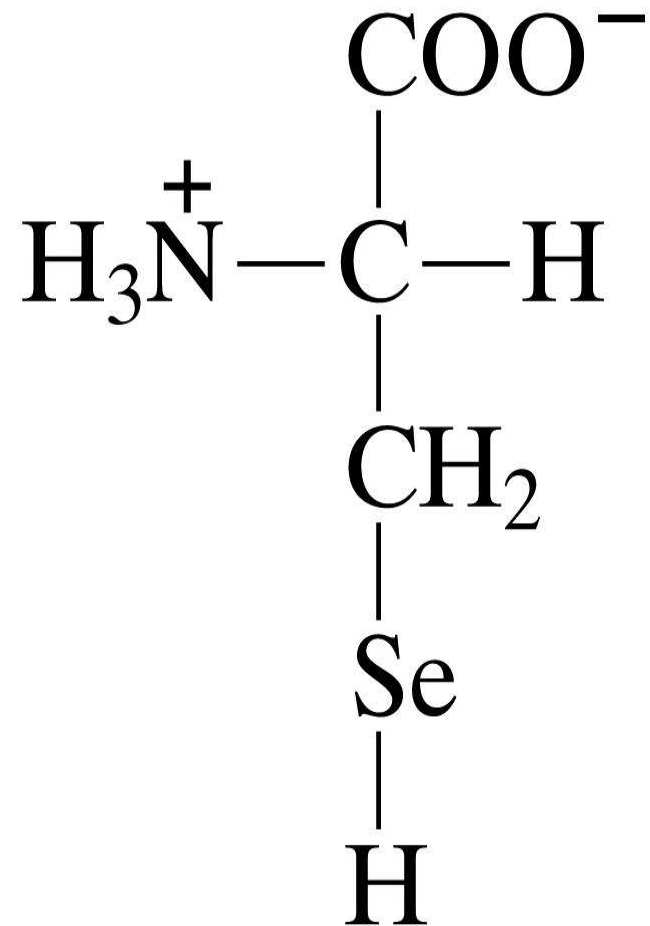
# Cystin



# Cystin



# Selenocystein



# Selenocysteine

Používané zkratky 
}

 třípísmenkové  
 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?*

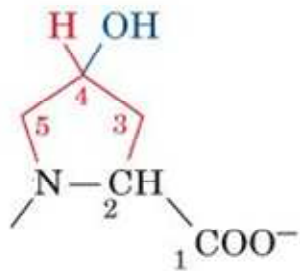
## II. Nekódované aminokyseliny

### A. v bílkovinách posttranslační modifikací AMK

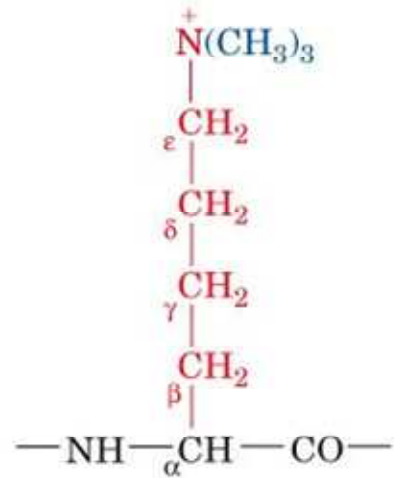
OH-Lys

OH-Pro

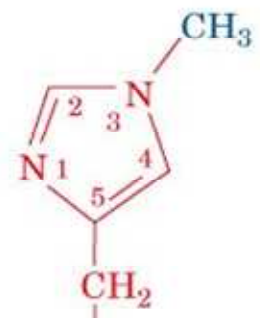
fosfo-Ser



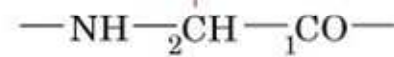
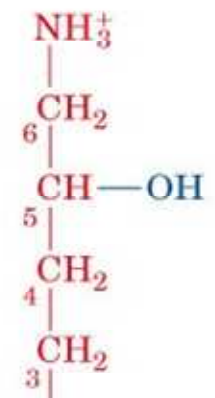
**4-Hydroxyproline**



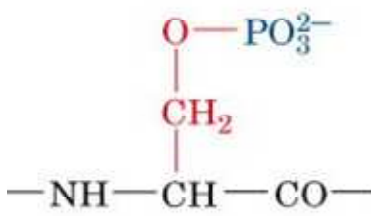
**ε-N,N,N-Trimethyllysine**



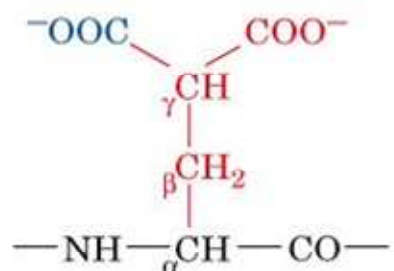
**3-Methylhistidine**



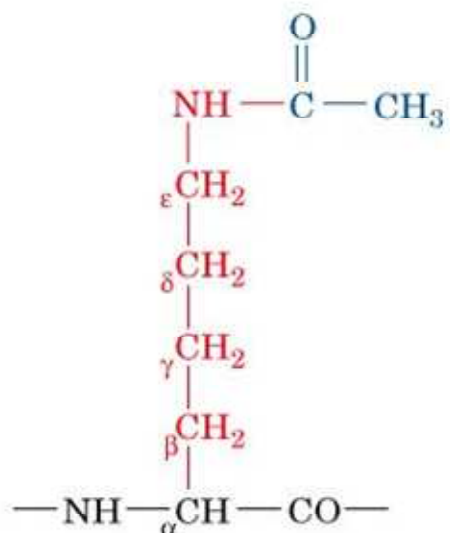
**5-Hydroxylysine**



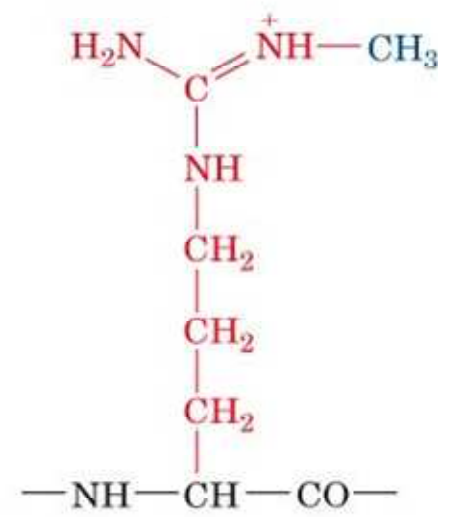
**O-Phosphoserine**



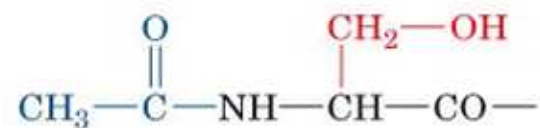
**γ-Carboxyglutamate**



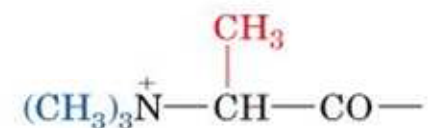
**ε-N-Acetyllysine**



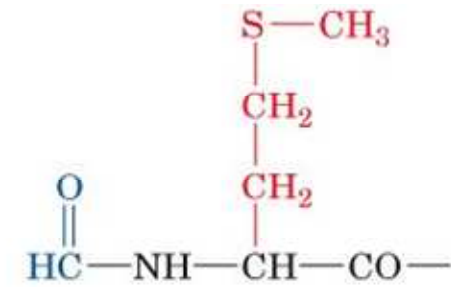
**ω-N-Methylarginine**



**N-Acetylserine**



**N,N,N-Trimethylalanine**



**N-Formylmethionine**

B. volné s biologickou funkcí

$\beta$  alanin

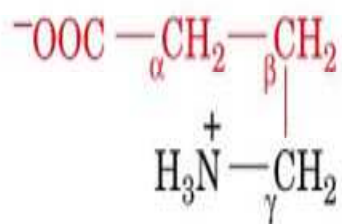
ornitin a citrulin

$\gamma$  aminomáselná

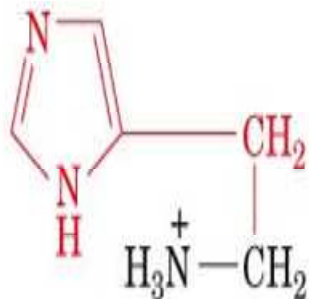
antibiotika - azaserin, cykloserin, chloramfenikol

nervové mediátory - DOPA, dopamin, adrenalin

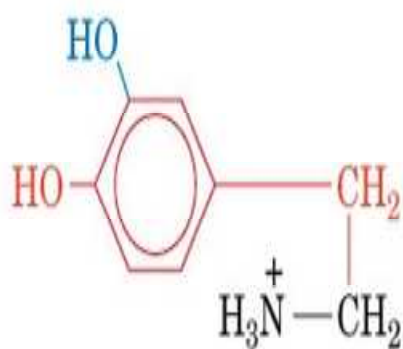
hormony - thyroxin, trijodthyronin



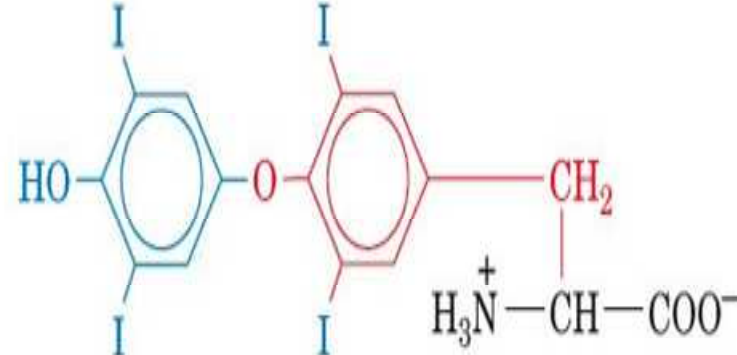
**$\gamma$ -Aminobutyric acid (GABA)**



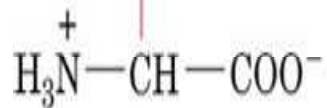
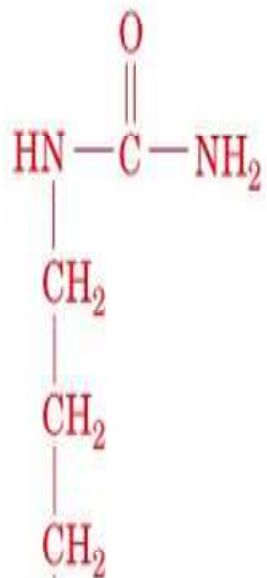
**Histamine**



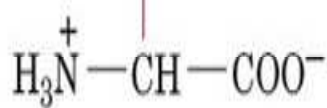
**Dopamine**



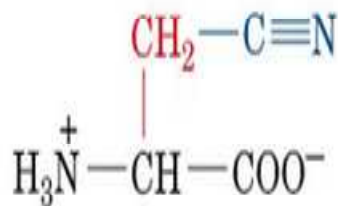
**Thyroxine**



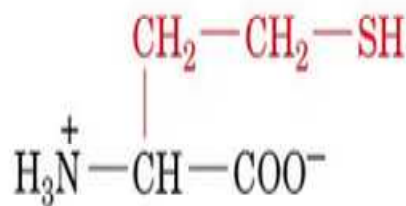
**Citrulline**



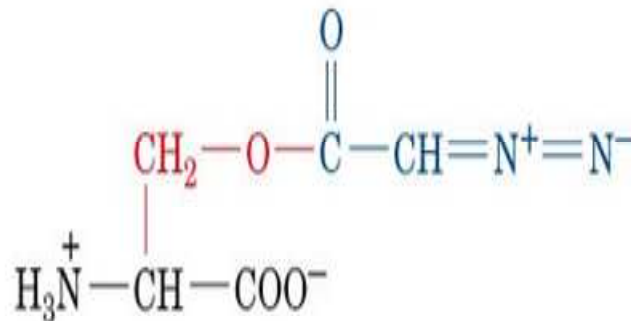
**Ornithine**



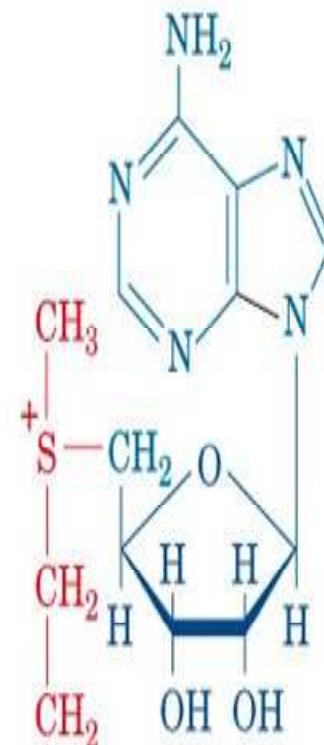
**$\beta$ -Cyanoalanine**



**Homocysteine**



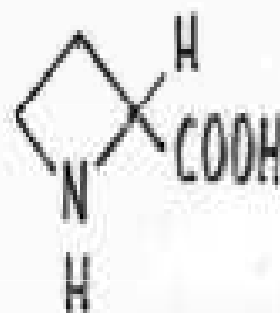
**Azaserine**



**S-Adenosylmethionine**



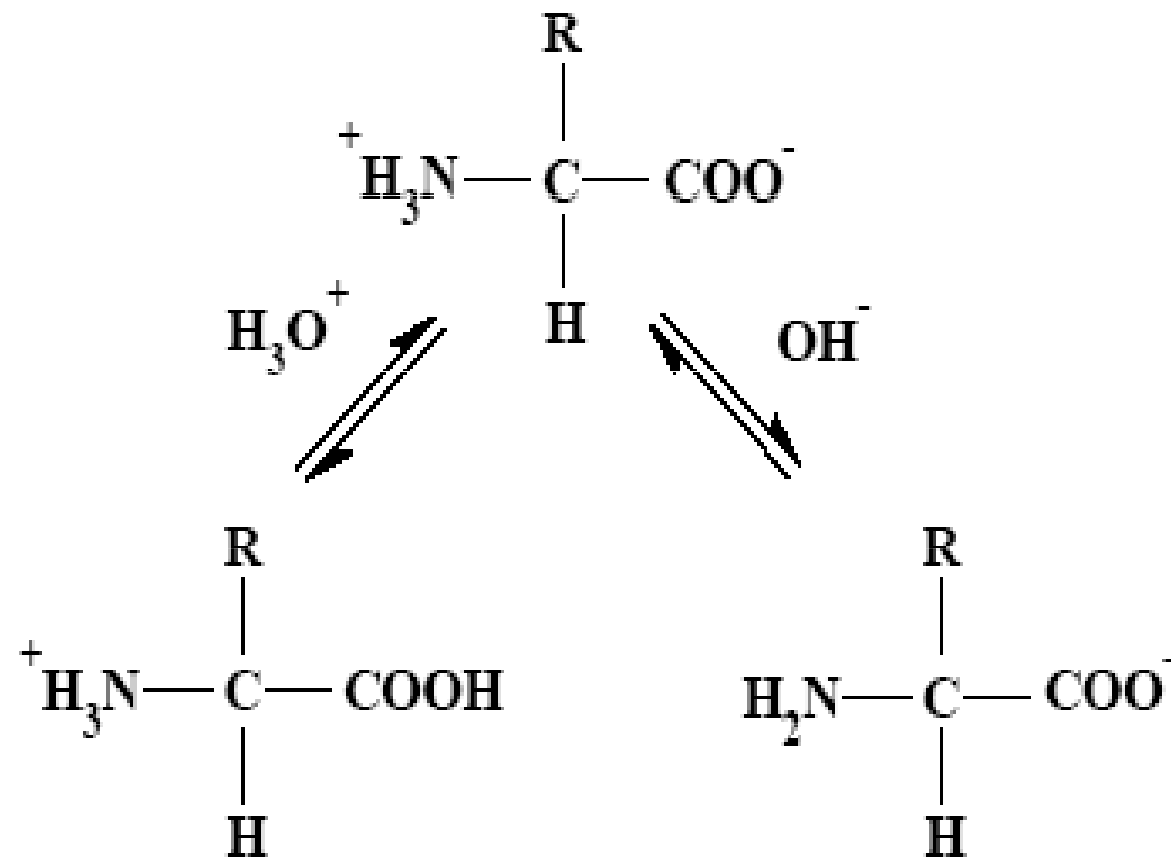
k. aminocyklopropyl-  
karboxylová



k. azetidinkarboxylová

Vlastnosti aminokyselin

ACIDOBAZICKÉ VLASTNOSTI







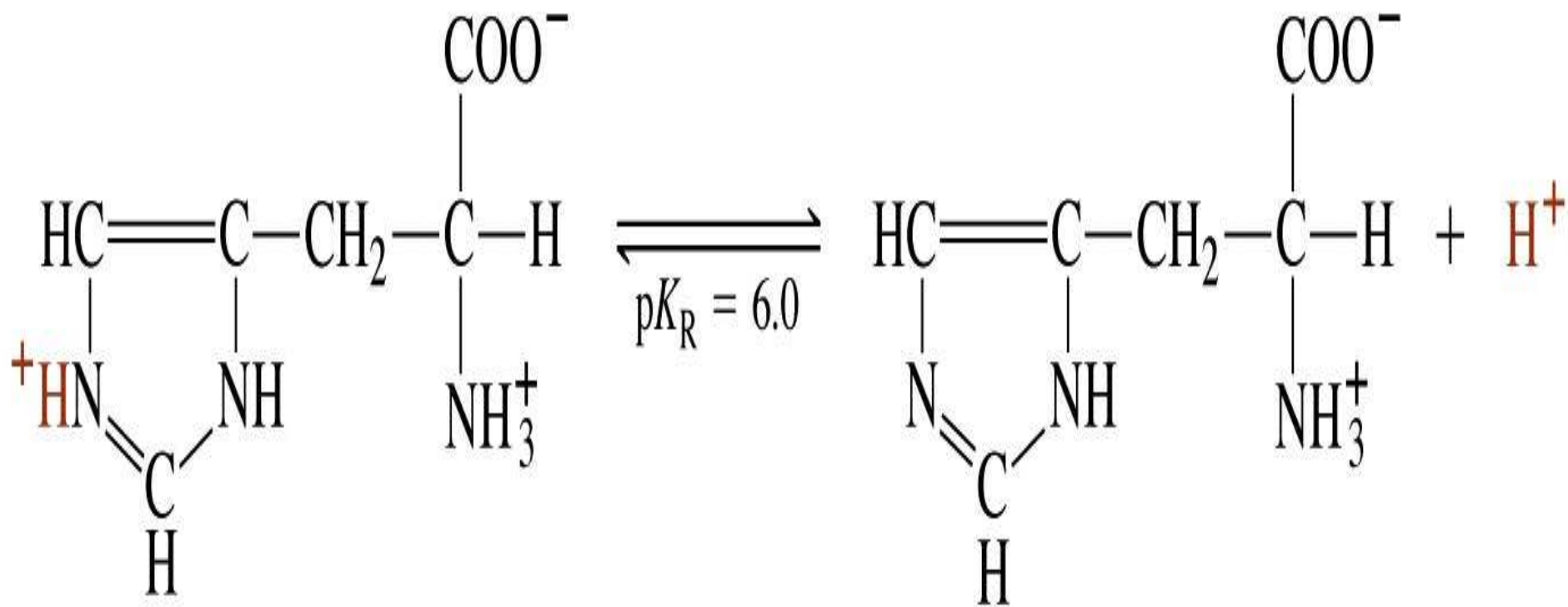
Izoelektrický bod  $pI = \frac{pK_{COOH} + pK_{NH_2}}{2}$

Tabulka pK

Skupina	pK	Skupina	pK	Skupina	pK
<b><math>\alpha</math> COOH</b>	1.8 - 2.5	<b><math>\beta</math> COOH</b>	3.9	<b><math>\gamma</math> COOH</b>	4.1
<b><math>\alpha</math> NH<sub>2</sub></b>	9 - 10	<b><math>\epsilon</math> NH<sub>2</sub></b>	10.8	<b>guanidin</b>	12.5
<b>imidazol</b>	6.0	<b>SH</b>	8.3	<b>OH</b>	10.1

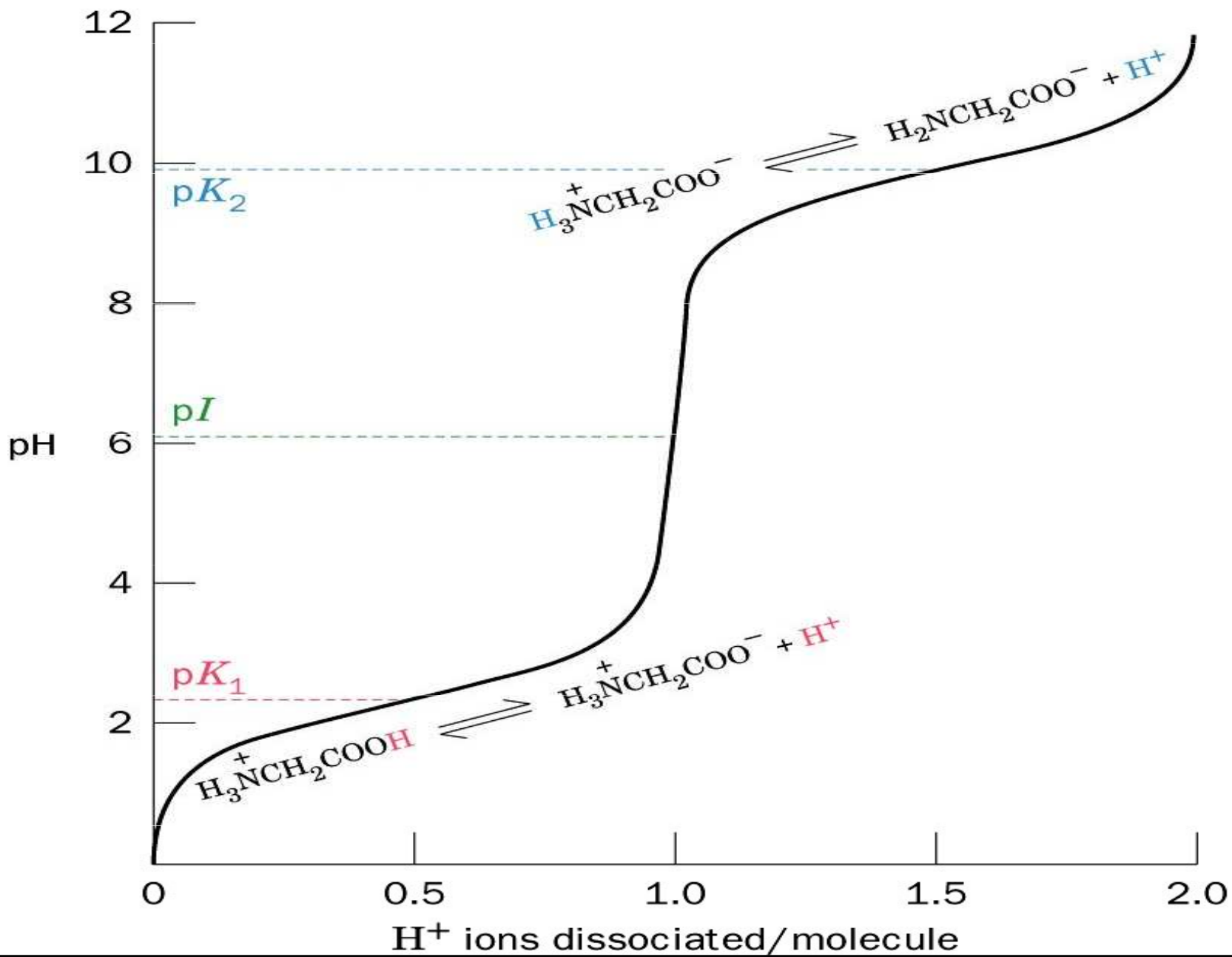
Pufrační kapacita

Titrační křivky

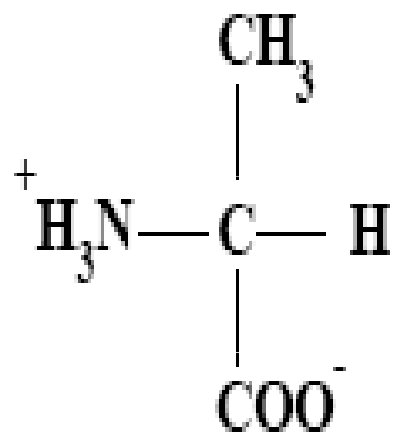


Histidine (His)

# Titrační křivka glycinu

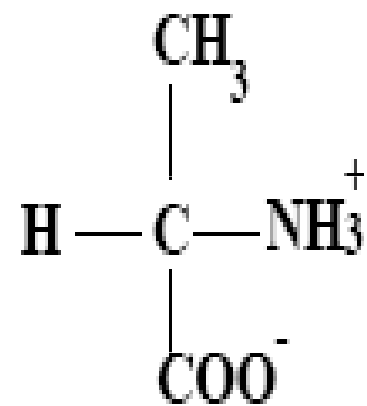


# OPTICKÁ AKTIVITA



L -alanin

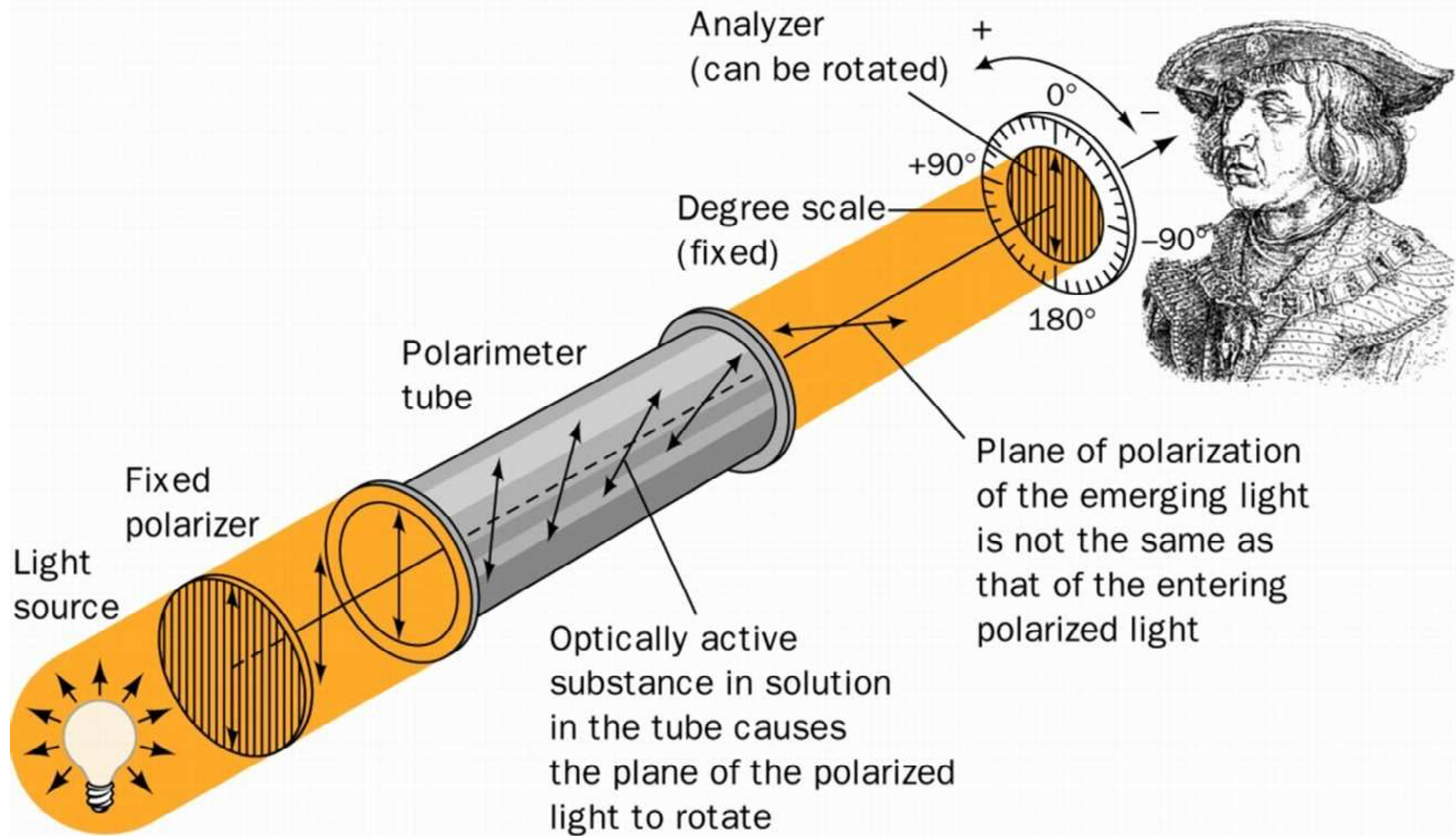
L



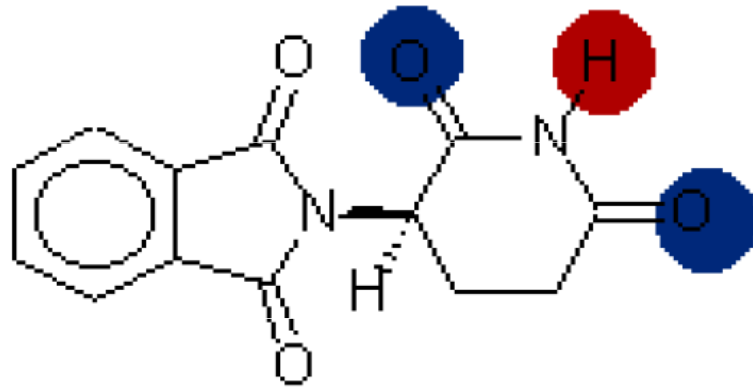
D-alanin

R

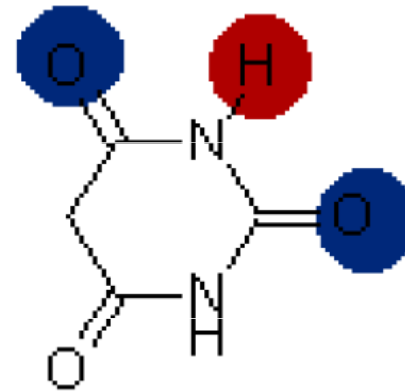
enantiomery



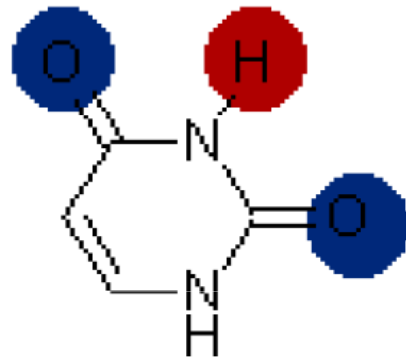
# Thalidomid



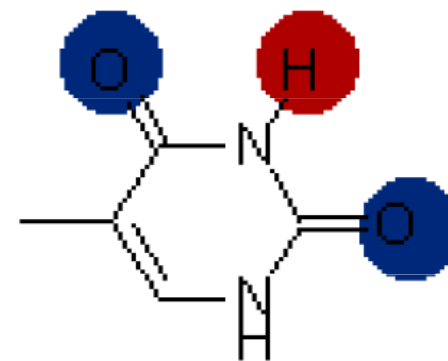
Thalidomid



Barbitursäure



Uracil

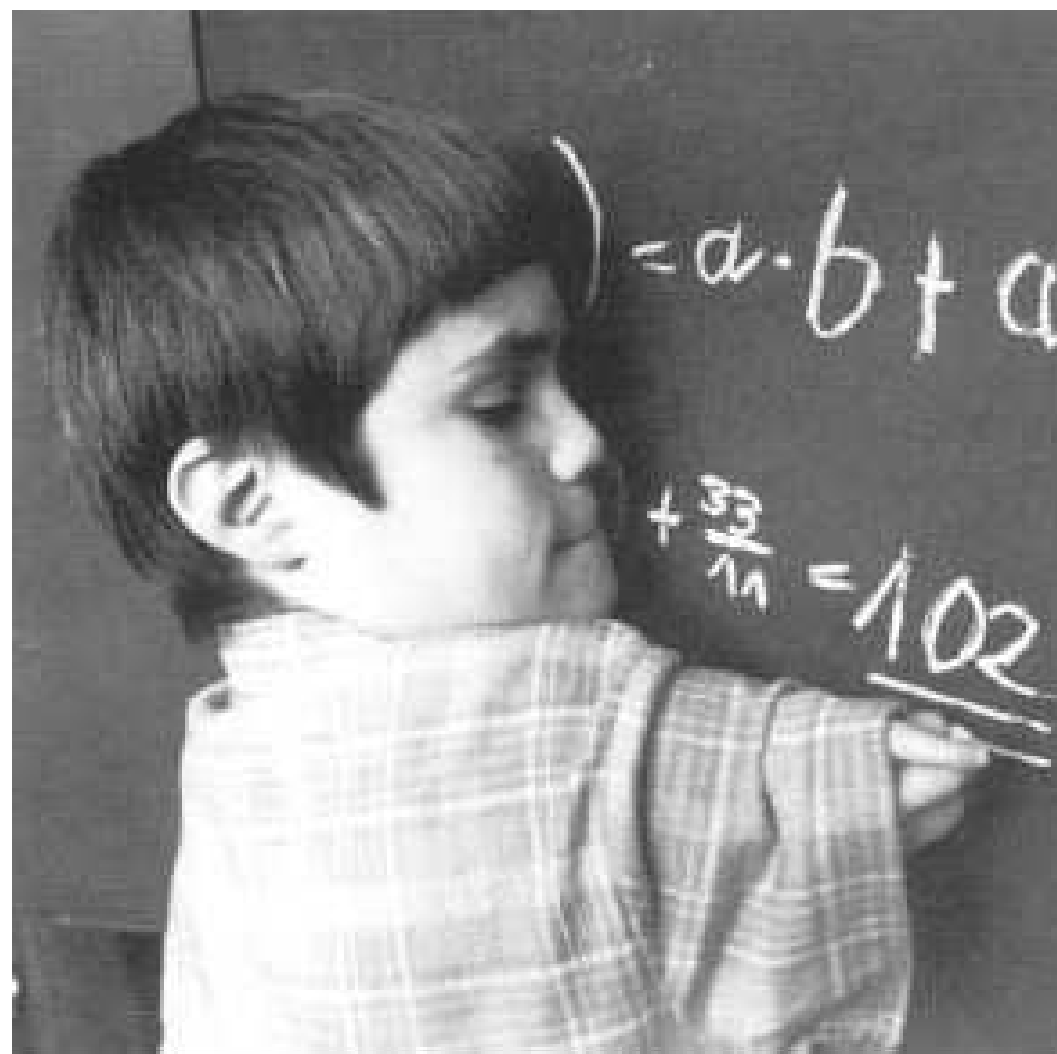


Thymin

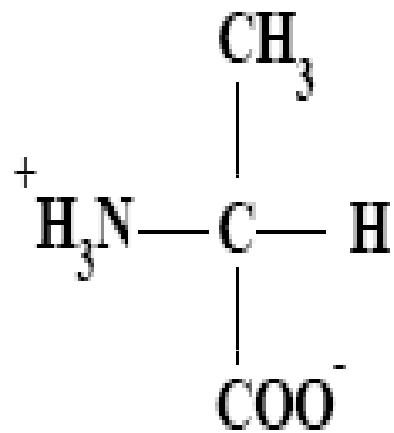
# Thalidomid





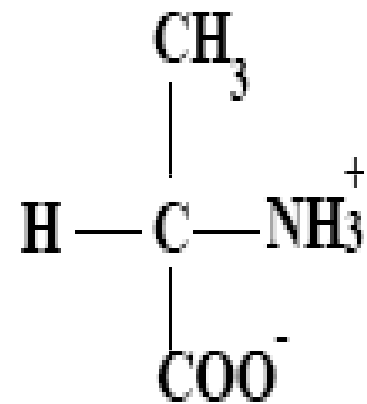


# OPTICKÁ AKTIVITA



L -alanin

L

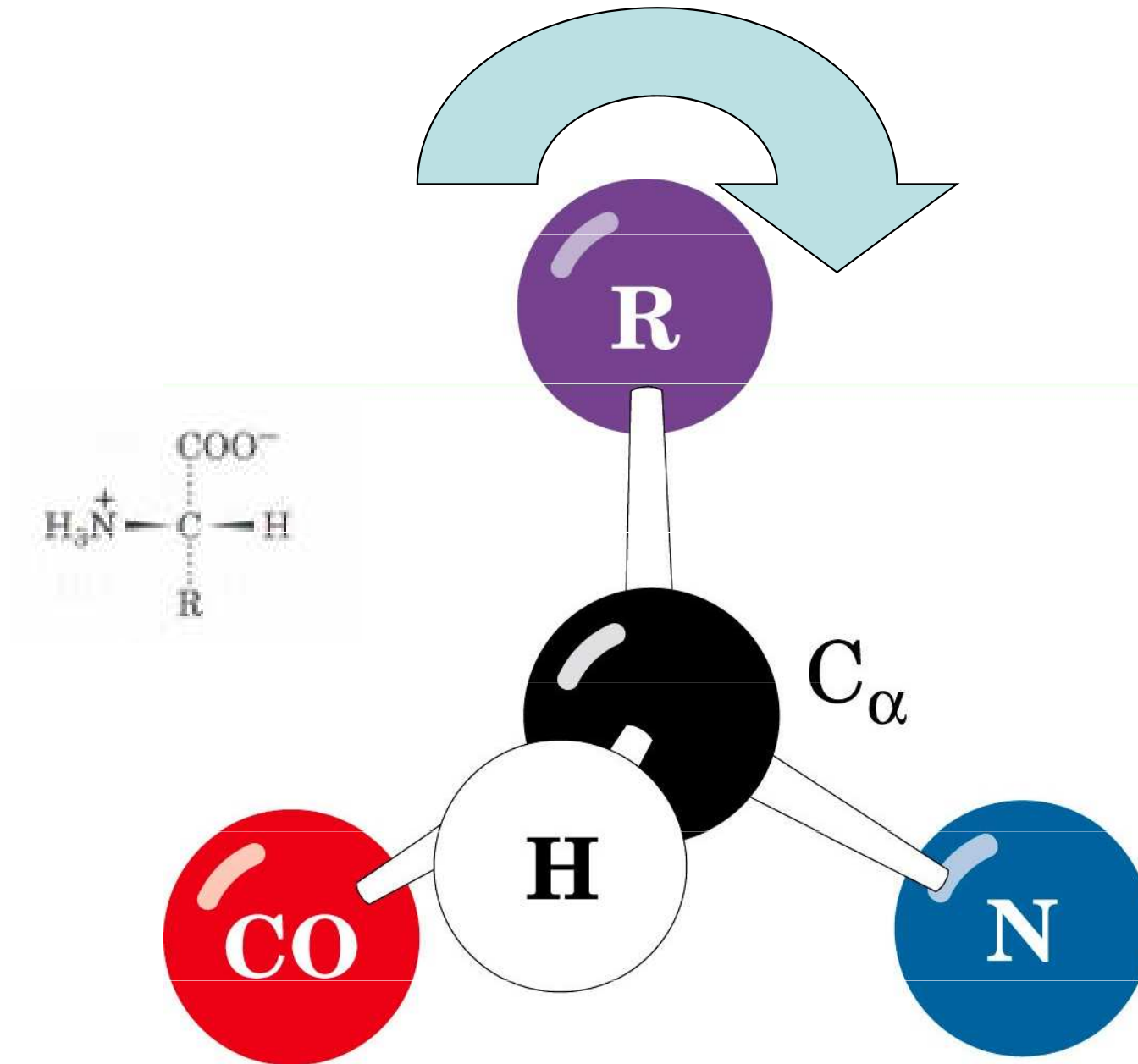


D-alanin

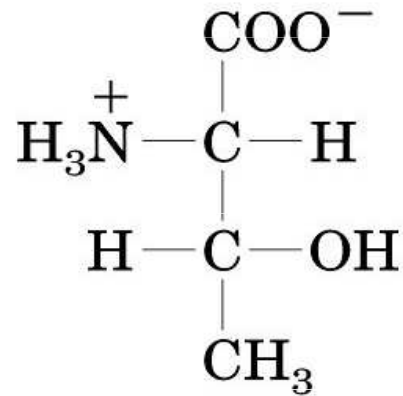
R

enantiomery

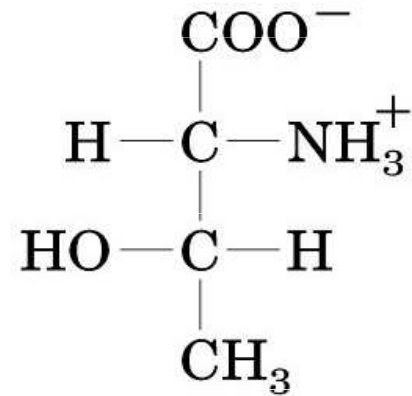
# L AMK - CO-R-N



# Diastomery threoninu

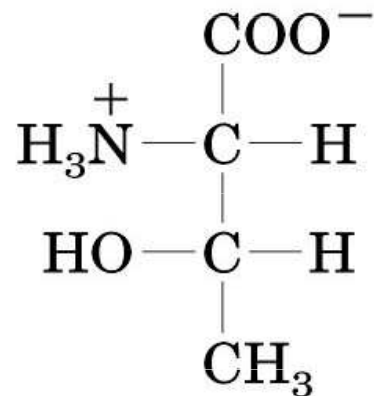


**L-Threonine**

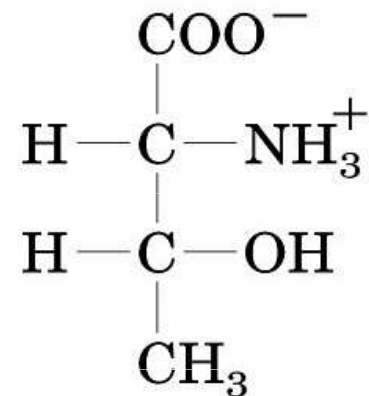


**D-Threonine**

Mirror  
plane



**L-*allo*-Threonine**



**D-*allo*-Threonine**

## CHEMICKÉ VLASTNOSTI

- reakce dané přítomností COOH a NH<sub>2</sub> skupin

ninhydrinová reakce - NH<sub>2</sub>

- reakce vedlejších skupin

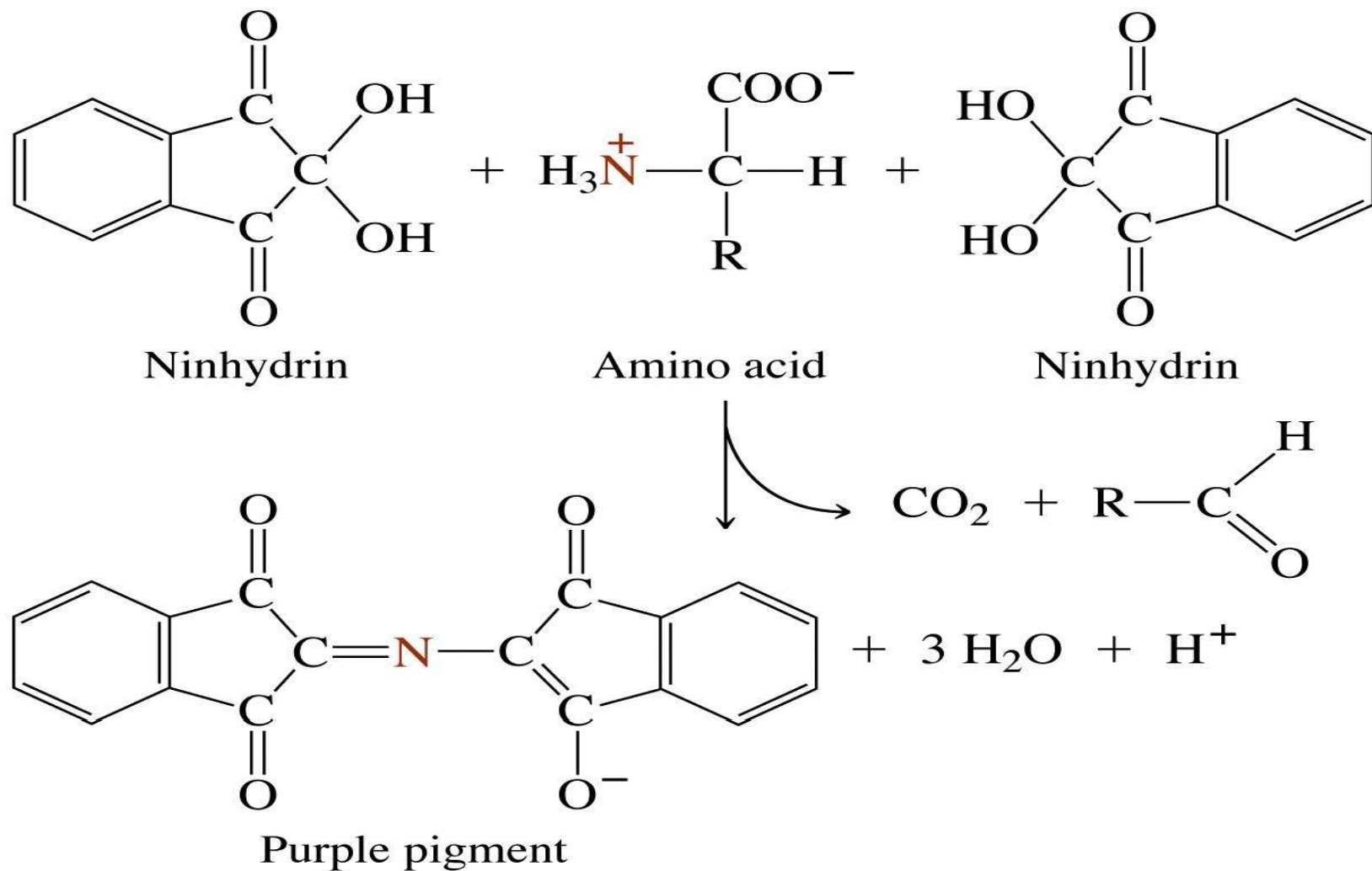
reakce Sakaguchiho - guanidinová skupina

xantoproteinová reakce - aromatické aminokyseliny

Paulyho reakce - tyrosin

Adamkiewiczova reakce - indol

# Ninhydrinová reakce



# Reakce AMK s dansylchloridem

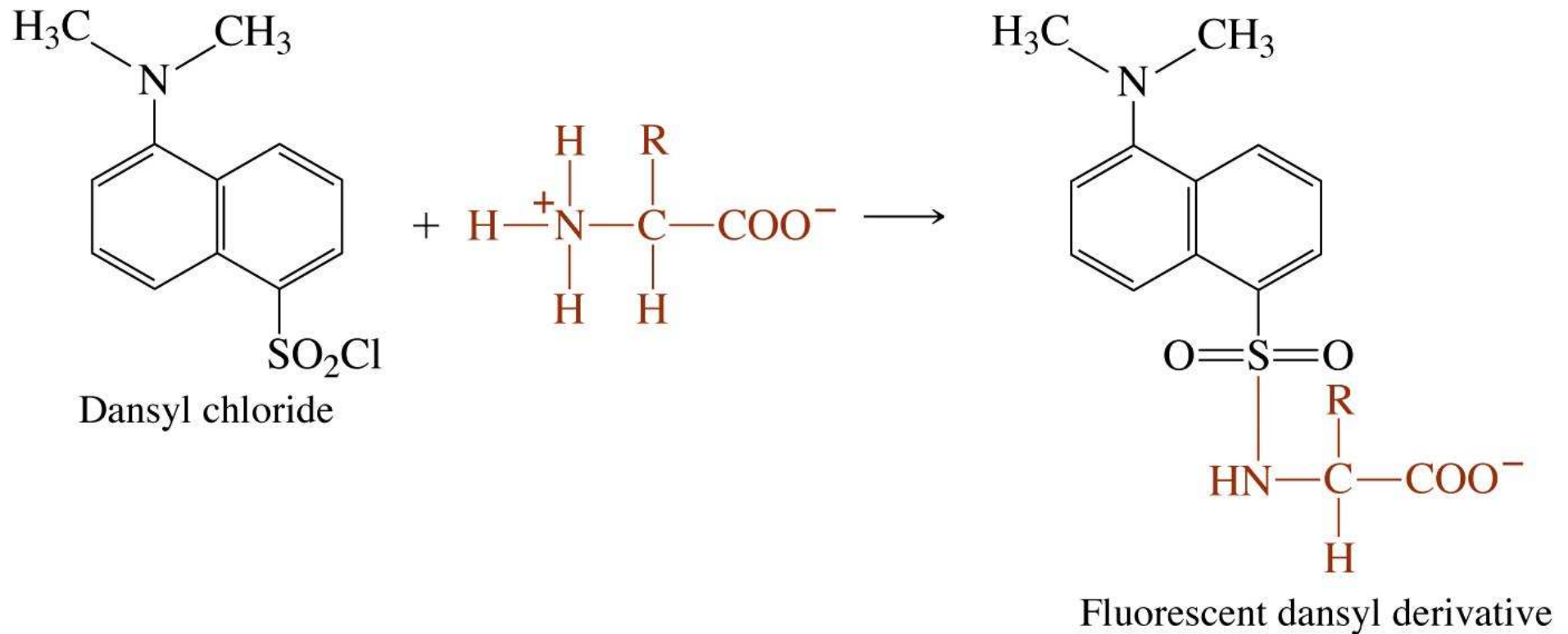


Figure 3-9d Concepts in Biochemistry, 3/e  
© 2006 John Wiley & Sons

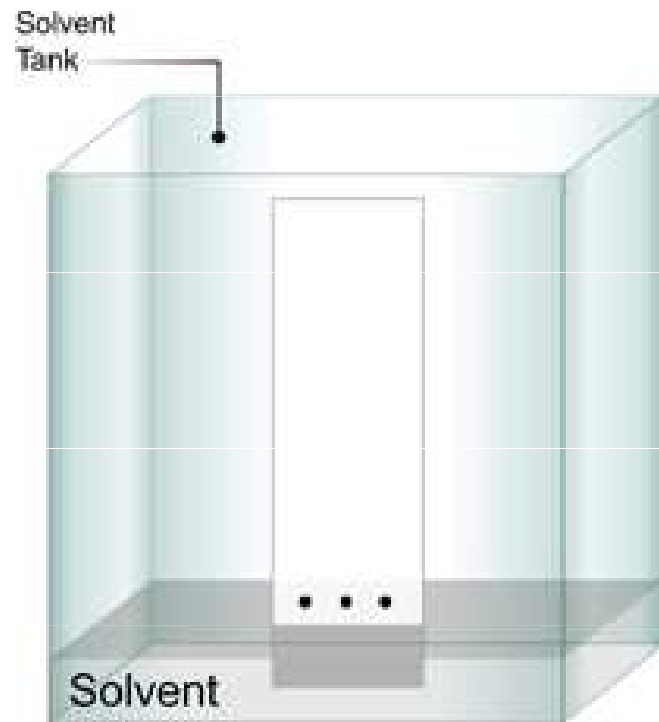
## Analýza aminokyselin

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

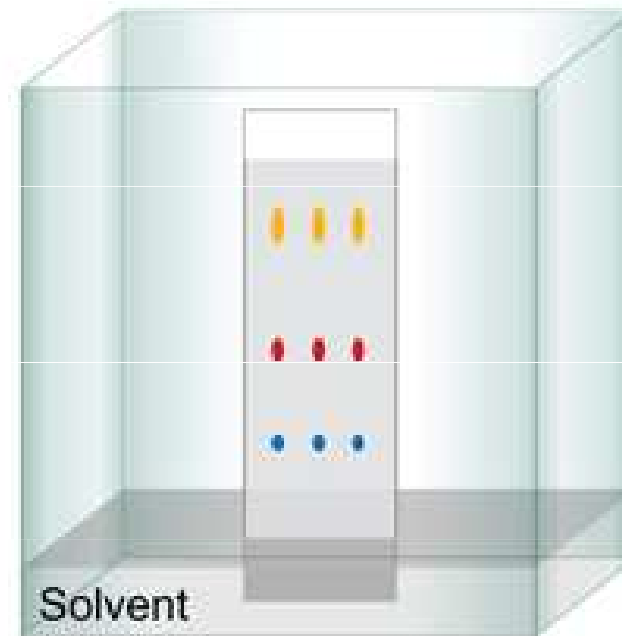


# Papírová chromatografie AMK

Martin Syngge Nobelova cena za chemii 1952

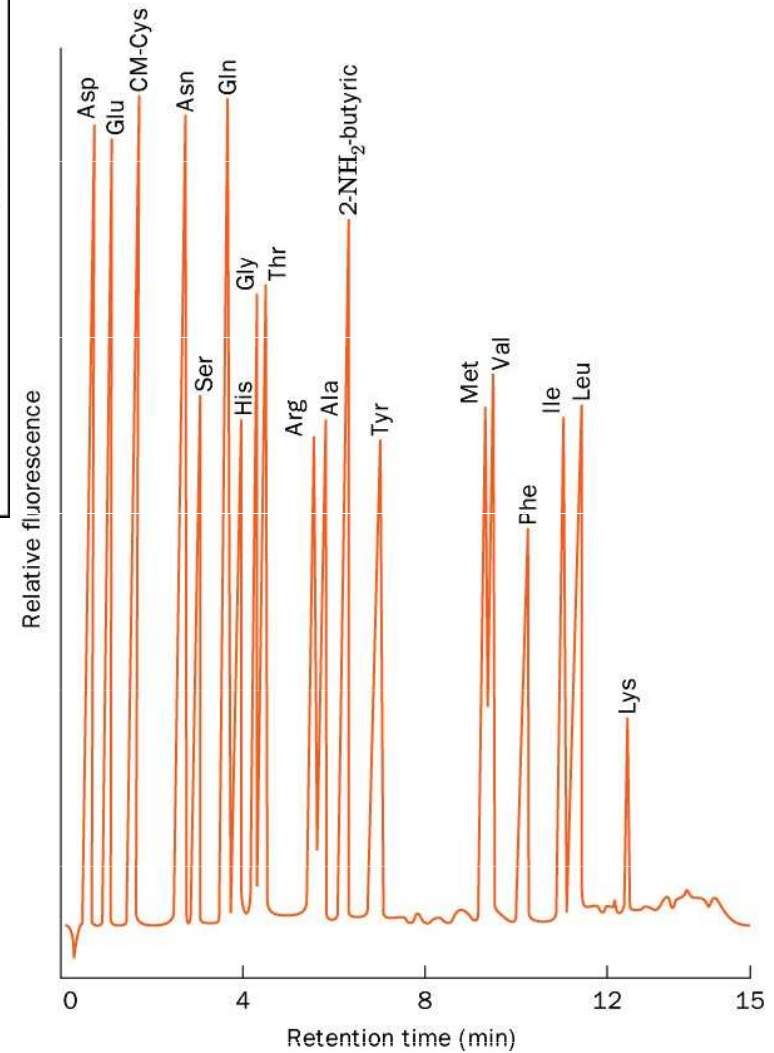
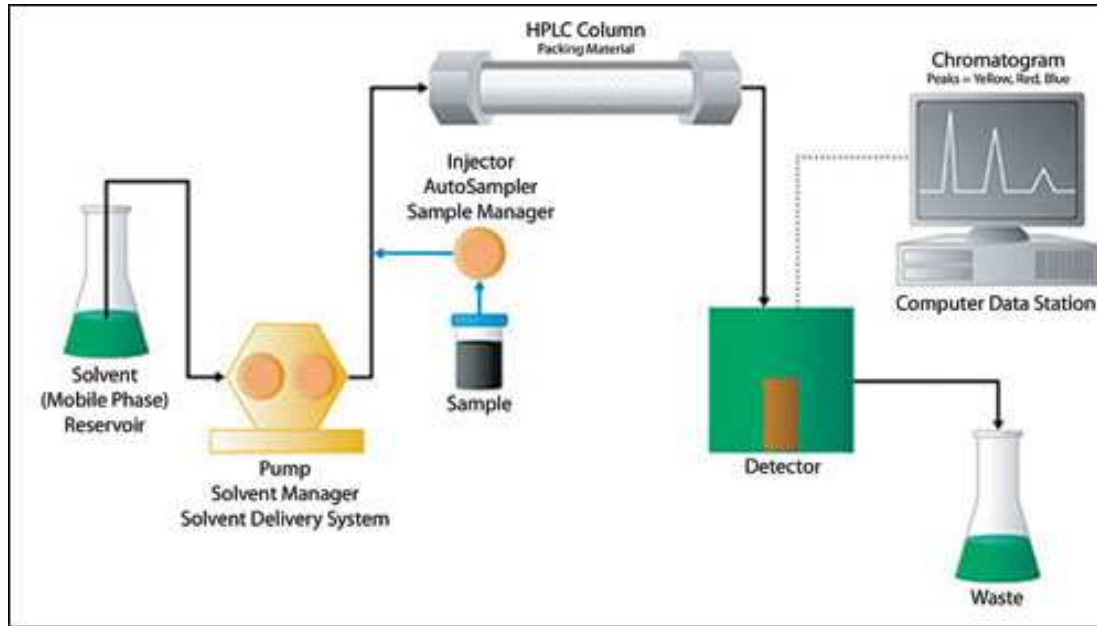


Time Zero



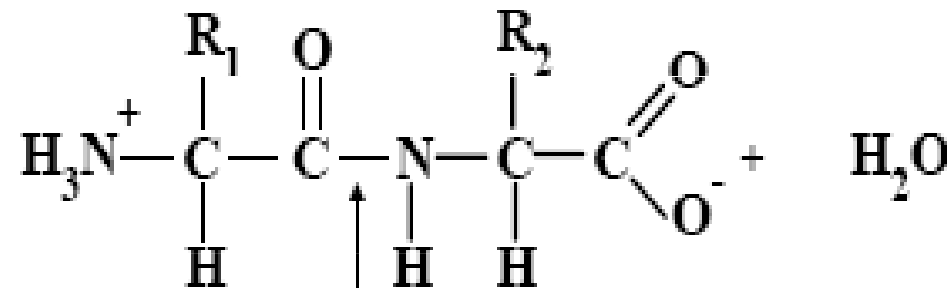
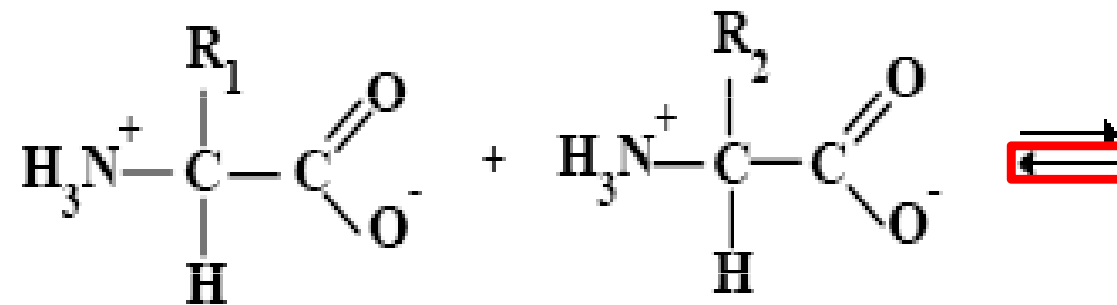
After Ten Minutes

# 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

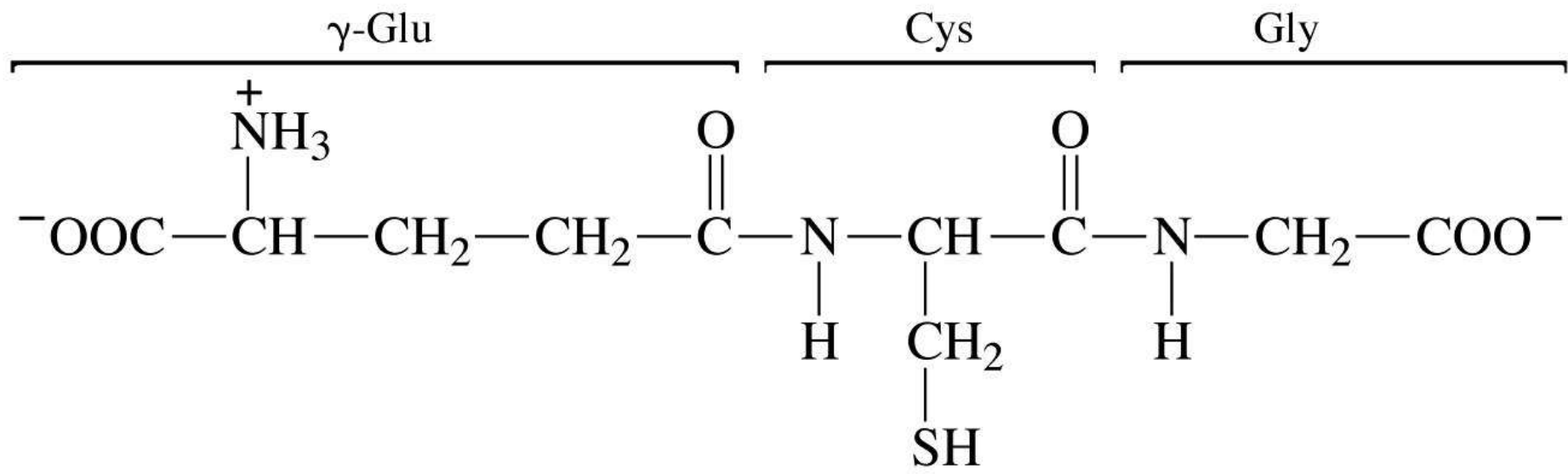
Peptidové hormóny - oxytosin  
vasopresin  
inzulin  
glukagon

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)

