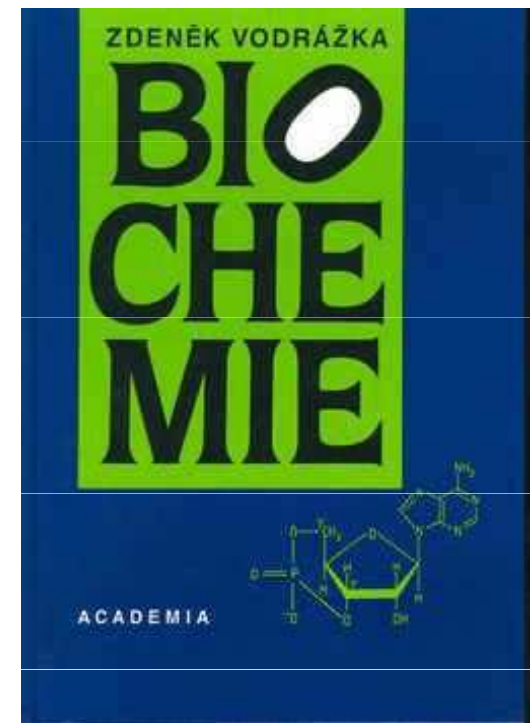


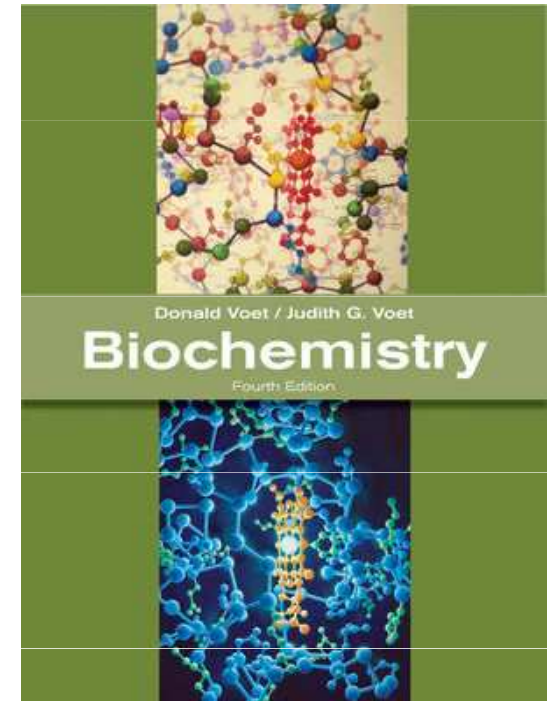
Biochemie

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

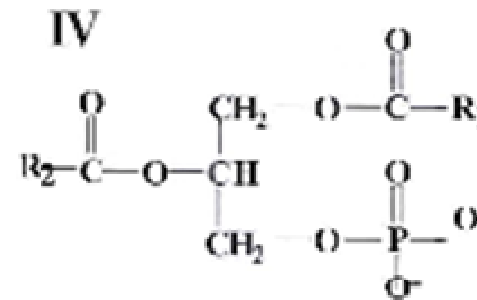
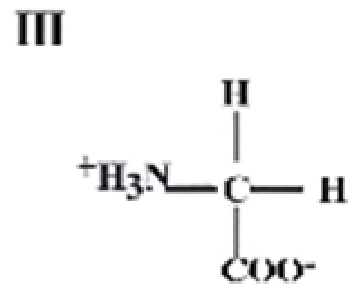
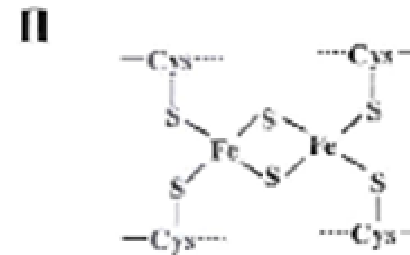
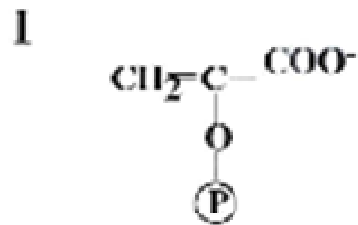
11. METABOLISMUS BÍLKOVIN

12. REGULACE BIOCHEMICKÝCH PROCESŮ

13. MOLEKULÁRNÍ FYZIOLOGIE

14. XENOBIOCHEMIE

Zkouška z biochemie

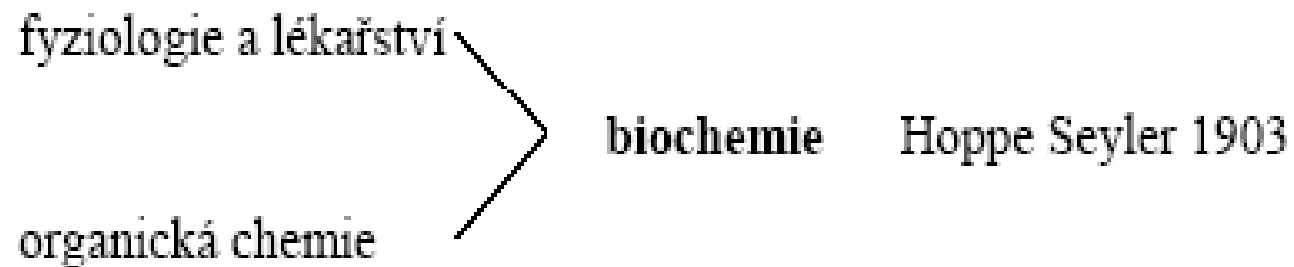


1. Metody purifikace bílkovin
2. Kinetika jednosubstrátové enzymové reakce
3. Biosyntéza mastných kyselin

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

BIOCHEMIE

**Hoppe Seyler
1903**

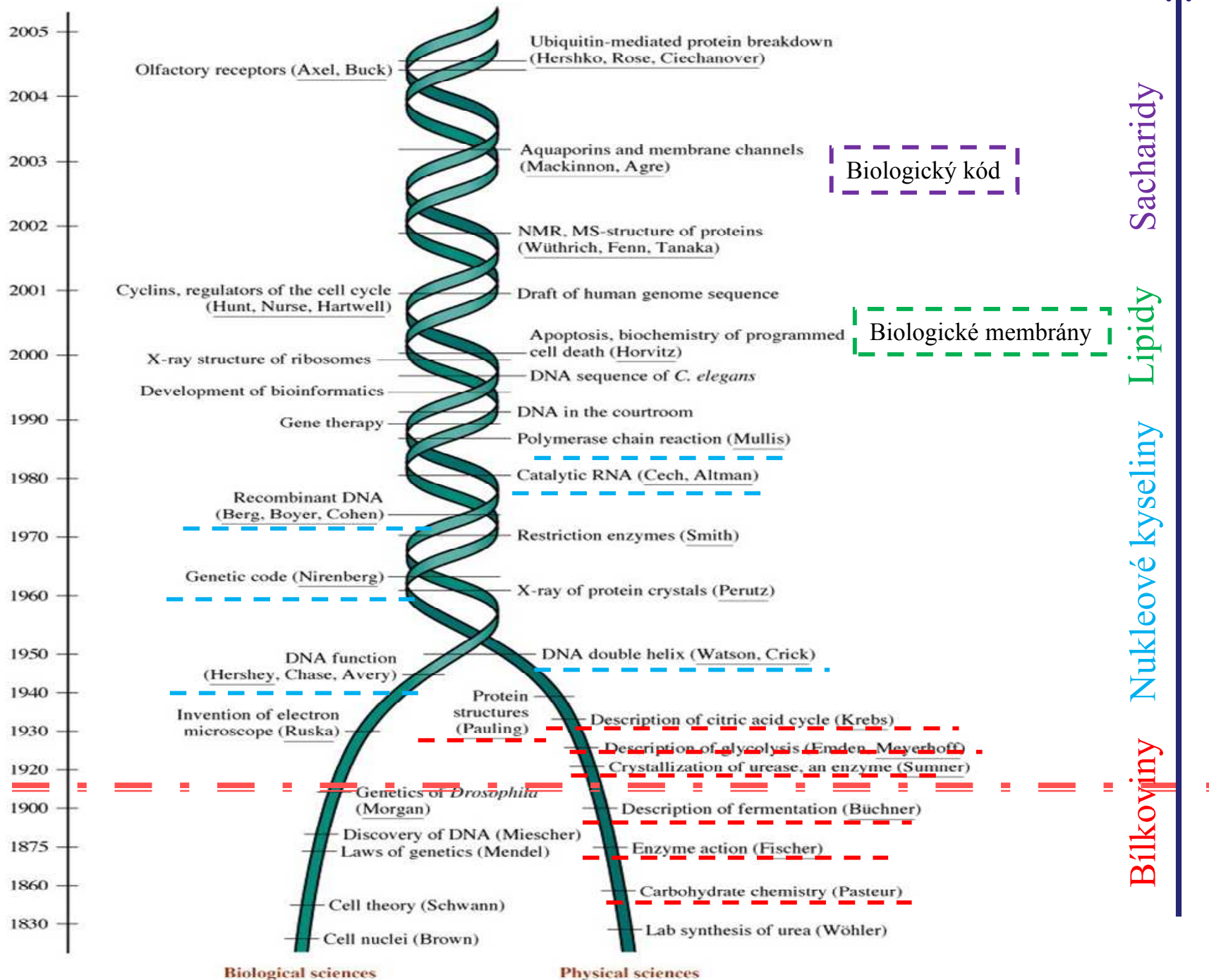
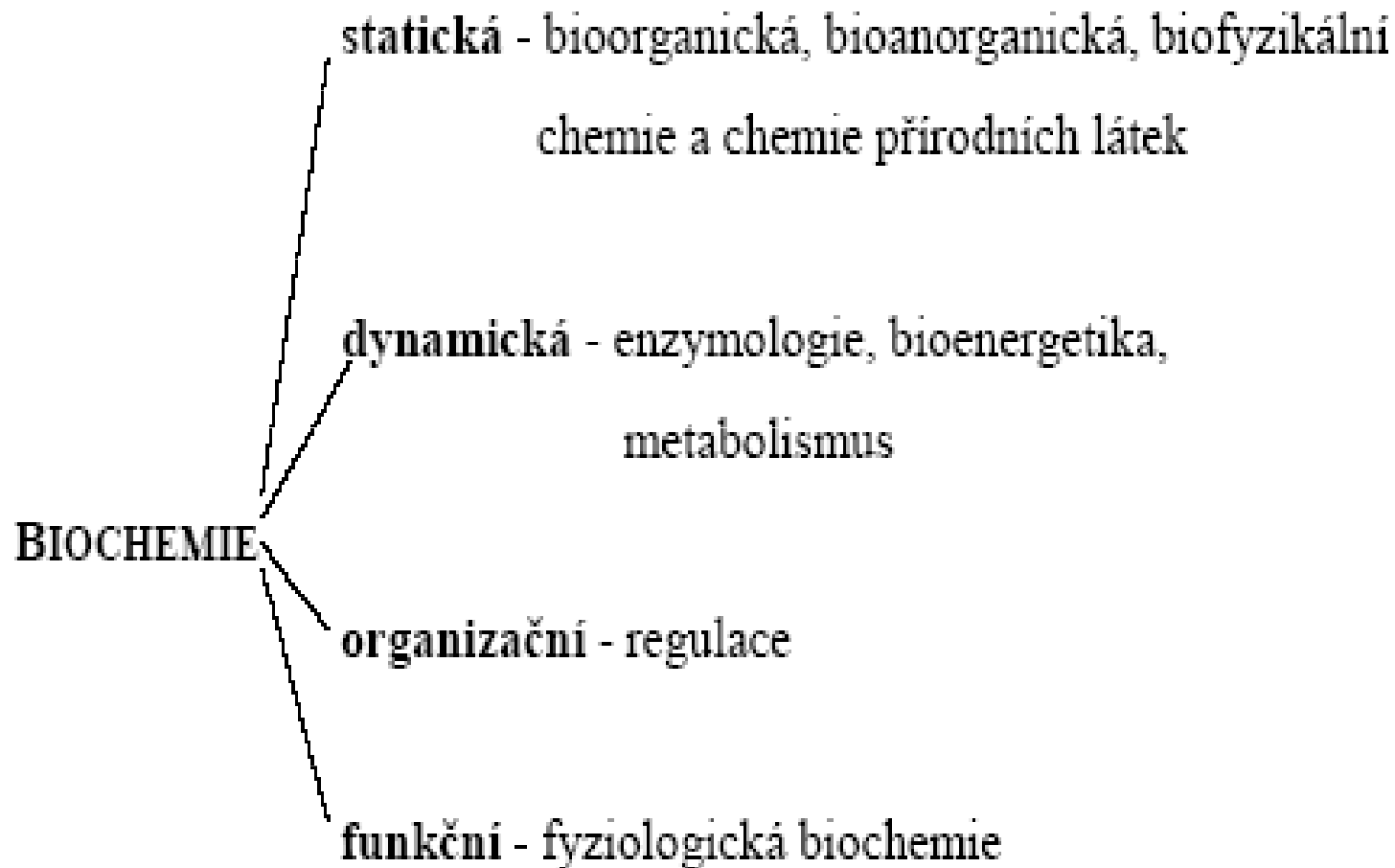
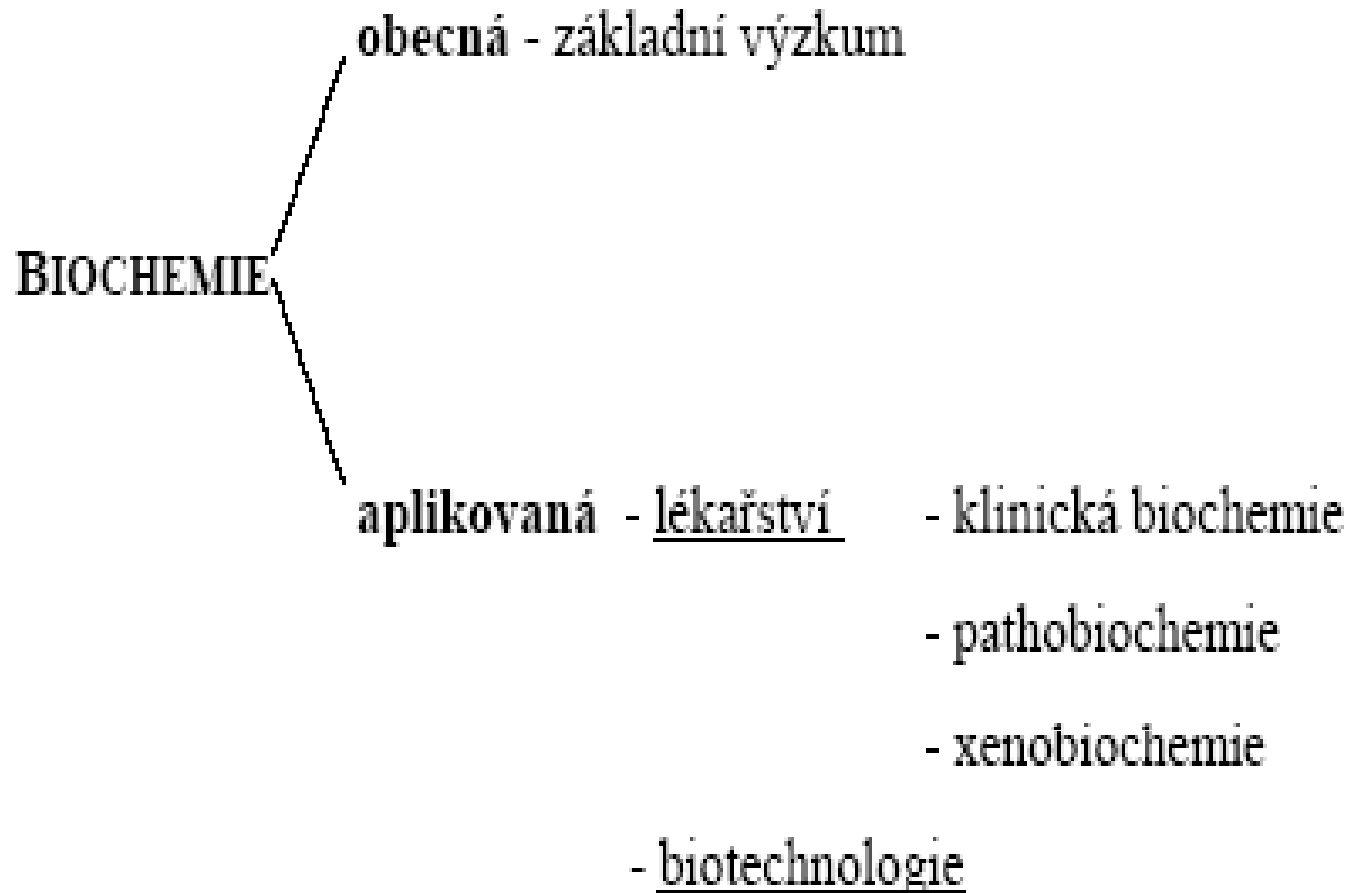


Figure 1-2 Concepts in Biochemistry, 3/e
© 2006 John Wiley & Sons

Dvě období : A. období statické biochemie

B. období dynamické biochemie





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

- Interpretace genetiky na základě struktury NK
- Trojrozměrná struktura biomolekul

**MOLEKULÁRNÍ
BIOLOGIE**
Astbury
1961

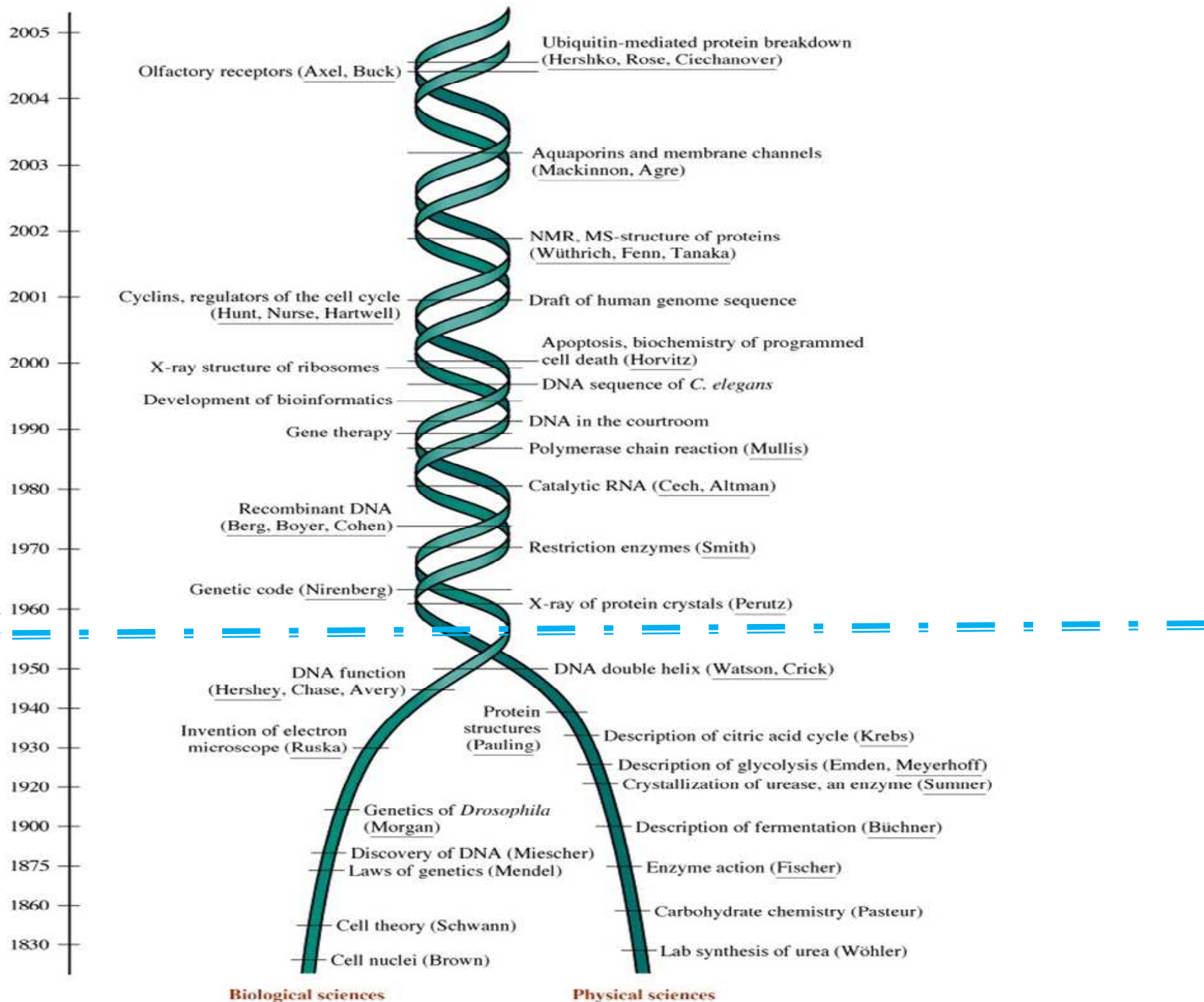
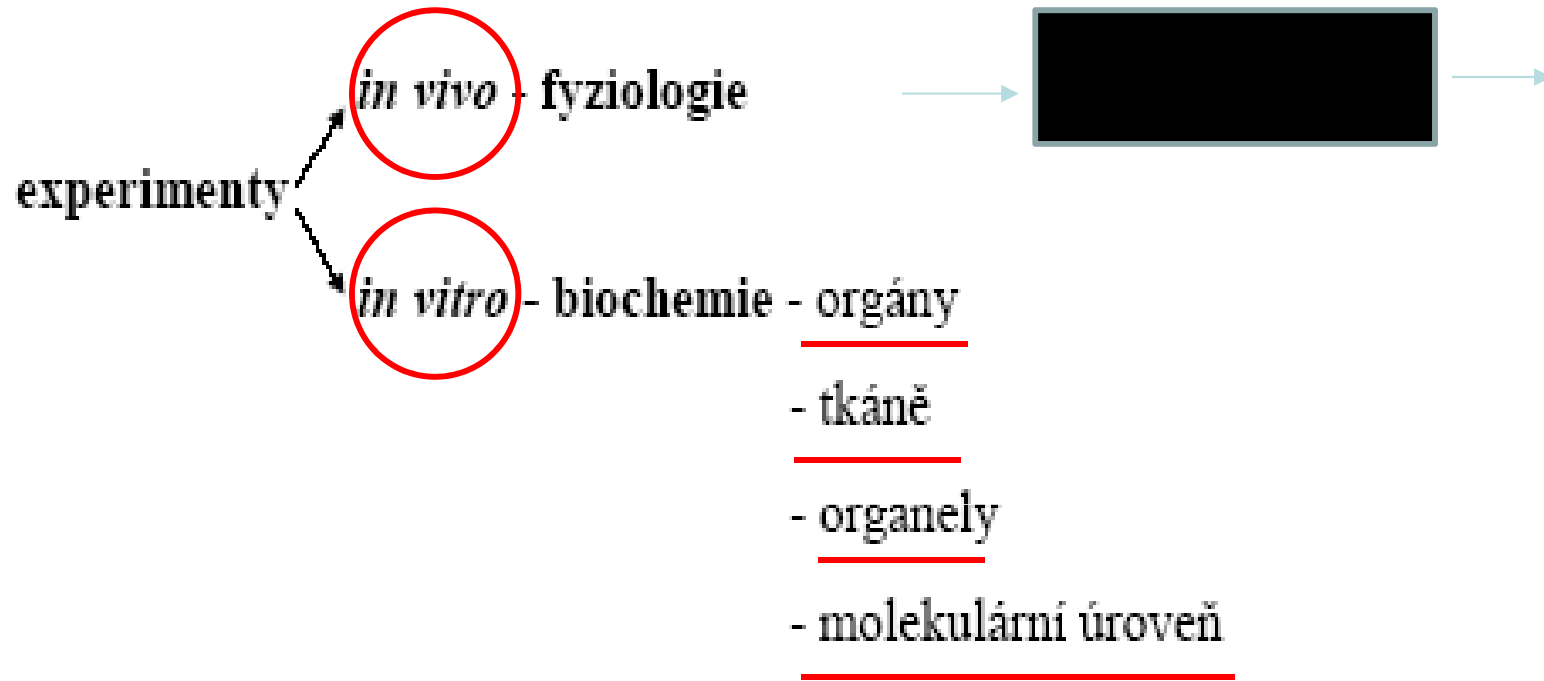


Figure 1-2 Concepts in Biochemistry, 3/e
© 2006 John Wiley & Sons

Biochemické metody :



O. von Warburg (NC 1931) Výsledky pokusu *in vitro* nesmí být v rozporu se situací *in vivo*

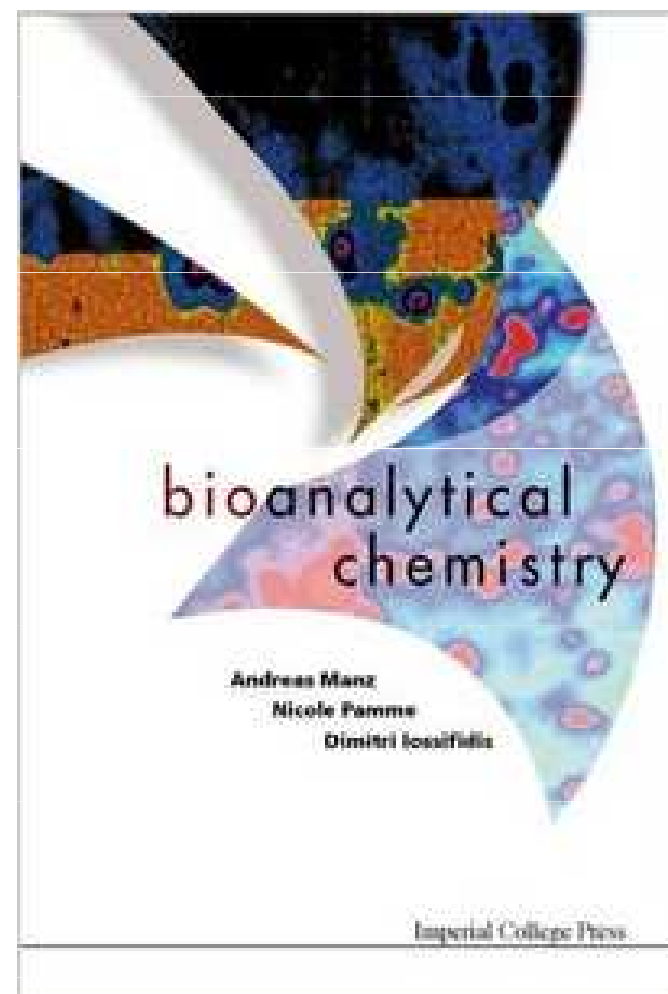
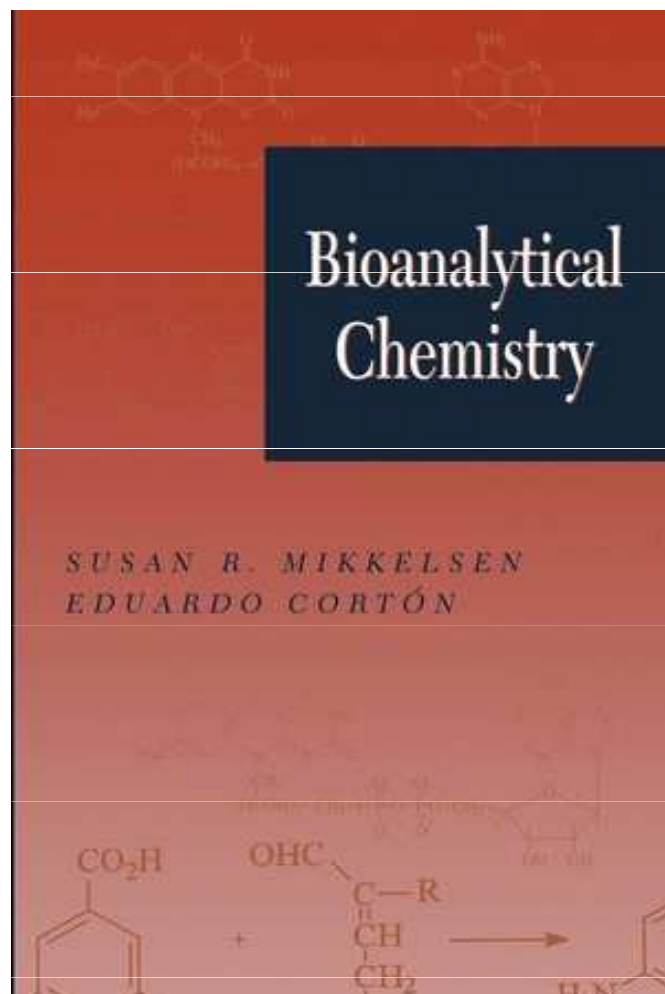
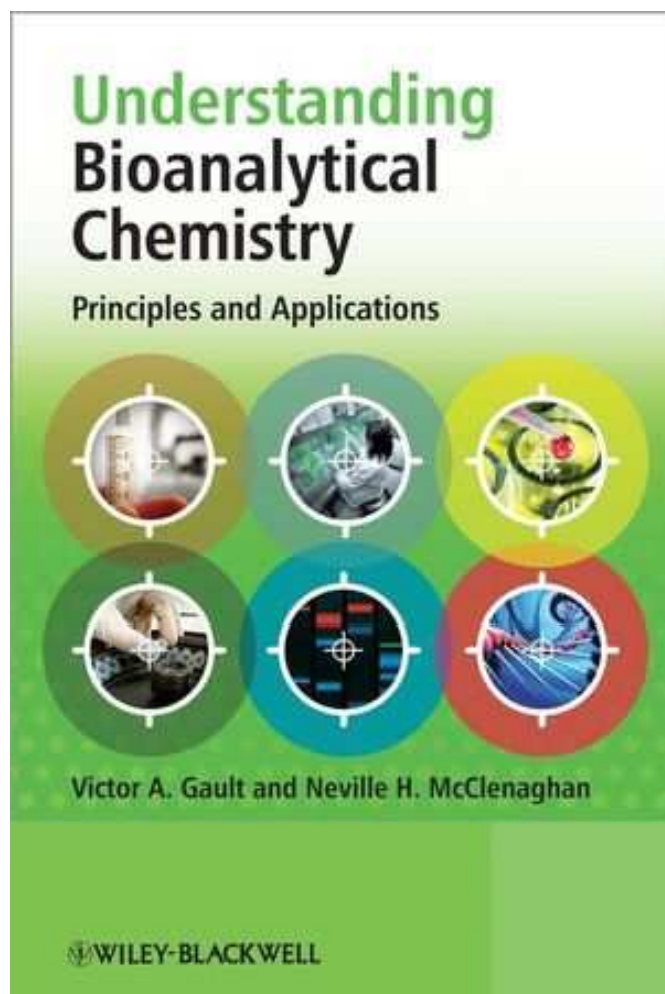
Problémy se vzorkem - práce s komplexními vzorky

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

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

- **XXX** základní makroprvky (makrobiogenní)
- **YYY** další makroprvky (mikrobiogenní)
- **ZZZ** mikroprvky (stopové)

Prvkové složení vesmíru, zemské kůry a člověka

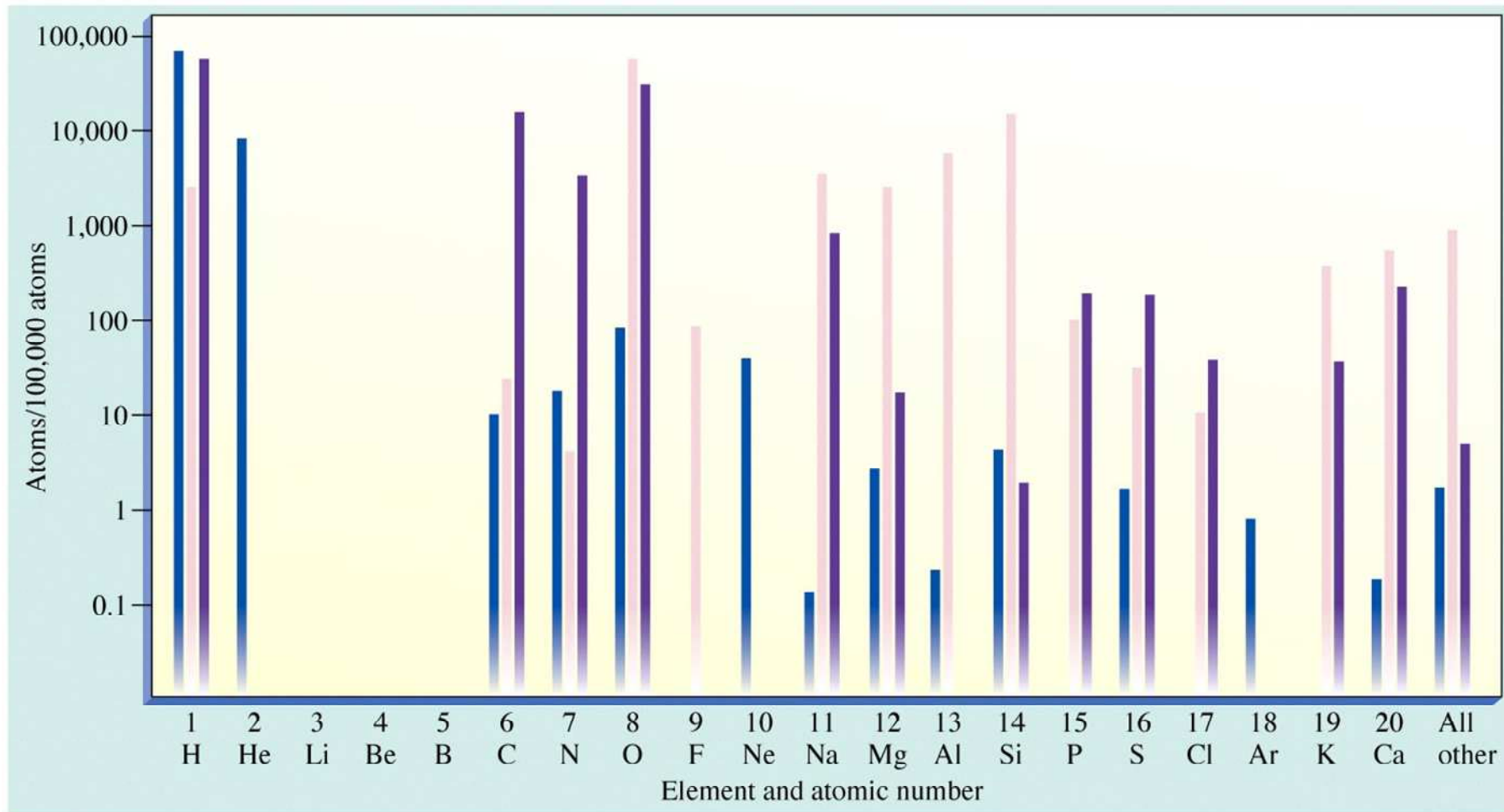


Figure 1-4 Concepts in Biochemistry, 3/e
© 2006 John Wiley & Sons

Porovnání zastoupení základních biogenních prvků v živé a neživé hmotě

Chemický prvek	Průměrné zastoupení v živé hmotě (v %)	Průměrné zastoupení v neživé hmotě (v %)
Uhlík	19,37 %	0,18 % (Si)
Kyslík	62,80 %	49,40 %
Vodík	9,31 %	0,95 %
Dusík	5,14 %	0,63 %

LÁTKOVÉ SLOŽENÍ ORGANISMŮ

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

Anorganické látky - voda

- Na, K, Cl⁻, SO₄⁻, HCO₃⁻, HPO₄²⁻,

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

- plyny - O₂, N₂, CO₂, NO

Organické látky - vysokomolekulární - biopolymery

- bílkoviny

- nukleové kyseliny

- sacharidy

- lipidy ??

Voda

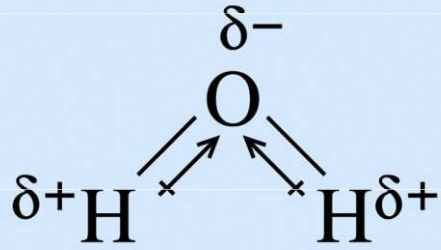
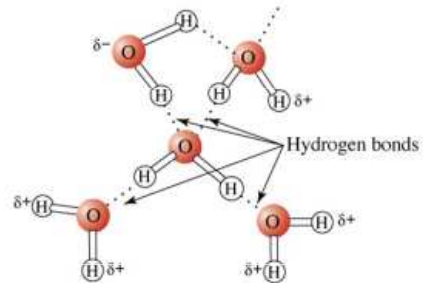
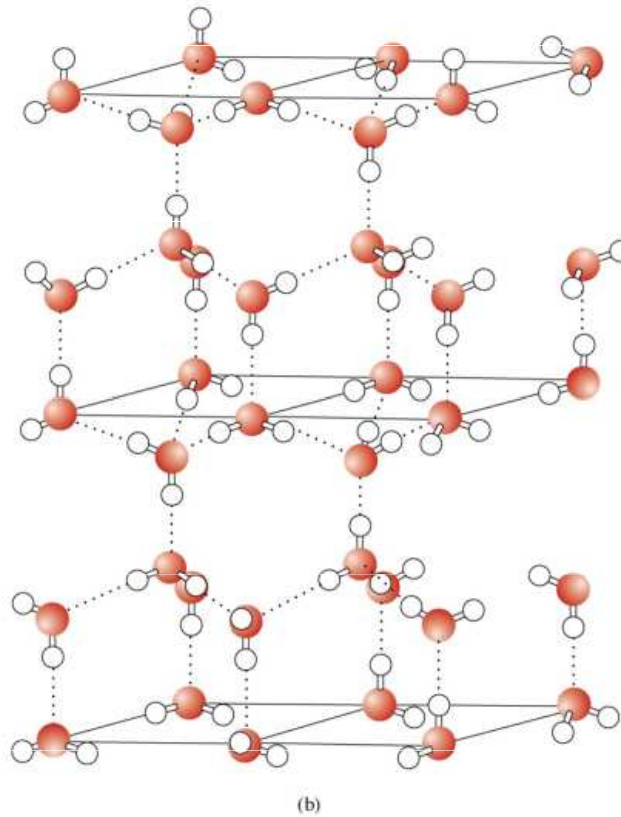
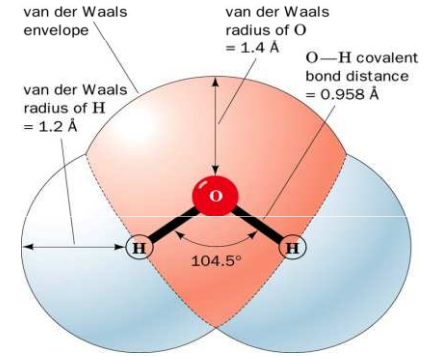


Figure 2-1b Concepts in Biochemistry, 3/e
© 2006 John Wiley & Sons



(a)

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

Voda

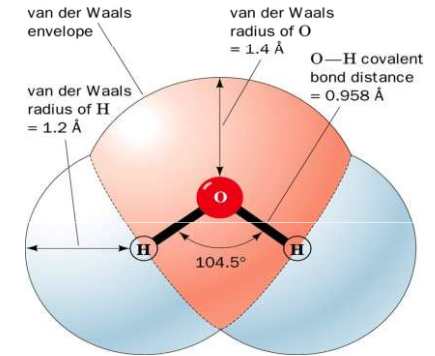
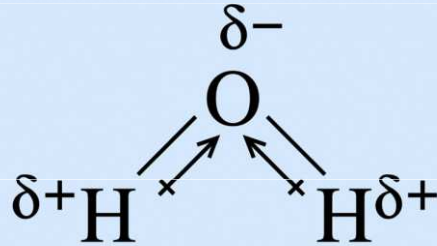


Figure 2-1b Concepts in Biochemistry, 3/e
© 2006 John Wiley & Sons

Table 2.3

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

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

^aUnits are centipoise.

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

Voda

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

Anorganické látky

- Na, K, Cl⁻, SO₄⁻, HCO₃⁻, HPO₄²⁻,

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

- plyny - O₂, N₂, CO₂, NO

5 %

Organické látky

- vysokomolekulární - biopolymery

- bílkoviny

- nukleové kyseliny

- sacharidy

- lipidy

95 %

**S
u
š
i
n
a**

Obecný princip výstavby biopolymerů :

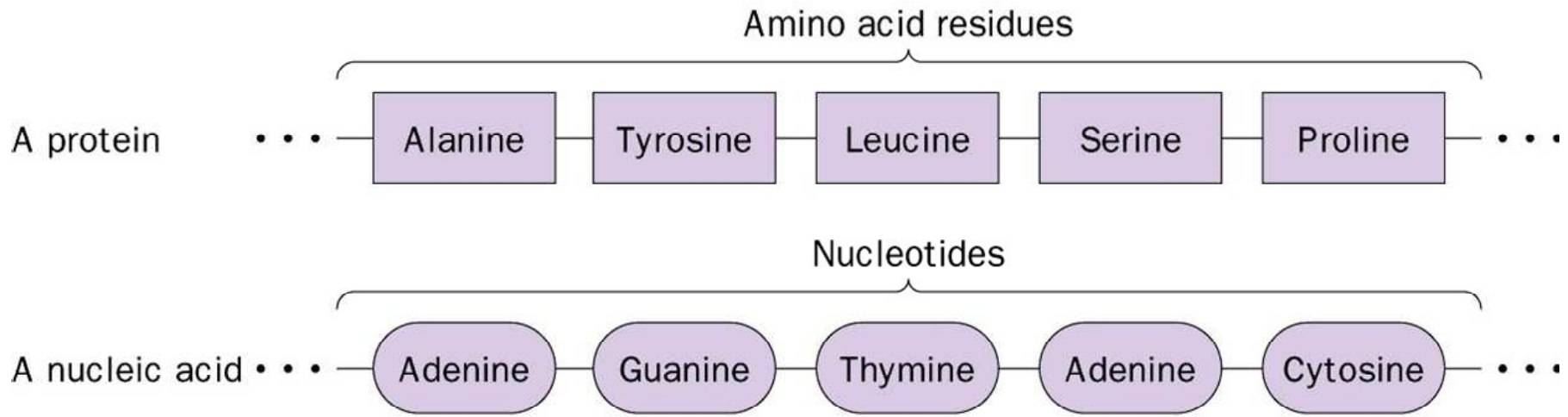
1. Jsou tvořeny monomery
2. Monomery vytvářejí lineární řetězce
3. Monomery jsou spojovány jediným typem vazby

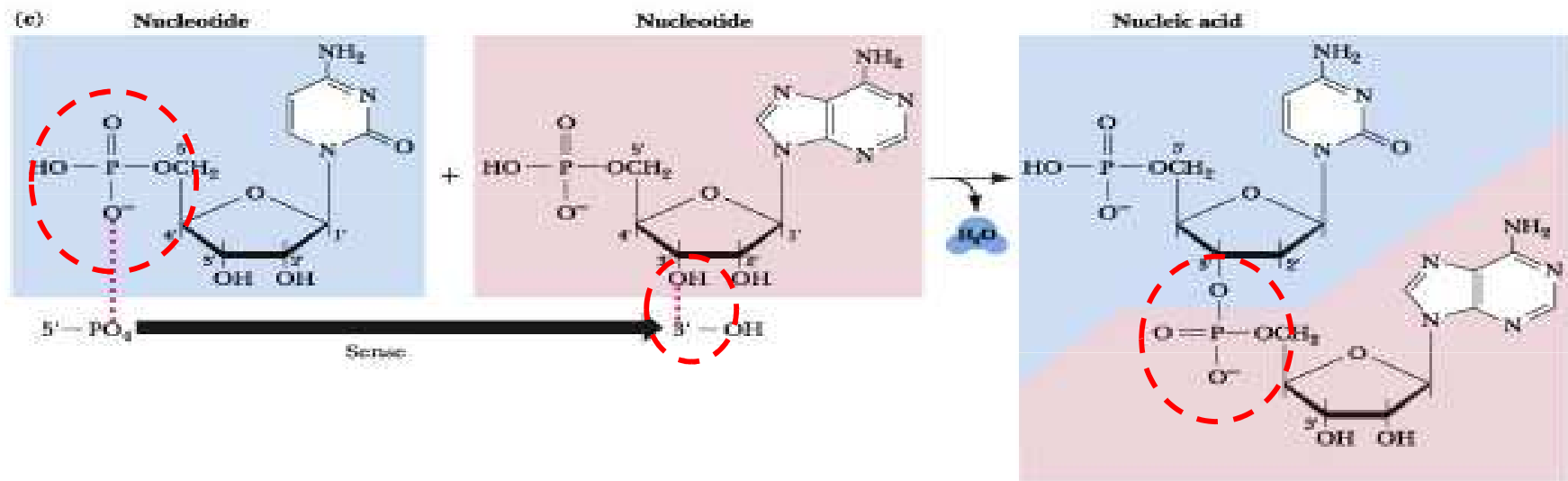
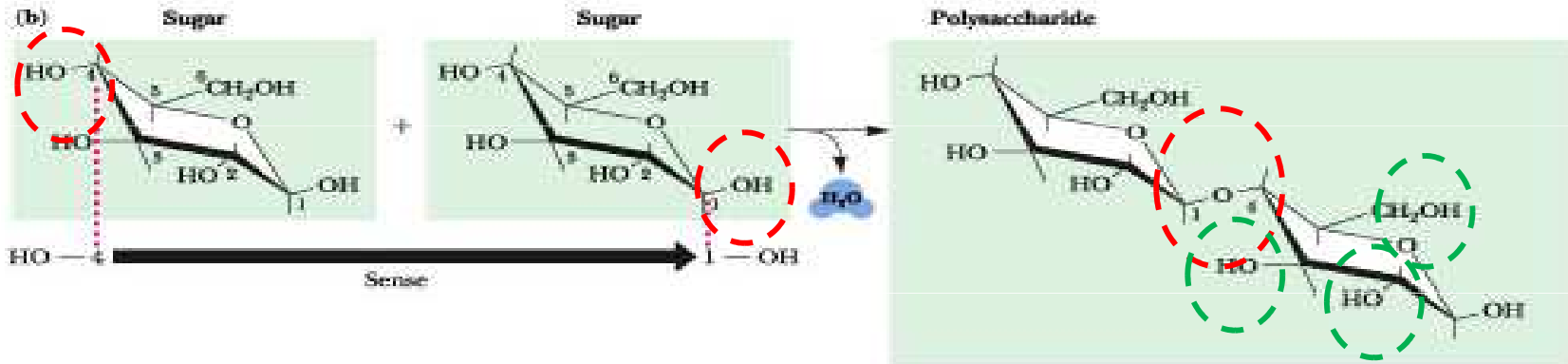
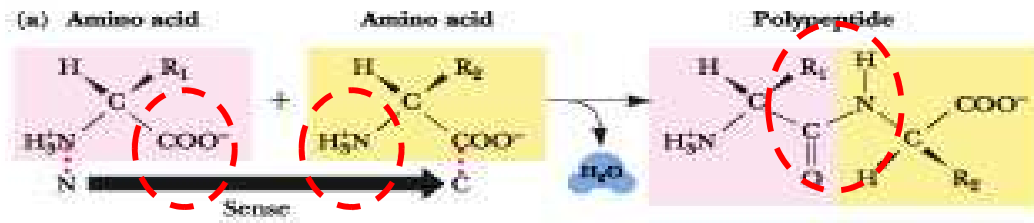
mono, di-, tri- , tetra-,....

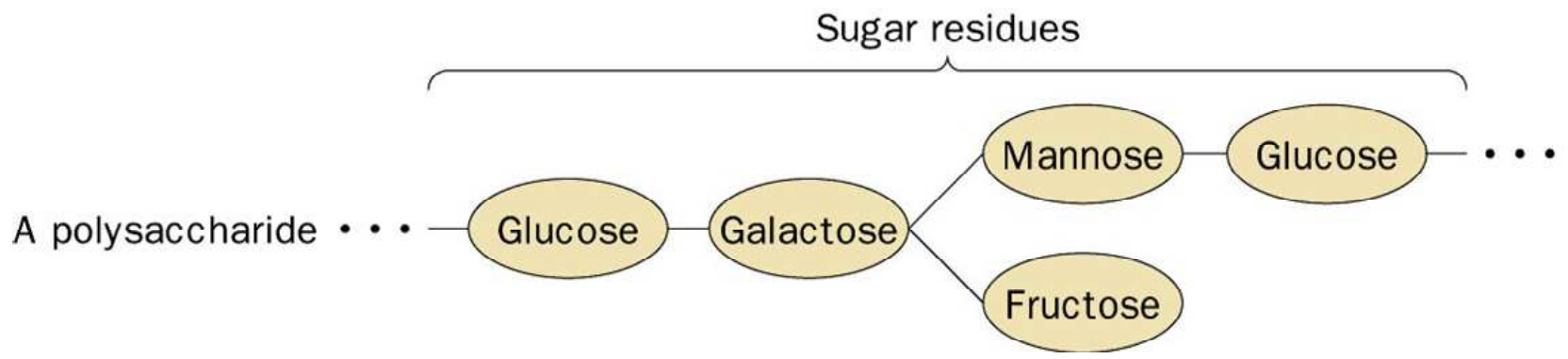
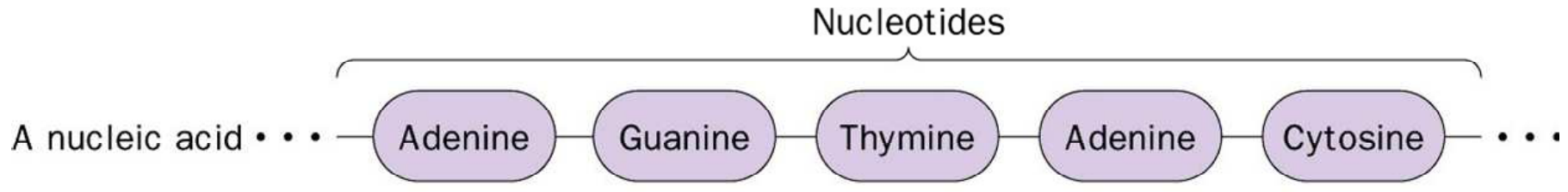
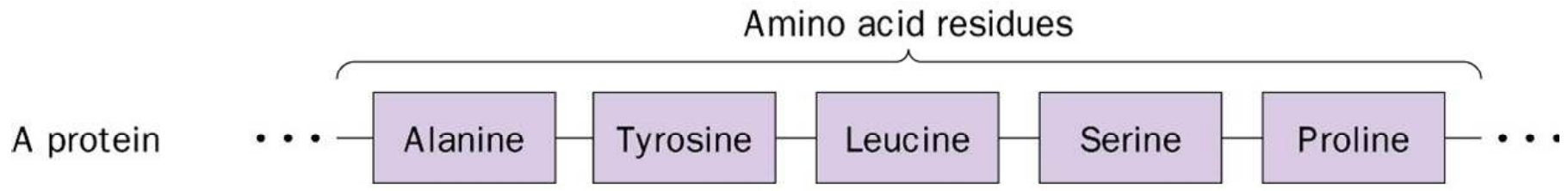
oligo < 10

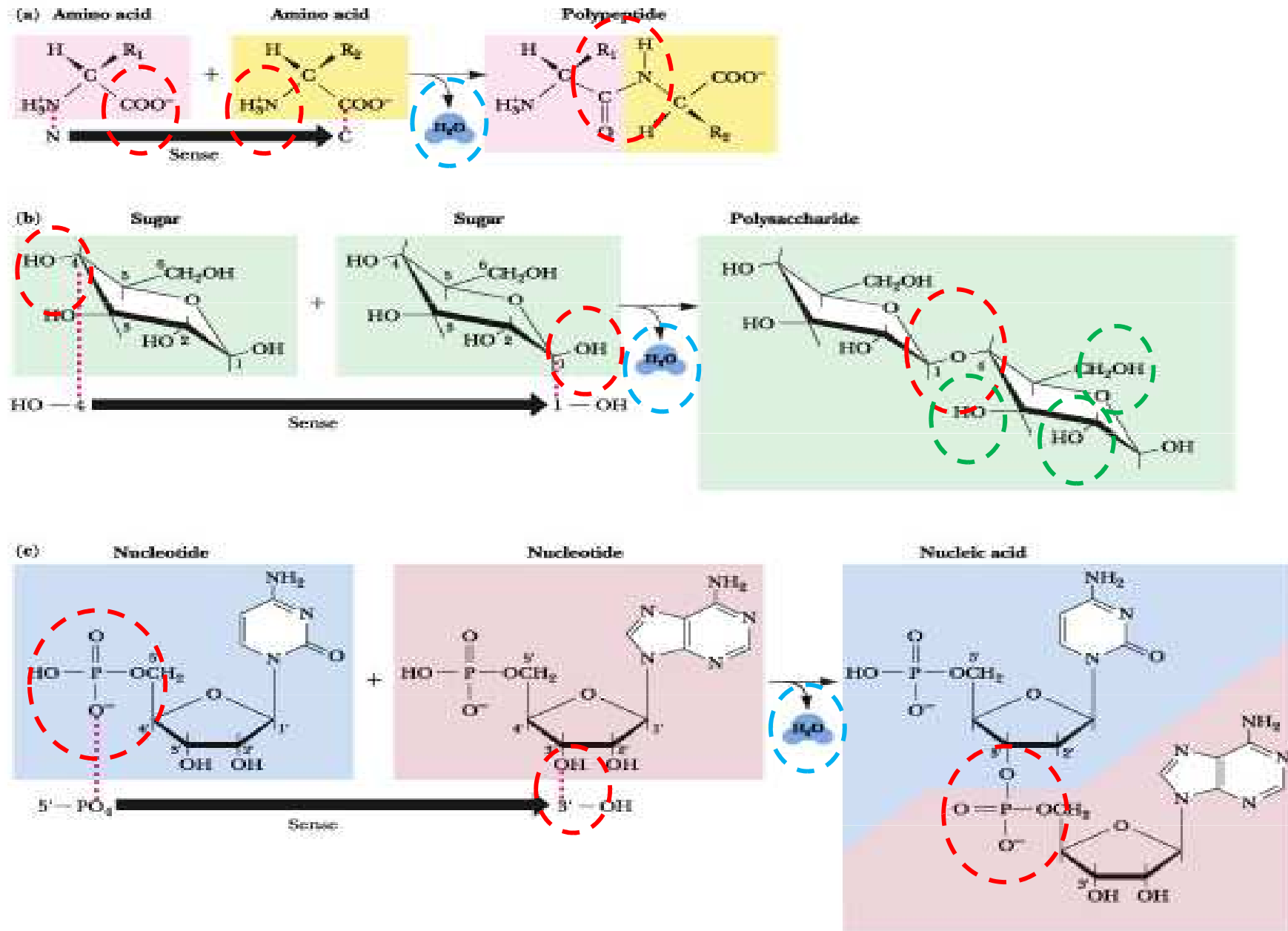
poly > 10

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





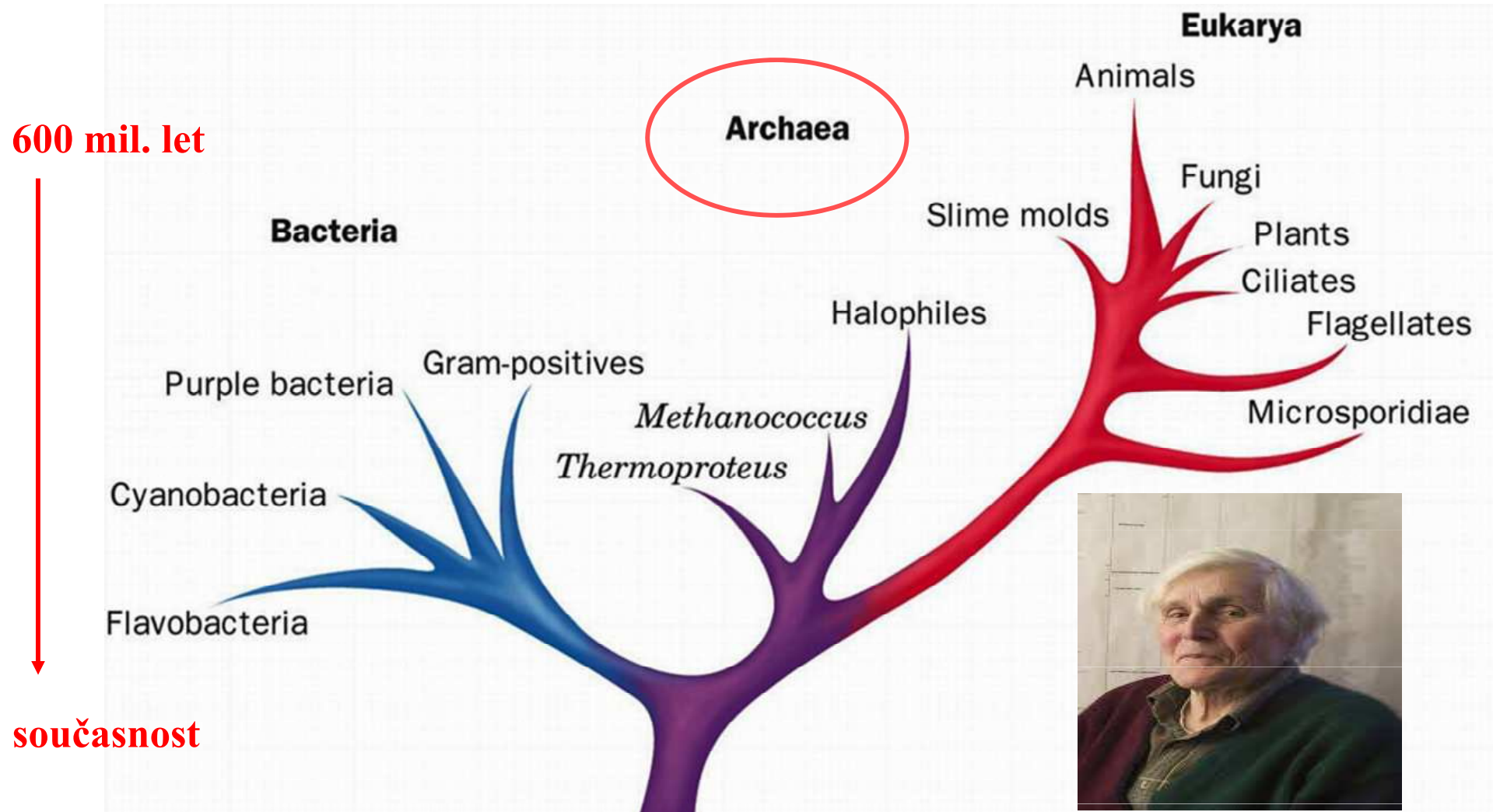




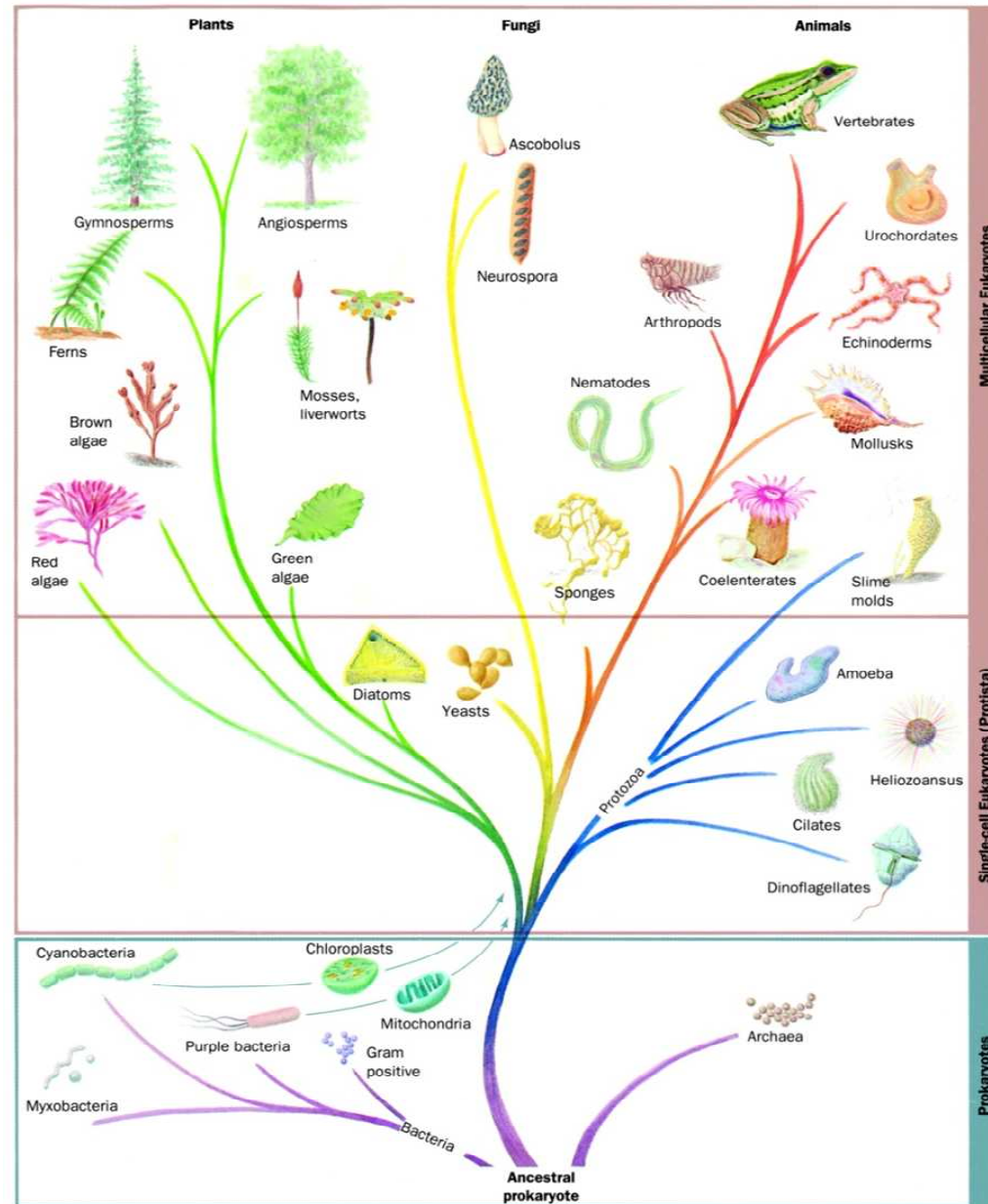
Kondenzační reakce - uvolňování H₂O → rovnováha posunuta ve směru opačném

Sledování rozdílů mezi biopolymery - vývoj života

Fylogenetický strom (rRNA)

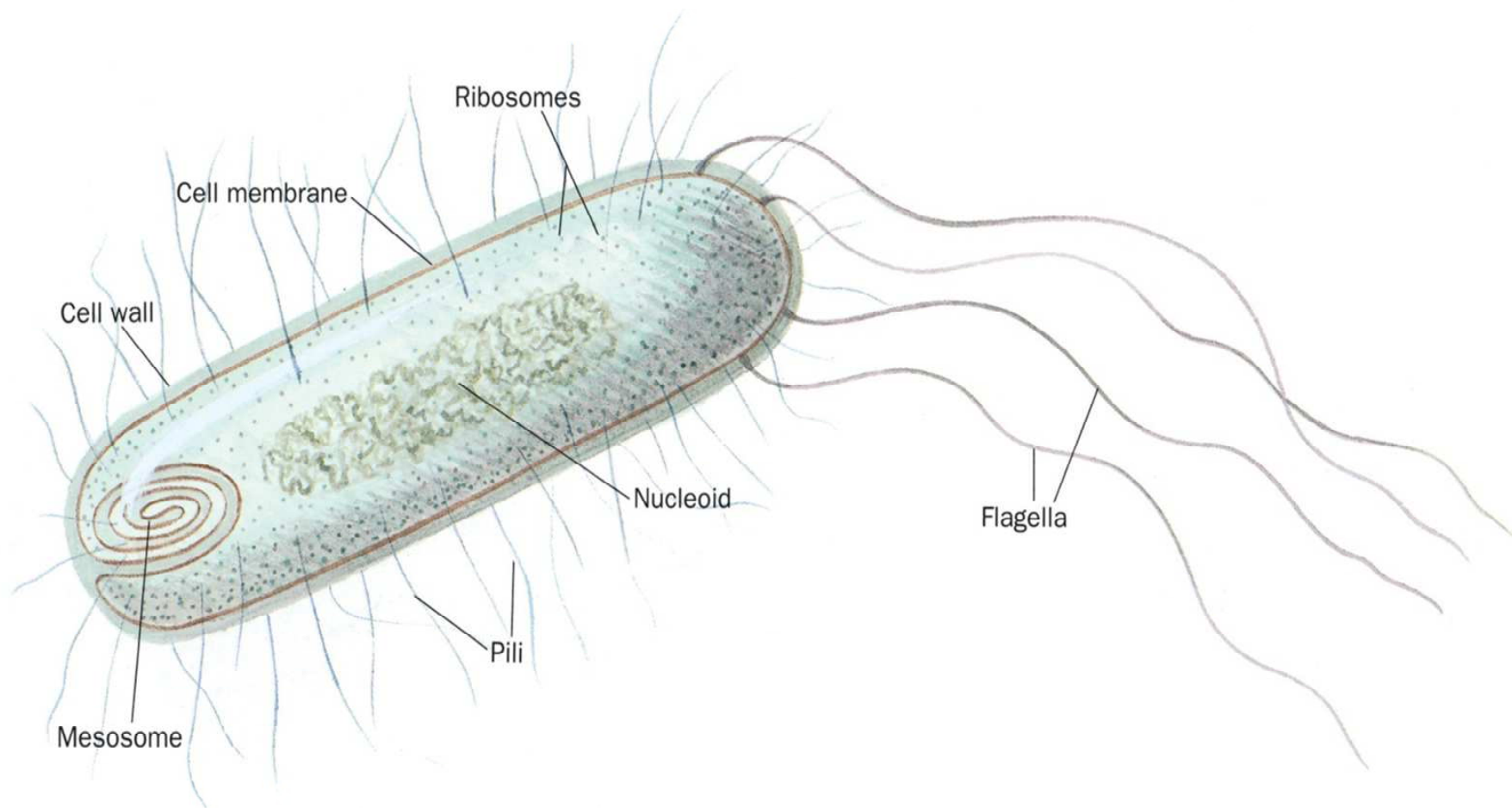


Fylogenetický strom



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

Prokaryontní bakteriální buňka



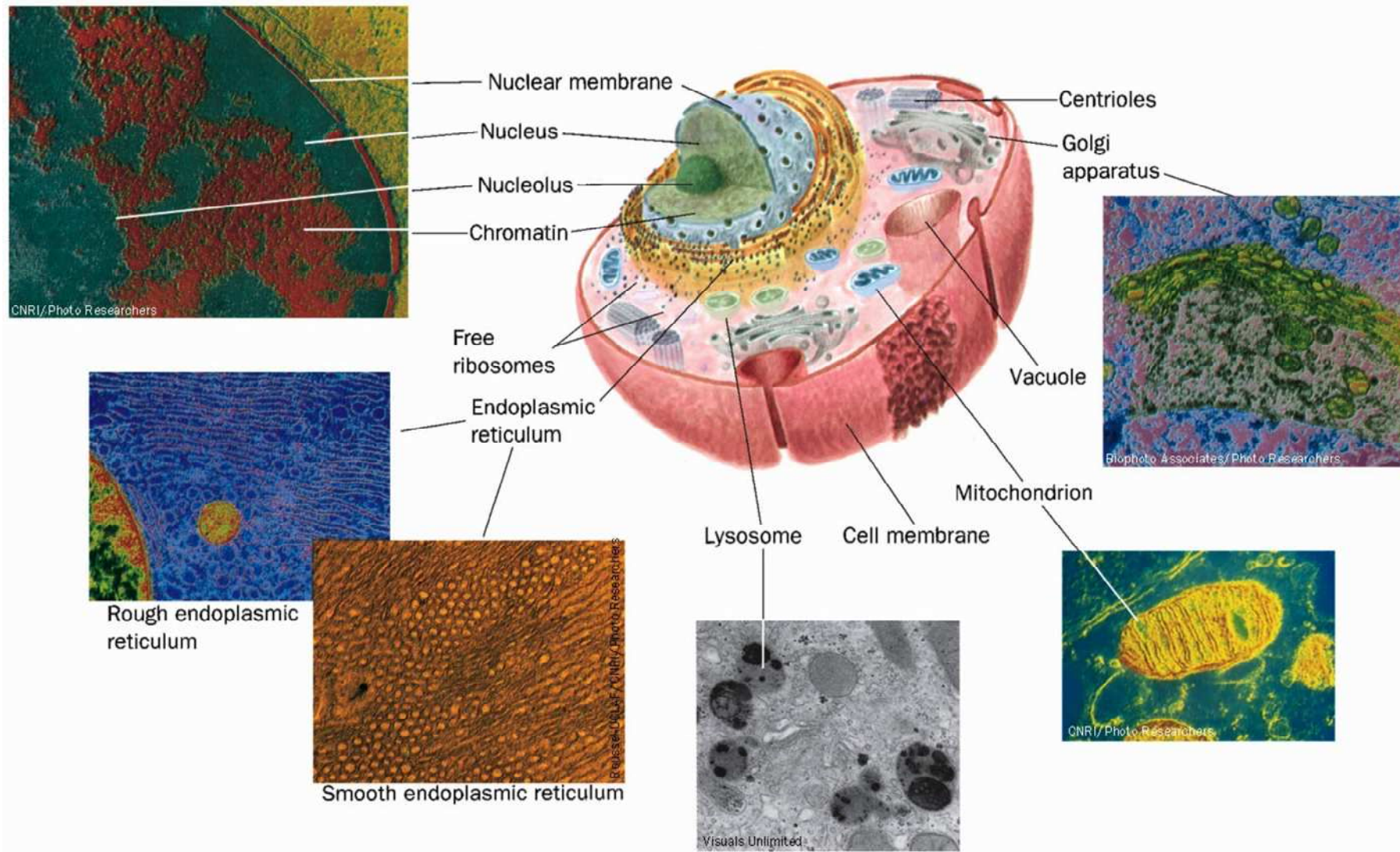
Prokaryontní bakteriální buňka

Table 1.1

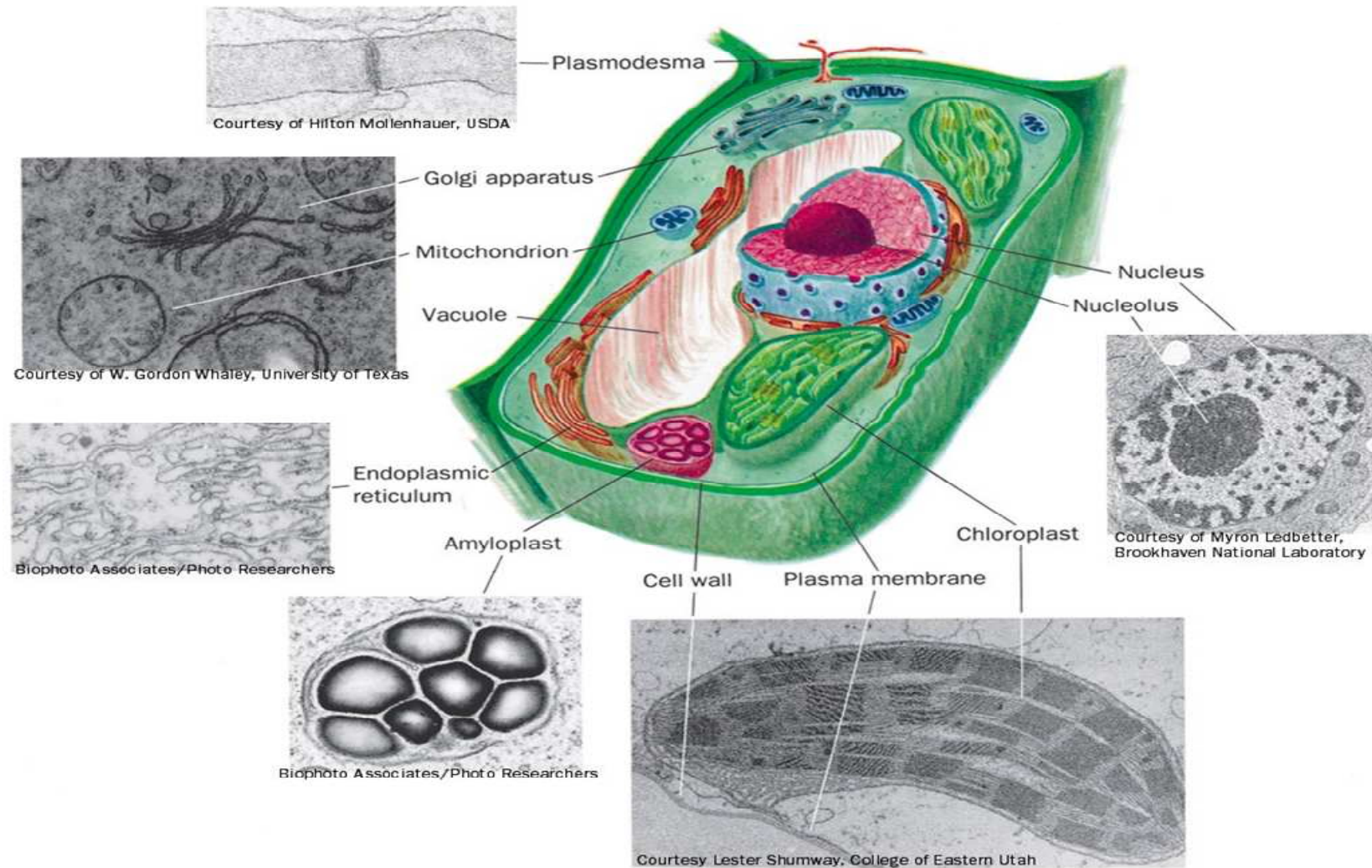
Molecular composition and biological function of prokaryotic cell components