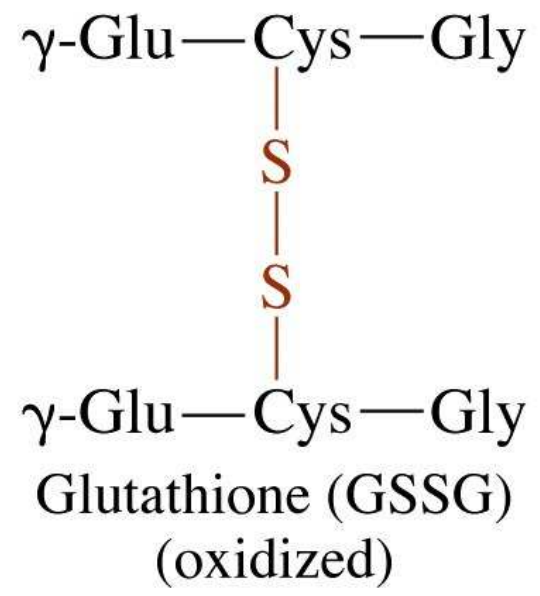


Figure 3-11a Concepts in Biochemistry, 3/e  
© 2006 John Wiley & Sons

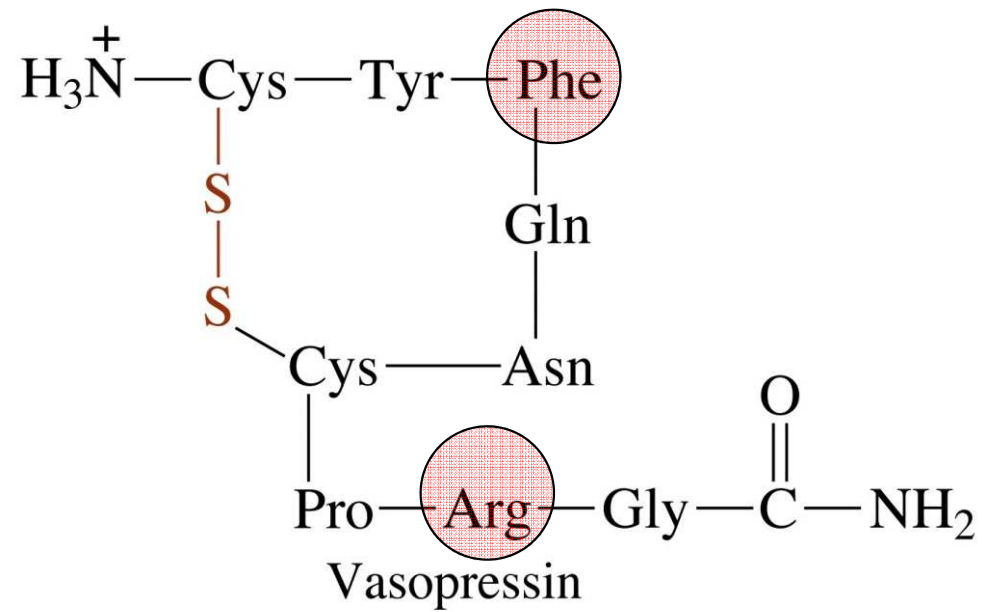


Figure 3-11c Concepts in Biochemistry, 3/e  
© 2006 John Wiley & Sons

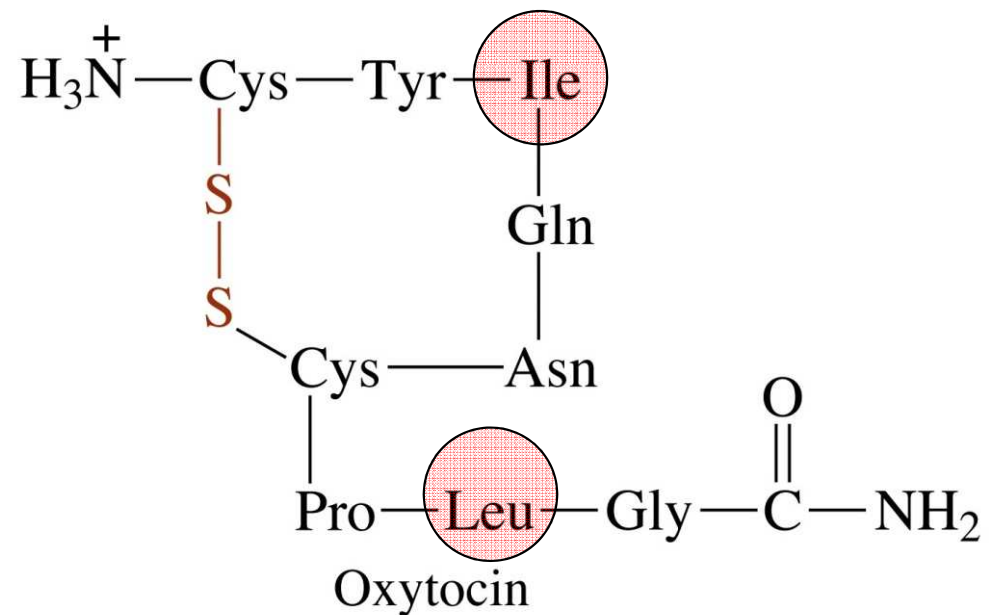


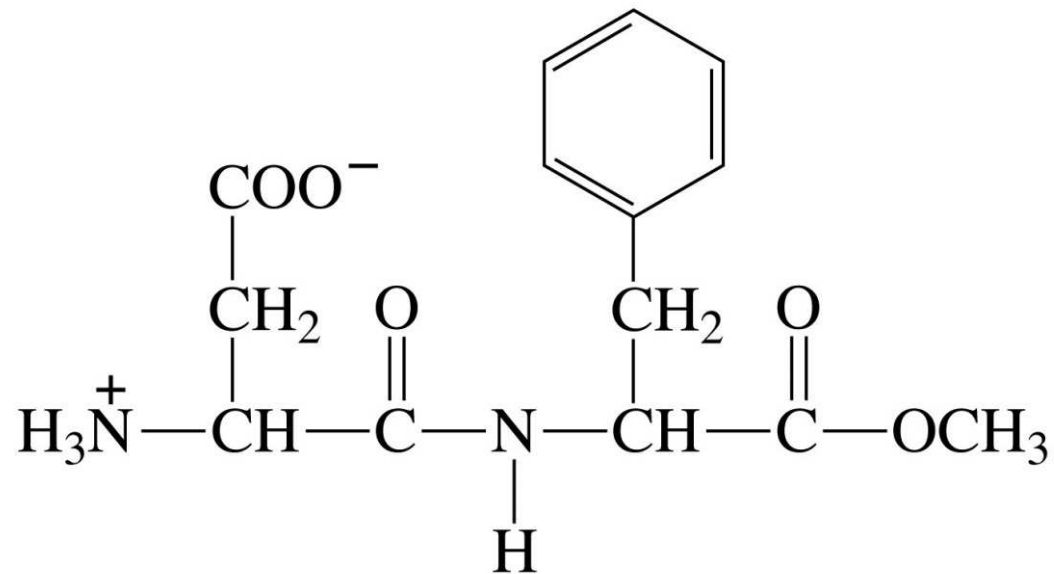
Figure 3-11b Concepts in Biochemistry, 3/e  
© 2006 John Wiley & Sons



Tyr—Gly—Gly—Phe—Leu  
Leucine enkephalin

Tyr—Gly—Gly—Phe—Met  
Methionine enkephalin

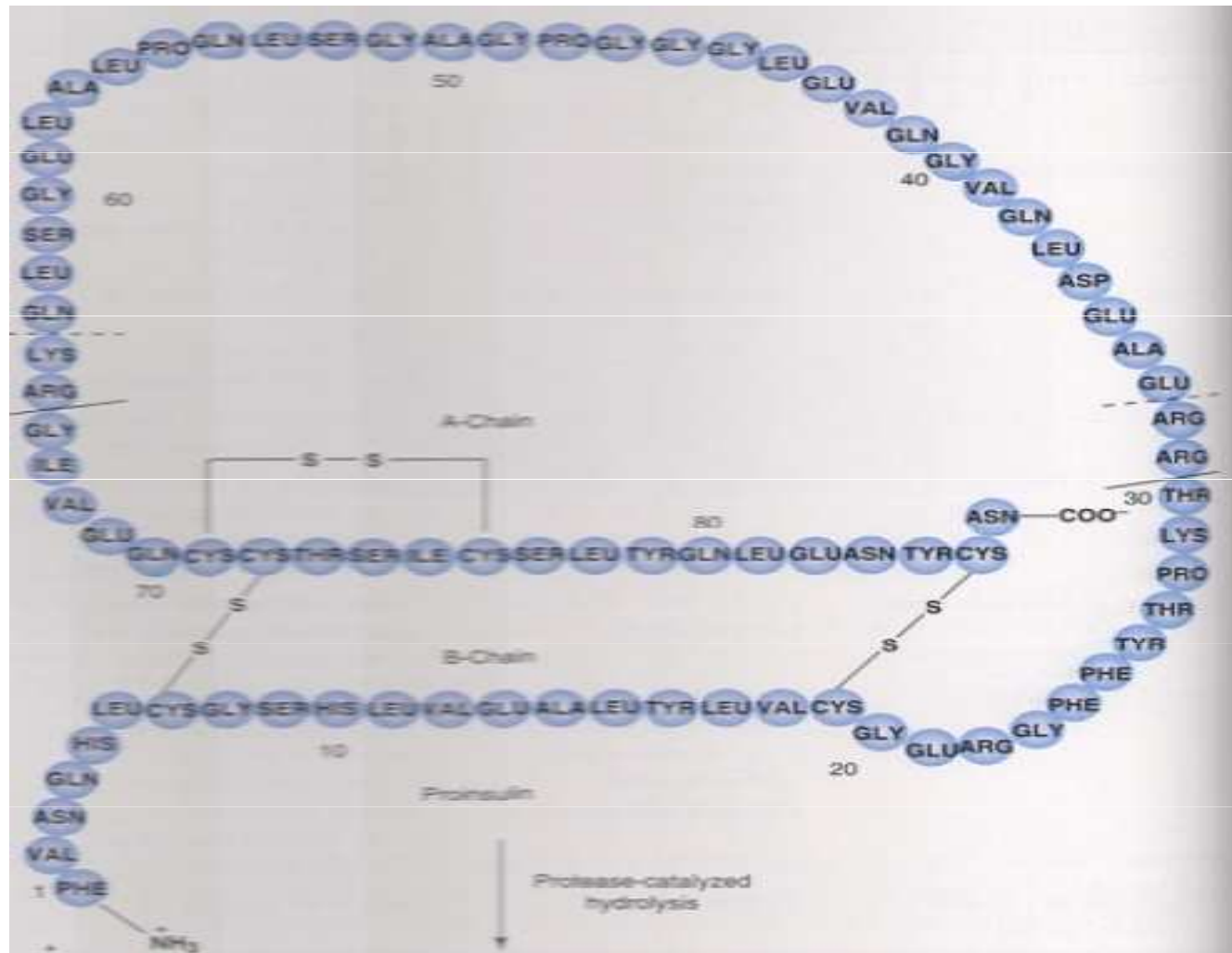
Figure 3-11e Concepts in Biochemistry, 3/e  
© 2006 John Wiley & Sons



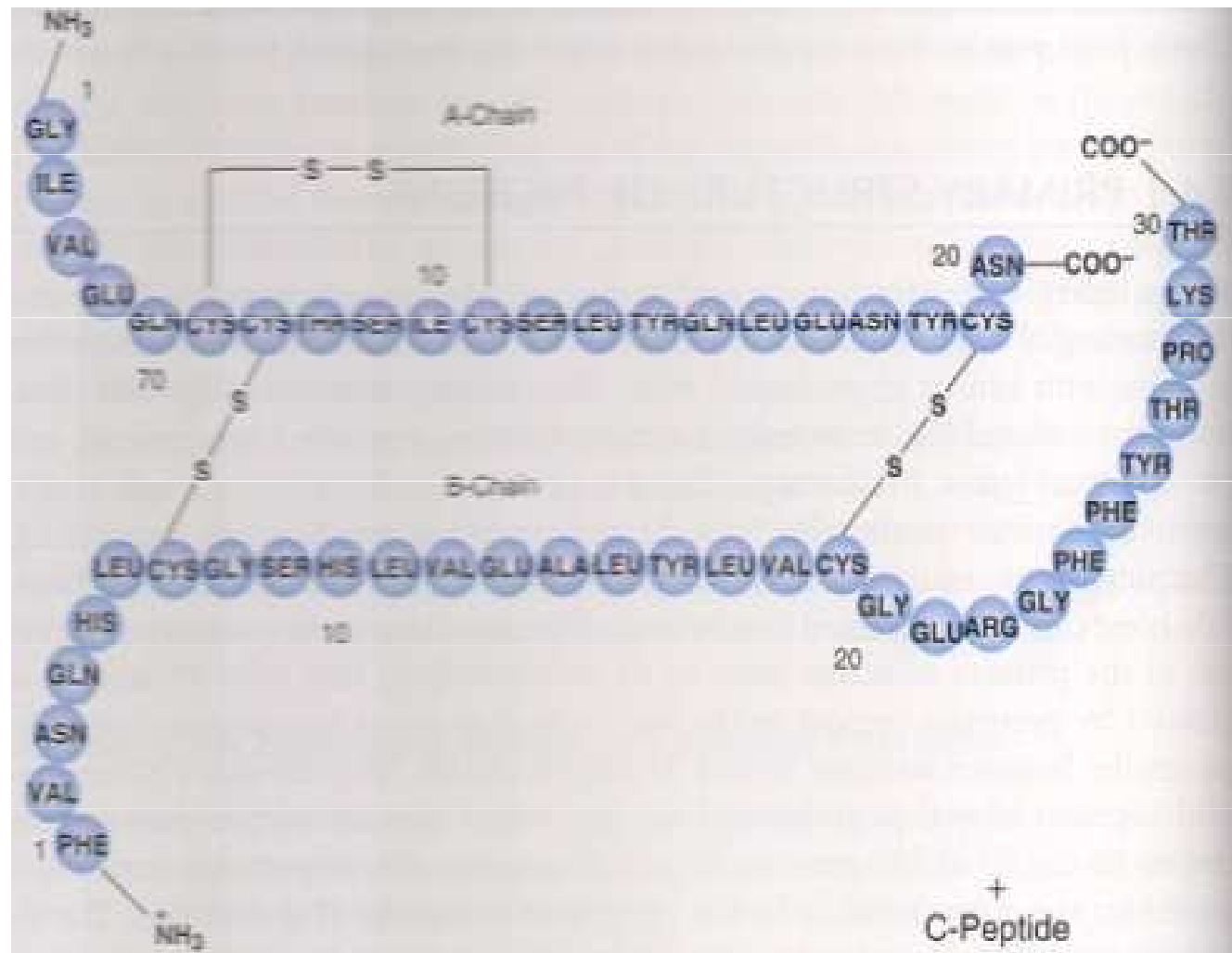
L-Aspartyl-L-phenylalanine methyl ester  
(aspartame)

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

# Proinzulín 84 AMK

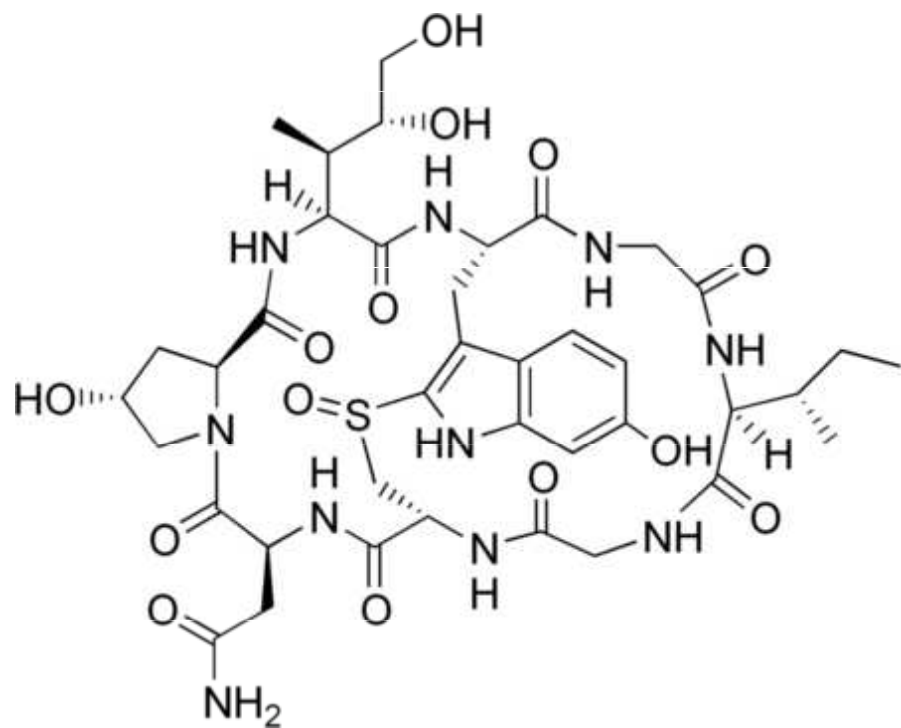


# Inzulín – 51 AMK

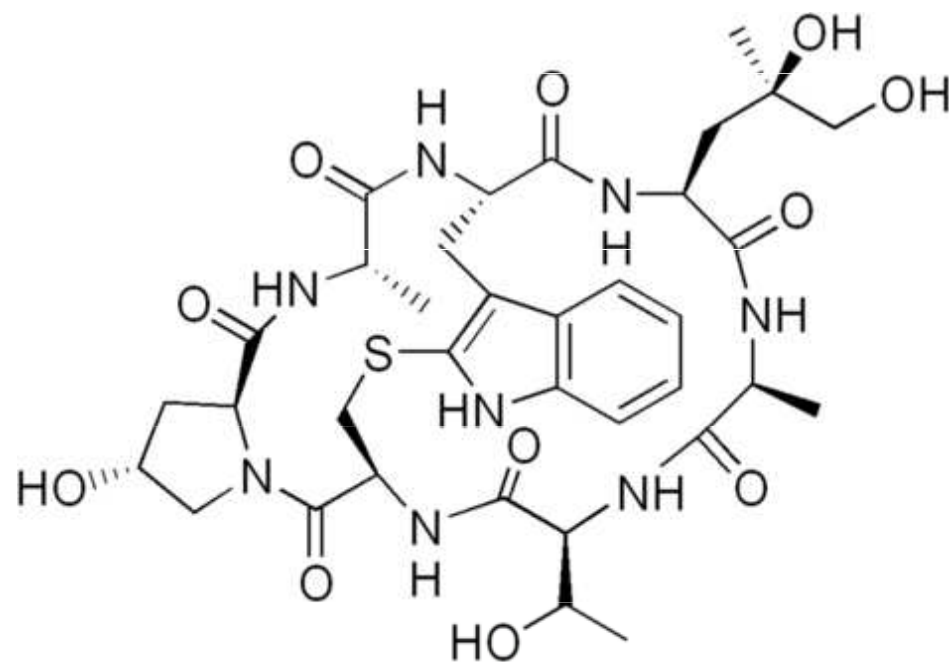


# Falotoxiny

**Amanitin**



**Faloidin**



*Amanita phalloides*



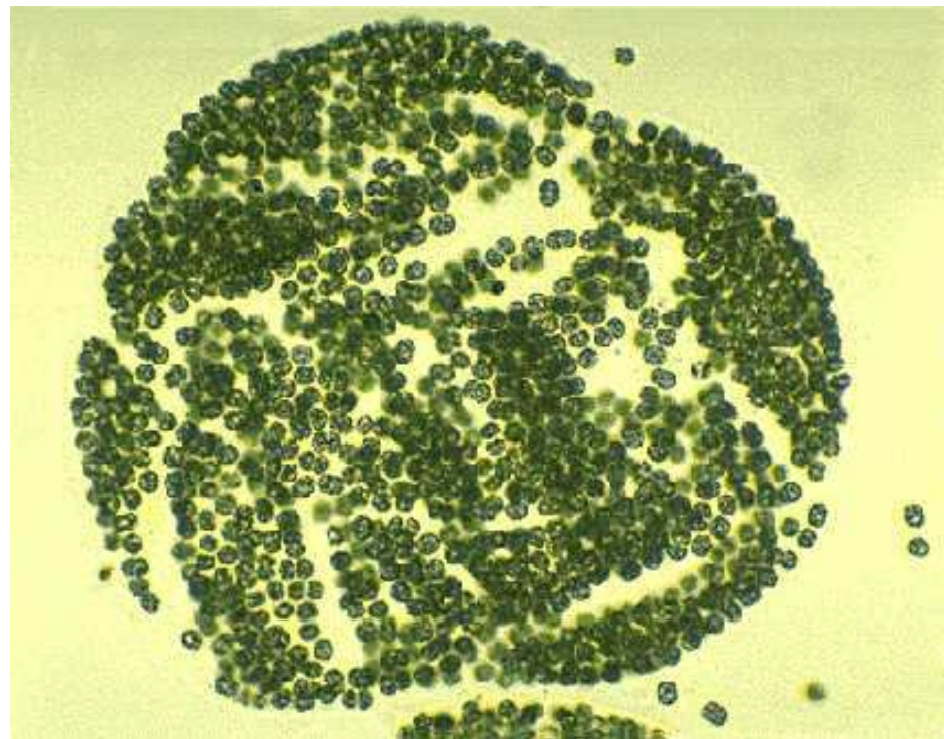


můrka hlišovitá obsahuje několik jedovatých látek. Roku 1937 podařilo se Lynenovi a Wielandovi izolovat z ní v krystalované podobě jedovatou látku, zvanou p h a l l o i d i n. Oba badatelé zjistili, že  $\frac{1}{10}$  miligramu této látky usmrtí myš ve 12 hodinách. V roce 1941 izolovali

Wieland a Hallermayer hlavní jed muchomůrky hlišovité, tzv. a m o n i t i n, který je tak prudce jedovatý, že jedna dvouseštiná miligramu usmrtí myš ve 2–3 dnech. Je to dávka tak nepatrná, že množství jedu, které bychom nabrali na špičku nože (o váze  $\frac{1}{2}$  g), usmrtilo by 100 000 myši, které, seřazeny za sebou, utvořily by řadu 18 km dlouhou, podle níž bychom si vykračovali  $4\frac{1}{2}$  hodiny vojenským krokem. Otrava muchomůrkou hlišovitou obvykle končí smrtí.



# Microcystiny



# Microcystins

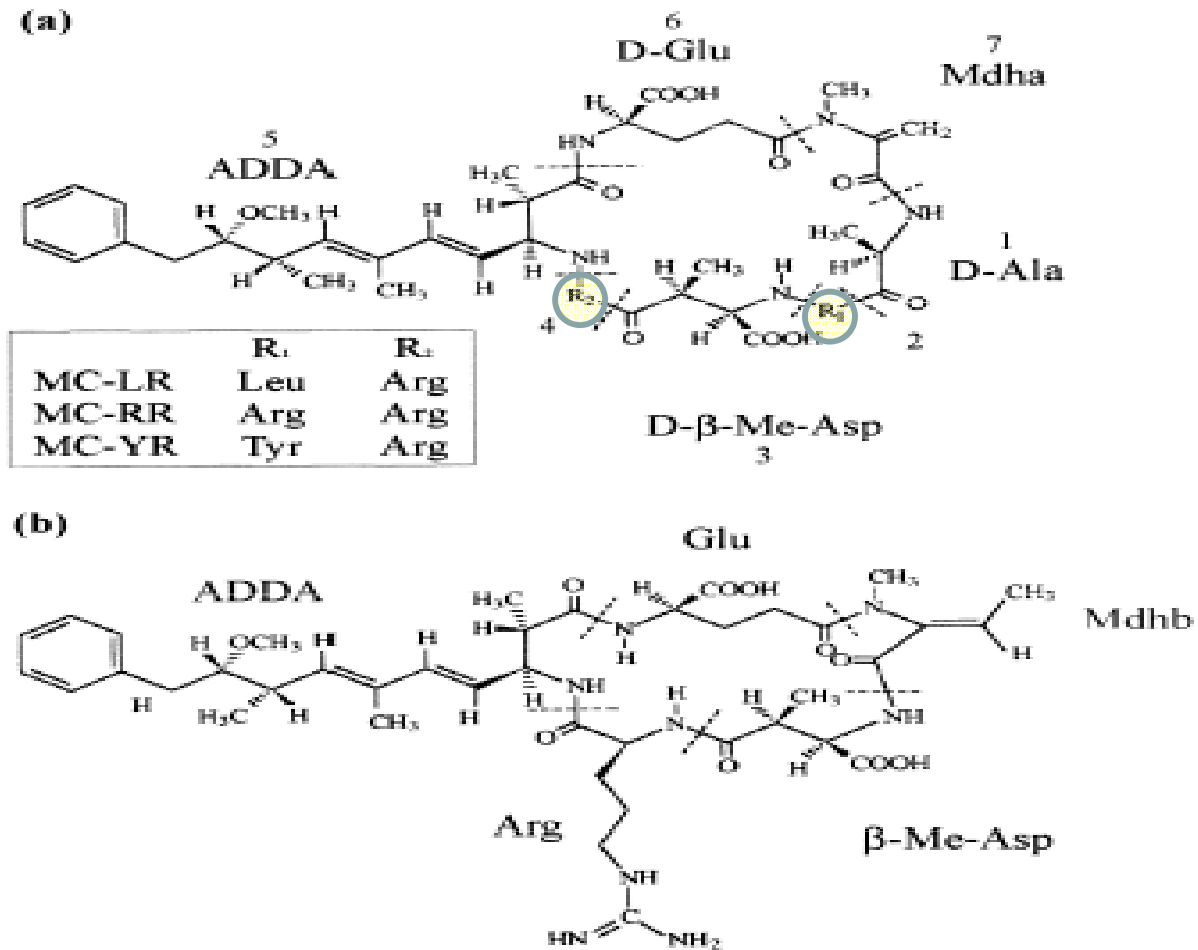


Fig. 1. General chemical structure of (a) microcystins and (b) nodularins.



# BÍLKOVINY :

## Struktura bílkovin

1. primární - sekvence aminokyselin

Konformace

2. sekundární - uspořádání polypeptidického řetězce

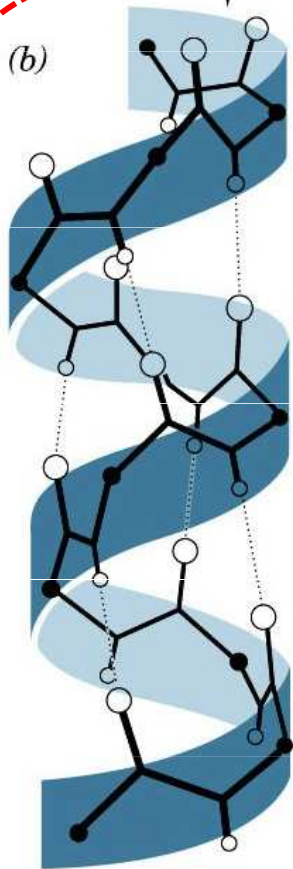
3. terciální - uspořádání polypeptidického řetězce s vedlejšími řetězci

4. kvartetní struktura - podjednotkové složení

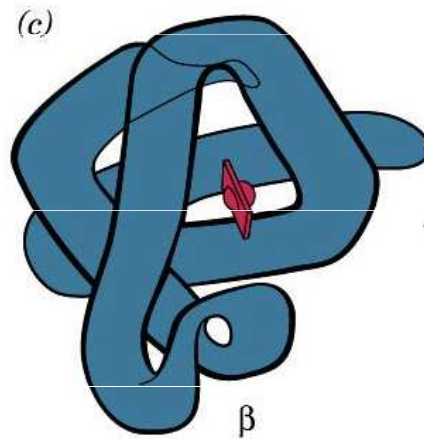
sekundární, terciální, kvartetní struktura  $\Rightarrow$  konformace

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

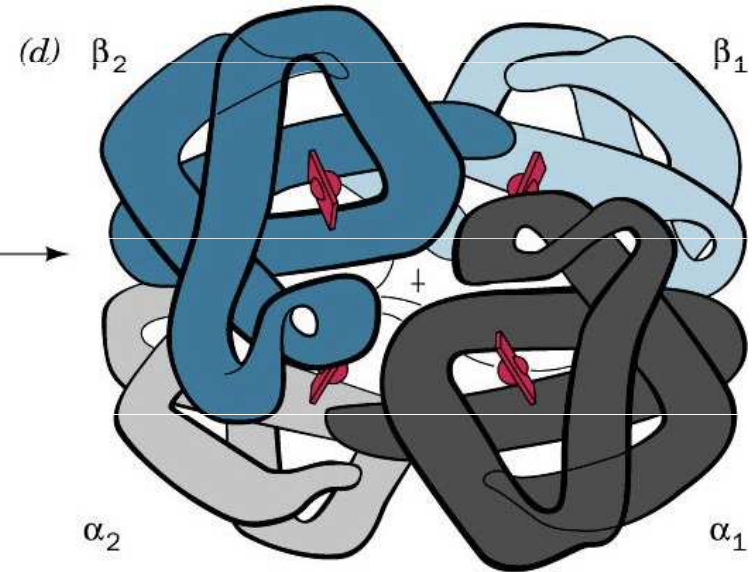
## Konformace



Secondary structure  
(helix)



Tertiary structure:  
one complete protein chain  
( $\beta$  chain of hemoglobin)



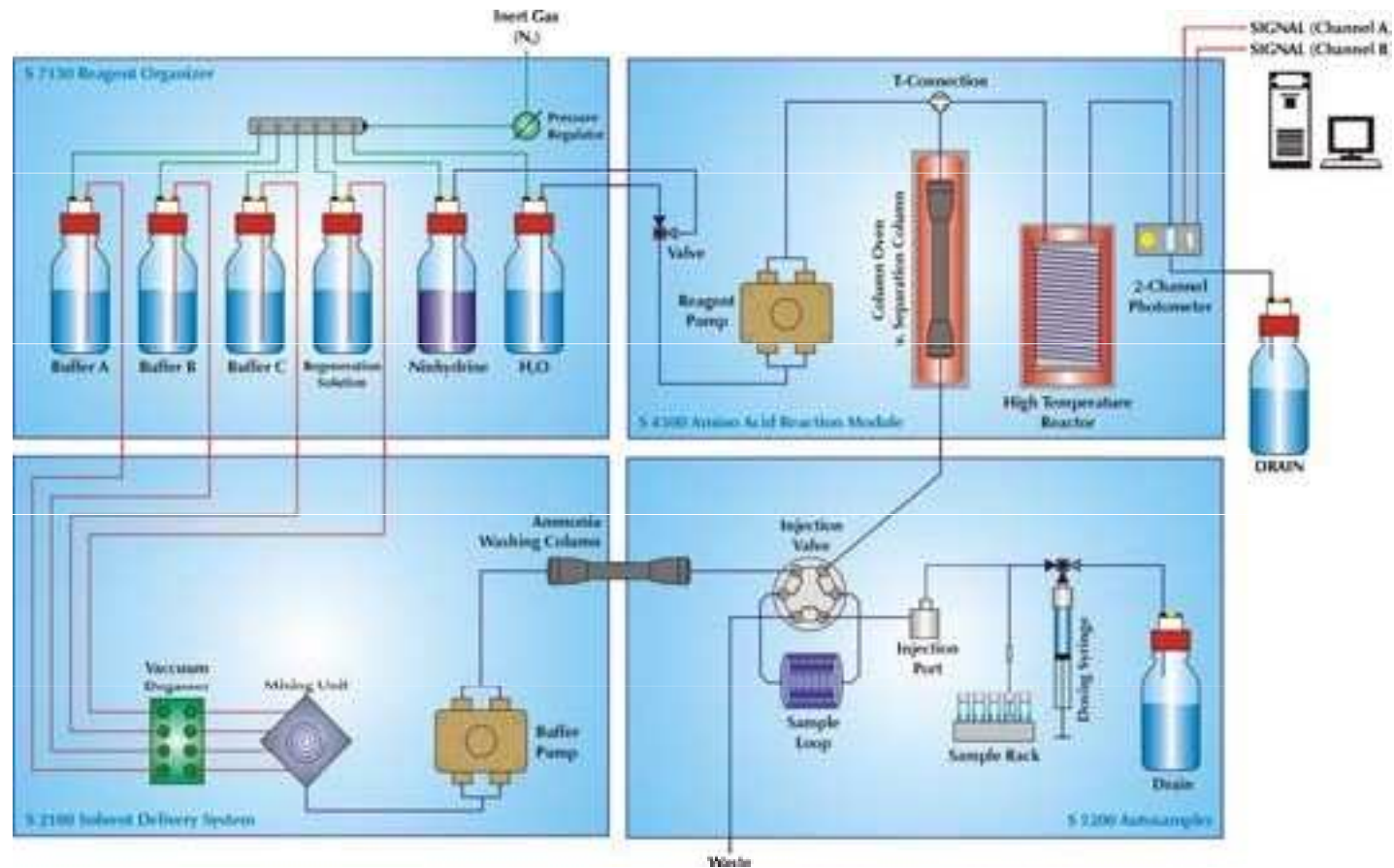
Quaternary structure:  
the four separate chains  
of hemoglobin assembled  
into an oligomeric protein

## Aminokyselinová analýza

1. Izolace homogenní bílkoviny
2. Úplná hydrolyza - 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



# AMK analyzátor



# AMK analizátor



## Primární struktura

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

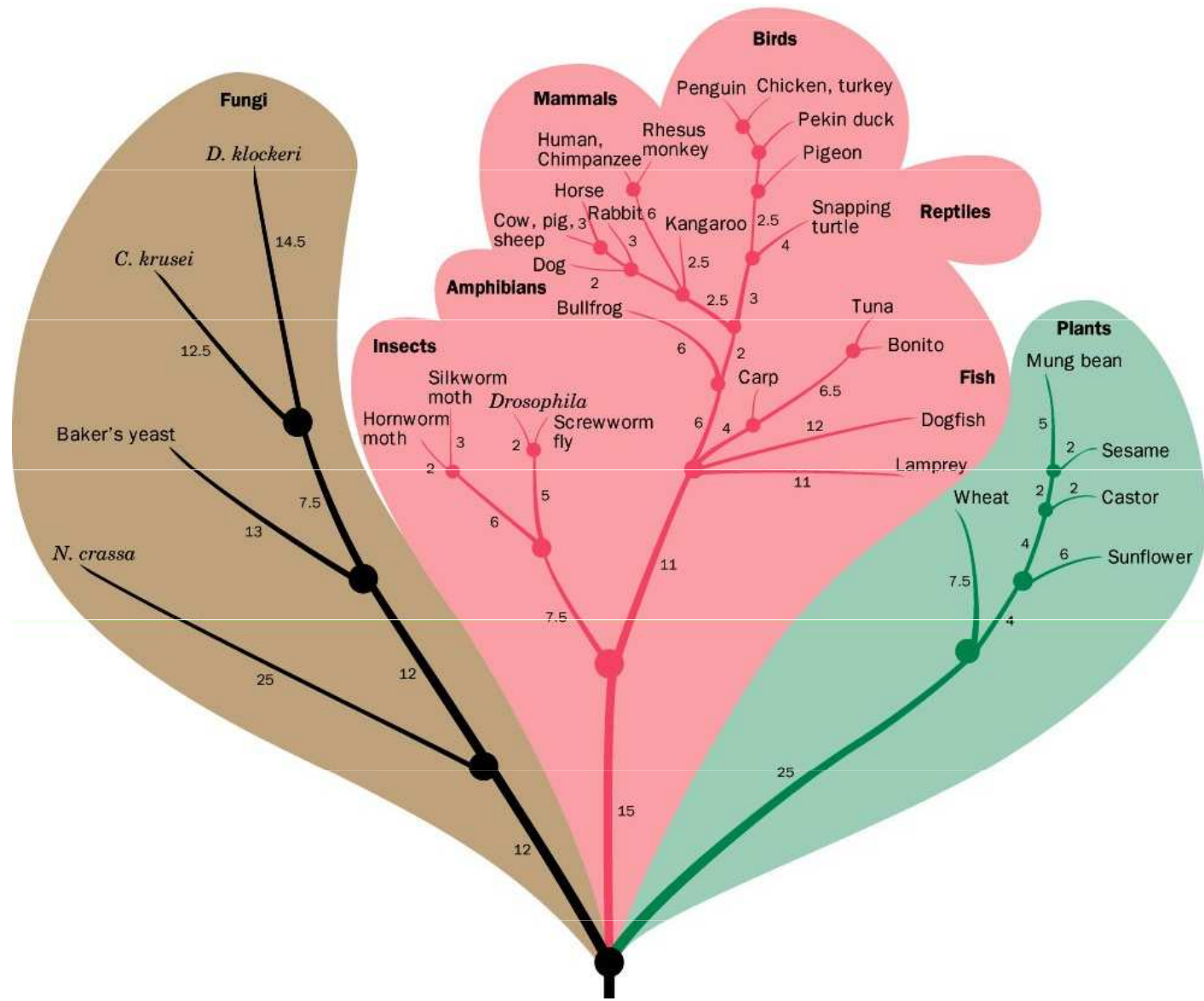
⇒ aminokyselinový sekvenátor

1978 -  $\beta$ - galaktosidasa (1028 AMK),  $\mu$ g materiálu, dny

--

**Stanovení sekvence** - Edmanovo odbourávání

na základě sekvence nukleových kyselin

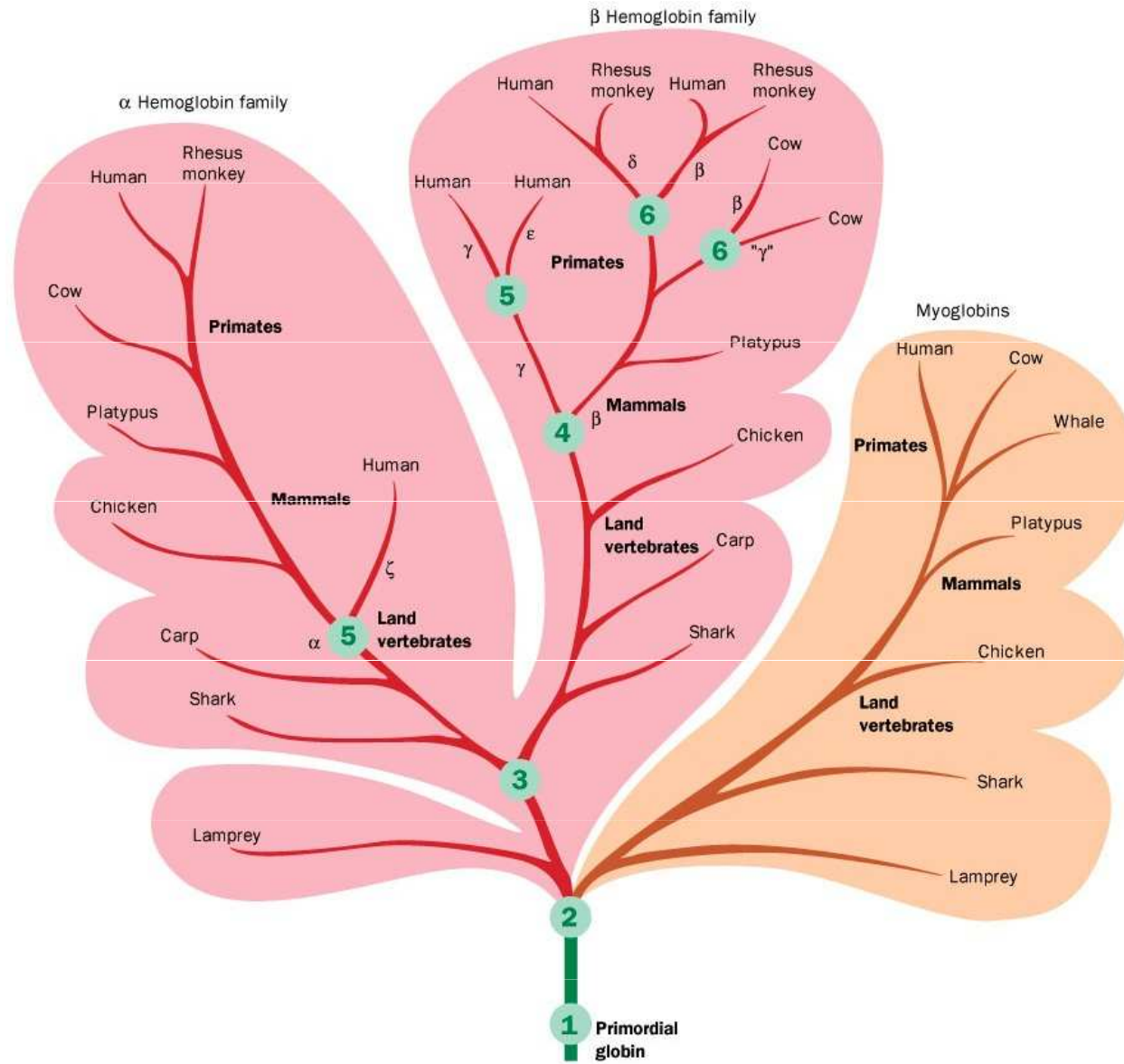


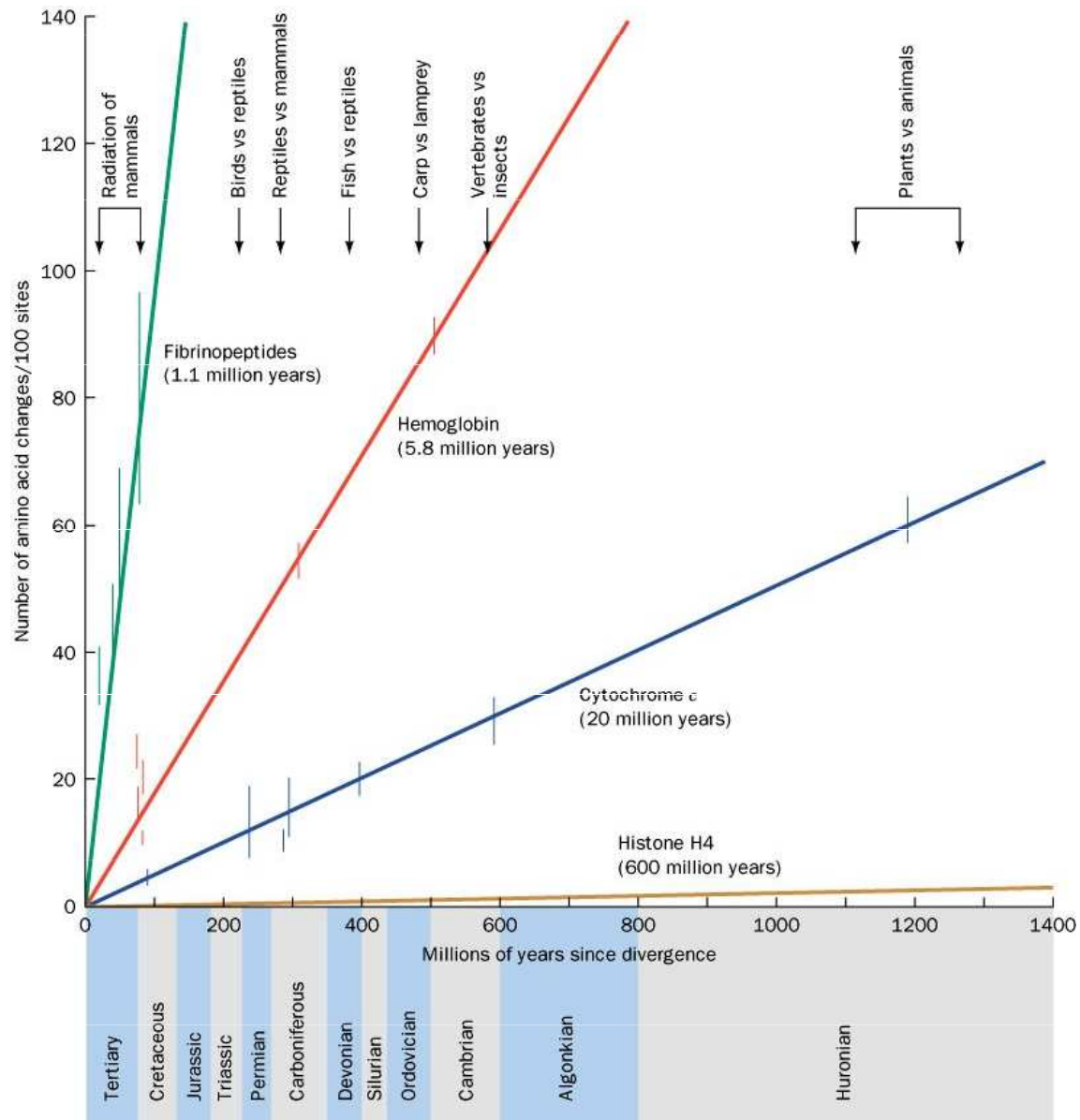




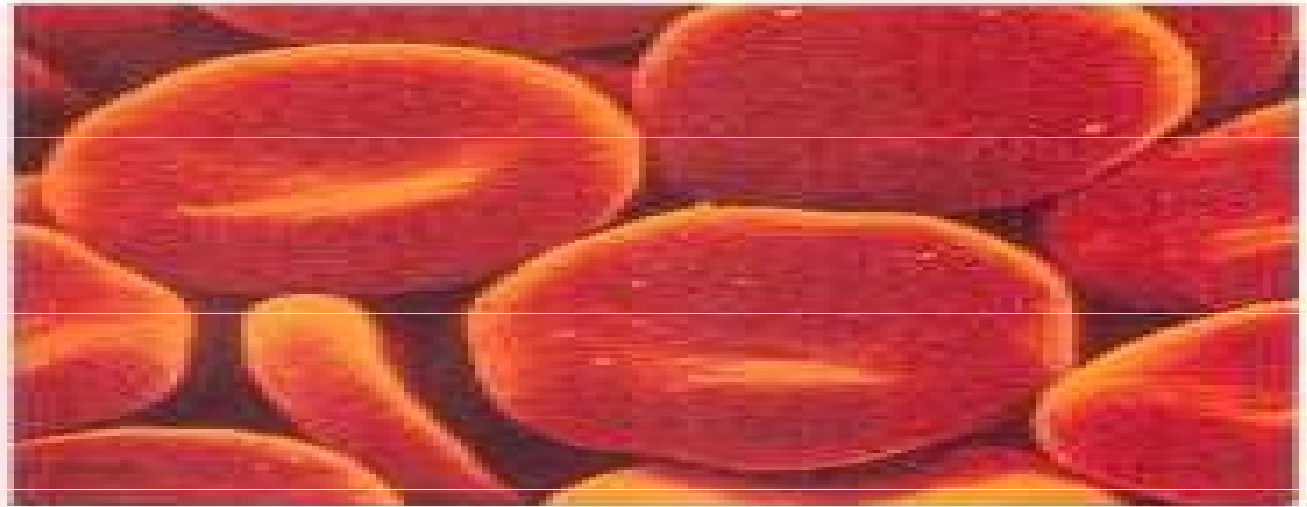






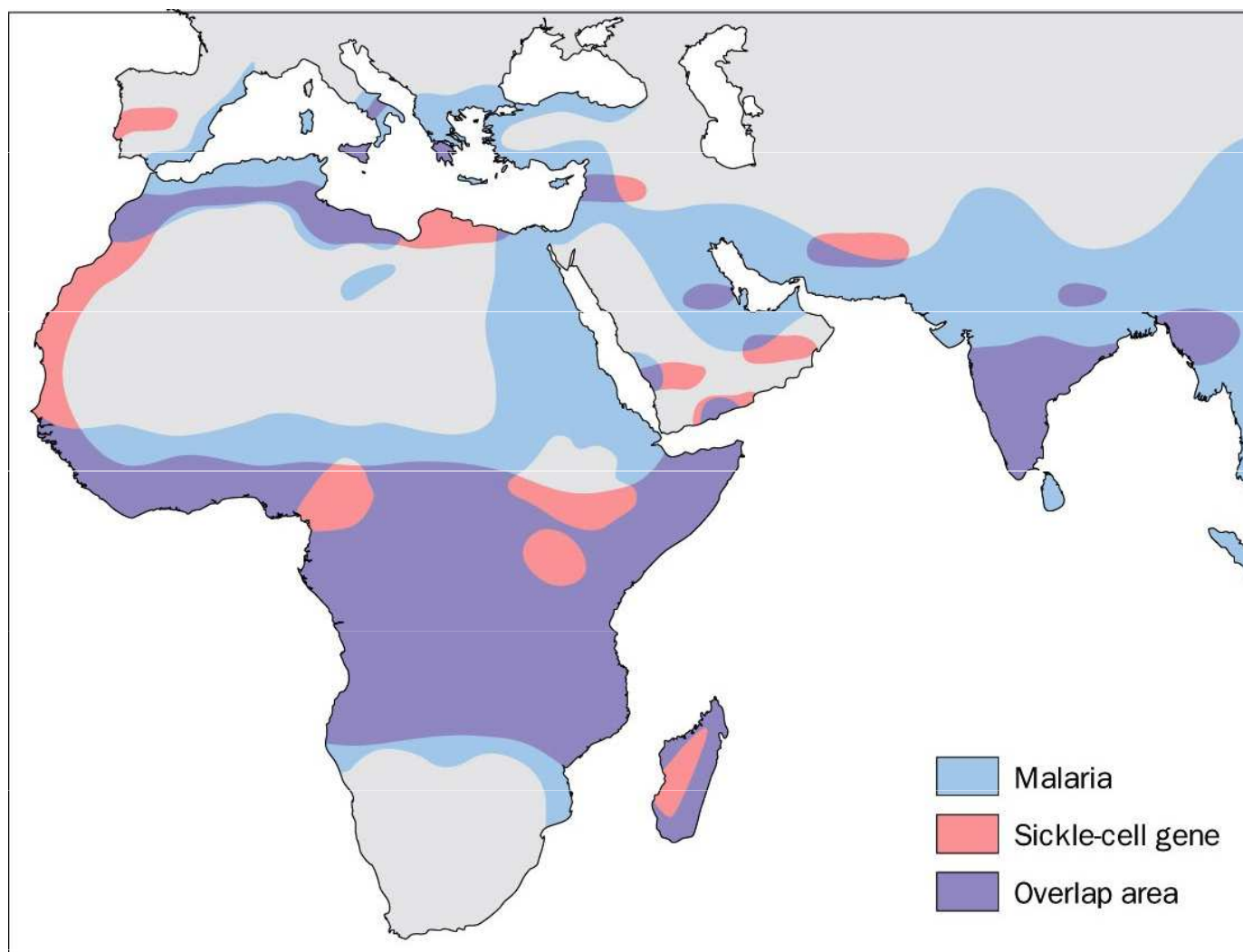


# Srpkovitá anémie





# Srpkovitá anémie versus malárie



# URČOVÁNÍ PRIMÁRNÍ STRUKTURY

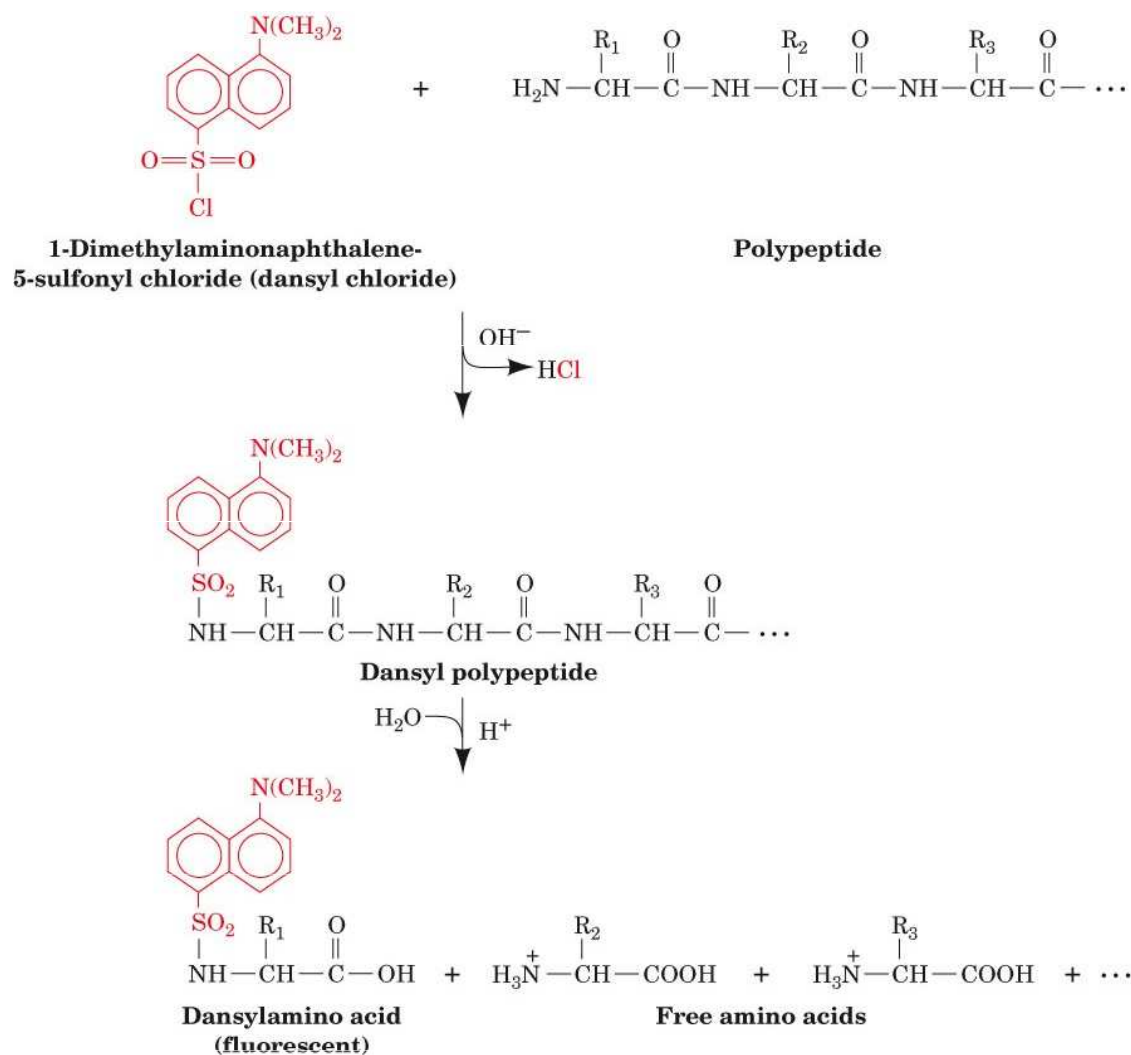
- A. **Purifikace bílkoviny** – získání homogenní bílkoviny
- B. **Aminokyselinové složení** – určení počtu jednotlivých AMK zbytků (kyselá hydrolyza 6N HCl, 100 –110 °C, 24 h)
- C. **Pořadí aminokyselin:**
  1. Oddělit a izolovat jednotlivé řetězce (redukce nebo oxidace disulfidických můstků)
  2. Určit 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

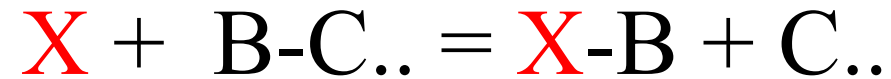
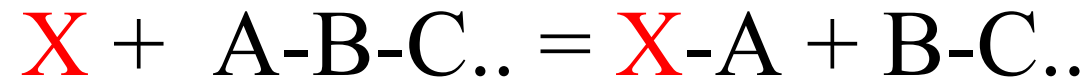
$$X + A-B-C = X-A + B + C$$



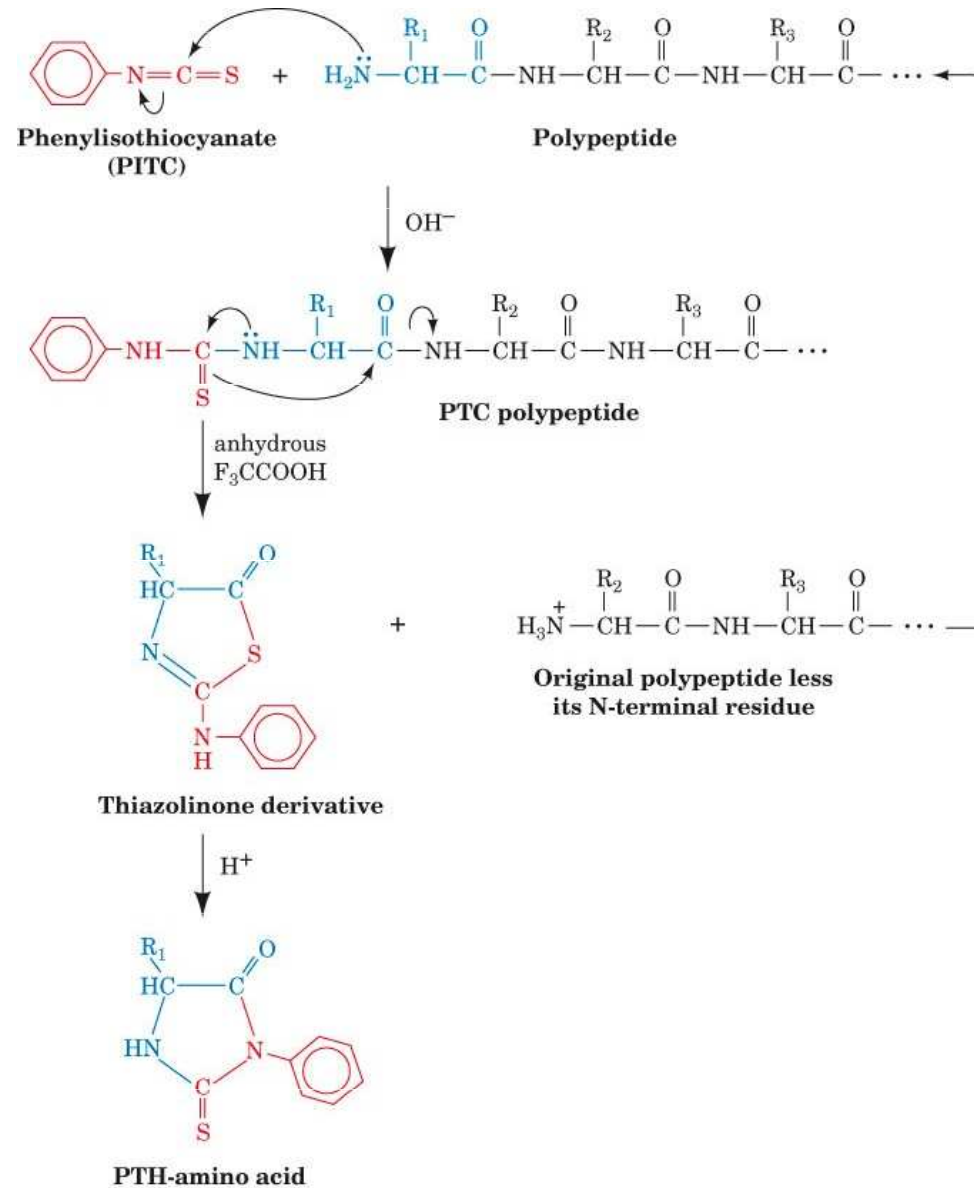
# Zjišťování N-koncových AMK



# Edmanovo sekvenování



# Edmanovo sekvenování



# Možnosti štěpení

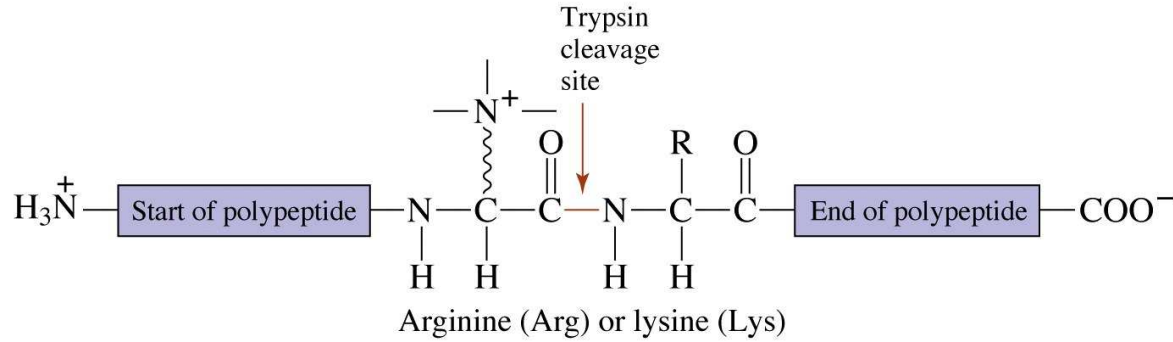


Figure 3-17a Concepts in Biochemistry, 3/e  
© 2006 John Wiley & Sons

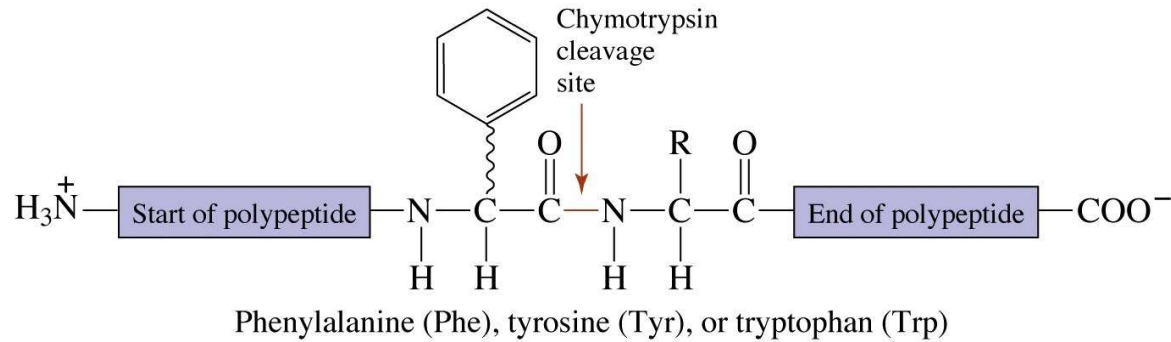


Figure 3-17b Concepts in Biochemistry, 3/e  
© 2006 John Wiley & Sons

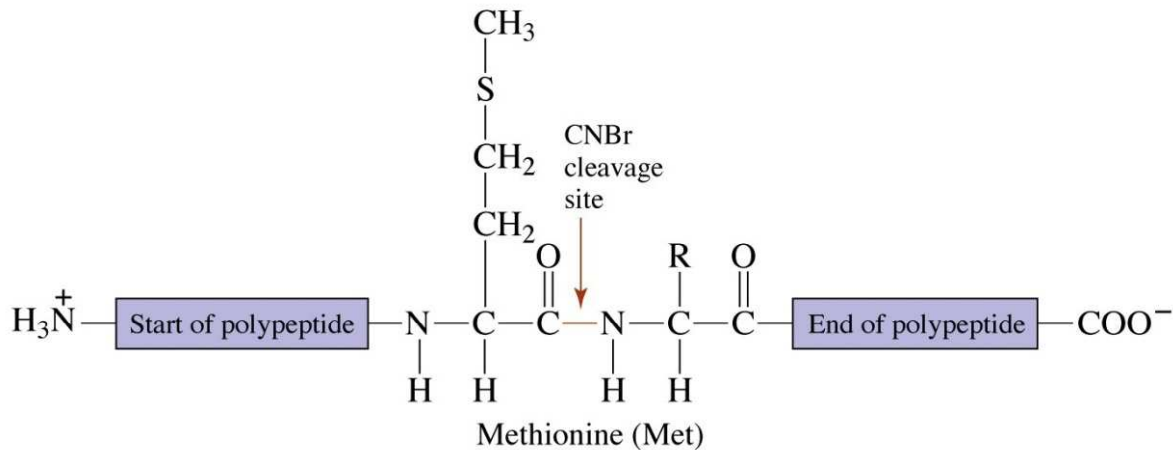
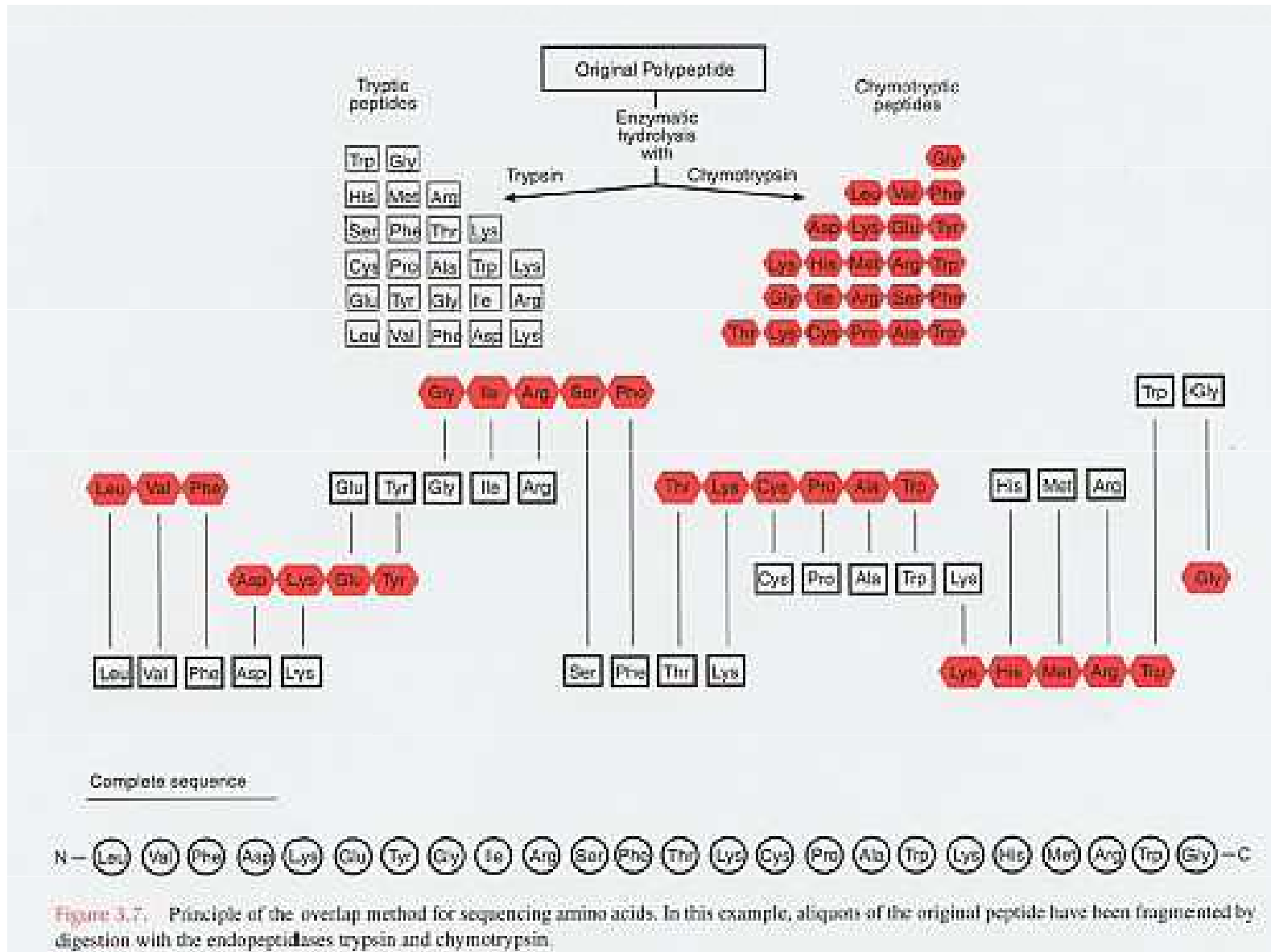


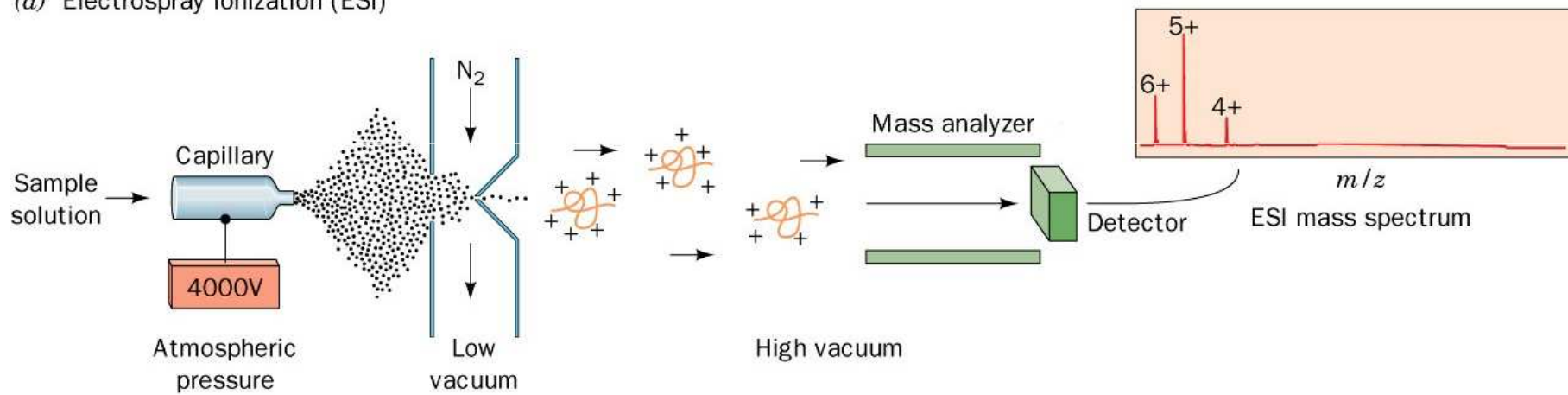
Figure 3-17c Concepts in Biochemistry, 3/e  
© 2006 John Wiley & Sons

# Metoda překrývajících se štěpů

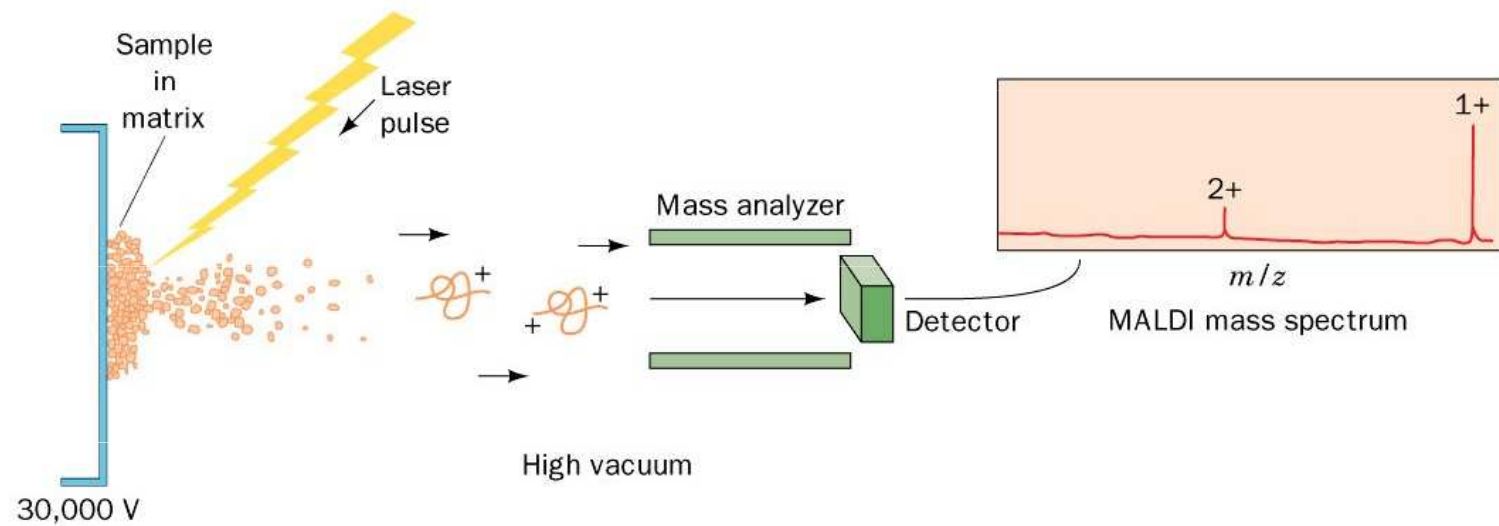


# MS

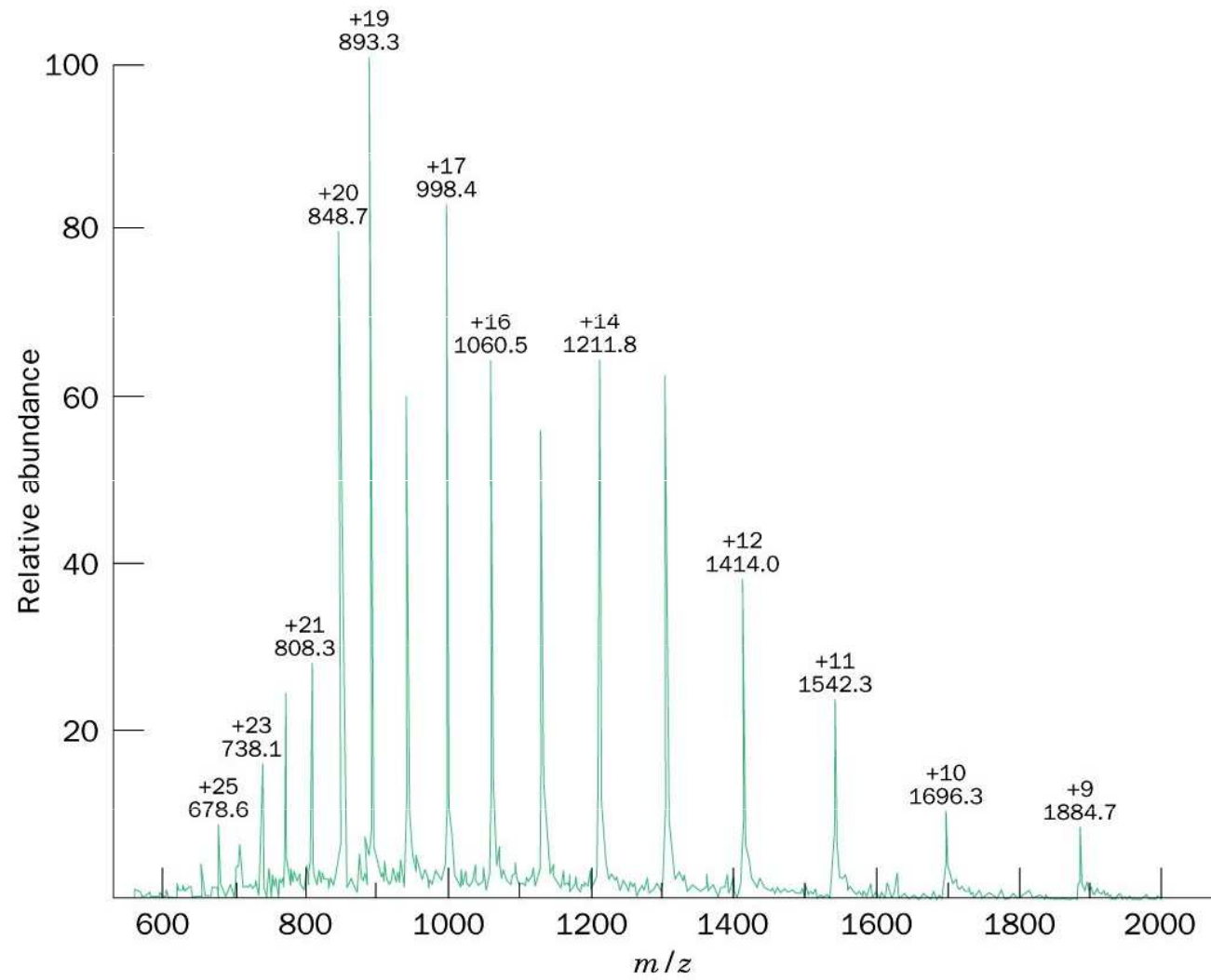
(a) Electrospray ionization (ESI)



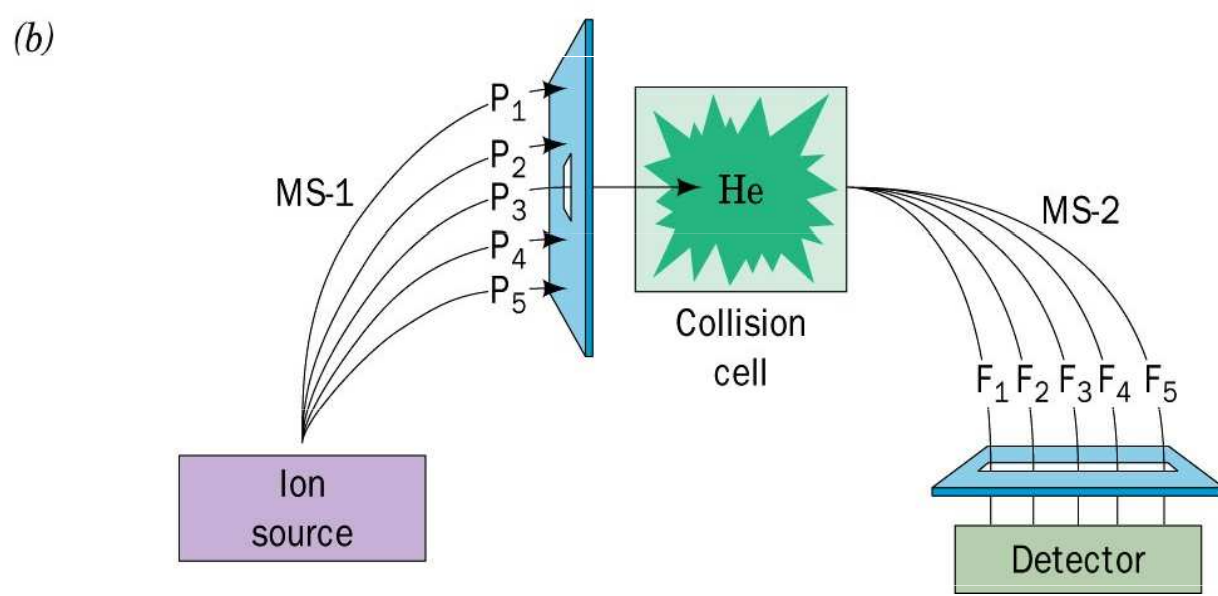
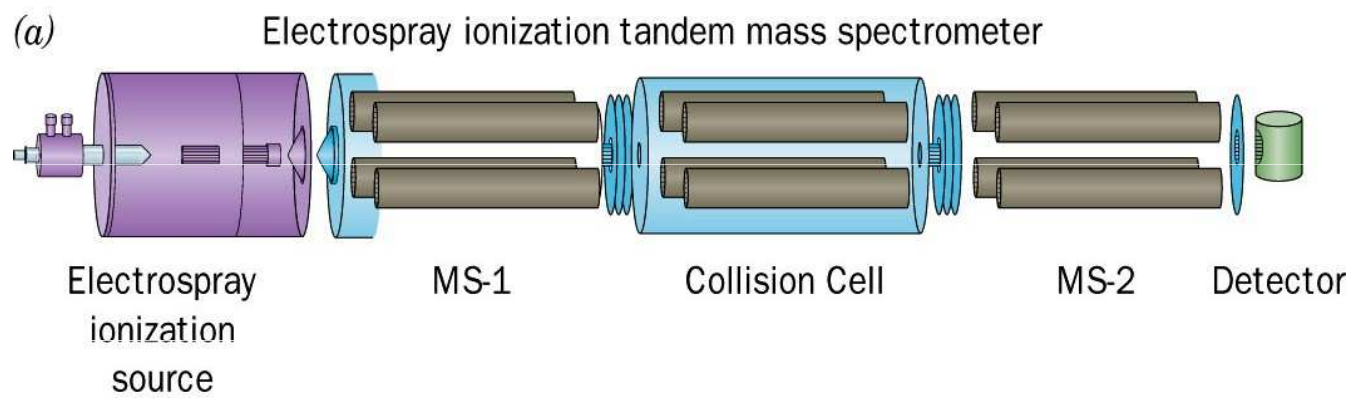
(b) Matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI)



# MS

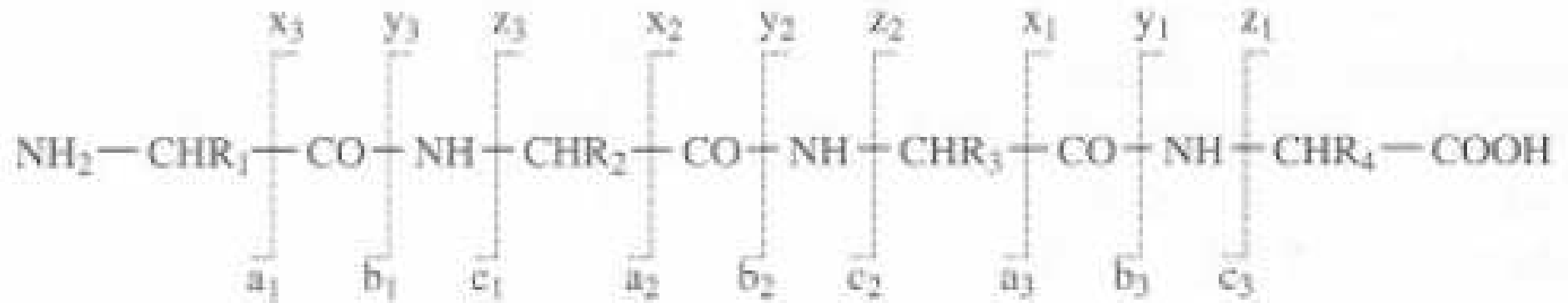


# MS-MS



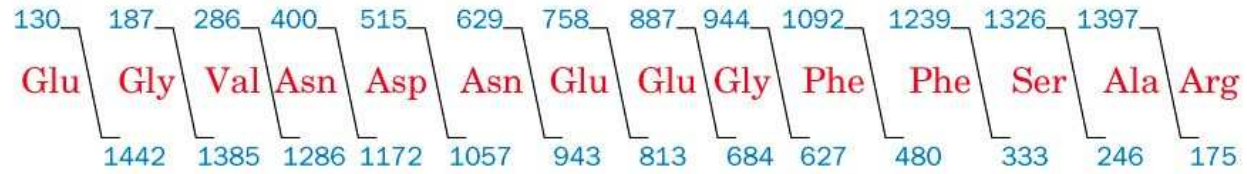


# MS-MS

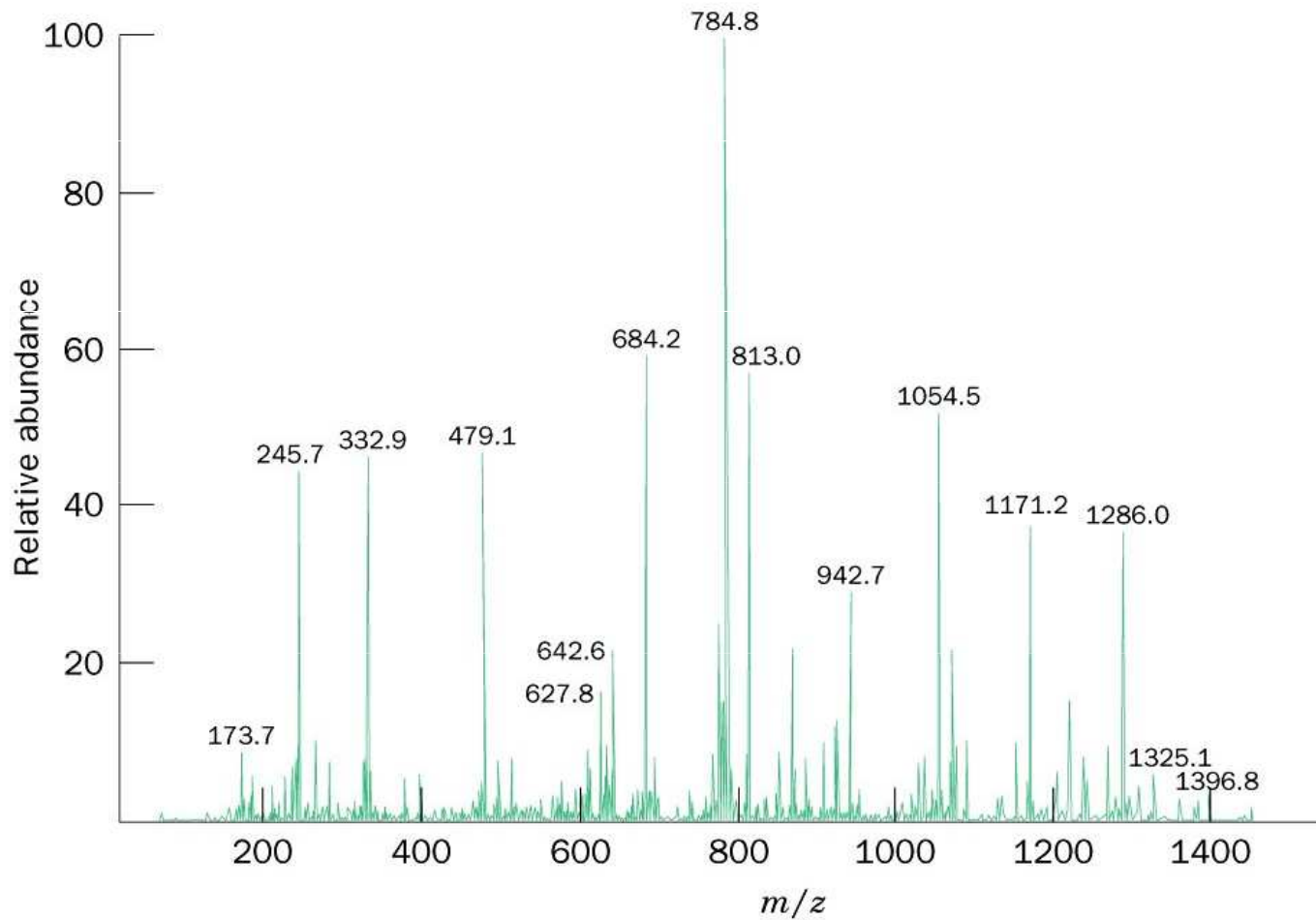


# MS-MS

(a)



(b)



## Primární struktura

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

⇒ aminokyselinový sekvenátor

1978 -  $\beta$ - galaktosidasa (1028 AMK),  $\mu$ g materiálu, dny

--

**Stanovení sekvence** - Edmanovo odbourávání

na základě sekvence nukleových kyselin

## *Syntéza peptidů*

1953 - oxytosin (9 AMK) DE VIGNEAND

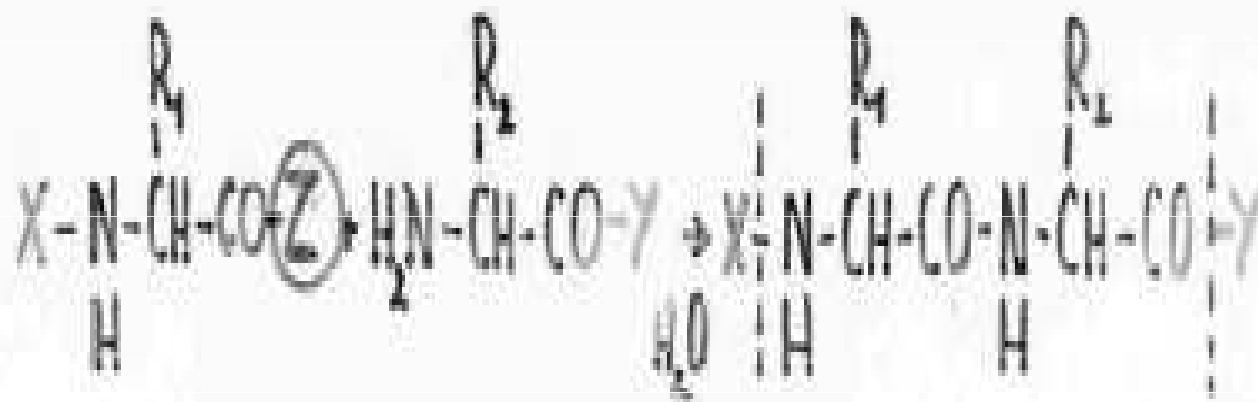
# Proč syntéza peptidů

- Proteinové inženýrství
- Příprava peptidových léčiv a vakcín

# Pravidla syntézy

- Pořadí AMK je dáno genetickým kódem
- COOH málo reaktivní, musí se aktivovat
- Je nutné blokovat další skupiny aby se zabránilo vedlejším reakcím, blokace musí být reverzibilní
- Nesmí být narušena L-konfigurace
- Co největší výtěžek (90 % u dekapeptidu = celkový 39%)

# SYNTEZA PEPTIDŮ



X, Y = ochránící skupiny

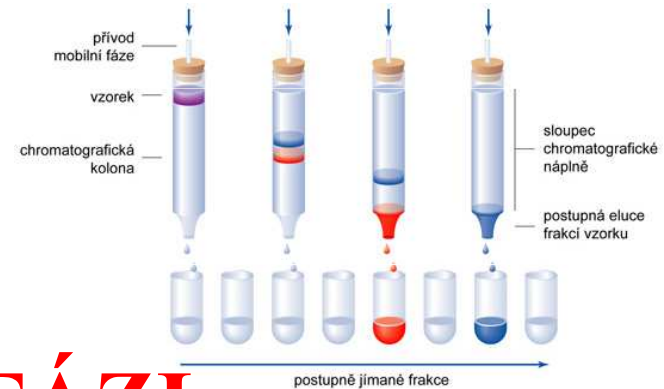
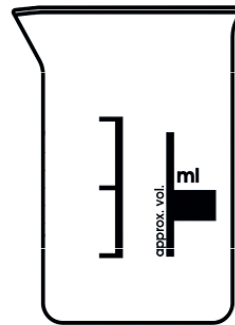
Z = aktivace karboxylu:  $-Cl$ ,  $-N_3$ ,  $-O-C_6H_4-NO_2$

# V ROZTOKU

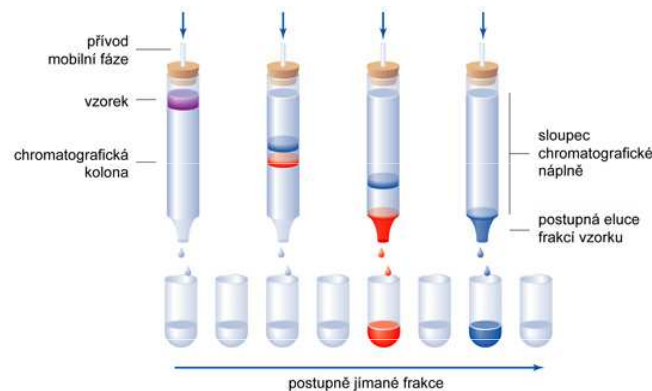


X – chránicí skupina

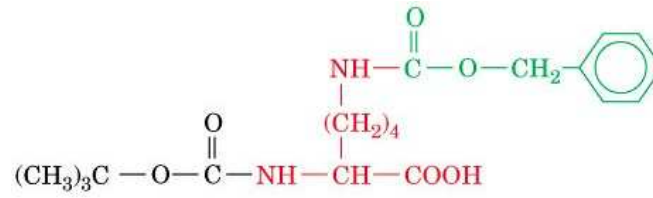
Y – aktivační skupina



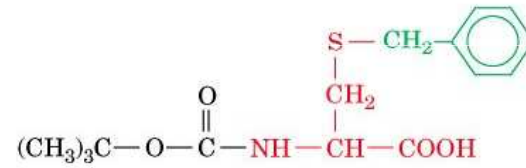
# NA PEVNÉ FÁZI



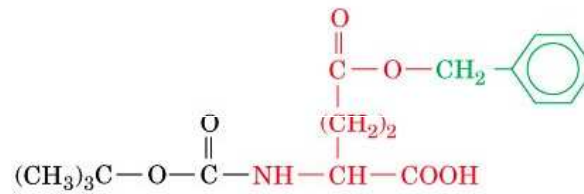




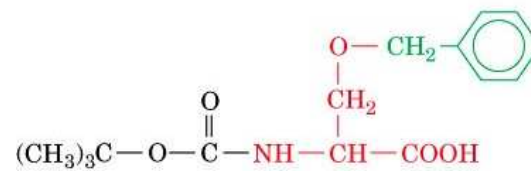
**Boc, *N*<sup>ε</sup>-benzyloxycarbonyl-Lys**



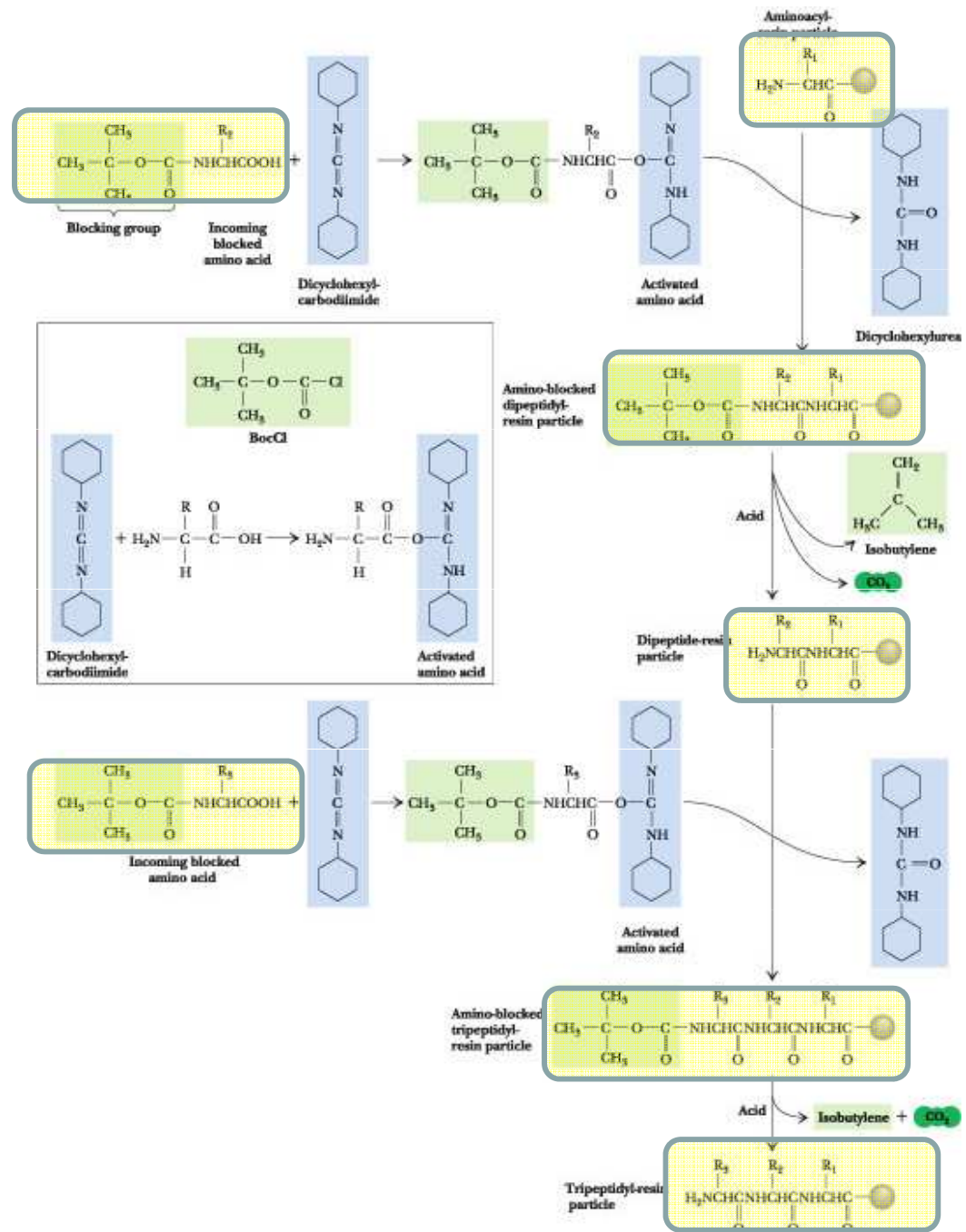
**Boc, *S*-benzyl-Cys**



**Boc-Glu,  $\gamma$ -Benzyl ester**



**Boc, *O*-benzyl-Ser**



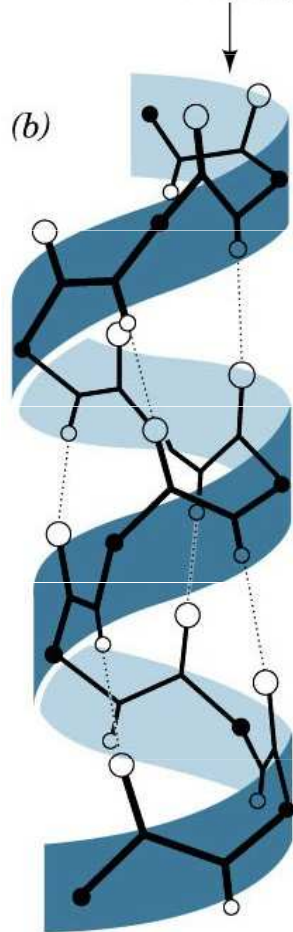
## Syntéza peptidů

1953 - oxytosin (9 AMK) DE VIGNEAND

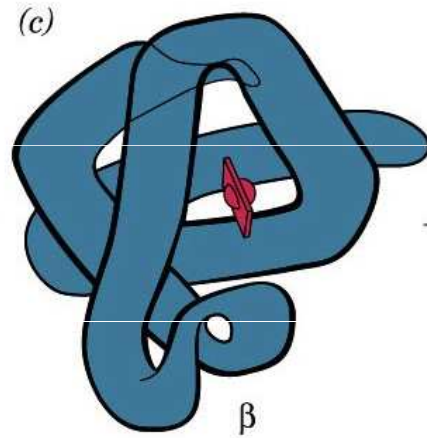
1962 - syntéza na pevné fázi - MERRIFIELD

1971 Merrifield syntetizova RNAsu - 128 AMK z 80 % aktivní  
(výtěžek 3 % na původní množství valin)

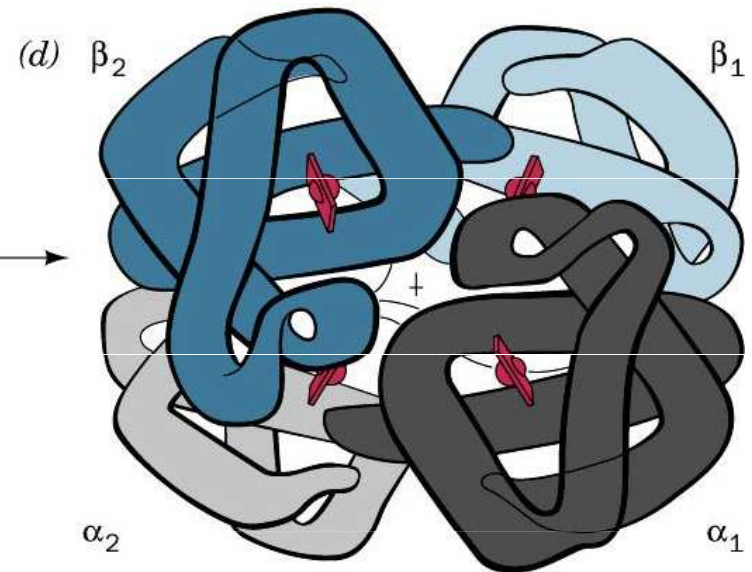
(a) – Lys – Ala – His – Gly – Lys – Lys – Val – Leu – Gly – Ala –  
Primary structure (amino acid sequence in a polypeptide chain)



Secondary structure (helix)



Tertiary structure:  
one complete protein chain  
( $\beta$  chain of hemoglobin)



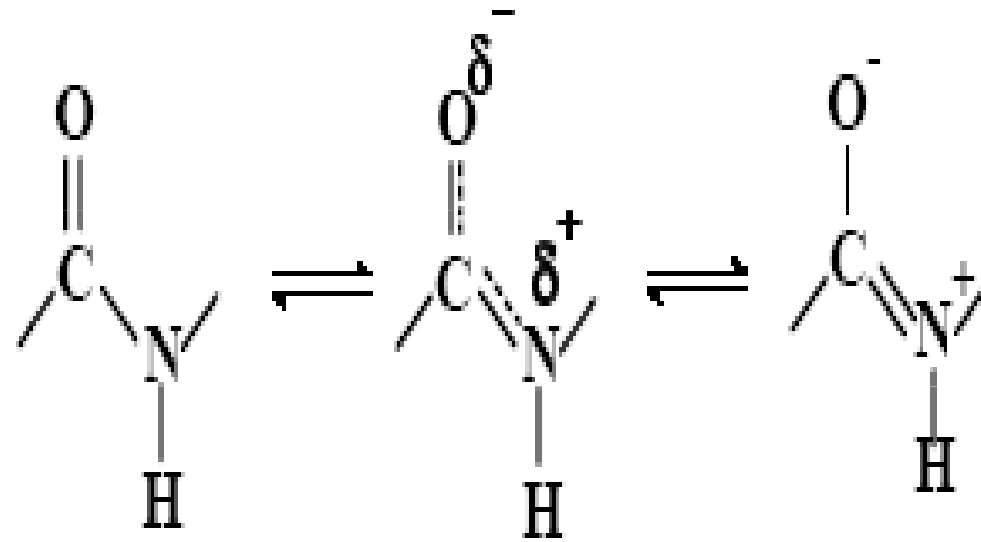
Quaternary structure:  
the four separate chains  
of hemoglobin assembled  
into an oligomeric protein

## Sekundární struktura

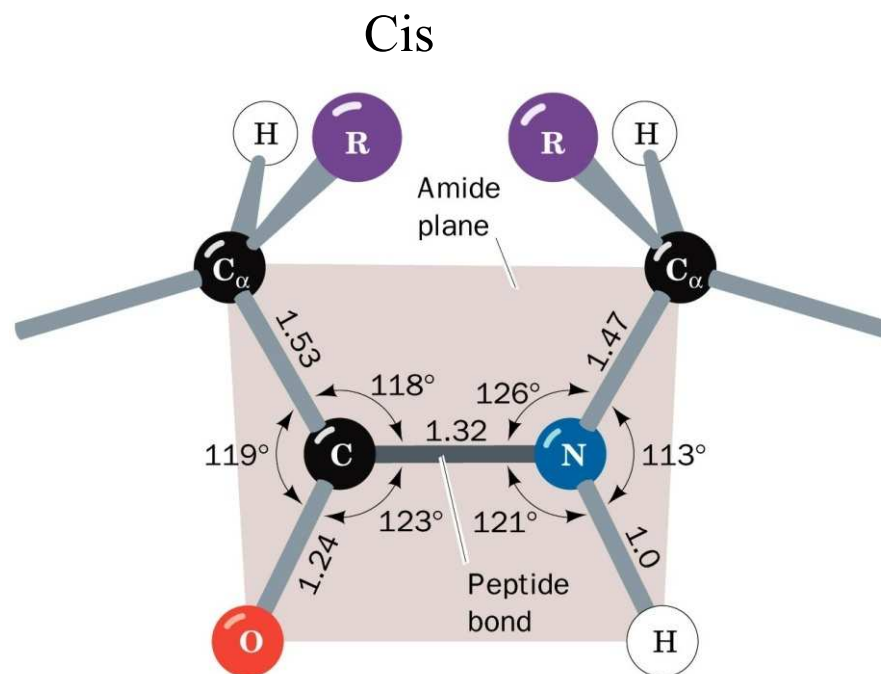
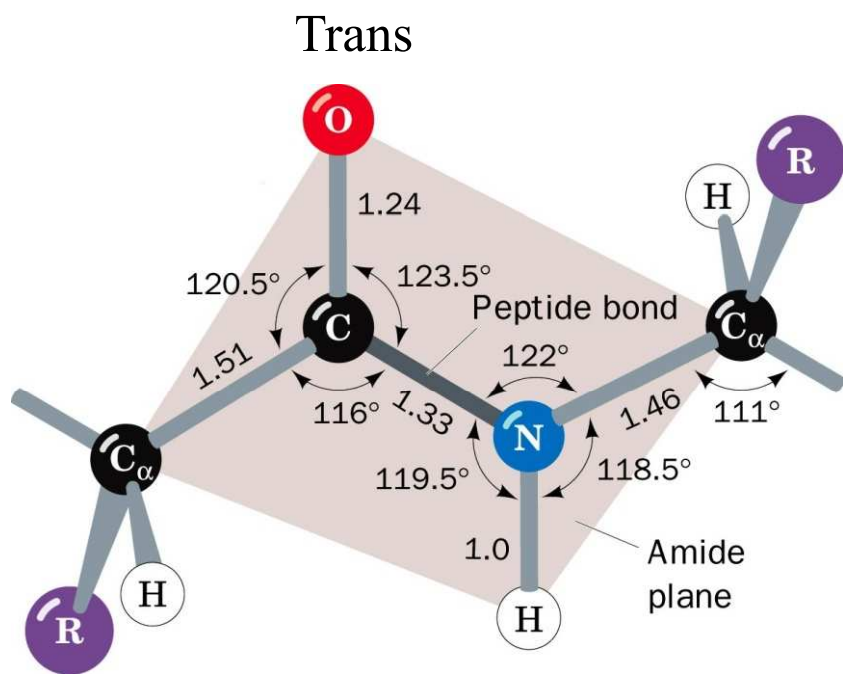
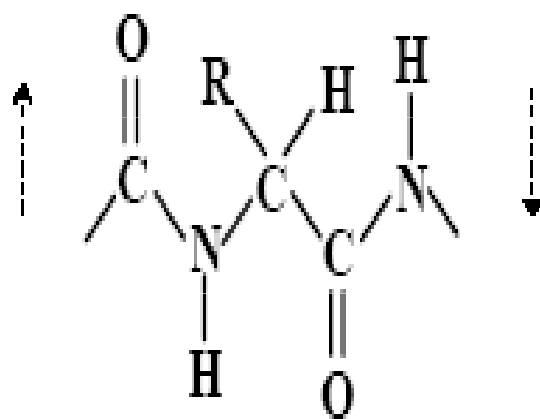
peptidická vazba - PAULING a COREY

30 až 40.léta

A. Peptidická vazba leží v rovině

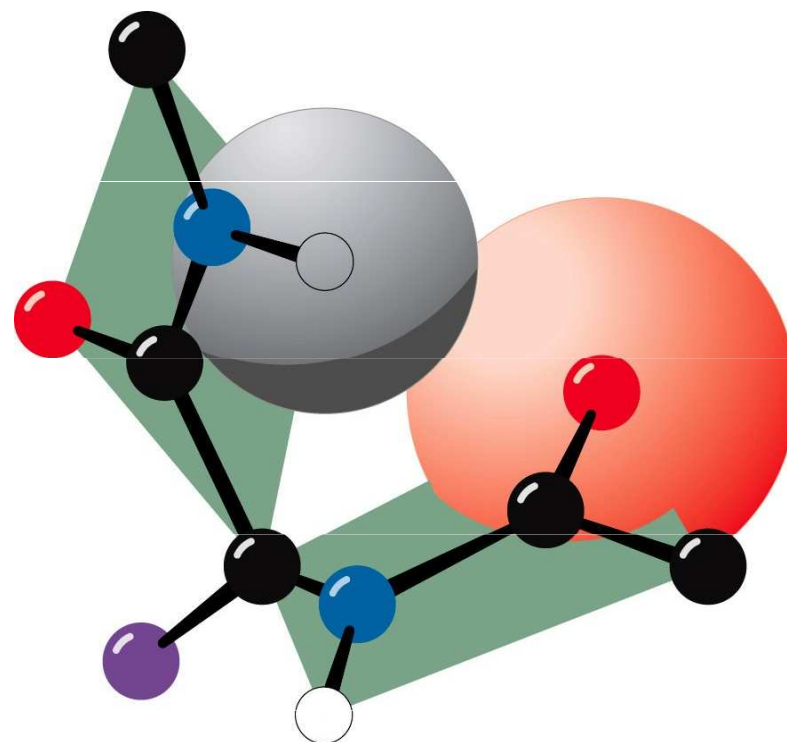
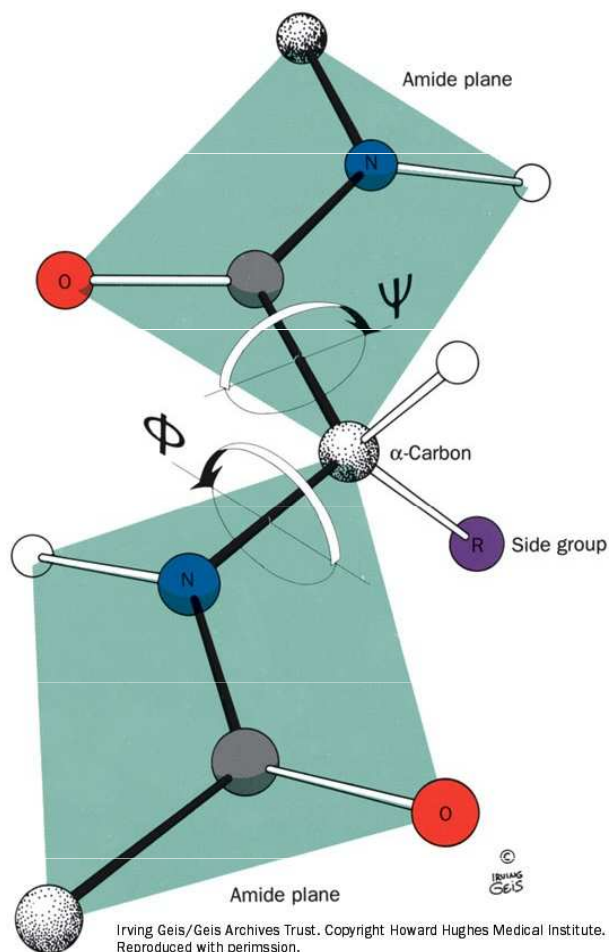
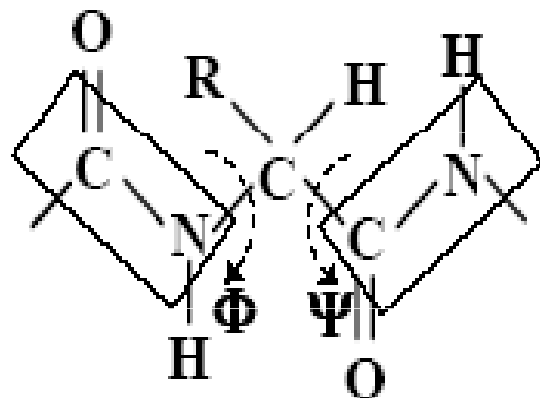


## B. Peptidické vazby jsou v trans konfiguraci



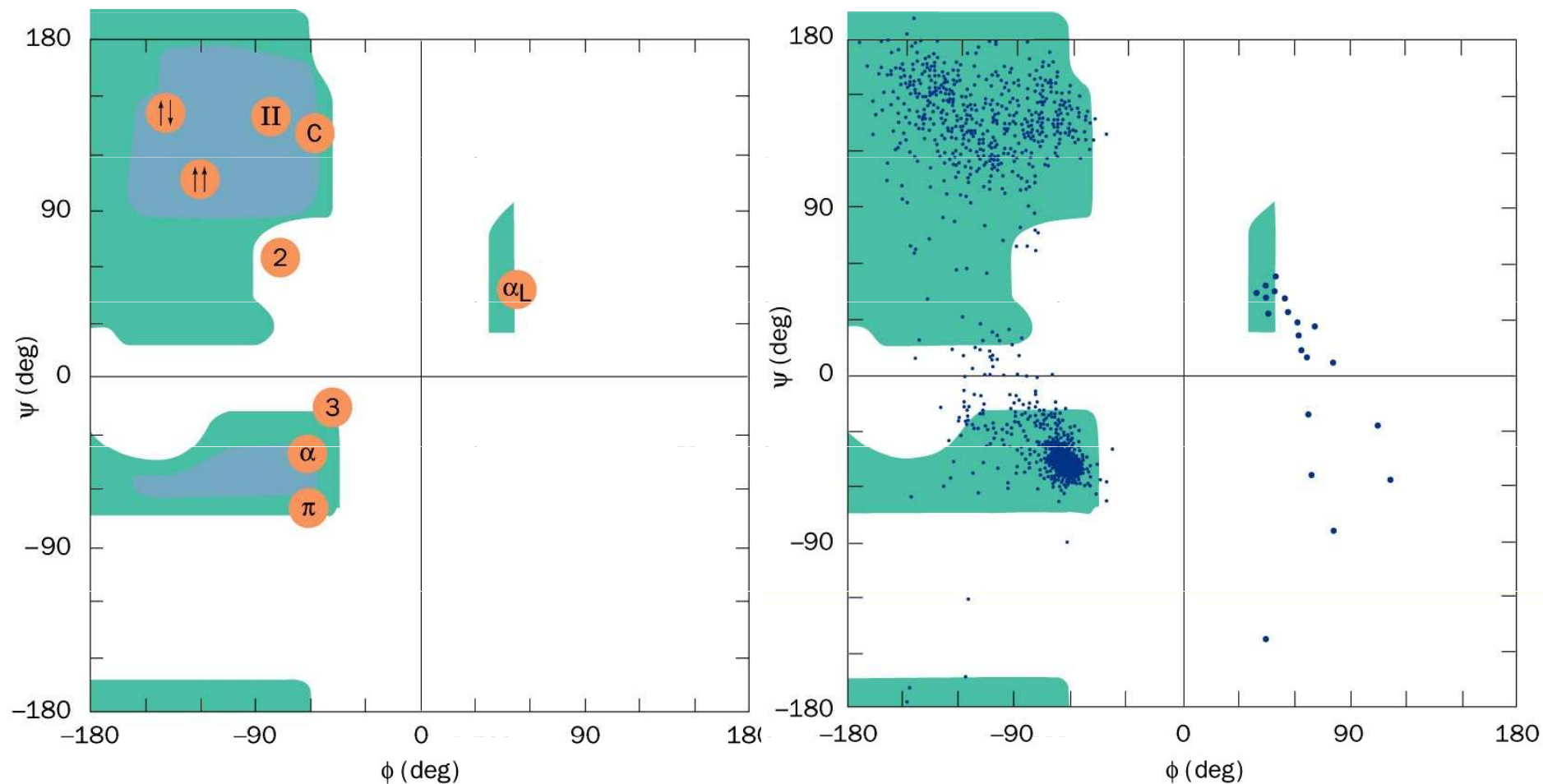
# C. Peptidické vazby ležící v rovině mohou svírat určité torzní uhly

$\phi, \psi$



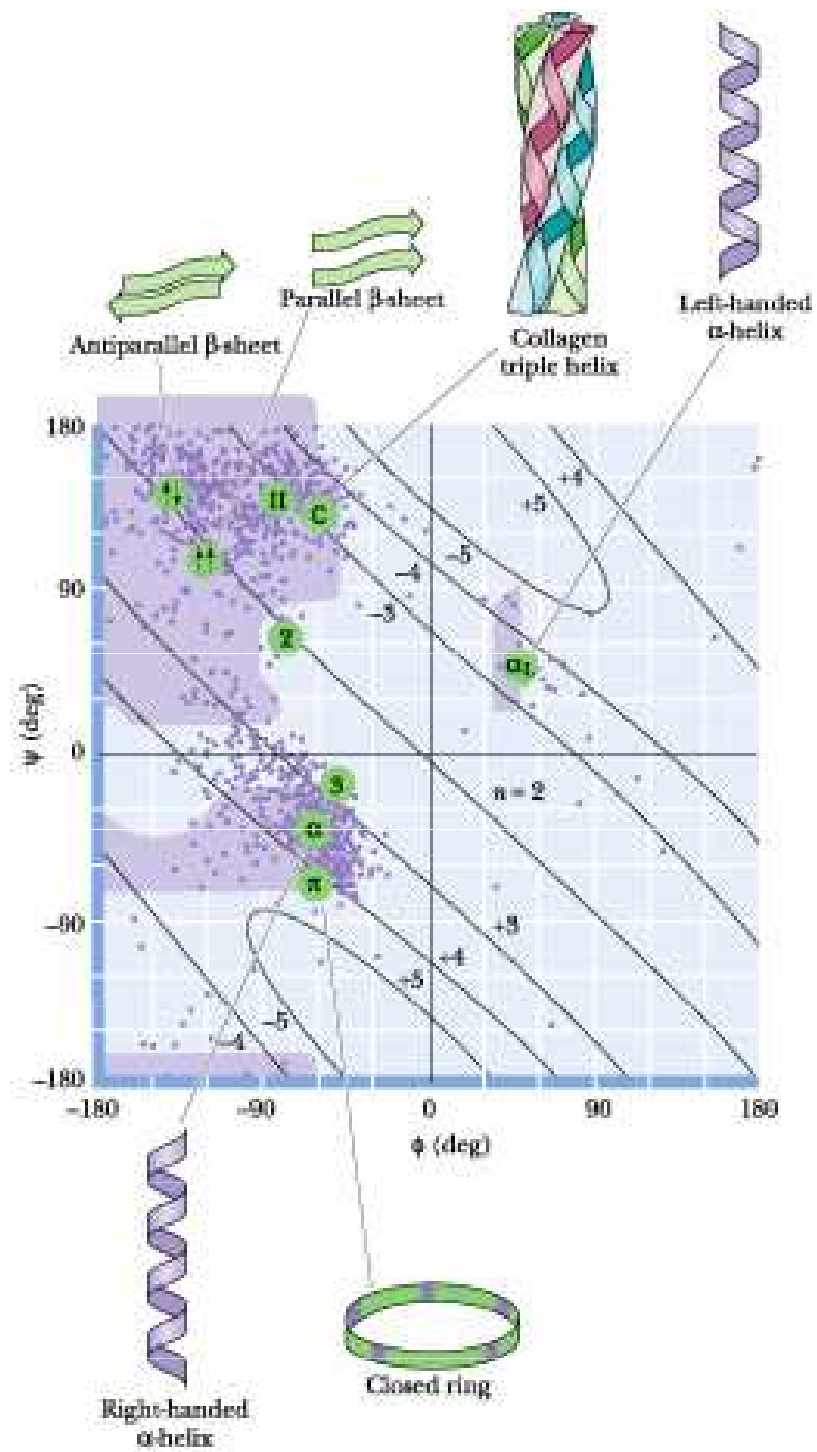
Irving Geis/Geis Archives Trust. Copyright Howard Hughes Medical Institute. Reproduced with permission.

## Ramachandrov diagram stability sekundárních struktur bílkovin



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





Typy sekundárních struktur :

A. Pravidelné - helikální struktury -  $\alpha$  helix (-56, -47)

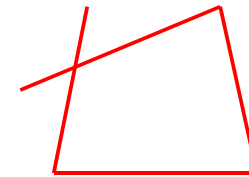
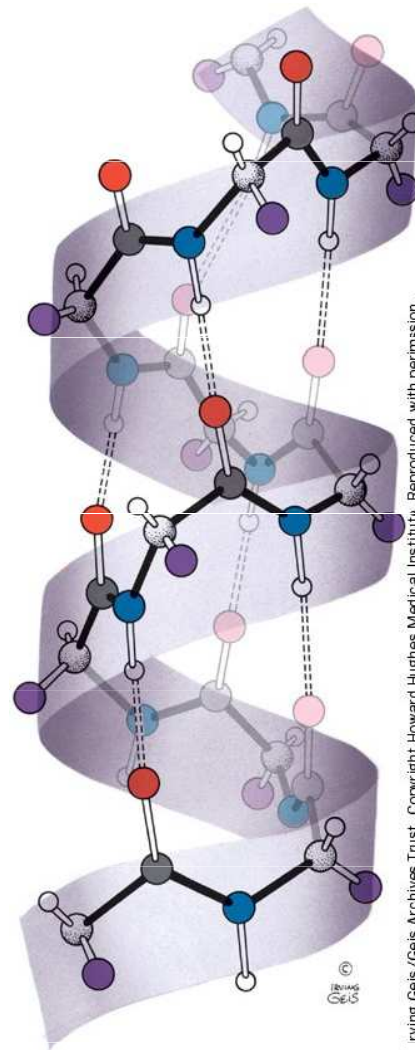
-  $\beta$  struktury - skládaný list - paralelní (-139, +135) a

antiparalelní (-119, +113)

B. Ohybové -  $\beta$  ohyb

C. Nepravidelné

# $\alpha$ - helix

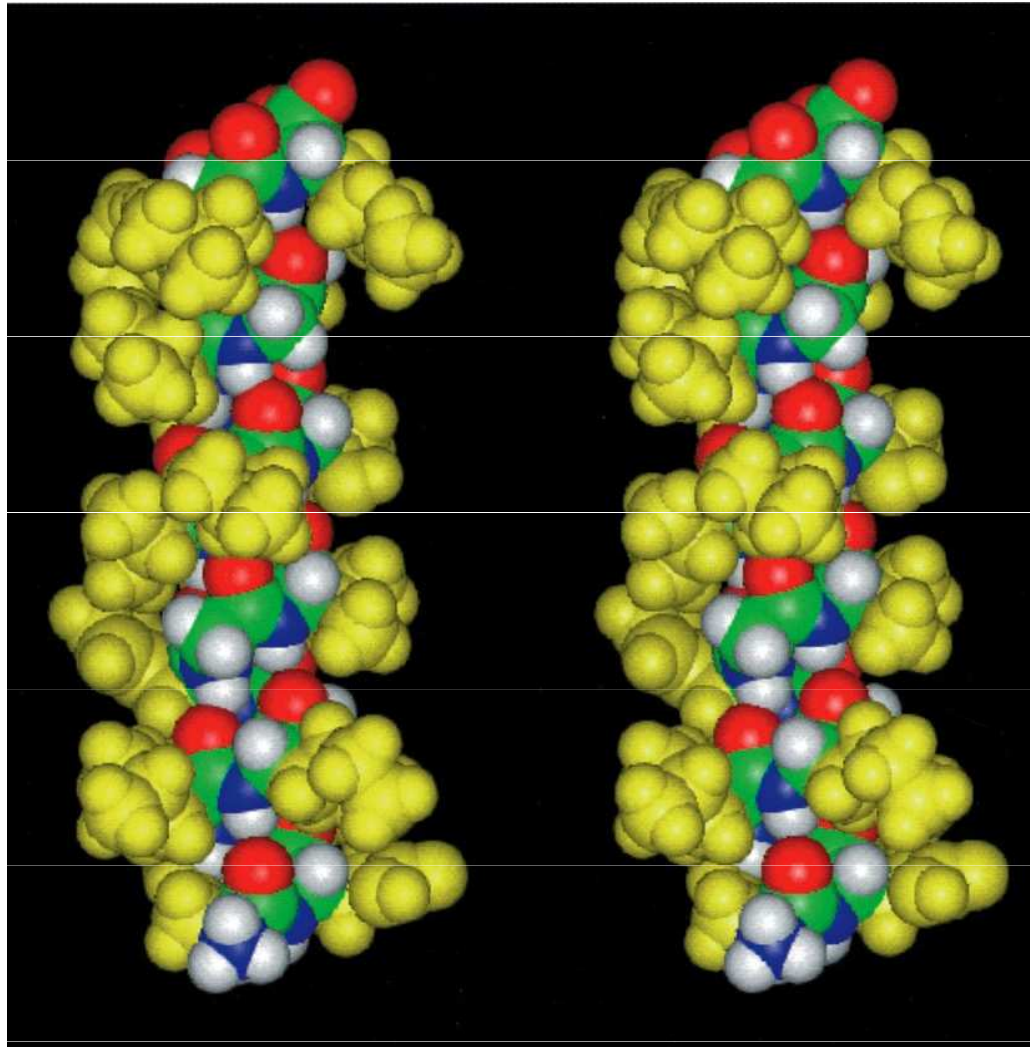


H můstek mezi C=O  $n$ -té peptidické vazby a N-H  $n+4$  peptidické vazby



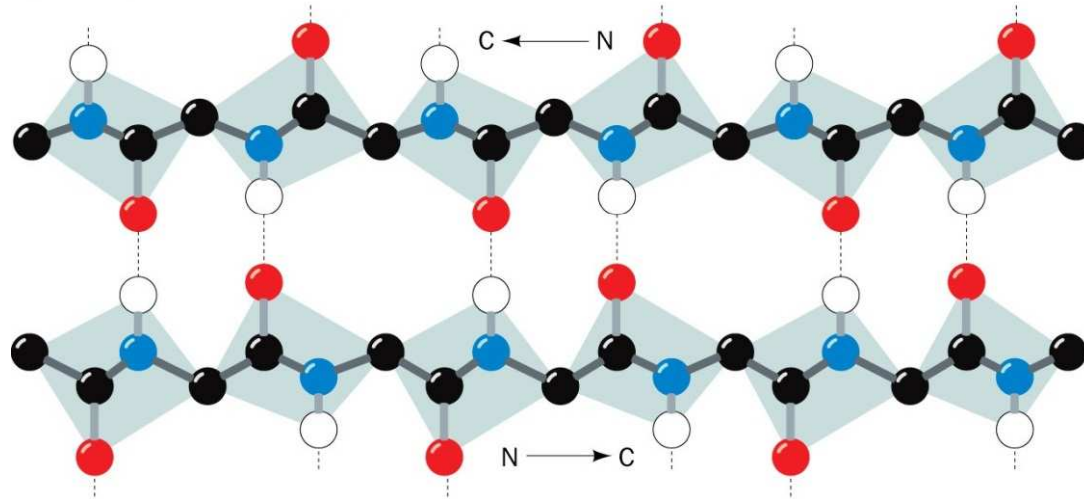
Optimální vzdálenost 0,28 nm

# $\alpha$ - helix



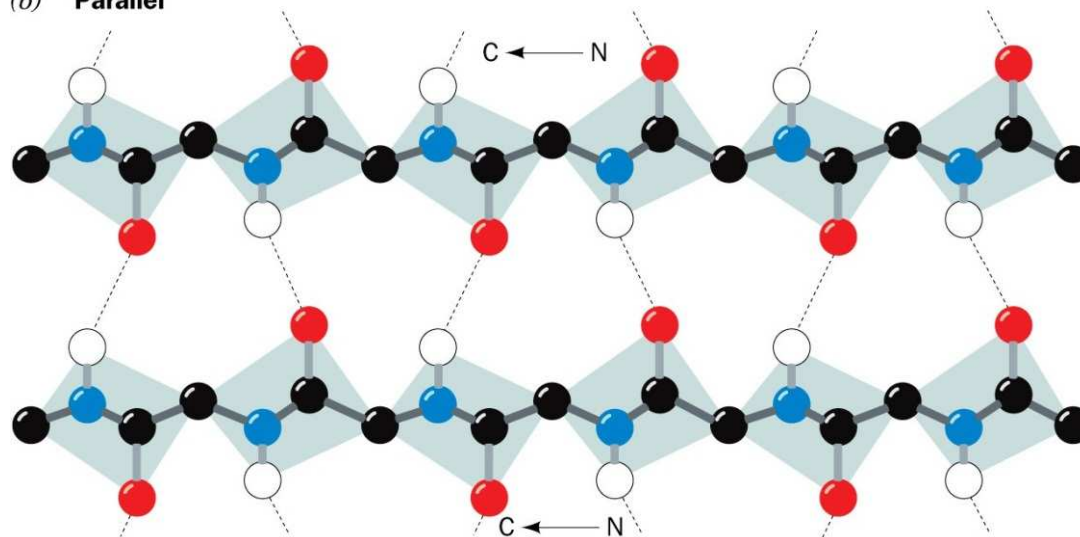
# $\beta$ - sheet

(a) Antiparallel



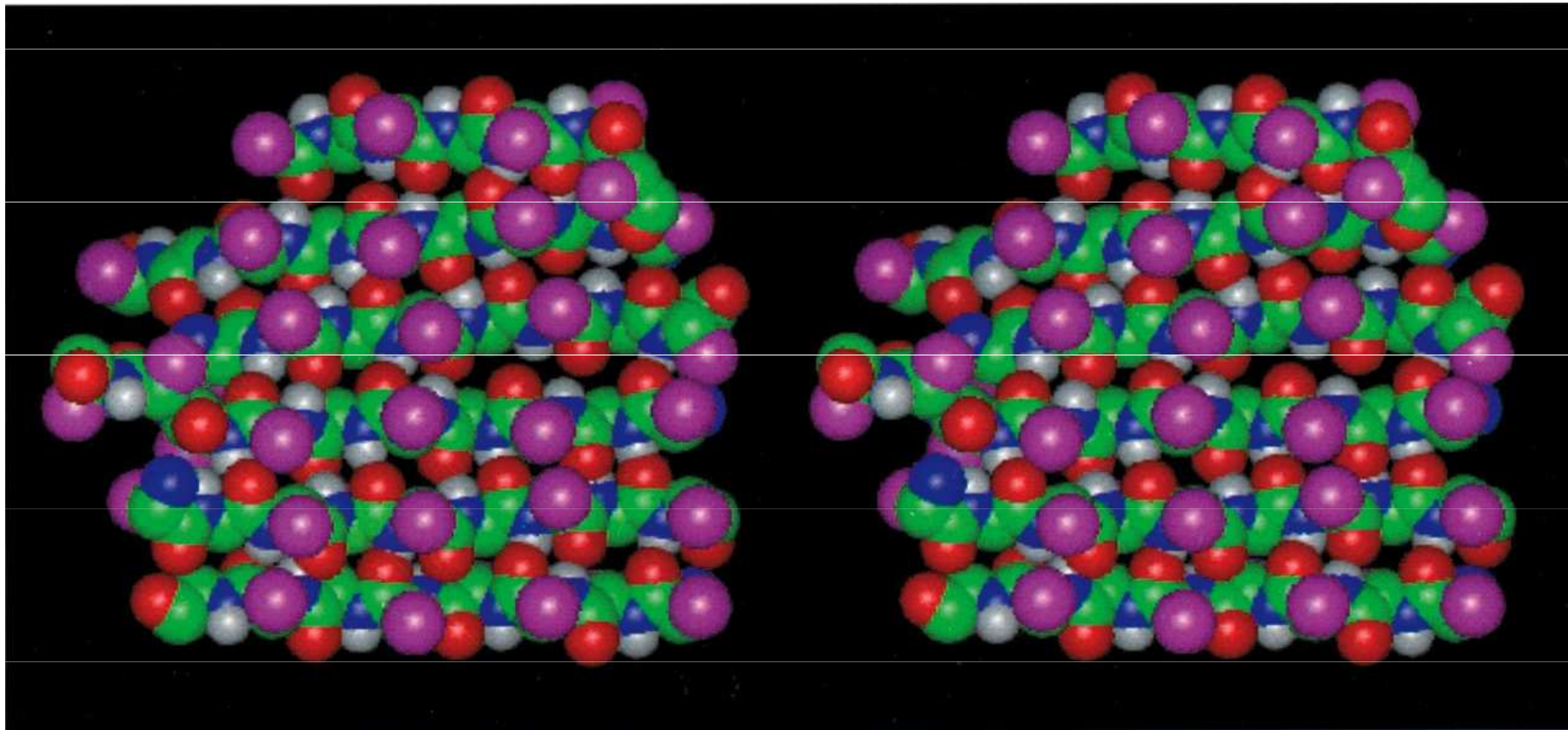
Irving Geis/Geis Archives Trust. Copyright Howard Hughes Medical Institute. Reproduced with permission.