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

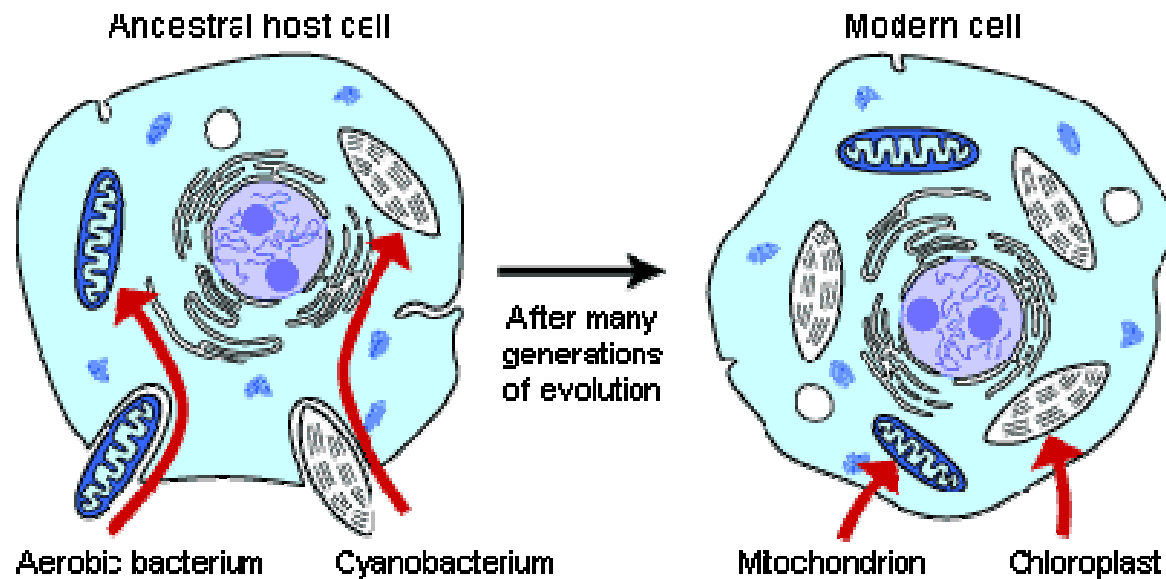
Table 1.2
Eukaryotic organelles, their constituent biomolecules, and biological function

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 ₂ to generate H ₂ O ₂
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

Vznik eukaryotních buněk

Margulis – endosymbiotická teorie



Organizace biologických struktur

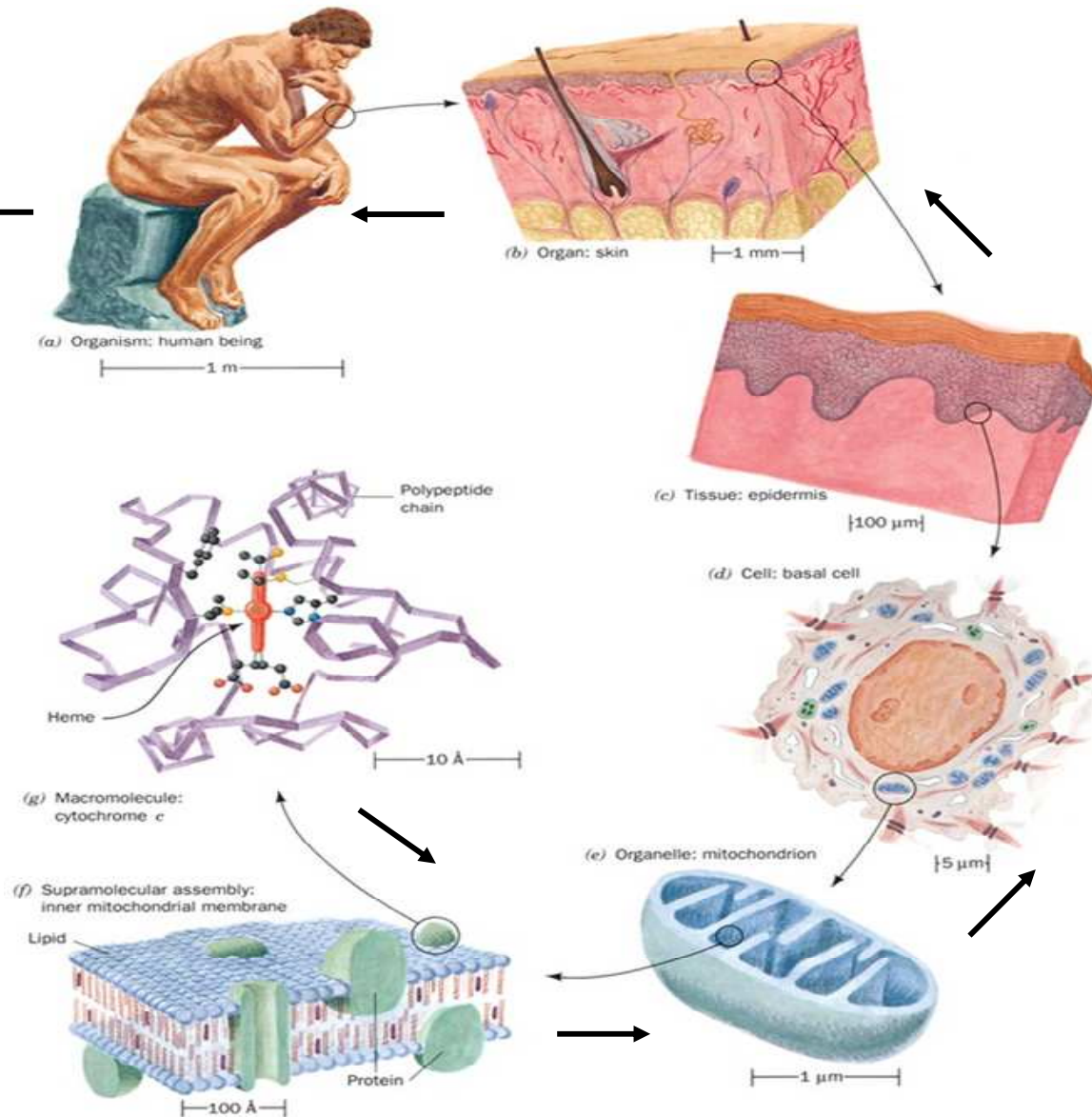
Populace



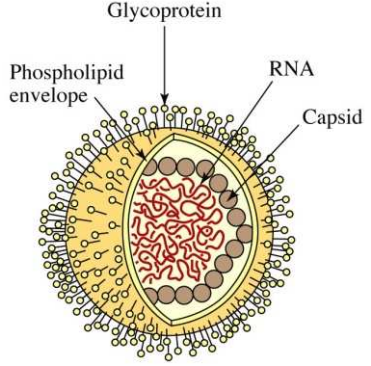
Biocenosa
společenství



Biosféra

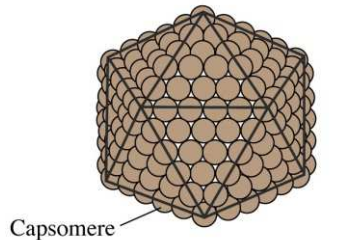
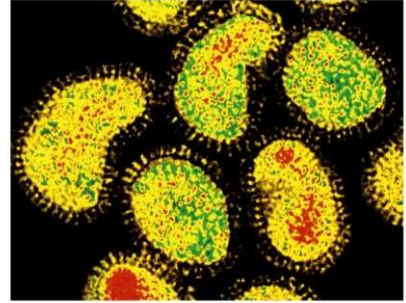


Viry



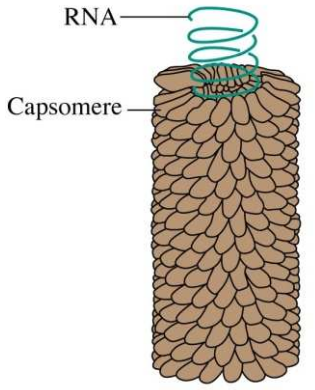
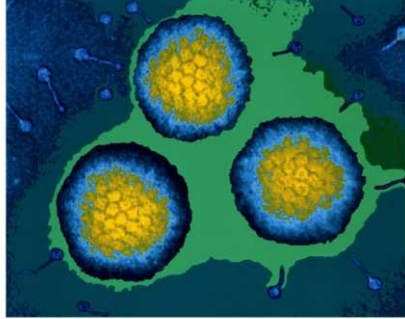
(a) Influenza virus (globular)

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



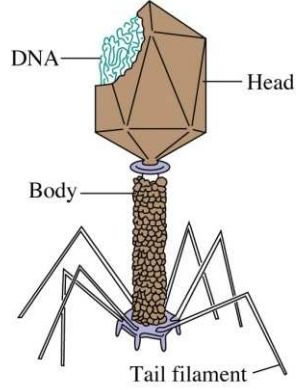
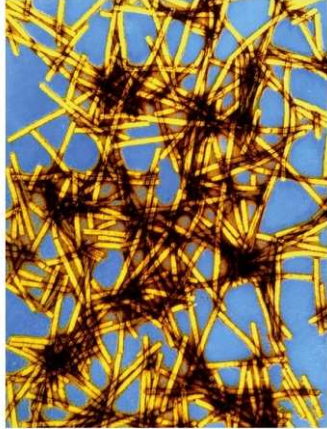
(b) Adenovirus (polyhedral)

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



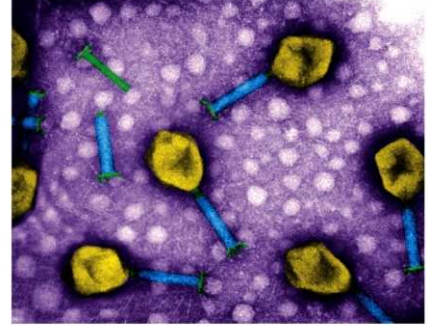
(c) Tobacco mosaic virus (cylindrical)

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

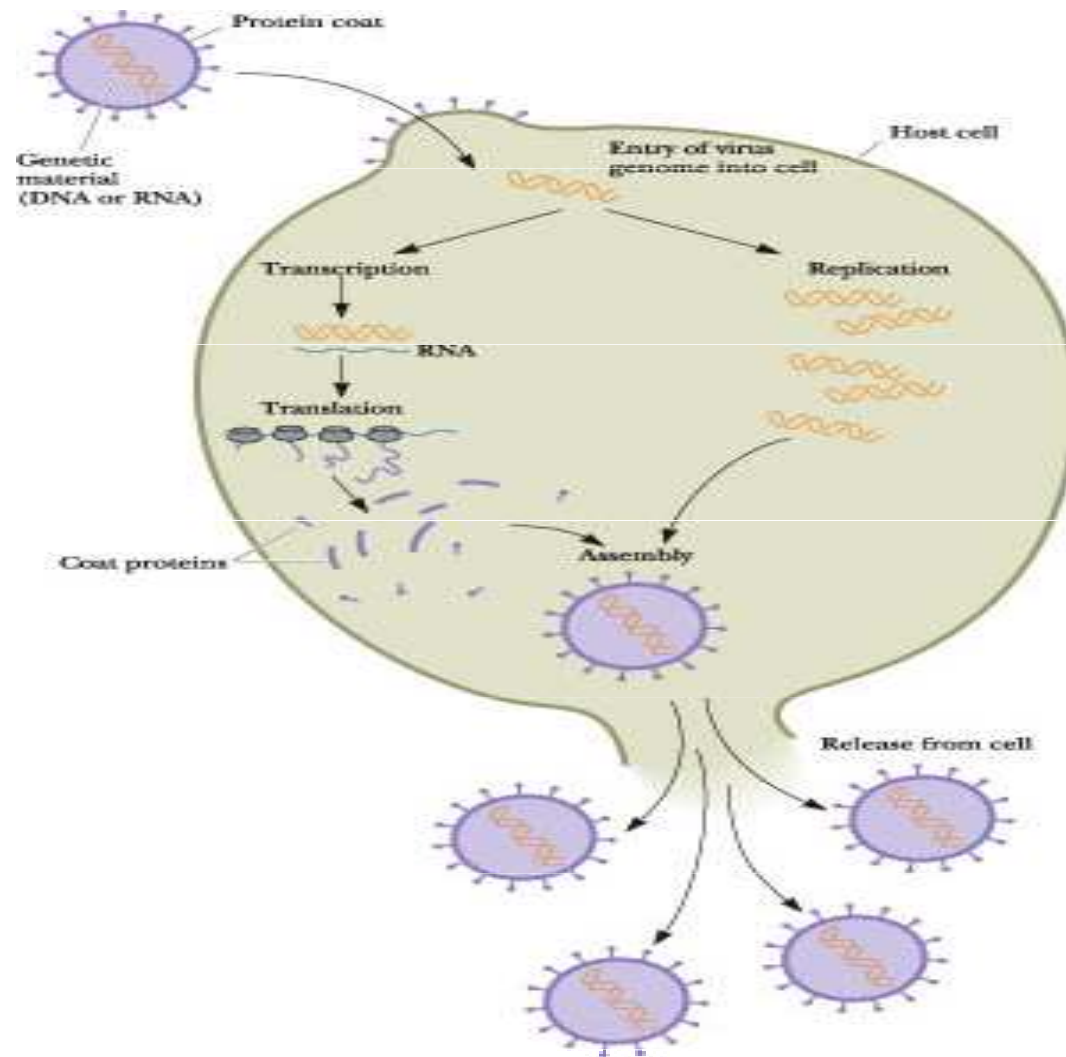


(d) Bacteriophage (complex shape)

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



Viry

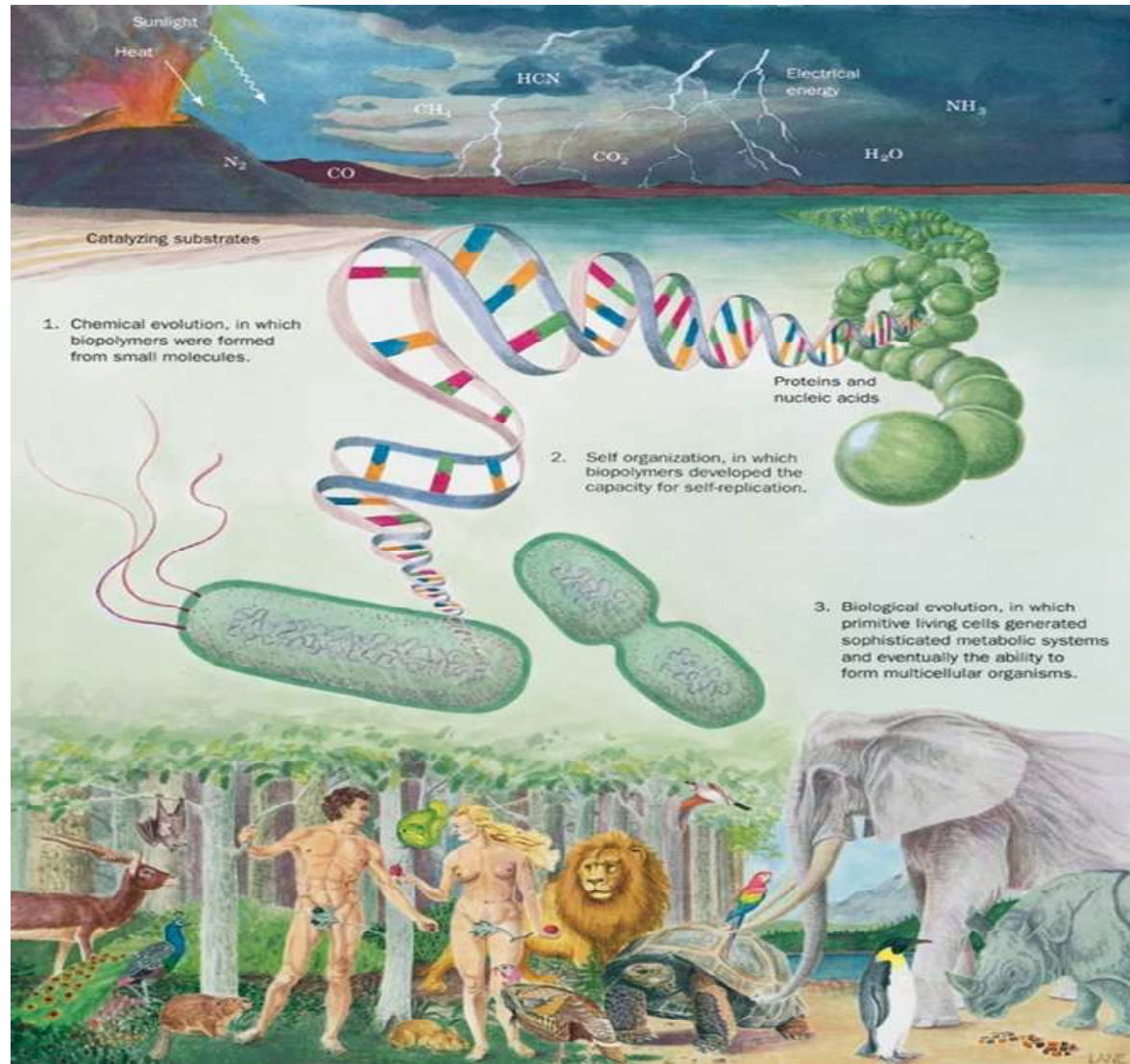


Evolve života na zemi

1. Chemická evolve — jednoduché anorganické molekuly dávají vznik organickým polymerům
2. Vznik uspořádaných struktur biopolymerů — ty jsou schopná autoreplikace- RNA
3. Biologická evolve — evolve od jednobuněčných k mnohobuněčným živočichům

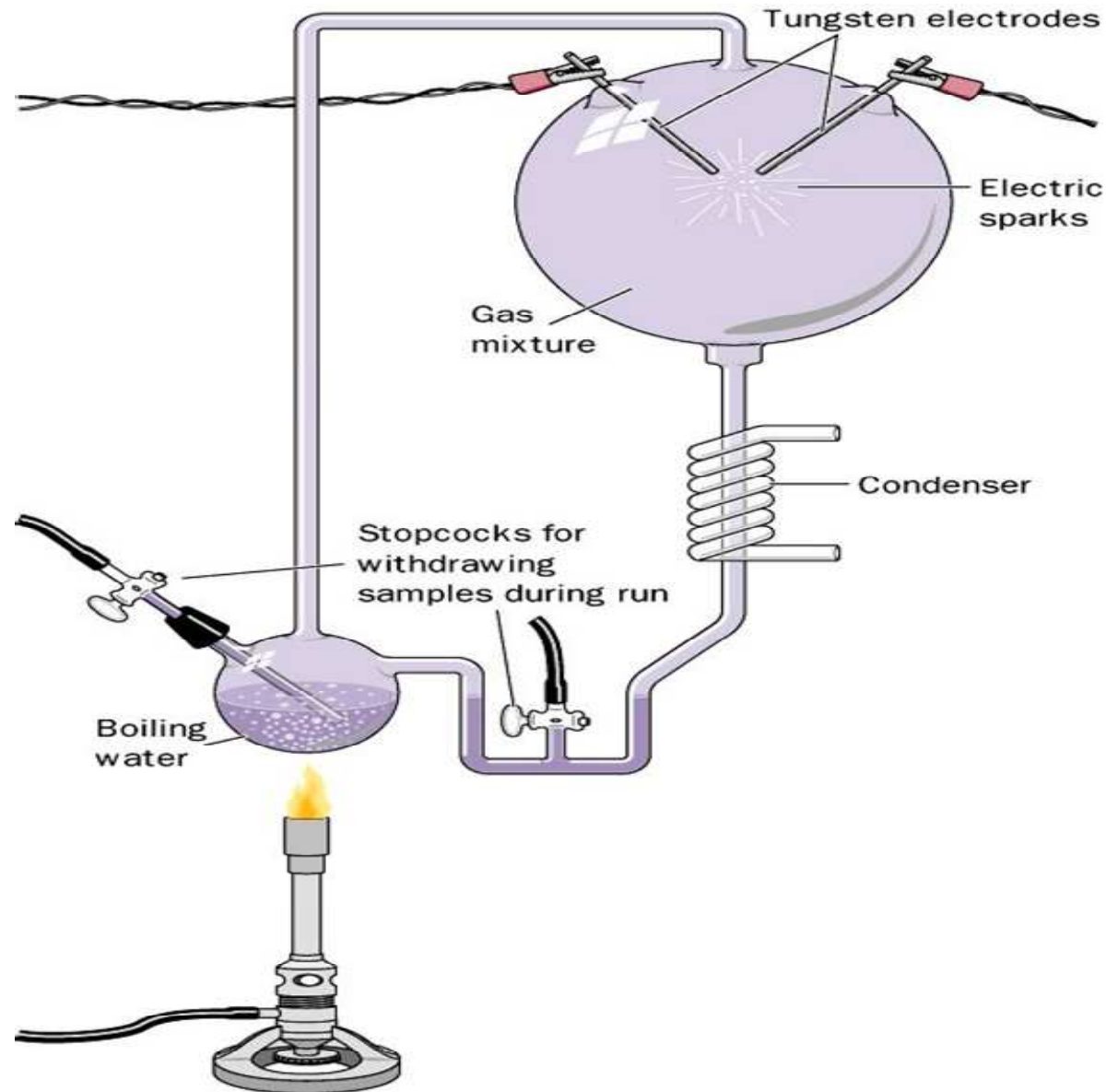
Evolve života na zemi

Chemická evoluce



Evolve životu na zemi

Miller Orgel



Evolve života na zemi

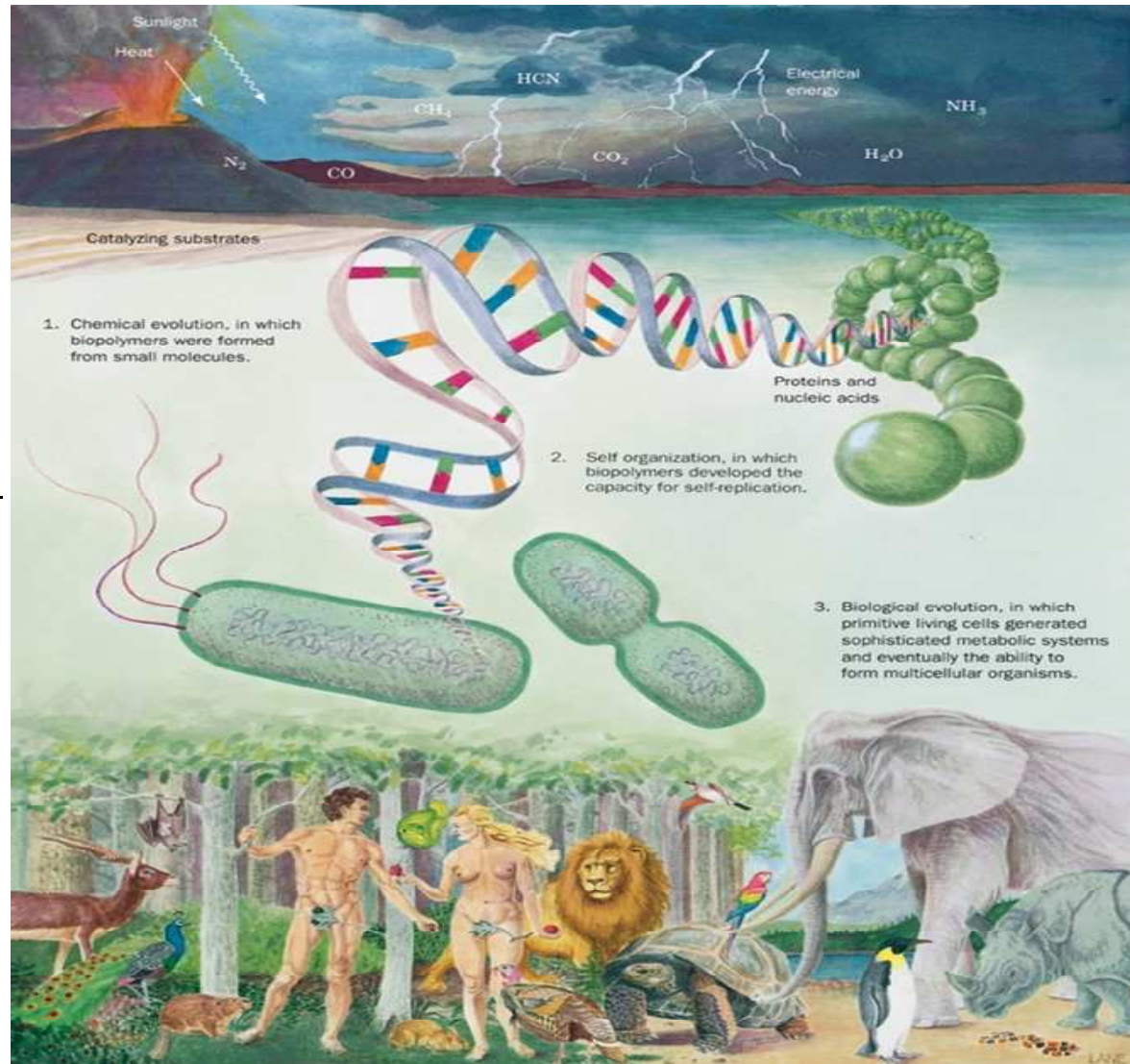
Compound	Yield (%)
Glycine ^a	2.1
Glycolic acid	1.9
Sarcosine	0.25
Alanine ^a	1.7
Lactic acid	1.6
<i>N</i> -Methylalanine	0.07
α -Amino- <i>n</i> -butyric acid	0.34
α -Aminoisobutyric acid	0.007
α -Hydroxybutyric acid	0.34
β -Alanine	0.76
Succinic acid	0.27
Aspartic acid ^a	0.024
Glutamic acid ^a	0.051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

^a Amino acid constituent of proteins.

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

Evolution of life on Earth

Chemical evolution



Vznik uspořádaných struktur biopolymerů

Vědci spočítali, jak vznikal život na Zemi



31. ledna 2015 | redakce

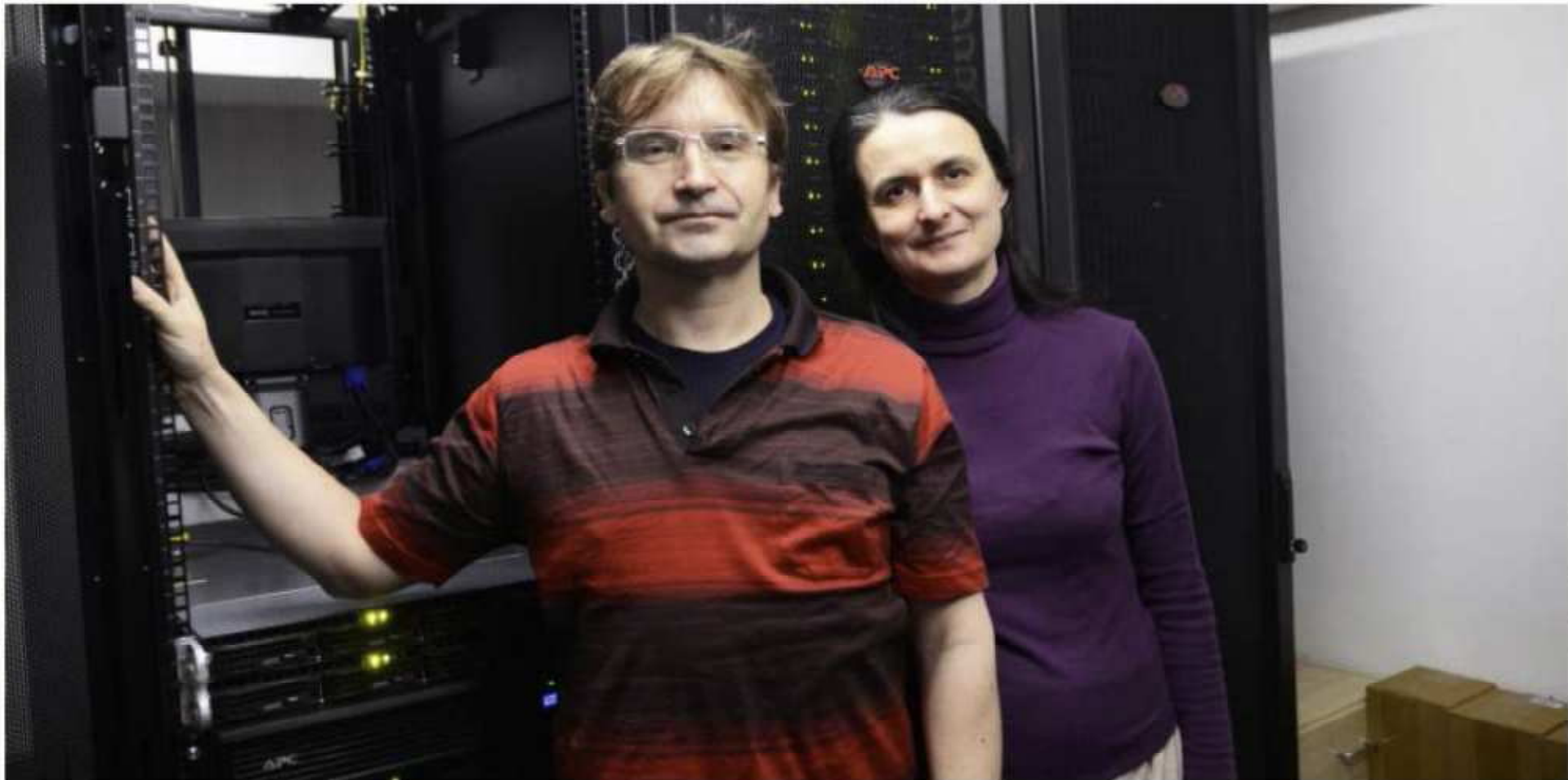
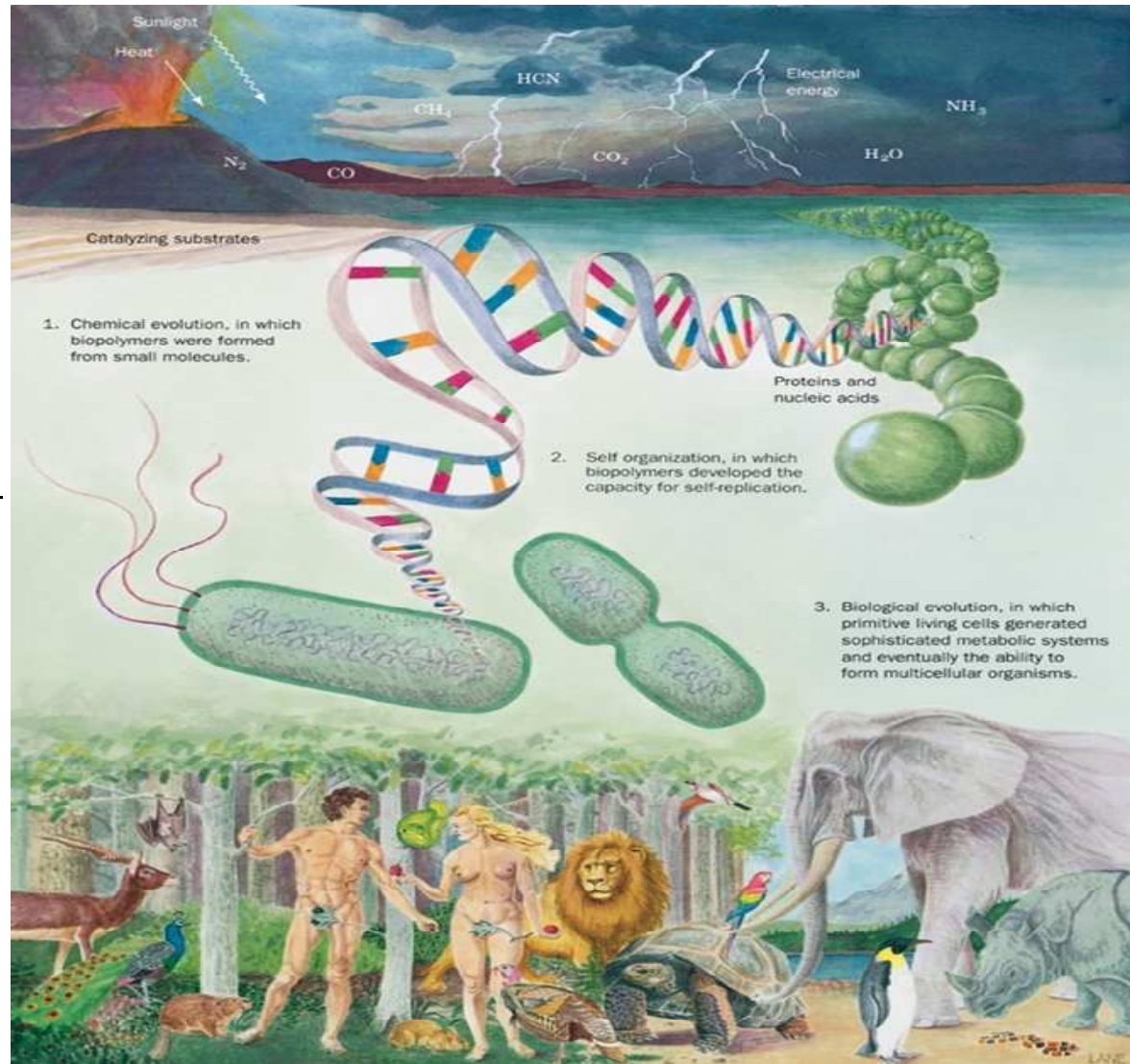


Foto: Ludmila Korešová.

Autoři objevu Jiří Šponer a Judit Šponerová.

Evolution of life on Earth

Chemical evolution



Vznik uspořádaných struktur biopolymerů

Biologická evoluce

BÍLKOVINY - PROTEINY

Protein - MULDER, BERZELIUS (1838)

πρωτεΐνη - „zaujímající první místo“

Bílkoviny

Jsou to biomakromolekuly s nejlépe poznanými a definovanými vlastnostmi :

- Fyzikálními – MW, spektra, pI,
- Chemickými - složení a struktura
- Biologickými - funkce

Bílkoviny

Proč:

- Zřetelná biologická funkce
- Je jednodušší je izolovat i charakterizovat než NK, polysacharidy či lipidy

BÍLKOVINY - PROTEINY

Protein - MULDER, BERZELIUS (1838)

πρωτεΐνη - „zaujímající první místo“

Funkce - katalýza

transport

pohyb

podpora

imunita

regulace

vznik a přenos nervového vzruchu

~~Přenos genetické informace NK~~

Výkonná moc

Zákonná moc

AMINOKYSELINY (20 AMK)

MW 50 - 200



2 až 50 AMK PEPTIDY → POLYPEPTIDY

MW < 10 000

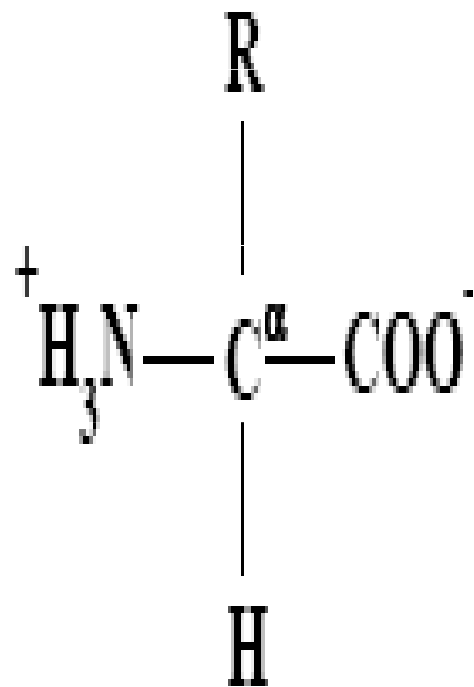


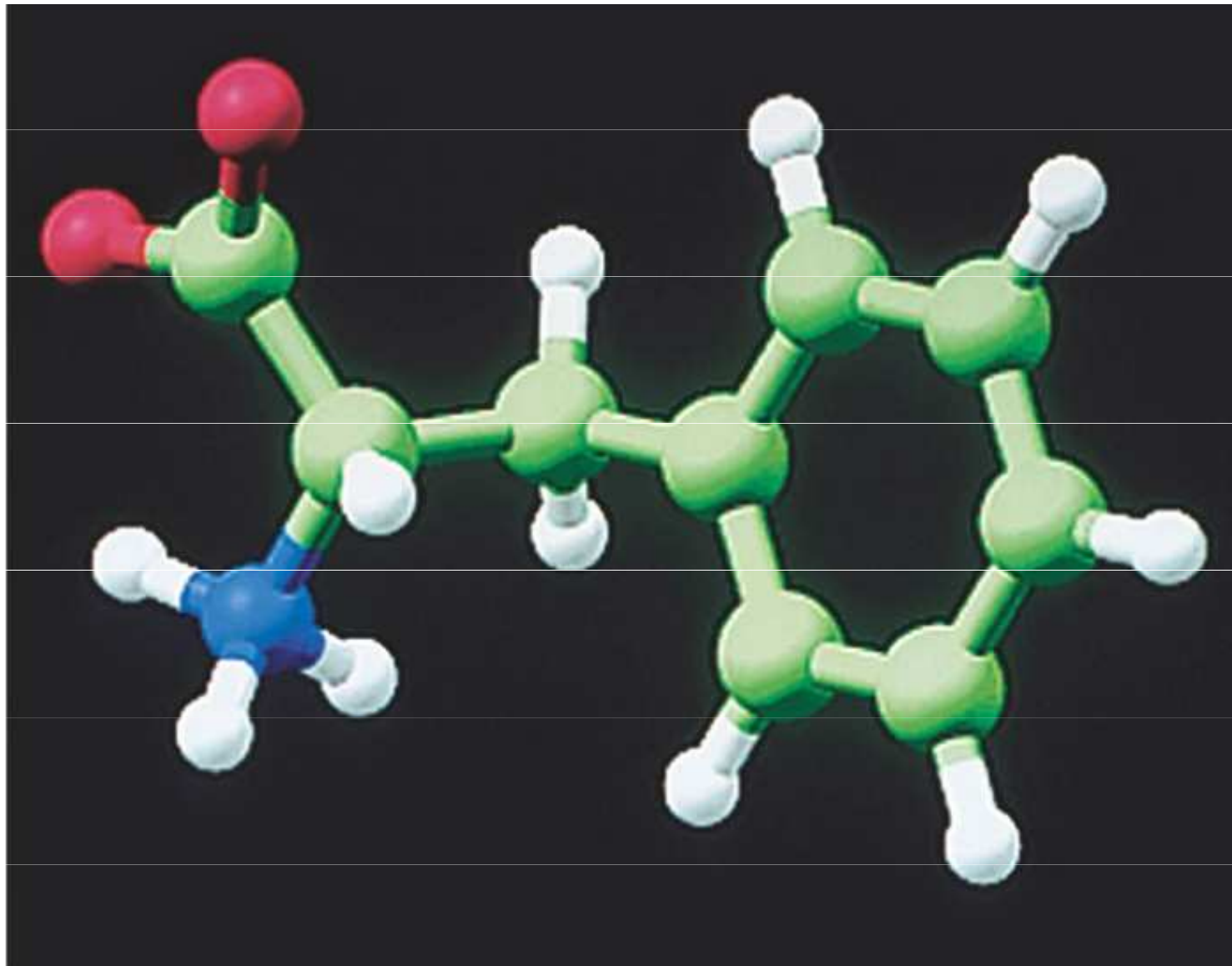
> 50 AMK BÍLKOVINY - PROTEINY

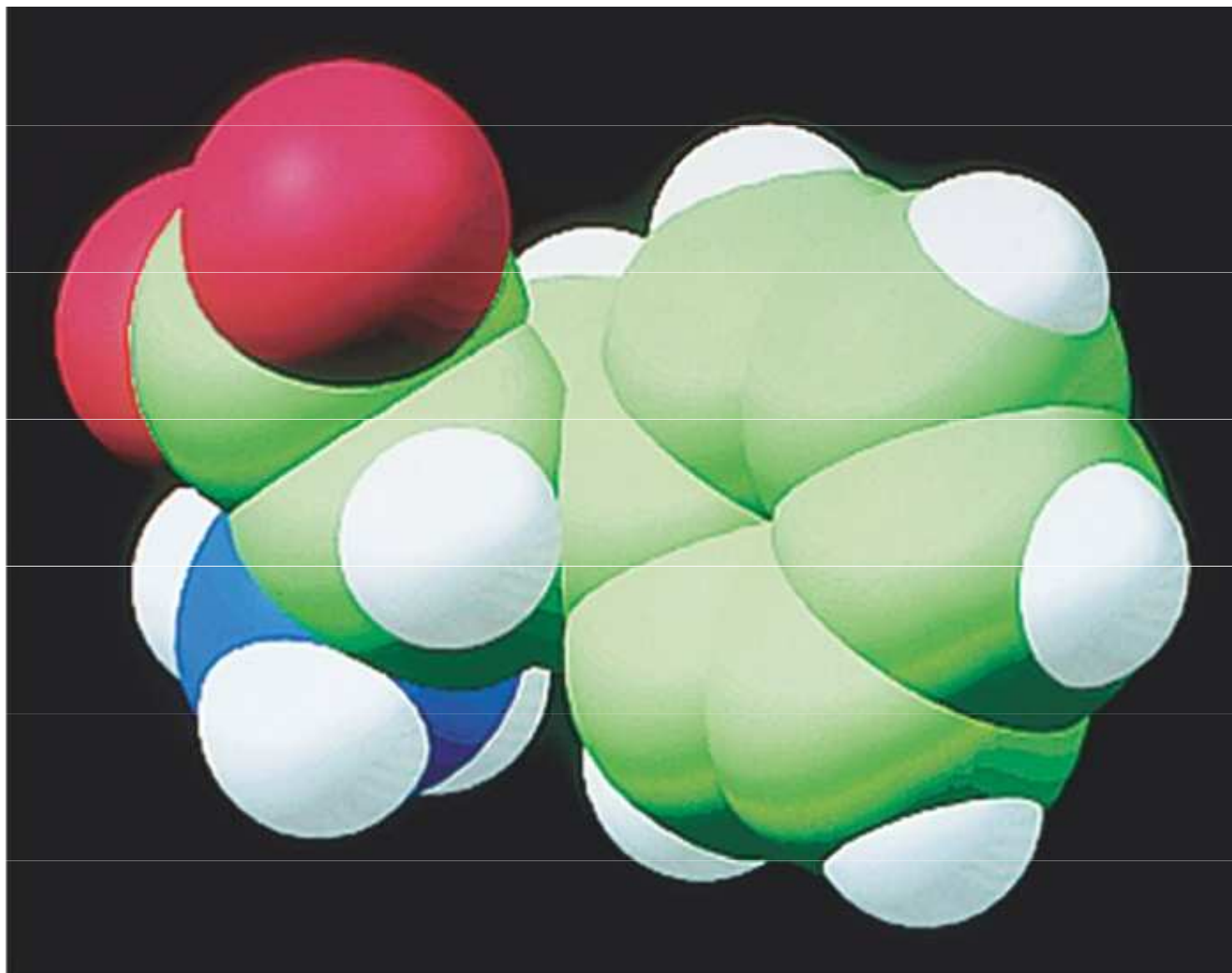
MW > 10 000

Aminokyseliny :

chemicky - substituční deriváty karboxylových kyselin







I. Kódované aminokyseliny

Rozdělení :

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

B. Polární aminokyseliny

OH skupinu - Ser, Thr, Tyr

SH skupinu - Cys, Met

indolovou skupinu - Try

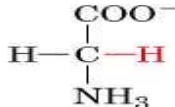
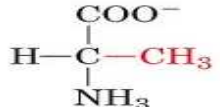

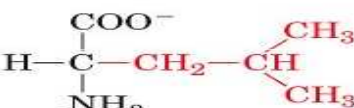
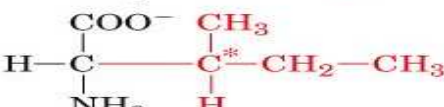
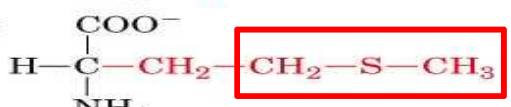
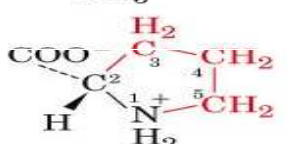
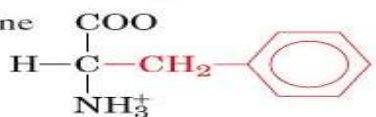
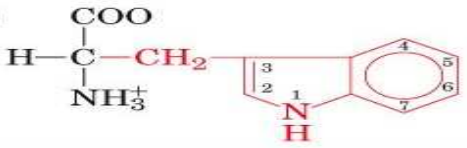
CONH₂ skupinu - AspNH₂, GluNH₂

C. Nabité - kyselé COOH skupinu - Asp, Glu

- basické NH₂ skupinu - Lys

guanidinovou skupinu - Arg

imidazolovou skupinu - His

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

(continued)

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

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

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

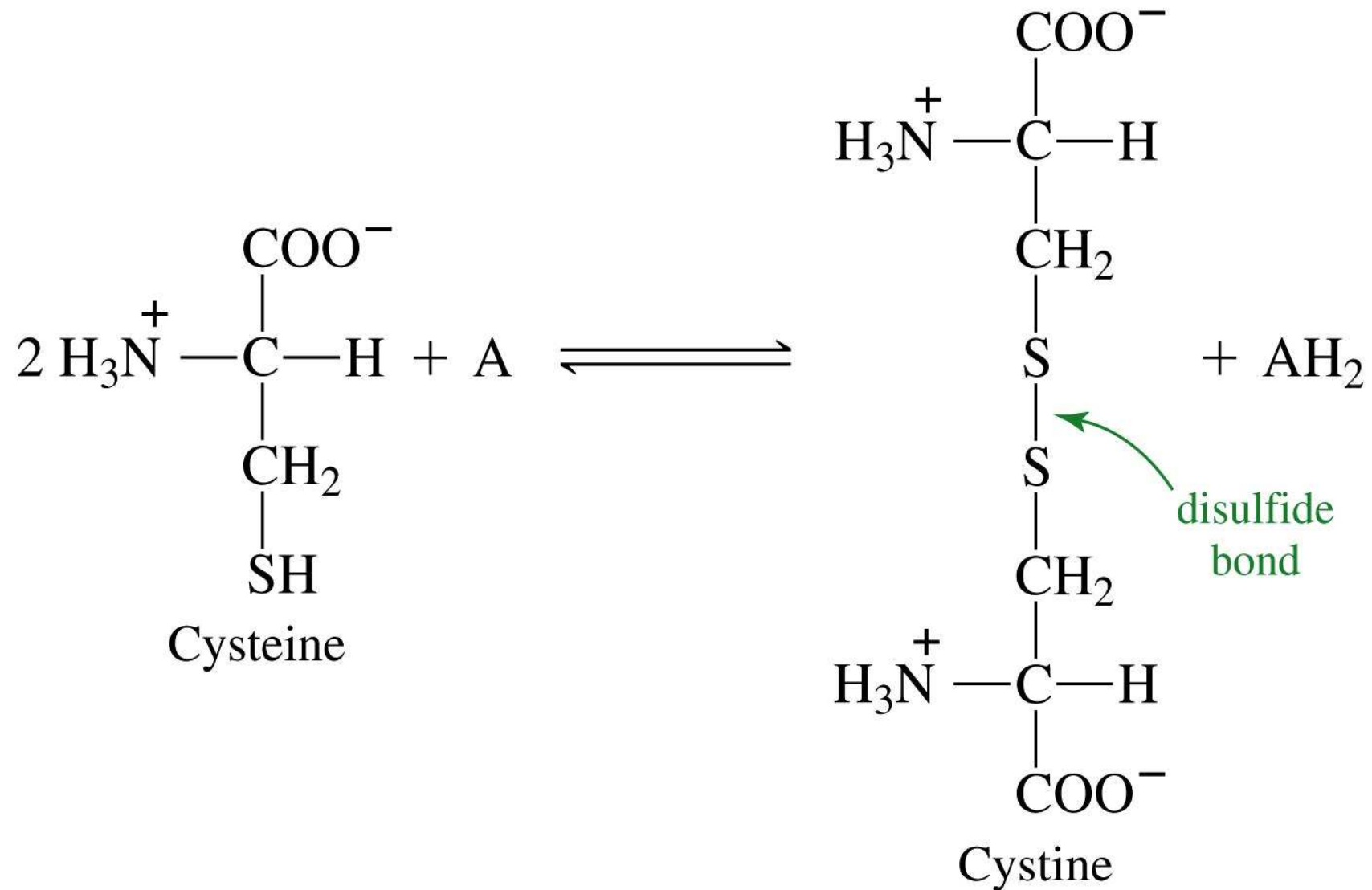
^dFrom Dawson, R.M.C., Elliott, D.C., Elliott, W.H., and Jones, K.M., *Data for Biochemical Research* (3rd ed.), pp. 1–31, Oxford Science Publications (1986).

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

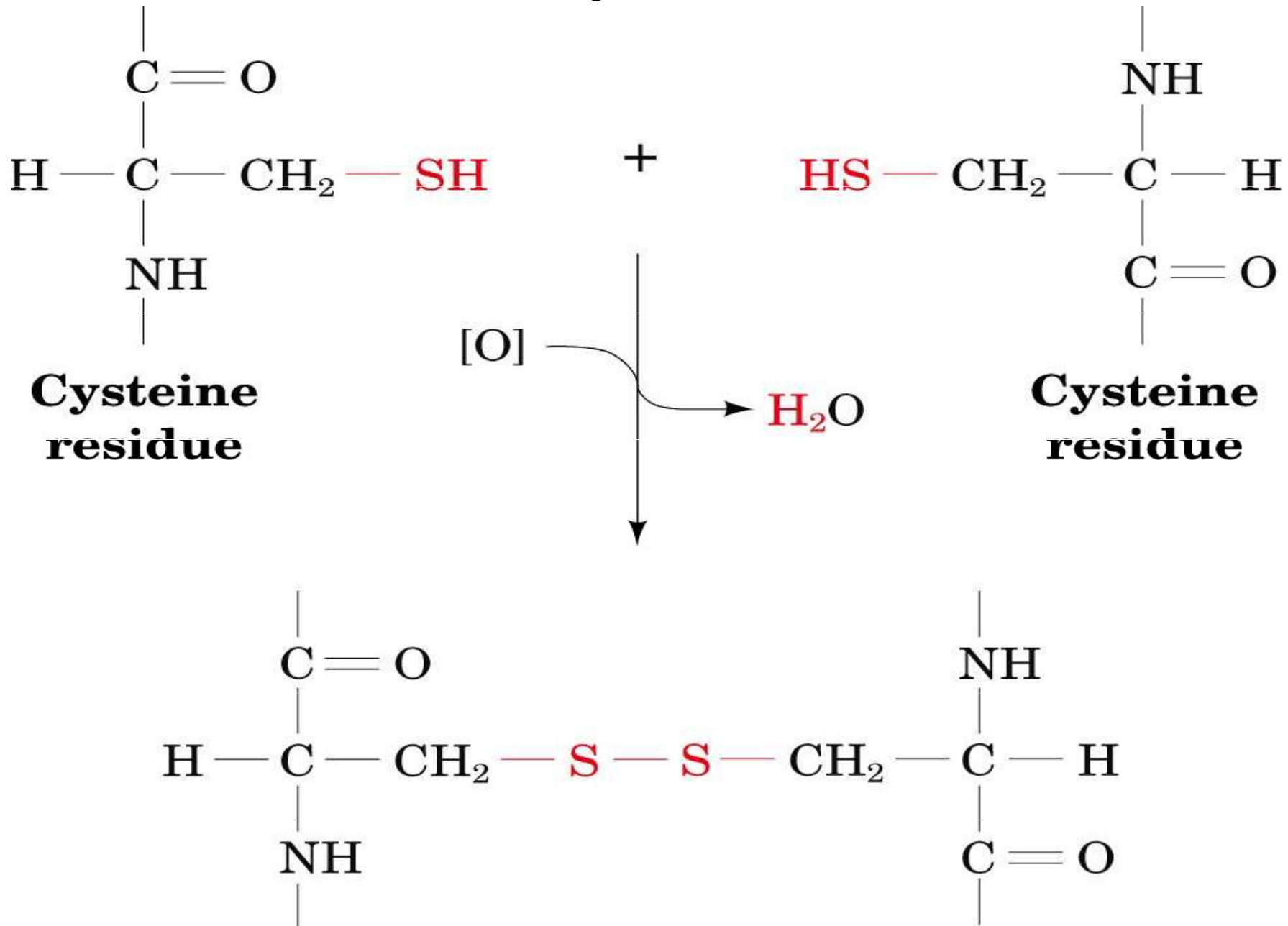
^fThe three- and one-letter symbols for asparagine or aspartic acid are Asx and B, whereas for glutamine or glutamic acid they are Glx and Z. The one-letter symbol for an undetermined or "nonstandard" amino acid is X.

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

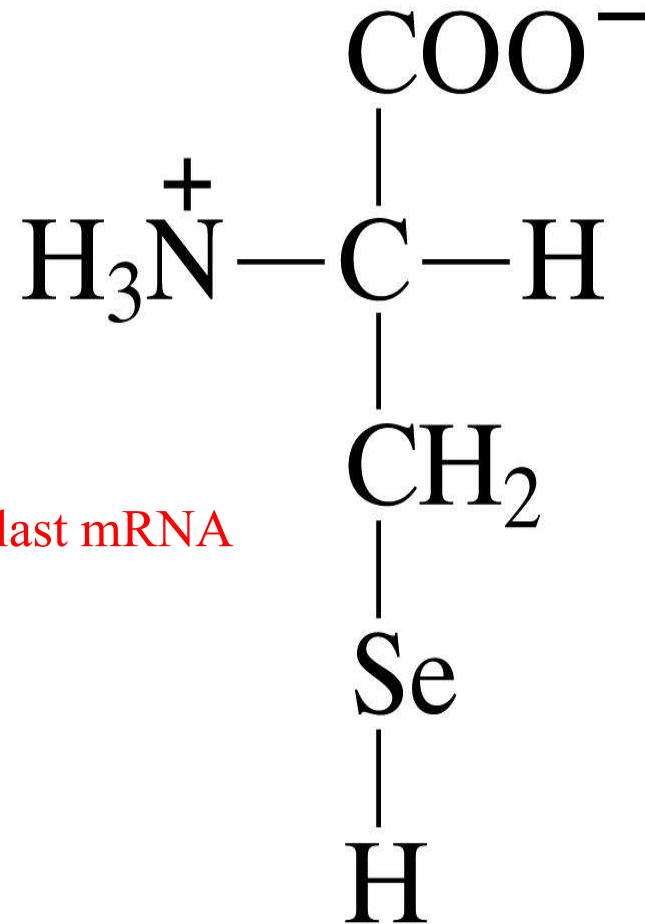
Cystin



Cystin



Selenocystein (UGA) SECIS (60 Nukl.)

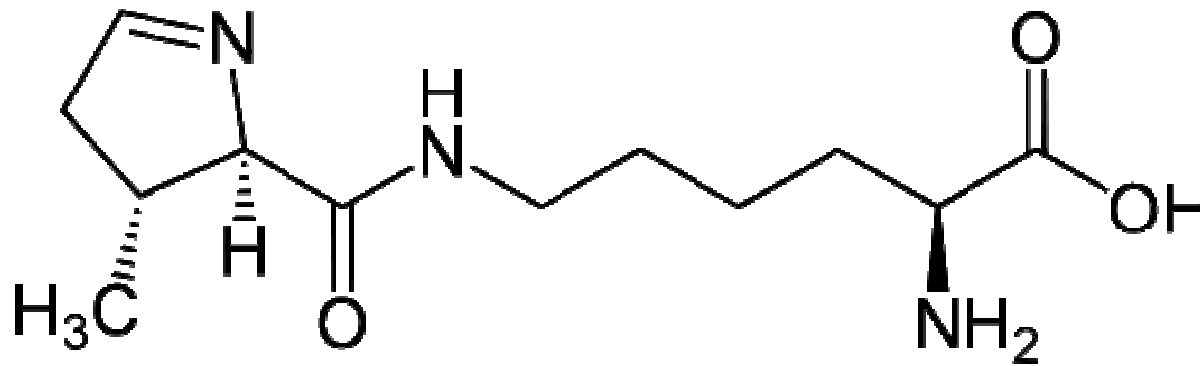


- Prokaryota – za UGA
- Eukaryota – netranslační oblast mRNA

Selenocysteine

Pyrrolysine (UAG) PYLIS

Desulfitobacterium hafniense



Názvosloví

- Triviální
 - Glycin
 - Tyrosin
 - Asparagová kyselina
- Systematické
 - 2-aminoethanová kyselina

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, His?

Semiesenciální - mláďata

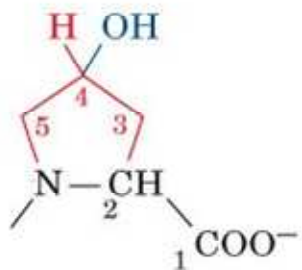
II. Nekódované aminokyseliny

A. v bílkovinách posttranslační modifikací AMK

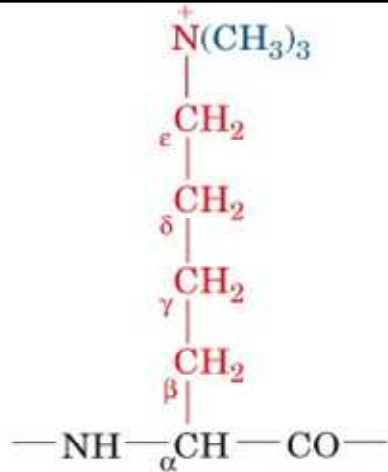
OH-Lys

OH-Pro

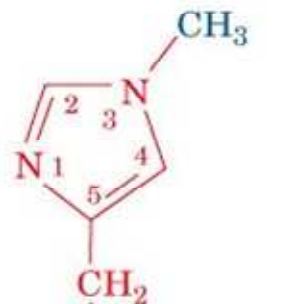
fosfo-Ser



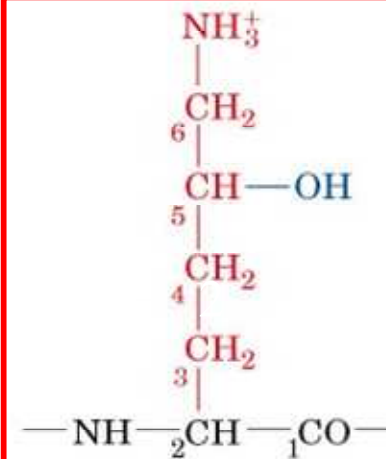
4-Hydroxyproline



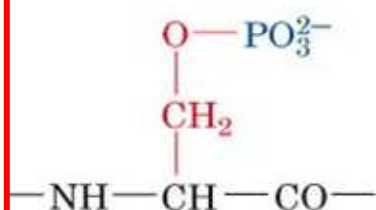
ε-N,N,N-Trimethyllysine



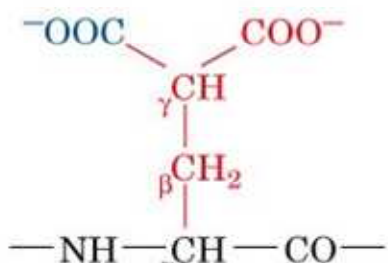
3-Methylhistidine



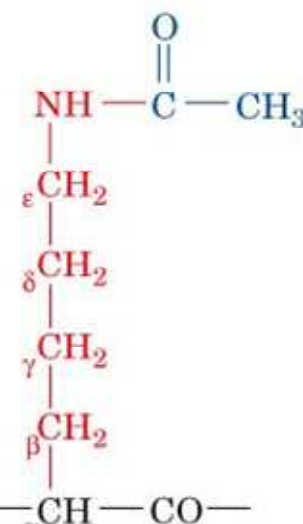
5-Hydroxylysine



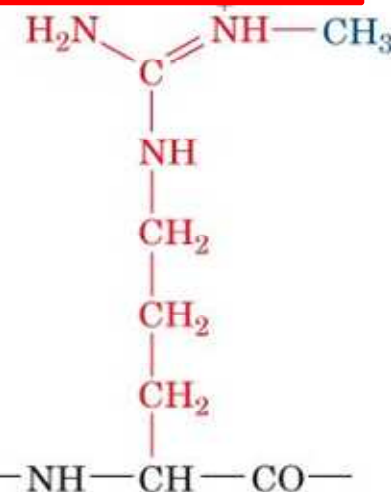
O-Phosphoserine



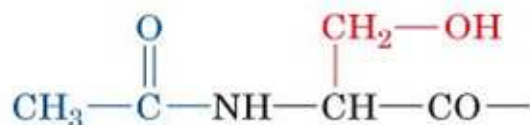
γ-Carboxyglutamate



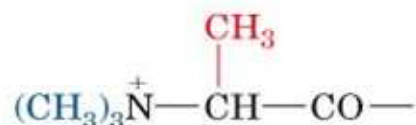
ε-N-Acetyllysine



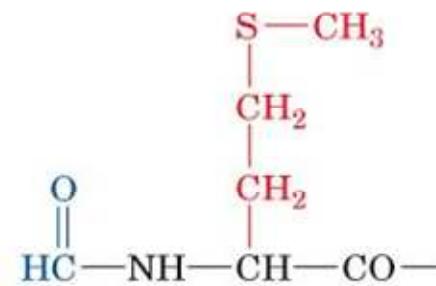
ω-N-Methylarginine



N-Acetylserine



N,N,N-Trimethylalanine



N-Formylmethionine

B. volné s biologickou funkcí

β alanin

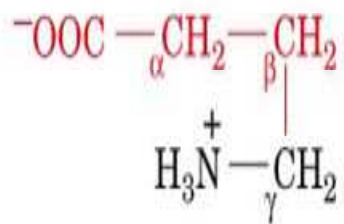
ornitin a citrulin

γ aminomáselná

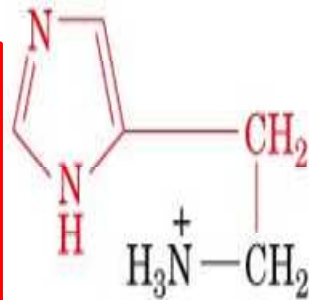
antibiotika - azaserin, cykloserin, chloramfenikol

nervové mediátory - DOPA, dopamin, adrenalin

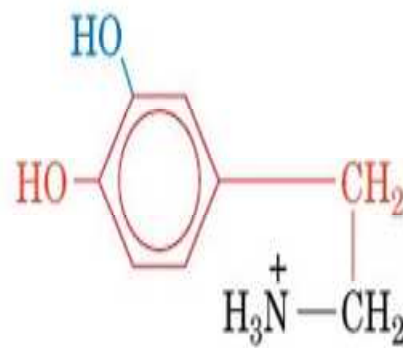
hormony - thyroxin, trijodthyronin



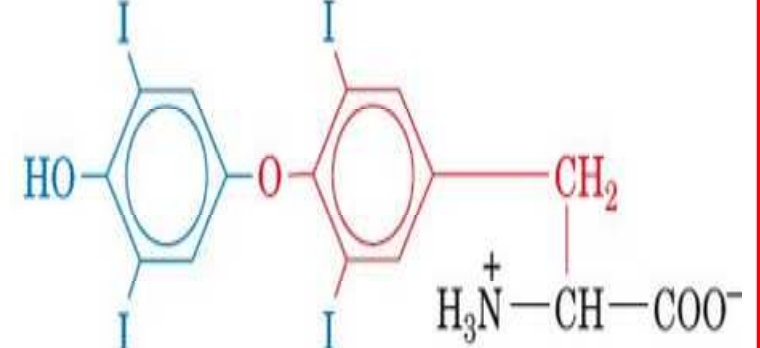
γ -Aminobutyric acid (GABA)



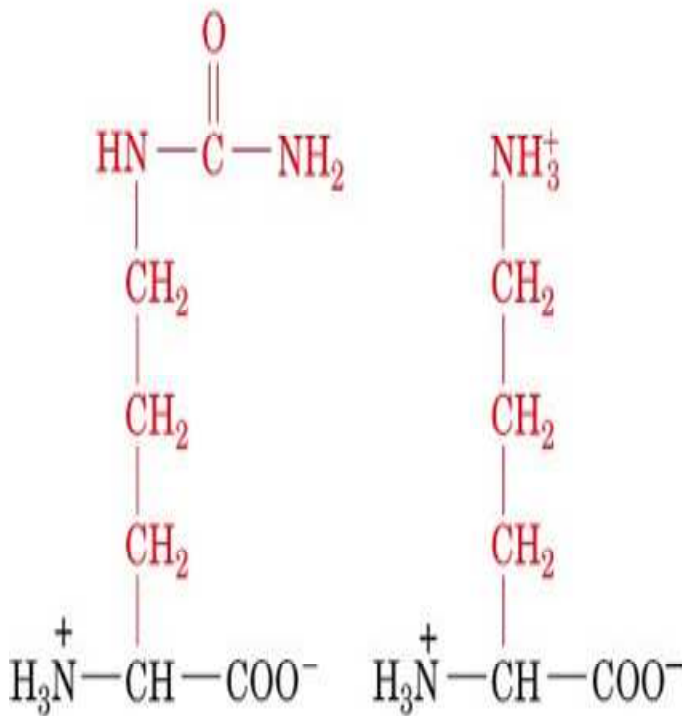
Histamine



Dopamine

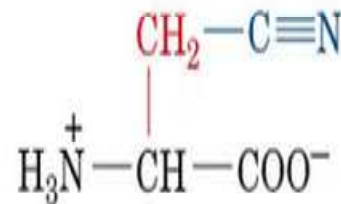


Thyroxine

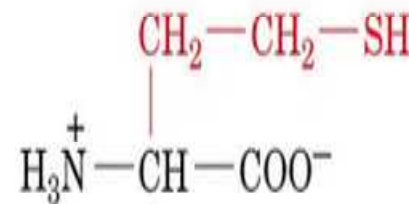


Citrulline

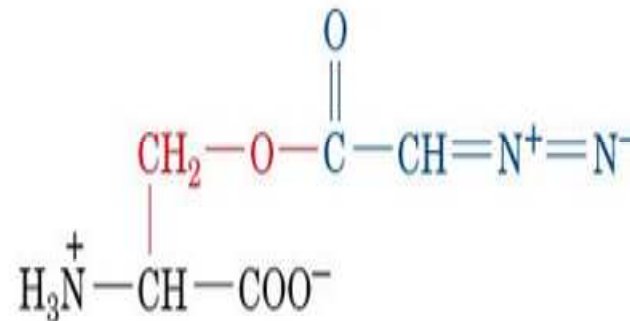
Ornithine



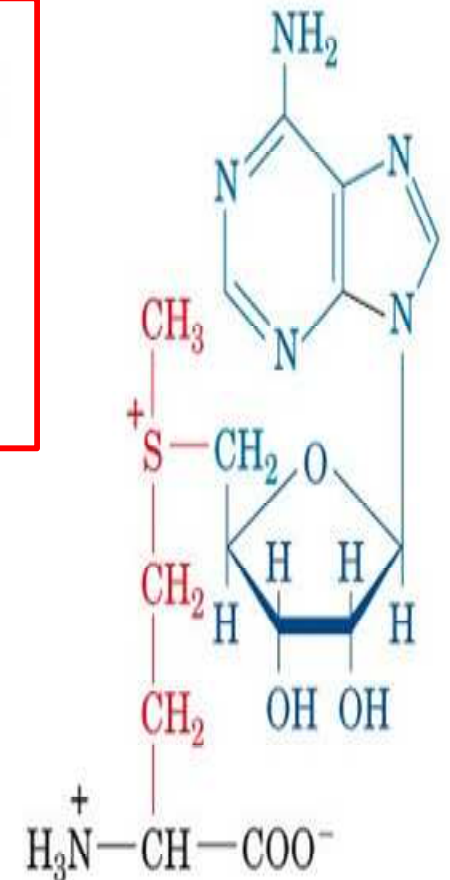
β -Cyanoalanine



Homocysteine



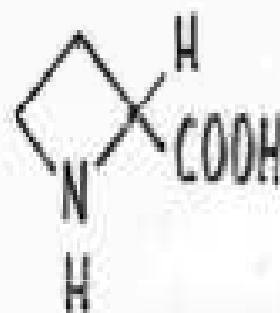
Azaserine



S-Adenosylmethionine



k. aminocyklopropyl-
karboxylová

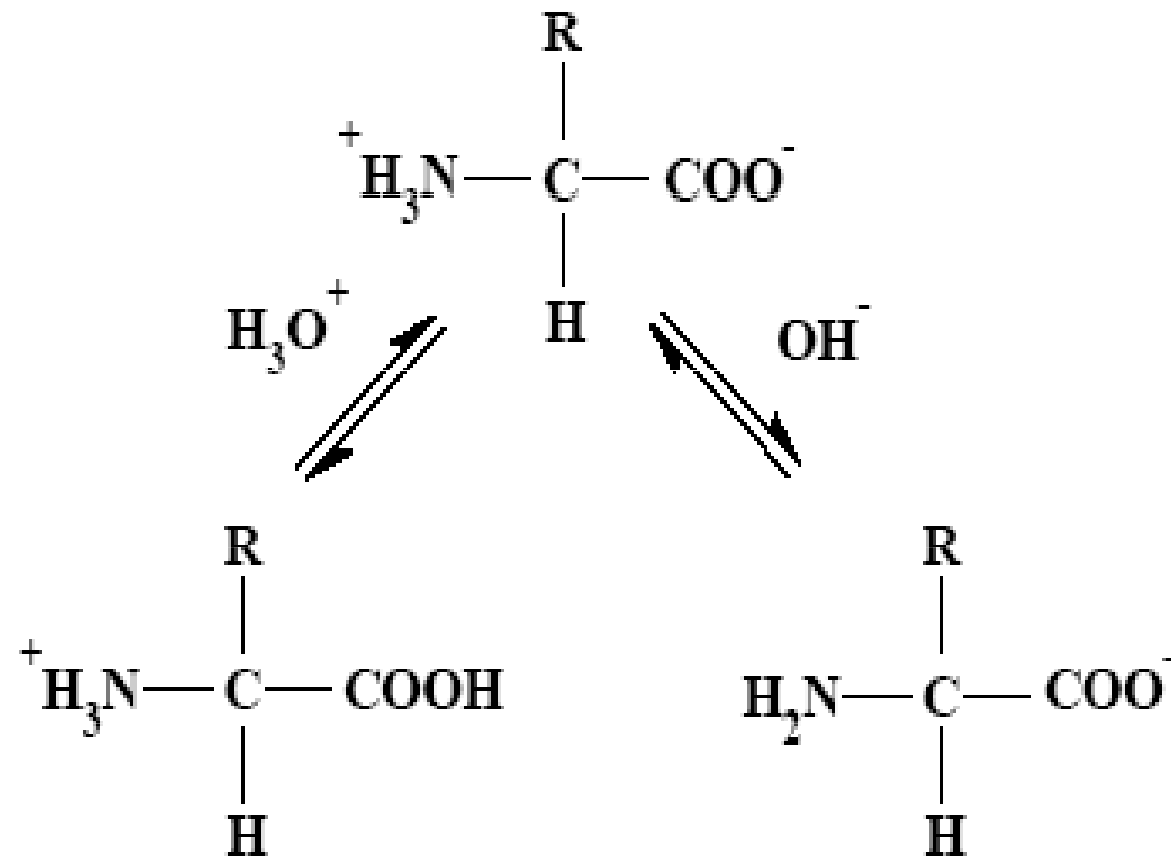


k. azetidinkarboxylová

Vlastnosti aminokyselin

ACIDOBAZICKÉ VLASTNOSTI

Amfoterní charakter - zwitterionty



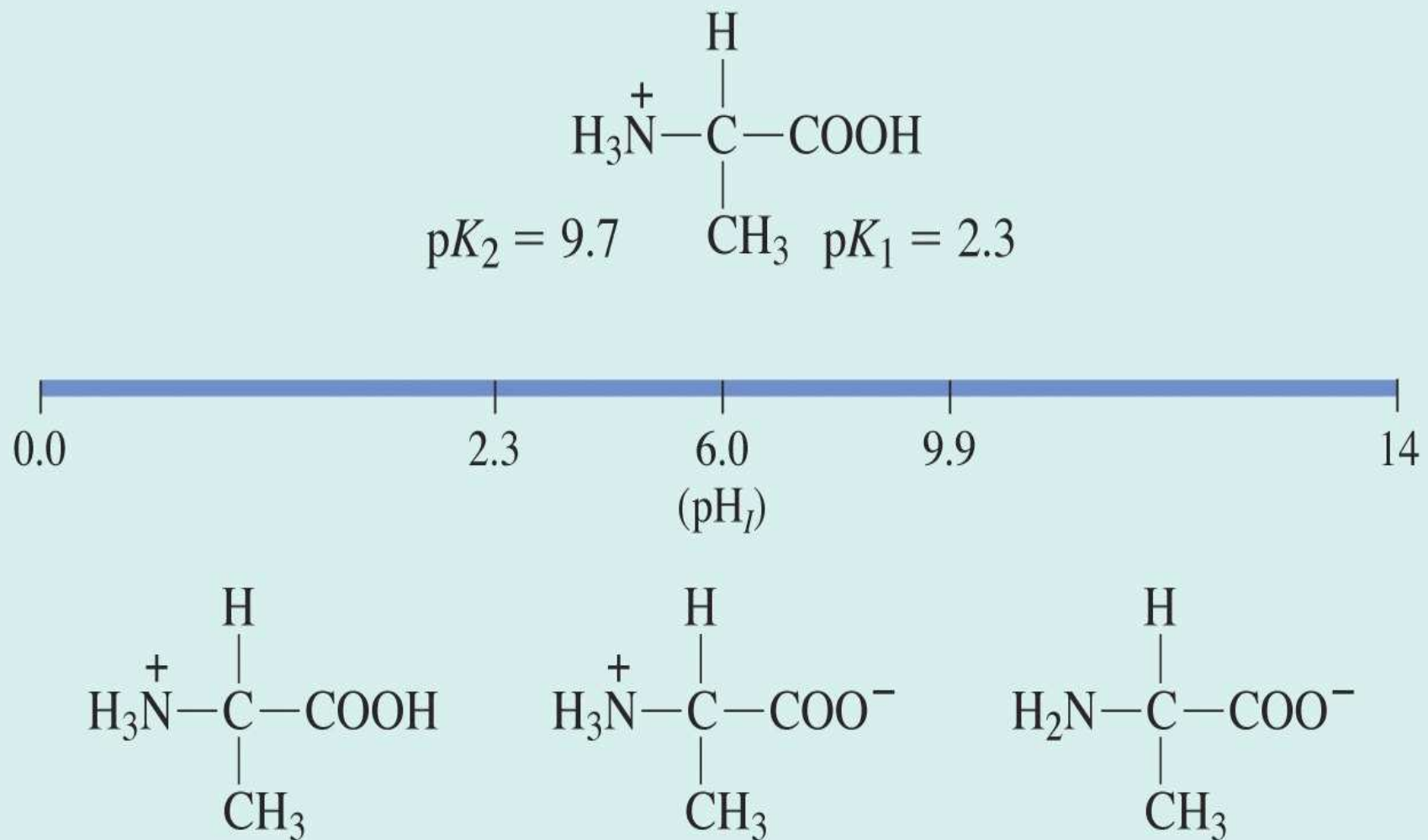


Figure 3-4b Concepts in Biochemistry, 3/e
 © 2006 John Wiley & Sons

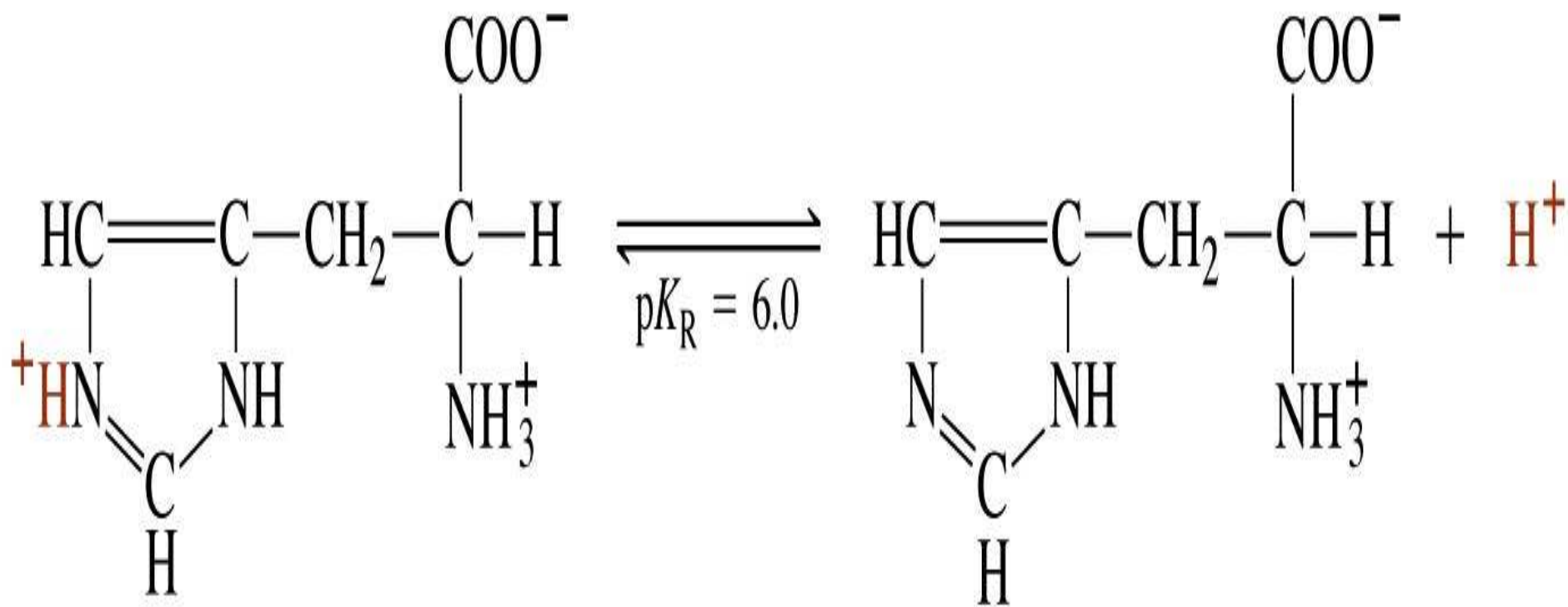
Izoelektrický bod $pI = \frac{pK_{COOH} + pK_{NH_2}}{2}$