(b) Parallel



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

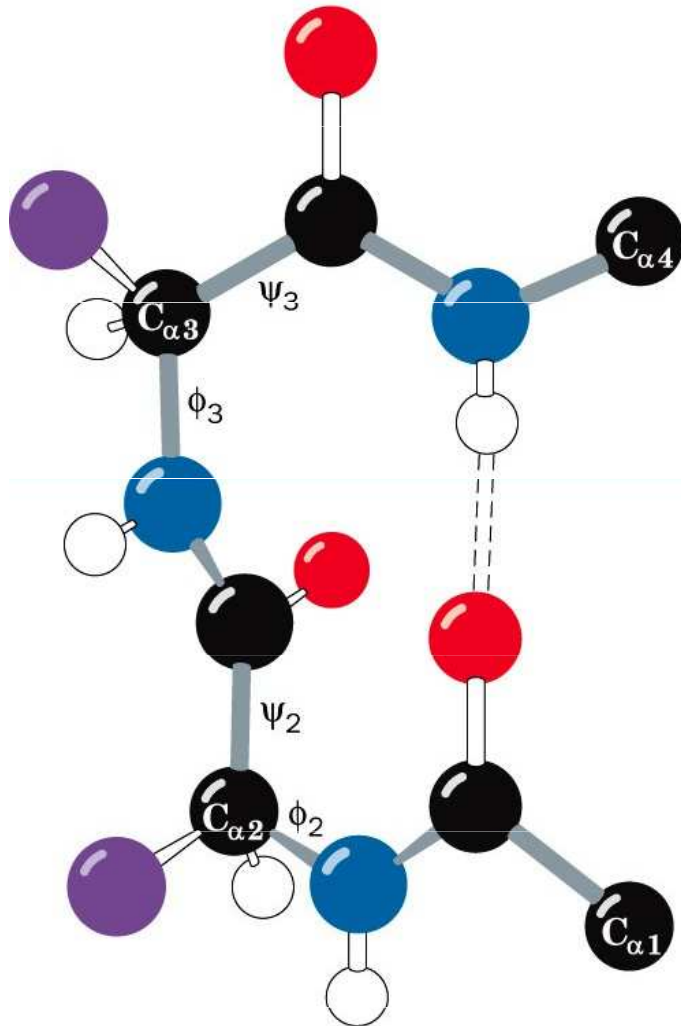
# $\beta$ - sheet



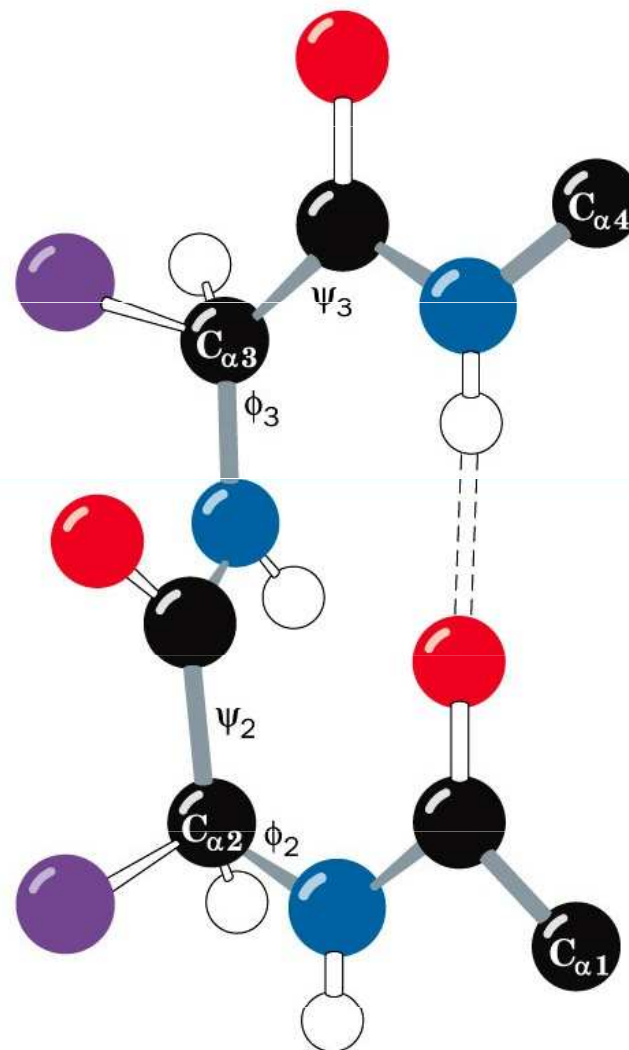


# $\beta$ - turn

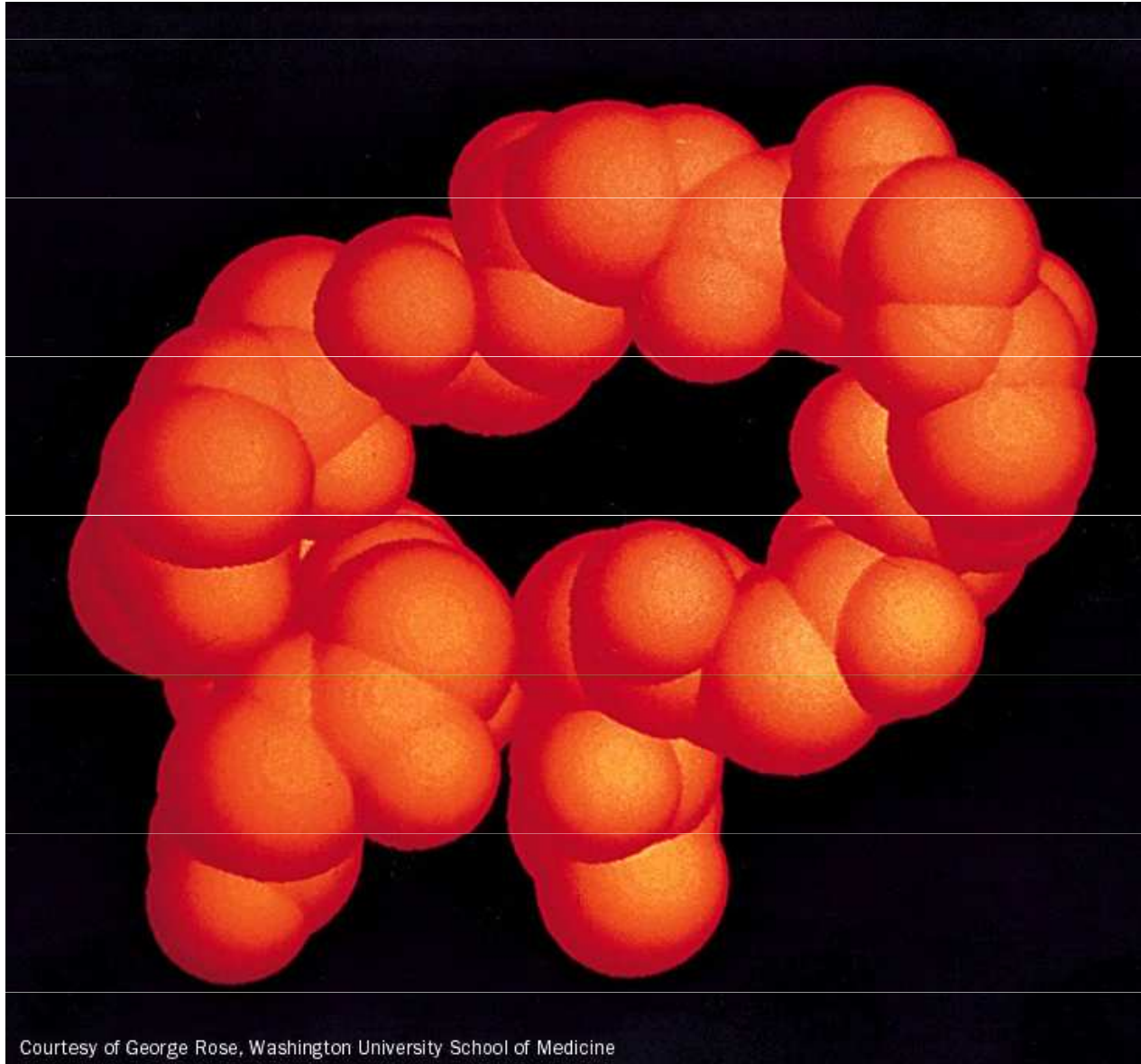
(a) Type I  $\beta$  bend



(b) Type II  $\beta$  bend



# $\beta$ - turn





## Terciální struktura

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

Strukturní motivy - domény

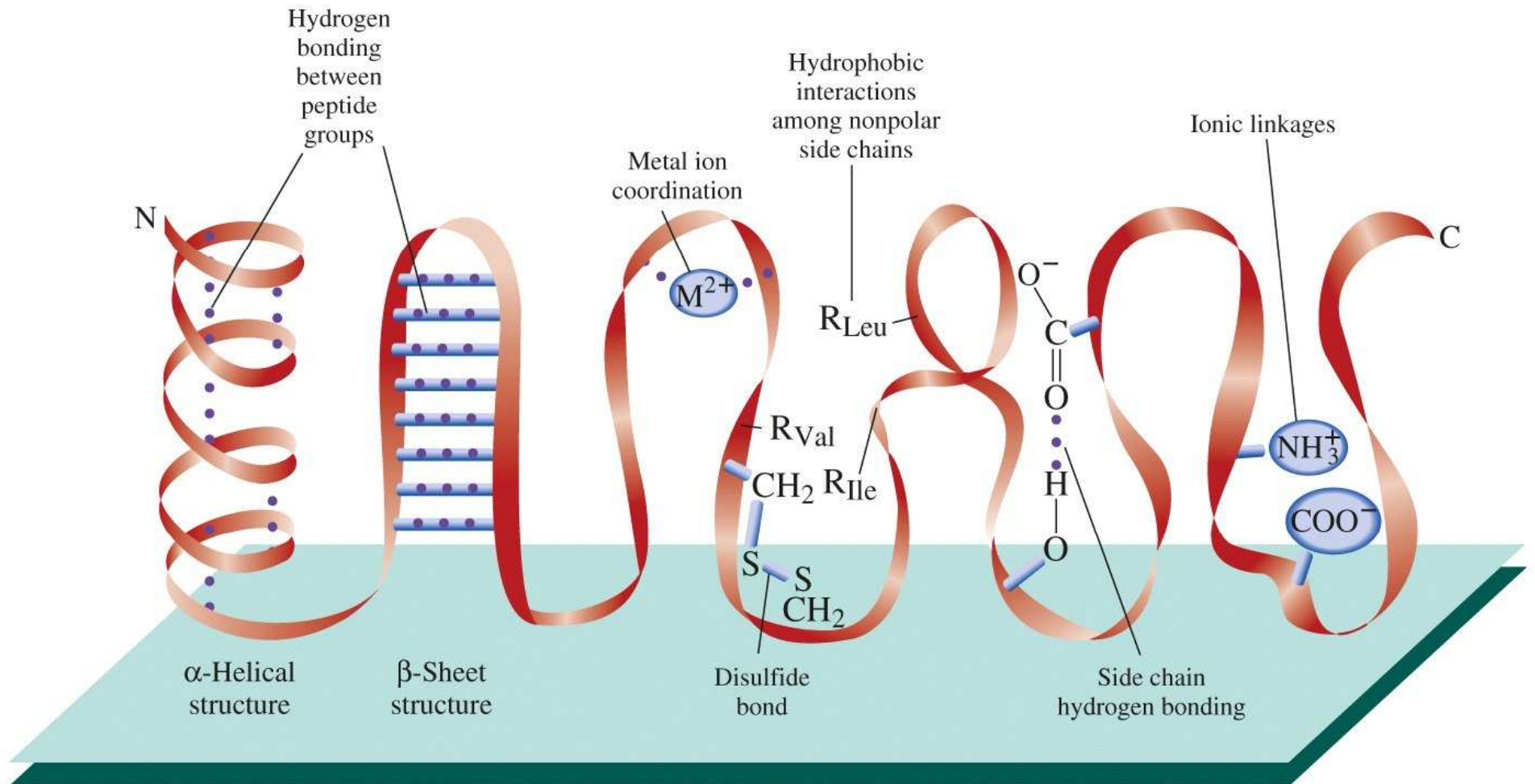
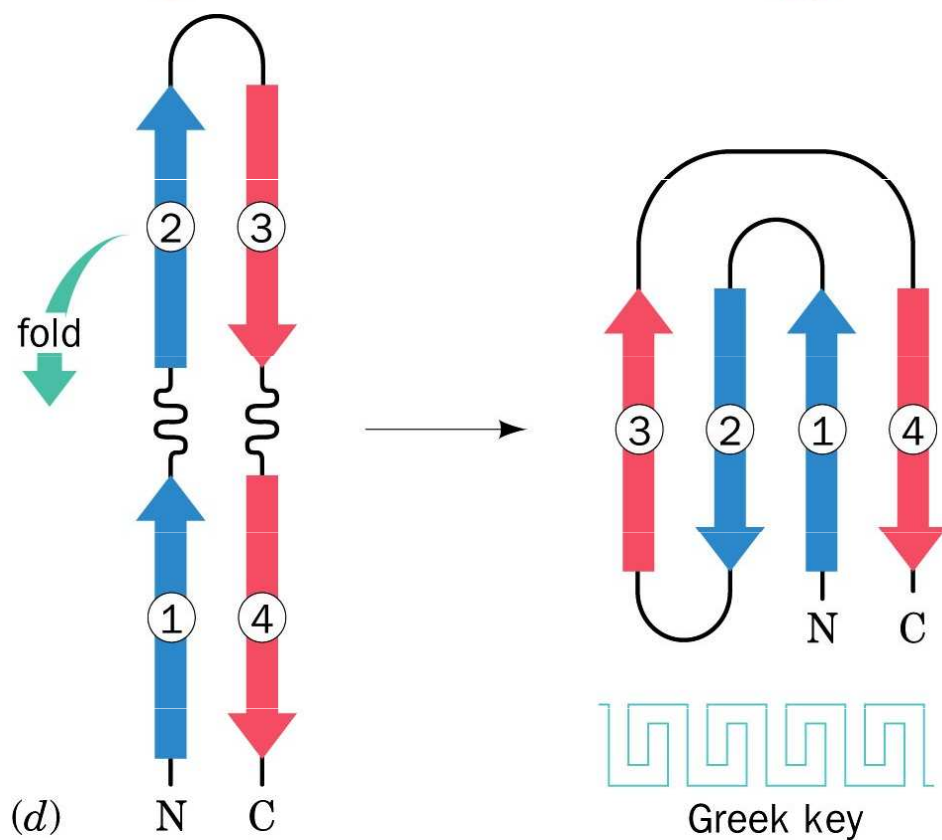
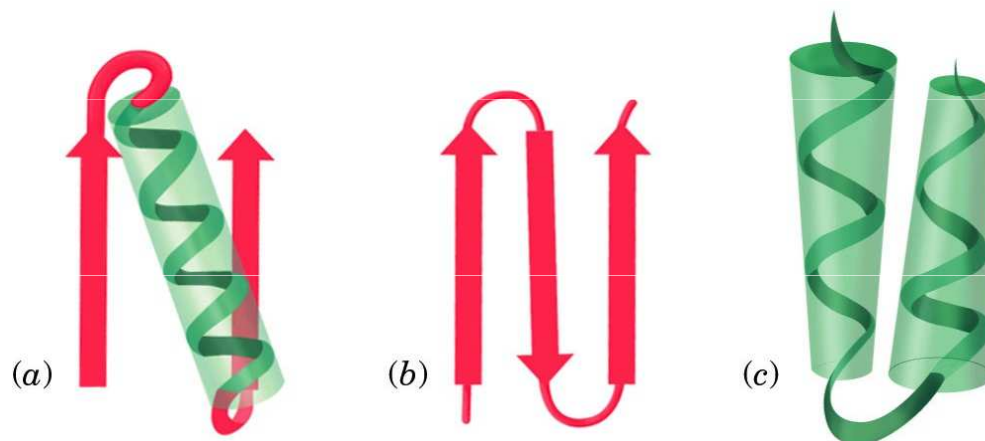
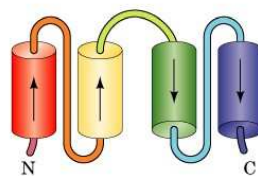
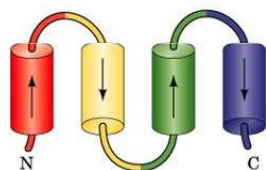
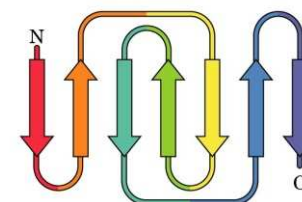
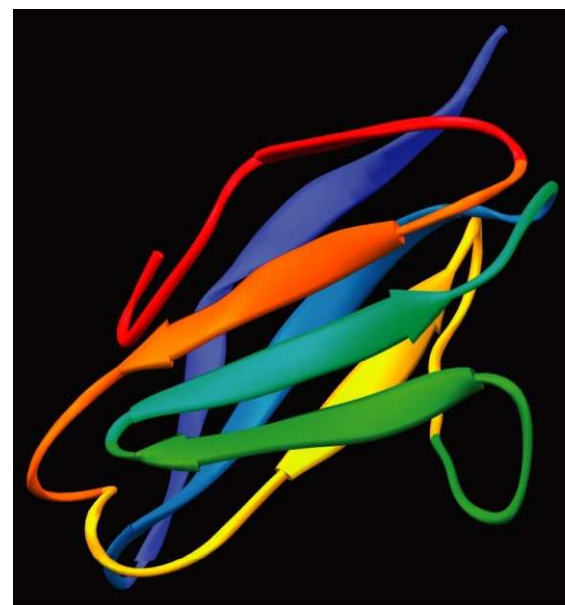
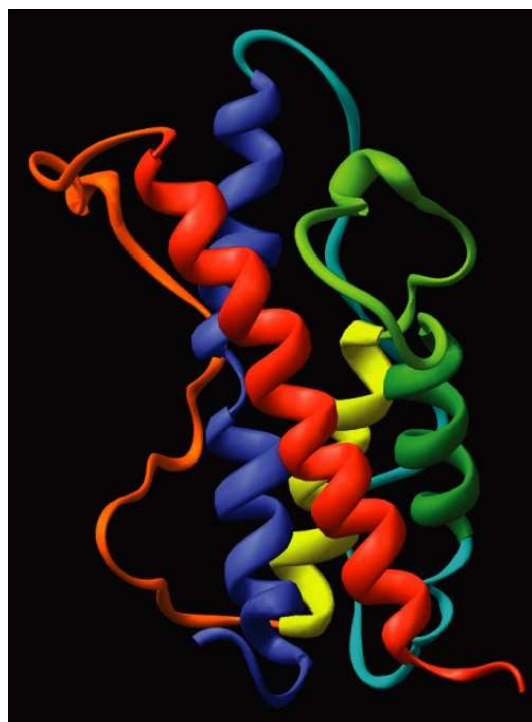
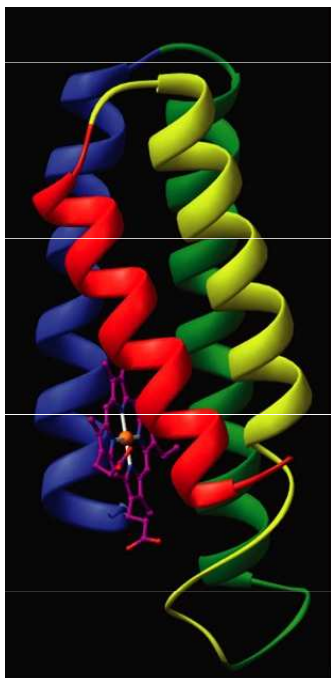


Figure 4-3 Concepts in Biochemistry, 3/e  
 © 2006 John Wiley & Sons

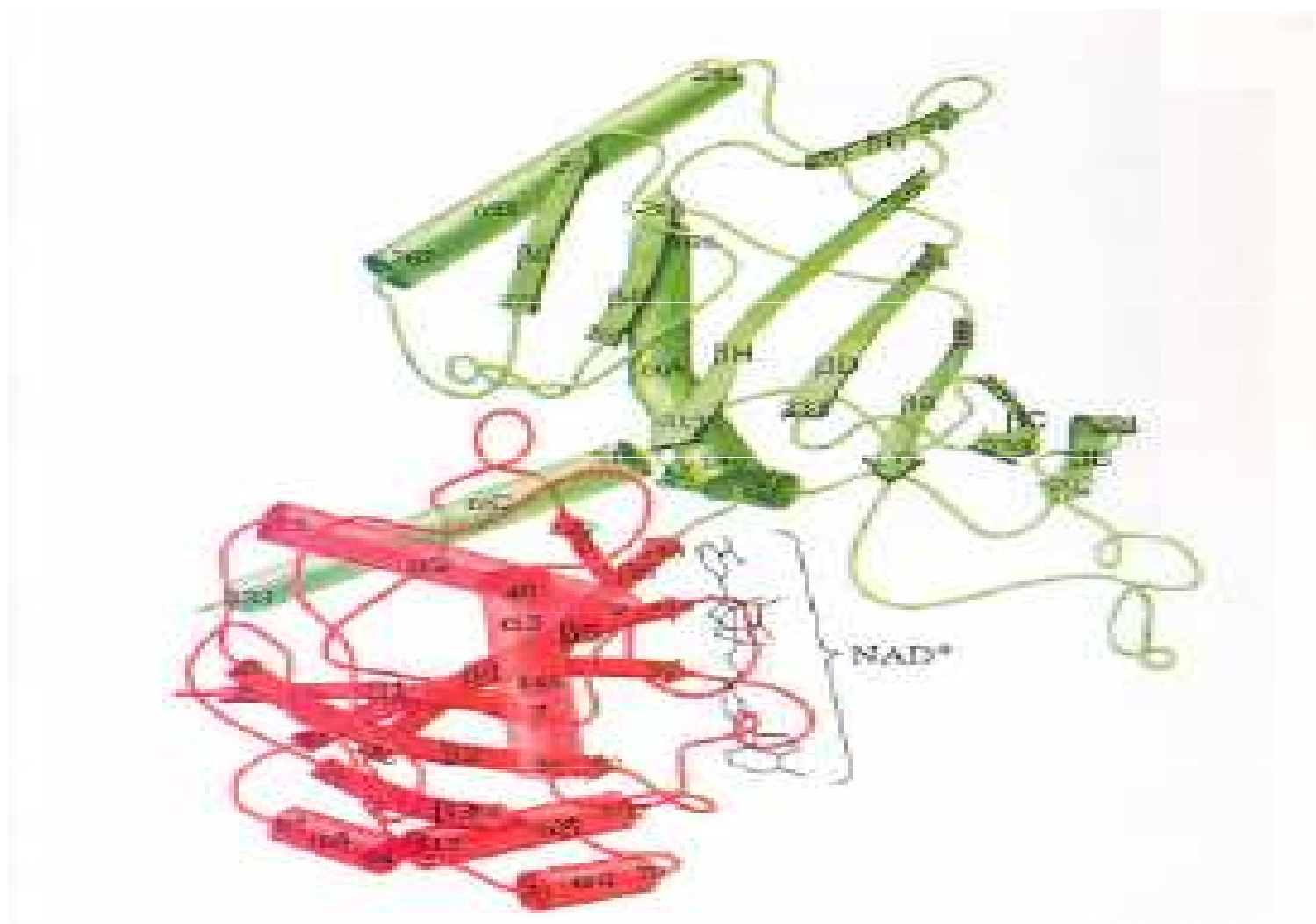
# Strukturní motivy

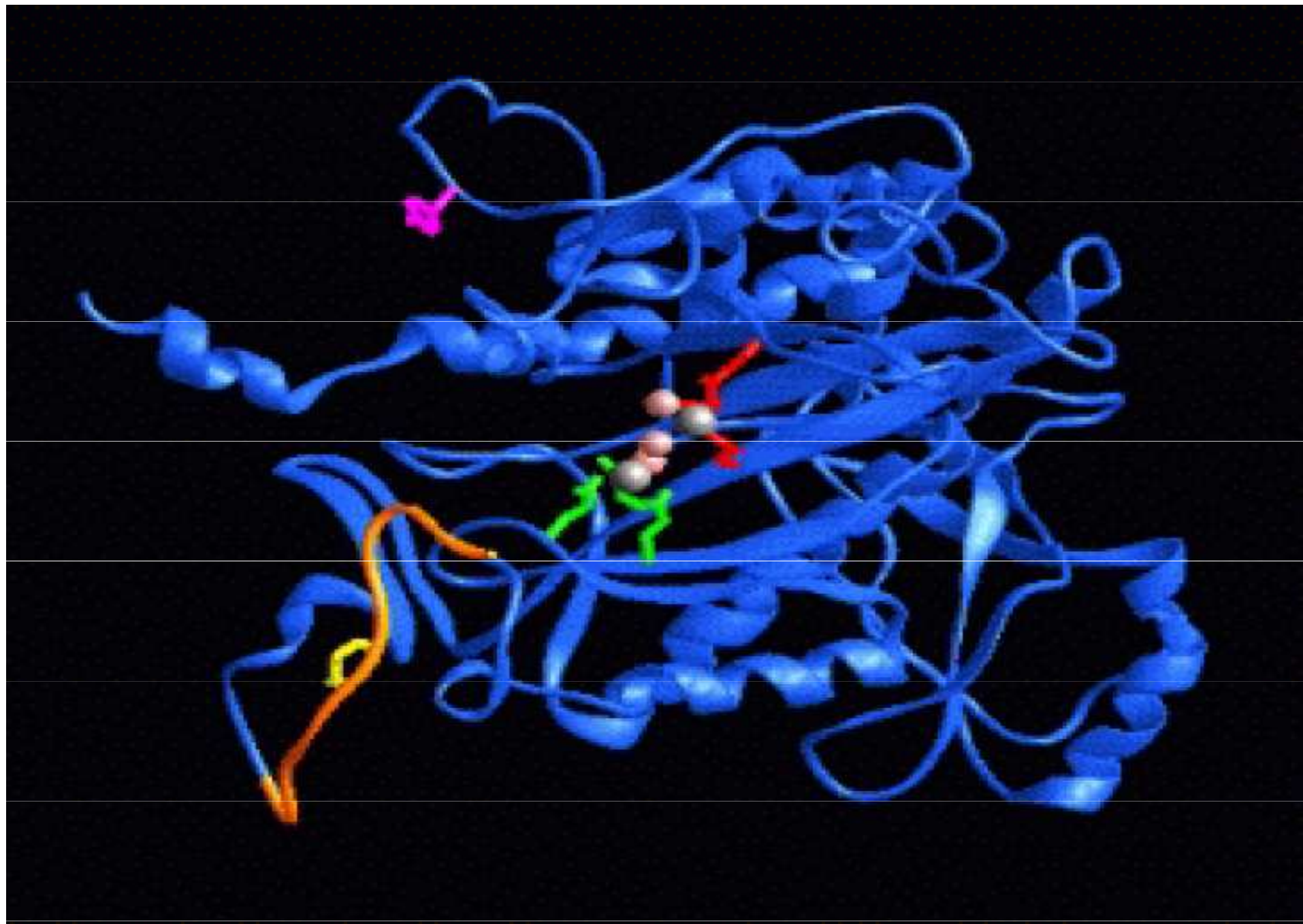


# Strukturní motivy



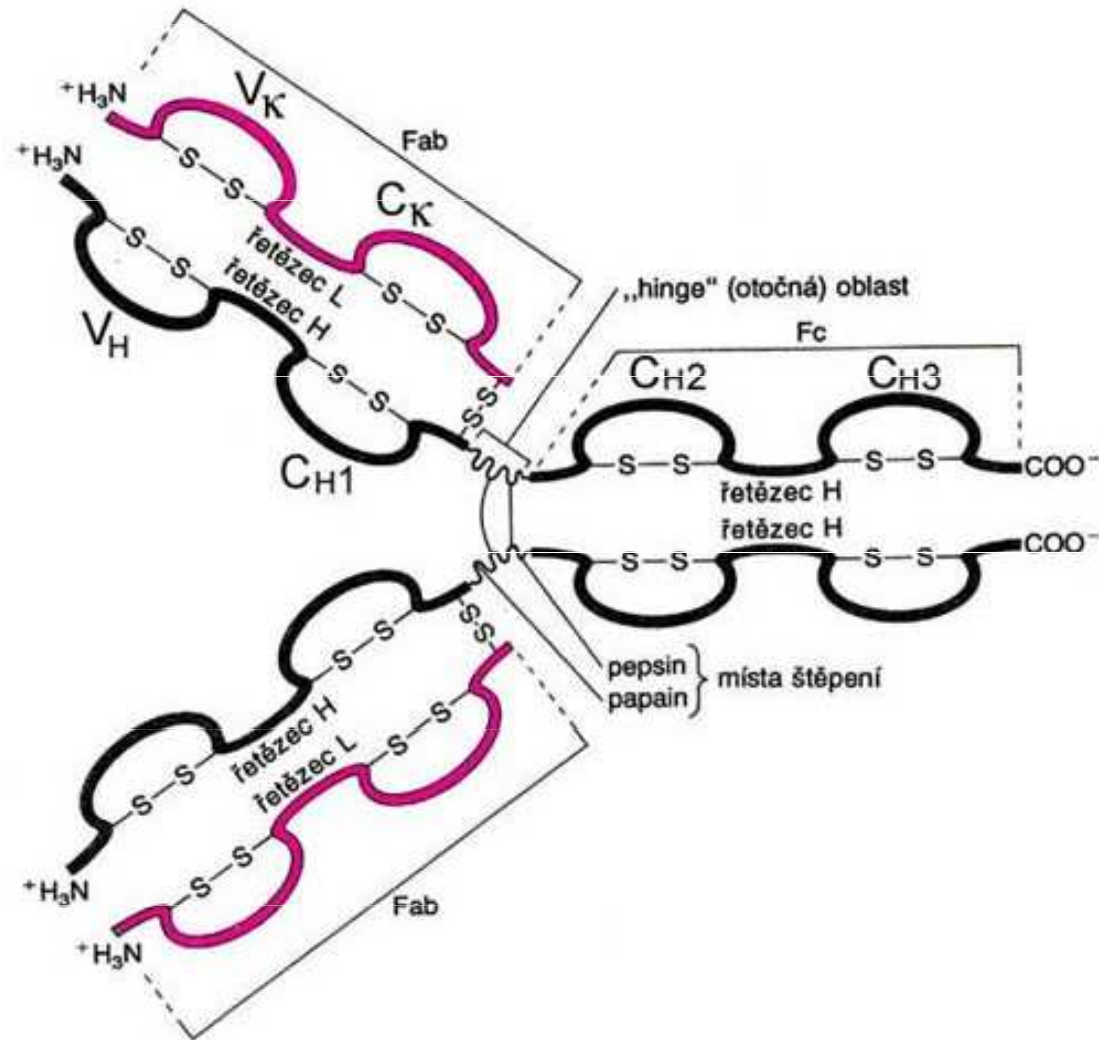
# Strukturní domény







# Strukturní domény IgG



## Kvarterní struktura

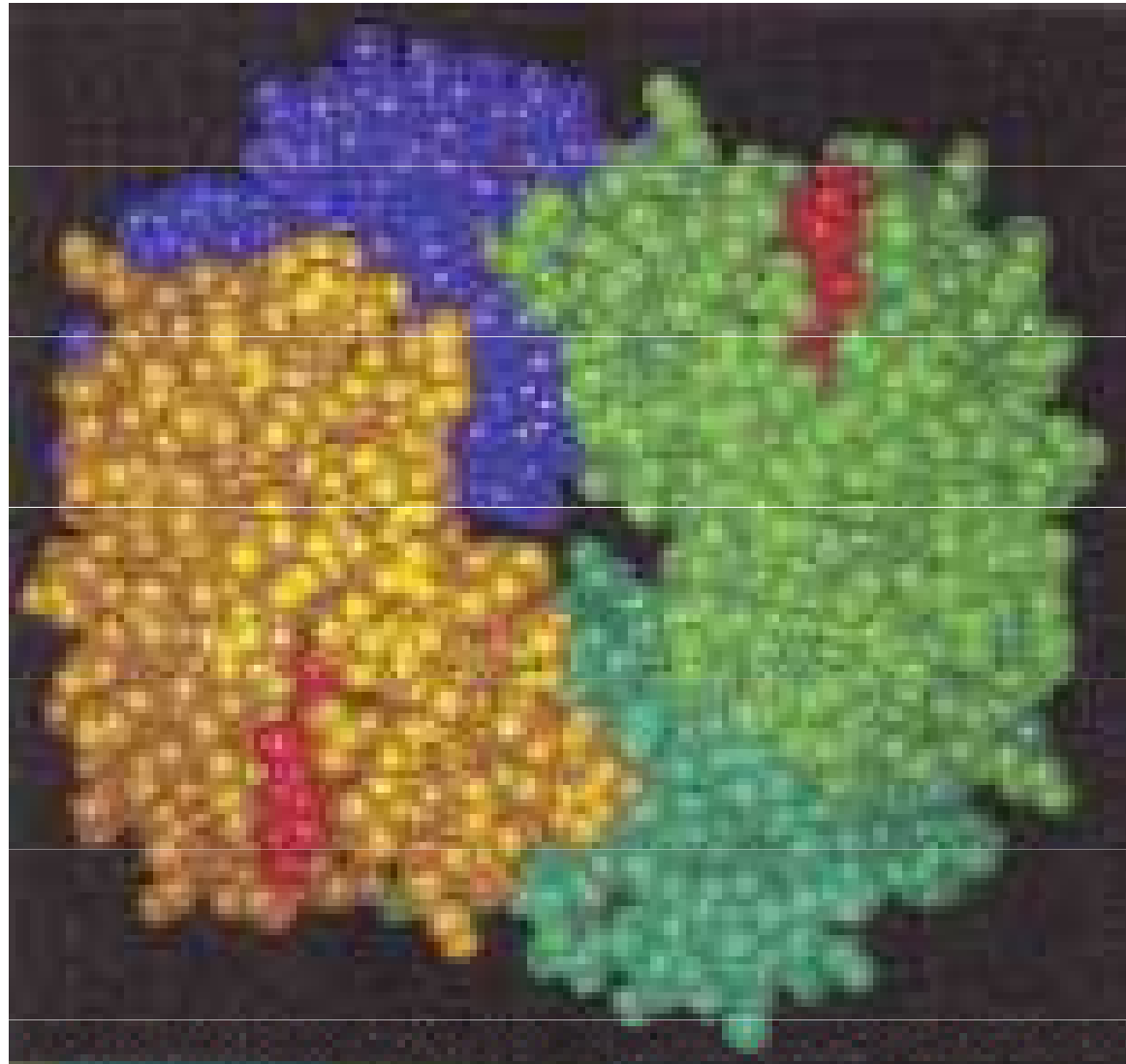
Podjednotkové složení - nekovalentní spojení - vodíkové můstky

- kovalentní spojení - bisulfidické můstky

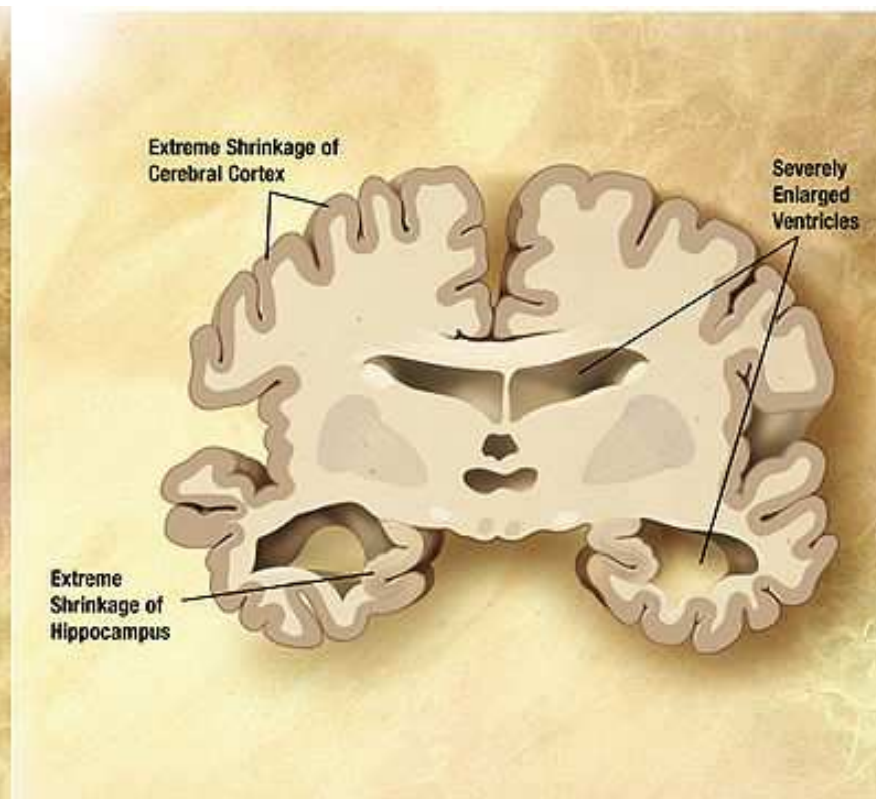
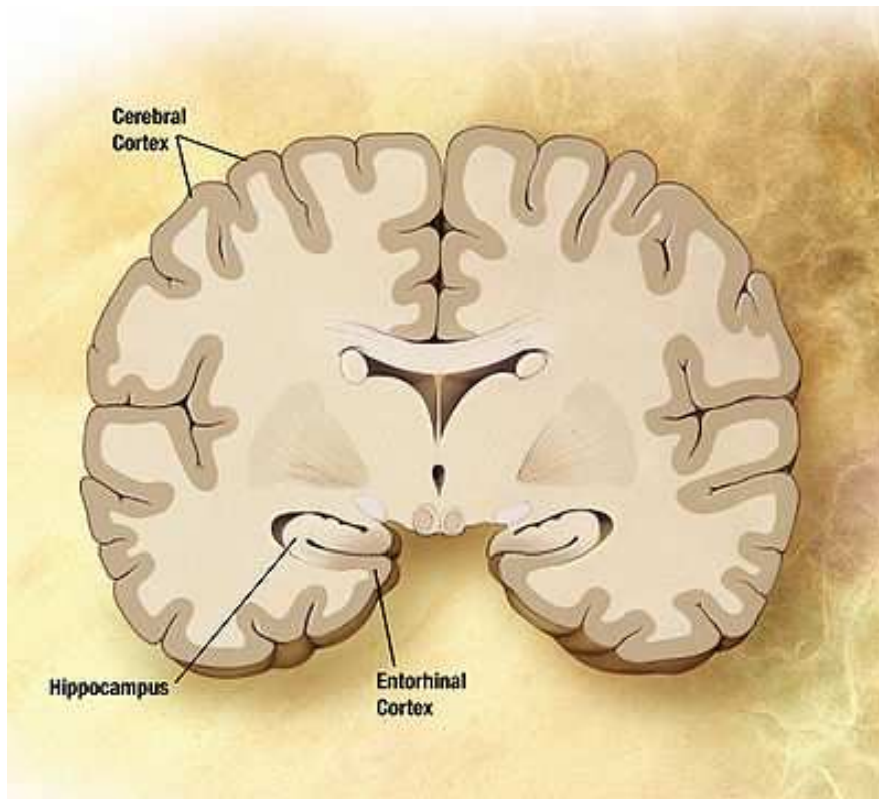
Stanovení podjednotkového složení - SDS PAGE



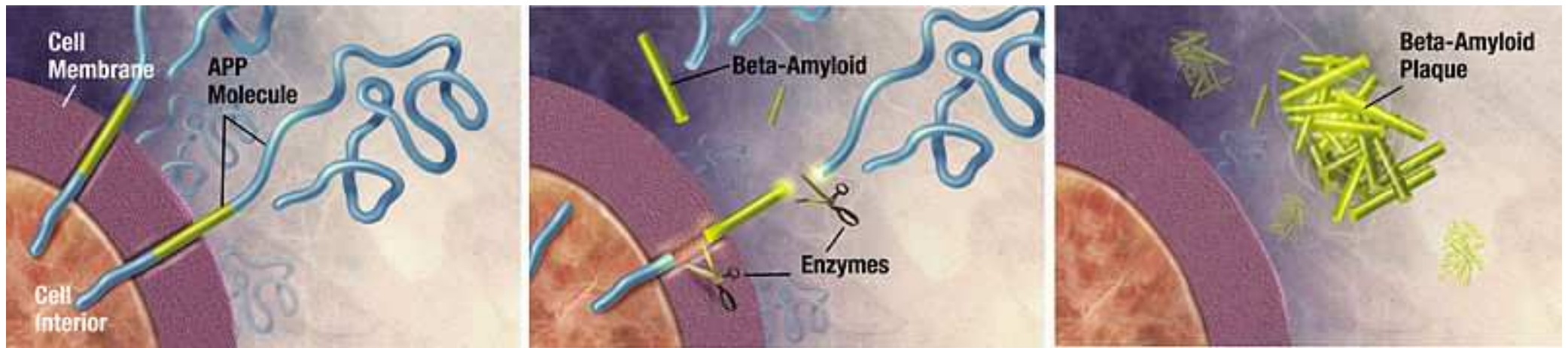
# Hemoglobin



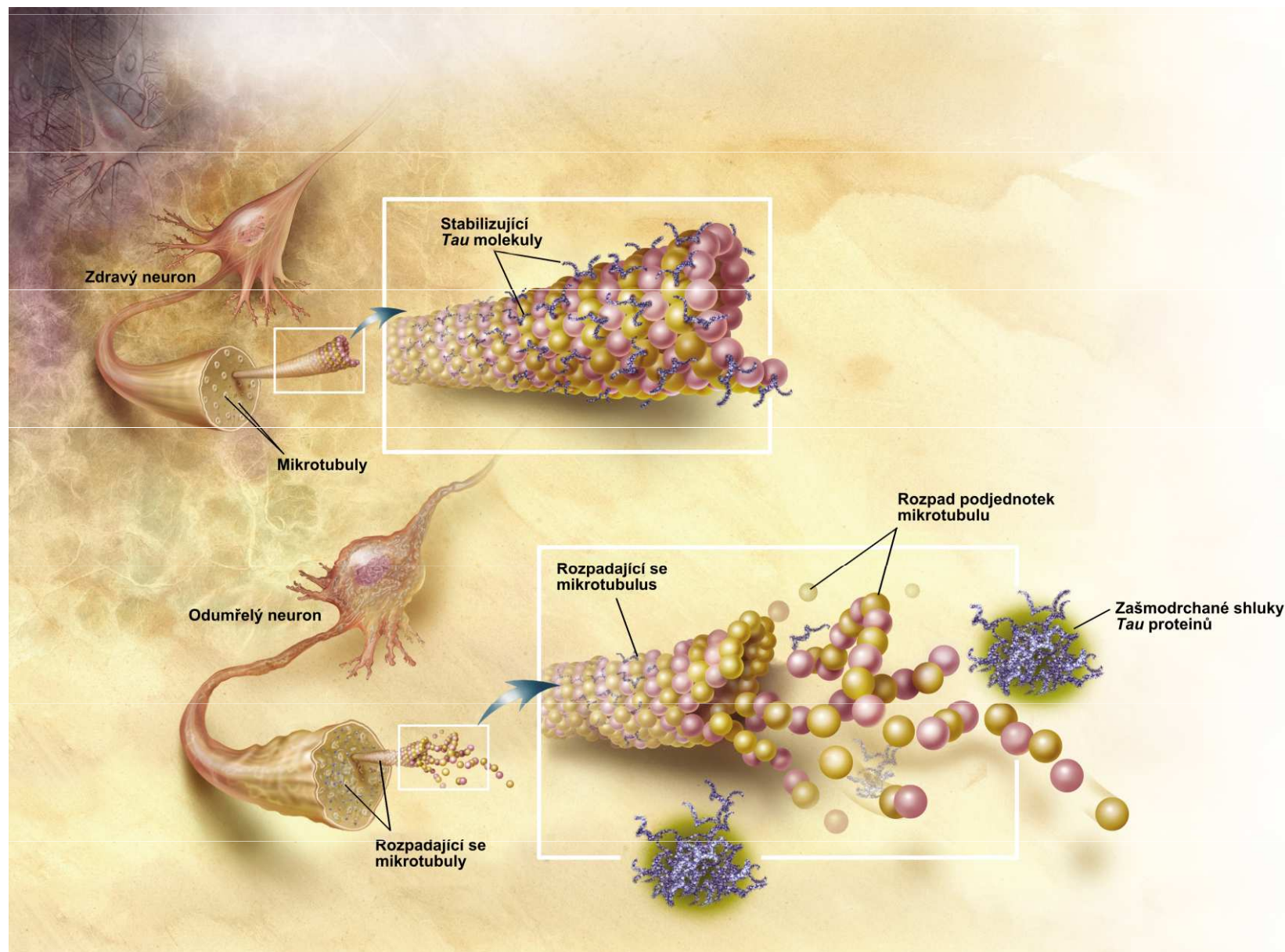
# Alzheimer



# Alzheimer



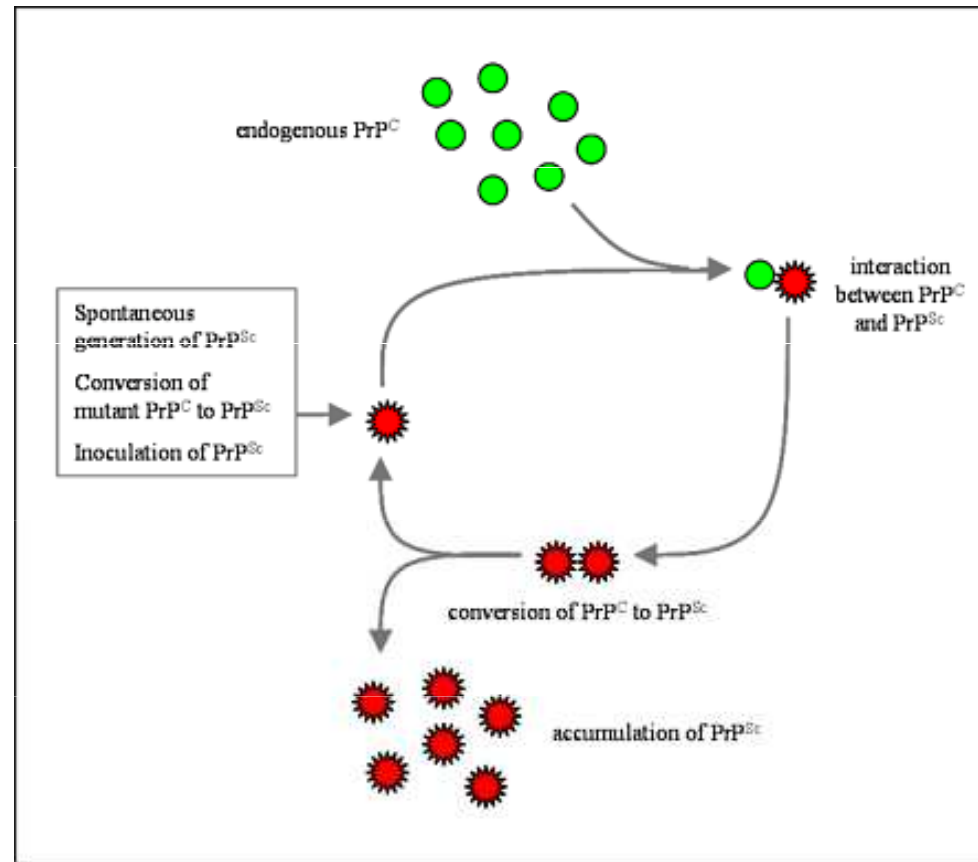
# Alzheimer





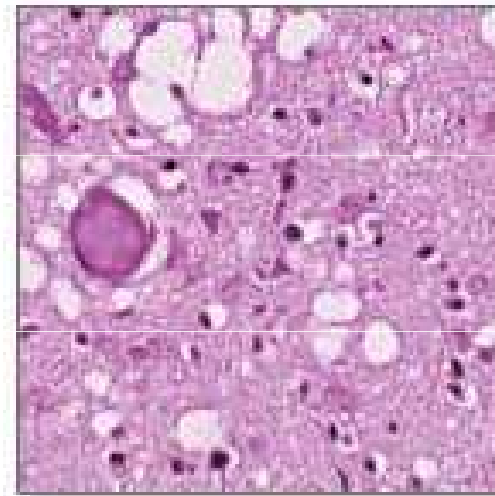
# Scrapie - BSE – CJD

## Priony



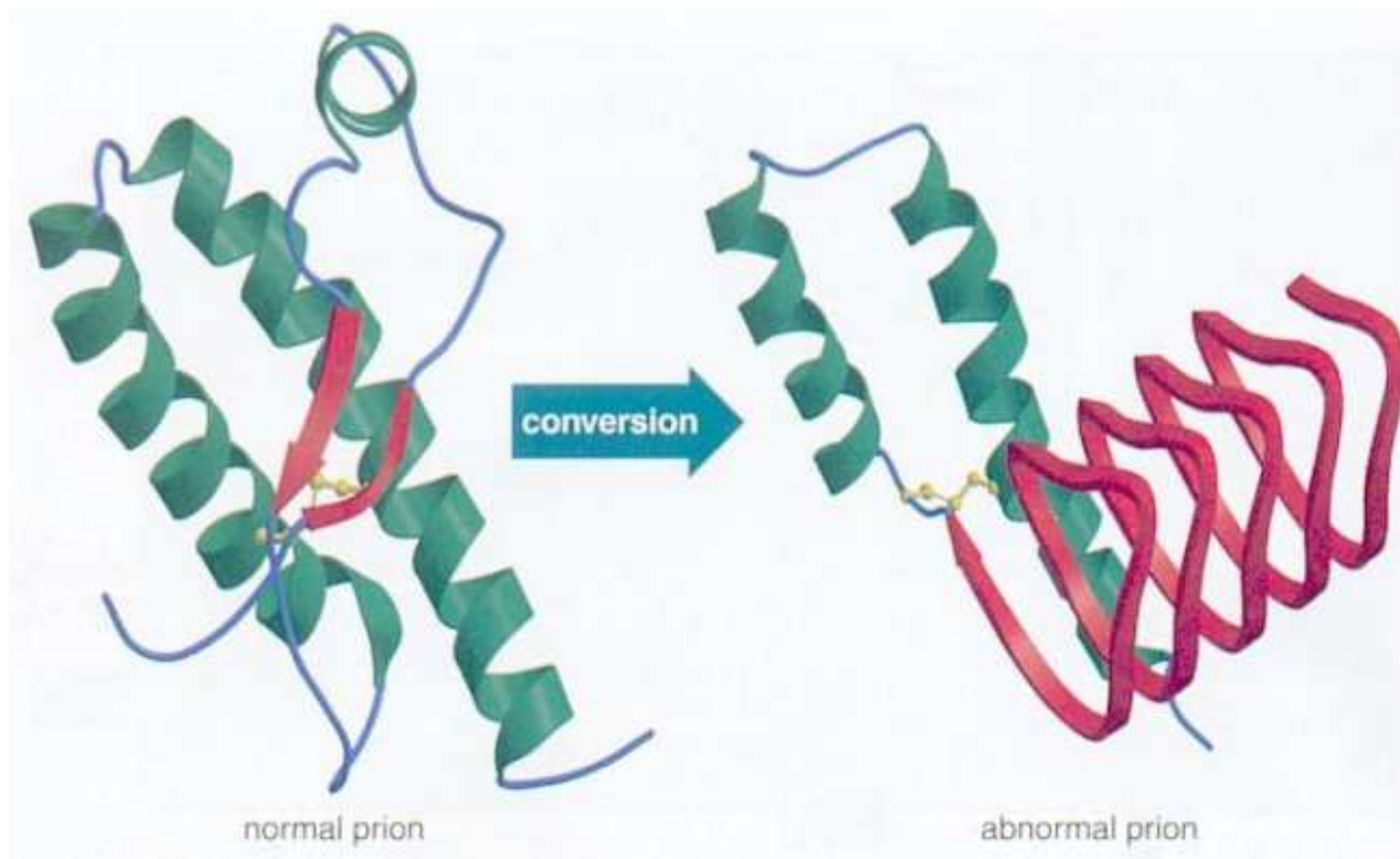
# CJD

Brain shrinkage and deterioration occurs rapidly



Brain section showing spongiform pathology characteristic of Creutzfeldt-Jakob

# PrP<sup>C</sup> - PrP<sup>Sc</sup>



## Studium konformace bílkovin

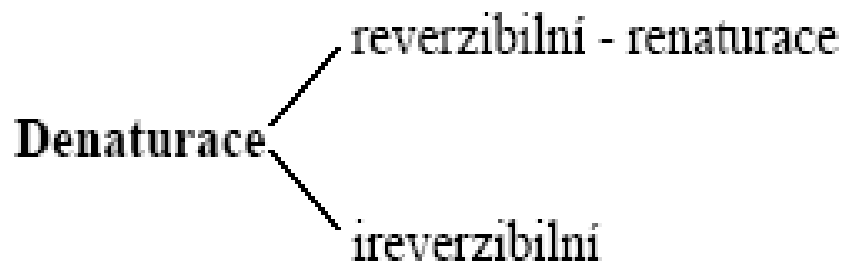
RTG difrakce - studium krystalů - BRAGG 1913

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

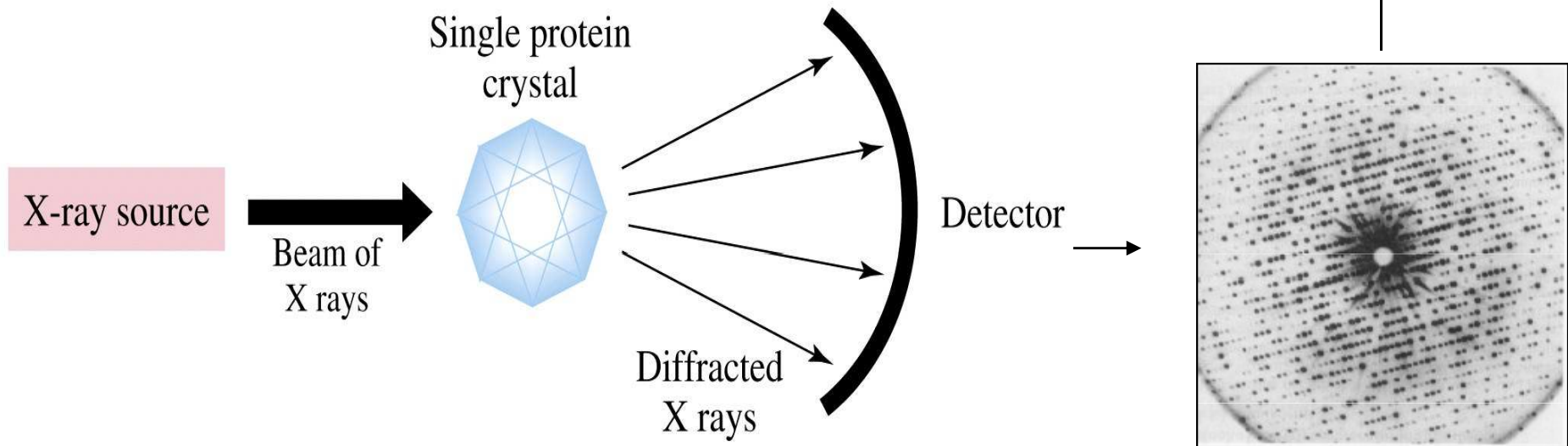
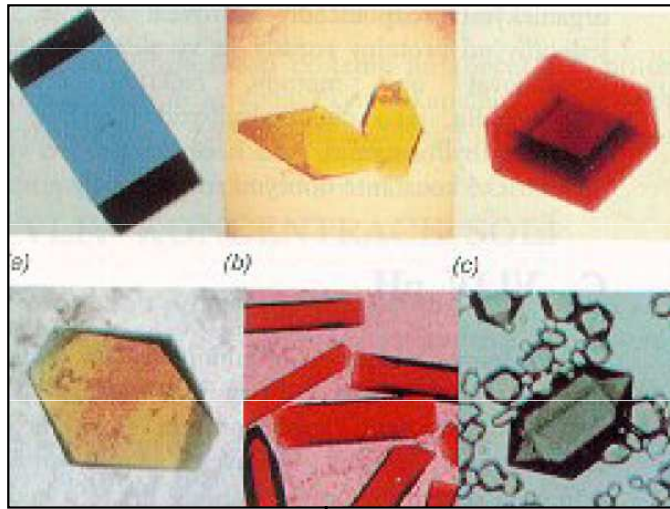
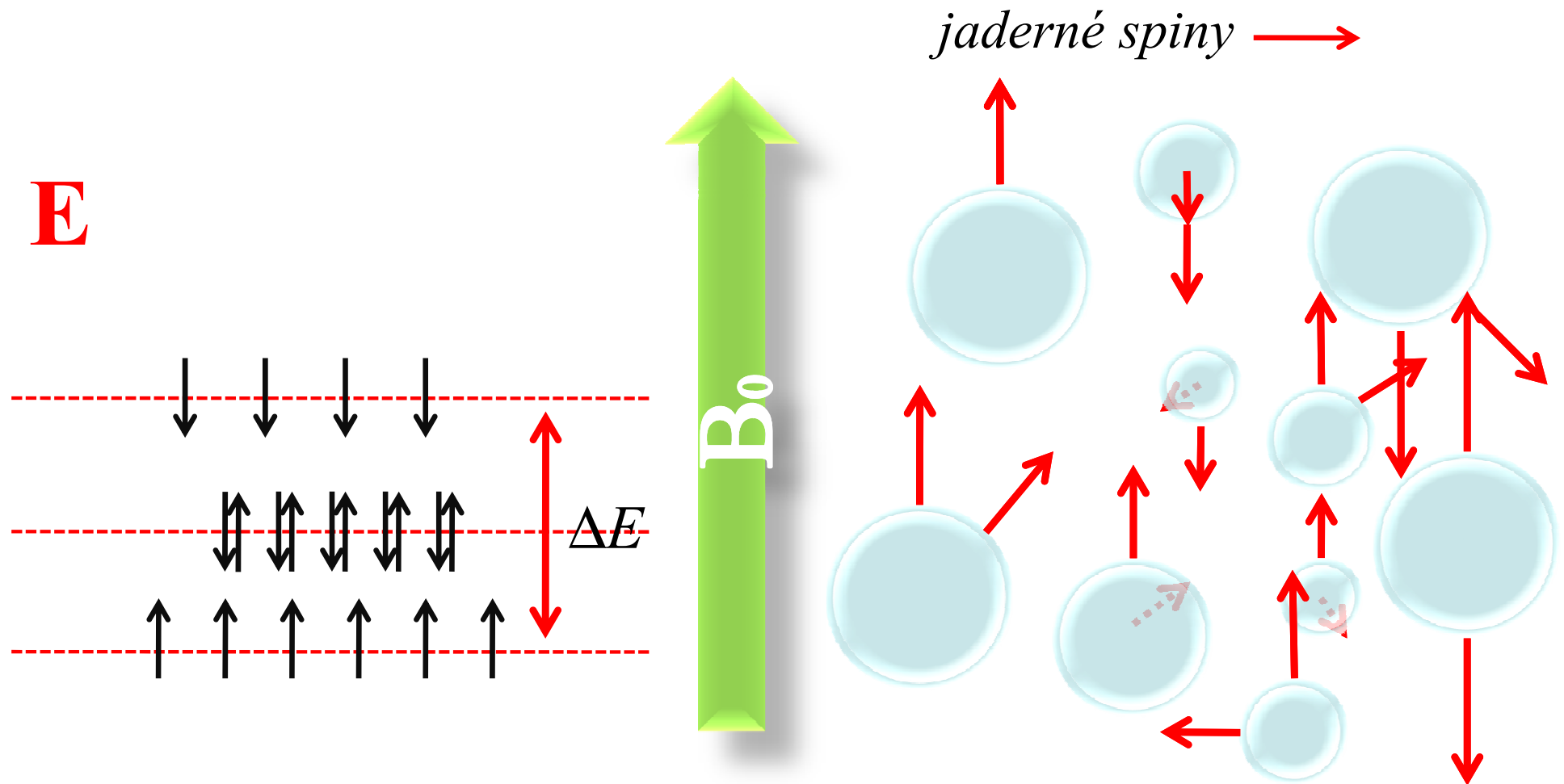
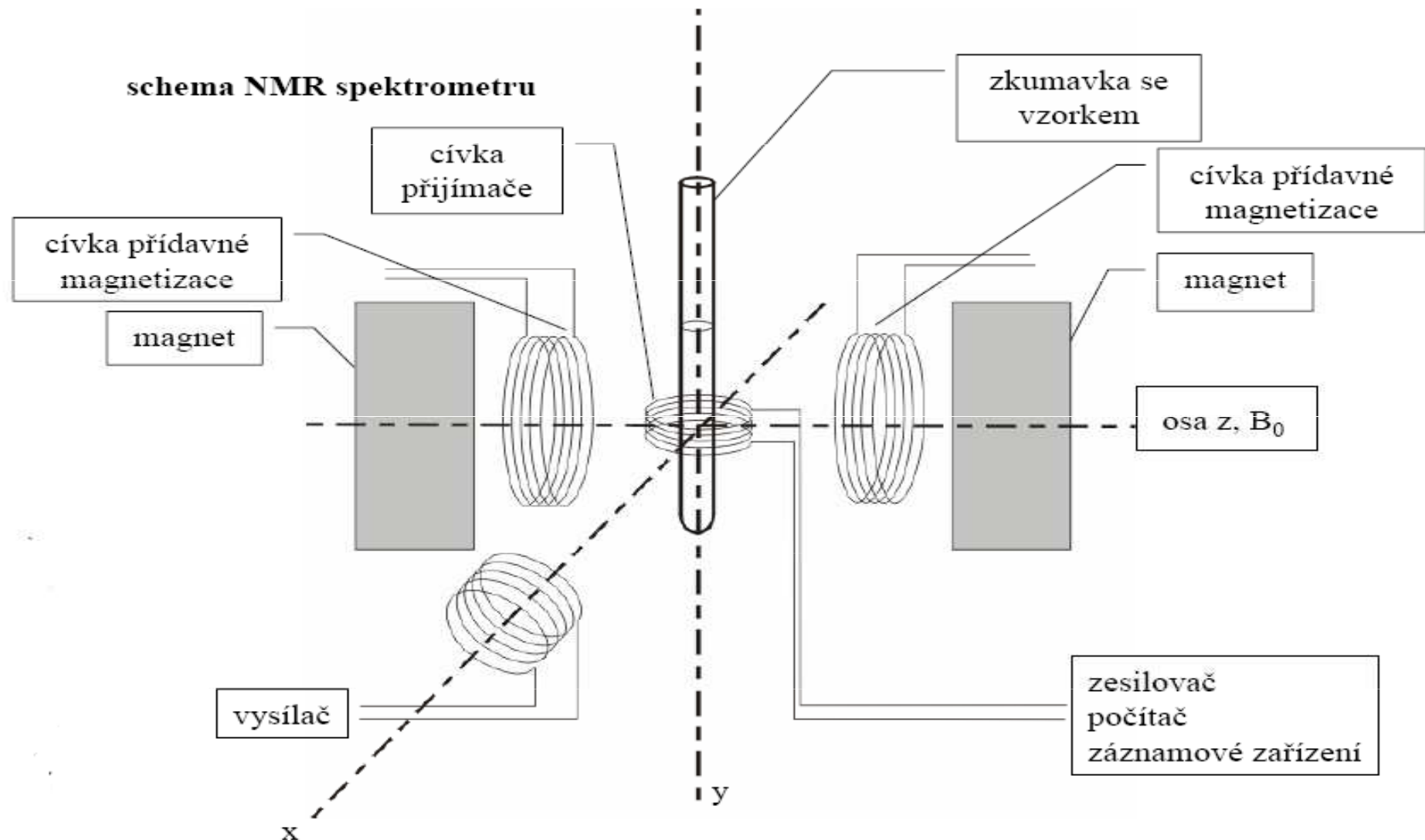


Figure 4-15 Concepts in Biochemistry, 3/e  
© 2006 John Wiley & Sons

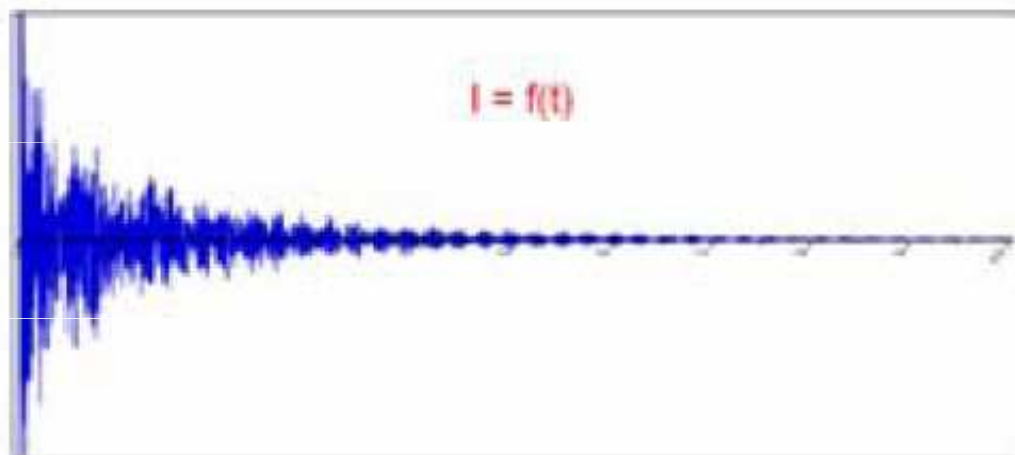
# NMR podstata



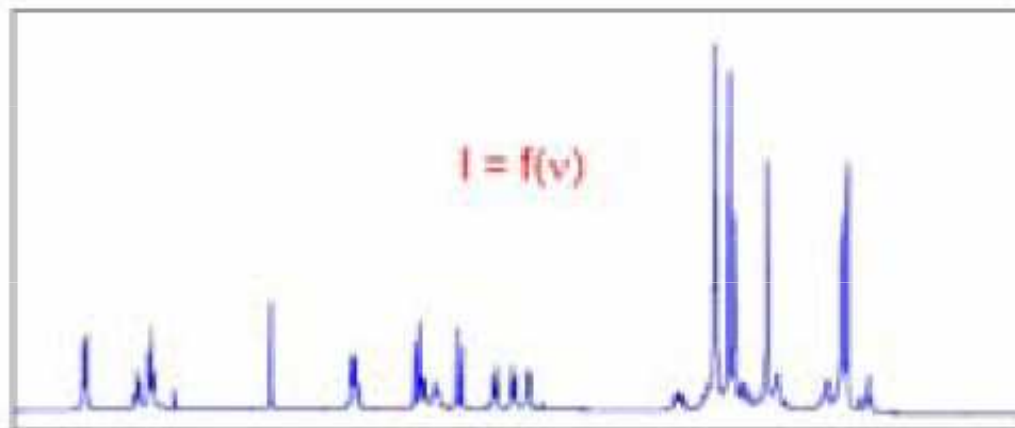
# NMR



# NMR spektrum



Po zpracování Fourierovou transformací dostaneme:



# NMR

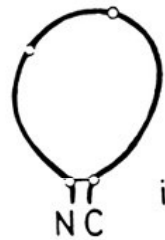
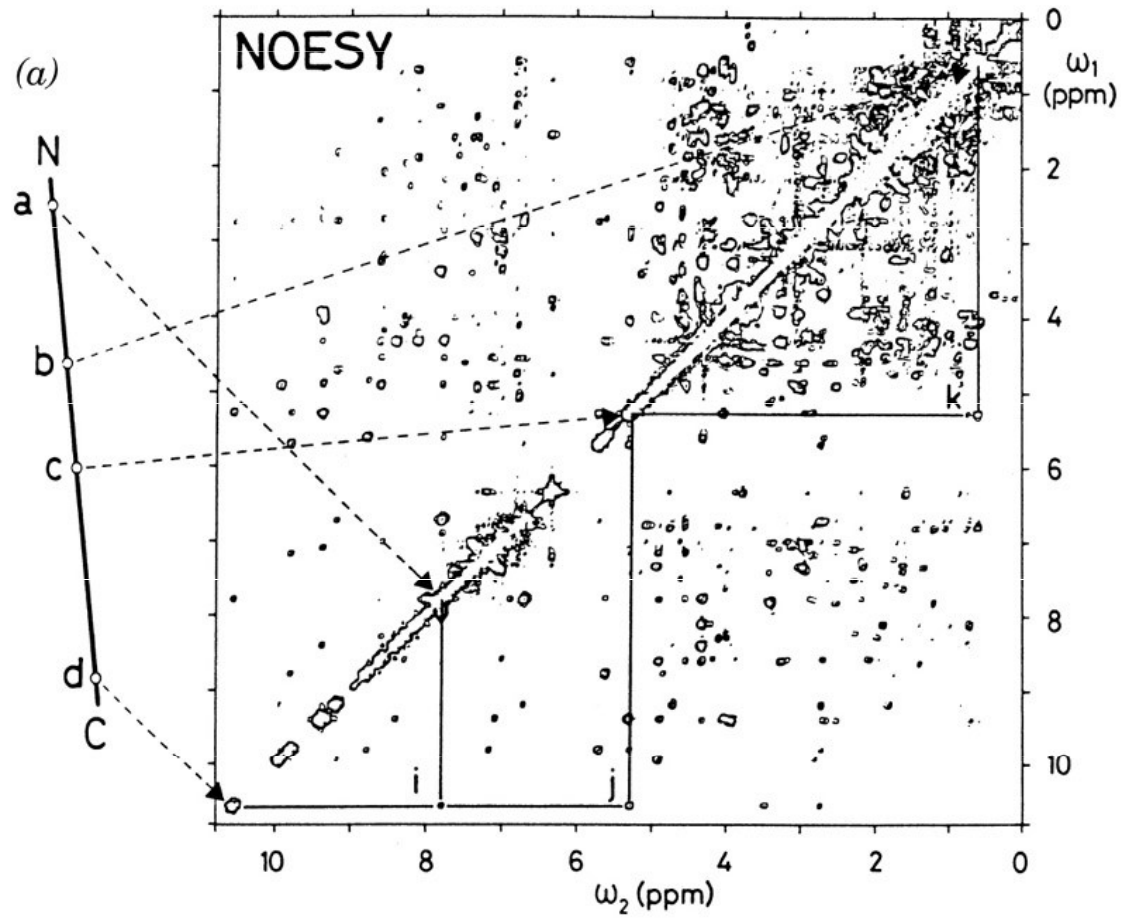
počítač

elektronika

supra-  
vodivý  
magnet



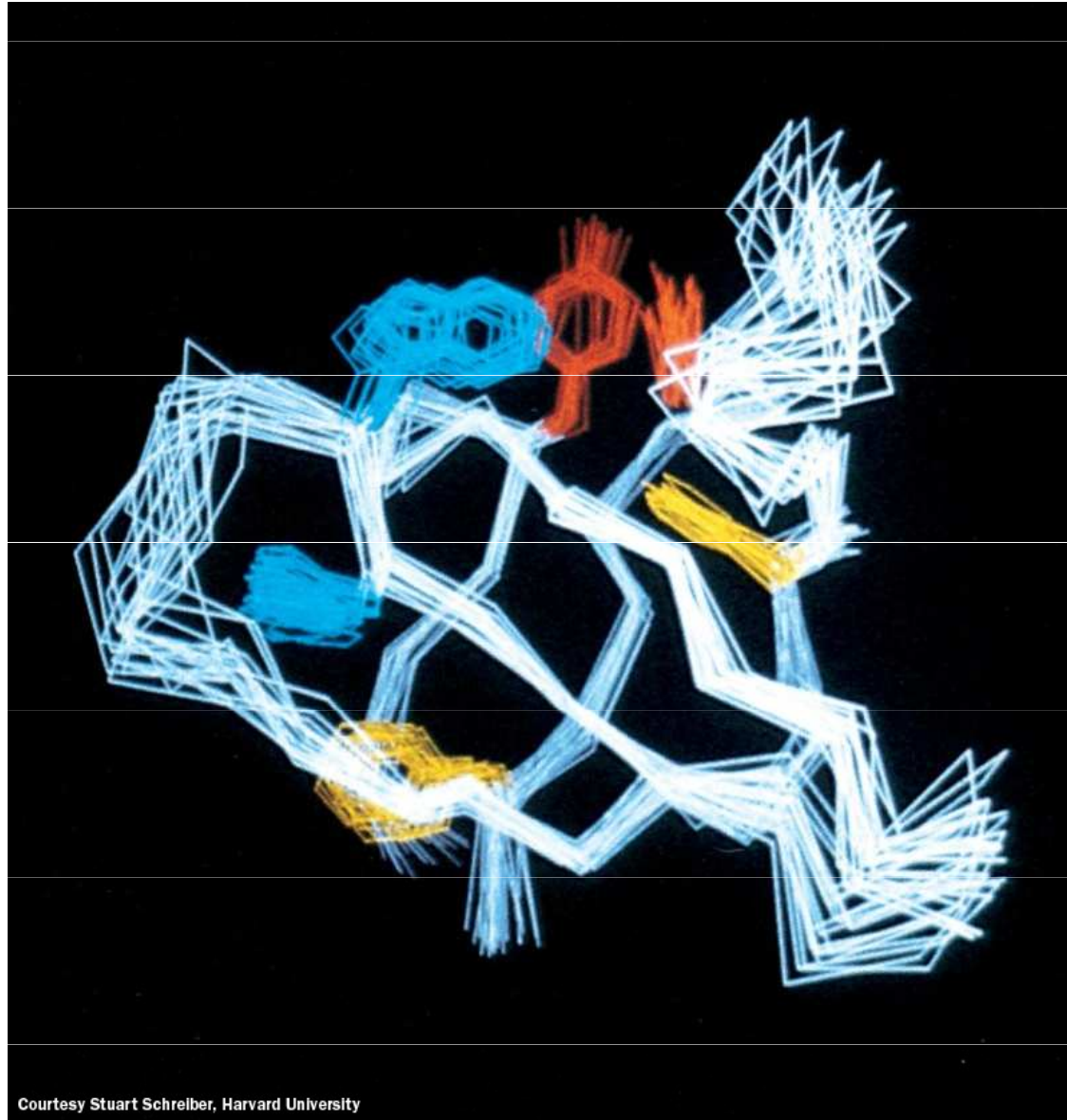
# NMR spektrum



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



# NMR



# Denaturace - renaturace

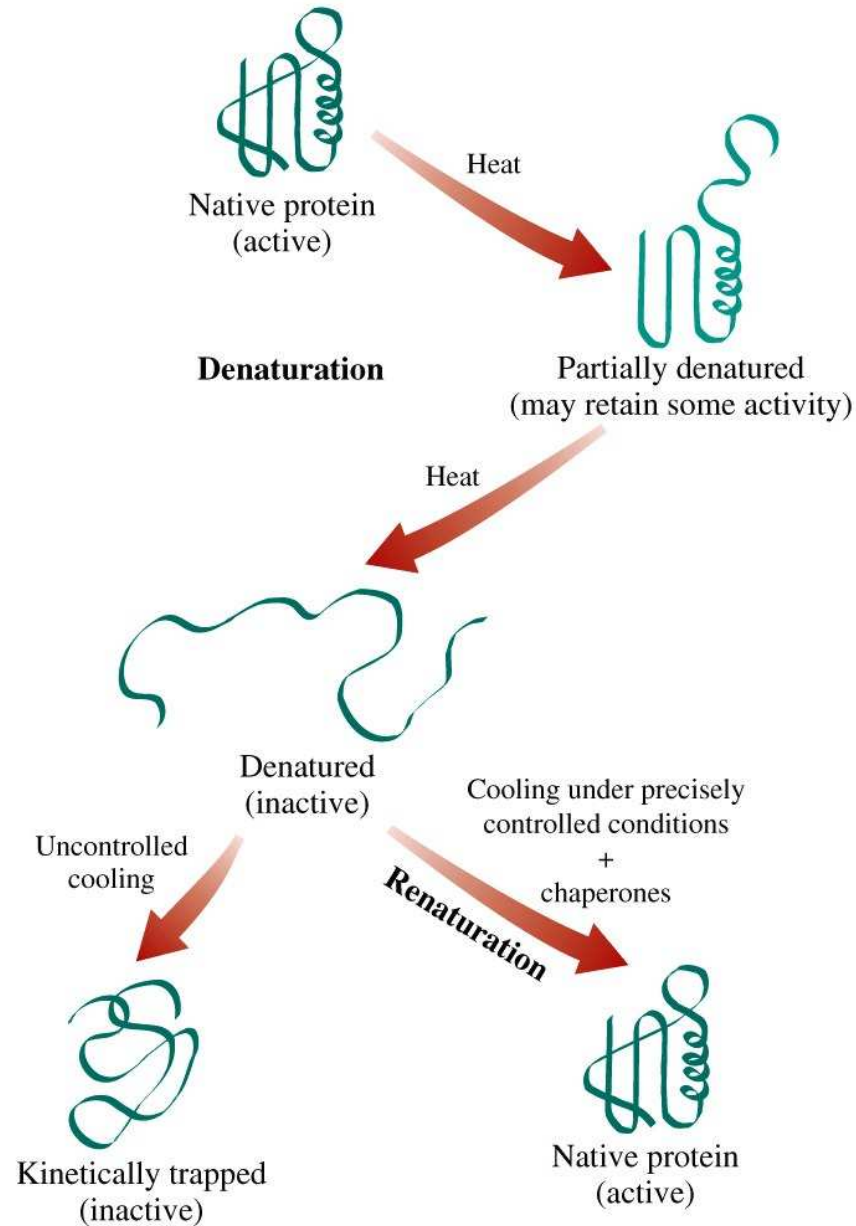
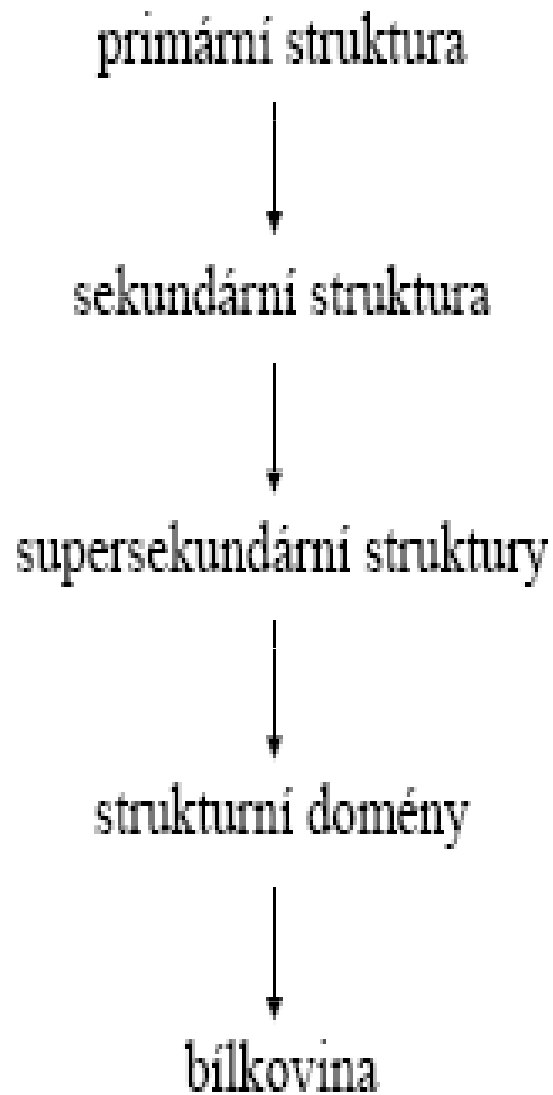


Figure 4-14 Concepts in Biochemistry, 3/e  
© 2006 John Wiley & Sons



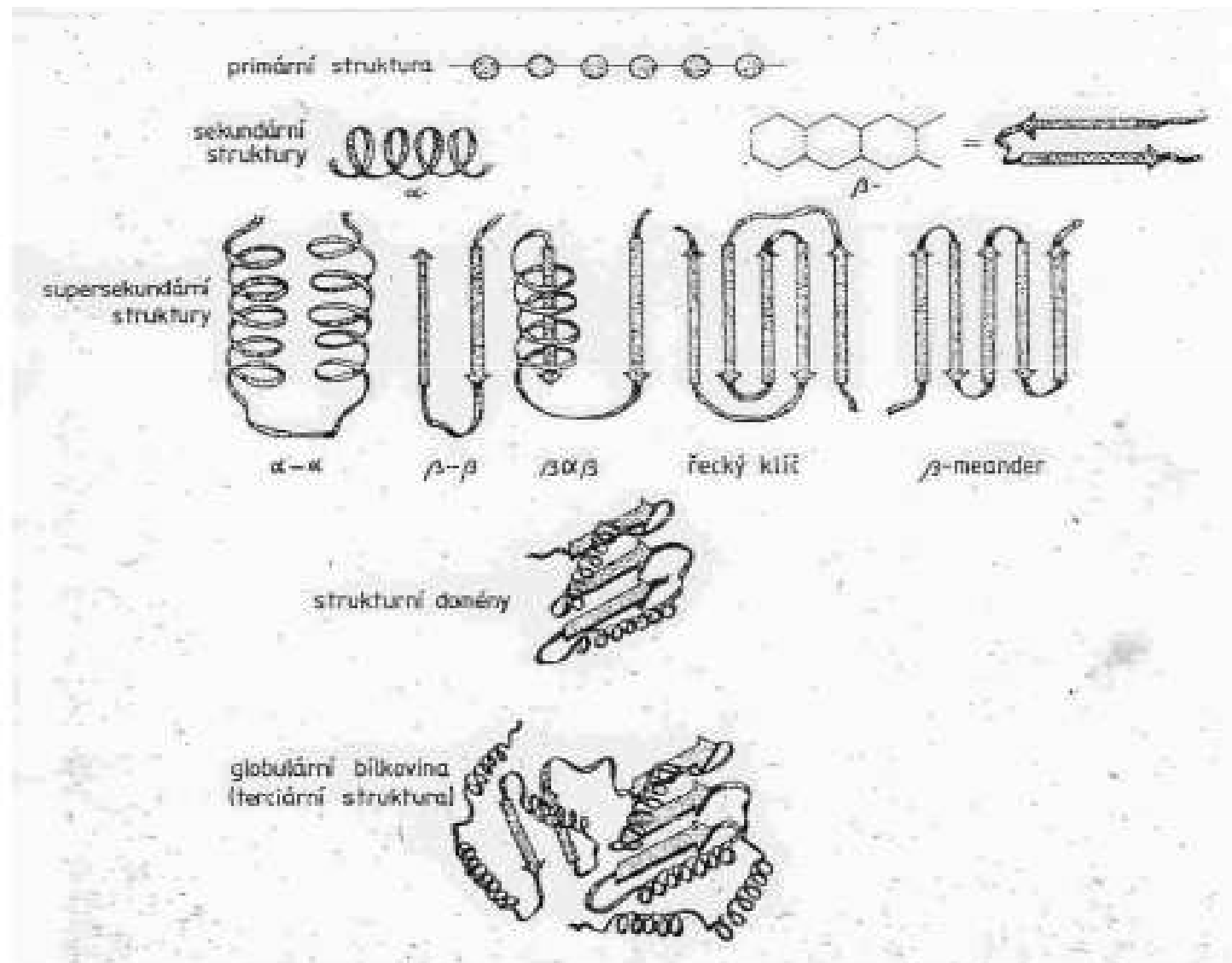
## Vznik prostorové struktury - skládání, svinutí - „FOLDING“



# 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

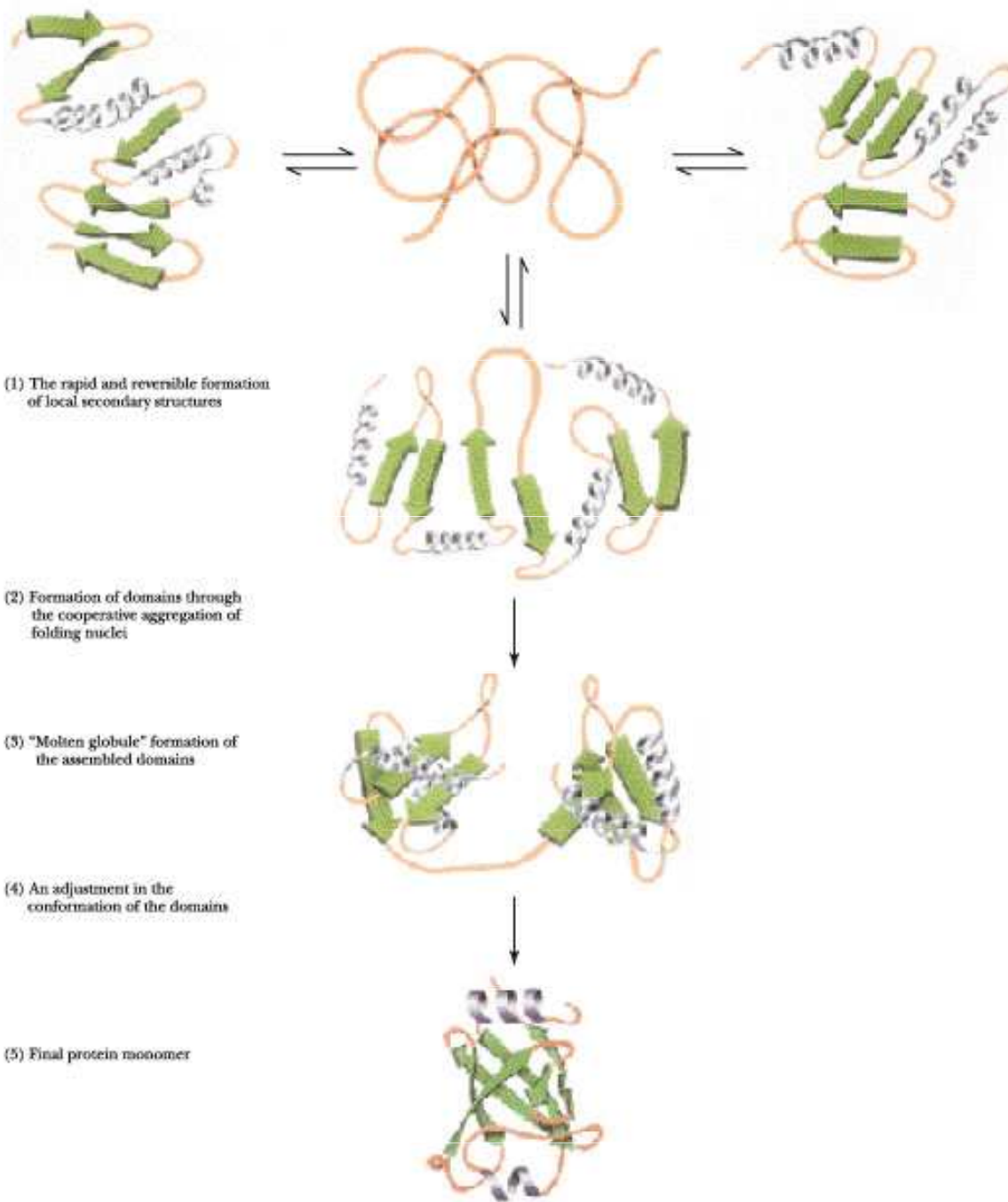
- We assume that there are three conformations for each amino acid(ex.  $\alpha$ -helix,  $\beta$ -sheet and random coil). If a protein is made up of 100 amino acid residues, a total number of conformations is :

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

- 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.



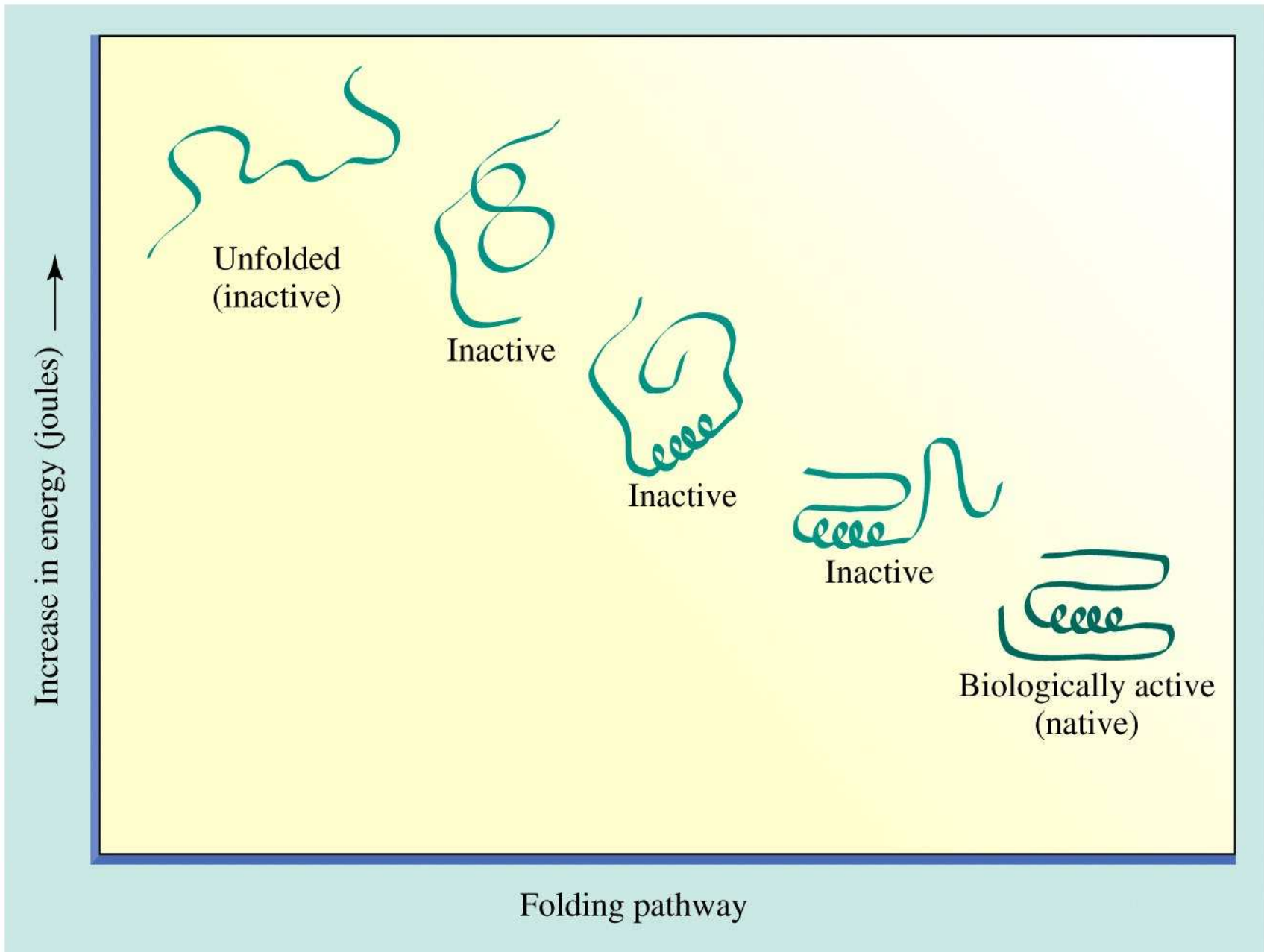
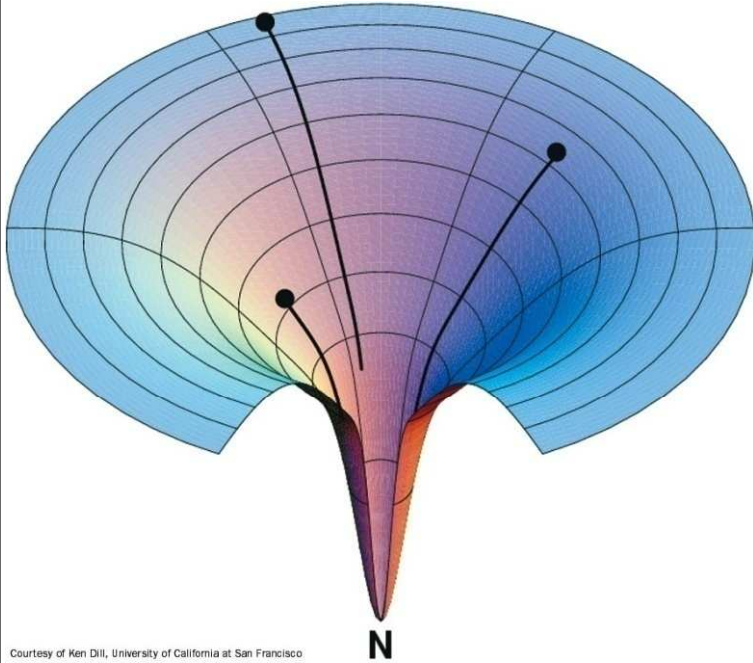
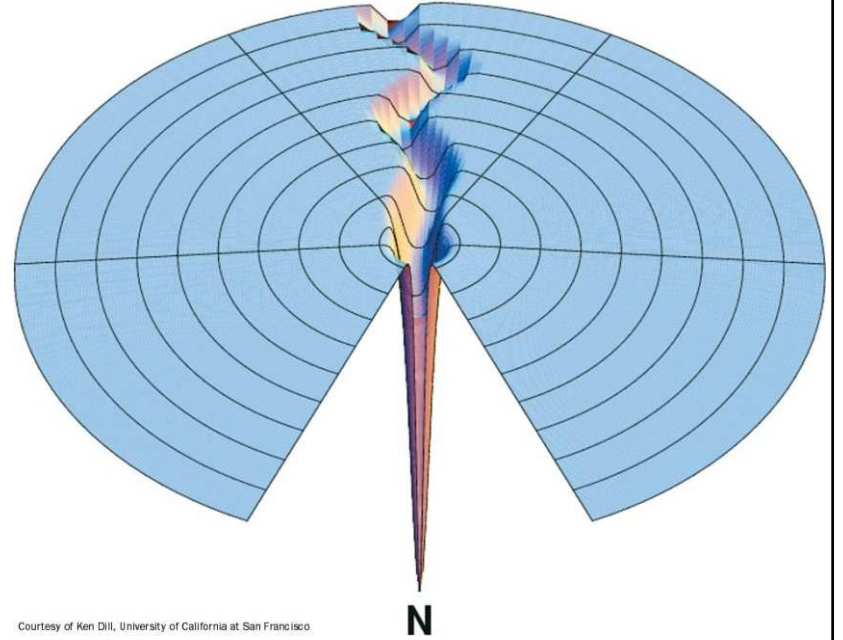


Figure 4-13 Concepts in Biochemistry, 3/e  
© 2006 John Wiley & Sons

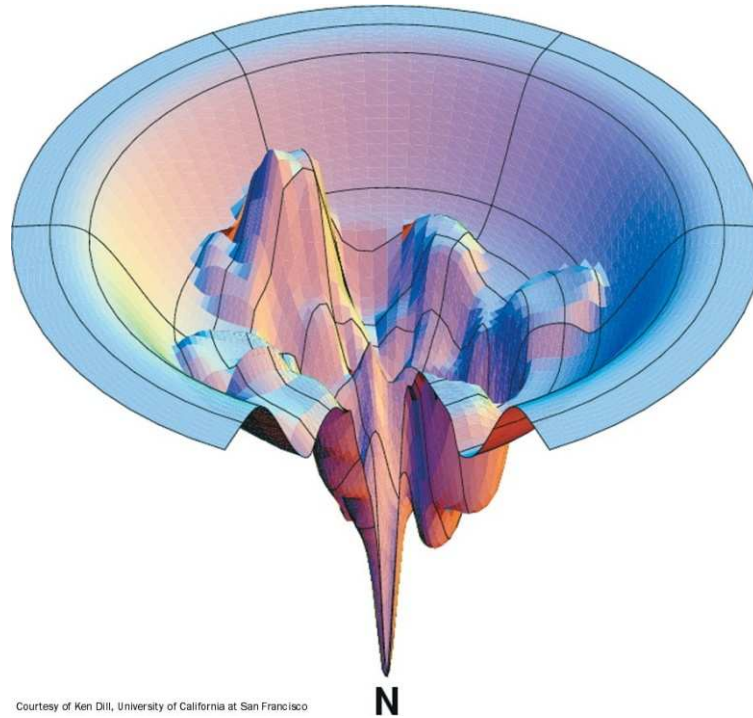
# Landscape theory



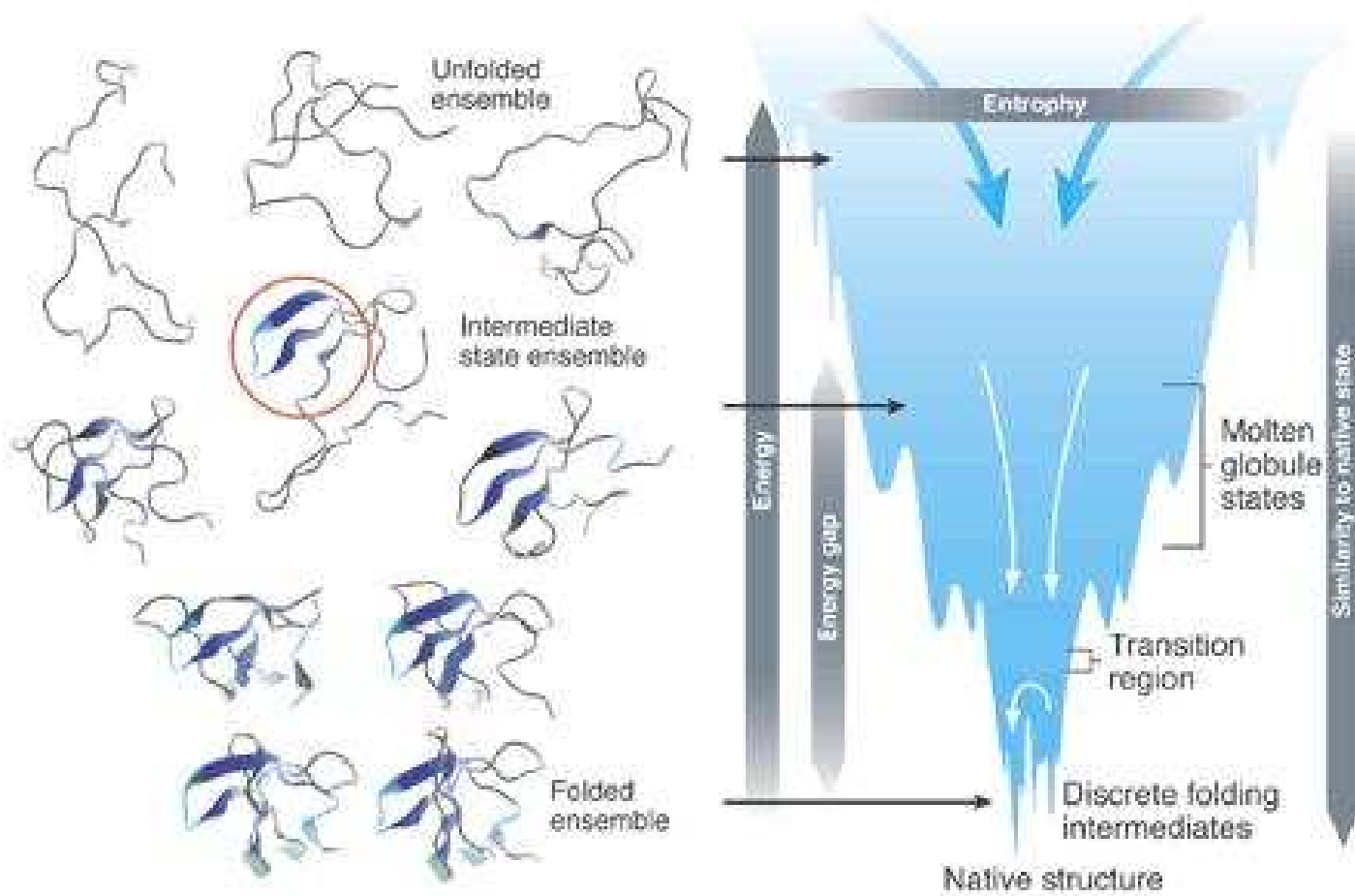
Courtesy of Ken Dill, University of California at San Francisco



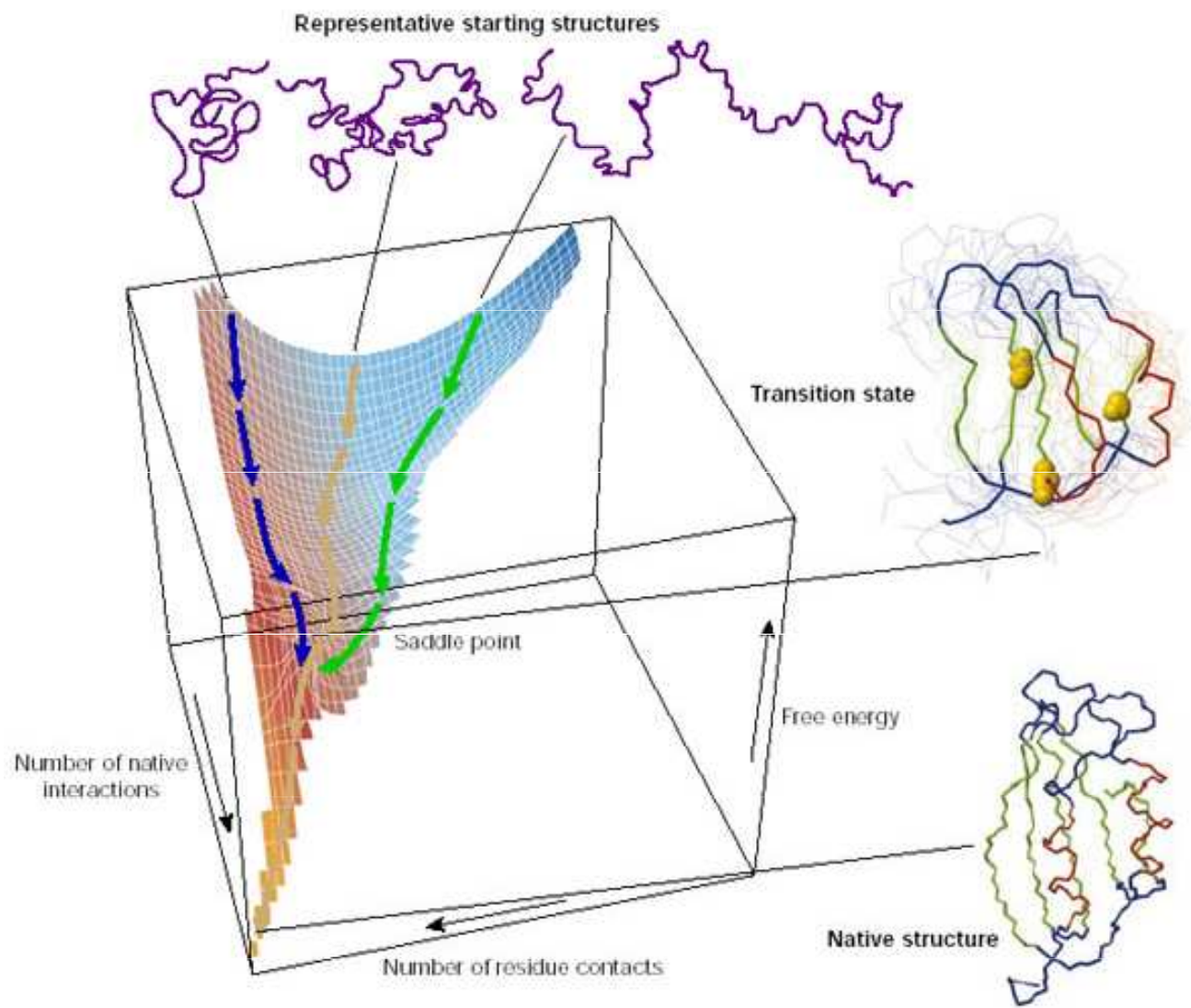
Courtesy of Ken Dill, University of California at San Francisco



Courtesy of Ken Dill, University of California at San Francisco



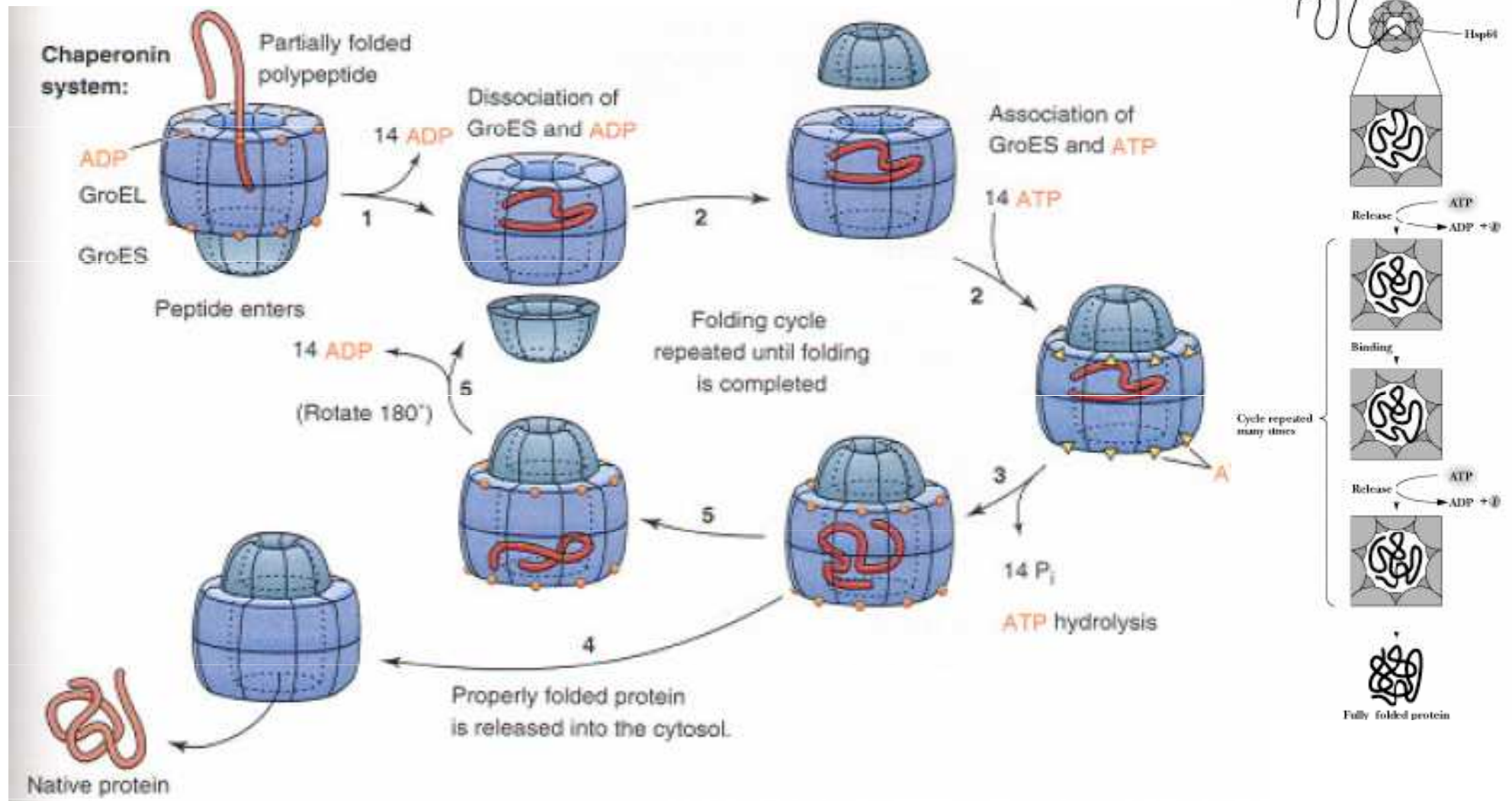




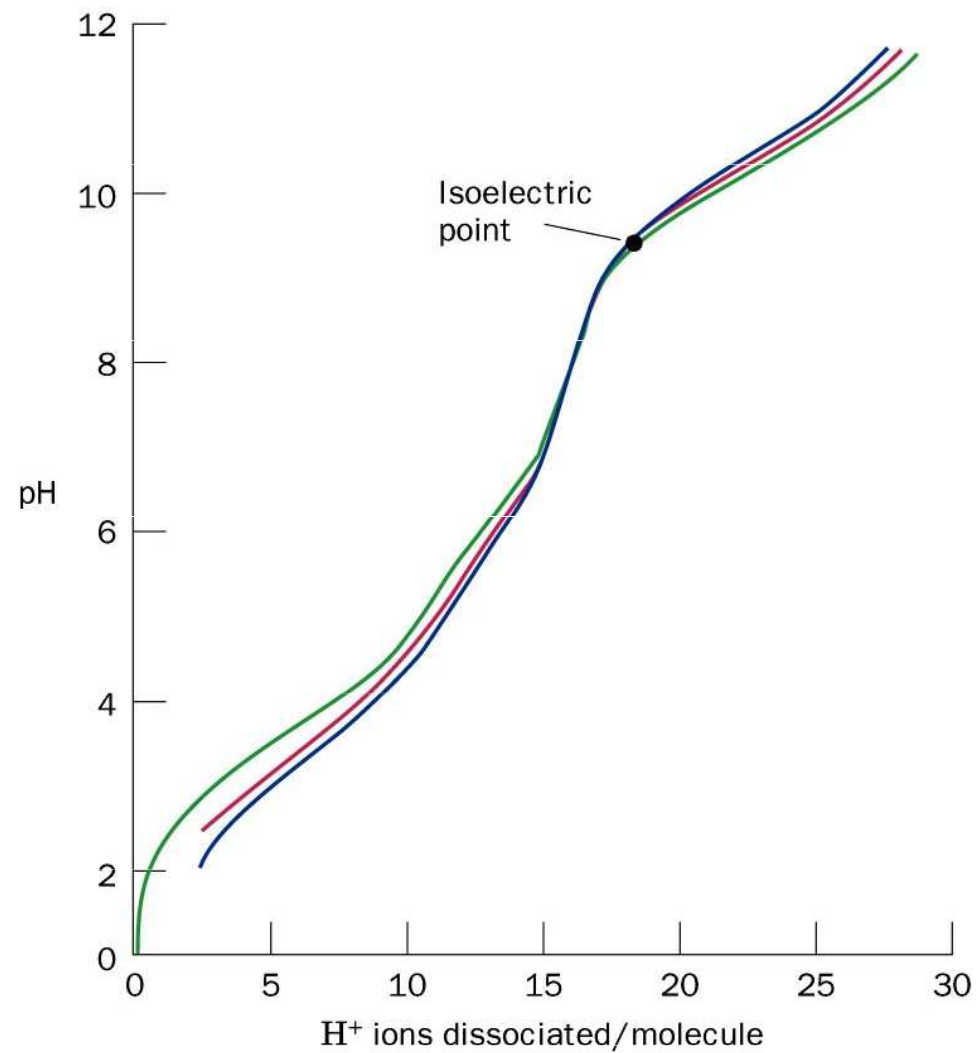
# Chaperony

- Proteiny jsou skládány do aktivní formy molekulárními chaperony a chaperoniny
- Chaperony *E. coli* Hsp70, rozpoznává nesložené hydrofobní části peptidového řetězce
- Váže se na tyto části a ochraňuje je dokud nedojde ke správnému složení
- GroES-GroEL komplex – hlavní chaperonin u *E. coli* - GroEL 2 kruhy, každý 7 x 60 kDa podjednotek (Hsp60)
- Nesložený protein se váže dovnitř komplexu a jeho skládání je řízeno energií

# 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

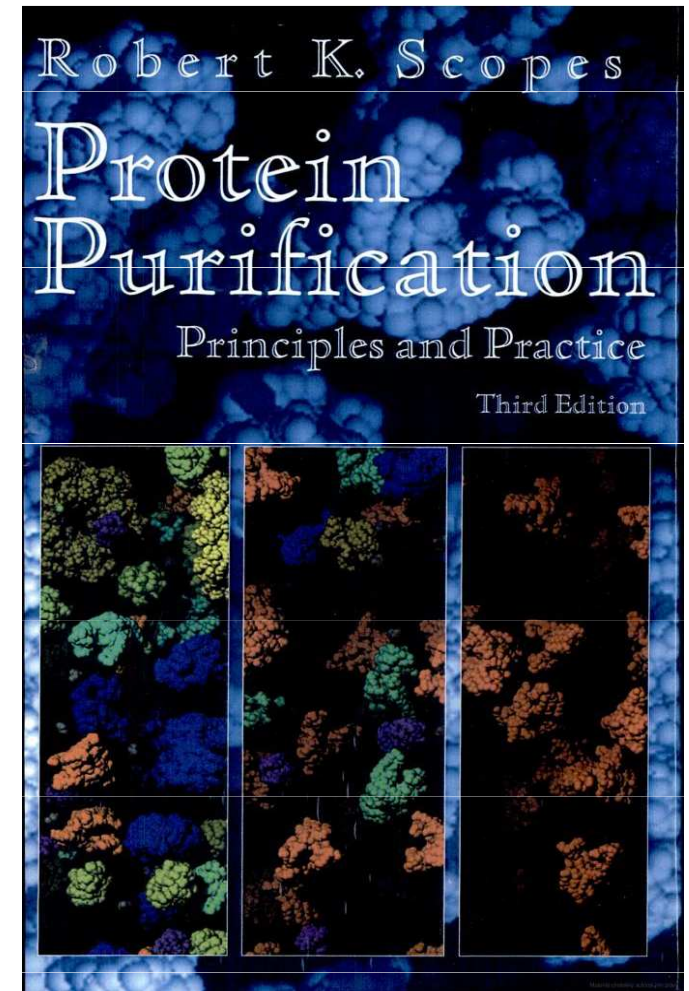
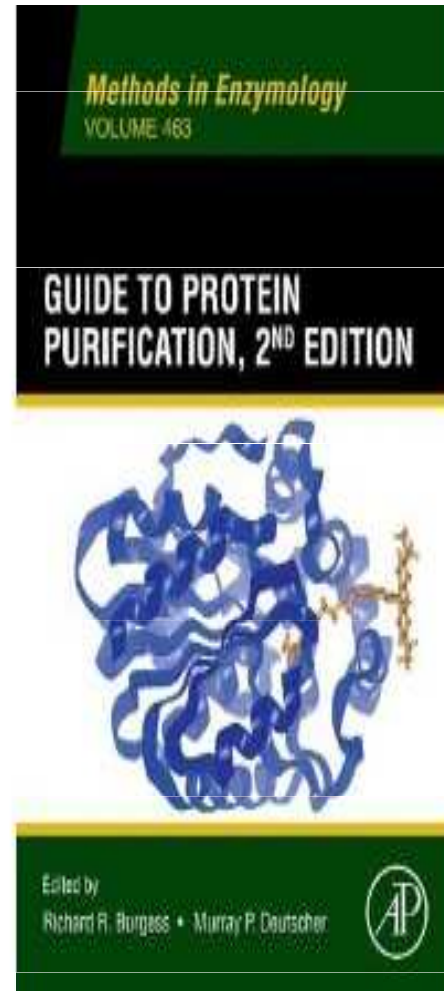
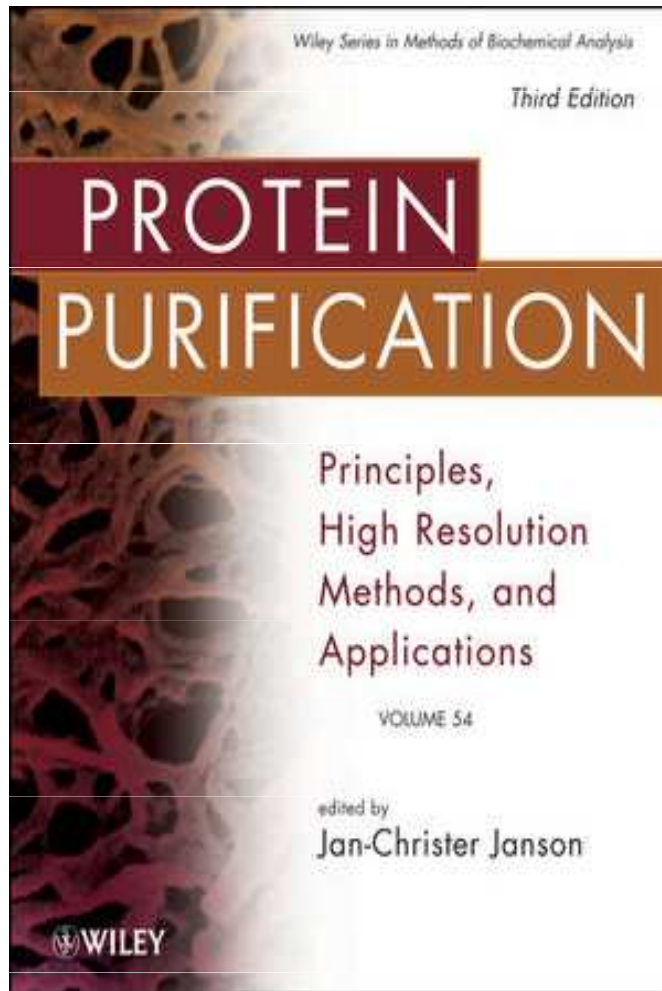
# Izolace proteinů

# Literatura

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



# Literatura



# 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

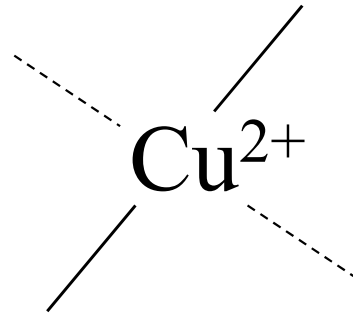
# VIS spektrofotometrie

Přídavek činidla → barevný derivát

- Destruktivní metoda
- Nutná kalibrační závislost

# Biuretová metoda

Princip :  $\text{Cu}^{2+}$  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

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



# Stanovení biologické aktivity

Enzymatické, imunologické, toxické,  
hormonální receptorové atdf.

# Vlastní separace

# Obecné schéma

Získání vstupního materiálu



Rozrušení buněk



Separace

# 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



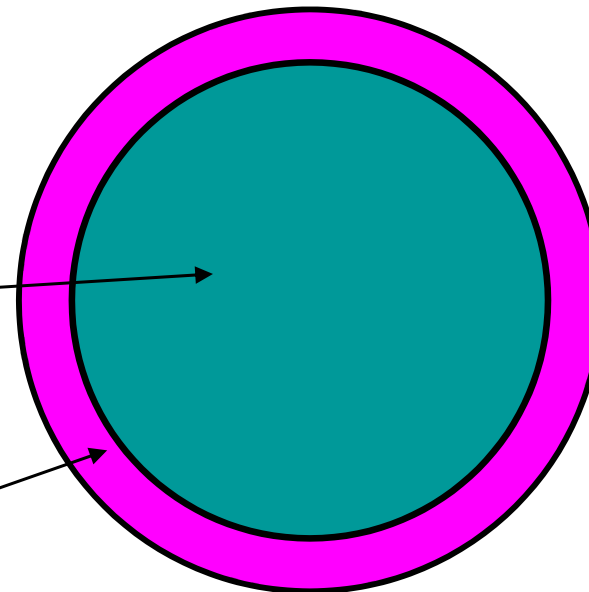
# Rozbití a extrakce

# Bakterie

- Záleží na lokalizaci
  - Extracelulární
  - Intracelulární
    - Cytoplasma
    - Periplazma

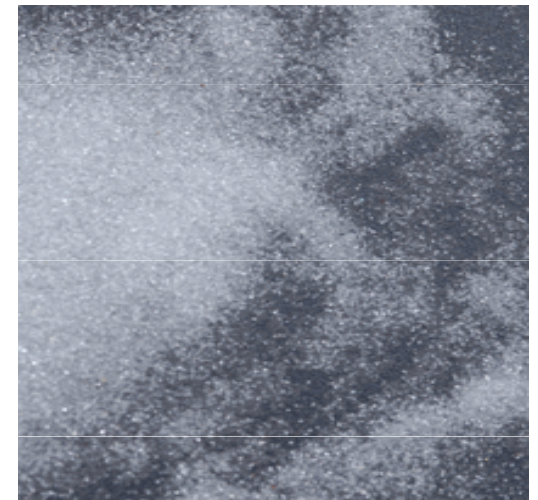
cytoplasma

periplasma



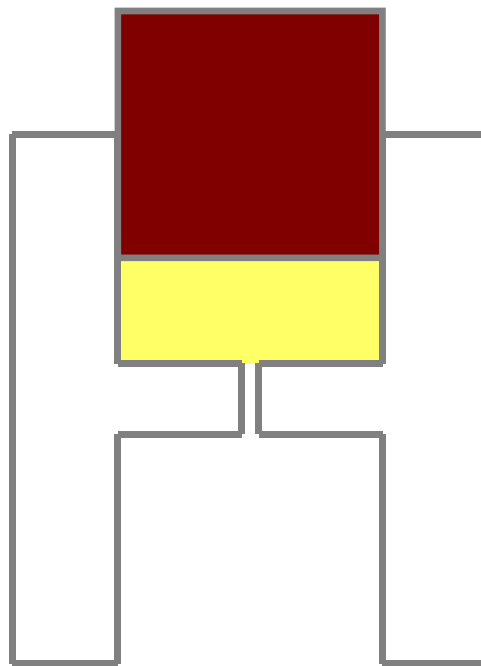
# Balotina

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



# French (X) press

Pressure Cells

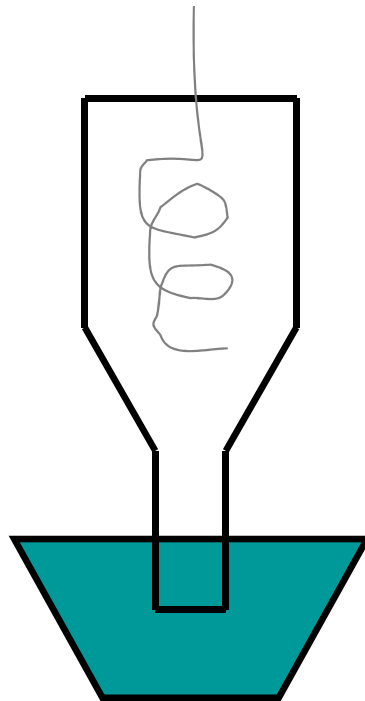


Mechanical Press



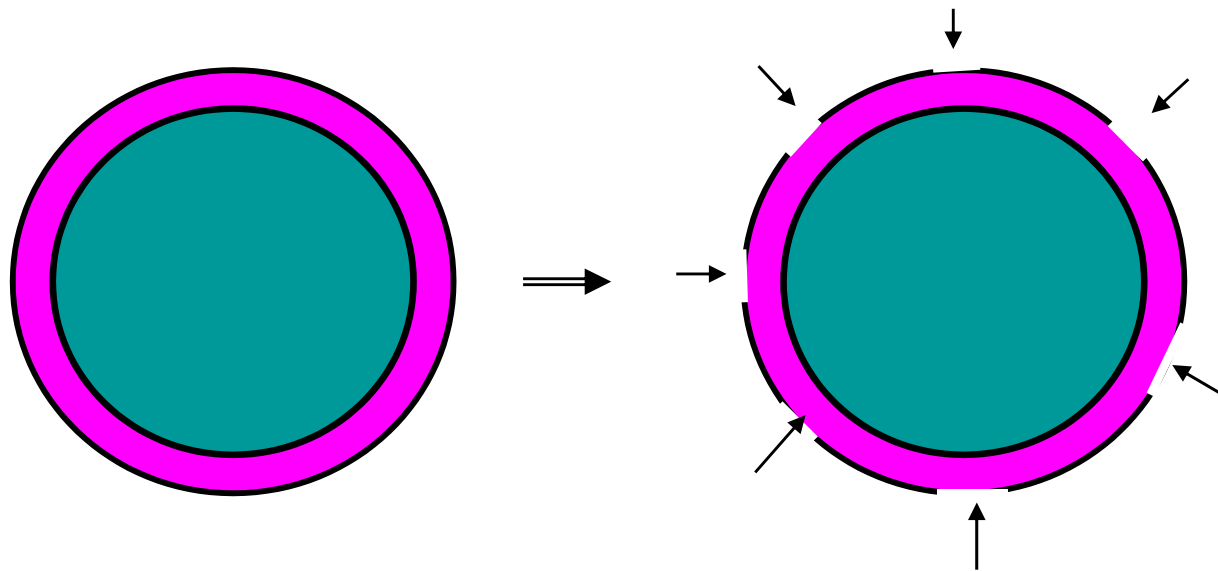
# Ultrazvuk

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  $H_2O$  – bakterie popraskají



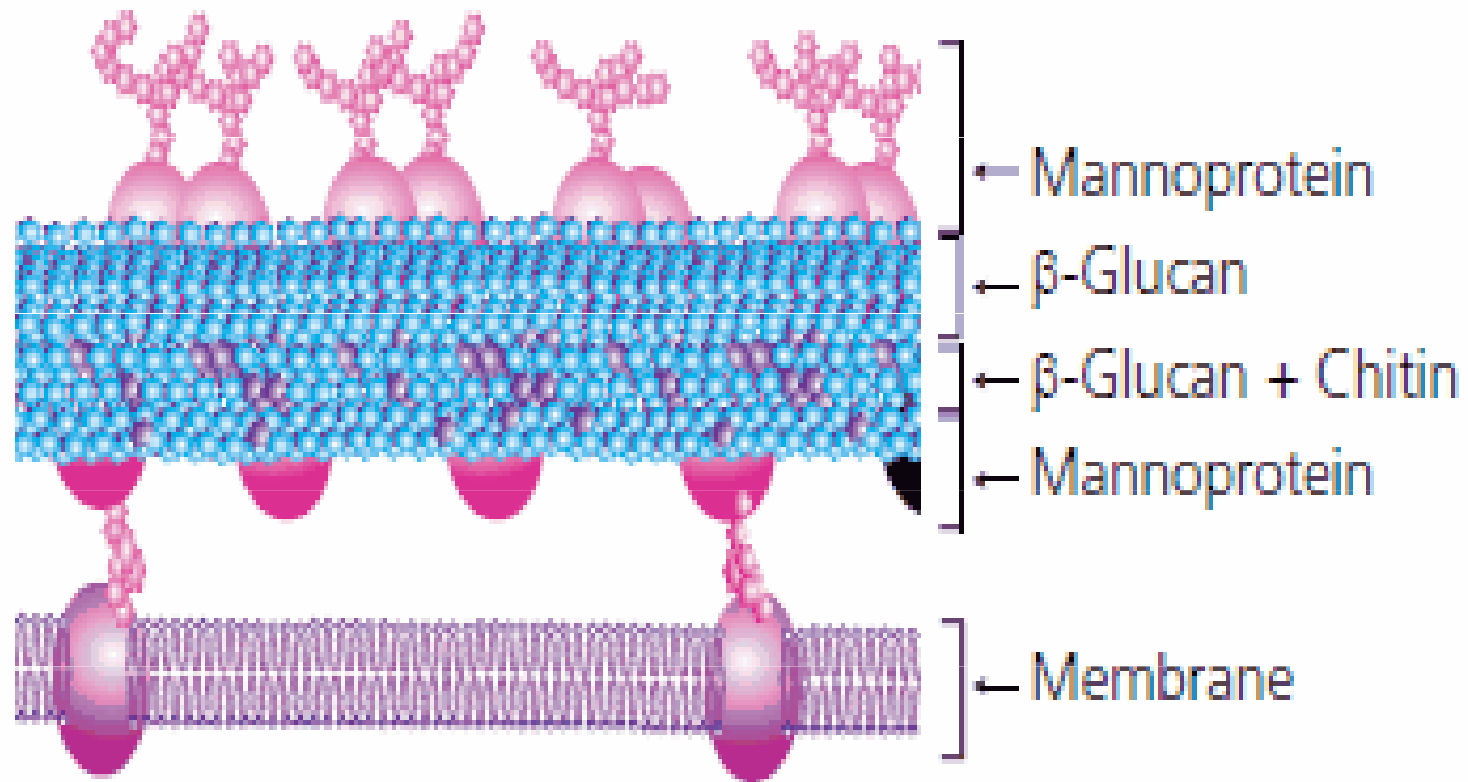
# Další

- Alumina  $\text{Al}_2\text{O}_3$  – roztírání v třecí misce
- Opakované zmrazování a rozmrazování



# Kvasinky

## Yeast Cell Wall



# Kvasinky

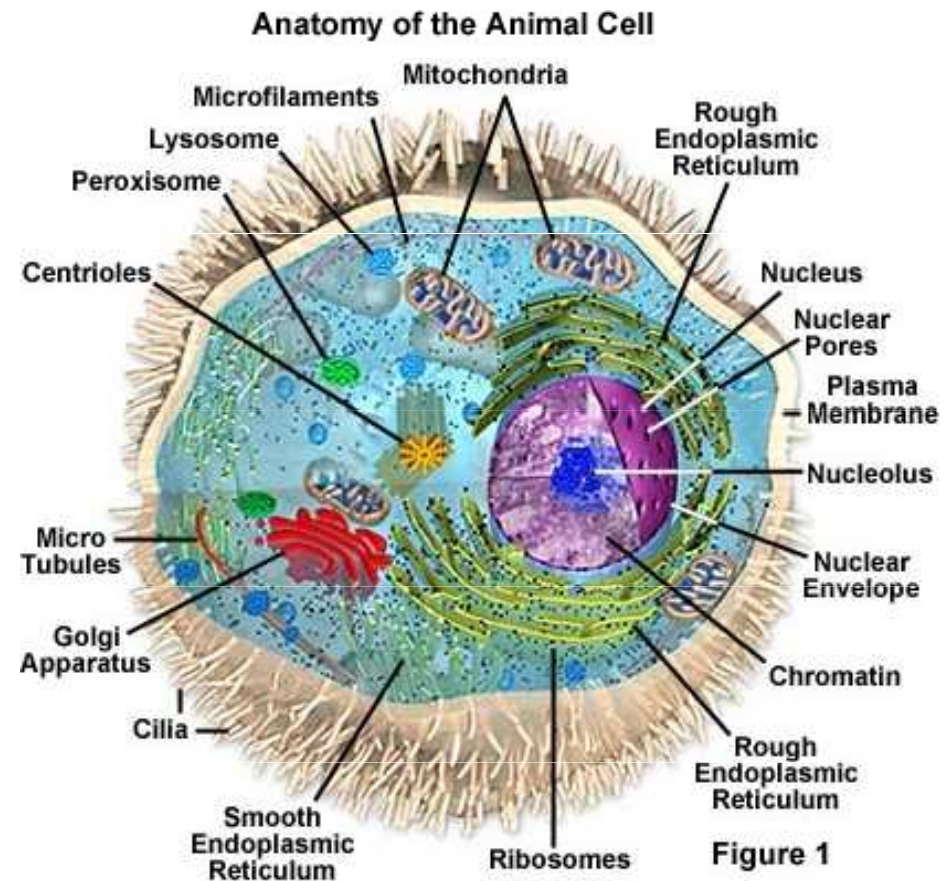
Toluenová autolýza

Princip – toluen extrahuje při 35 –40 °C  
fosfolipidy buněčné stěny →  
osmotický šok → enzymová autolýza