Tabulka pK

Skupina	pK	Skupina	pK	Skupina	pK
α COOH	1.8 - 2.5	β COOH	3.9	γ COOH	4.1
α NH ₂	9 - 10	ϵ NH ₂	10.8	guanidin	12.5
imidazol	6.0	SH	8.3	OH	10.1

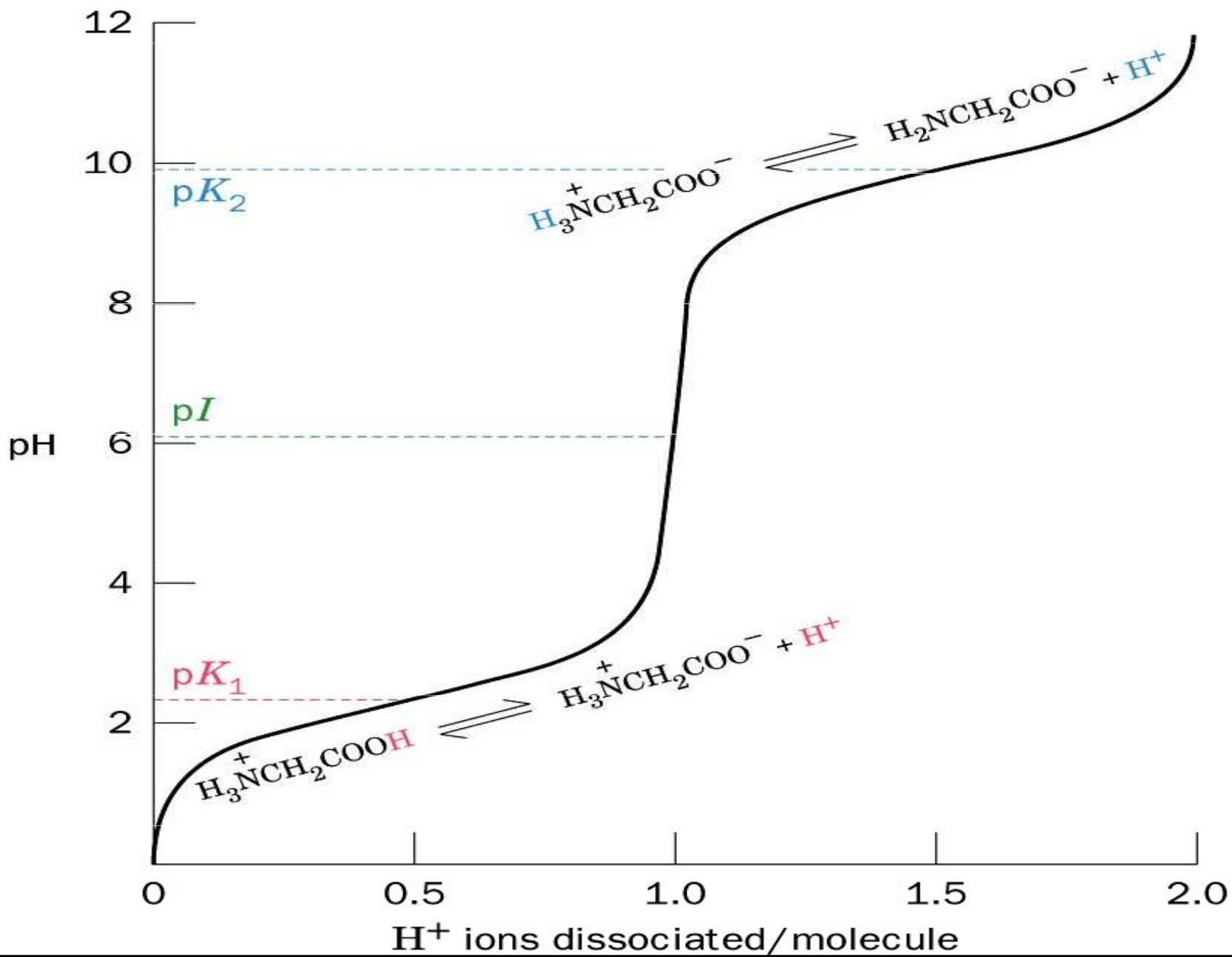
Pufrační kapacita

Titrační křivky

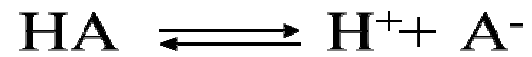


Histidine (His)

Titrační křivka glycinu

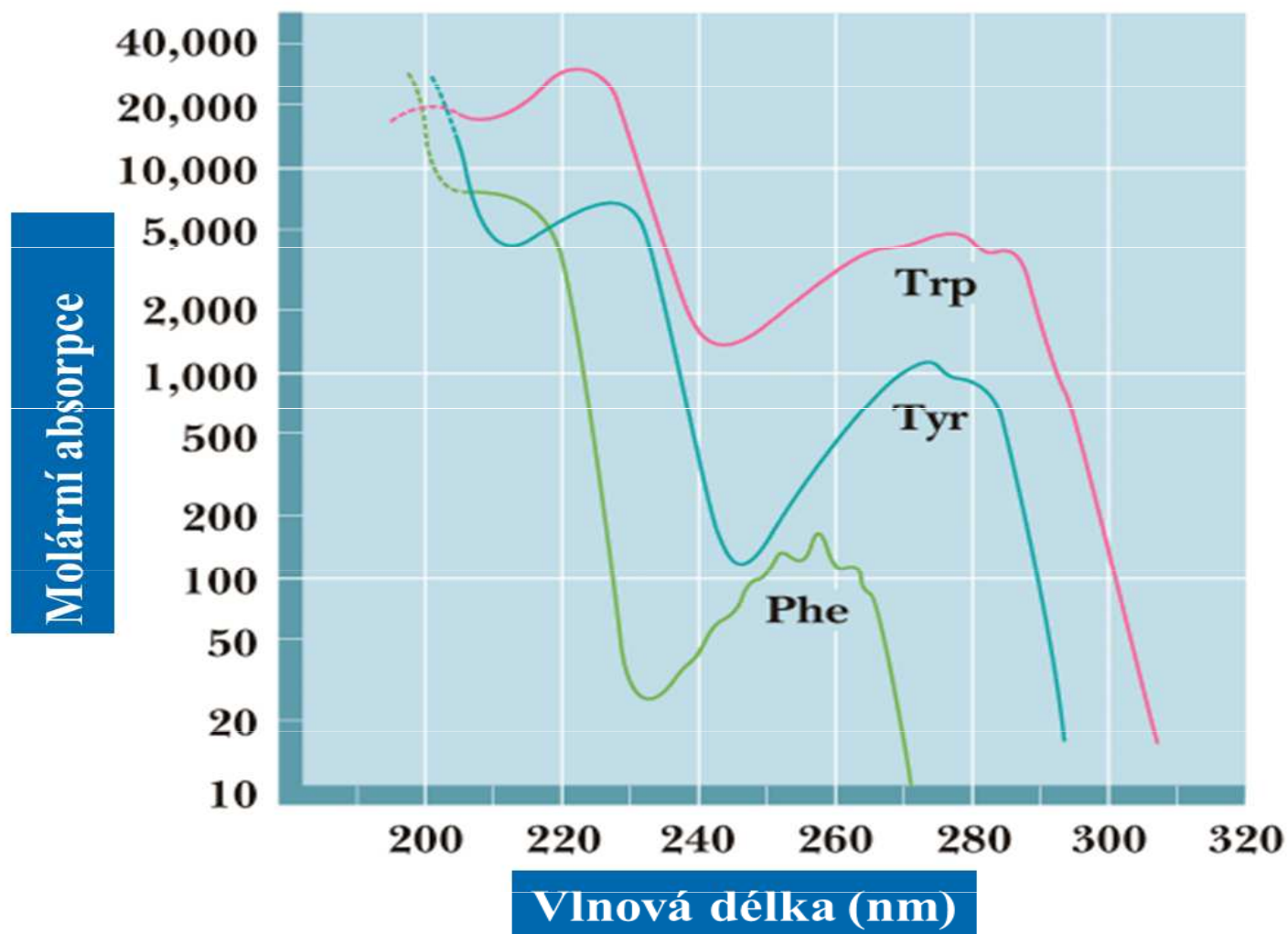


Henderson-Hasselbachova rovnice

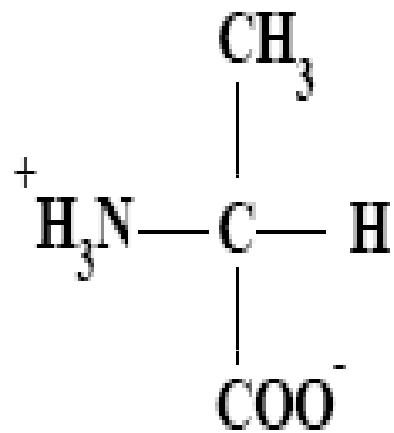


$$K_a = \frac{[\text{H}^+][\text{A}^-]}{[\text{HA}]}$$

Optické vlastnosti

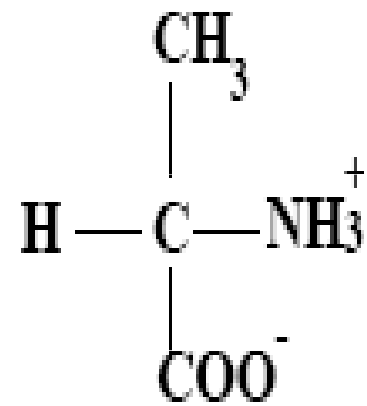


OPTICKÁ AKTIVITA



L -alanin

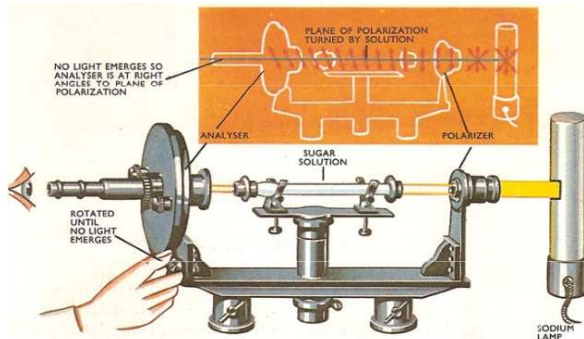
L



D-alanin

R

enantiomery



Analyzer
(can be rotated)

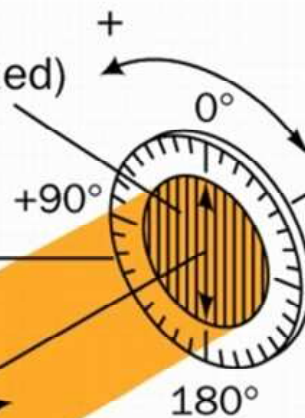
Degree scale
(fixed)

Polarimeter
tube

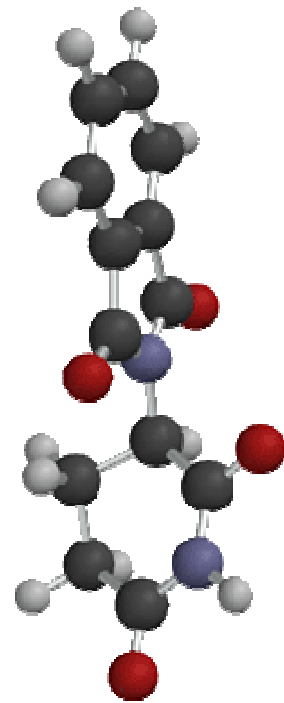
Plane of polarization
of the emerging light
is not the same as
that of the entering
polarized light

Light source
Fixed
polarizer

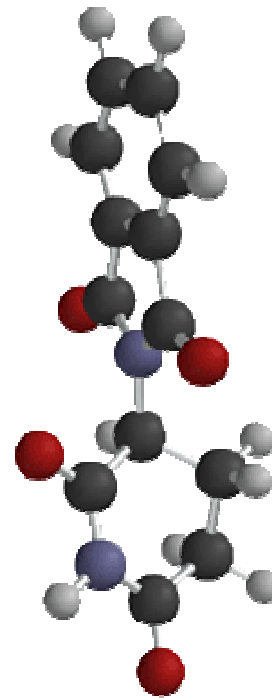
Optically active
substance in solution
in the tube causes
the plane of the polarized
light to rotate



Thalidomid



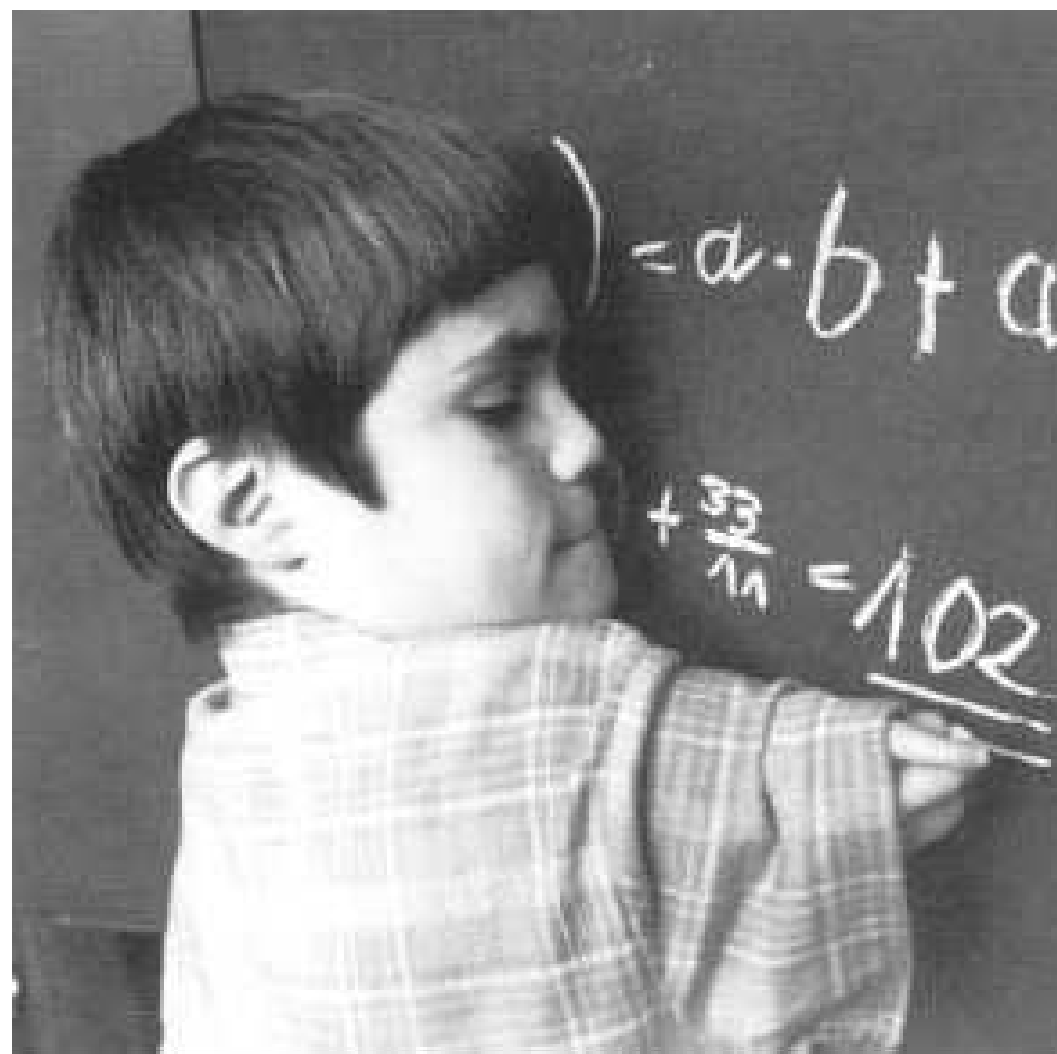
(R)-(+)-Thalidomide



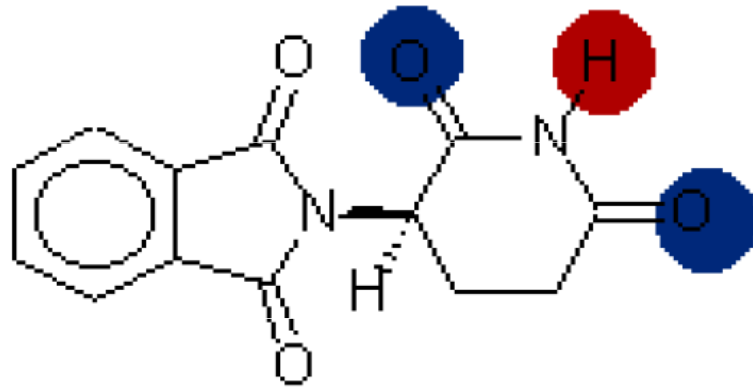
(S)-(-)-Thalidomide

Thalidomid

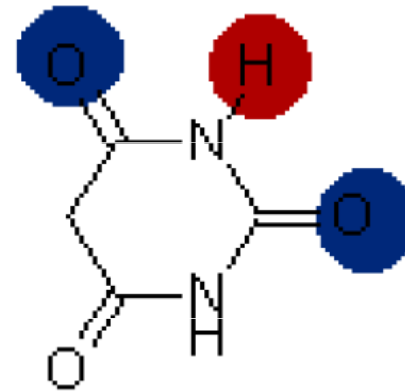




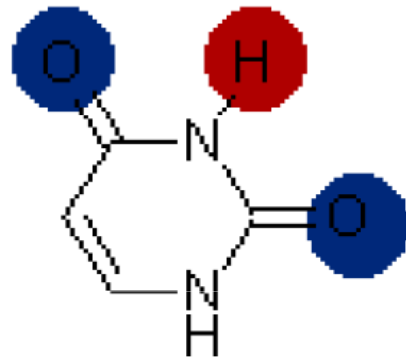
Thalidomid



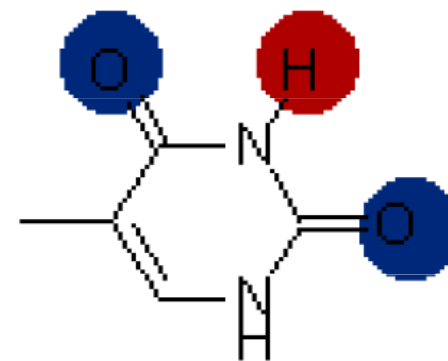
Thalidomid



Barbitursäure

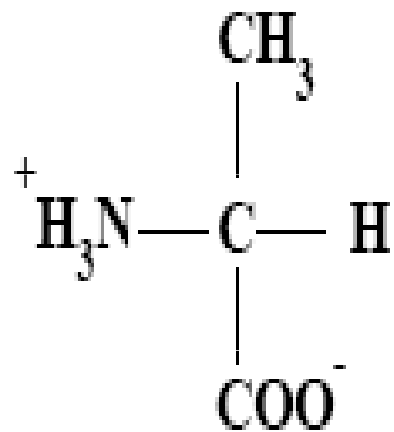


Uracil



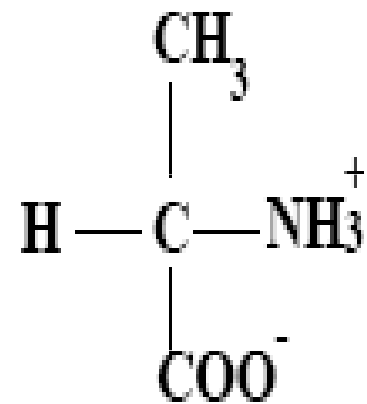
Thymin

OPTICKÁ AKTIVITA



L -alanin

L

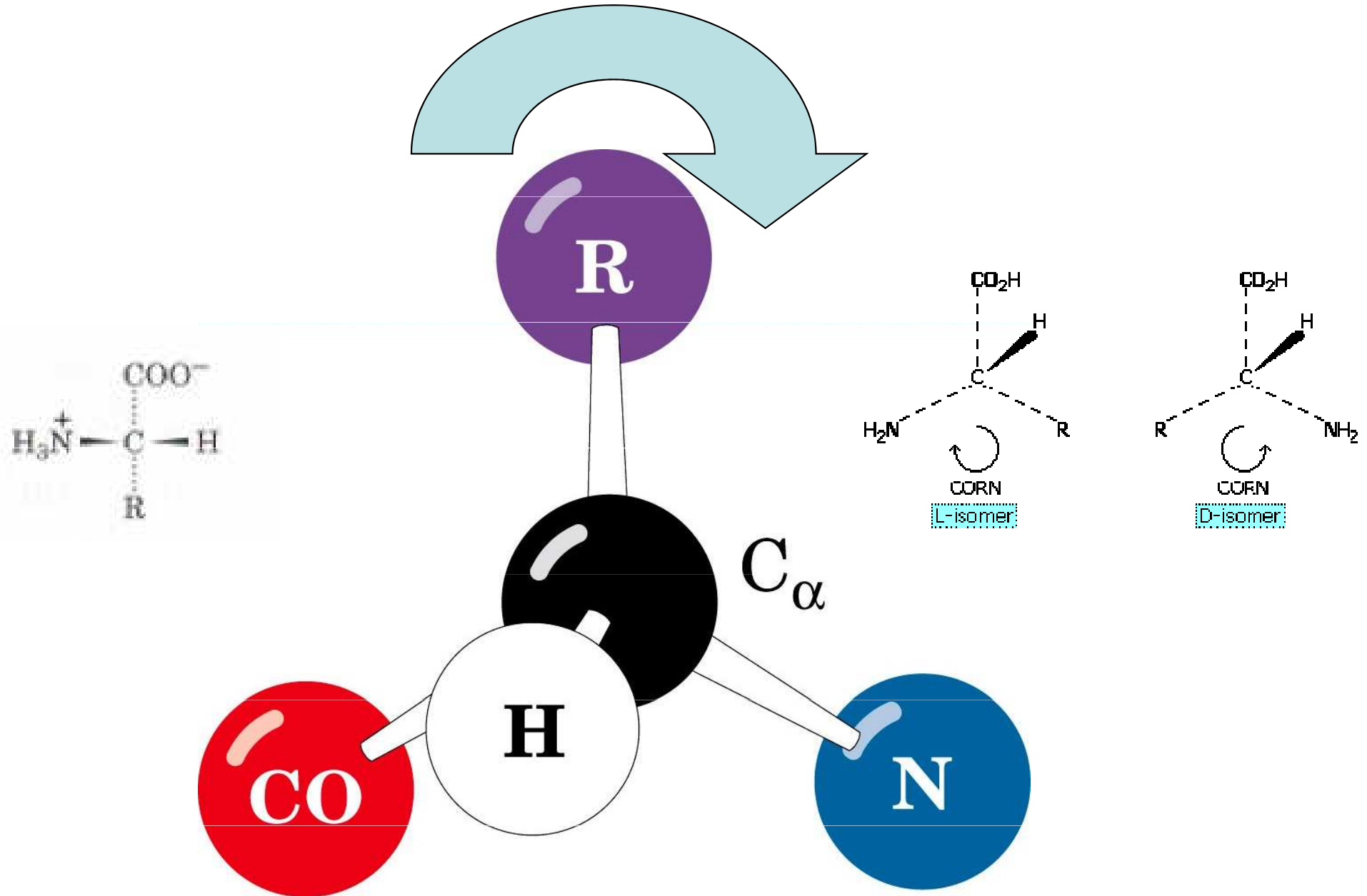


D-alanin

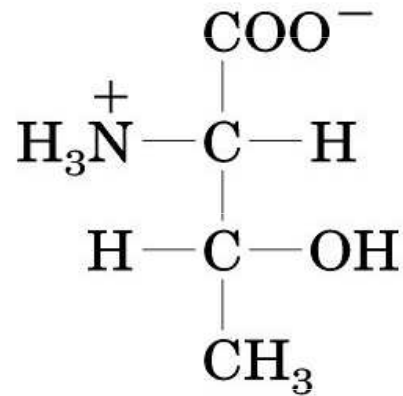
R

enantiomery

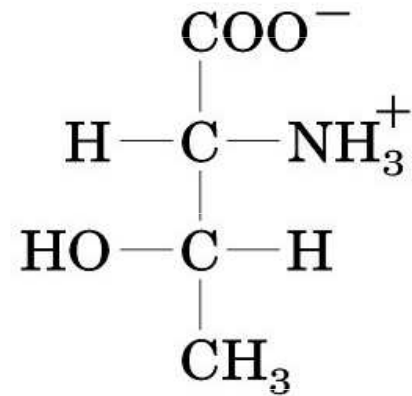
L AMK - CO-R-N



Diastomery threoninu (Ile)

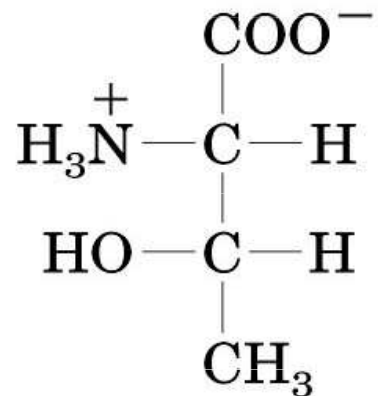


L-Threonine

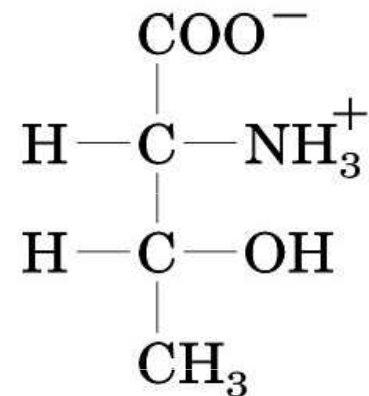


D-Threonine

Mirror
plane



L-*allo*-Threonine



D-*allo*-Threonine

CHEMICKÉ VLASTNOSTI

- reakce dané přítomností COOH a NH₂ skupin

ninhydrinová reakce - NH₂

- reakce vedlejších skupin

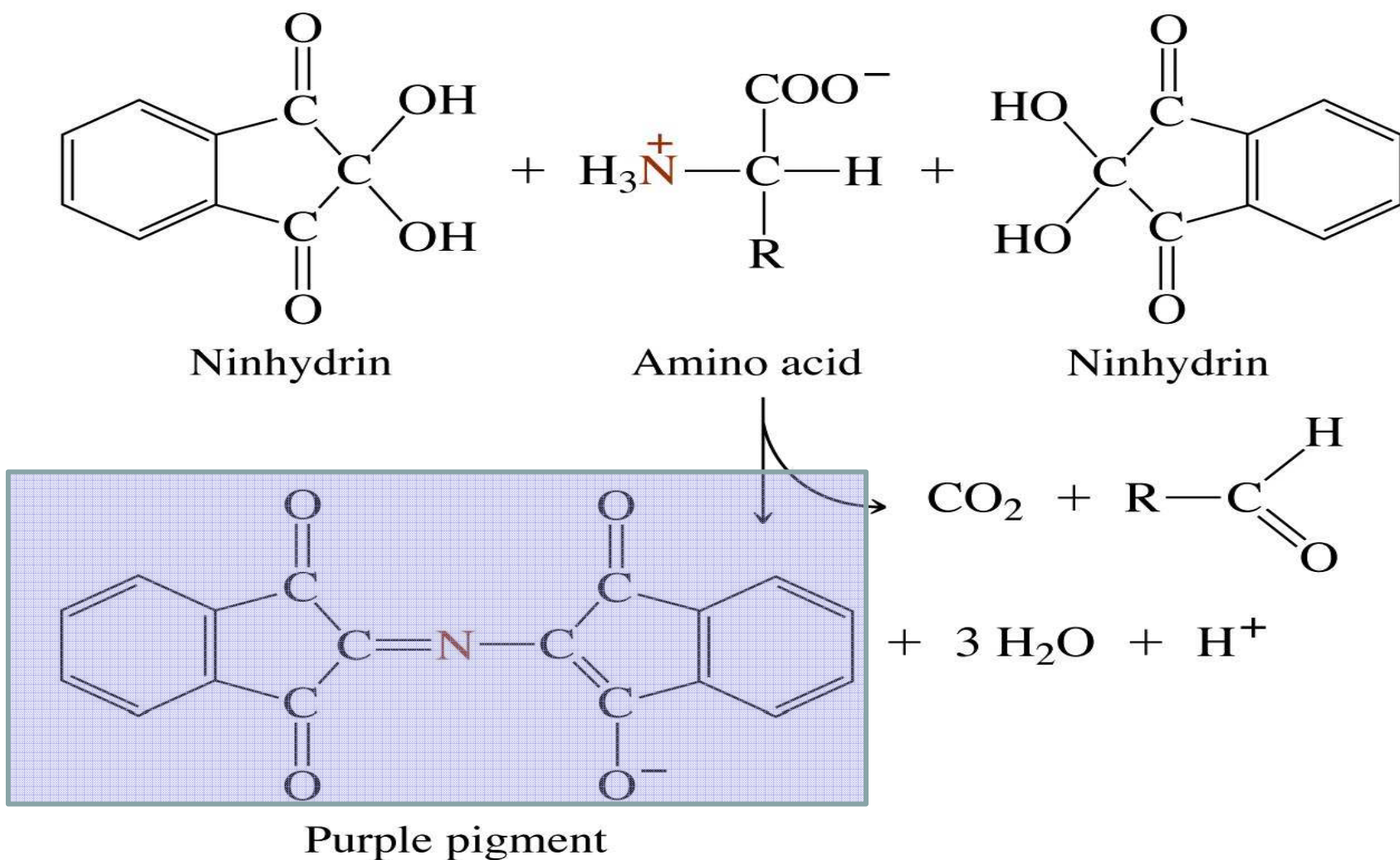
reakce Sakaguchiho - guanidinová skupina

xantoproteinová reakce - aromatické aminokyseliny

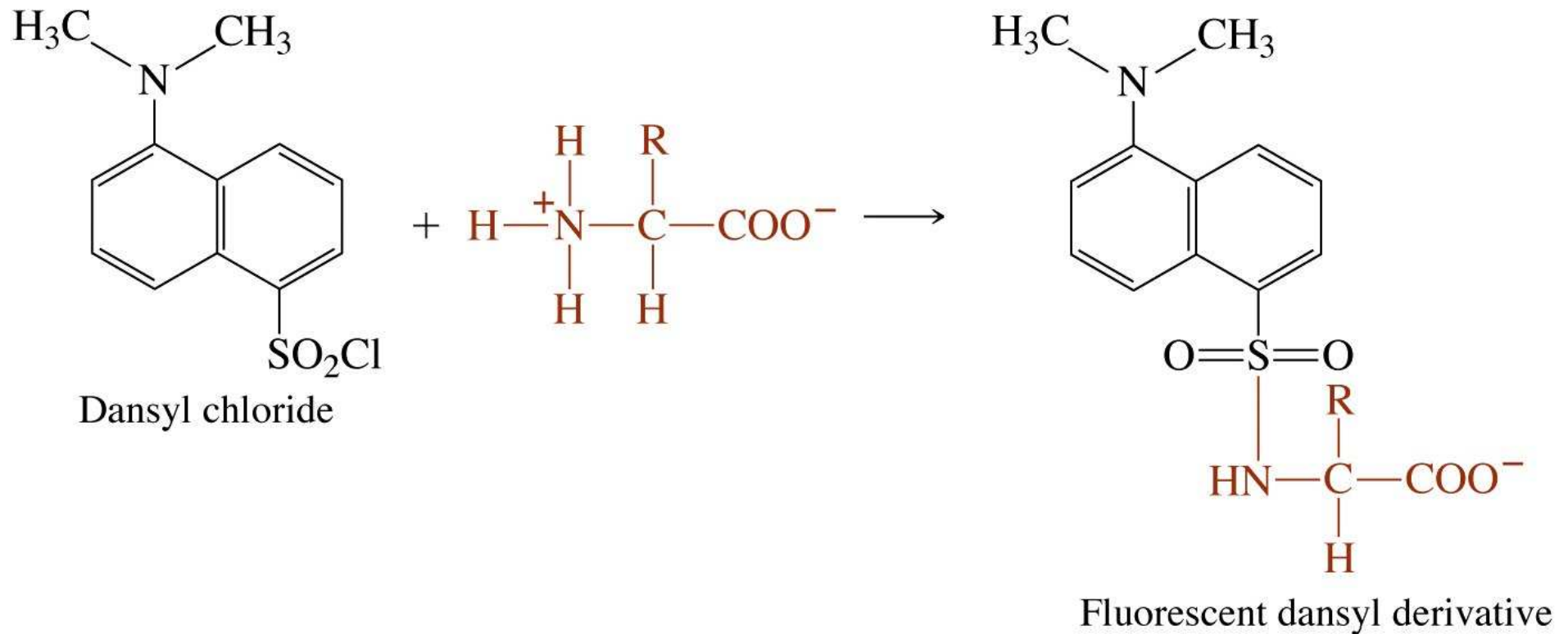
Paulyho reakce - tyrosin

Adamkiewiczova reakce - indol

Ninhydrinová reakce



Reakce AMK s dansylchloridem

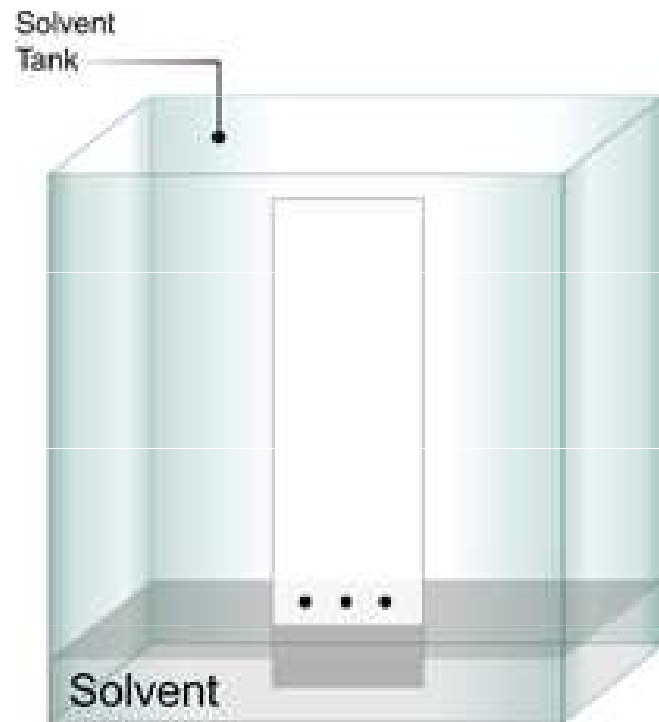


Analýza aminokyselin

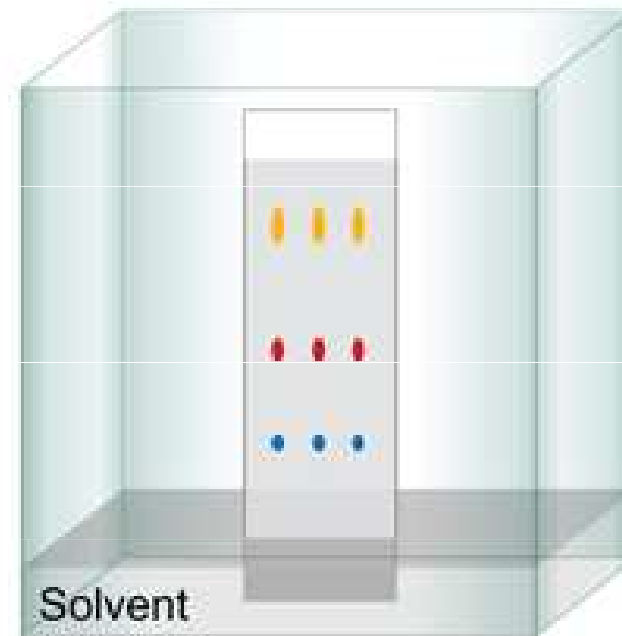
- papíroví a tenkovrstvá chromatografie
- ionexová chromatografie
- reverzně fázová chromatografie

Papírová chromatografie AMK

Martin Syngge Nobelova cena za chemii 1952



Time Zero



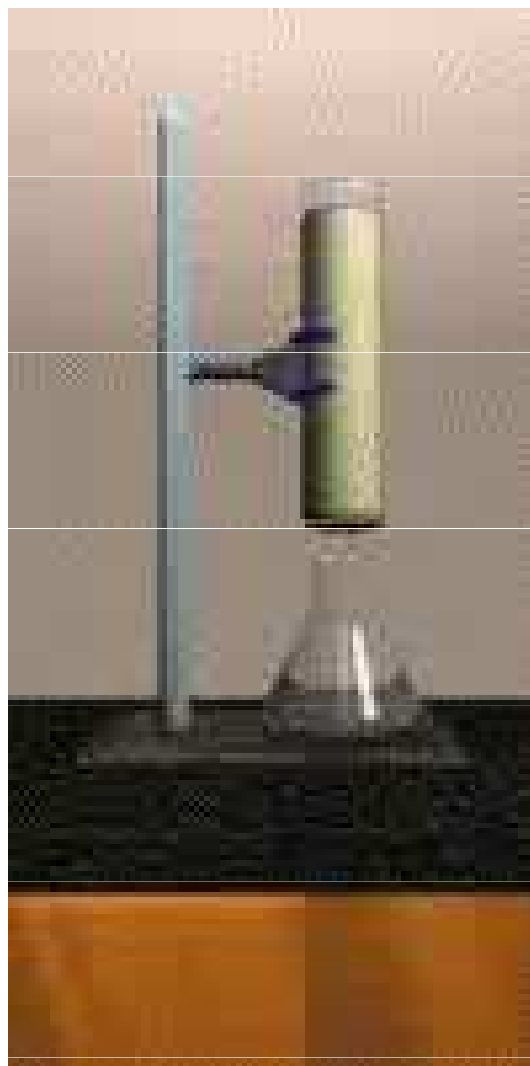
After Ten Minutes

Papírová chromatografie AMK

Martin Sygne Nobelova cena za chemii 1952

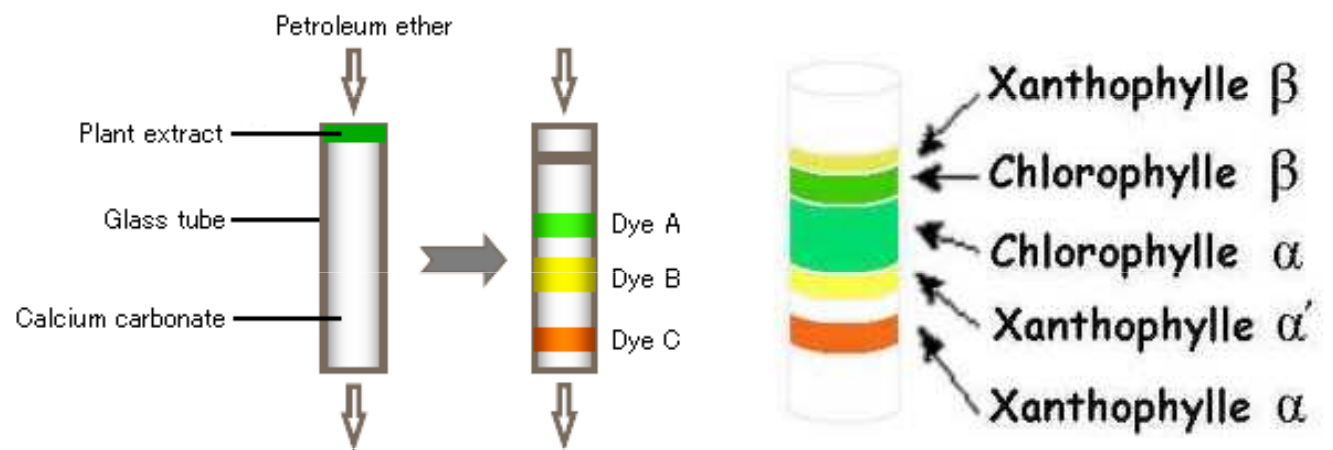
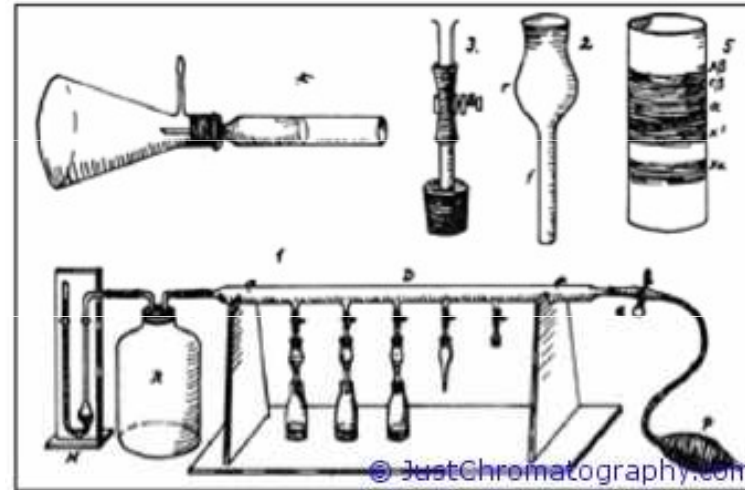


Kolonová chromatografie

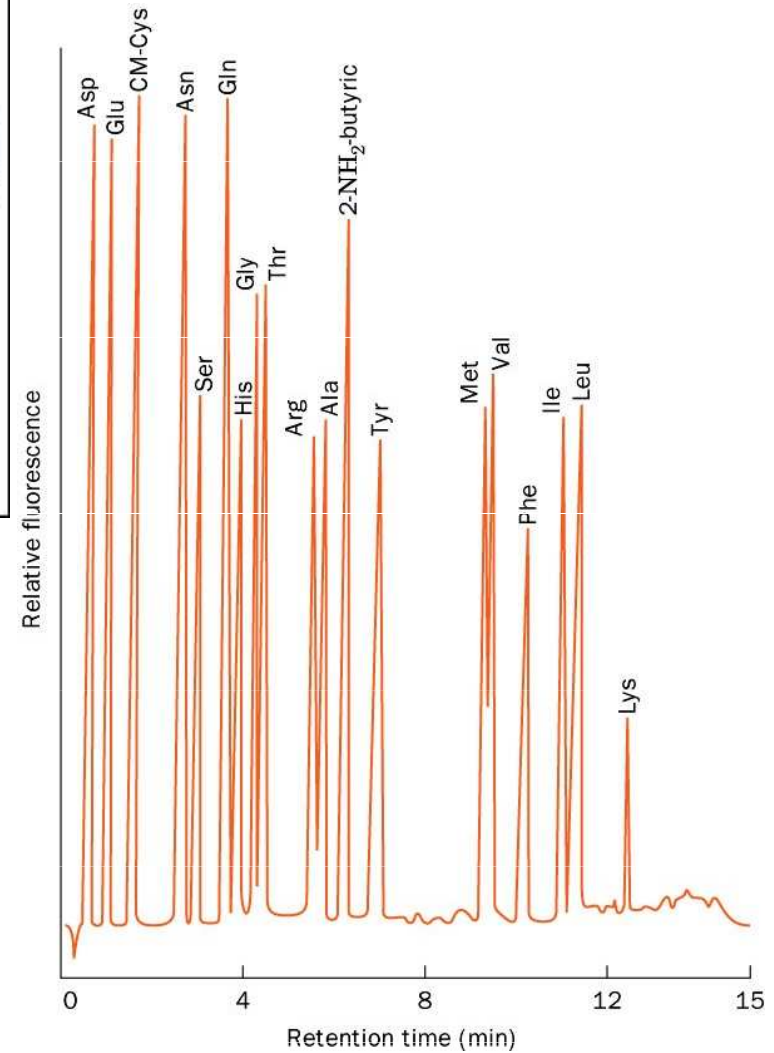
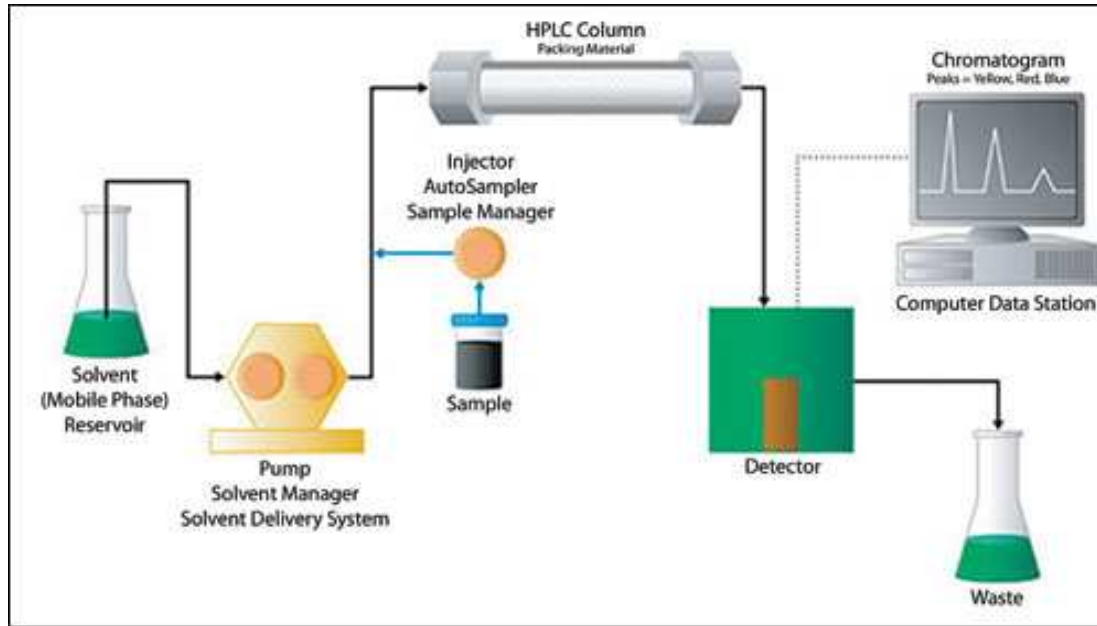


Mikhail Semyonovich Tsvet

Chromatographia 1906

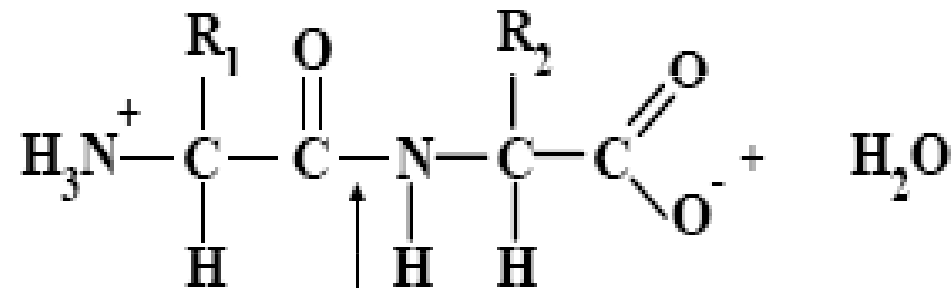
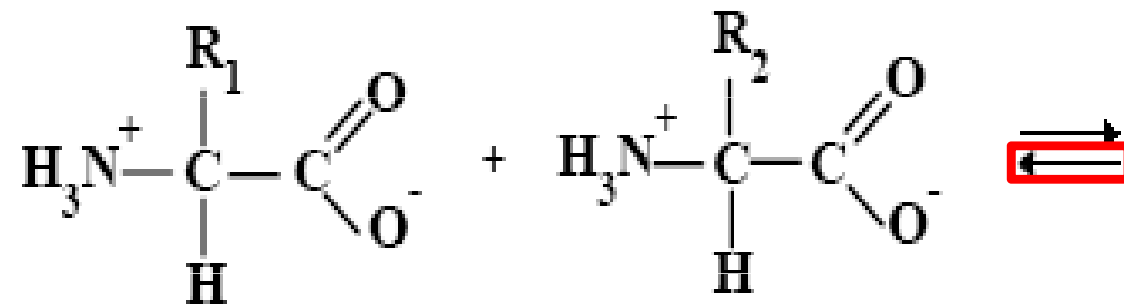


RP HPLC AMK



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:

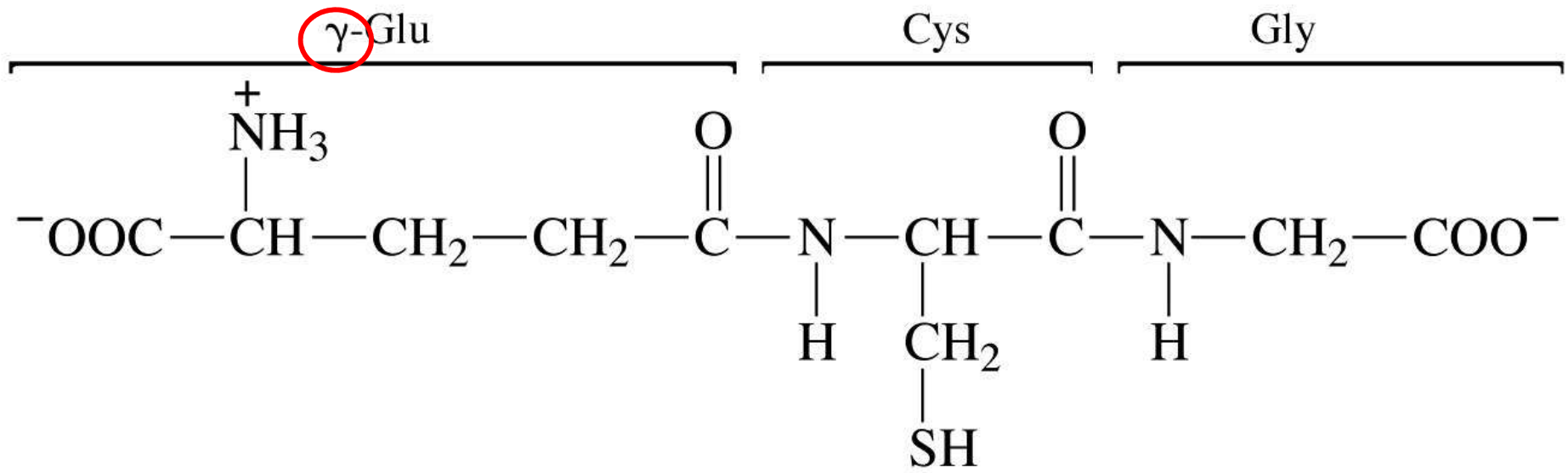
Di - karnosin

anserin

Ve svalech

Tri - glutathion GSH

Ve všech buňkách



Glutathione (GSH)
(reduced)



S

S



Glutathione (GSSG)
(oxidized)

Přírodní peptidy:

Di - karnosin
anserin

Tri - glutathion GSH

Peptidové hormóny - oxytosin
vasopresin

Zadní lalok hypofýzy

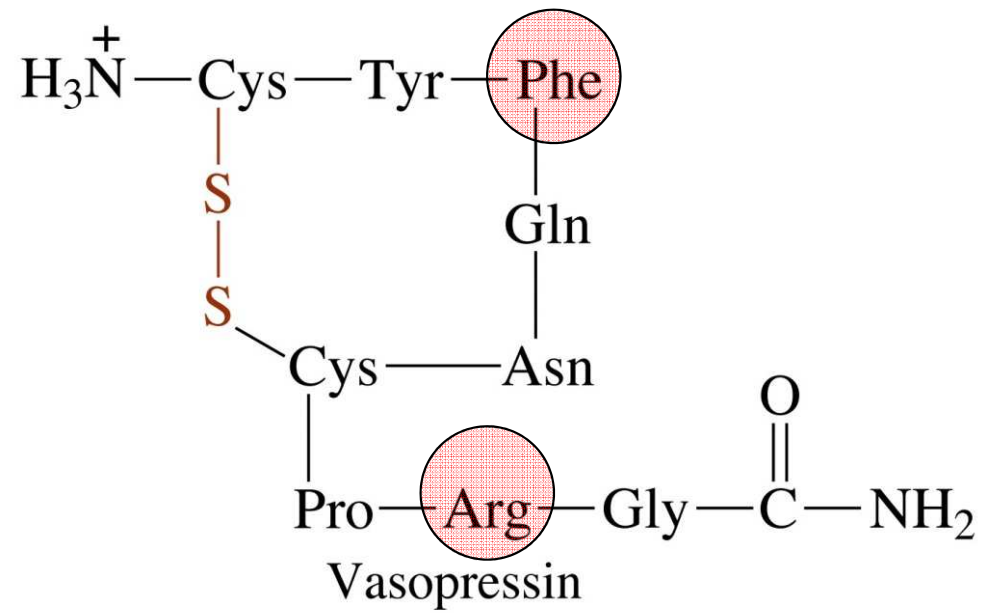


Figure 3-11c Concepts in Biochemistry, 3/e
© 2006 John Wiley & Sons

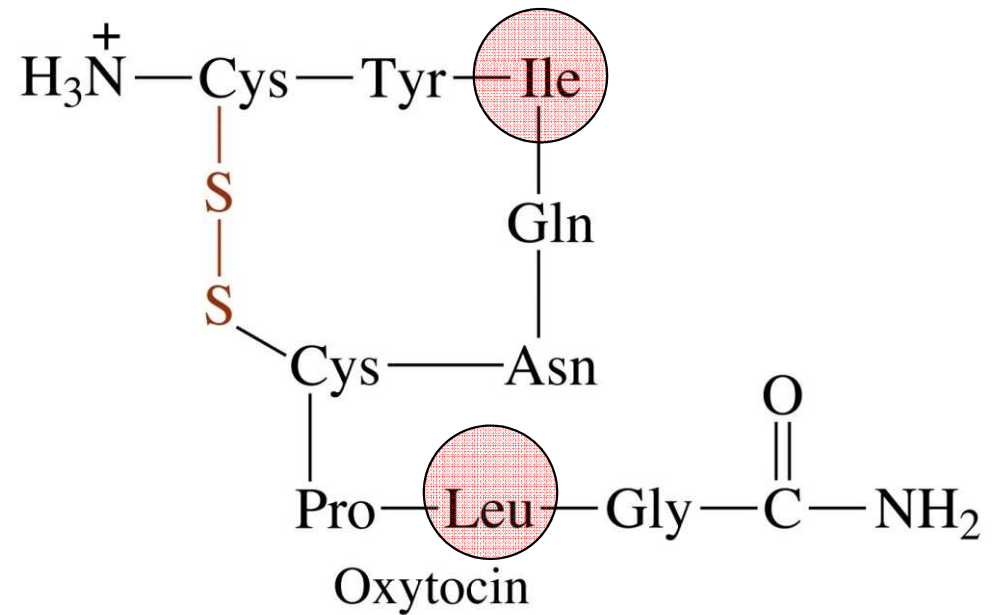


Figure 3-11b Concepts in Biochemistry, 3/e
© 2006 John Wiley & Sons

Přírodní peptidy:

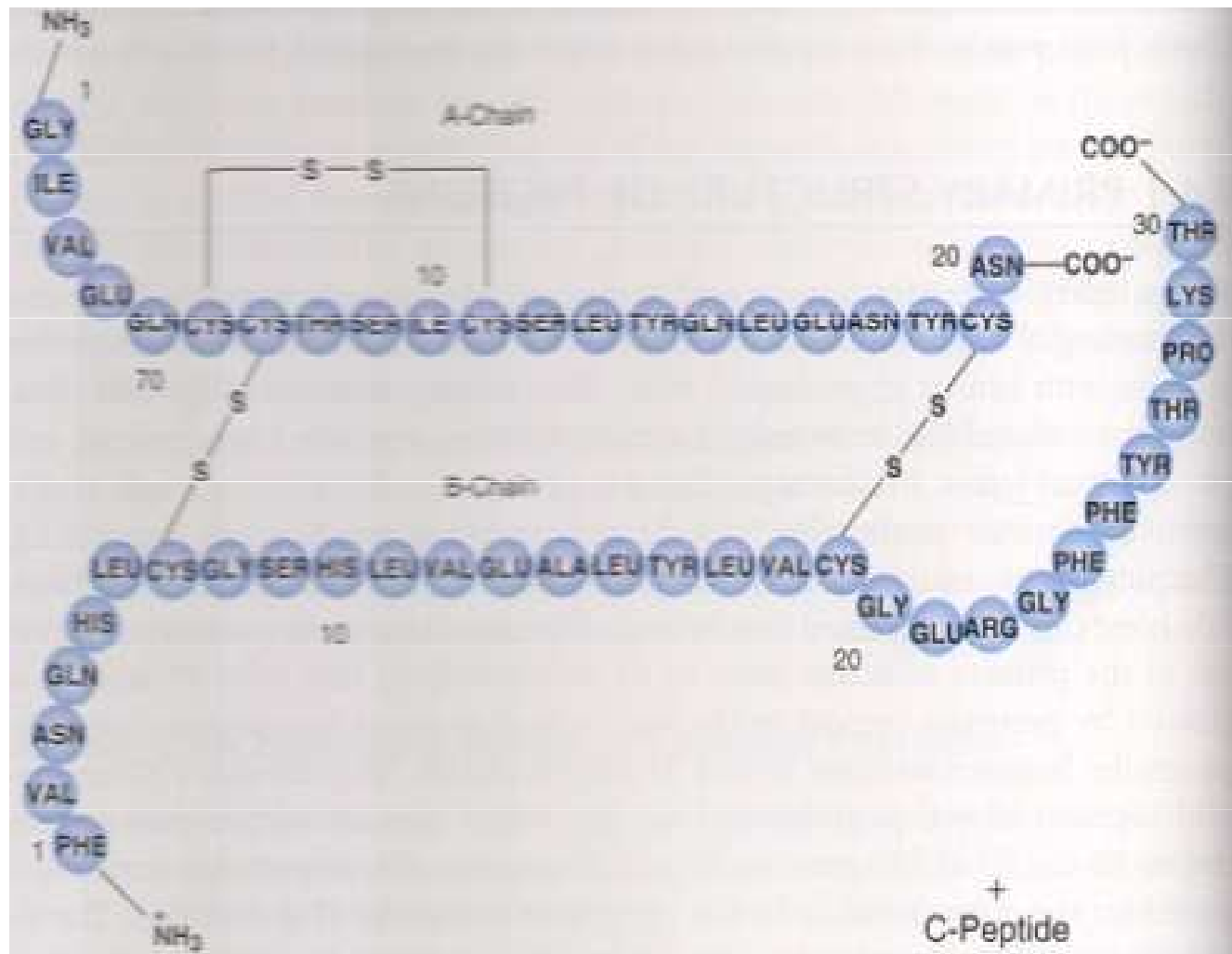
Di - karnosin
anserin

Tri - glutathion GSH

Peptidové hormóny - oxytosin
vasopresin
inzulin
glukagon

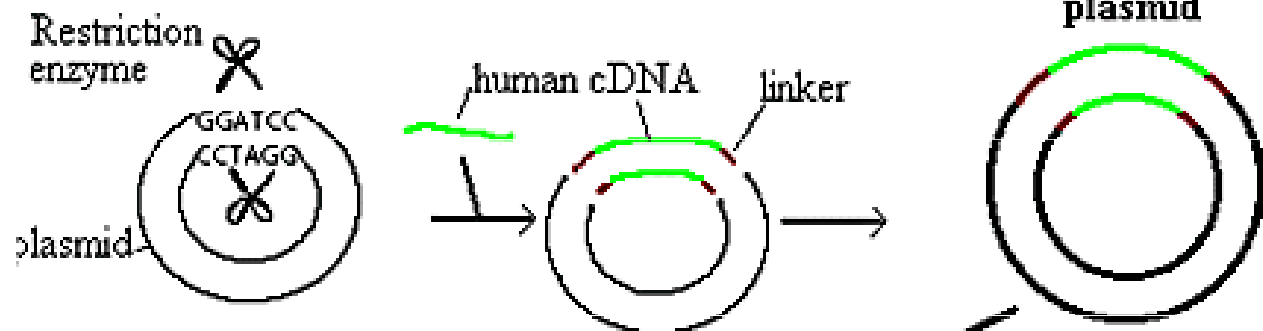
pankreas

Inzulín – 51 AMK

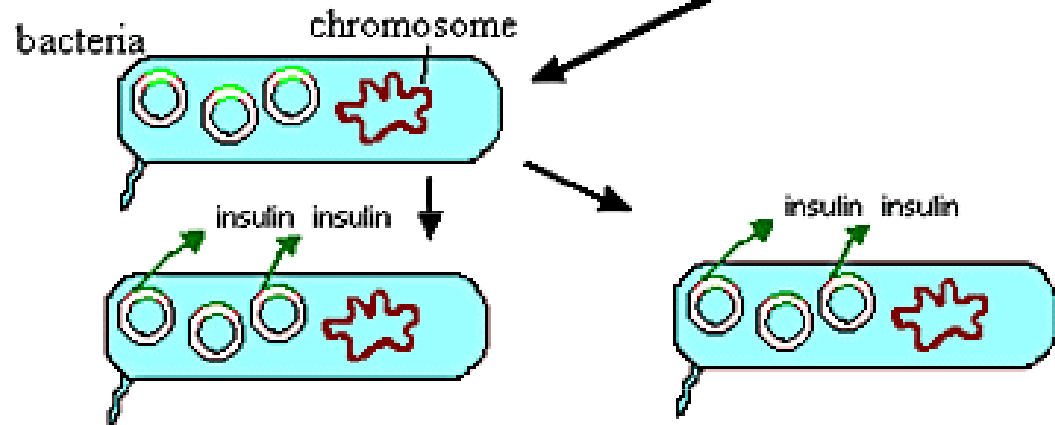


Genetické inženýrství

Transfer of the Insulin gene



Cloning the Insulin Gene



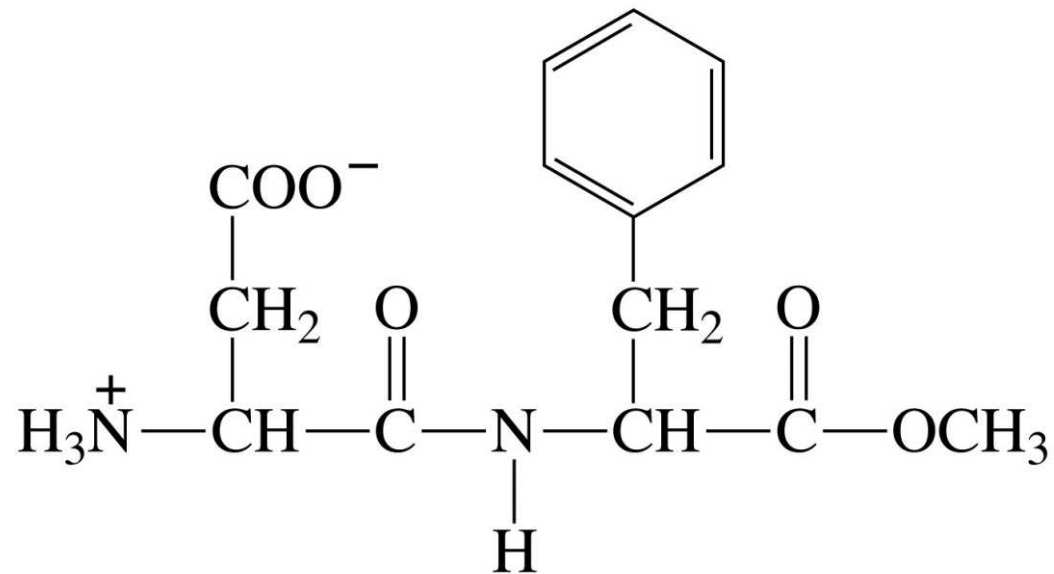
Peptidové neuromodulátory

- enkefaliny 5 AMK
endorfiny 15-32 AMK

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)

Peptidové neuromodulátory - enkefaliny
endorfiny

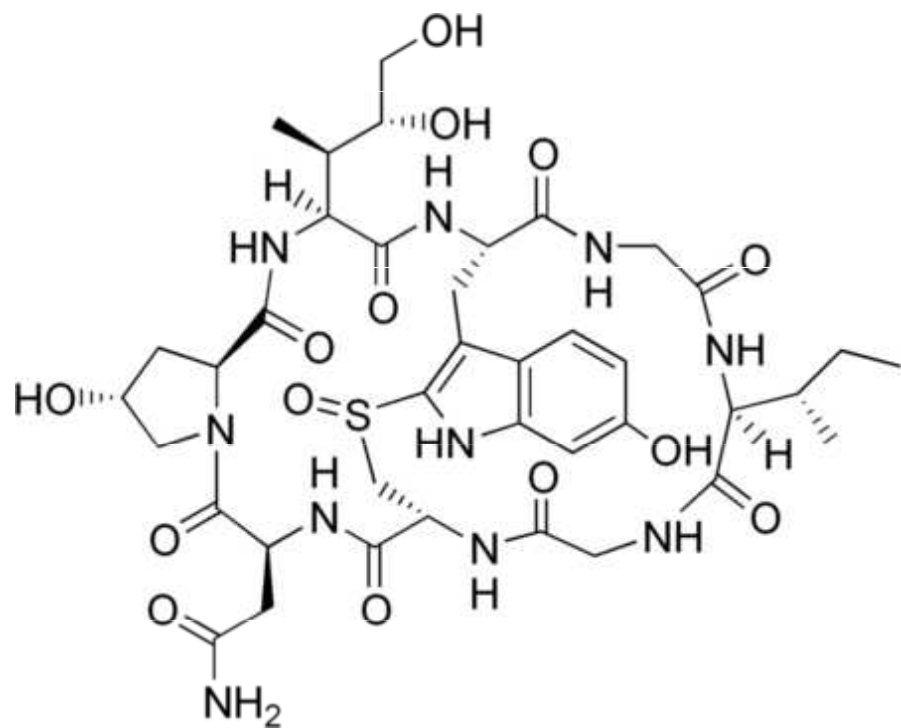
Peptidová antibiotika - penicilin
gramicidin
valinomycin
aktinomycin

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

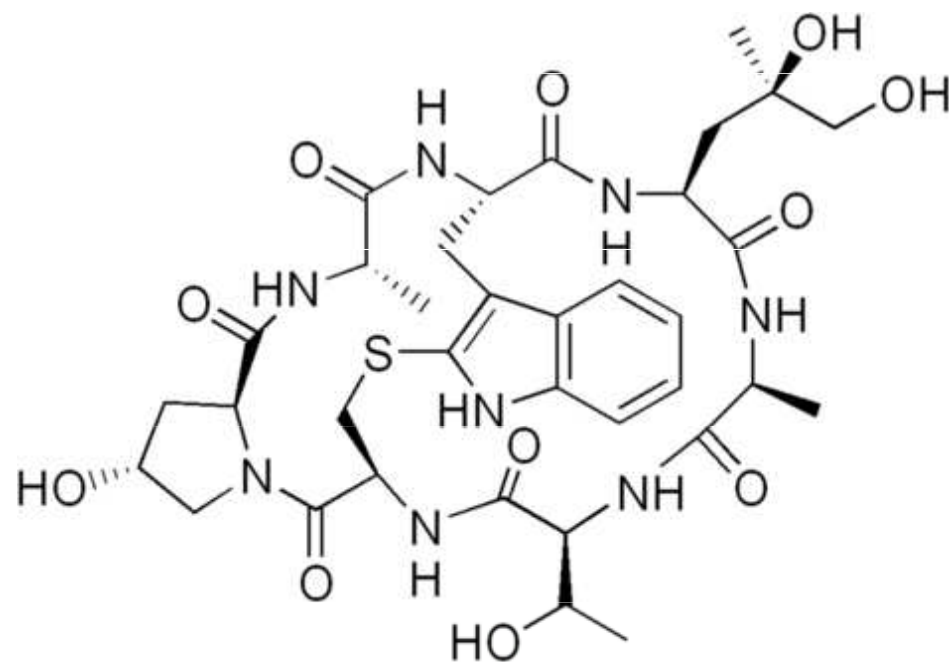
Polypeptidy - protaminy

Falotoxiny

Amanitin

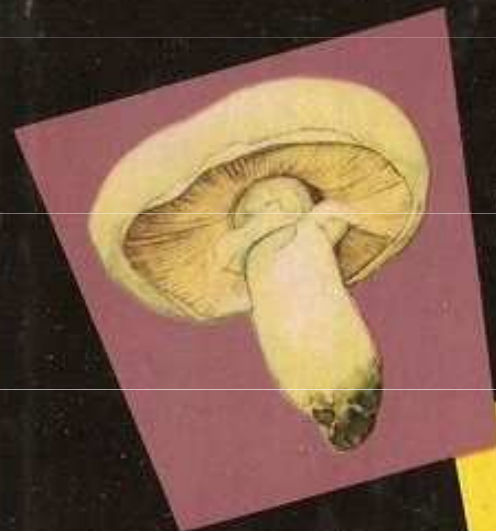


Faloidin



Amanita phalloides





A. PILÁT
O. UŠÁK



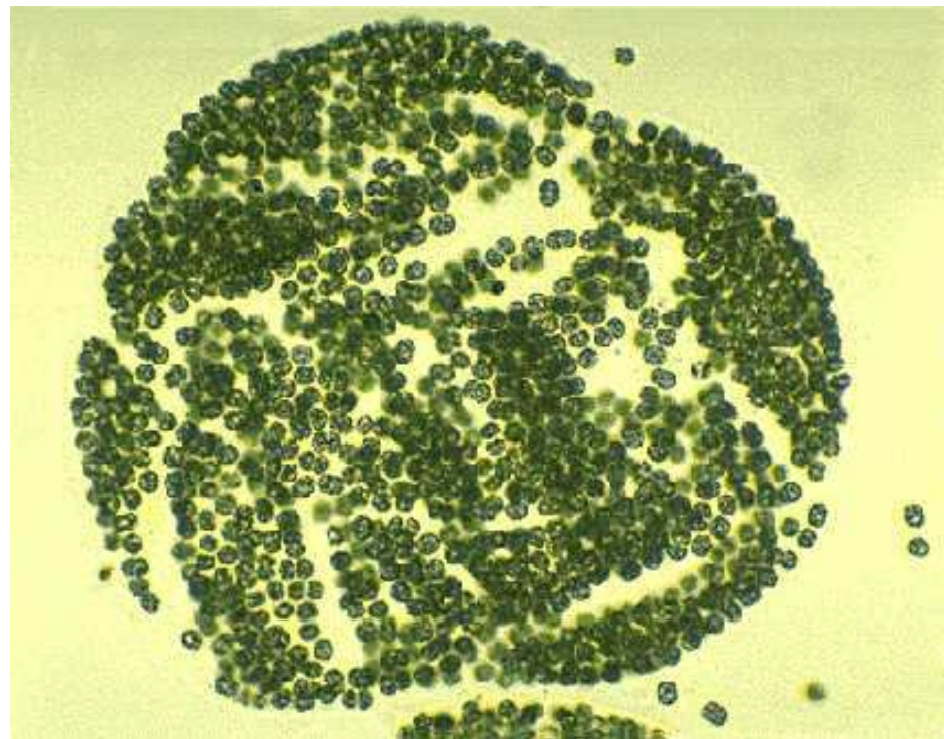
Kapesní
**ATLAS
HUB**

SPN

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

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

Microcystiny



Microcystins

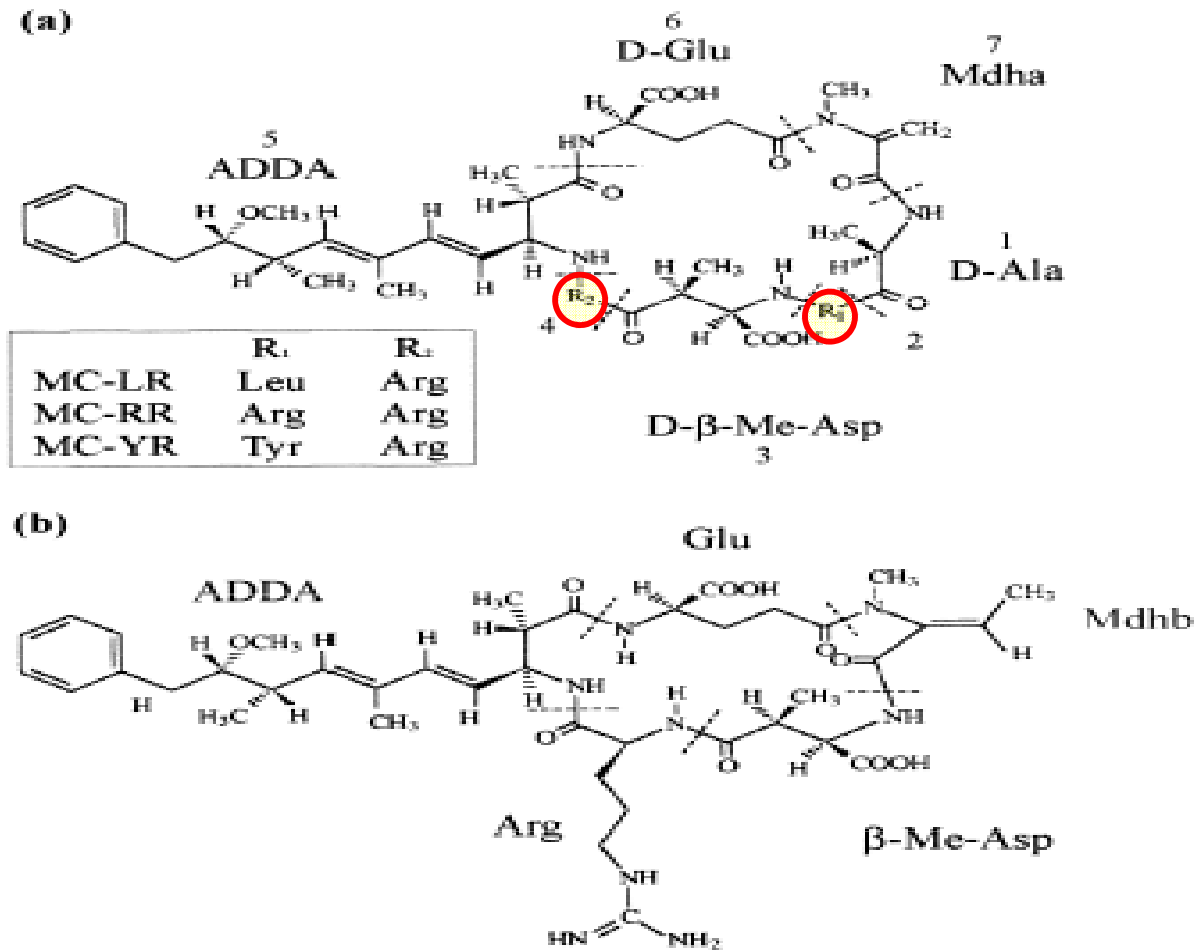


Fig. 1. General chemical structure of (a) microcystins and (b) nodularins.