Balotina, French press,

# Živočišné tkáně

- Bez buněčné stěny
- Velmi křehké
- Tkáňové kultury

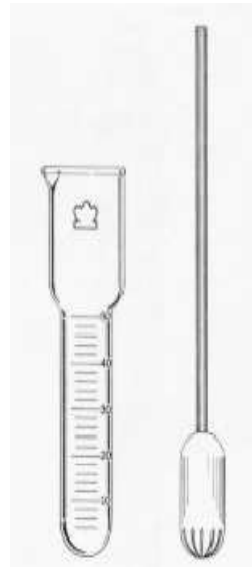


# Živočišné tkáně

- Třecí miska s pískem



- Ruční homogenizatory – Potter –  
Elvehjemův

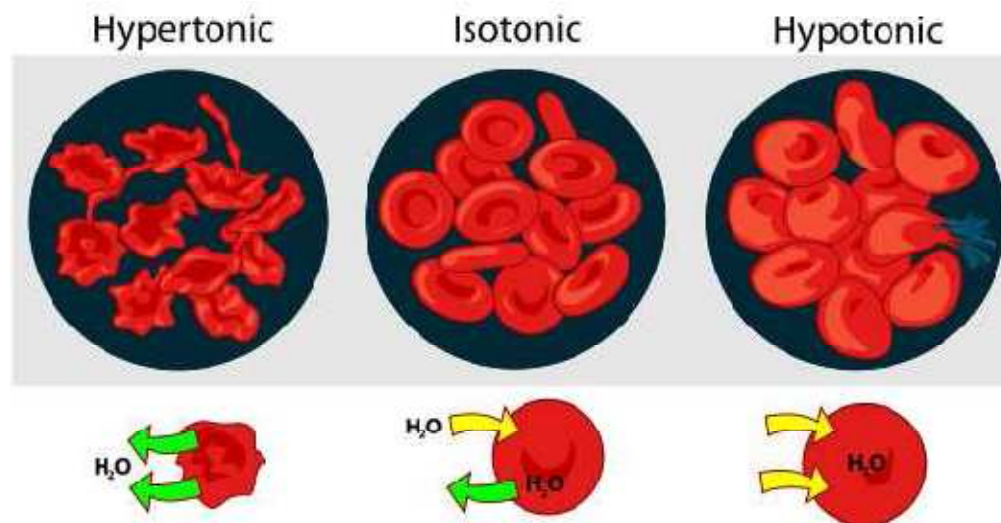


# Živočišné tkáně

- Mixery

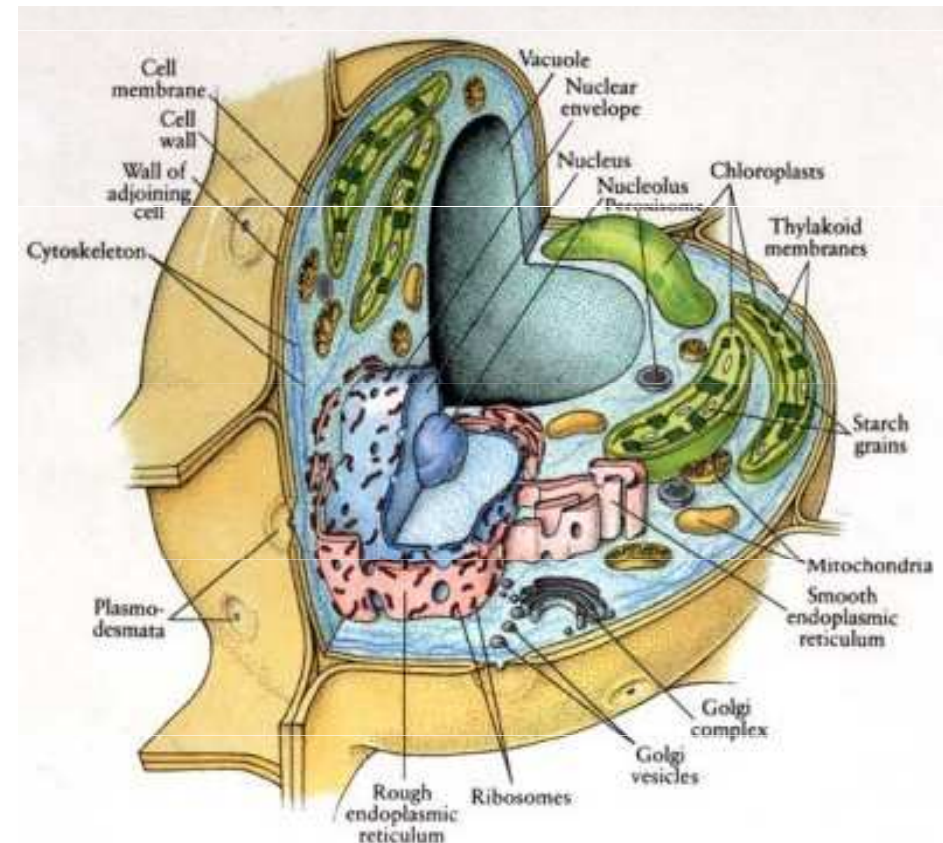


- Osmotická lyse - erythrocyty



# Rostlinné tkáně

- Silná buněčná stěna - celuloza
- Tkáňové kultury křehké



# Rostlinné tkáně

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

# Optimalizace extrakce

- Teplota – 4 - 6 °C chlazení
- pH – optimální pro danou bílkovinu – práce v pufrech
- I – v prostředí o definované iontové síle
- Přídavky látek – EDTA,  $\beta$ -merkaptoethanol, kovové ionty, inhibitory proteas



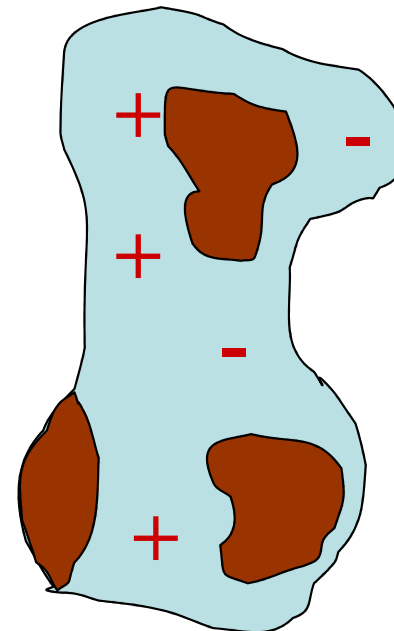
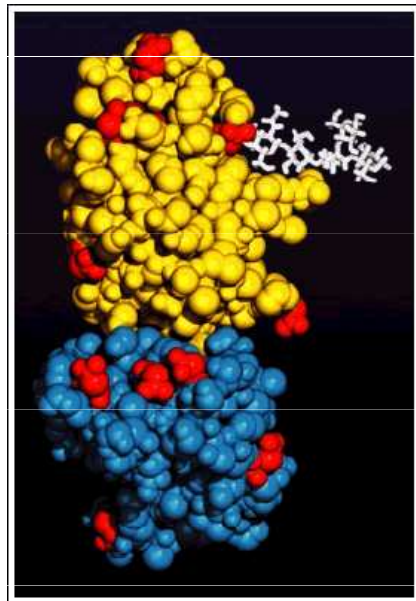
# Srážecí metody

# 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

# Rozpustnost bílkoviny

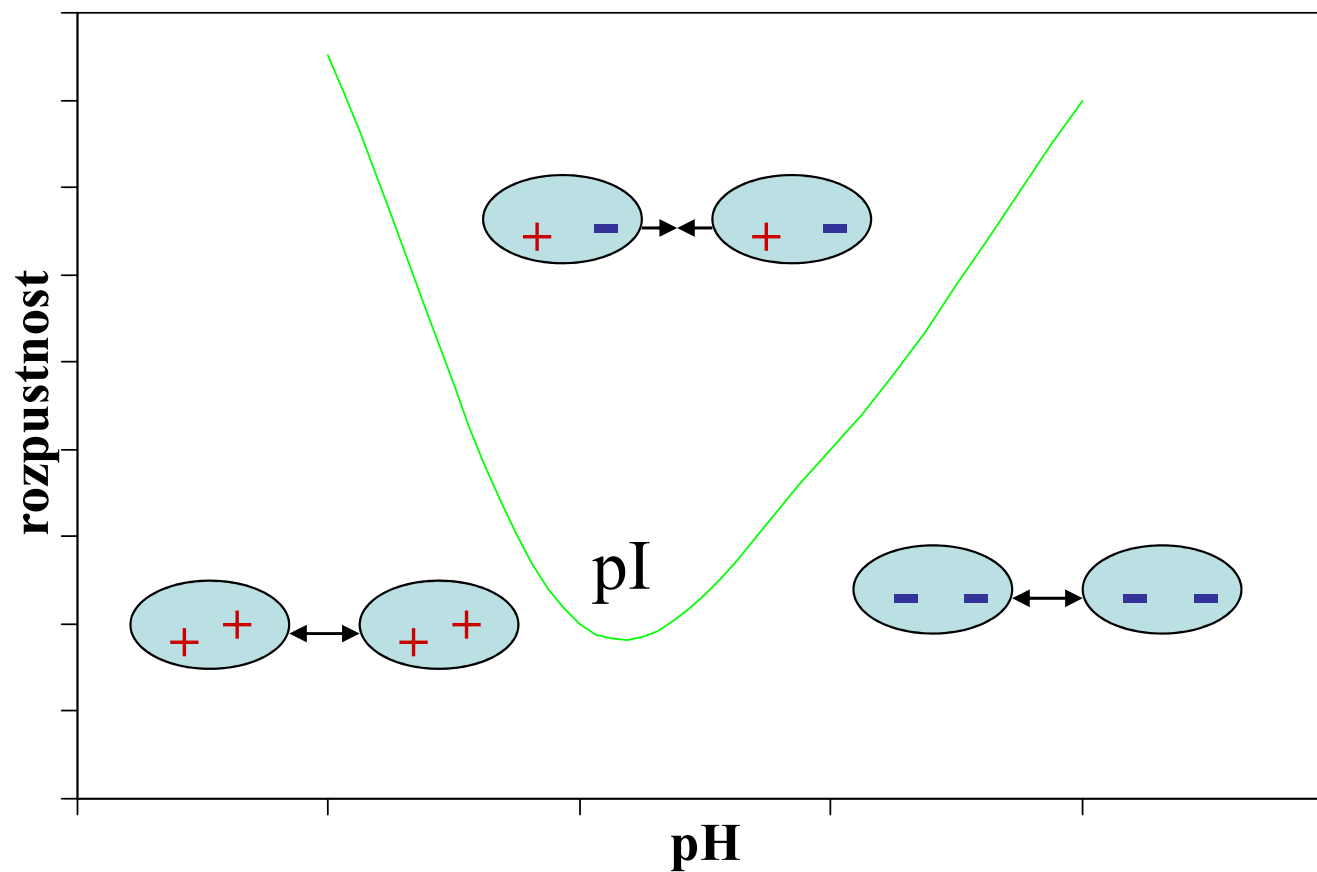
- Vlastnostmi bílkoviny – distribuce hydrofobních a hydrofilních skupin na povrchu bílkoviny



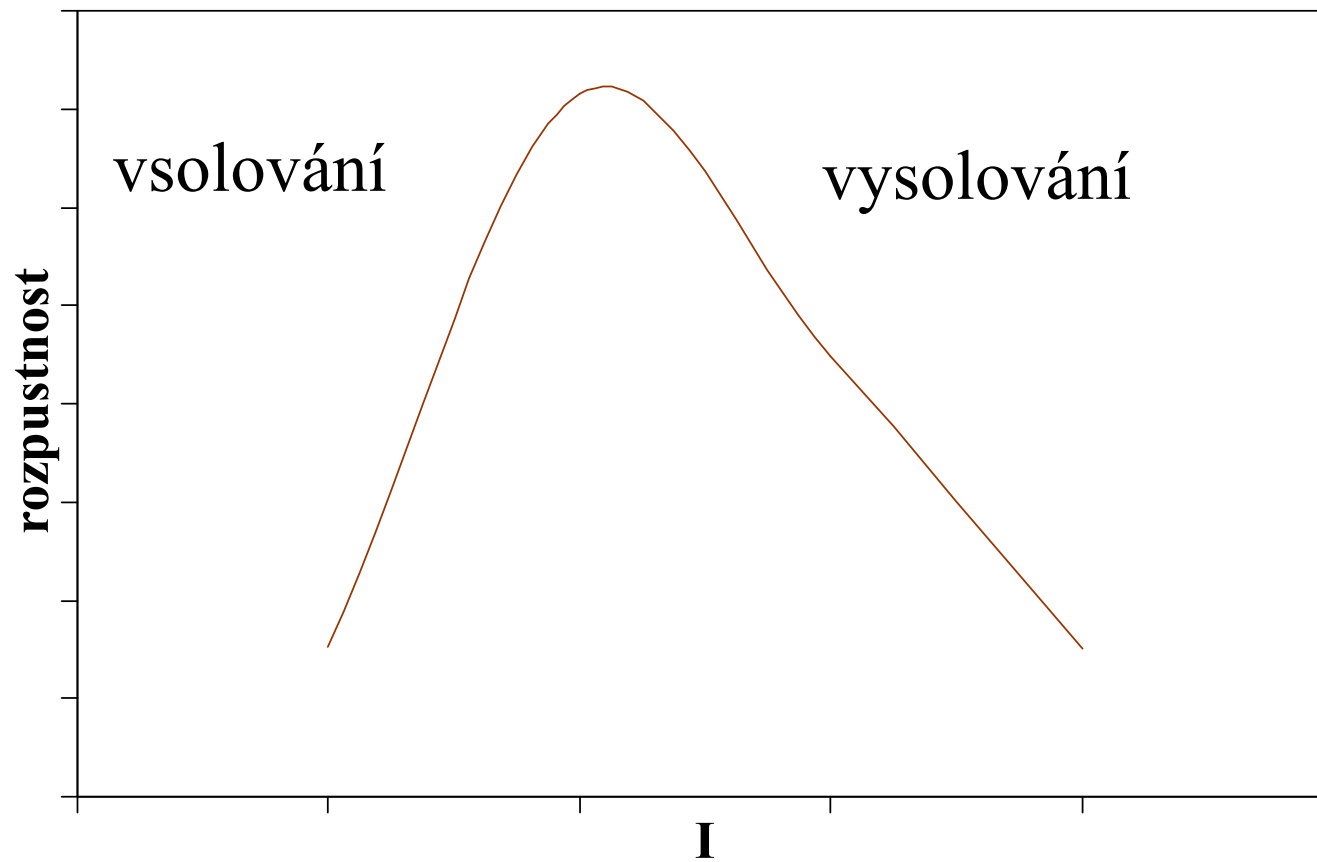
# Rozpustnost bílkoviny

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

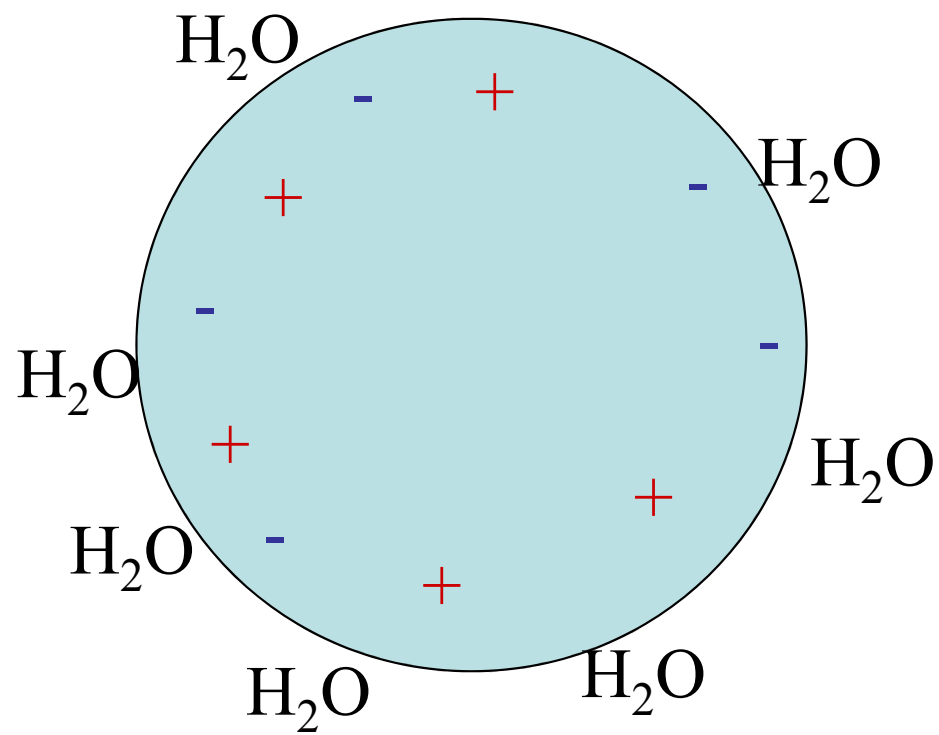
# Izoelektrická precipitace



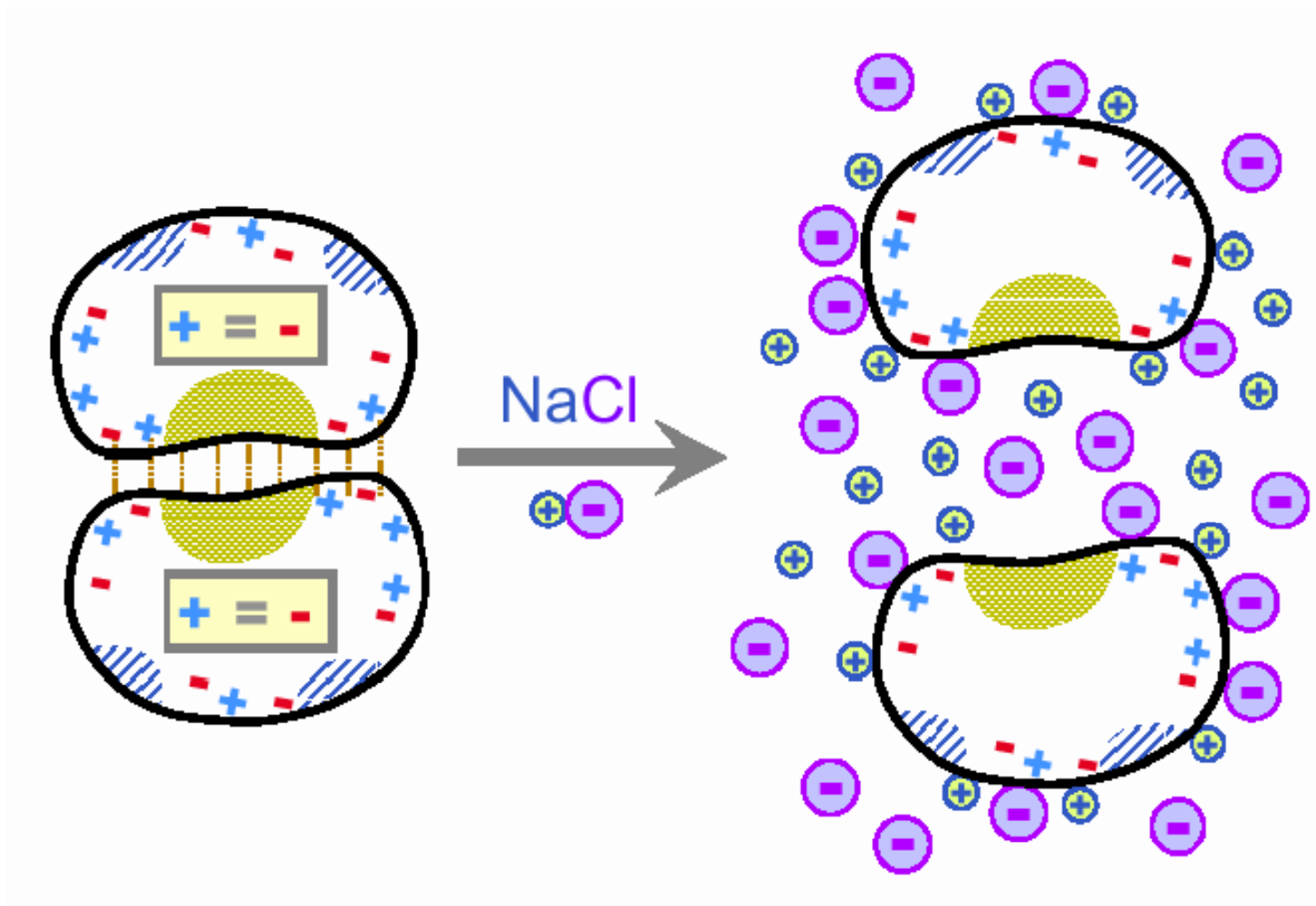
# Srážení neutrálními solemi



# Vsolování

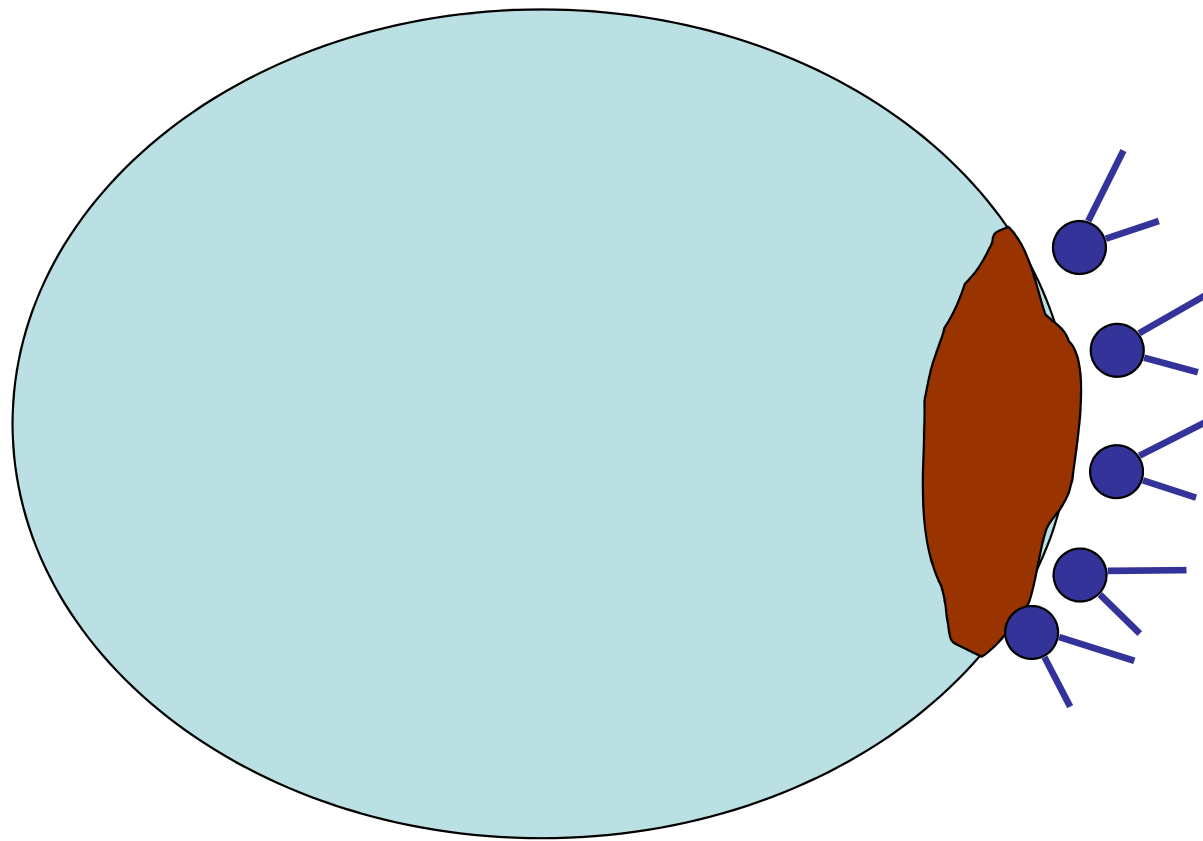


# Vsolování

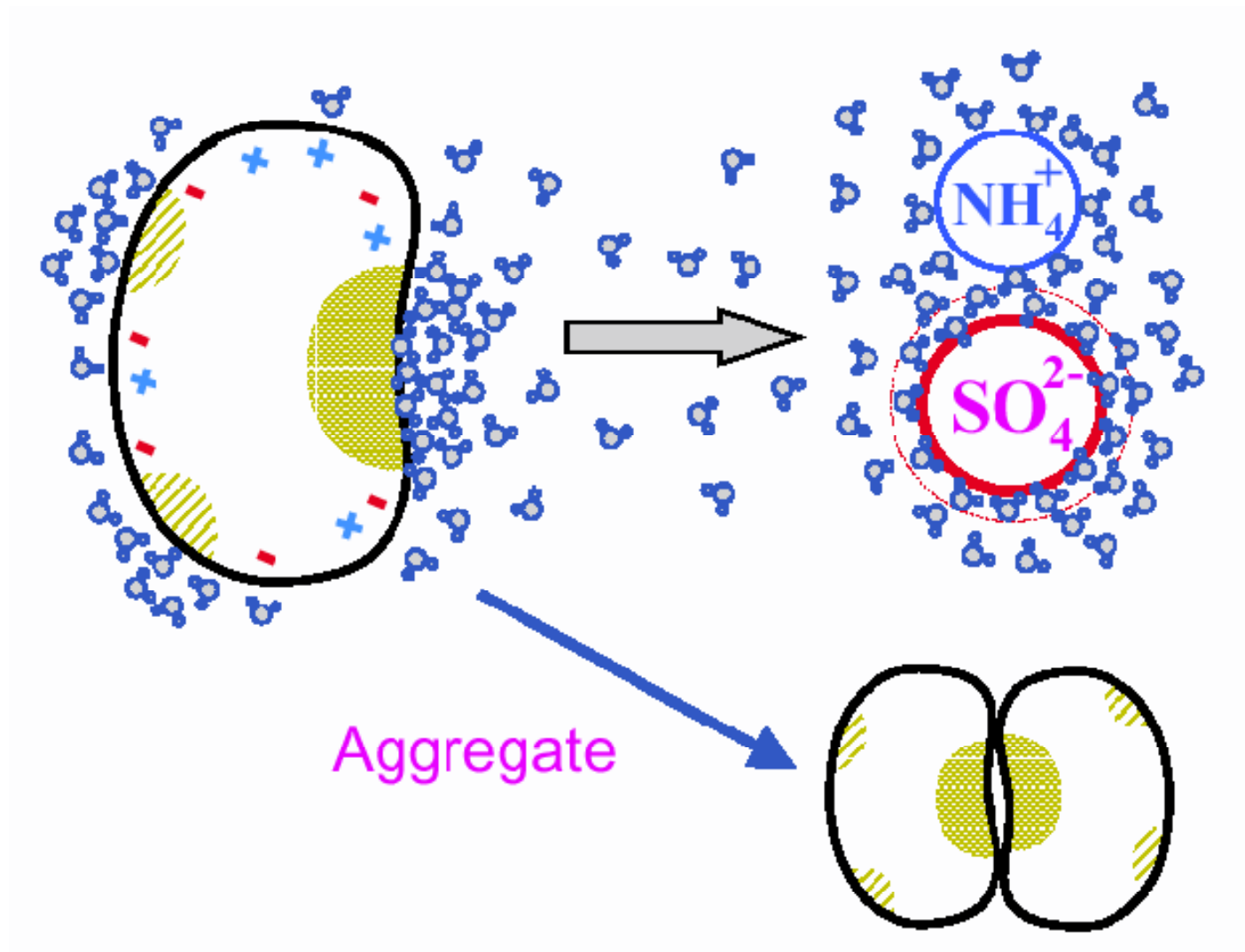


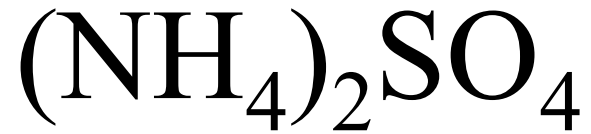


# Vysolování



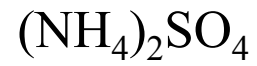
# Vysolování



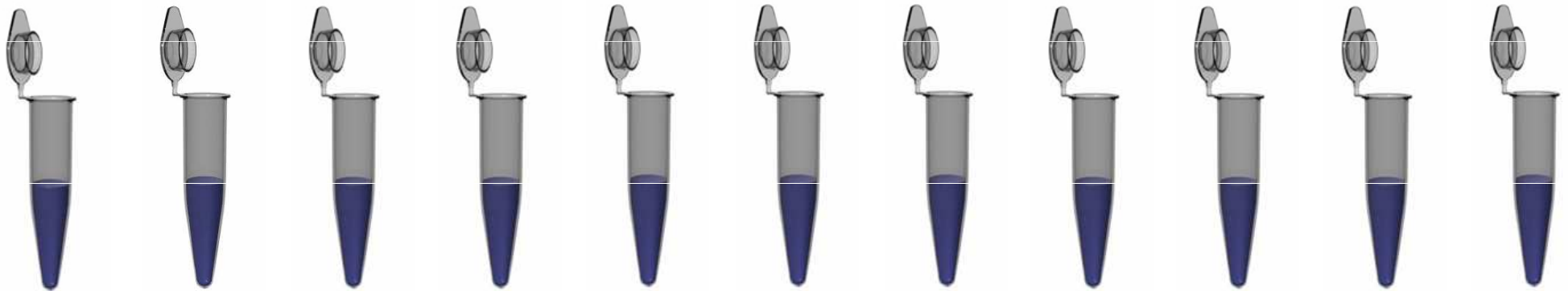


- Rozpustnost se málo mění s teplotou
- Saturevaný roztok 4 M - hustota 1,235g/cm<sup>3</sup>  
umožňuje centrifugaci agregovaných bílkovin  
(hustota 1,29 g/cm<sup>3</sup>)
- Levný
- Stabilizuje bílkoviny
- Relativně čistý

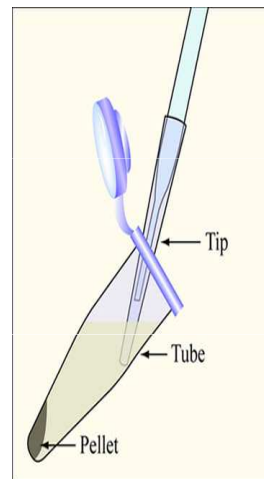
# Srážecí křivka



0 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 %

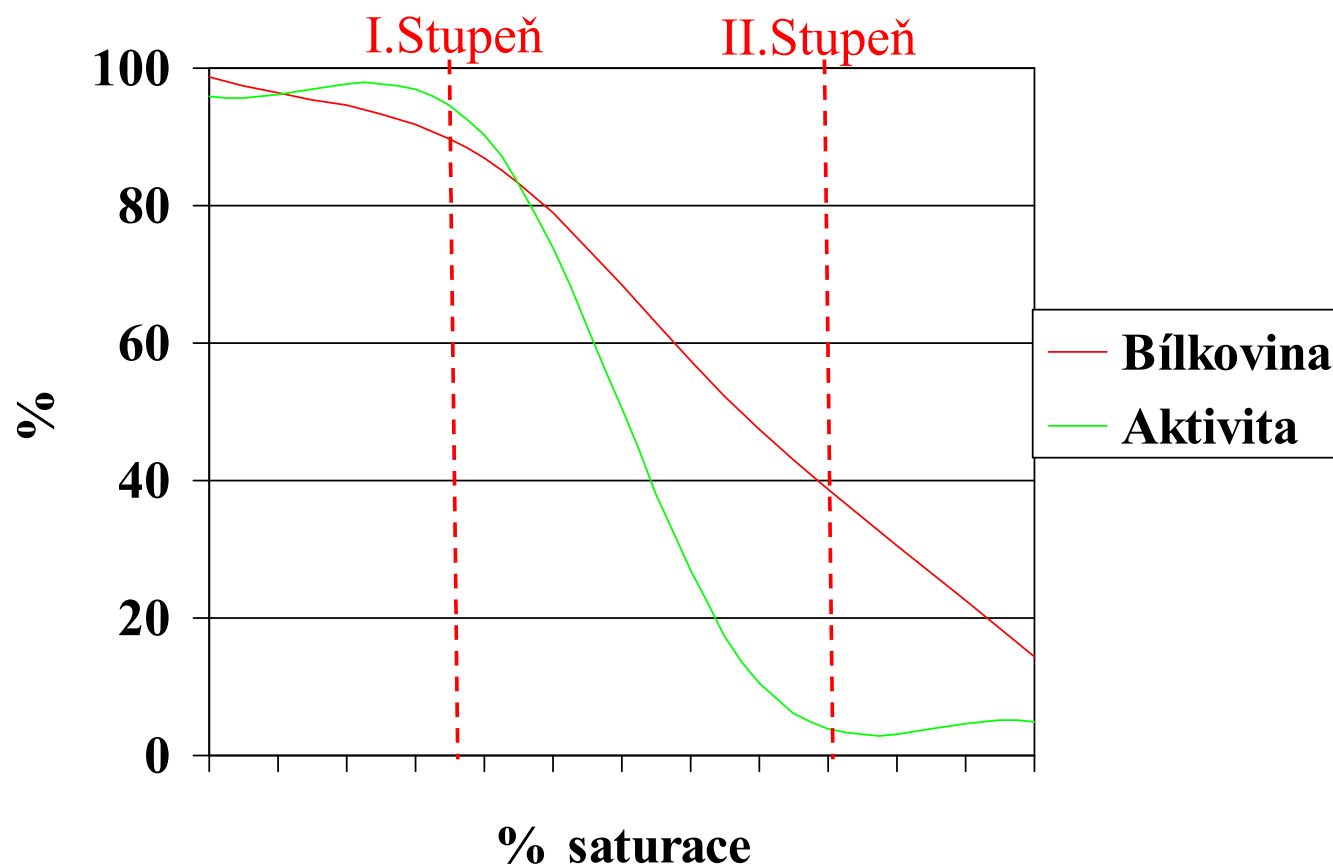


Koncentrace bílkoviny ←



→ Aktivita bílkoviny

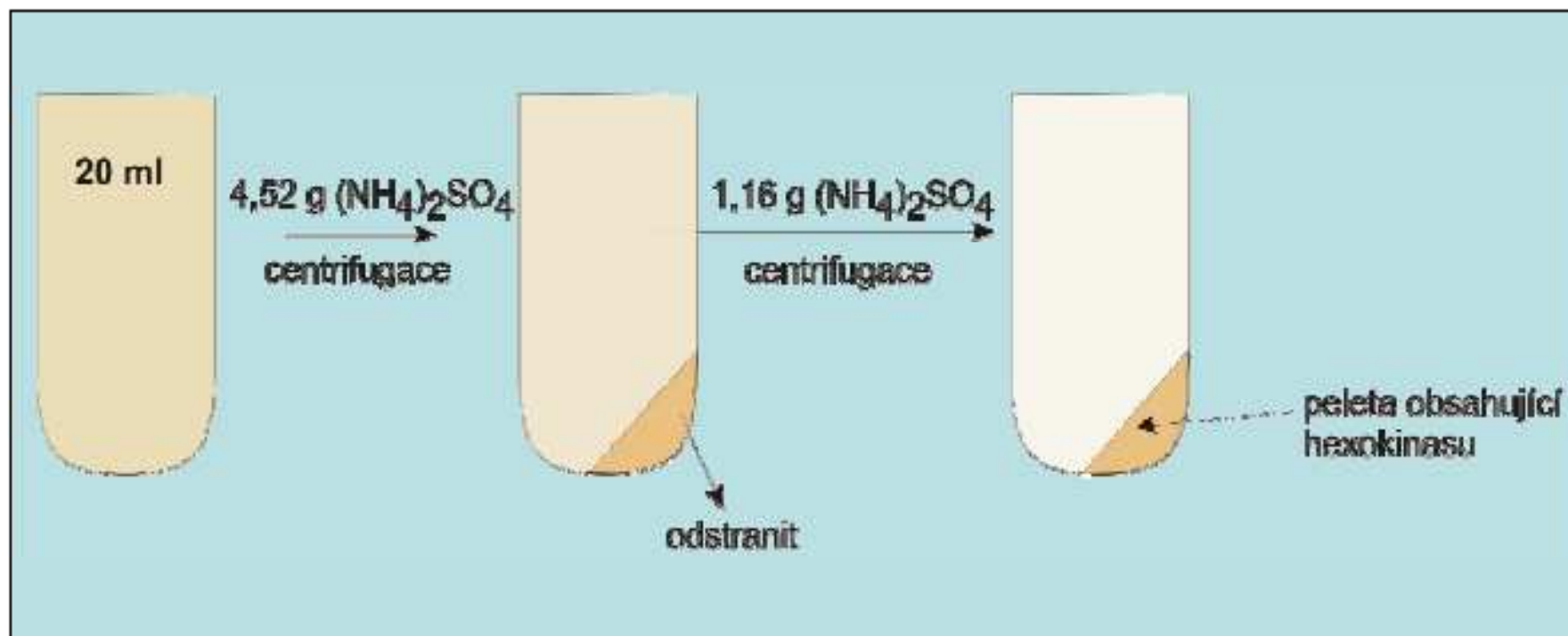
# Srážení - dvojstupňově



# Srážení - dvojstupňově

I. Stupeň

II. Stupeň





# Přidané množství

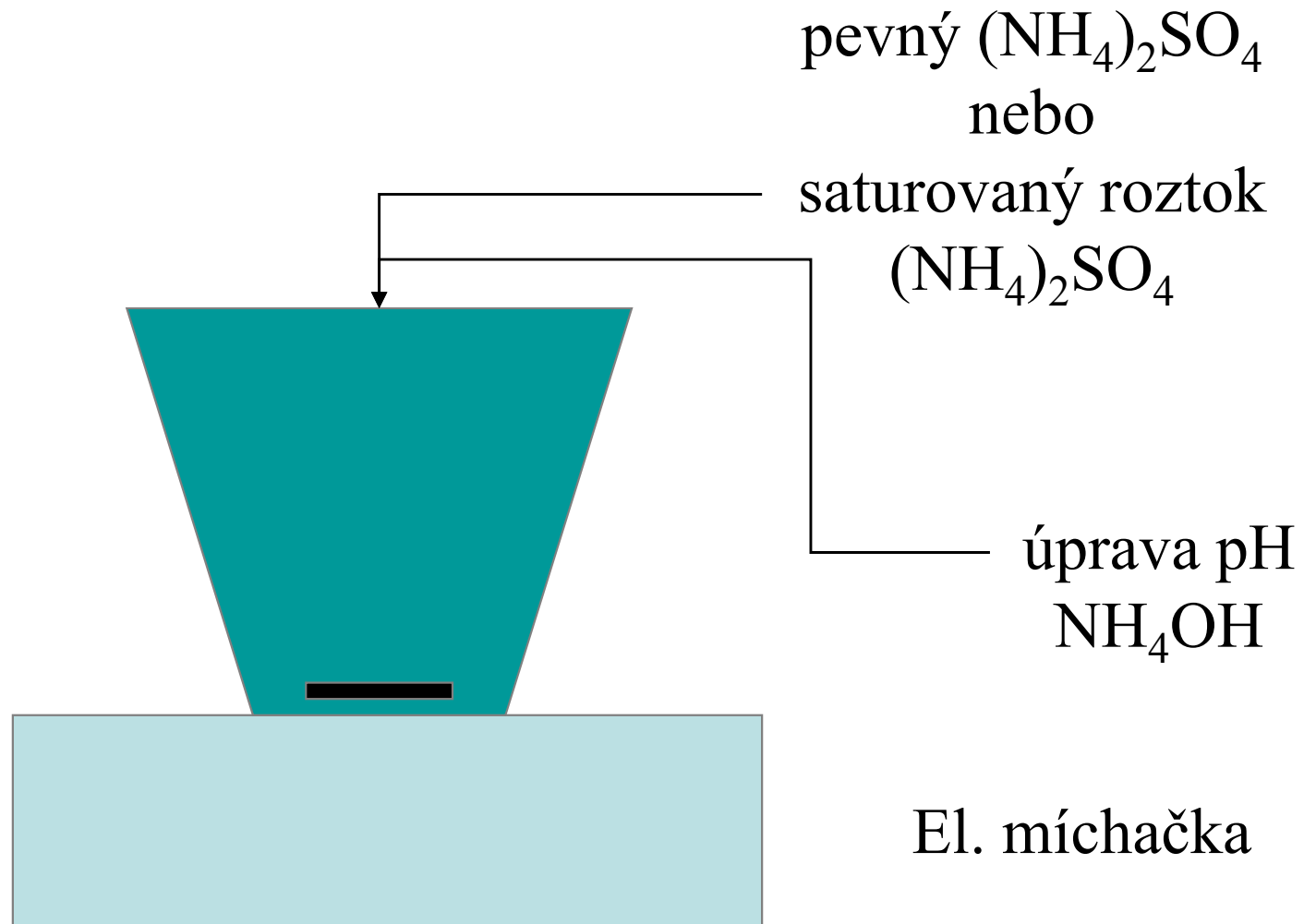
- Tabulky
- Vzorce

$$g/l = \frac{533 \cdot (S_2 - S_1)}{100 - 0.3 \cdot S_2}$$



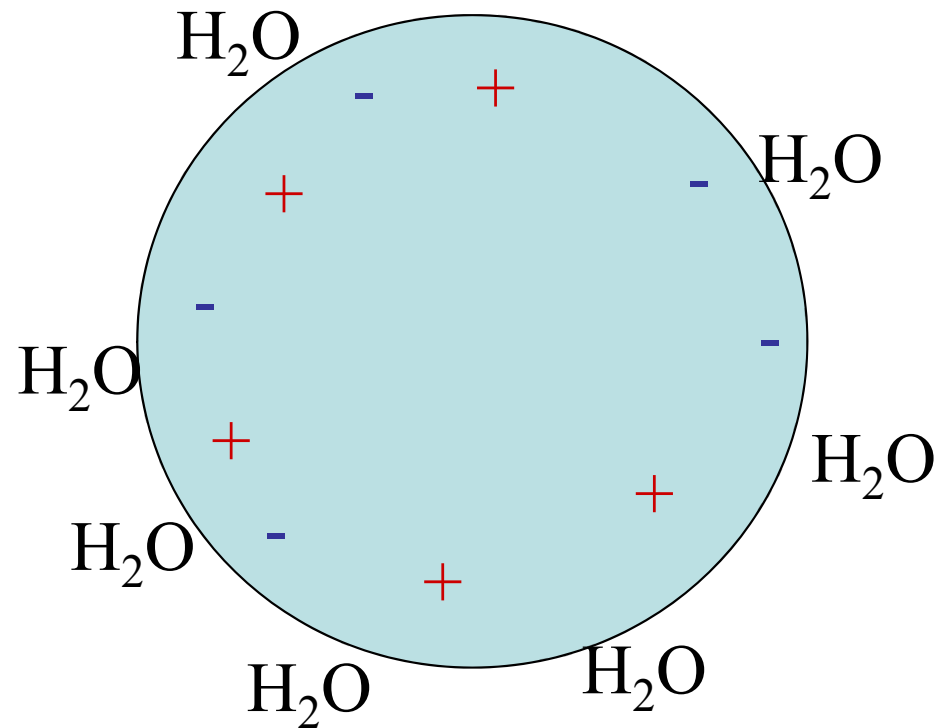
# Provedení

Chlazení  
Míchání 10-30'  
Centrifugace



# Srážení org.rozpouštědly mísitelnými s vodou

- Rozpouštědla ruší solvatační obal bílkoviny



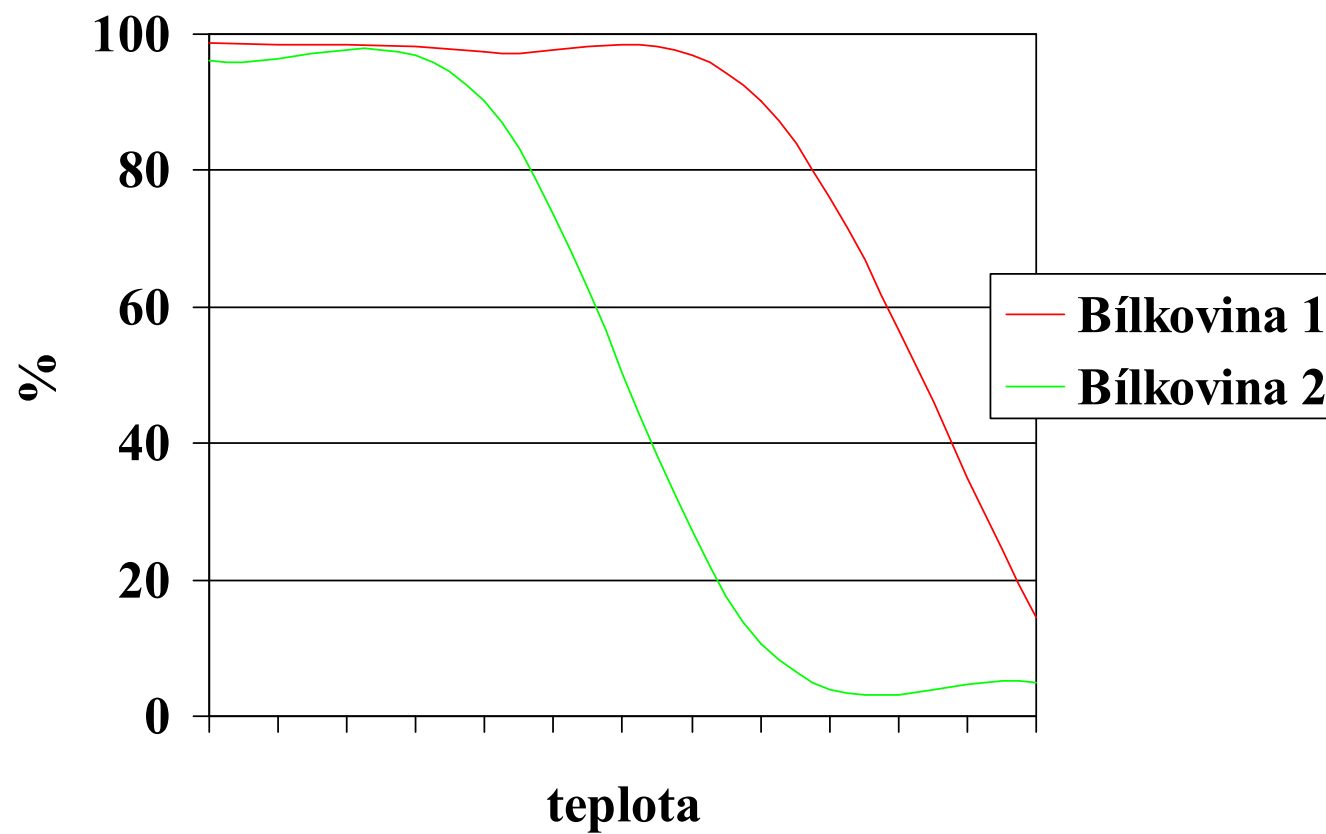
# Srážení org.rozpouštědly mísitelnými s vodou

- COHN – separace plazmatických bílkovin  
EtOH
- Nutno provádět při  $T < 0\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 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

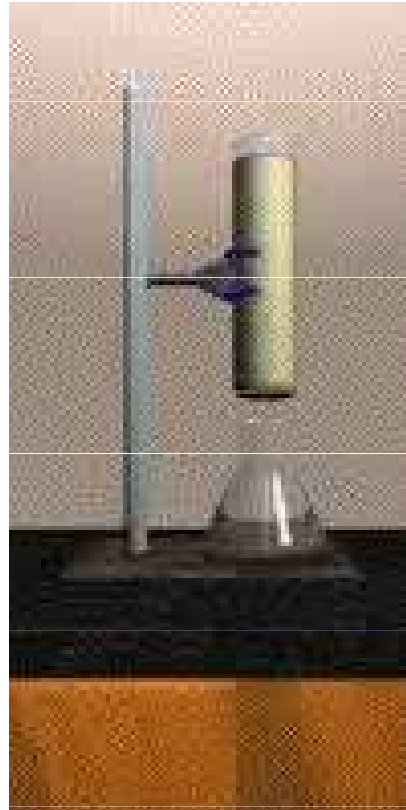
# Tepelná denaturace



# Chromatografické metody

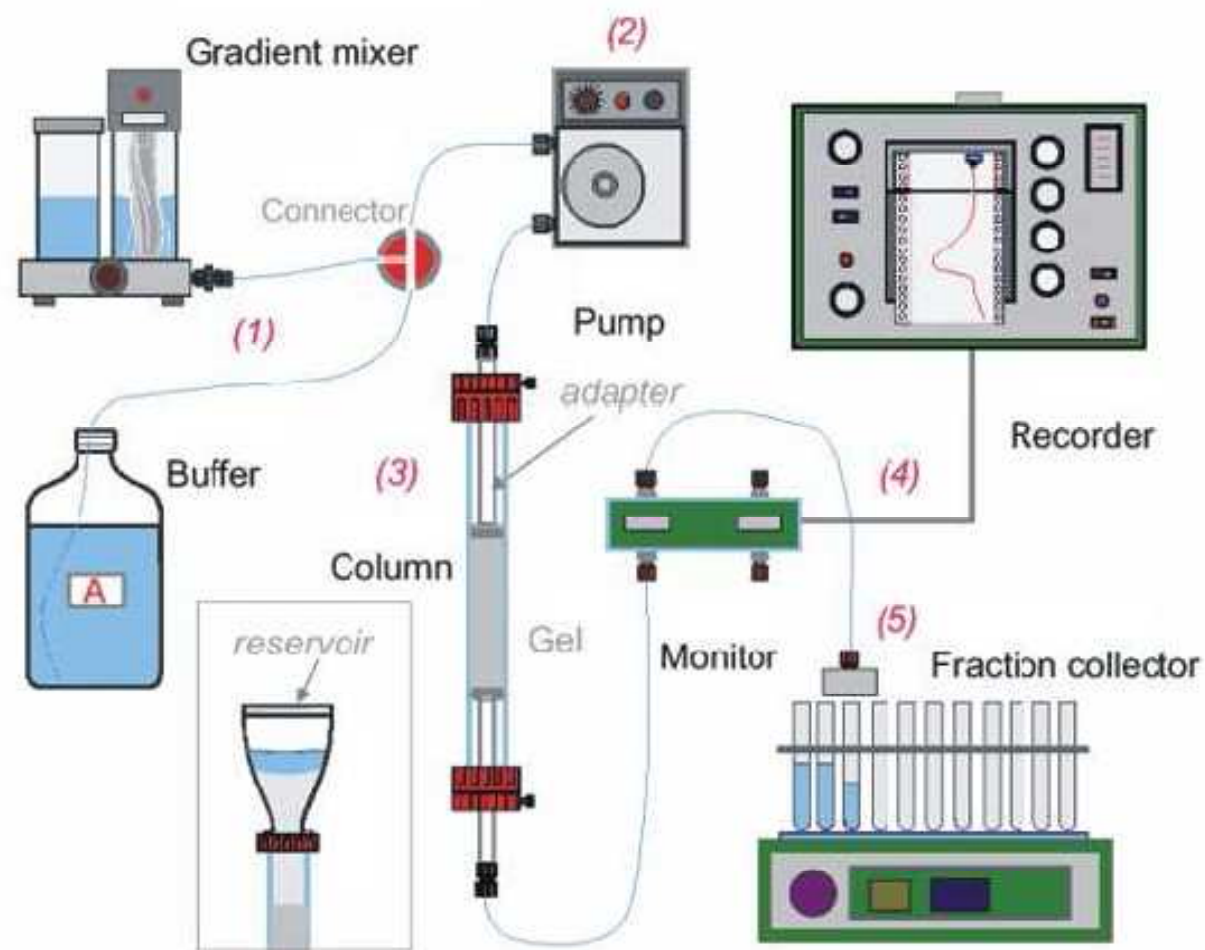


# Chromatografie

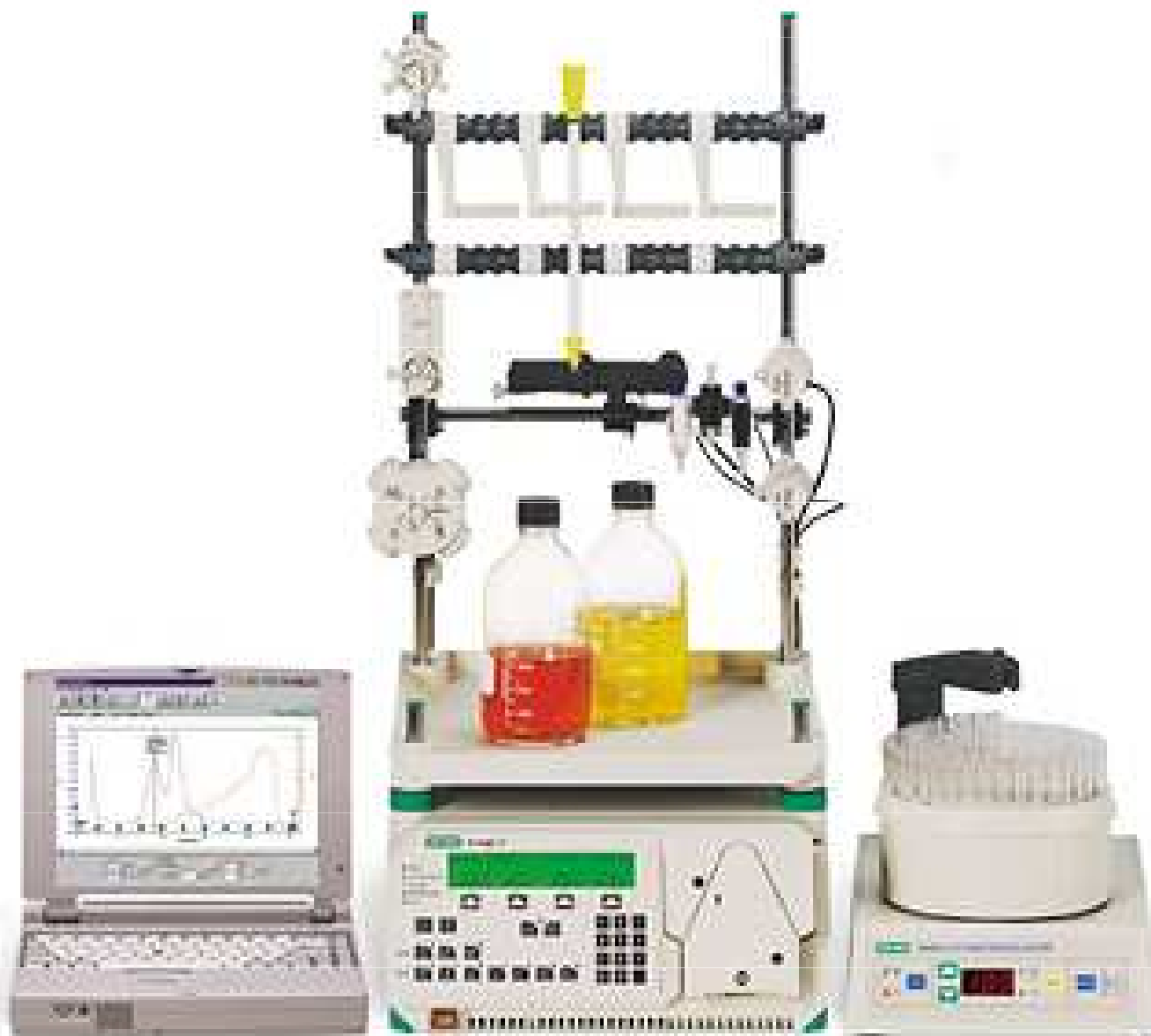




# Zařízení pro LPC



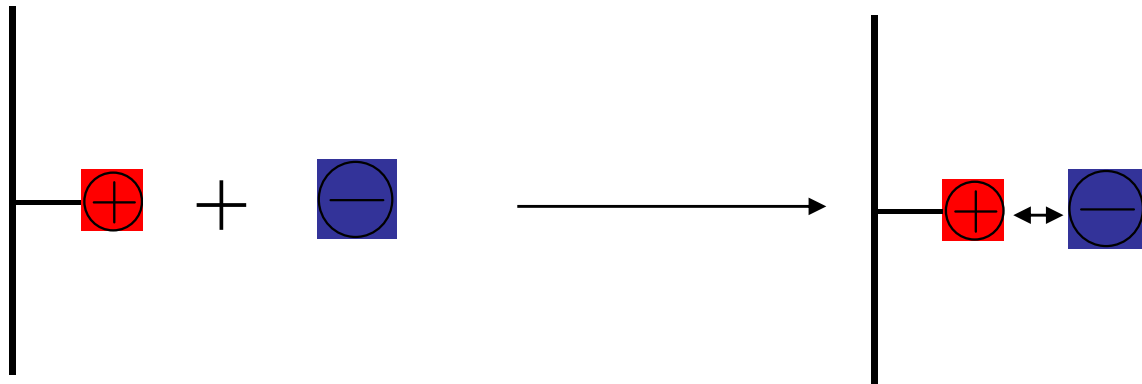
# Zařízení pro LPC



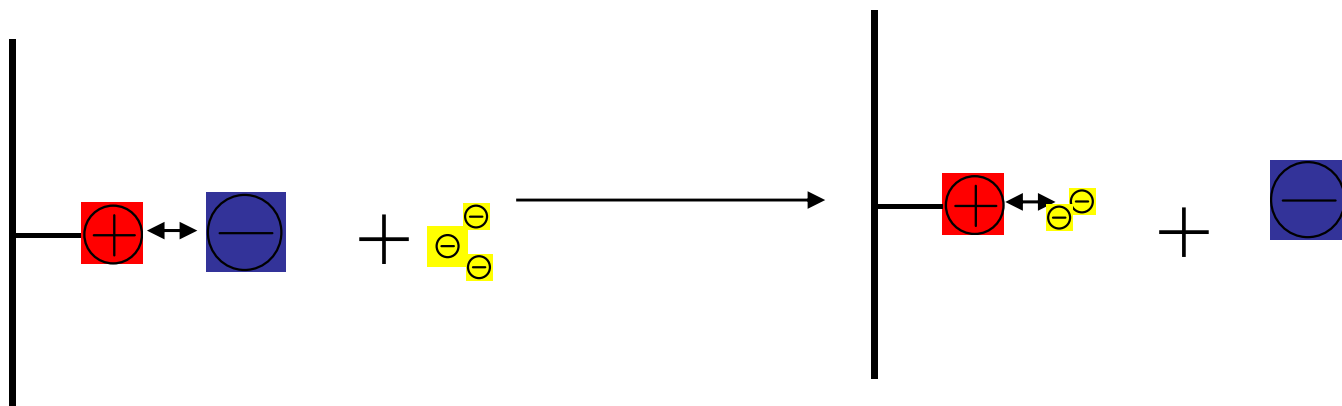
# Ionexová chromatografie

elektrostatická interakce

Vazba



Eluce



# Ionexy

- Katexy - - vazba kationtů

silné - sulfo(S), sulfopropyl(SP)  $\text{OSO}_3^-$

slabé - karboxy(C), karboxymetyl(CM)  $\text{COO}^-$

- 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

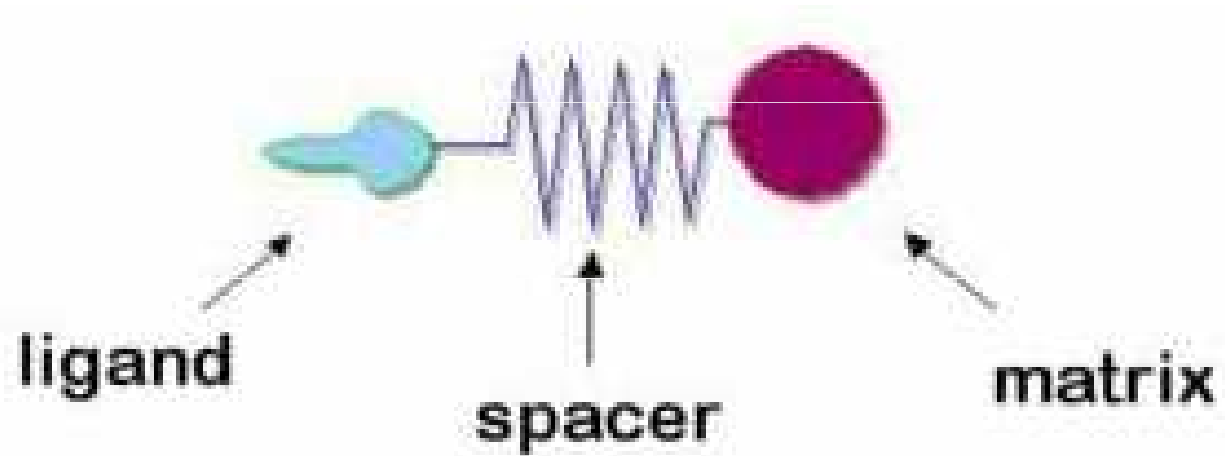
Použití – purifikace, zakoncentrování, výměna pufu

# Hydrofobní chromatografie

- Stacionární fáze – - C<sub>8</sub>, -fenyl
- Mobilní fáze – vodné roztoky  
1.7 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>
- 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	$10^{-14} - 10^{-6}$

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

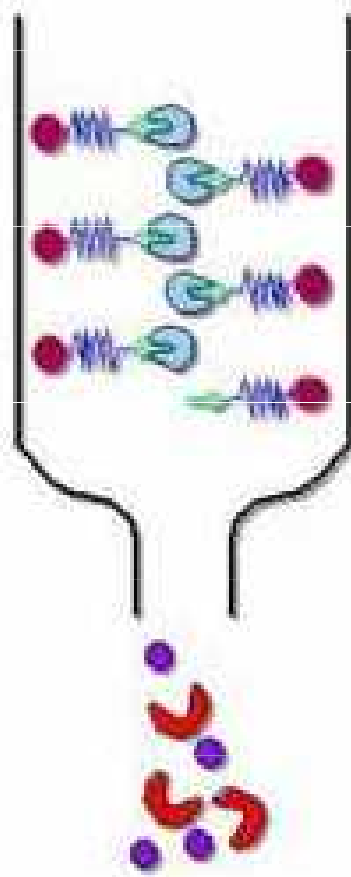


# Afinní chromatografie nanesení vzorku

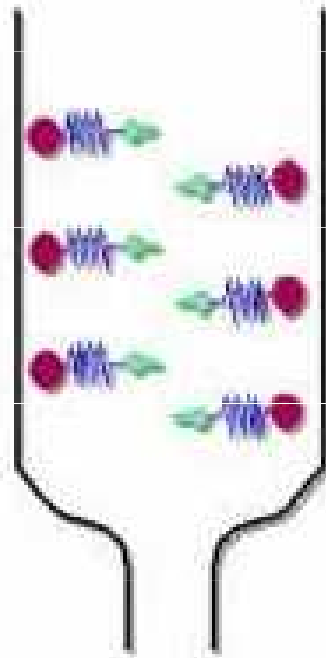




# Afinní chromatografie vymytí balastů



# Afinní chromatografie eluce

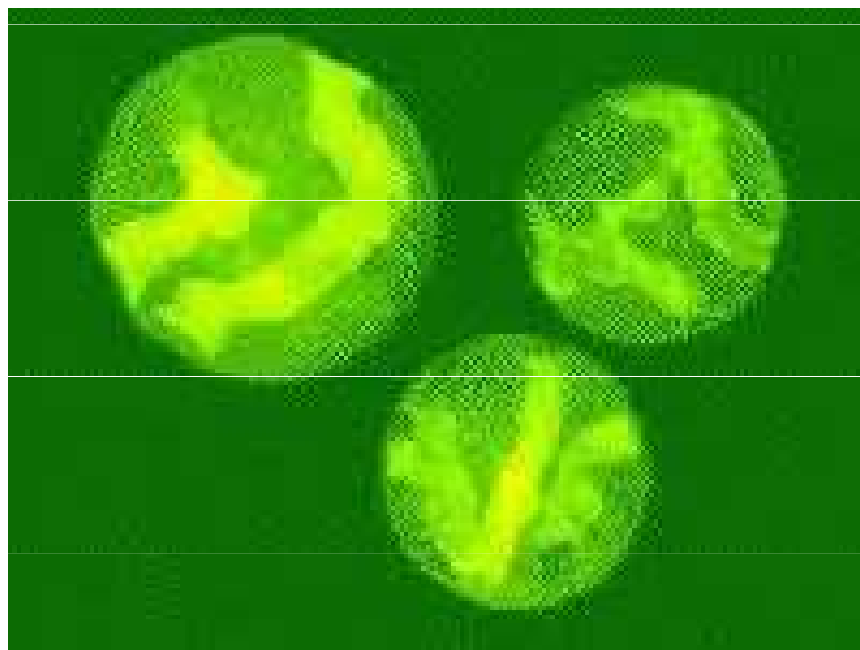


# Provedení

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

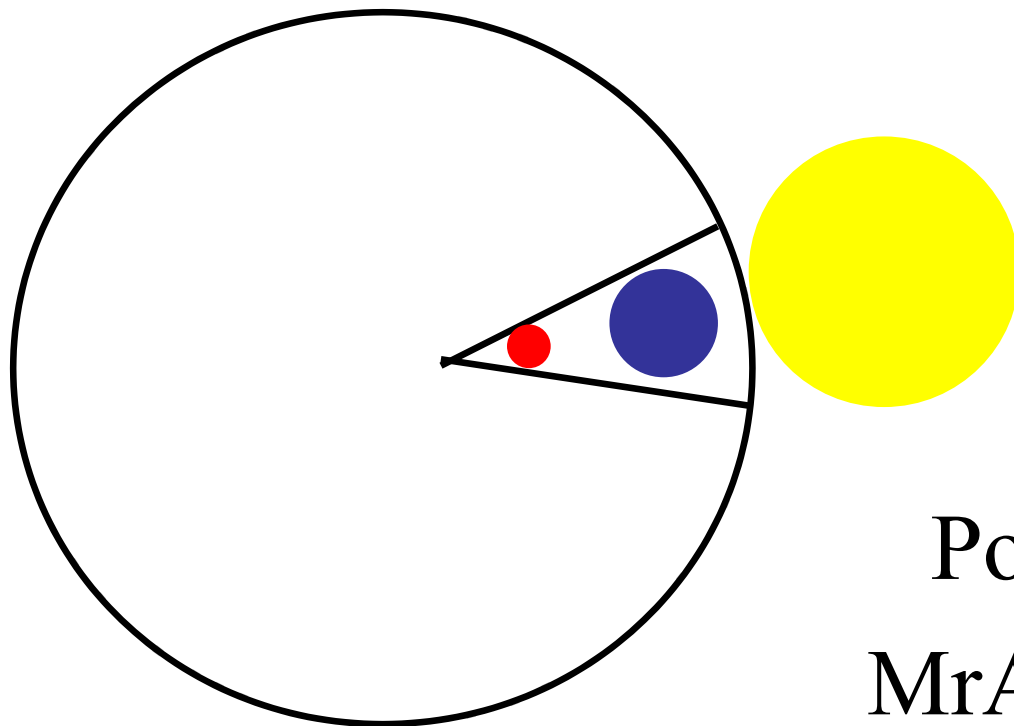
Použití : analytické (stanovení K), purifikace