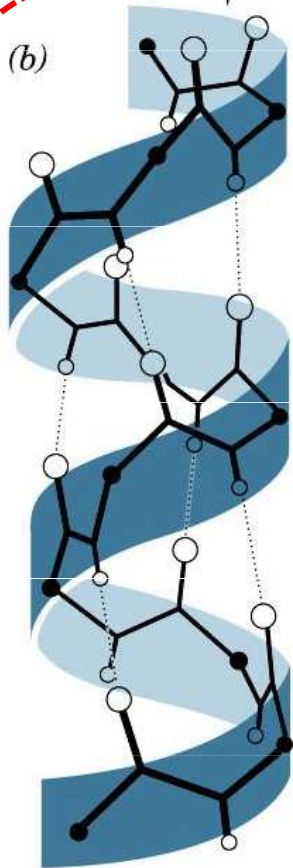
BÍLKOVINY :

Funkce

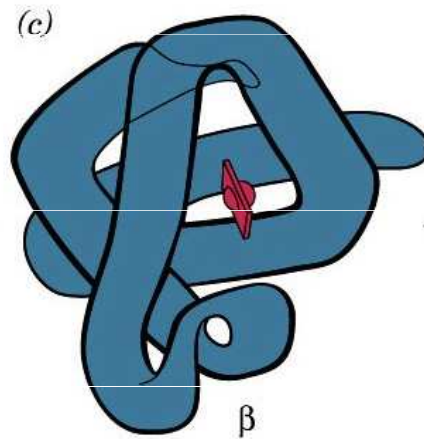


(a) – Lys – Ala – His – Gly – Lys – Lys – Val – Leu – Gly – Ala –
Primary structure (amino acid sequence in a polypeptide chain)

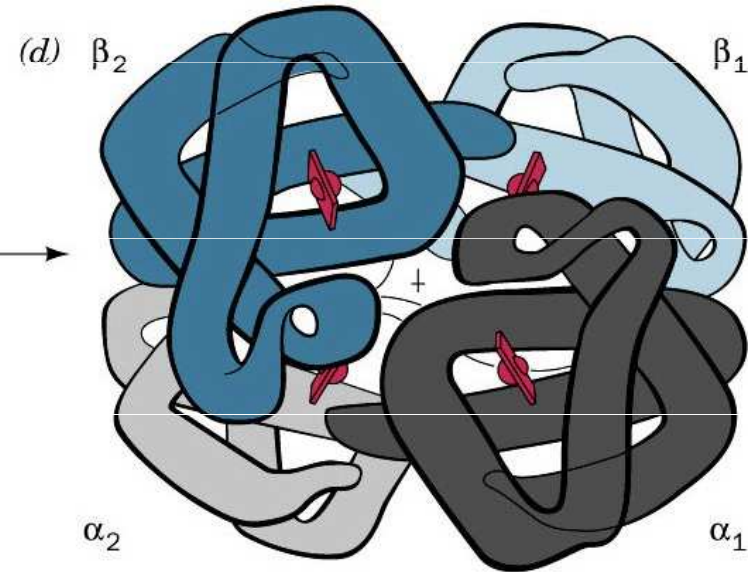
Konformace



Secondary structure (helix)



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



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

Aminokyselinová analýza

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

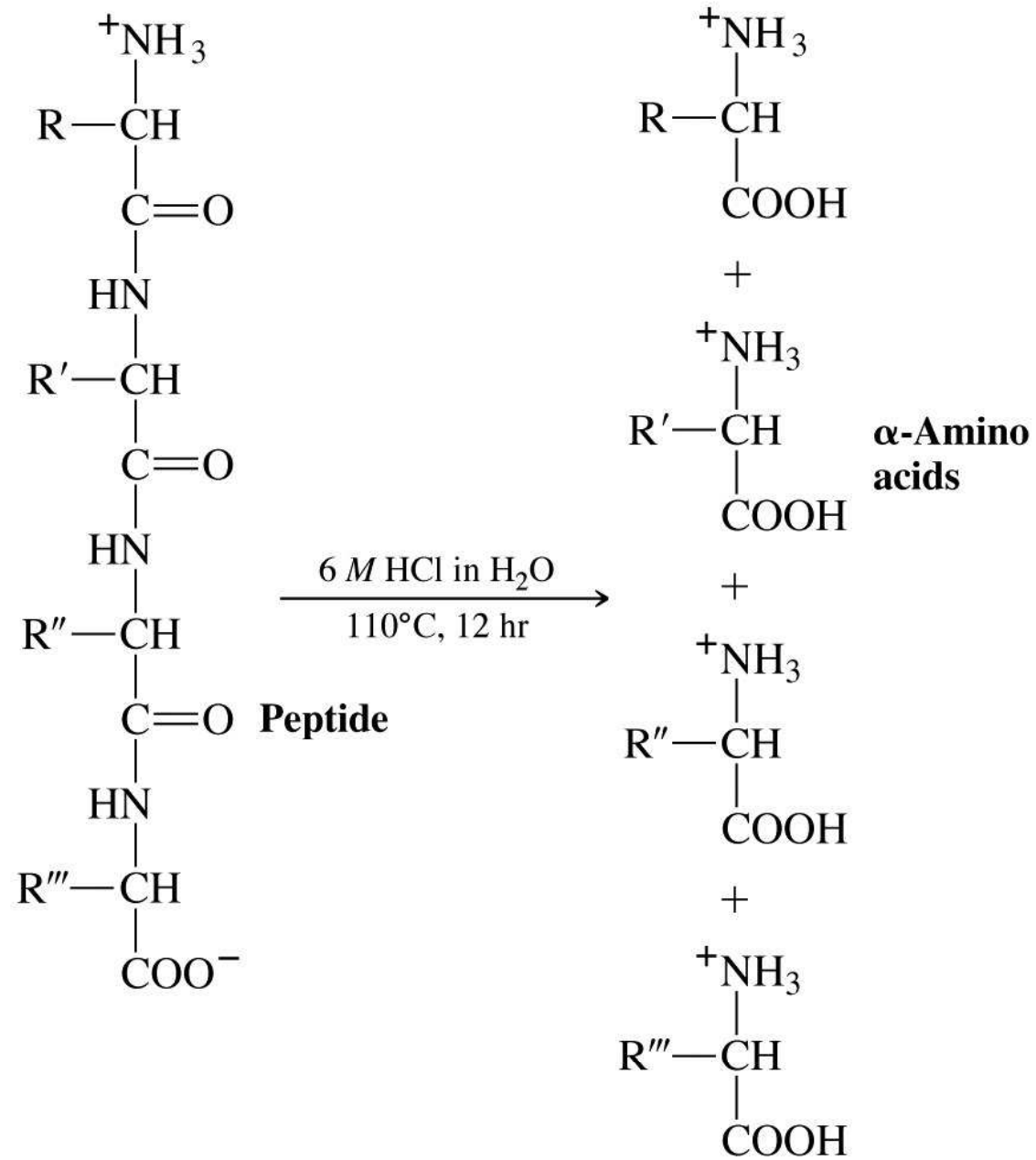
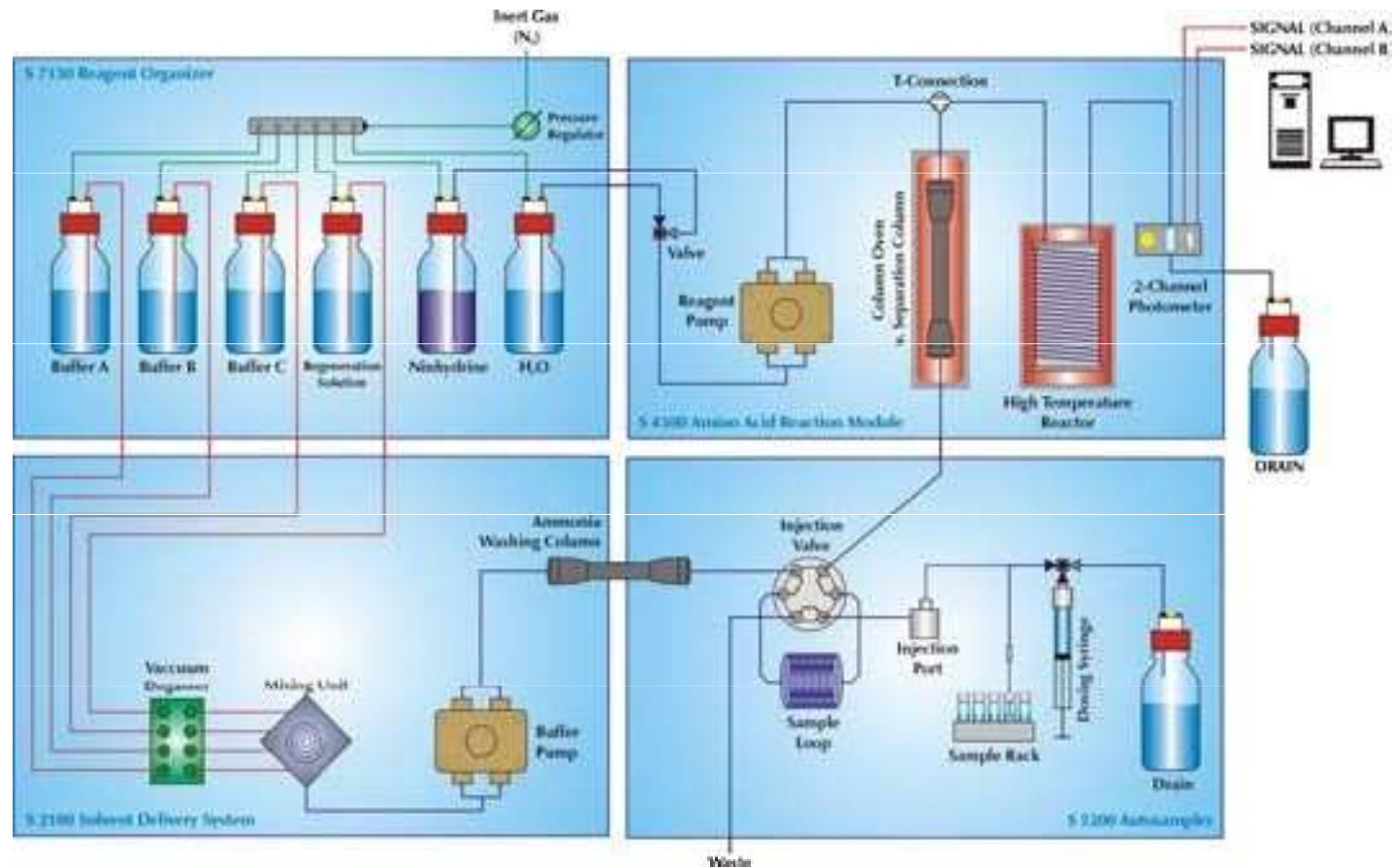


Figure 3-15 Concepts in Biochemistry, 3/e
© 2006 John Wiley & Sons

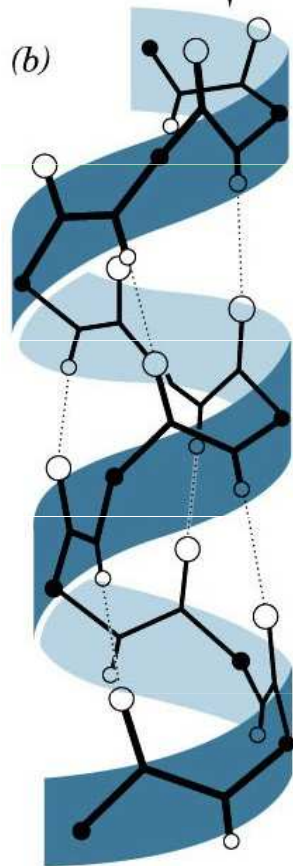
AMK analyzátor



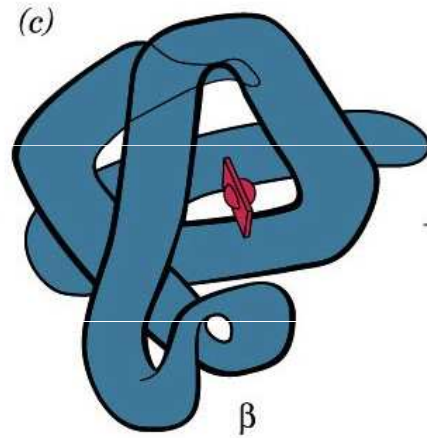
AMK analyzátor



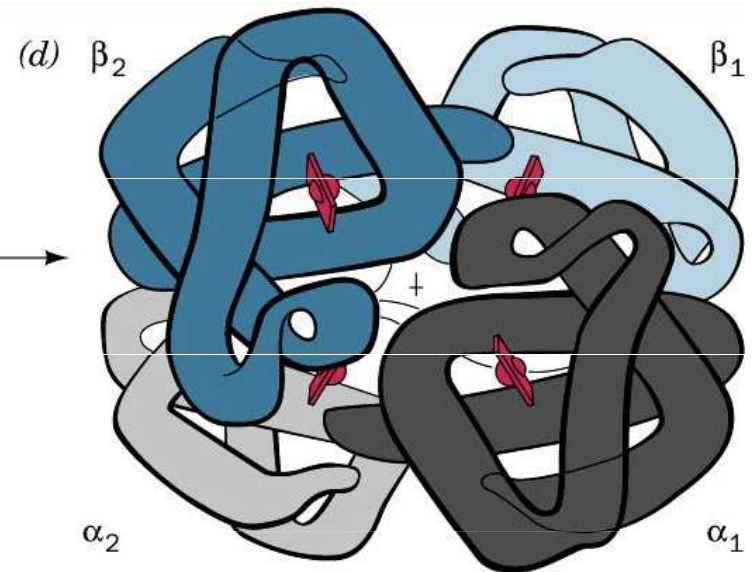
(a) – Lys – Ala – His – Gly – Lys – Lys – Val – Leu – Gly – Ala –
Primary structure (amino acid sequence in a polypeptide chain)



Secondary structure (helix)



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



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

Primární struktura

Sekvence AMK

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

⇒ aminokyselinový sekvenátor

1978 - β - galaktosidasa (1028 AMK), μ g materiálu, dny

--

Stanovení sekvence - Edmanovo odbourávání

na základě sekvence nukleových kyselin

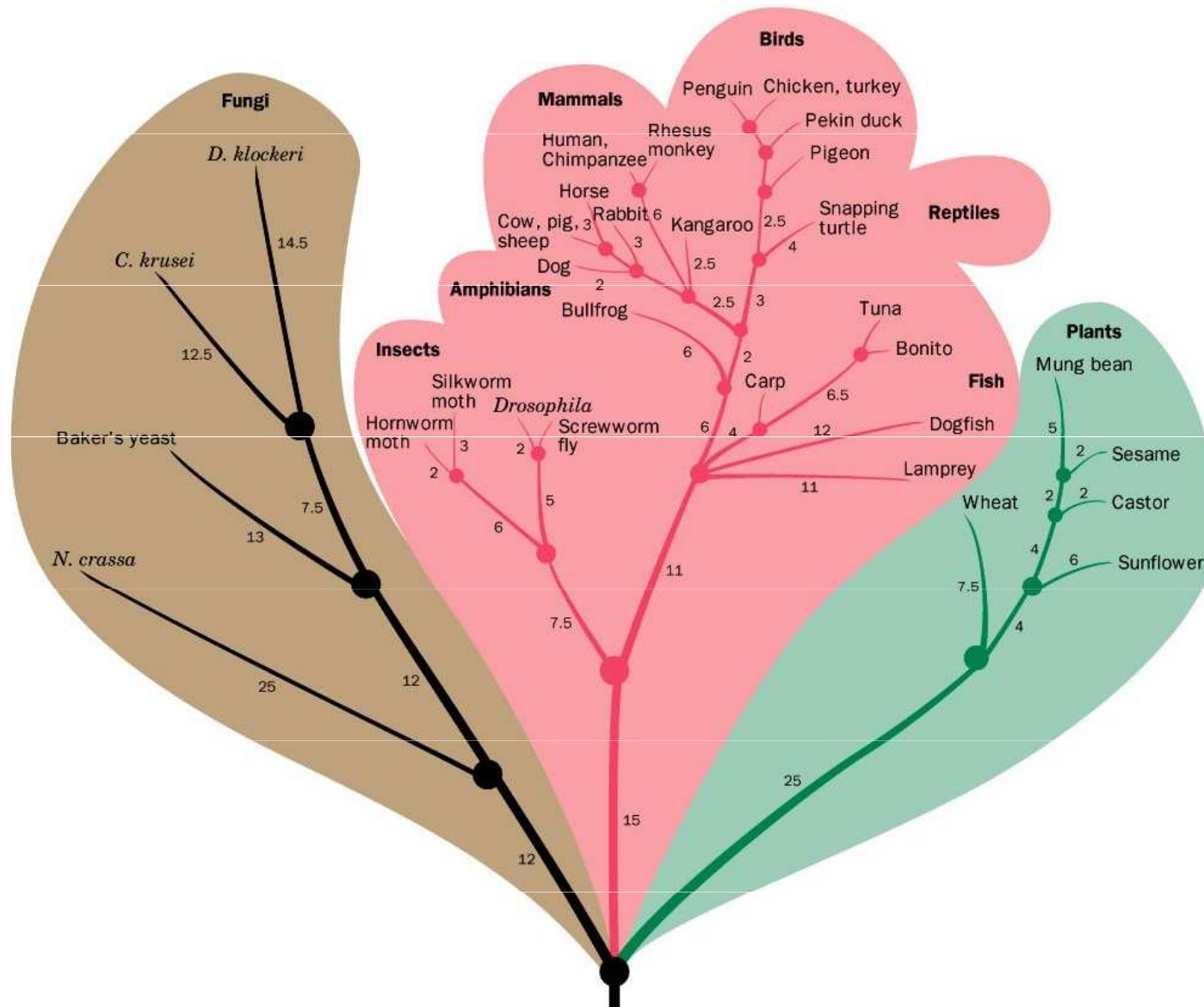
MS – hmotnostní spektrometrie

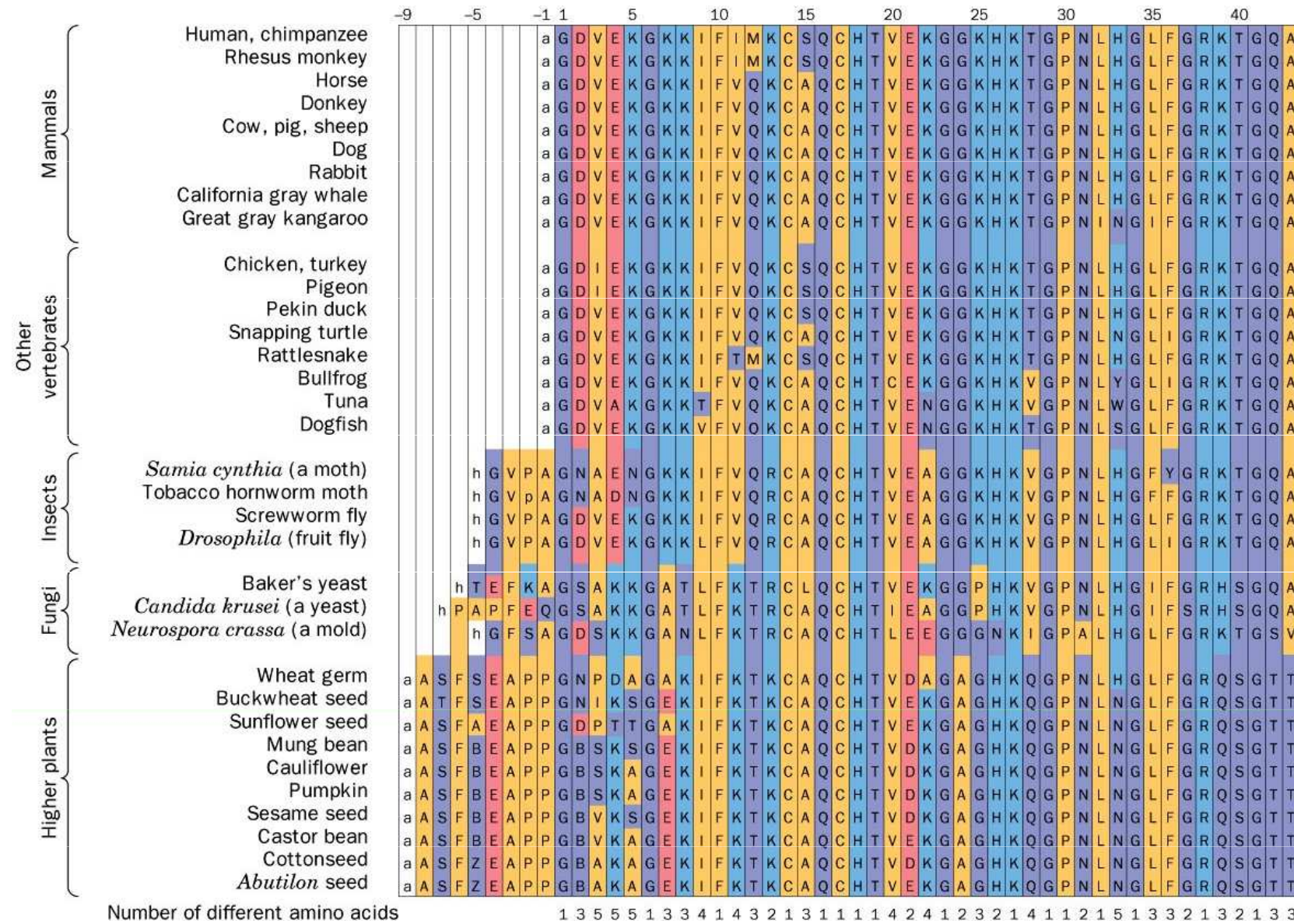
Proč je nutné znát primární strukturu

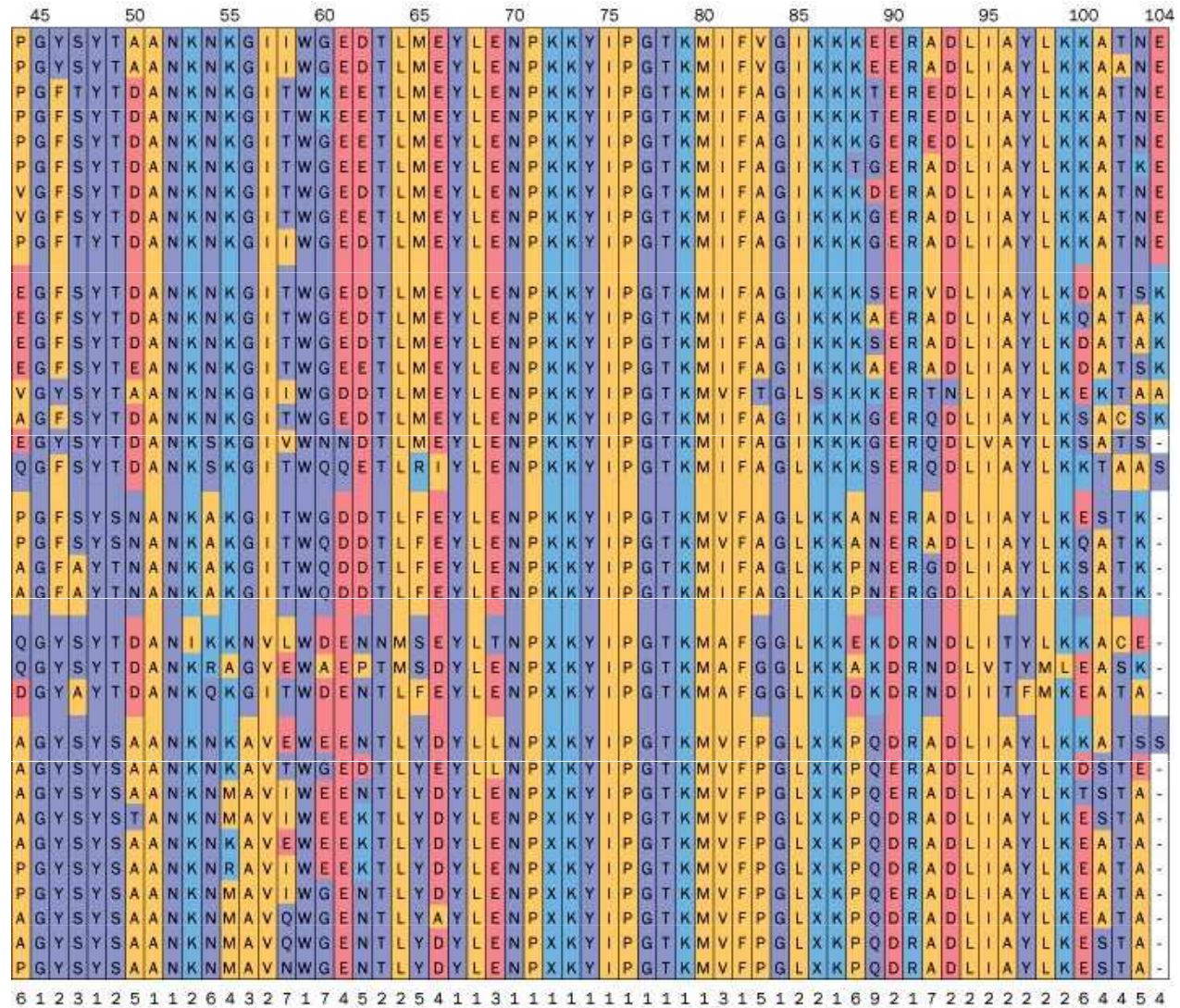
- Pro objasnění vyšších struktur
- Pro porozumění jejich funkce
- Taxonomické evoluční studie

Taxonomické evoluční studie

Cytochrom C







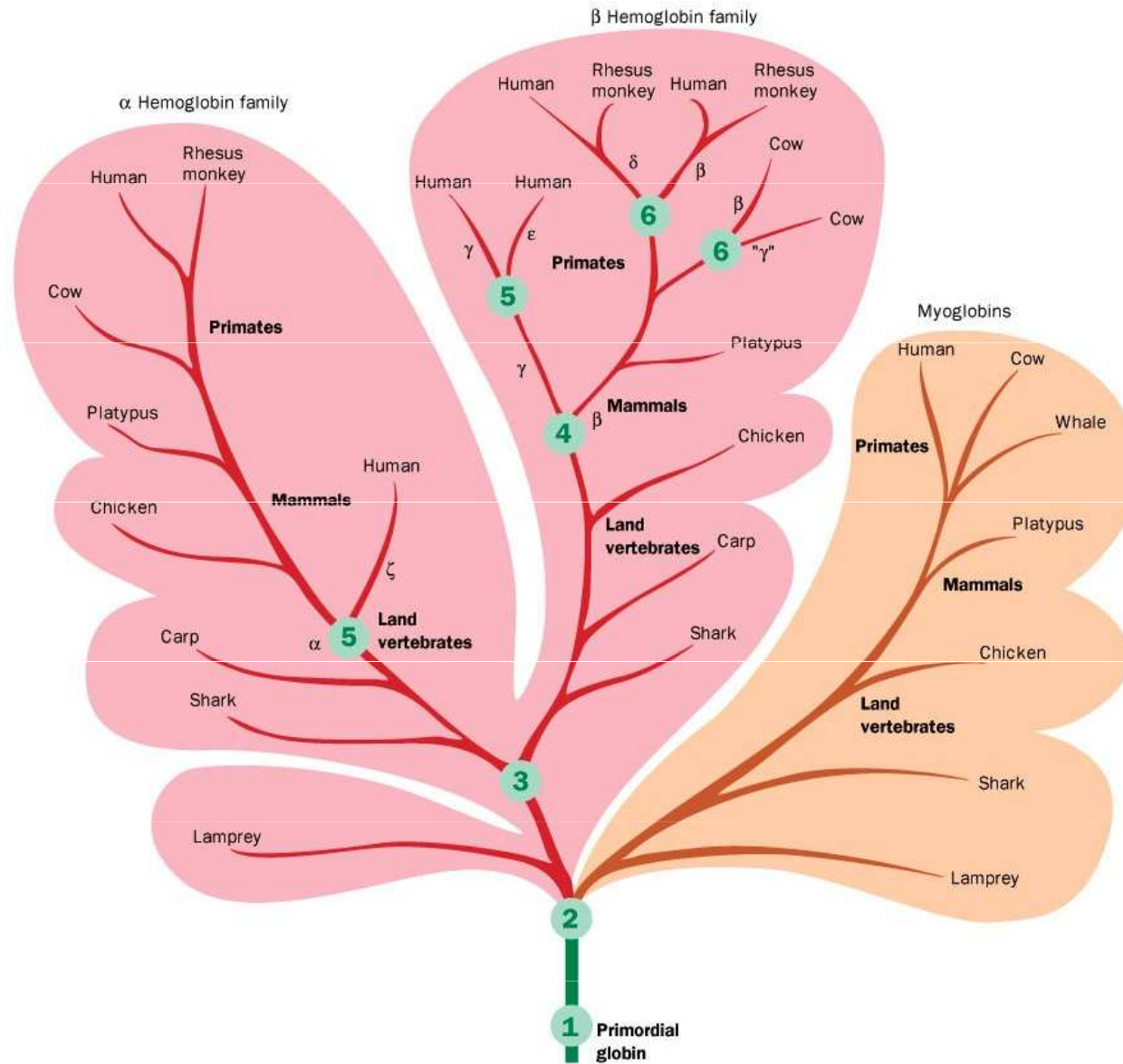
Hydrophilic, acidic: **D** Asp **E** Glu

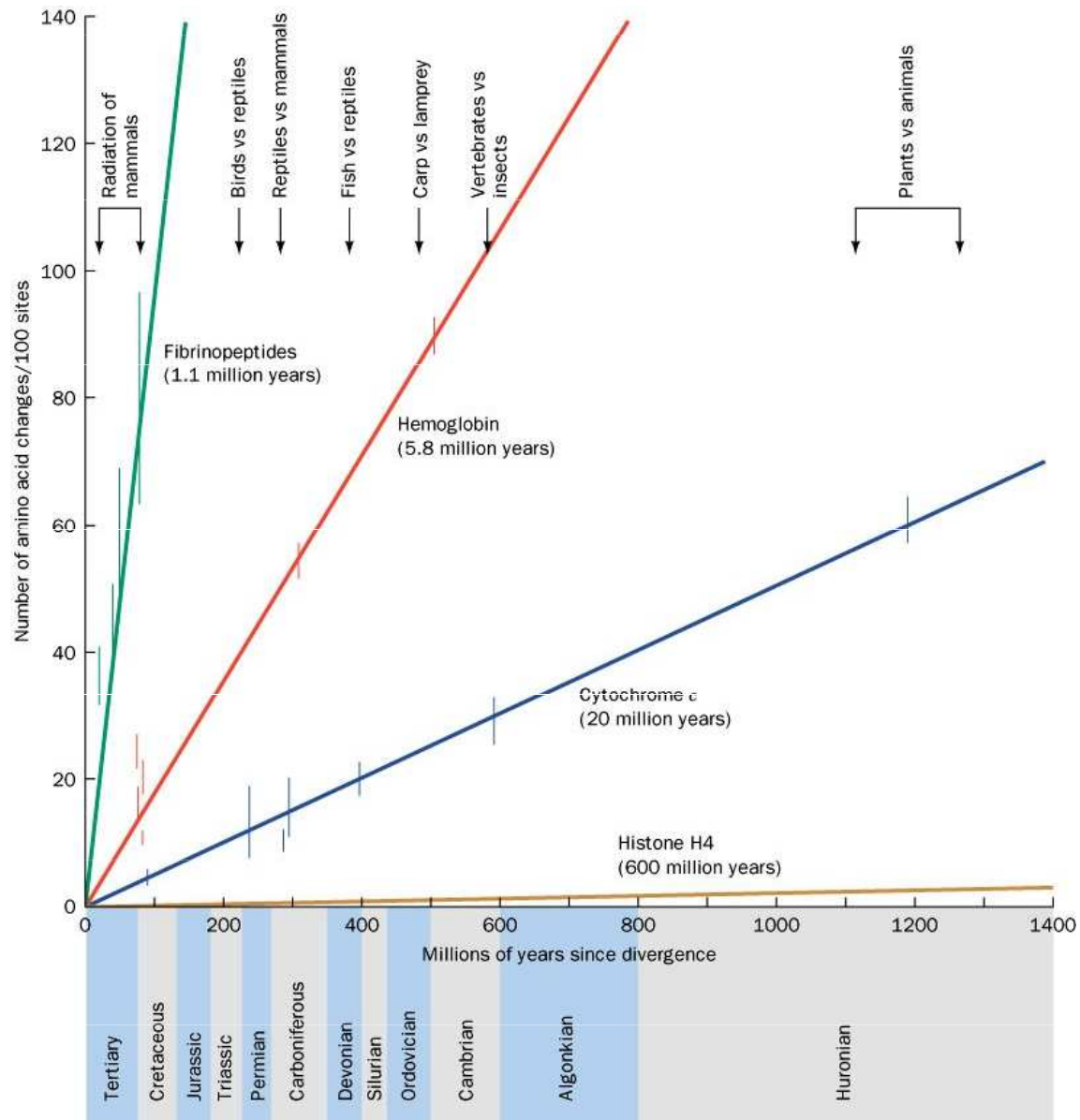
Hydrophilic, basic: **H** His **K** Lys **R** Arg **X** TrimethylLys

Polar, uncharged: **B** Asn or Asp **G** Gly **N** Asn **Q** Gln
S Ser **T** Thr **W** Trp **Y** Tyr **Z** Gln or Glu

Hydrophobic: **A** Ala **C** Cys **F** Phe **I** Ile **L** Leu
M Met **P** Pro **V** Val

Hemoglobin a myoglobin



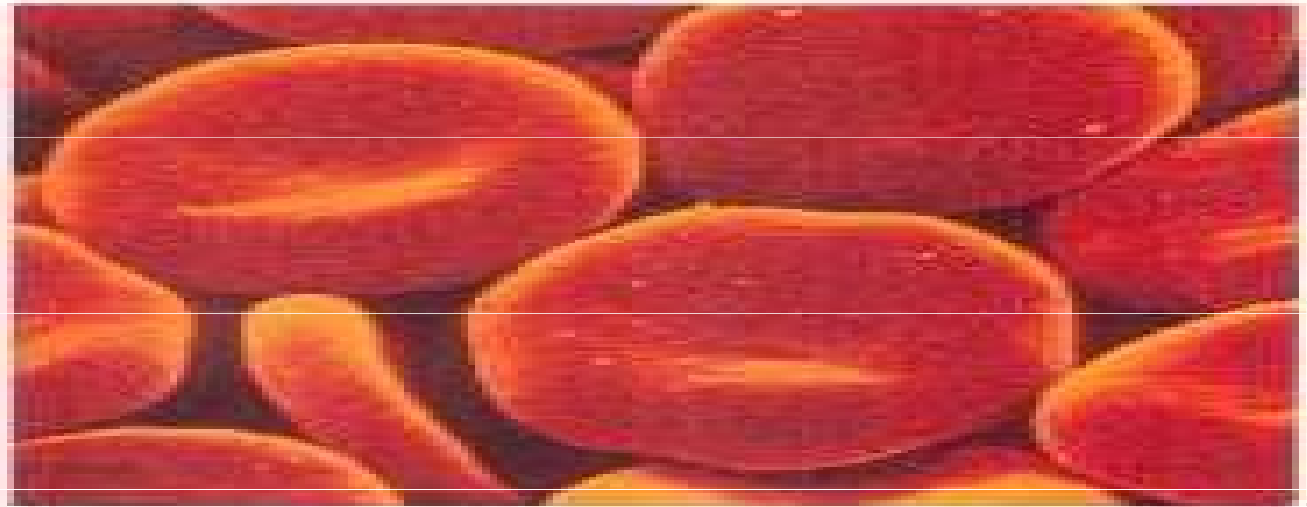


Proč je nutné znát primární strukturu

- Pro objasnění vyšších struktur
- Pro porozumění jejich funkce
- Taxonomické evoluční studie
- Klinický význam

Srpkovitá anémie

HbA HbS



Norm.