# Gelová permeační chromatografie



# Gelová permeační chromatografie

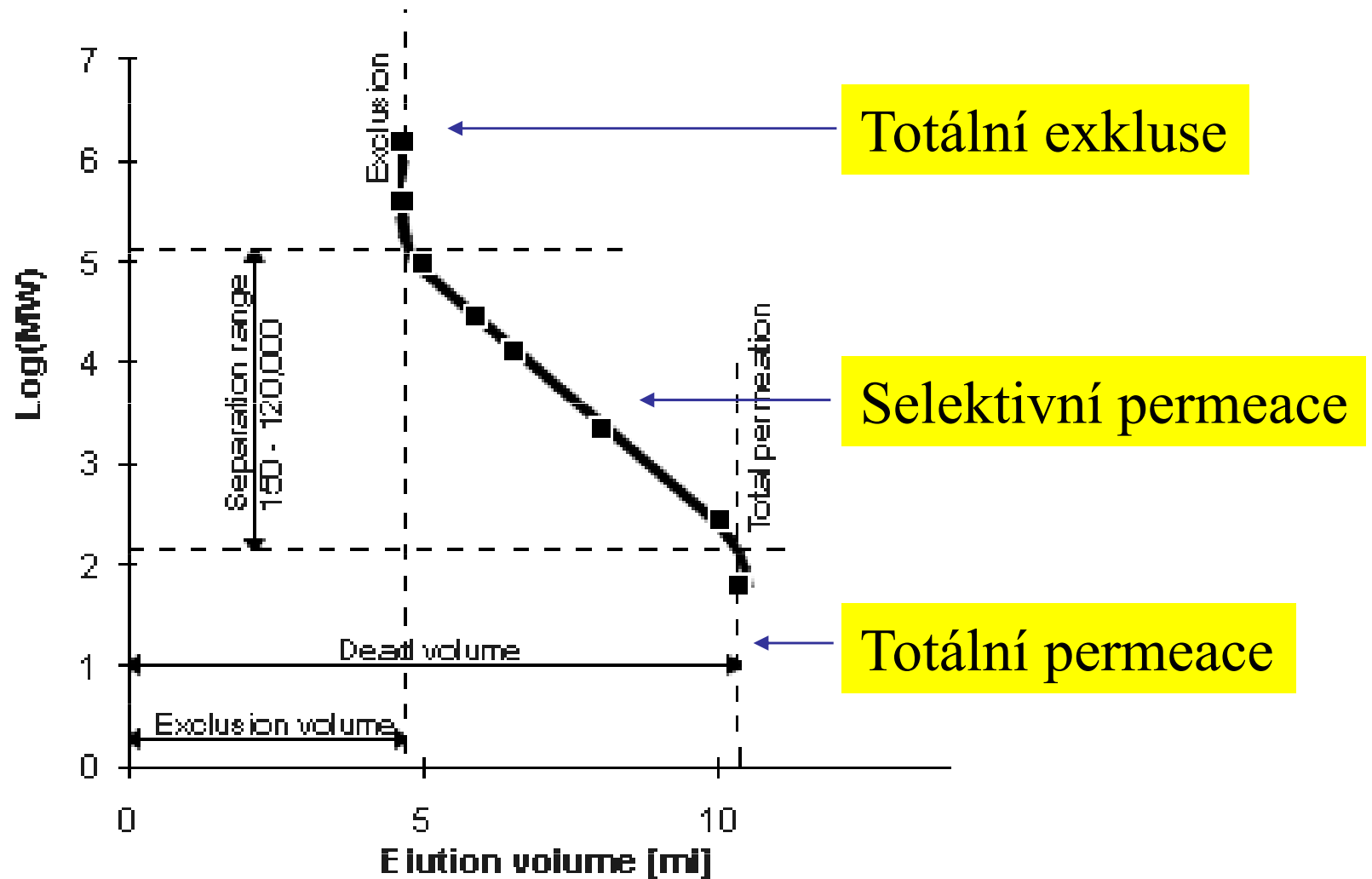
Princip - stérická exkluze  
- omezená difuze



Pořadí eluce :

$MrA > MrB > MrC$

# Gelová permeační chromatografie





# Gelová permeační chromatografie

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

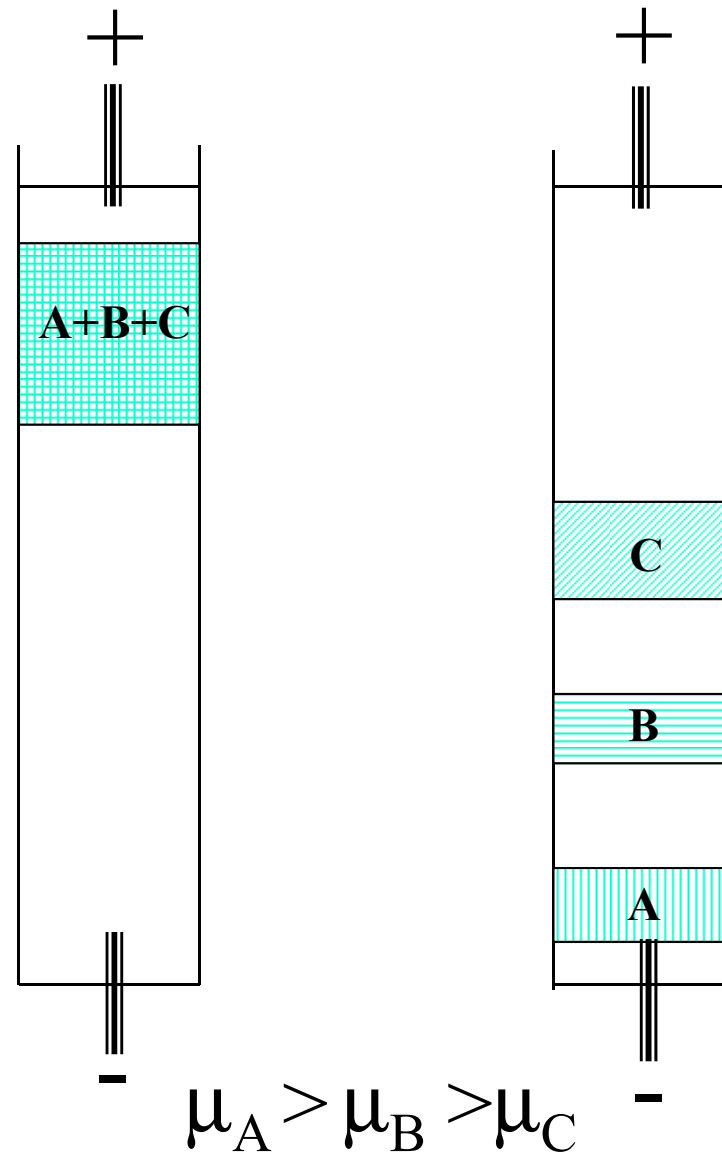
Použití : stanovení Mr, odsolování, purifikace

# Elektromigrační metody

# Podstata

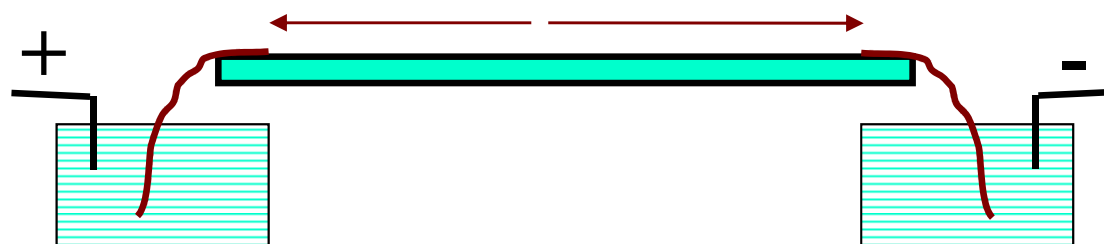
*„Pohyb elektricky nabitých částic  
v elektrickém poli“*

# Zónová elektroforéza



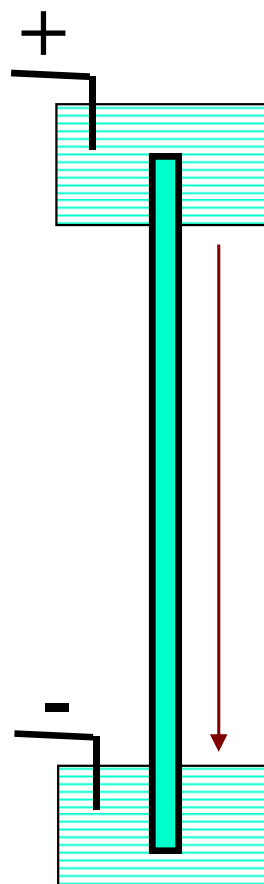
# Upořádání

## Horizontální



# Upořádání

Vertikální



# Polyakrylamid

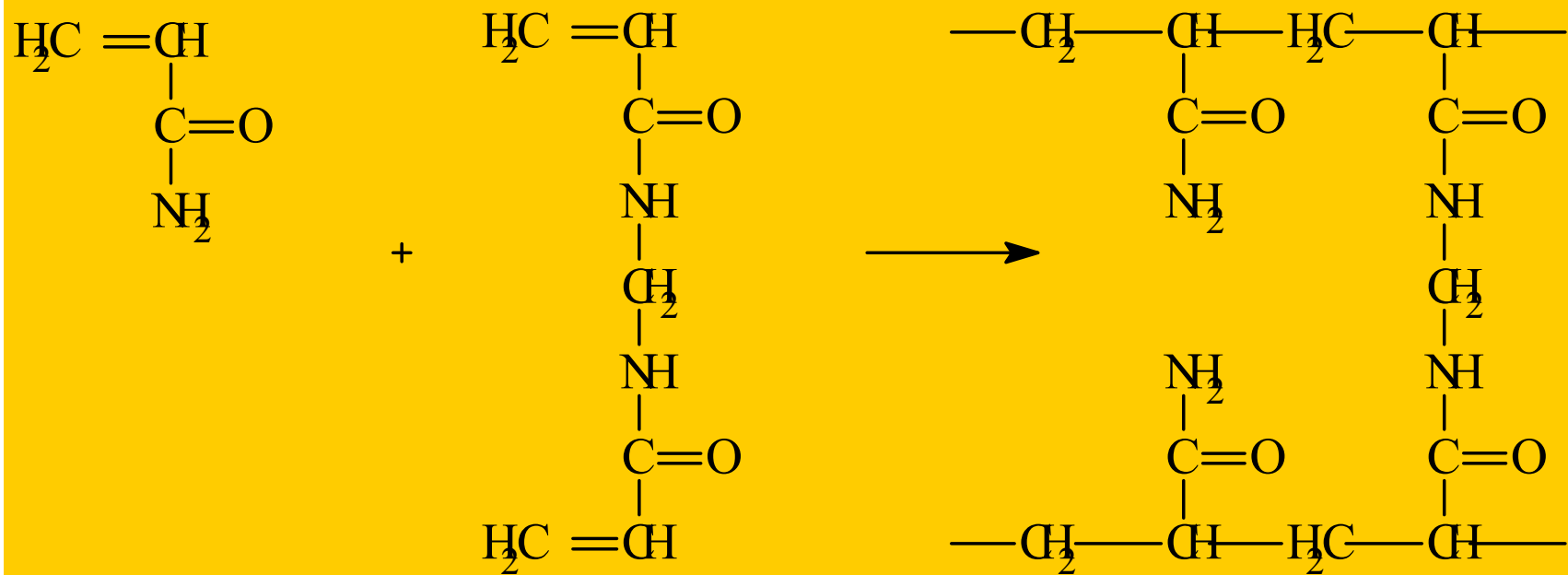
Složení – kopolymer akrylamidu a  
N,N,- methylenbisakrylamidu

+ plně splňuje požadavky

- **Monomery jsou neurotoxiny !!!!!!!**

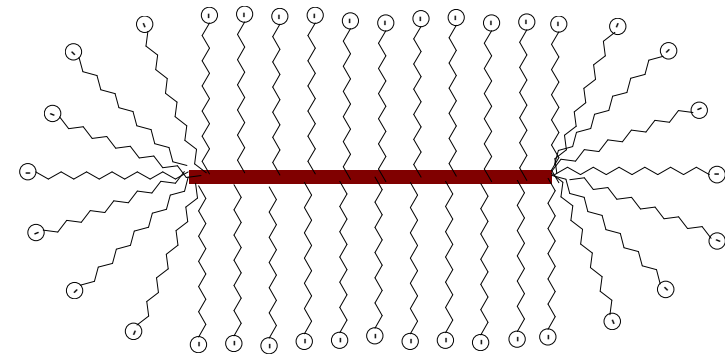
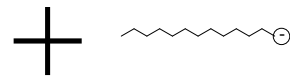
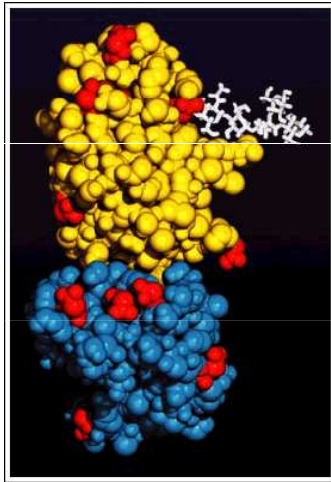
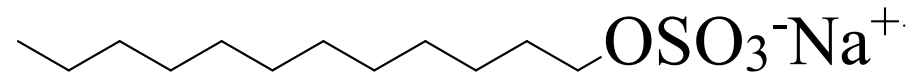
Použití : analýza bílkovin

# Polyakrylamid



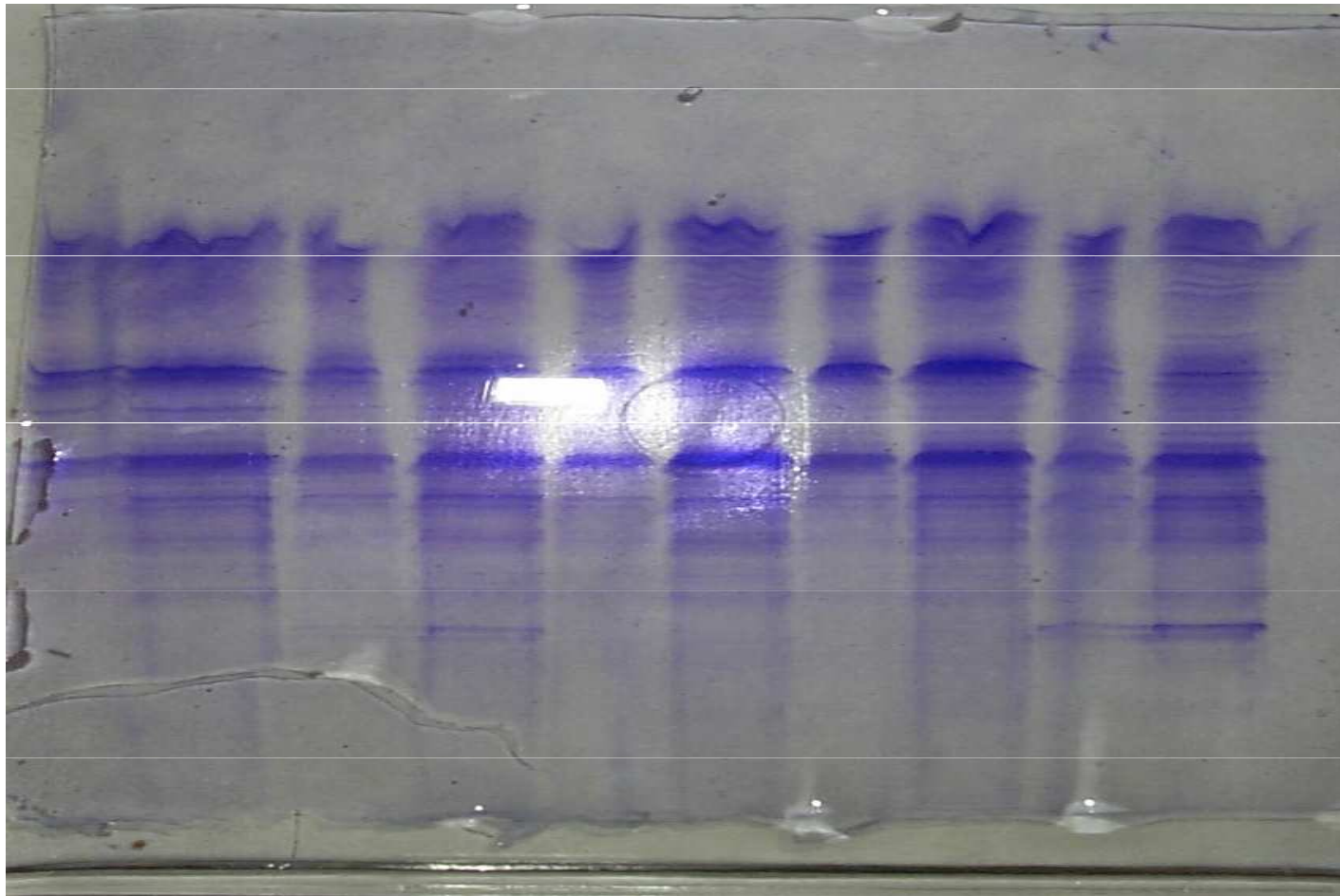


# SDS PAGE

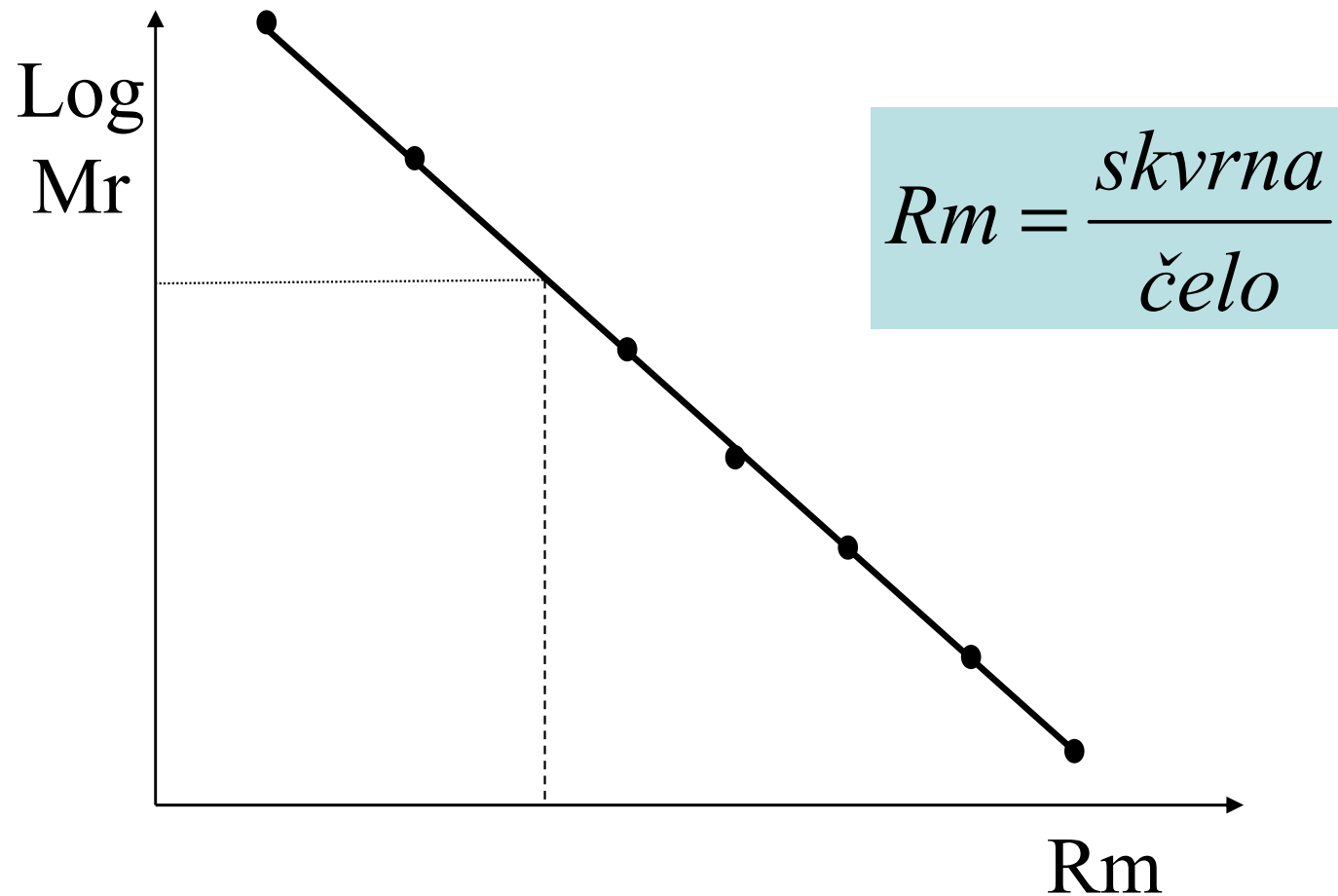


1 g bílkoviny váže 1.4 g SDS  $\Rightarrow$   
uniformní náboj na jednotku MW

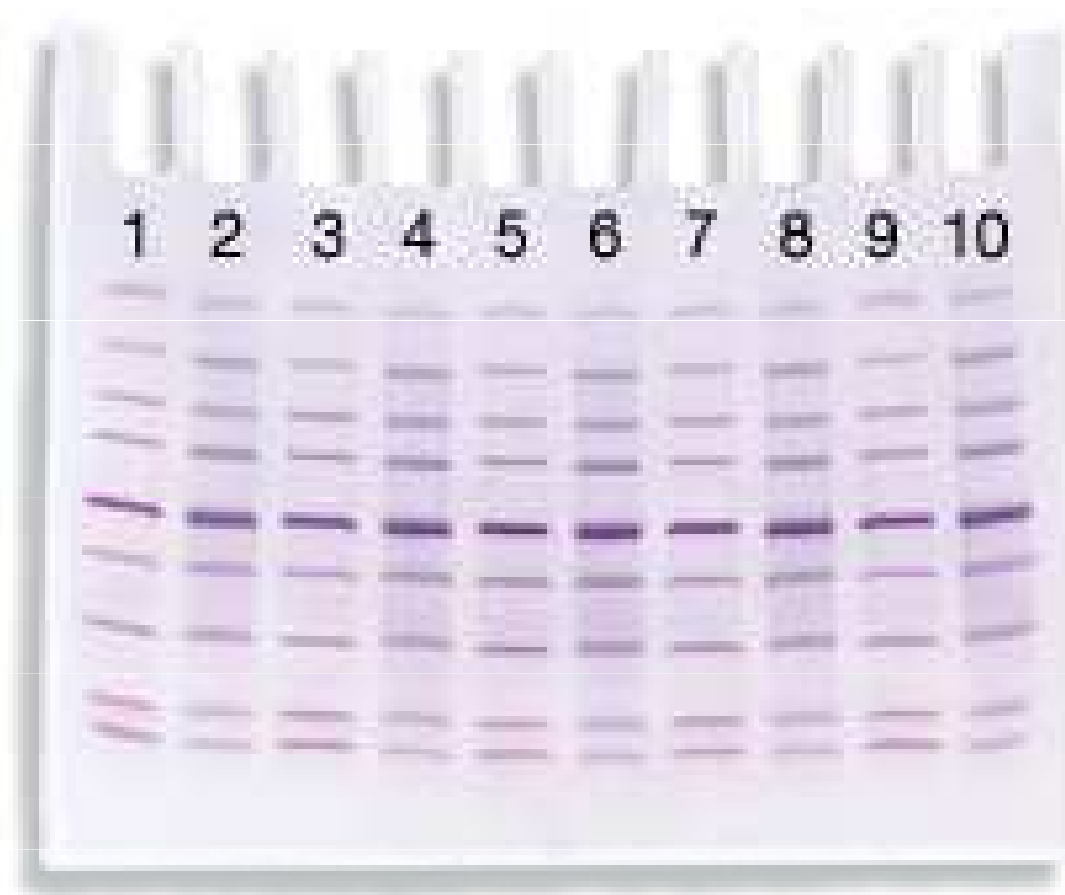
# SDS PAGE



# Stanovení Mr pomocí SDS PAGE



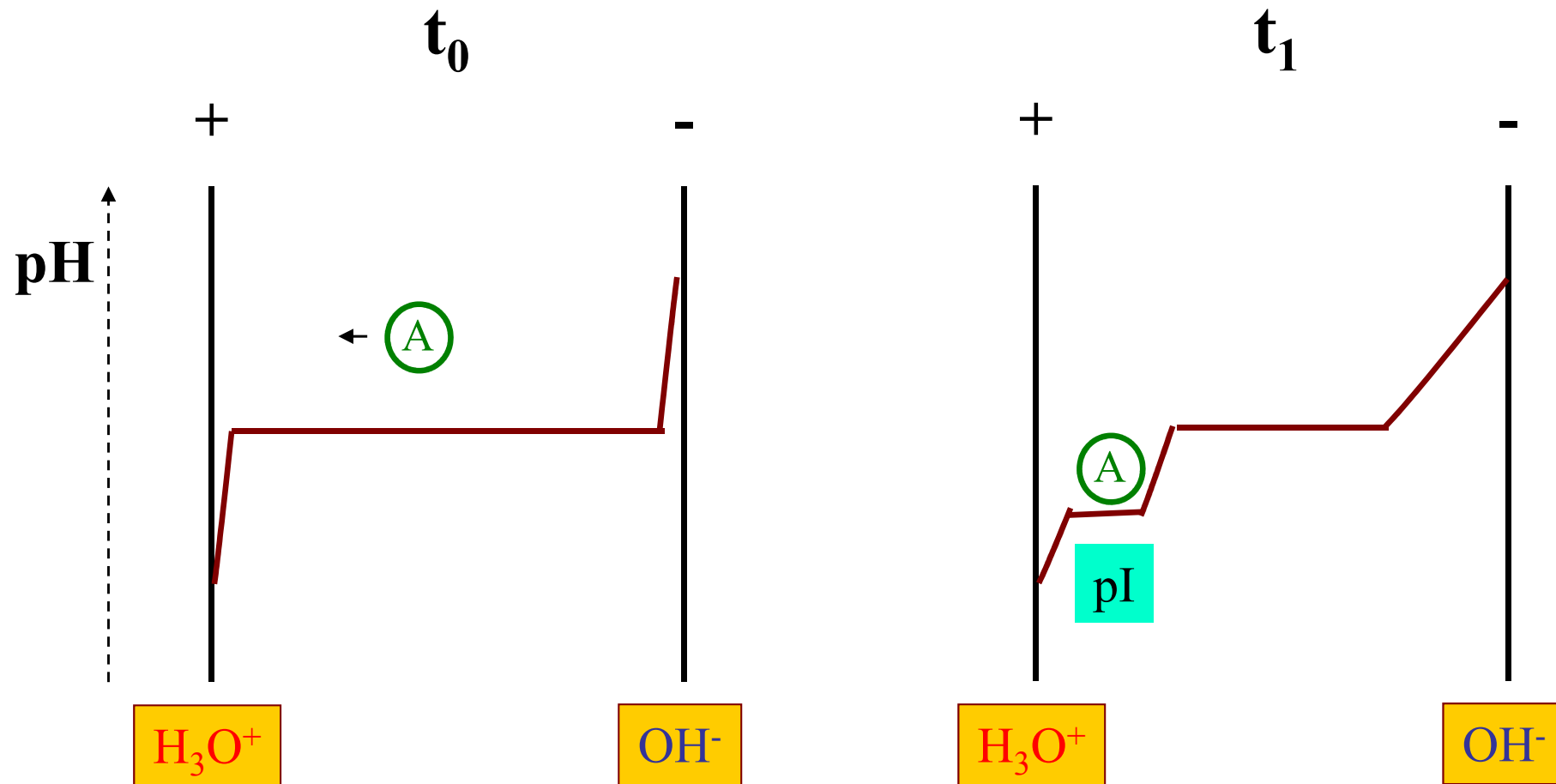
# Stanovení Mr pomocí SDS PAGE - standardy



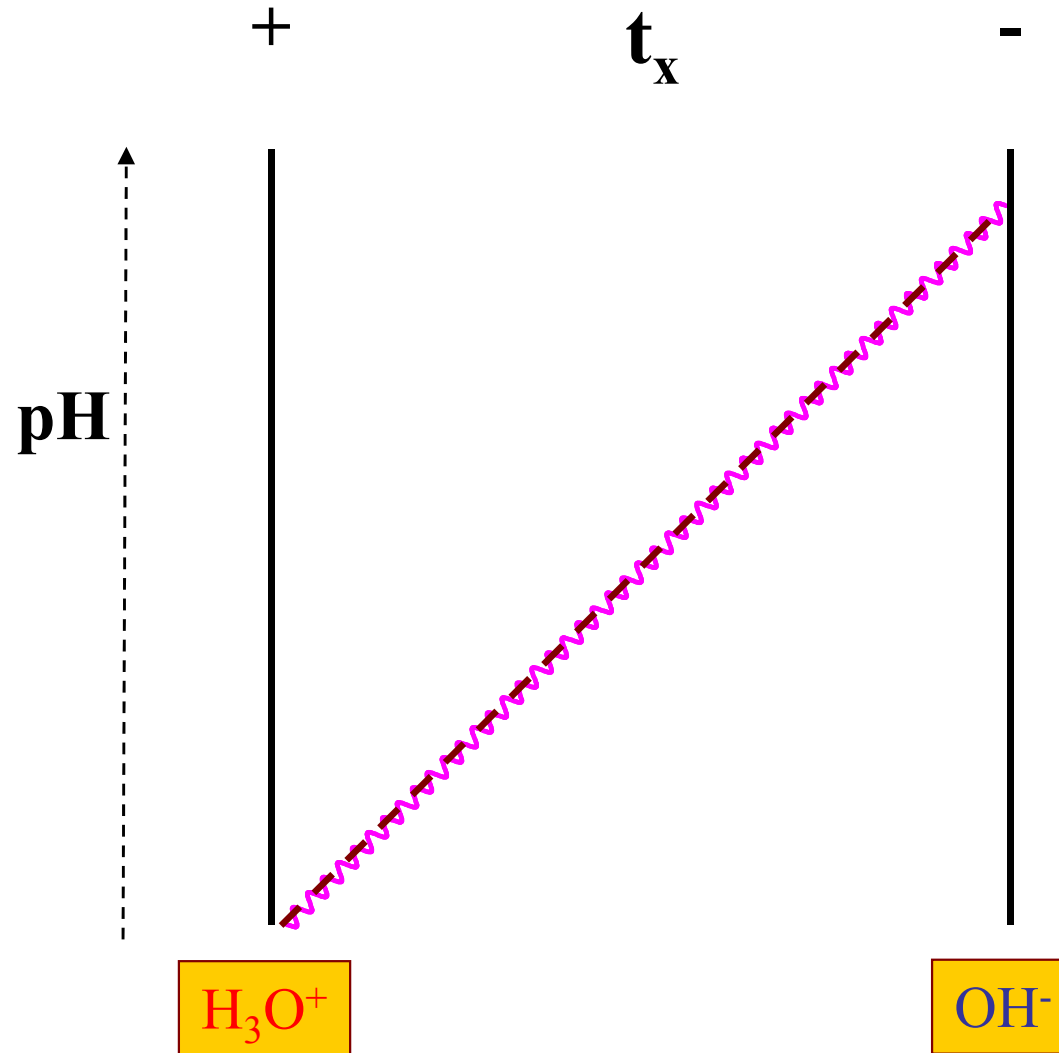
# Izoelektrická fokusace

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

# Izoelektrická fokusace



# Izoelektrická fokusace

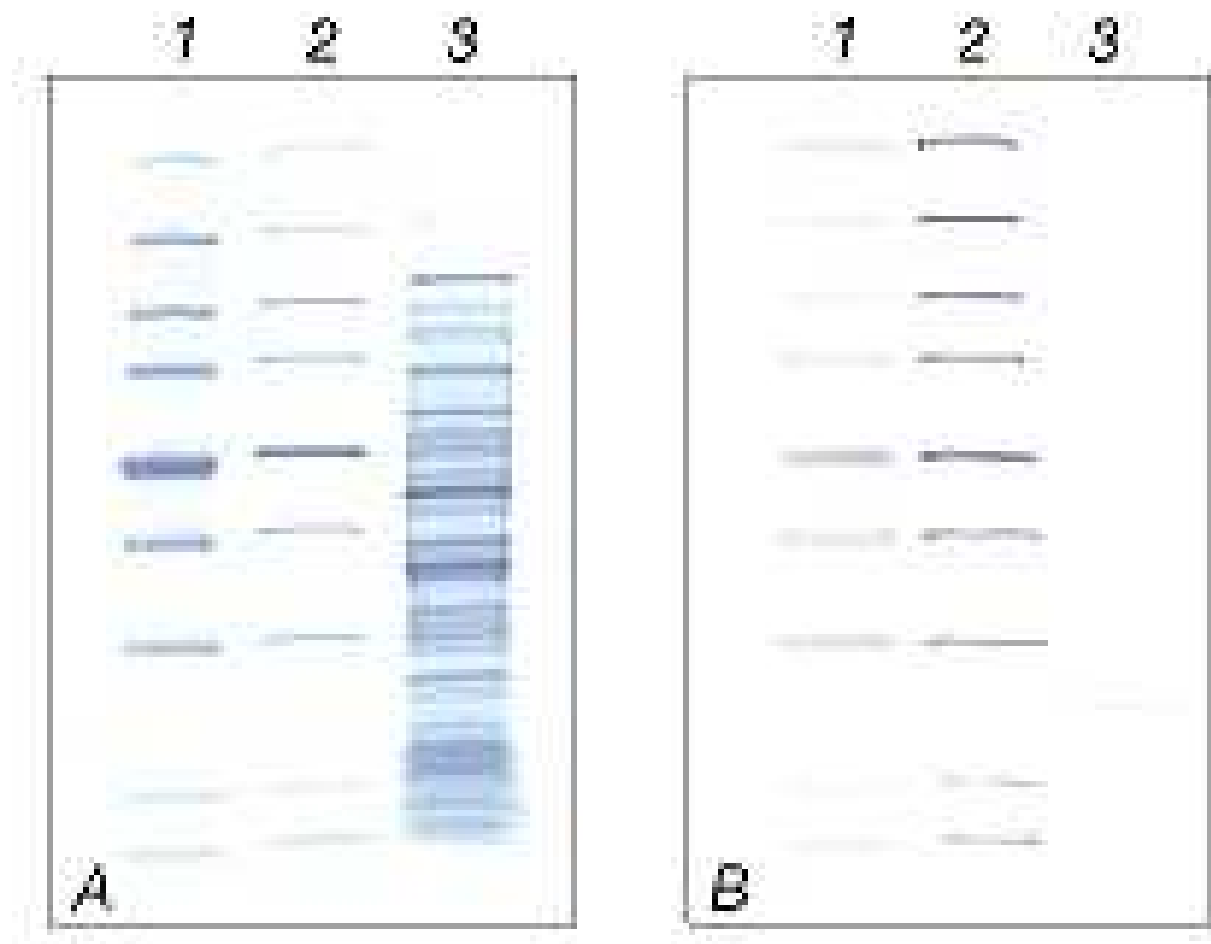


# Izoelektrická fokusace analytická

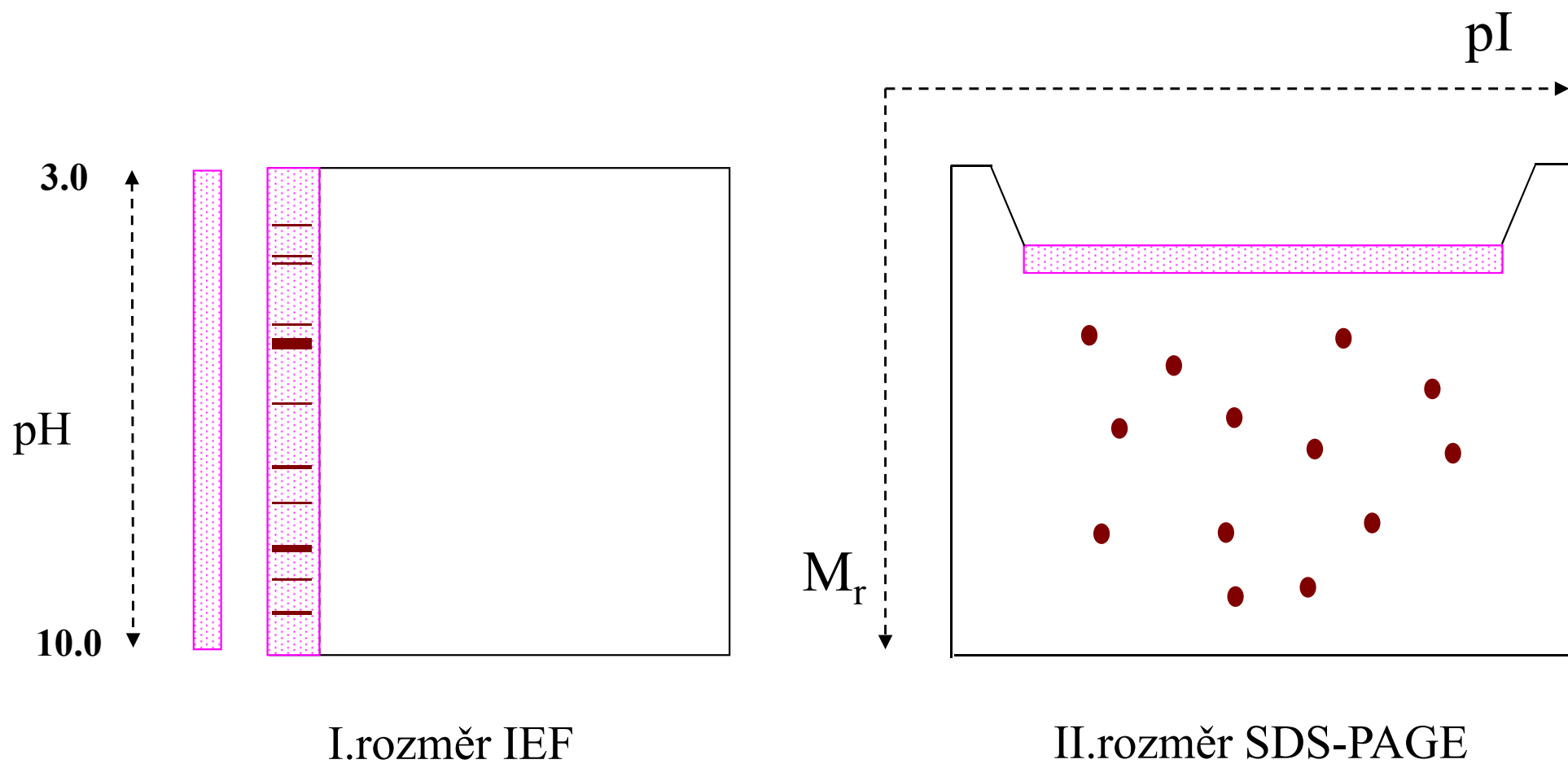
- Provedení - v gelech – PAGE, agarosa
- Použití - sledování komplexních směsí
  - izoenzymové složení
  - stanovení pI – rozřezání a eluce
    - $\mu\text{pH}$  elektrody
    - pI standardy



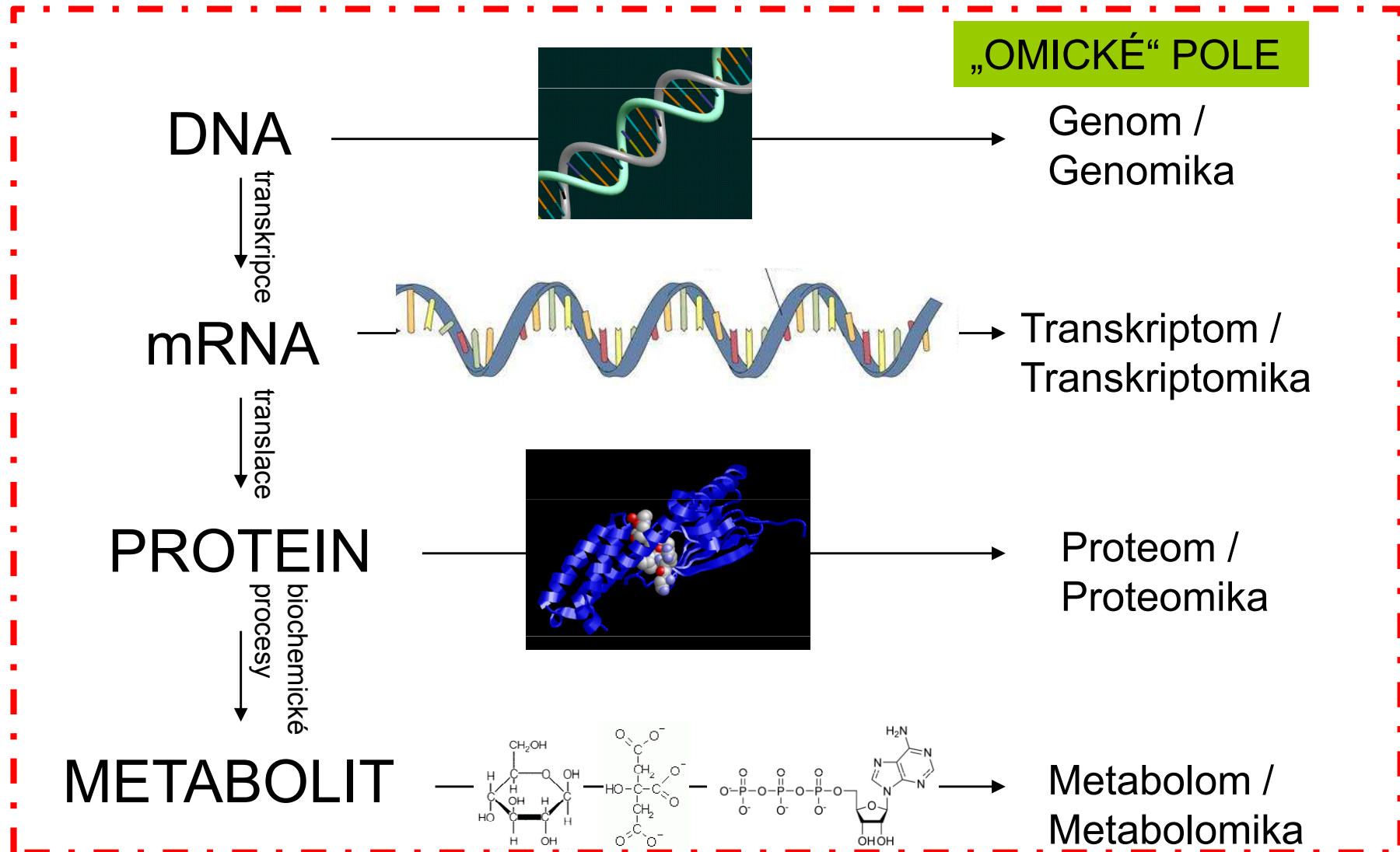
# Izoelektrická fokusace analytická



# Dvojrozměrná elektroforéza

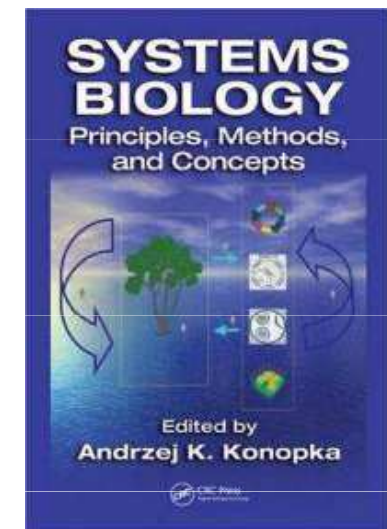
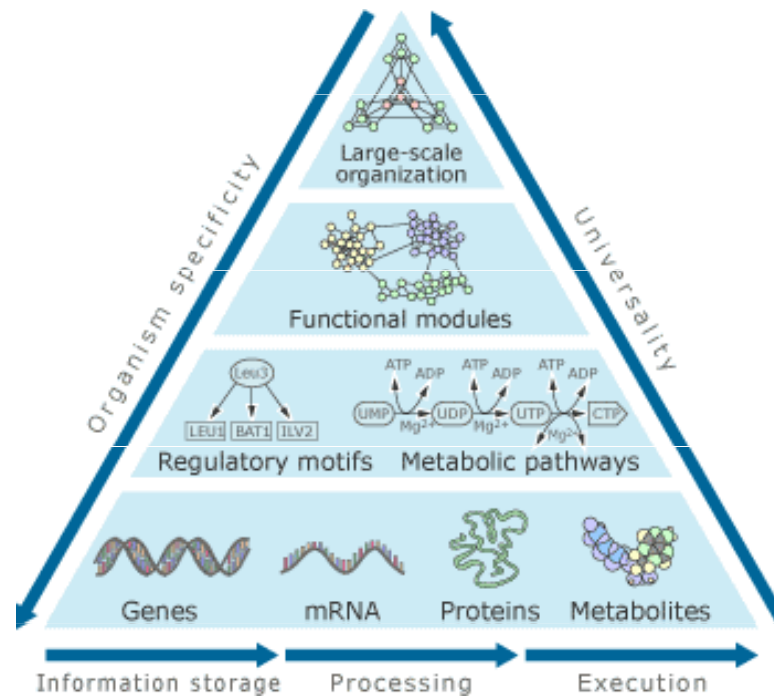


# Studium procesů probíhajících v živých organismech



Systemová biologie

# Systemová biologie





## **PROTEIN**

**J. J. Berzelius 1838**

*Proteios*

## **PROTEOMIKA**

**Marc Wilkins 1994**

## **PROTEOM**

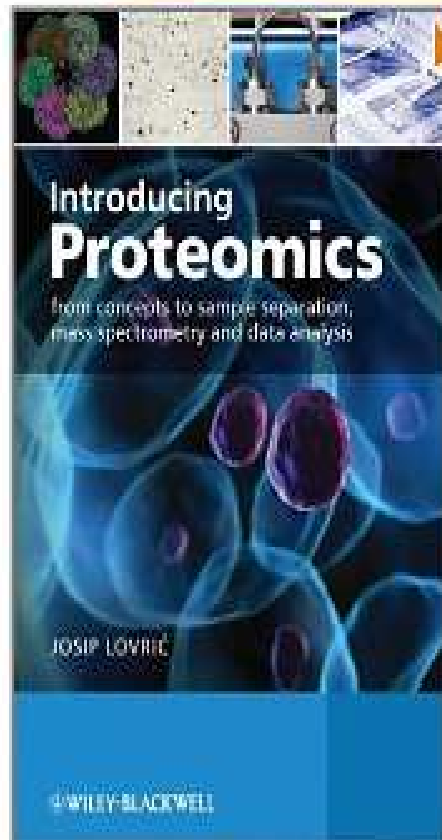
**Kompletní sada bílkovin přítomných v daném okamžiku v buňce, nebo tkáni, zahrnující veškeré jejich modifikace, vzájemné interakce, lokalizaci a metabolický obrat.**

## **PROTEOMIKA**

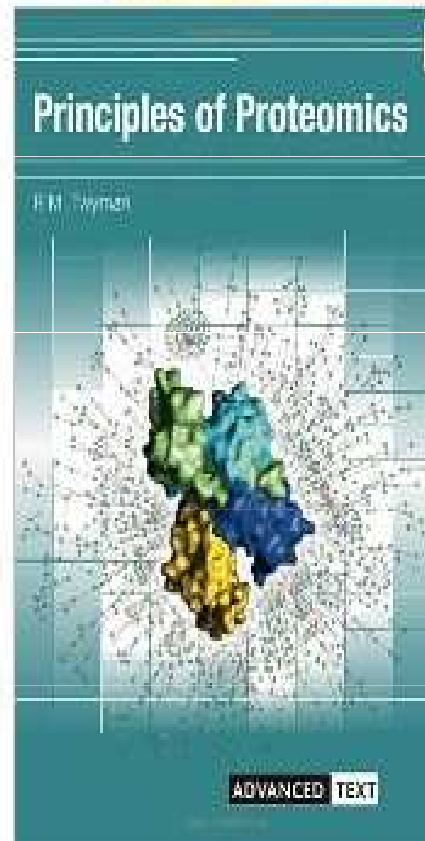
- **kvantitativní a kvalitativní charakterizace úplné sady bílkovin organely, buněčné linie, tkáně nebo organismu**
- **kvantitativní a kvalitativní porovnání proteomů za různých podmínek**

# Literatura

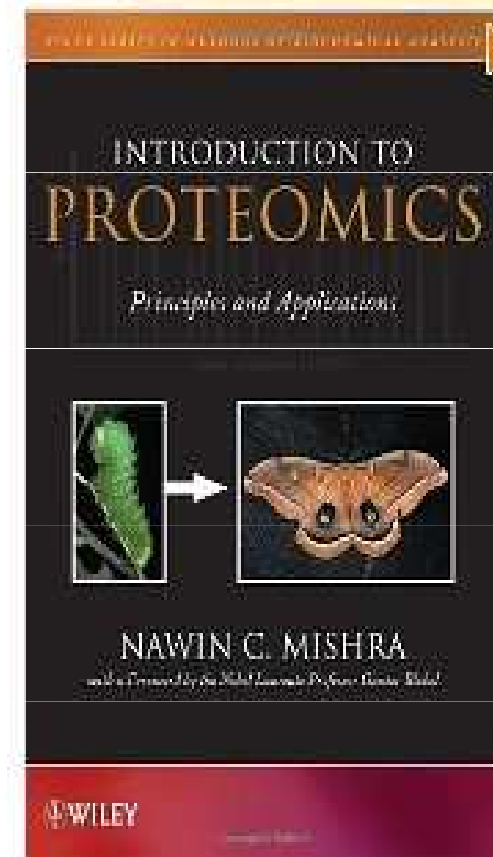
Click to **LOOK INSIDE!**



Click to **LOOK INSIDE!**



Click to **LOOK INSIDE!**



# Cíl proteomiky

- Cílem je nejen identifikovat všechny bílkoviny, ale zároveň pochopit jejich funkci a strukturu a vytvořit 3D mapu bunky (určit lokalizaci jednotlivých bílkovin).

# Proč proteomika když máme genomiku ?

- nelze určit funkci proteinu na základě sekvence DNA nebo mRNA
- nelze popsat molekulární mechanismy pomocí studia genomu
- 200 typu posttranslacioních modifikací
- existuje alternativní translace
- !!!! špatná korelace hladin mRNA a skutečných hladin bílkovin !!!

**PROTOŽE PROTEINY A NIKOLIV GENY VYTVÁŘEJÍ FENOTYP !**

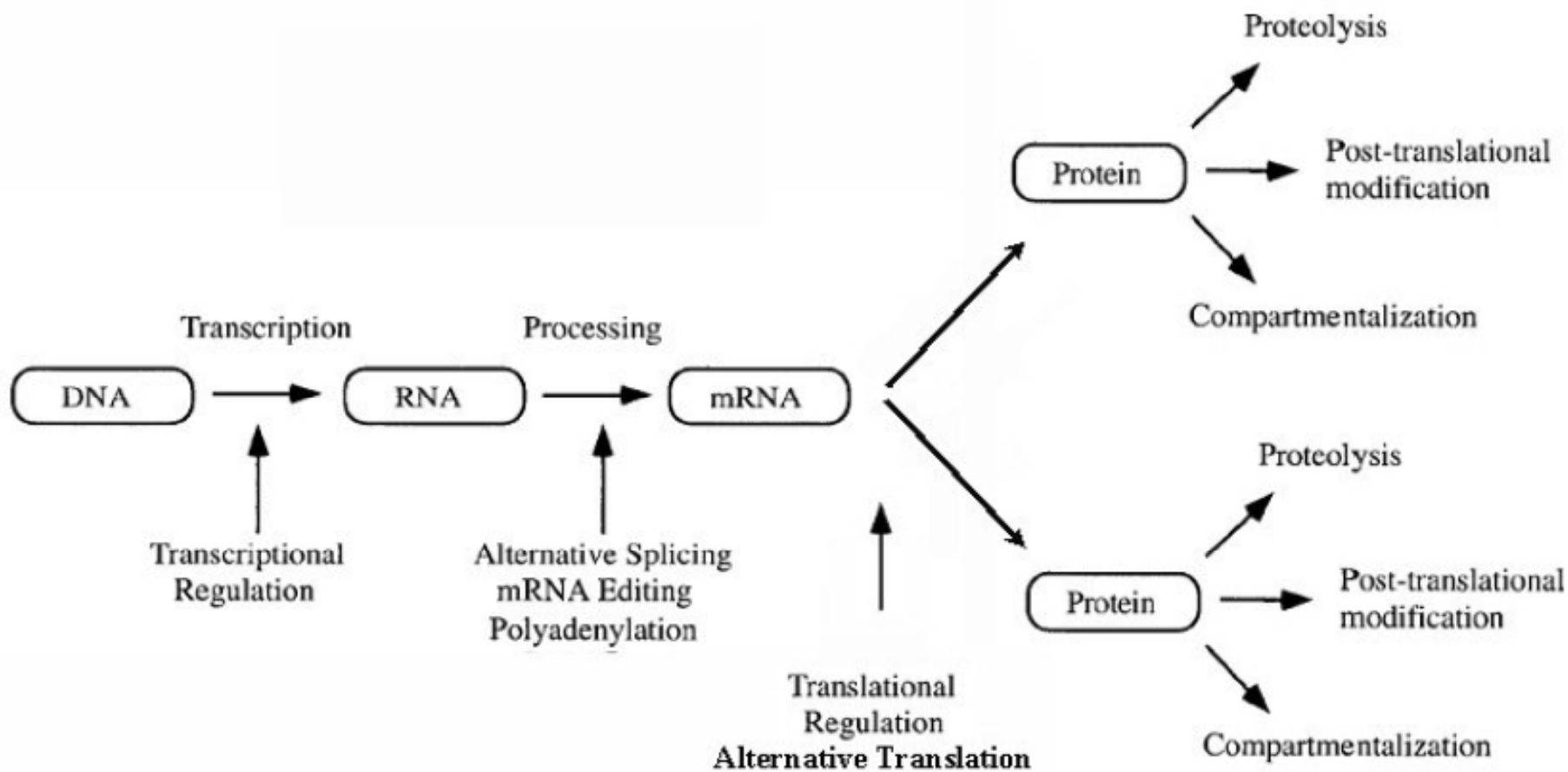




**JEDEN GENOM  
DVA PROTEOMY**



# JEDEN GEN, MNOHO BĚLKOVIN



Cca 25-30 000 genů



Několik set tisíc bílkovin

## STRUKTURNÍ PROTEOMIKA

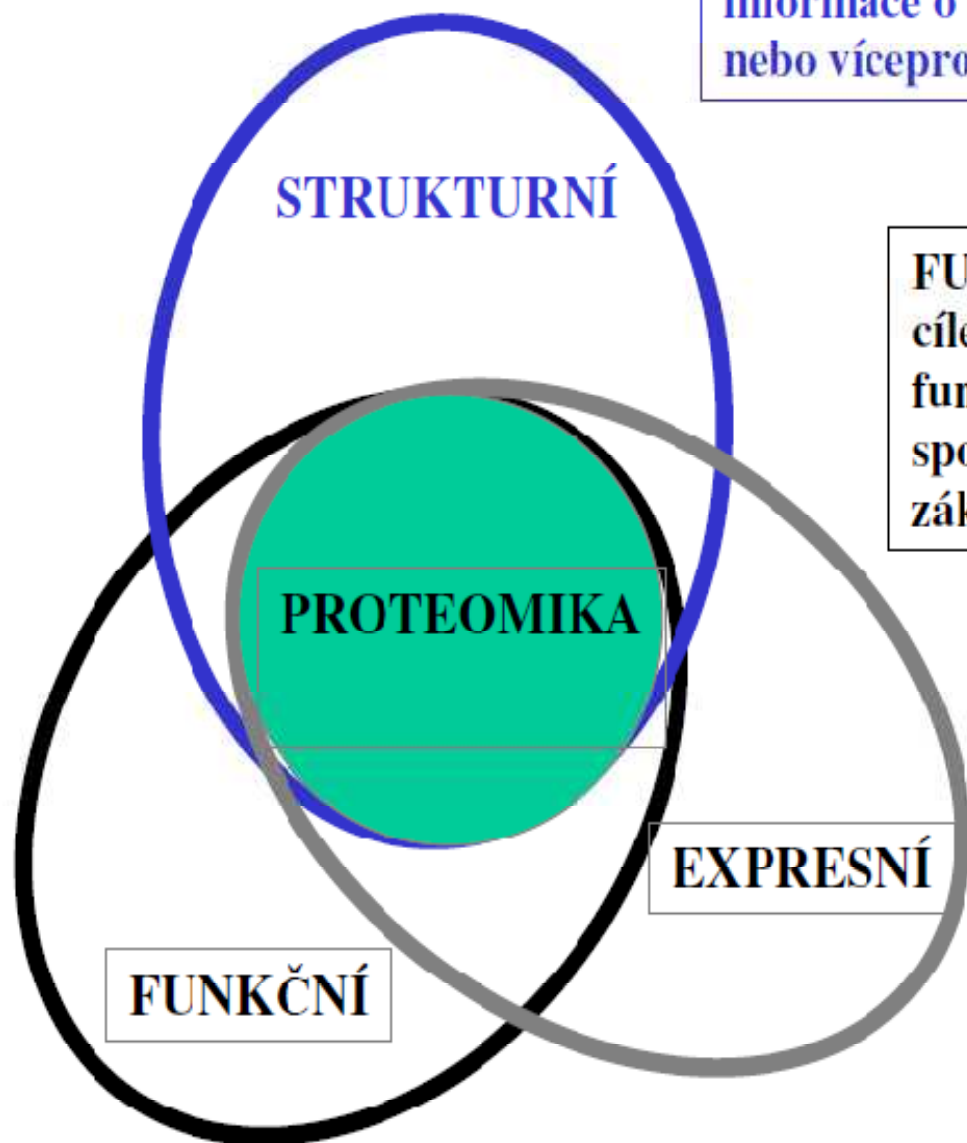
– vytváření buněčných nebo subcelulárních map, kompletní informace o bílkovinách a jejich interakcích v dané organelle nebo víceproteinovém komplexu.

## FUNKČNÍ PROTEOMIKA

cílená sub-proteomická izolace a charakterizace funkčních celků nebo souborů bílkovin na základě společné funkce. (identifikace sub-proteomů na základě interakce s nějakým ligandem.)

## EXPRESNÍ PROTEOMIKA

kvantitativní studium porovnávající expresi mezi různými proteomy



# Aplikace proteomiky v medicíně (proteomika nemocí)

**Úloha proteinů ve vzniku nemocí**

**Exprese proteinů u nemocí**

**Biomarkery nemocí**

**Detekce proteinů vznikajících během nemoci je využita k diagnóze**

Alzheimerova choroba (amyloid  $\beta$ )

Srdeční onemocnění (interleukin-6 a 8, sérový amyloid A, fibrinogen, troponiny)

Renální buněčný karcinom (karbonanhydrasa IX)

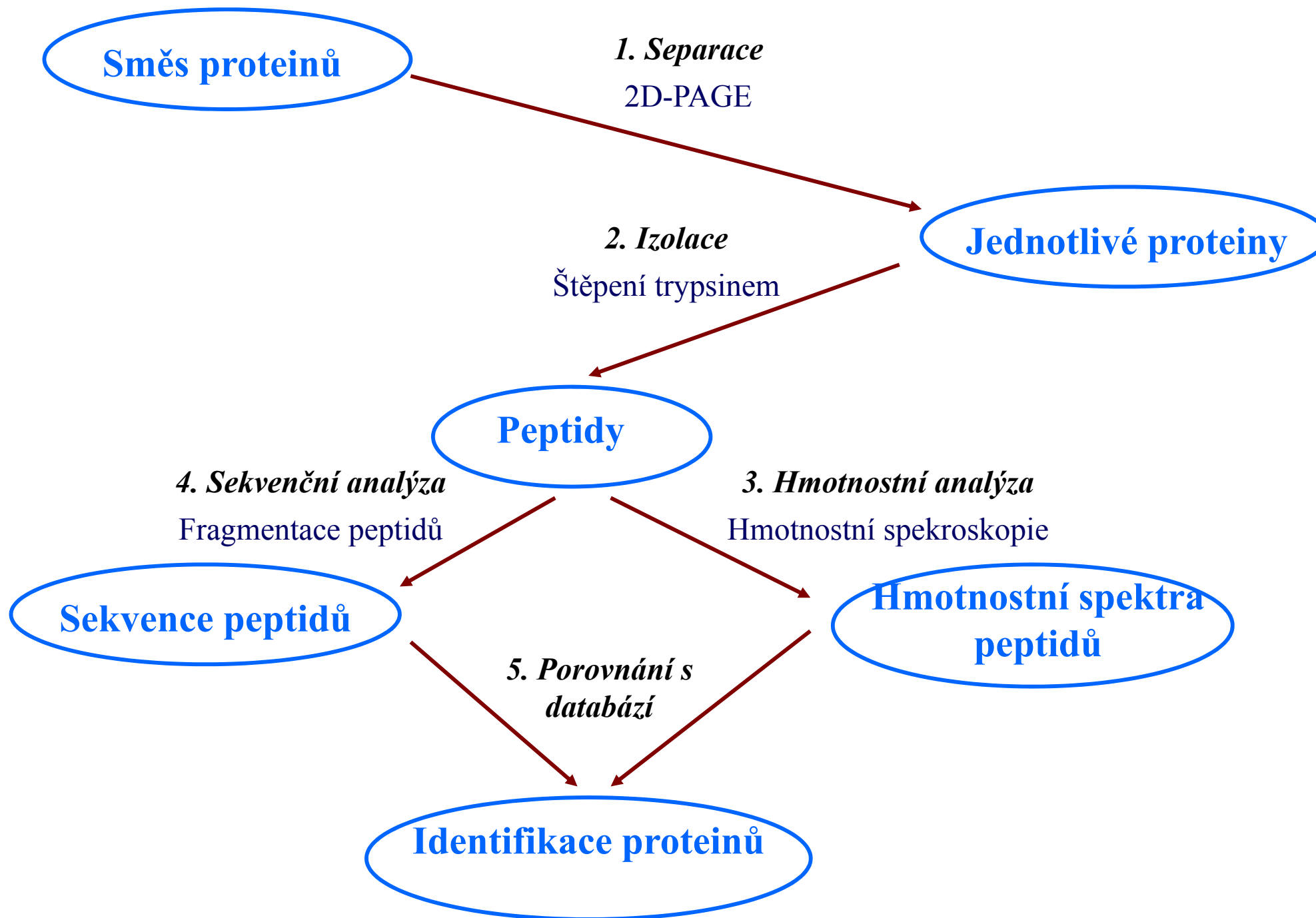
**Vývoj nových léků**

**Informace o proteinech způsobující onemocnění je využita pro vývoj nových léků**

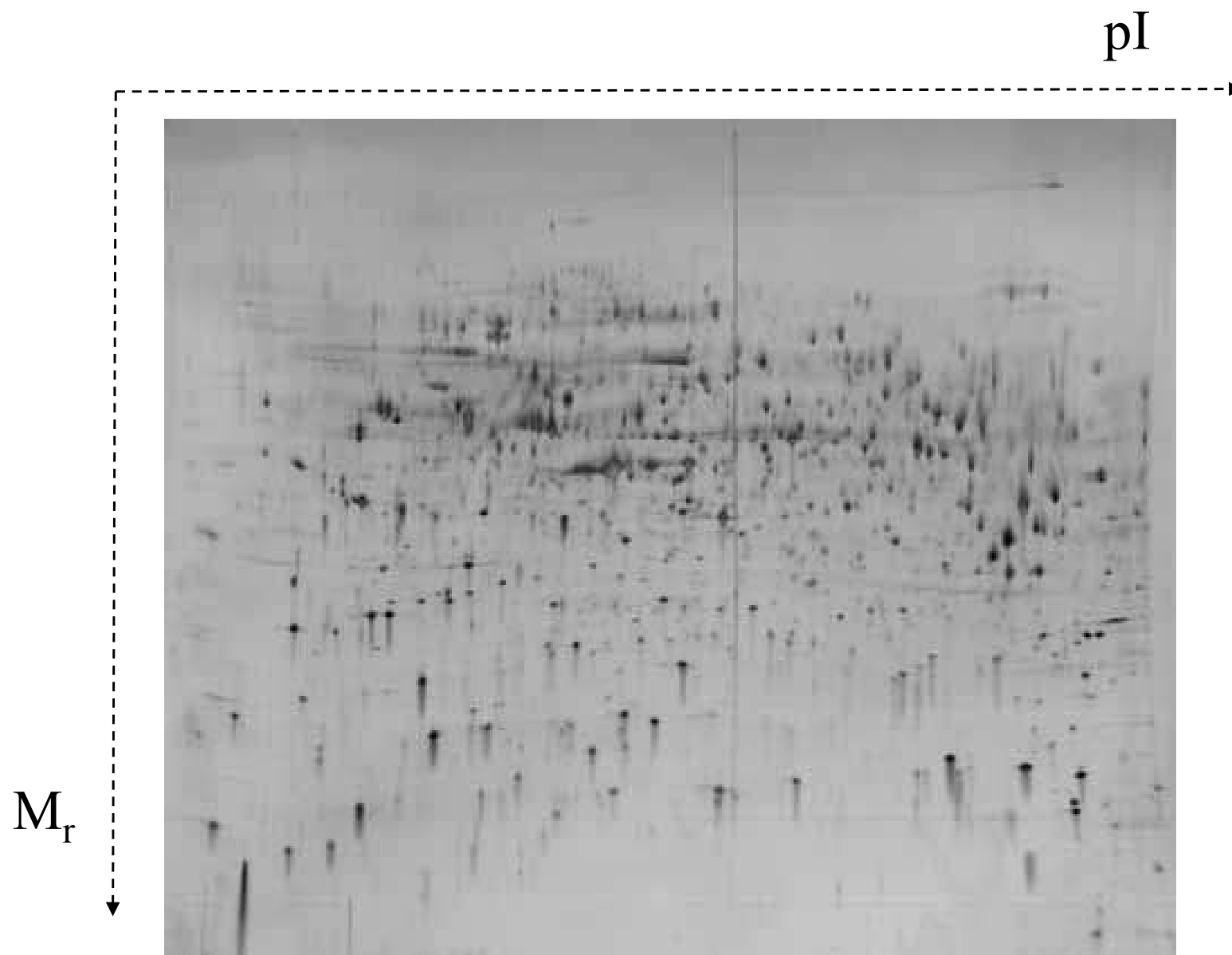
1. Známá 3D struktura proteinu-počítačová simulace-hledání léku, který inhibuje patologický protein (HIV-1 proteasa)

2. Genetické odlišnosti mezi lidmi-odlišný proteom-vývoj individuálních léků

# Základní schéma analýzy užívané v proteomice



# Dvojrozměrná elektroforéza





CompuGen Z3 DeskTop v.1.11.Beta

File Edit Image Spots Align View Analysis Window Log Help

[1st] 2small [2nd] 1small

Layered View: 2small vs. 1small

Matching Data Table

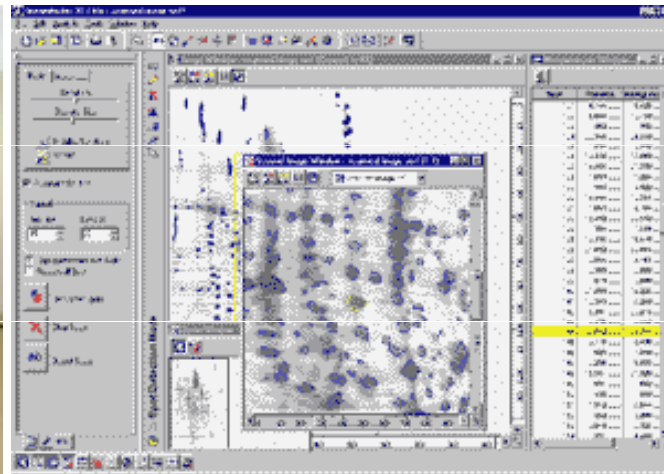
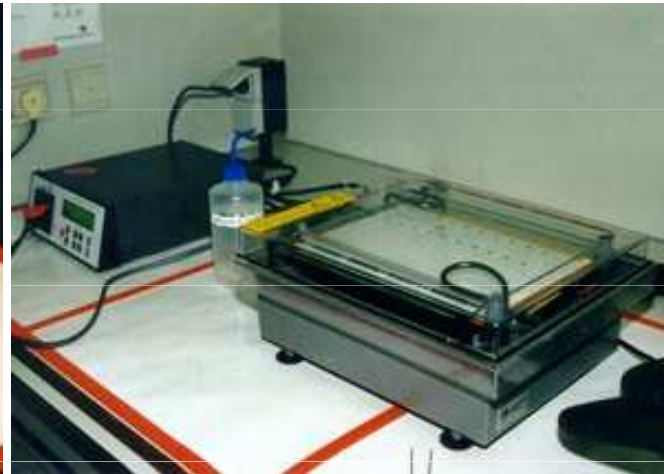
The gels in the table are enumerated as follows:

1. 2small
2. 1small

ID	X1	Y1	RE1	X2	Y2	RE2	std	baseline
1016	346	39	6031	337	43	11053	2511.0	0.588
1022	255	45	3712	250	51	3745	16.5	0.009
1023	242	48	2206	237	53	2921	357.5	0.279
1024	119	49	584	125	53	1076	246.0	0.593
1025	100	50	3290	108	54	4738	724.0	0.361
1027	183	50	2104	183	53	3515	705.5	0.502
1029				95	52	1150		
1030	221	52	5409	217	56	4496	456.5	-0.184
1032				264	52	4886		
1033				275	52	1422		
1034	147	53	3078	151	59	1281	898.5	-0.625
1038	290	56	1992					
1040				35	57	1006		

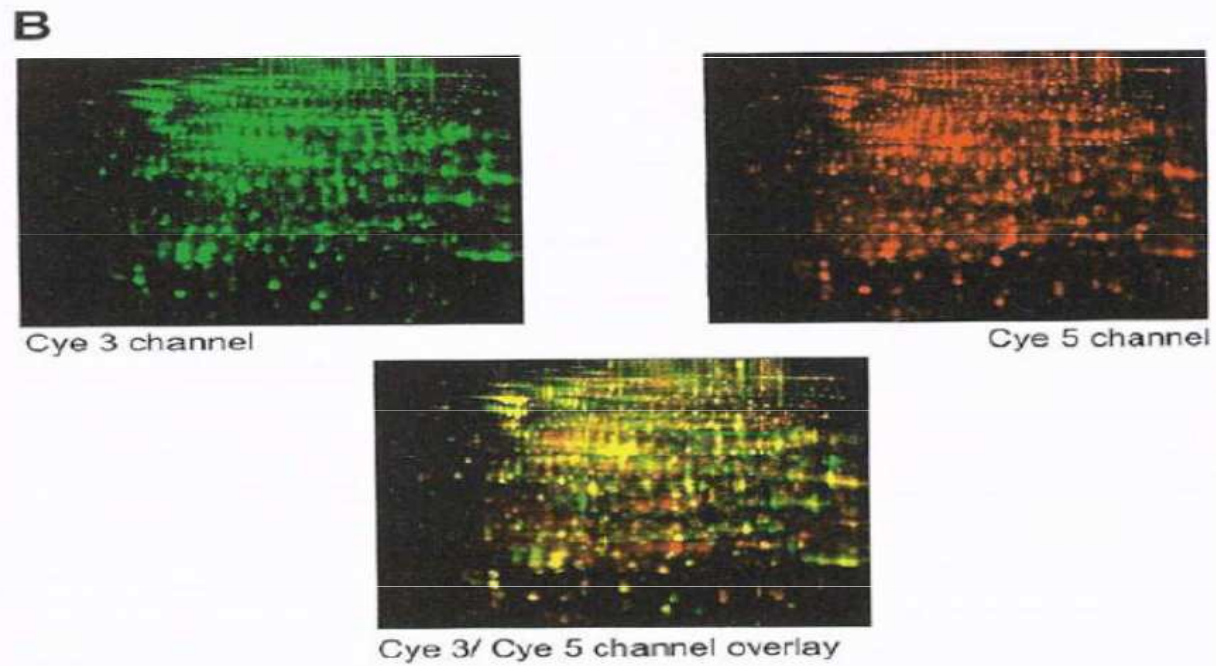
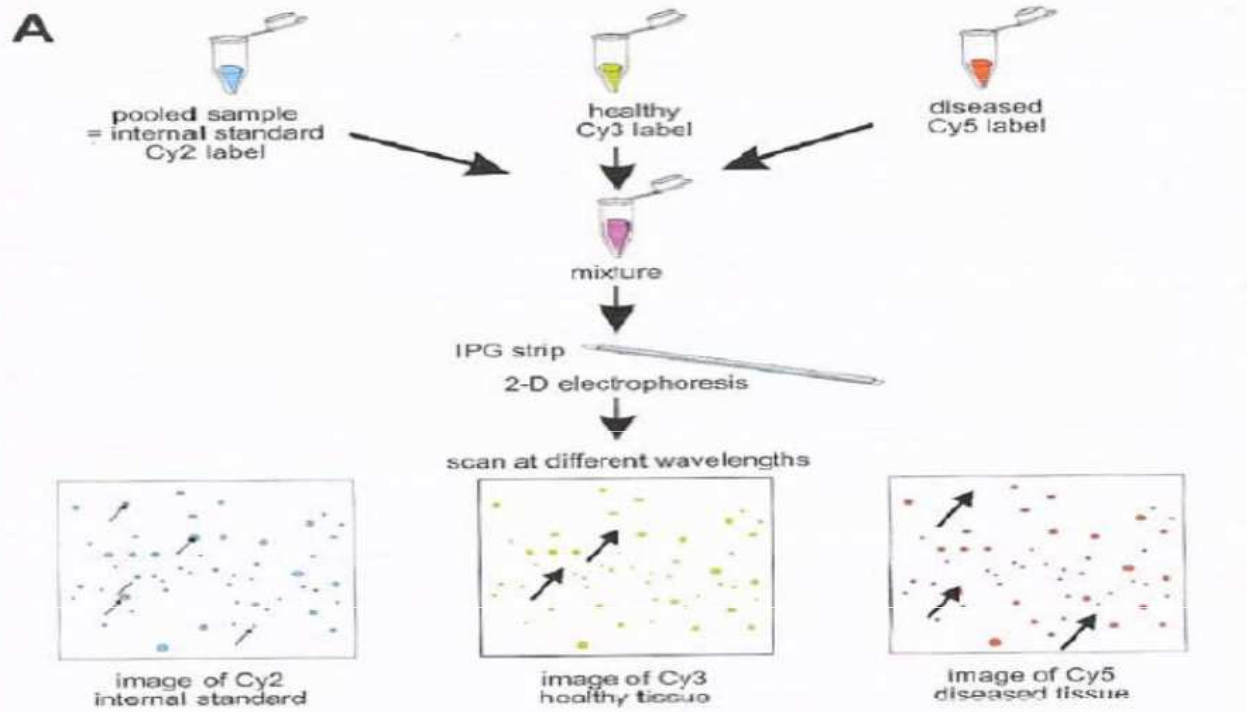
[142, 129] -> [1st: 127 2nd: 184]











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

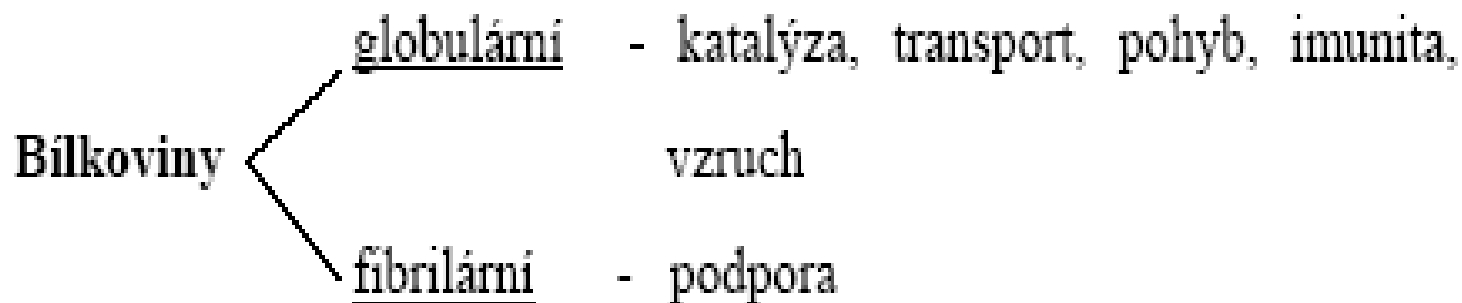
# Rozdělení bílkovin

## 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      $\Rightarrow$      prosthetická skupina + apoprotein

Fosfoproteiny -  $H_3PO_4$

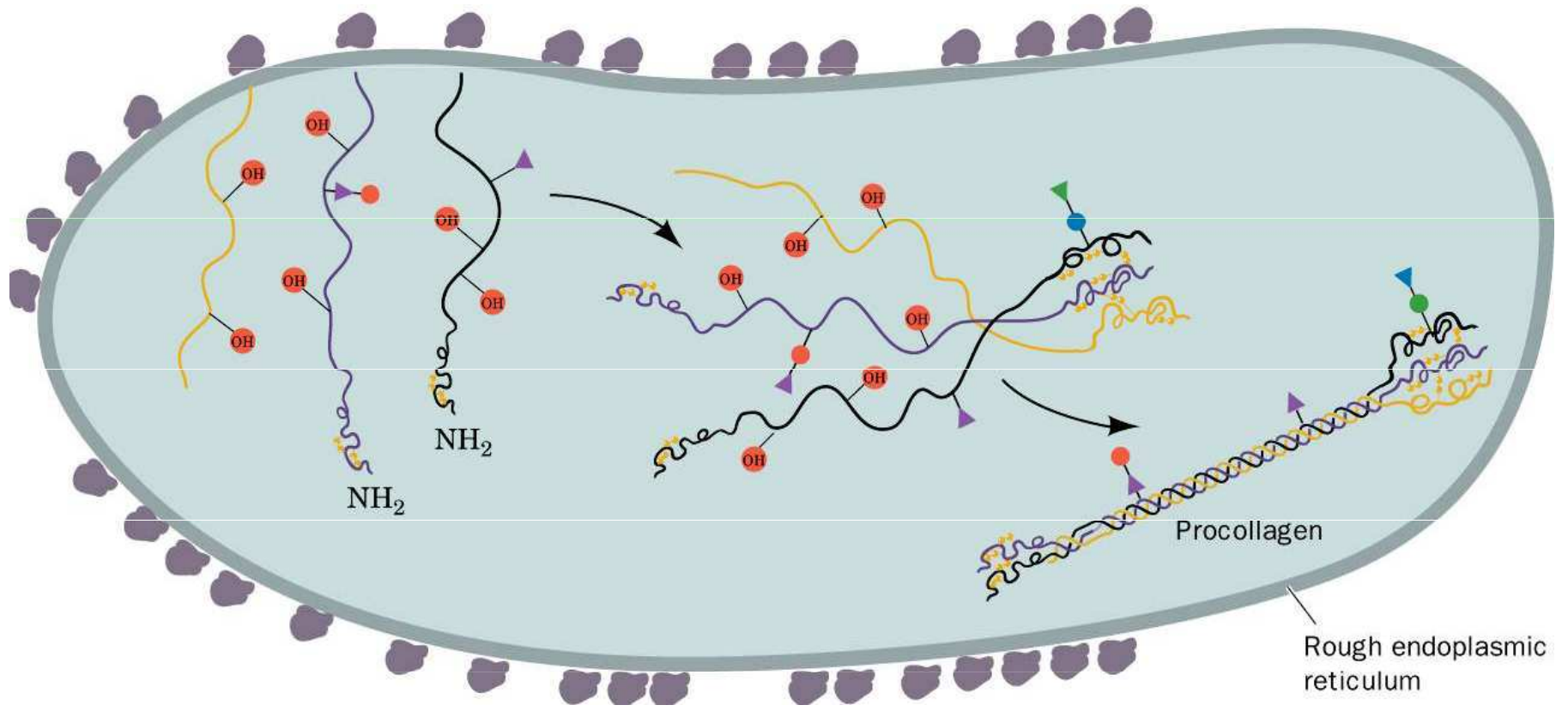
Glykoproteiny - cukry

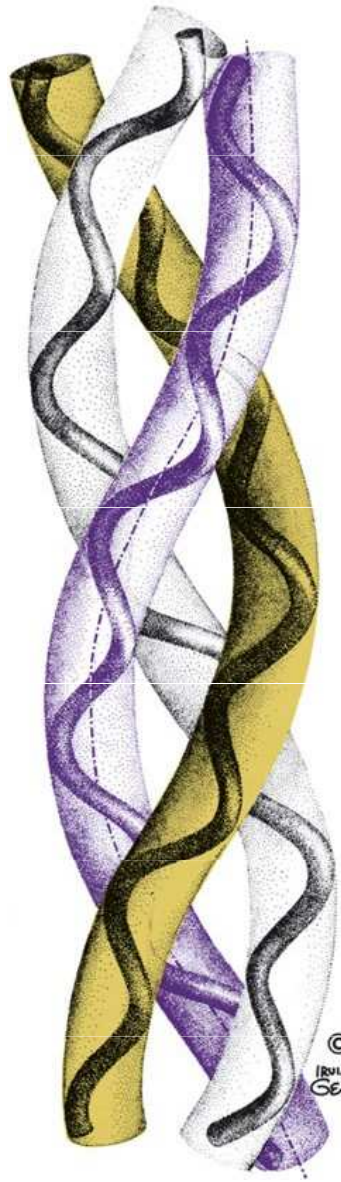
Metaloproteiny - kovy

Lipoproteiny - lipidy

Nukleoproteiny - nukleové kyseliny

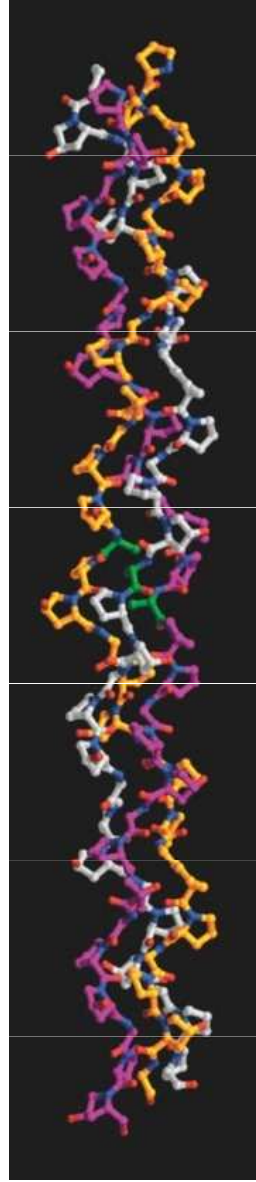






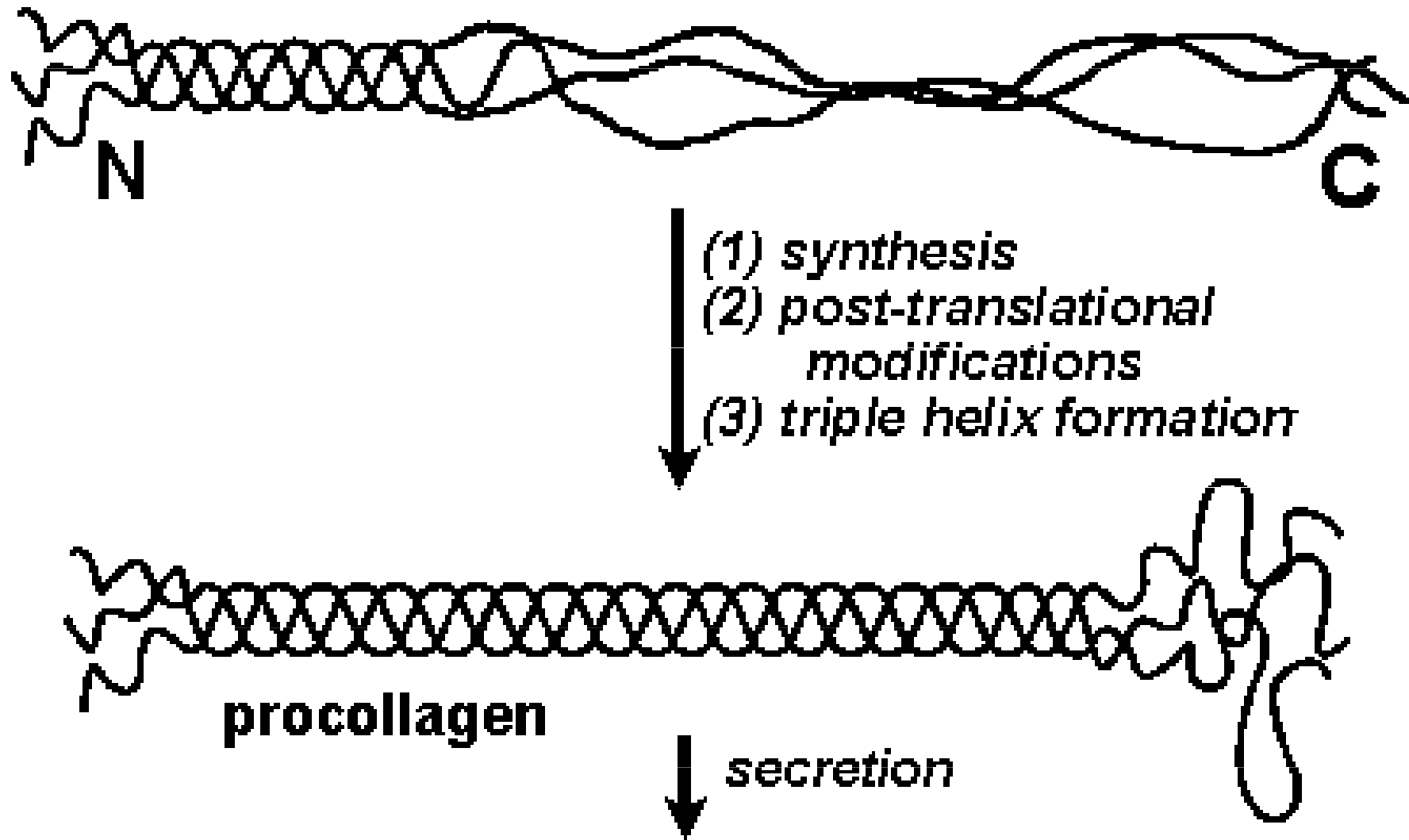
©  
IRVING  
GEIS

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

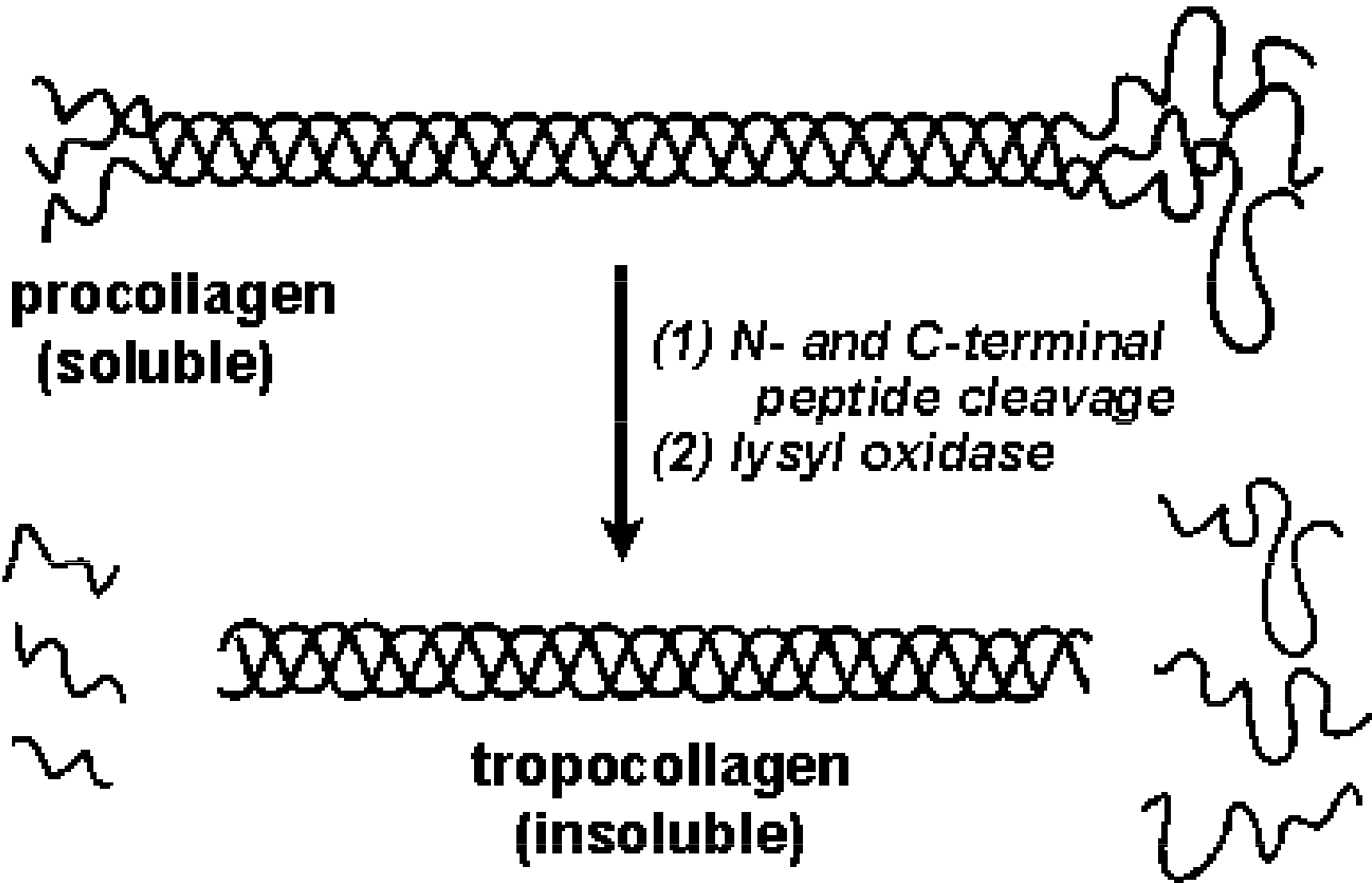




## Formation of collagen: intracellular processing

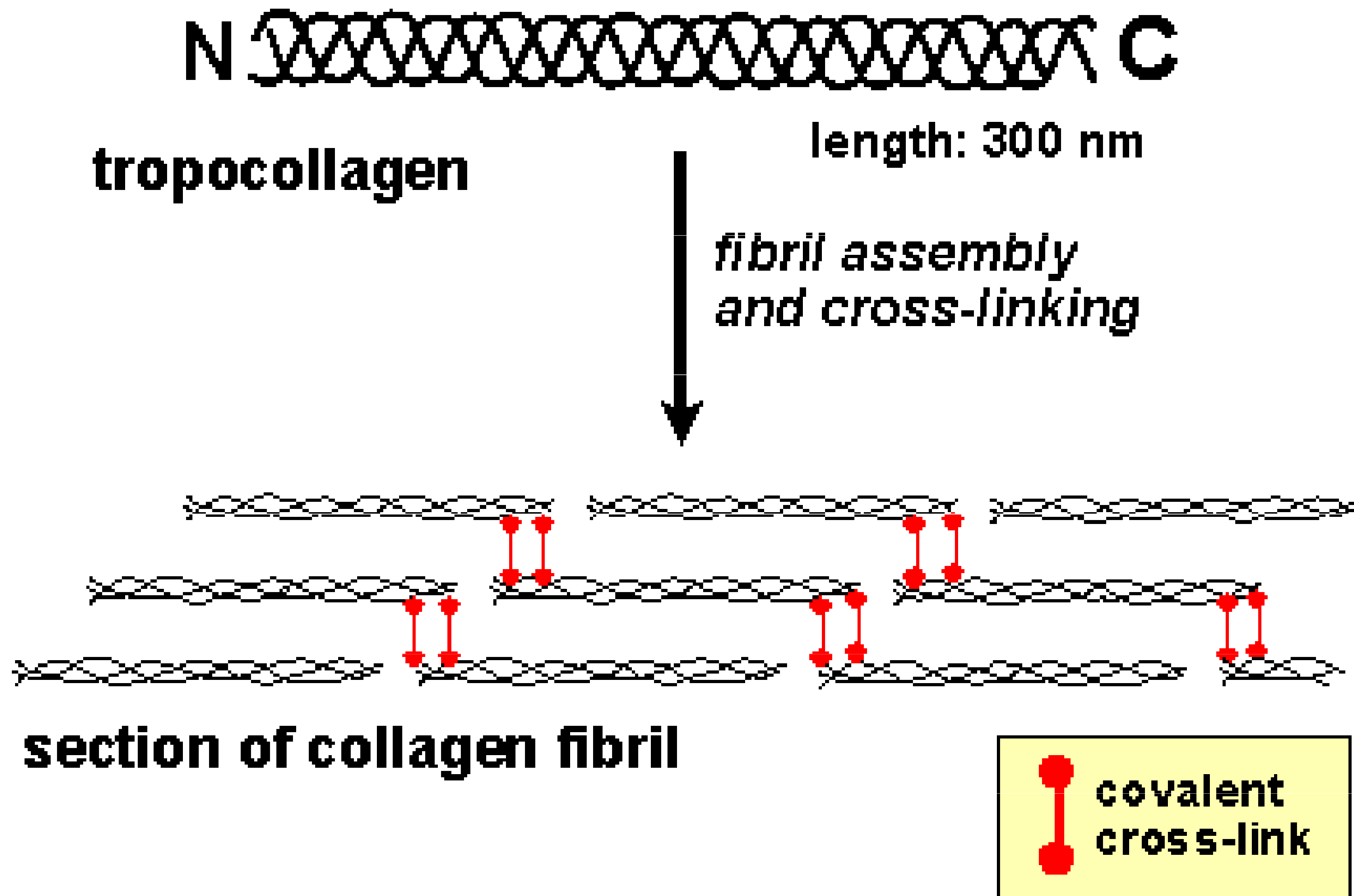


# Formation of collagen: extracellular processing





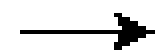
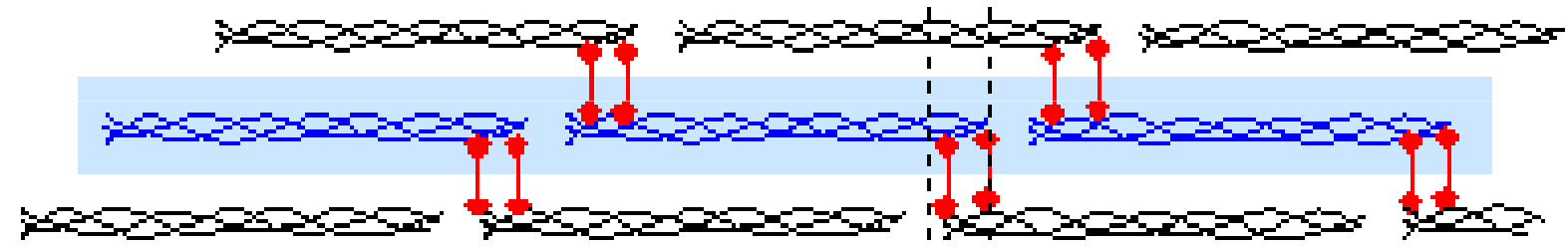
# Formation of collagen: extracellular processing



# Formation of collagen: extracellular processing

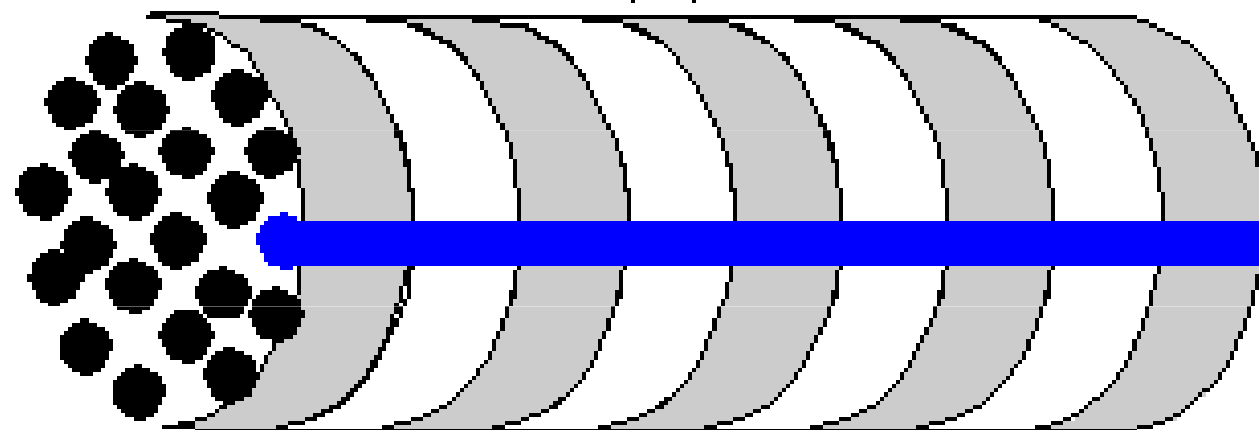
↓ *fibril assembly  
and cross-linking*

**section of collagen fibril**

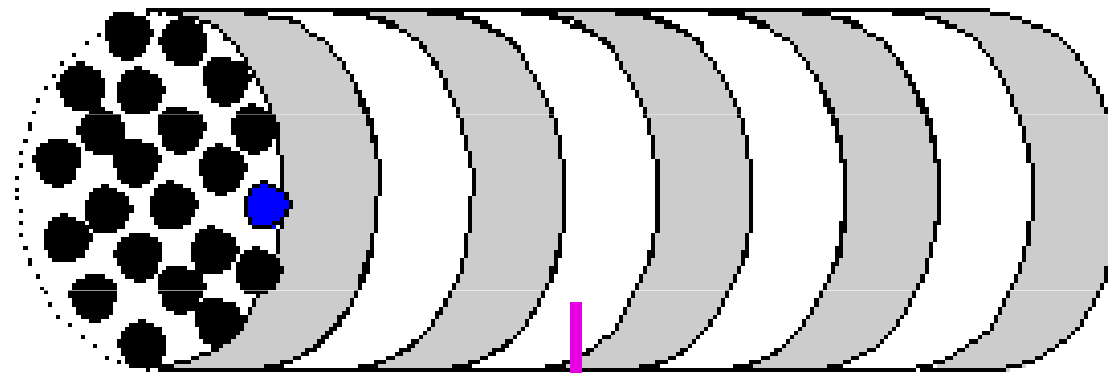


← 64-67 nm  
"quarter-staggered array"

**collagen fibril**



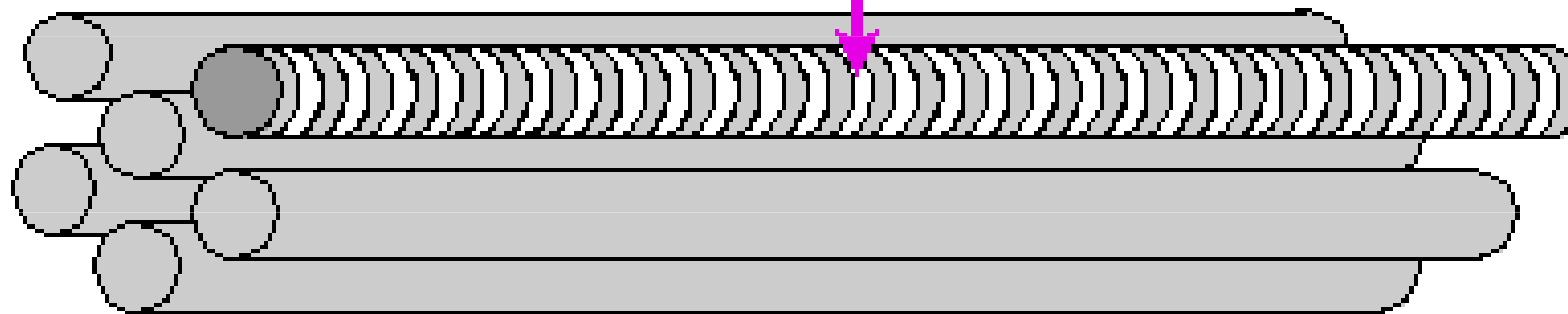
# Formation of collagen: extracellular processing



**collagen fibril**

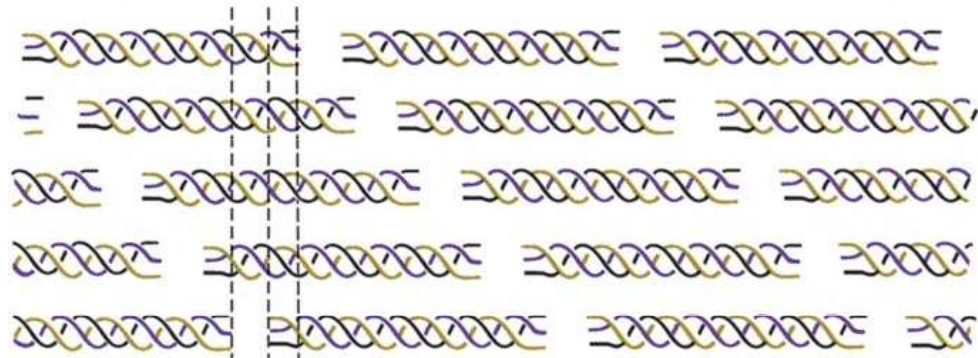
*aggregation*

**collagen fiber**

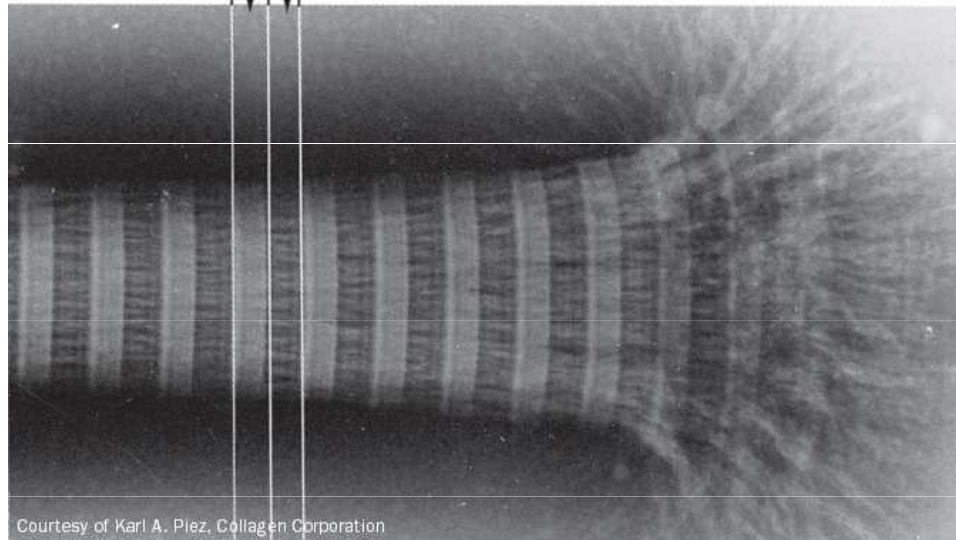


Collagen molecule 

Packing of molecules

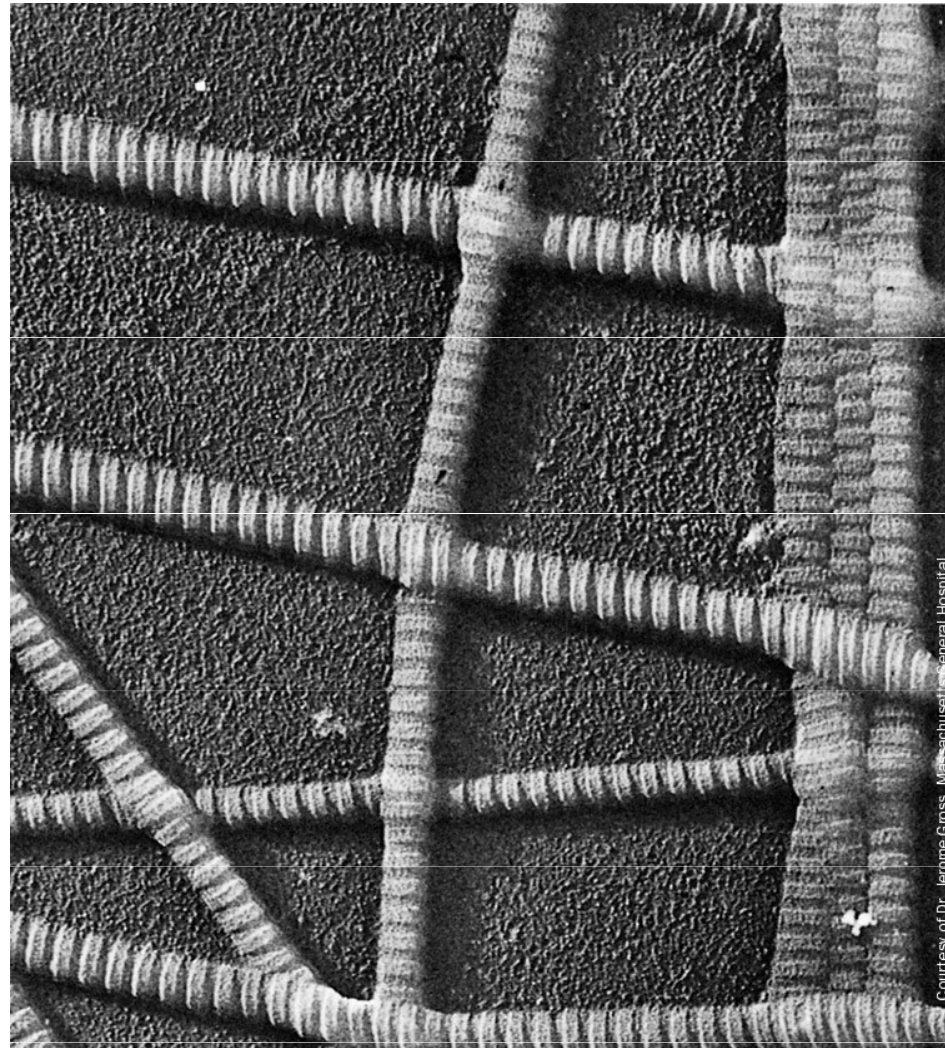


Hole zone  $0.6D$       Overlap zone  $0.4D$



Courtesy of Karl A. Piez, Collagen Corporation

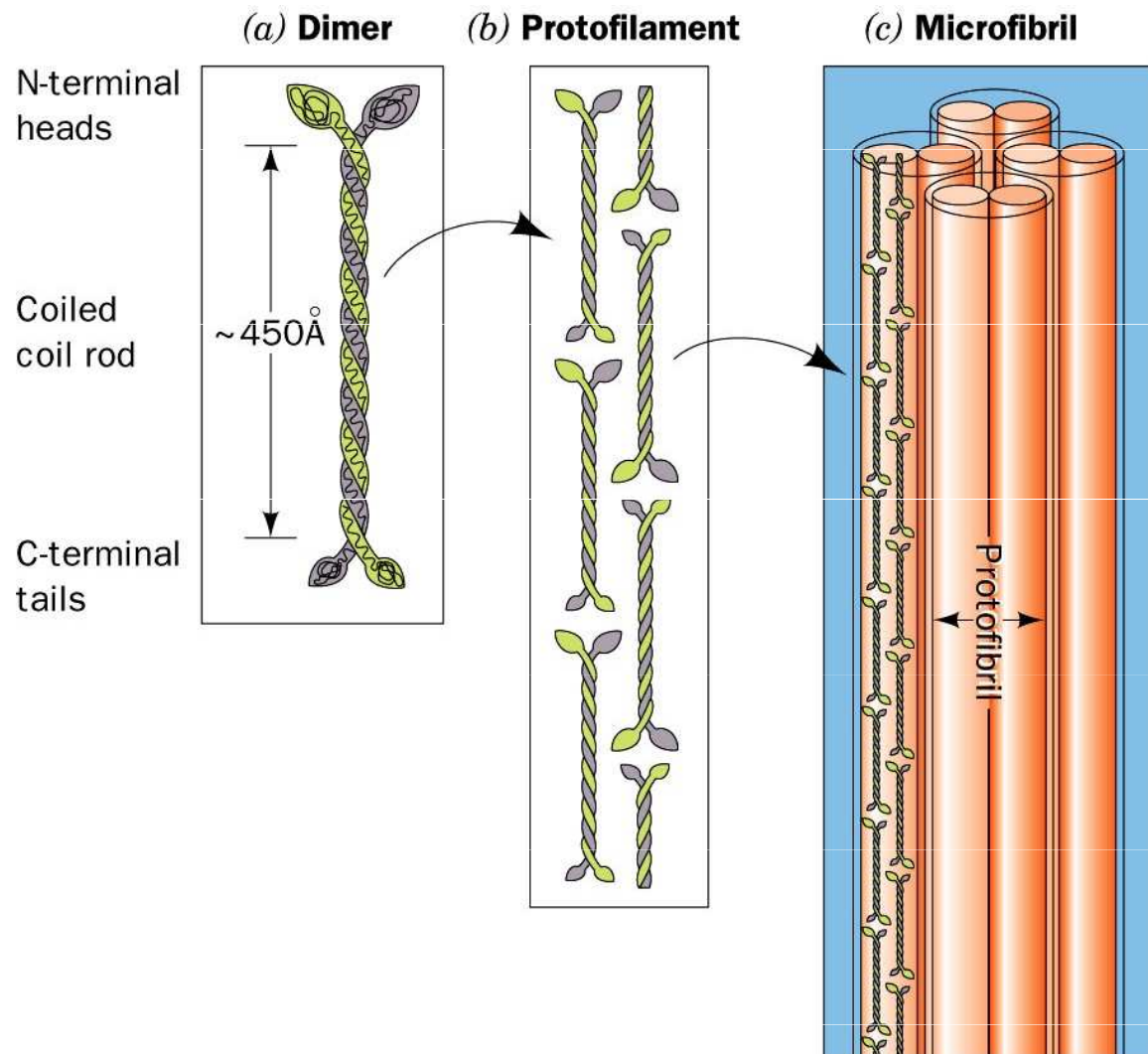
# Kolagen v kůži



Courtesy of Dr. Jerome Gross, Massachusetts General Hospital



# $\alpha$ - keratin



(Four  $\alpha$ -keratins twisted into a left-handed superhelix  
each  $\alpha$ -keratin is coiled into a right-handed  $\alpha$ -helix)

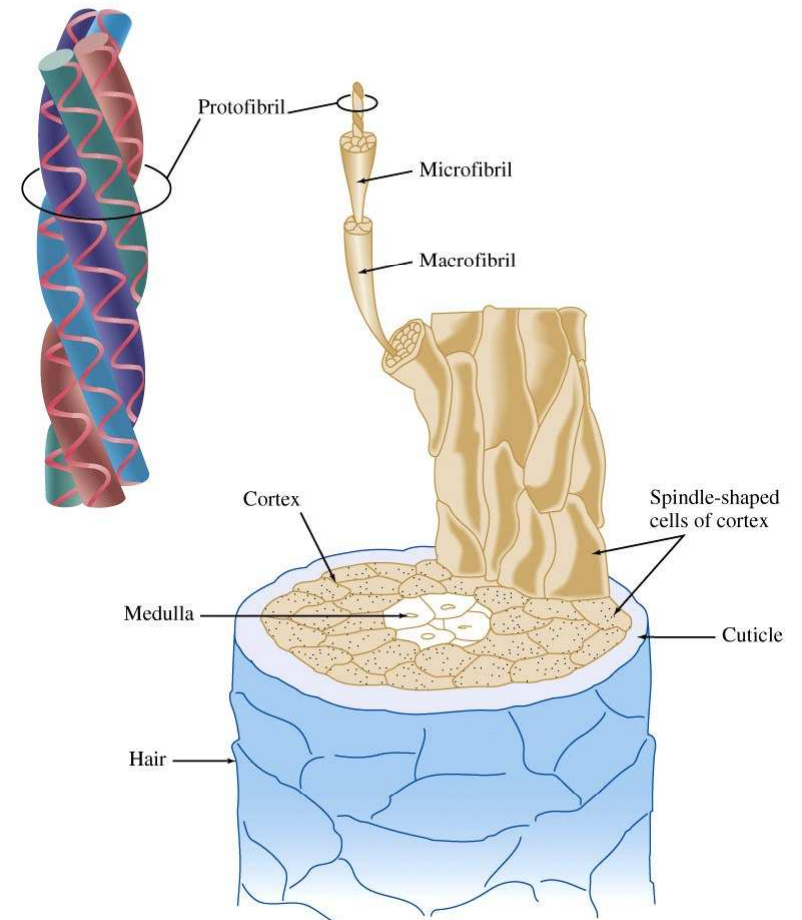
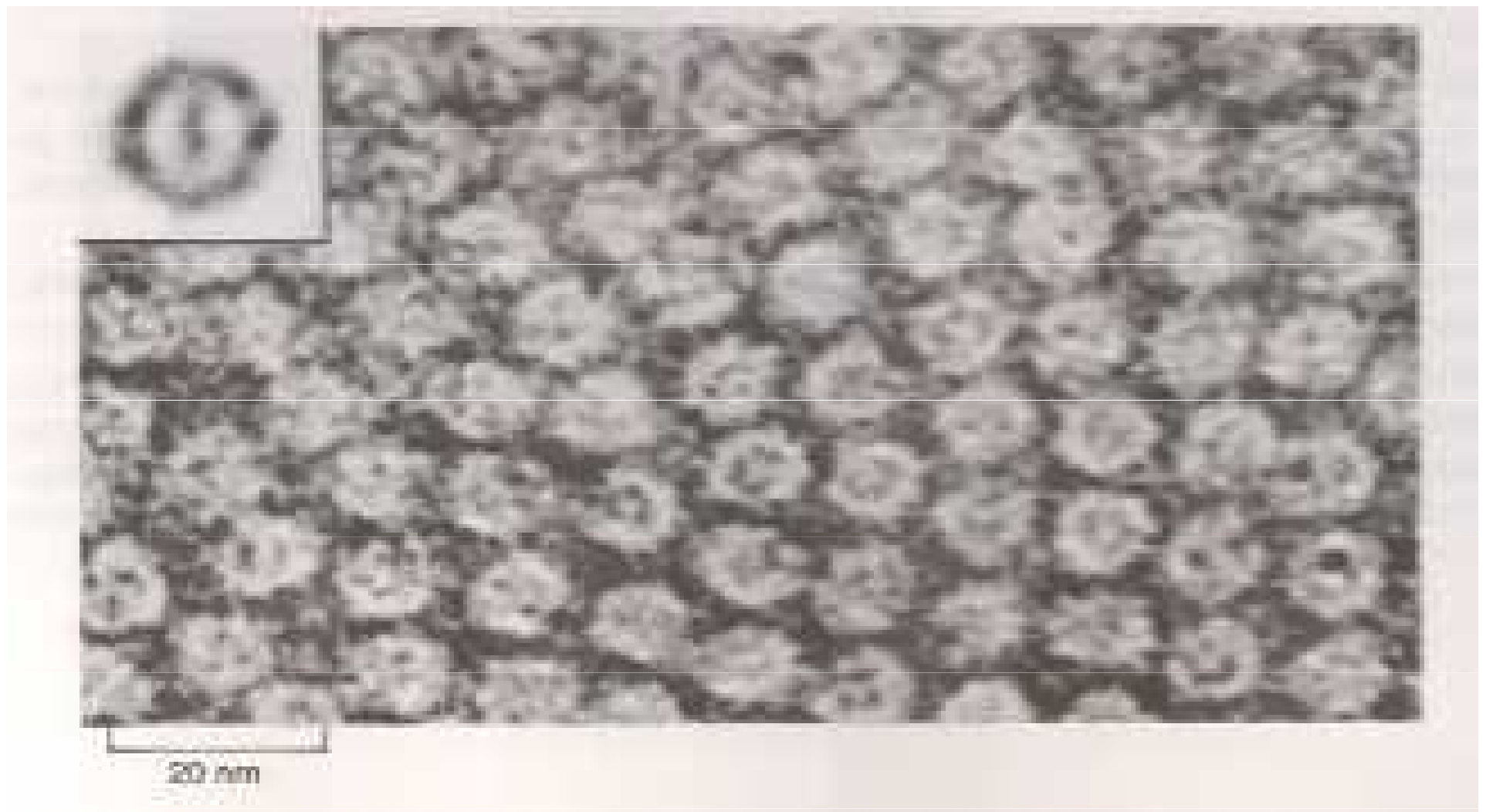
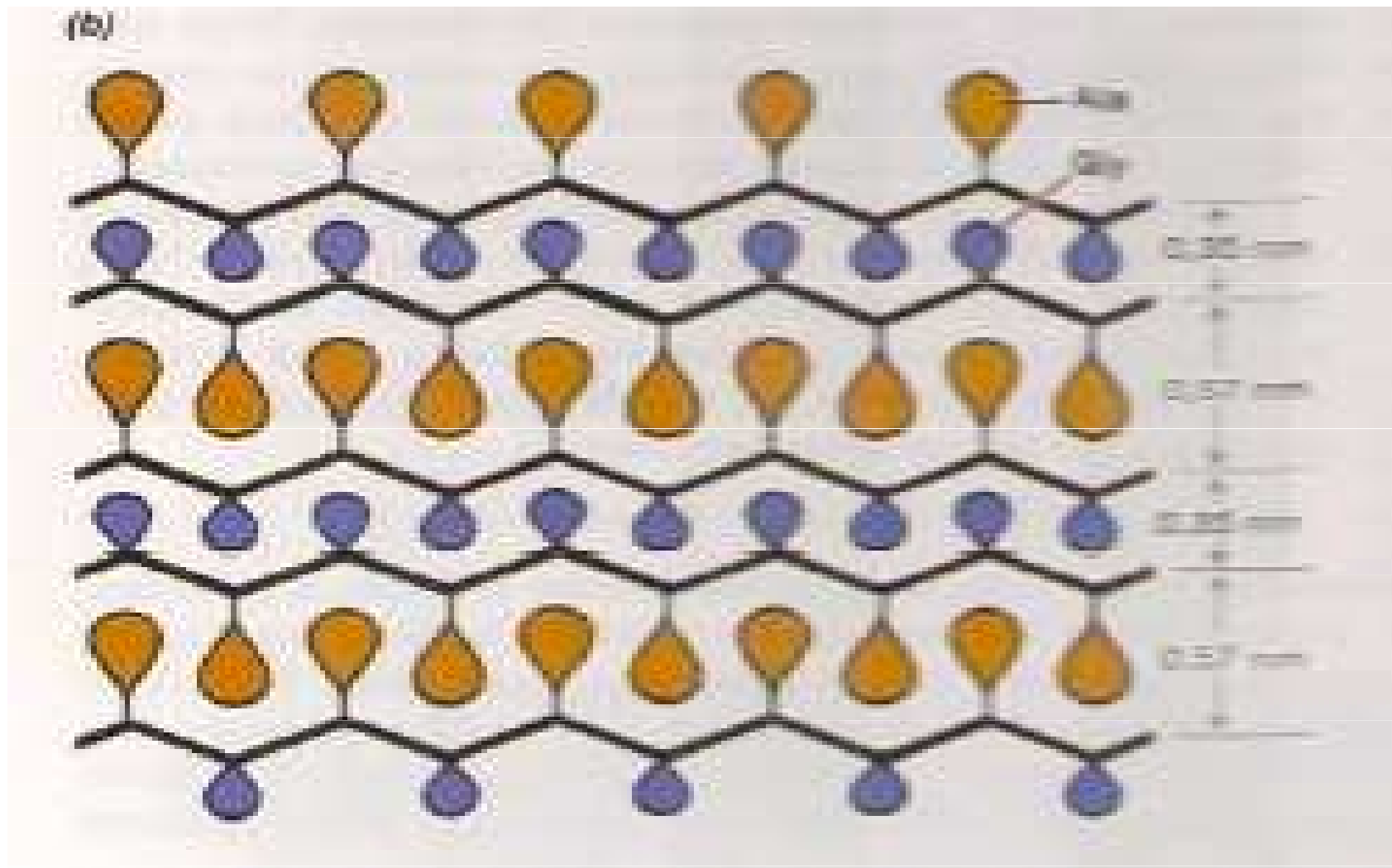


Figure 4-25 Concepts in Biochemistry, 3/e  
© 2006 John Wiley & Sons

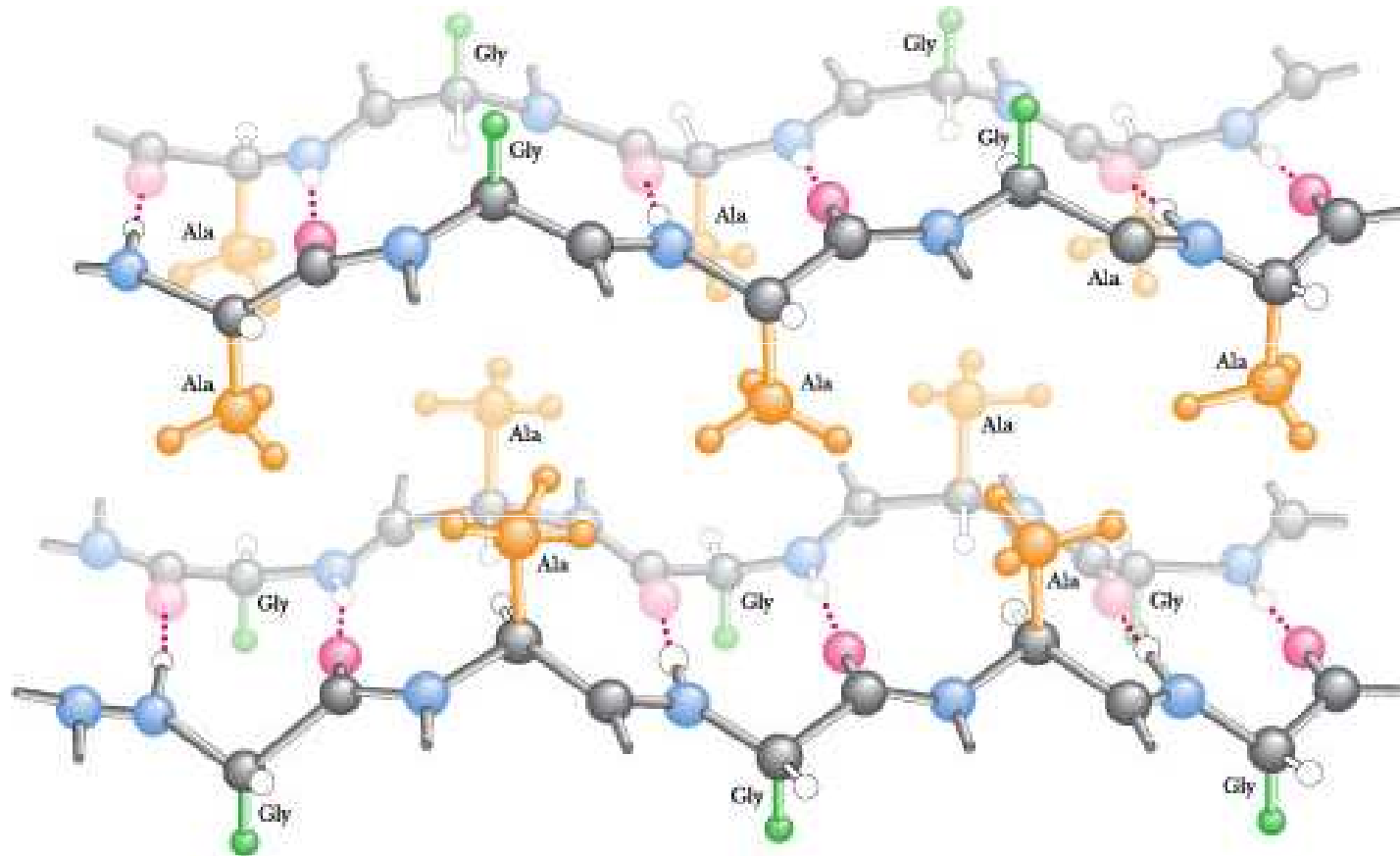
# $\alpha$ – keratin - vlas



# $\beta$ - keratin



# $\beta$ - keratin



# Elastin

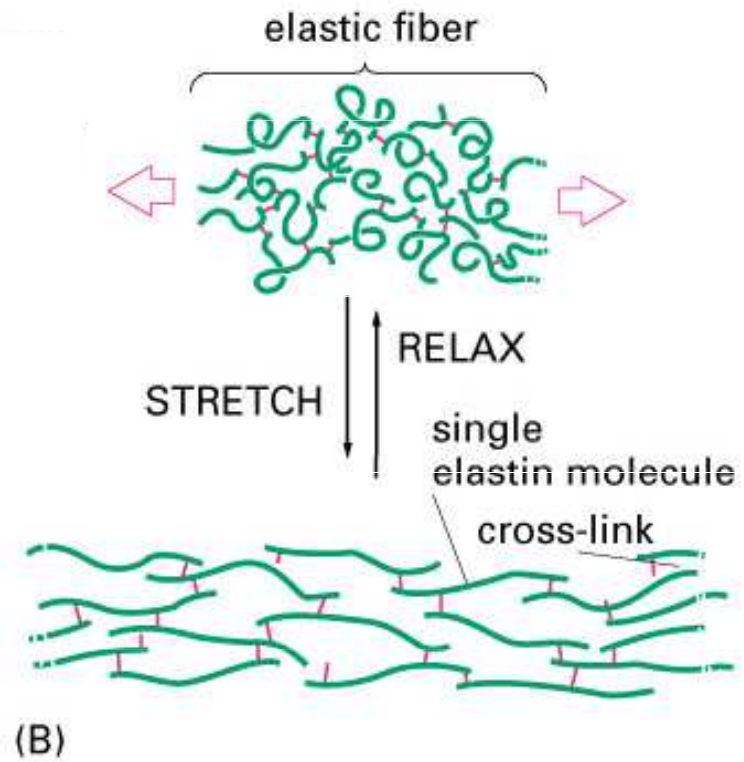
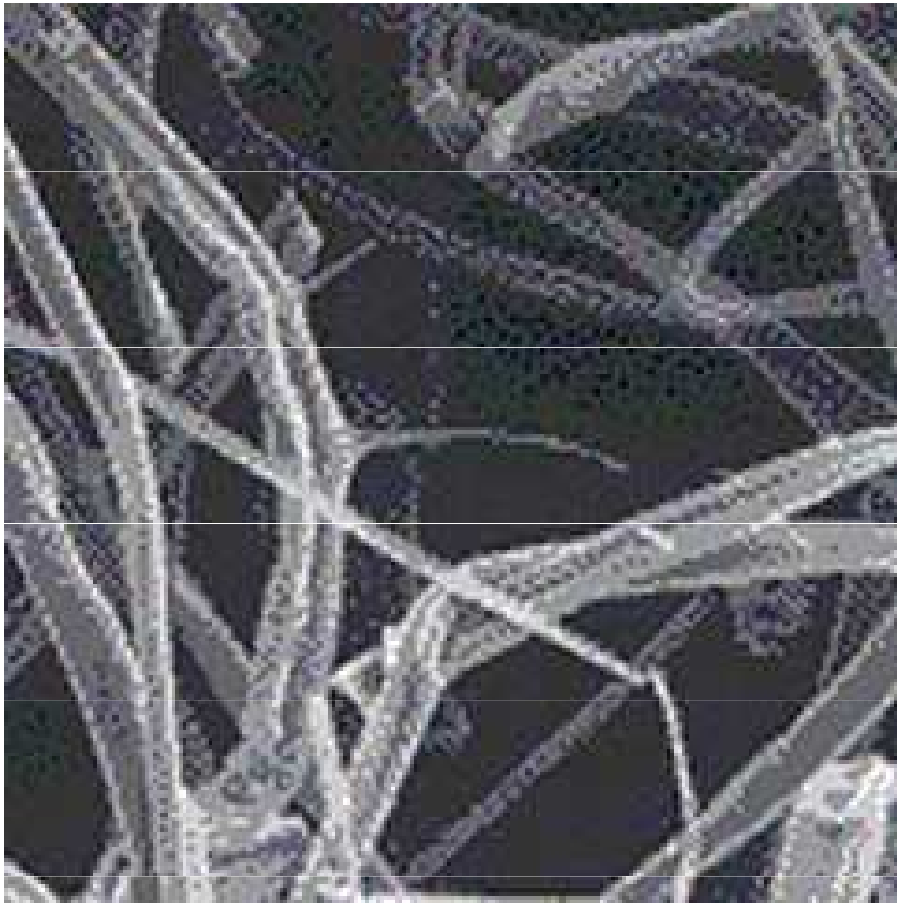


Figure 4-28 Essential Cell Biology, 2/e. (© 2004 Garland Science)