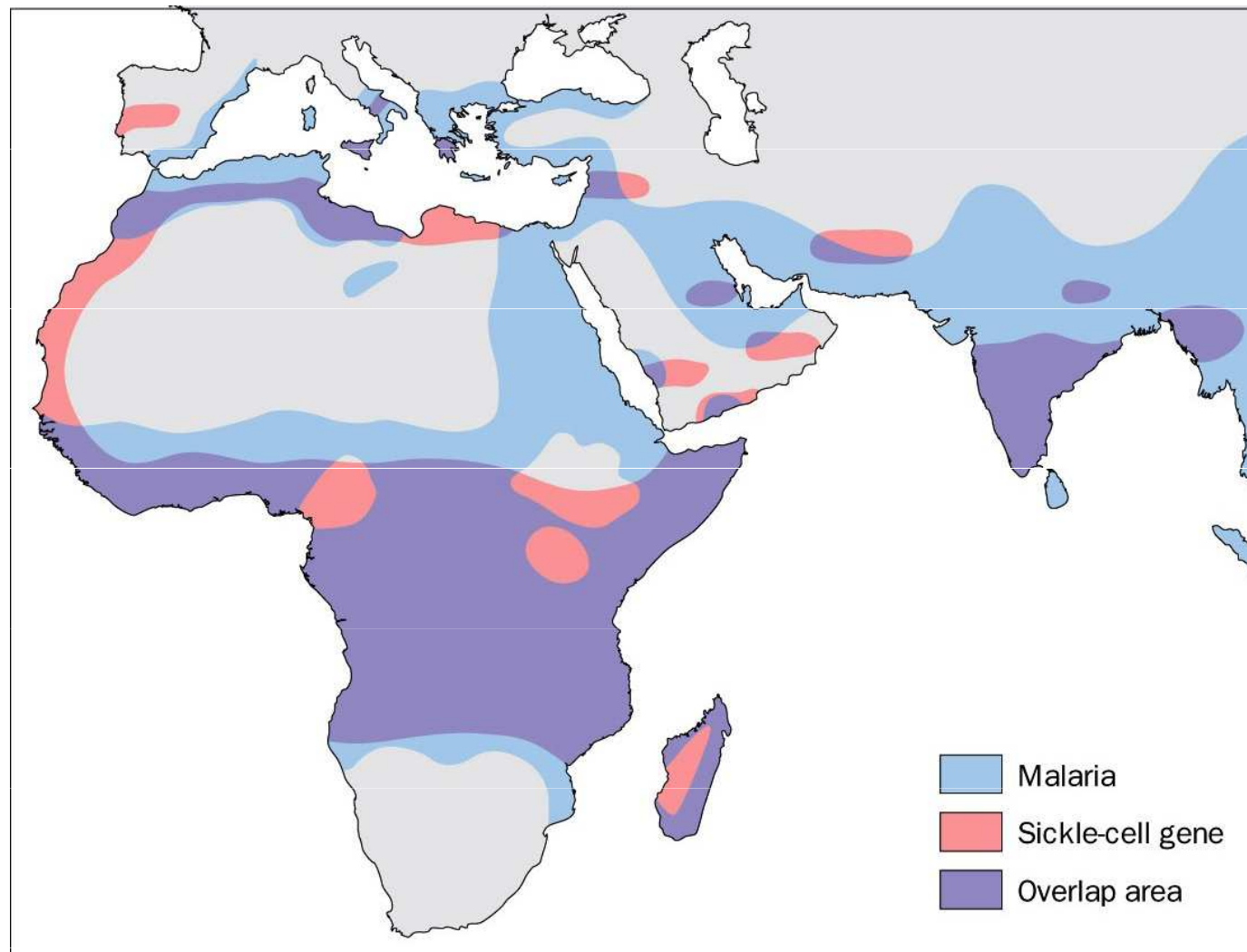


Srpkovitá

Srpkovitá anémie

- Krvinky srpkovité, špatně procházejí kapilárami
- Křehčí – snížené životnost z 7 na 3 měsíce
- Homozygot 100 % srpkovitost
Heterozygot 40% srpkovitost
- Jedinci se nedožívají dospělosti

Srpkovitá anémie versus malárie



Srpkovitá anémie versus malárie

- 40% srpkovitosti v kapilárách 2 % (nízká koncentrace O₂)
- *Plasmodium* snižuje pH v erytrocytu o 0.4 – zvýšení přilnavosti ke stěnám cév – neprochází slezinou
- Snížení pH vyvolává zvýšení srpkovitosti na 40 %
- Normální erytrocyt – vysoká koncentrace K⁺ nezbytná pro prvoka
- Srpkovitý erytrocyt propouští K⁺
- Prvok umírá

Přírodní výběr ??????

Primární struktura

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

⇒ aminokyselinový sekvenátor

1978 - β - galaktosidasa (1028 AMK), μ g materiálu, dny

--

Stanovení sekvence - Edmanovo odbourávání

na základě sekvence nukleových kyselin

MS – hmotnostní spektrometrie

Určování primární struktury AMK sekvenátorem

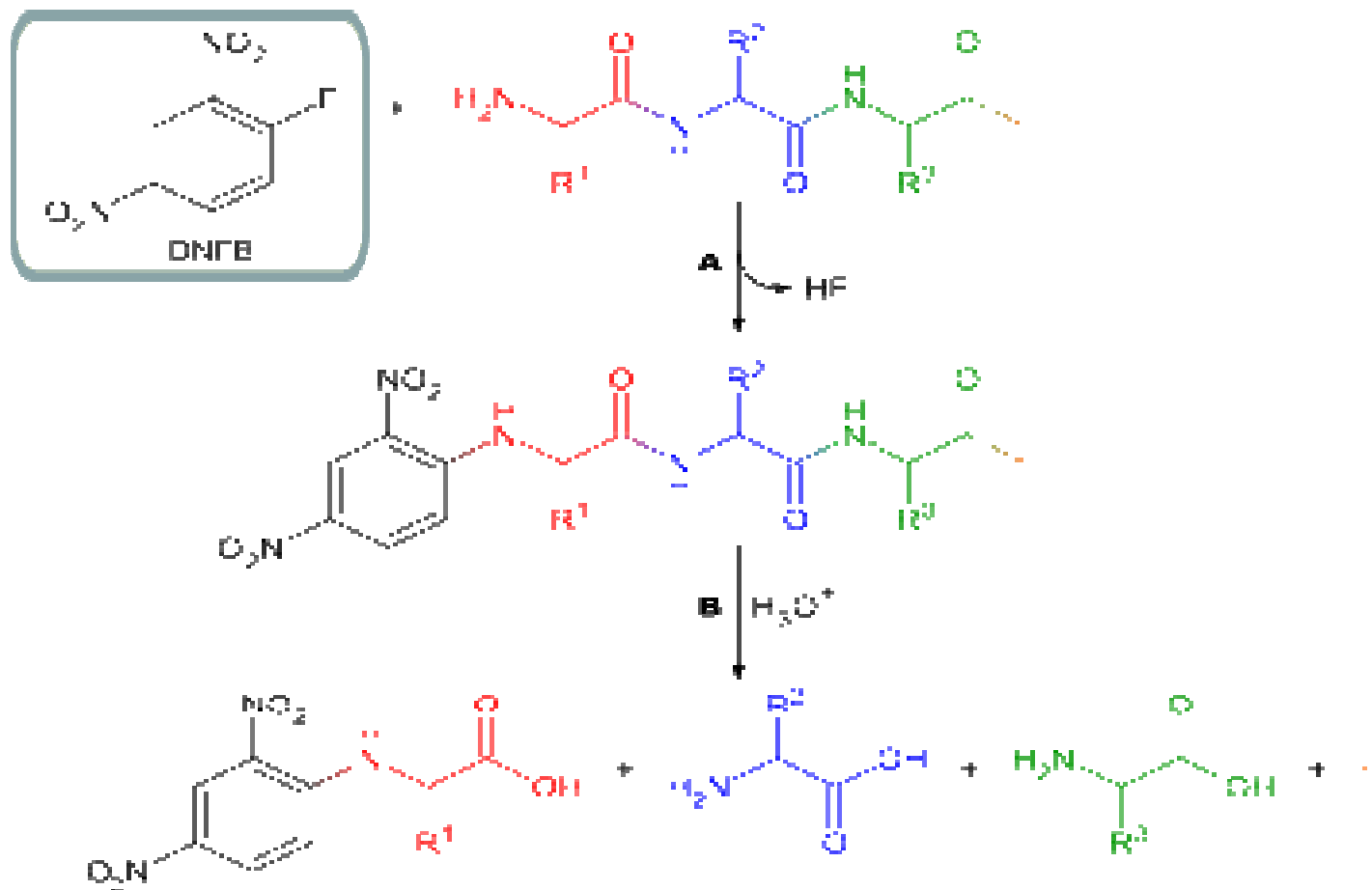
- A. **Purifikace bílkoviny** – získání homogenní bílkoviny
- B. **Aminokyselinové složení** – určení počtu jednotlivých AMK zbytků (kyselá hydrolyza 6N HCl, 100 –110 °C, 24 h)
- C. **Pořadí aminokyselin:**
 1. Oddělit a izolovat jednotlivé řetězce (redukce nebo oxidace disulfidických můstků)
 2. Určit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

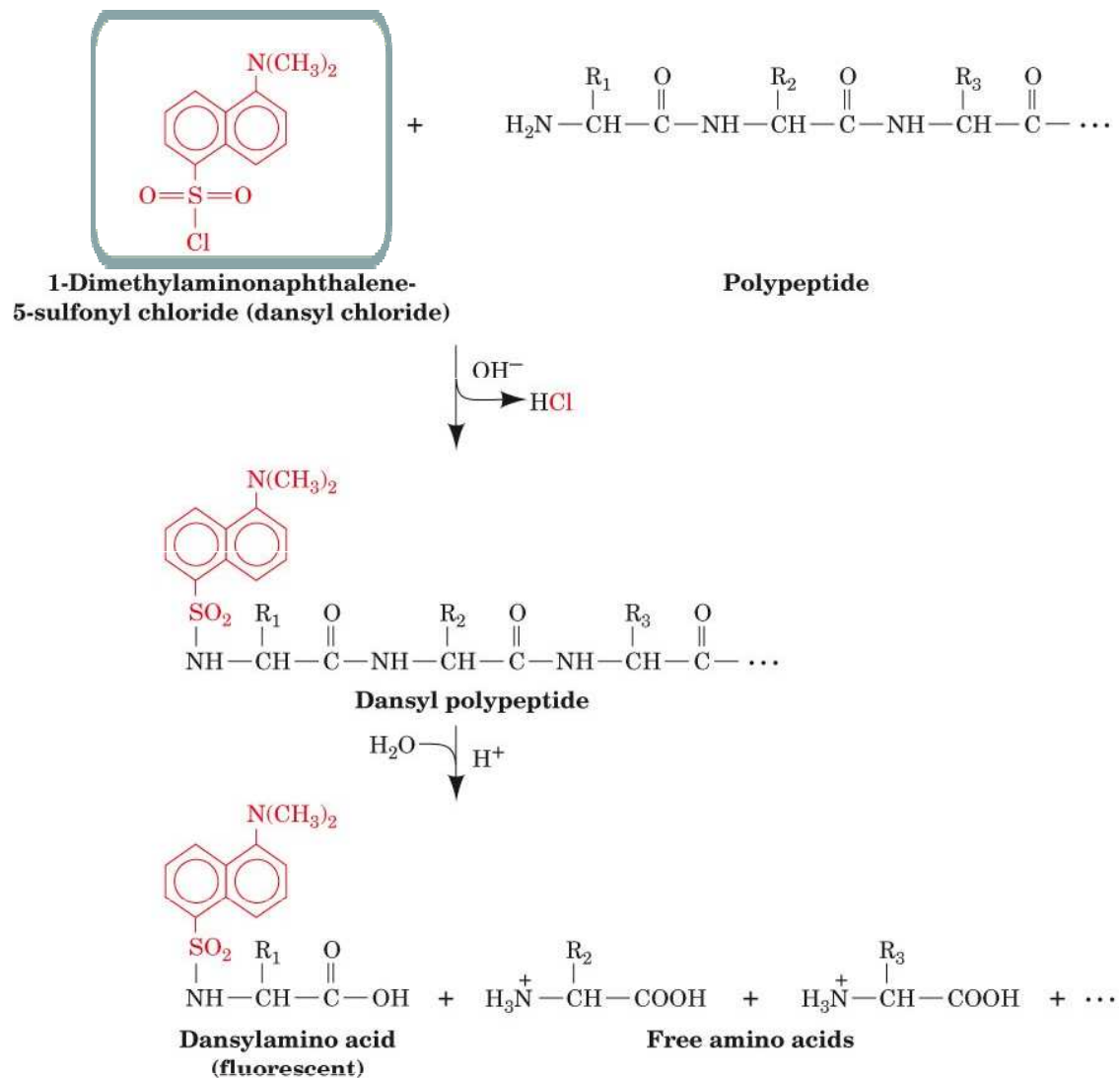
$$X + A-B-C = \textcircled{X-A} \textcircled{+ B} \textcircled{+ C}$$

Zjišťování N-koncových AMK

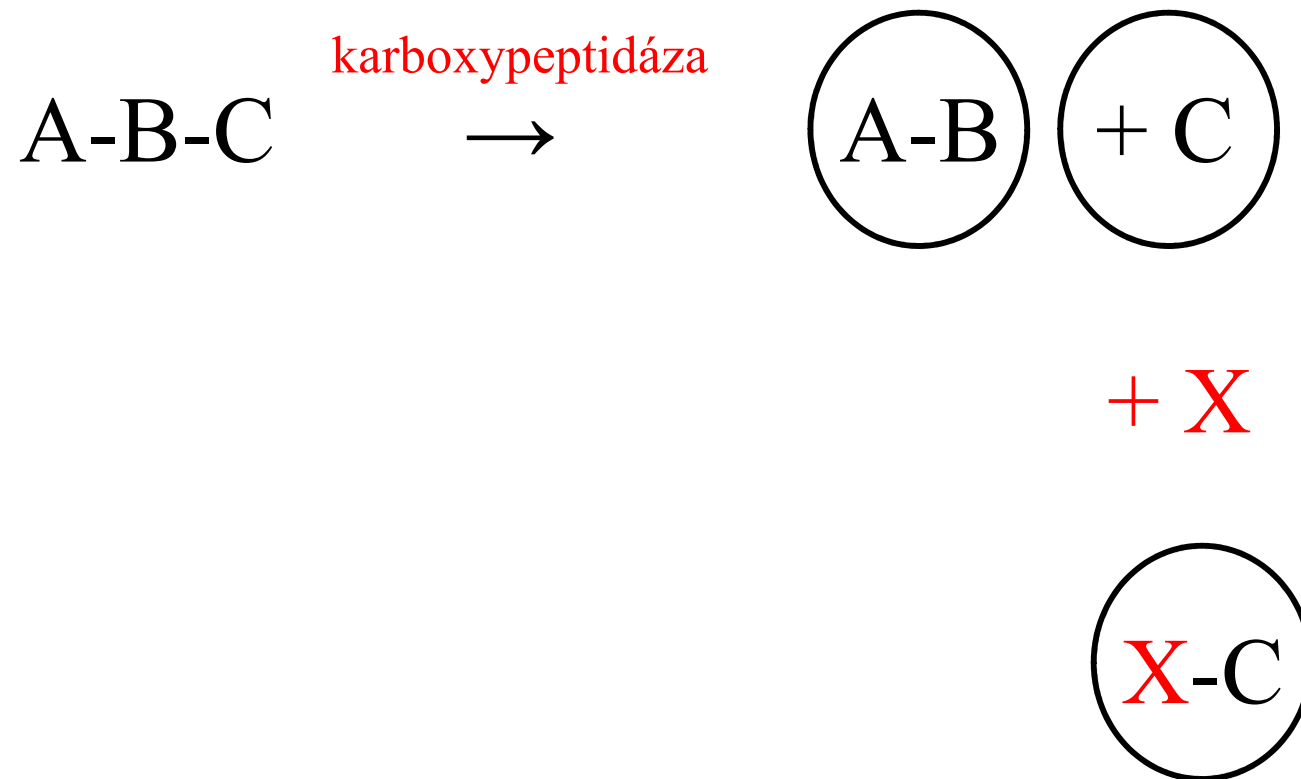
Frederick Sanger



Zjišťování N-koncových AMK

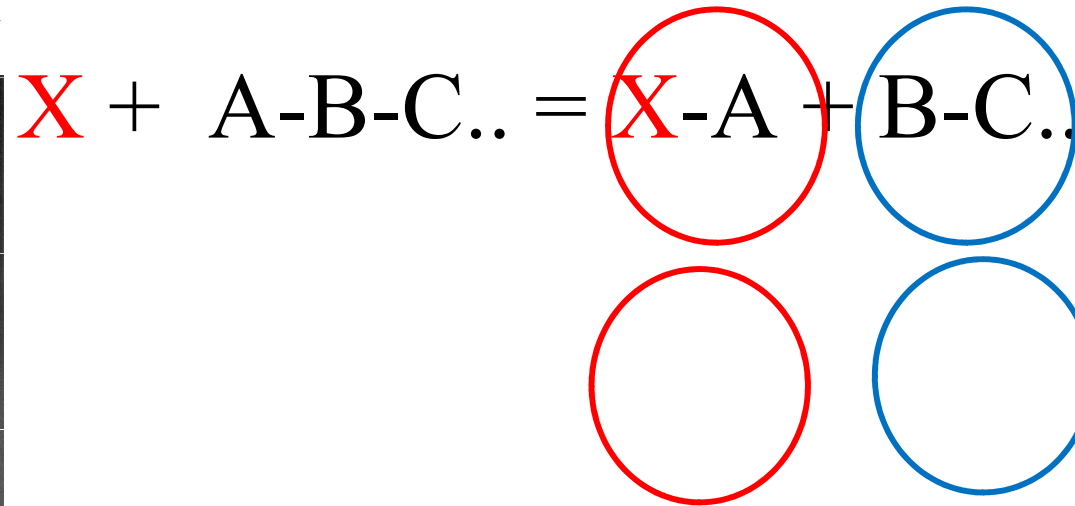


Zjišťování C-koncových AMK

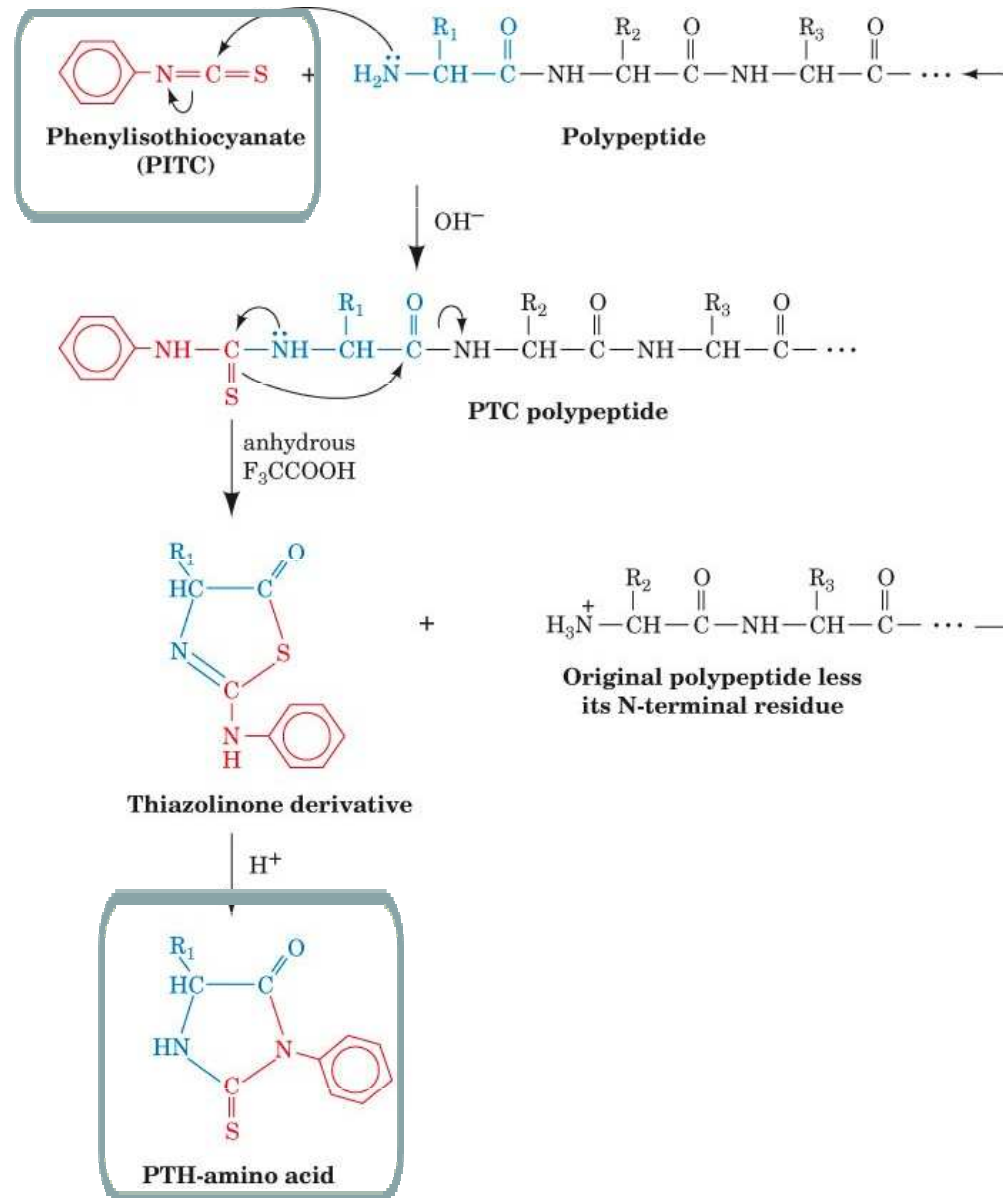


Edmanovo sekvenování

Pehr Victor Edman



Edmanovo sekvenování



Možnosti štěpení

Trypsin

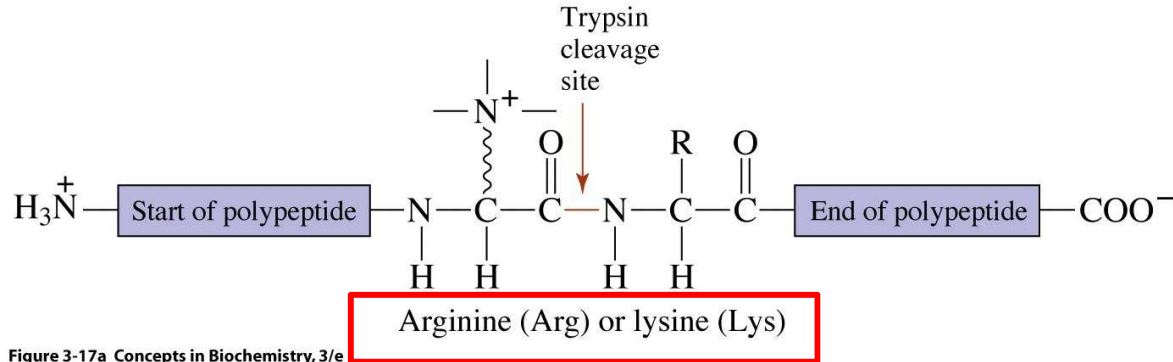


Figure 3-17a Concepts in Biochemistry, 3/e
© 2006 John Wiley & Sons

Chymotrypsin

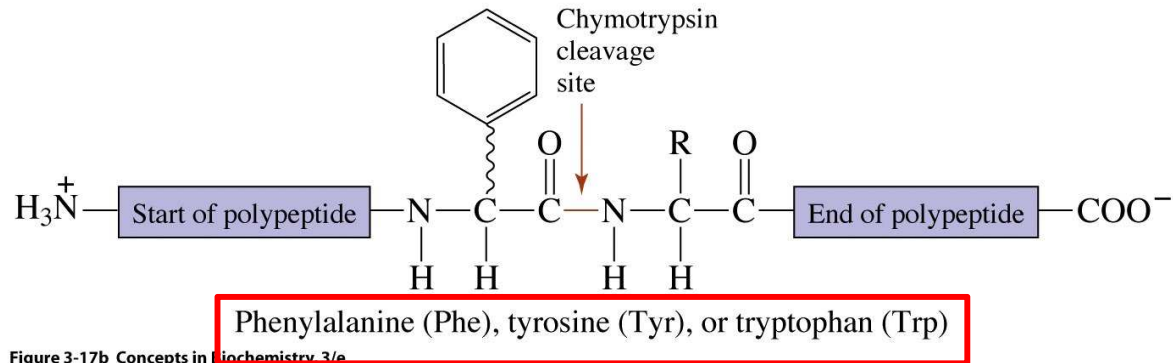


Figure 3-17b Concepts in Biochemistry, 3/e
© 2006 John Wiley & Sons

CNBr

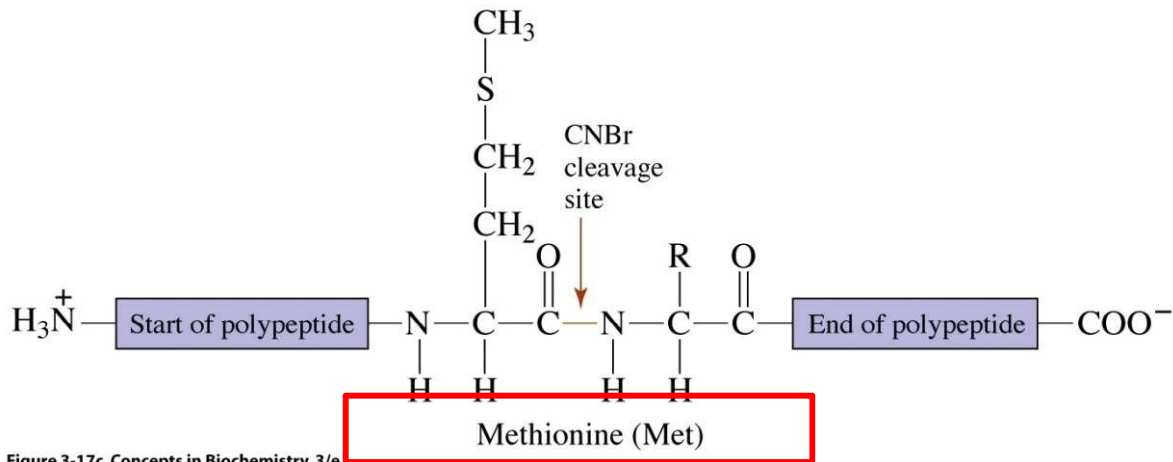
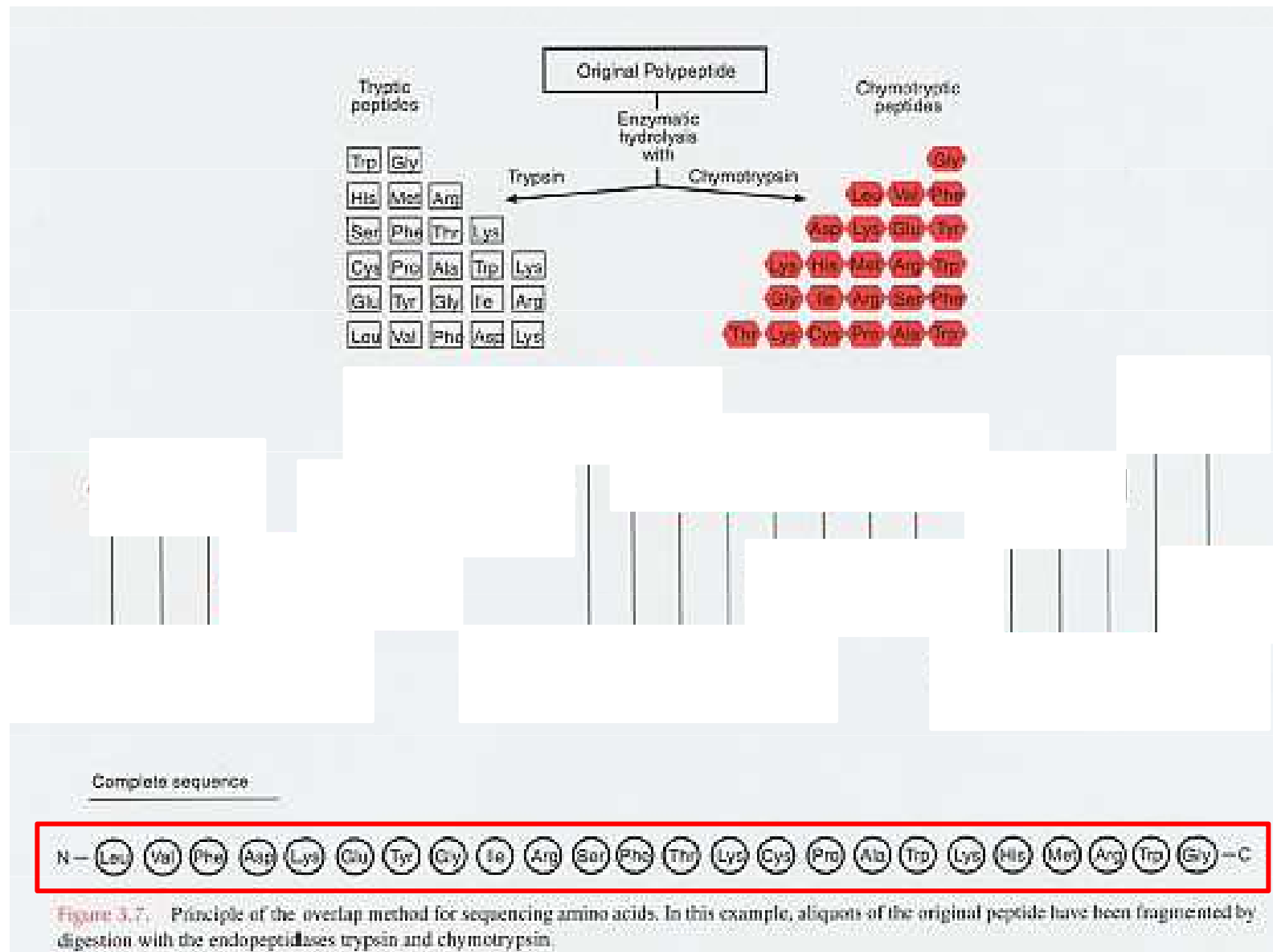


Figure 3-17c Concepts in Biochemistry, 3/e
© 2006 John Wiley & Sons

Metoda překrývajících se štěpů



Primární struktura

Stanovení na základě sekvenace NK

- Není snadné identifikovat gen kódující daný protein (introny a exony)
- Nelze takto zjistit posttranslační modifikace
- V genetické, kódu mohou být chyby
- Genetický kód není universální

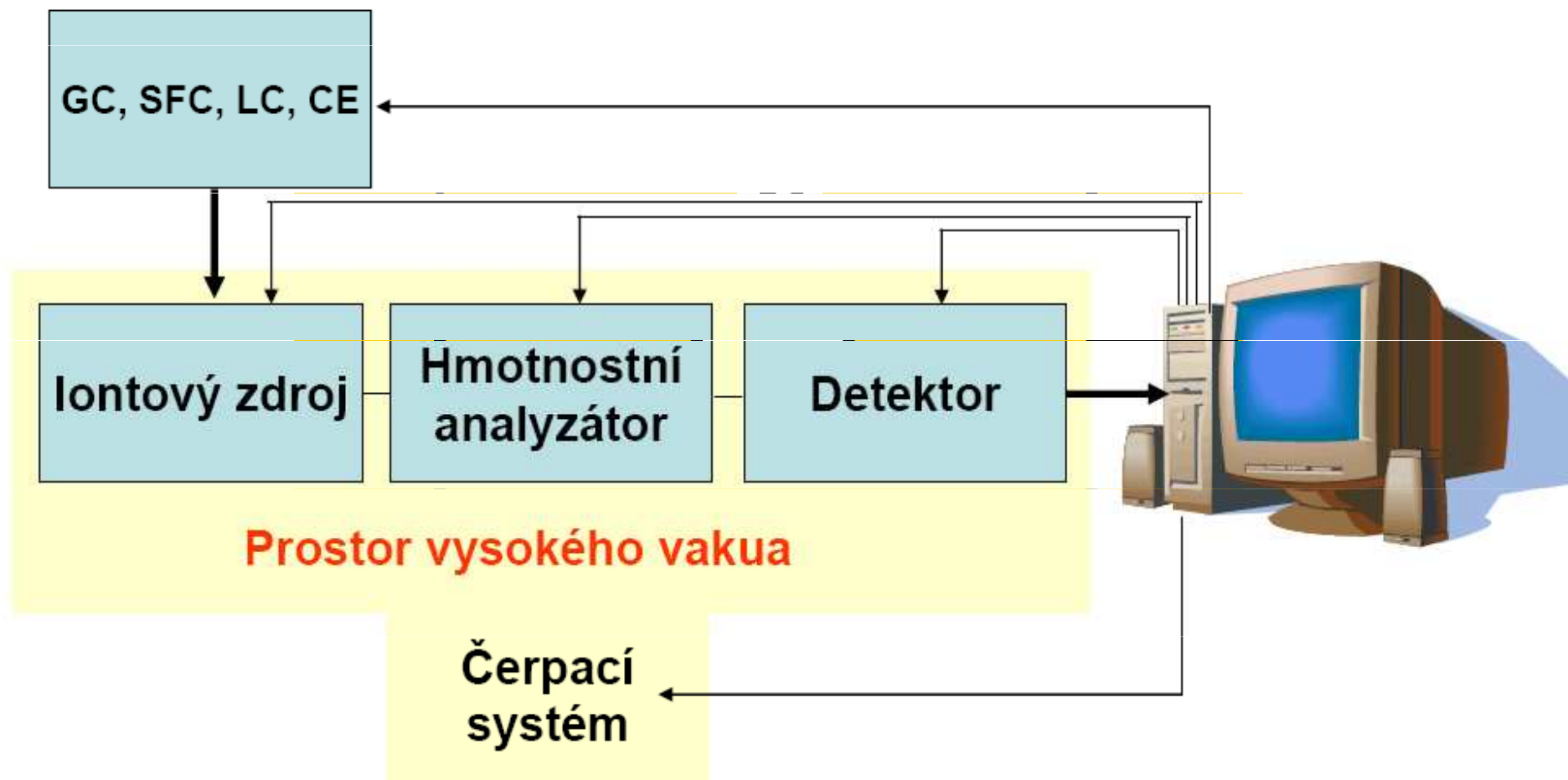
Primární struktura

Pomocí hmotnostní spektrometrie - MS

Hmotnostní spektrometr

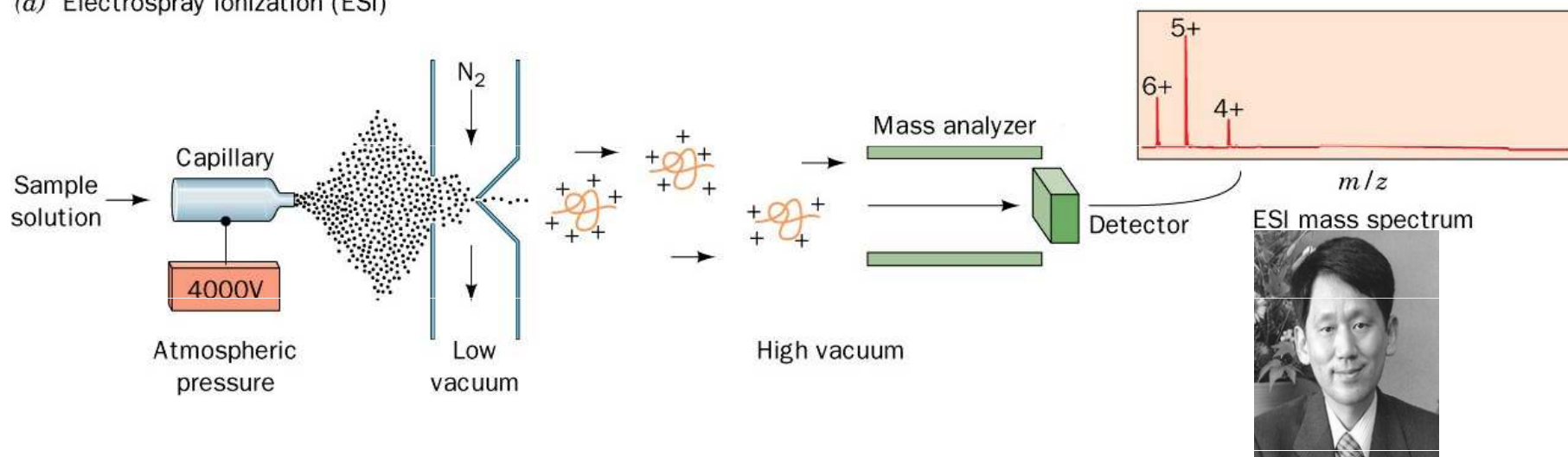
Hmotnostní spektrometr je iontově-optické zařízení, které separuje ionty podle poměru jejich m/z .

Blokové schéma MS

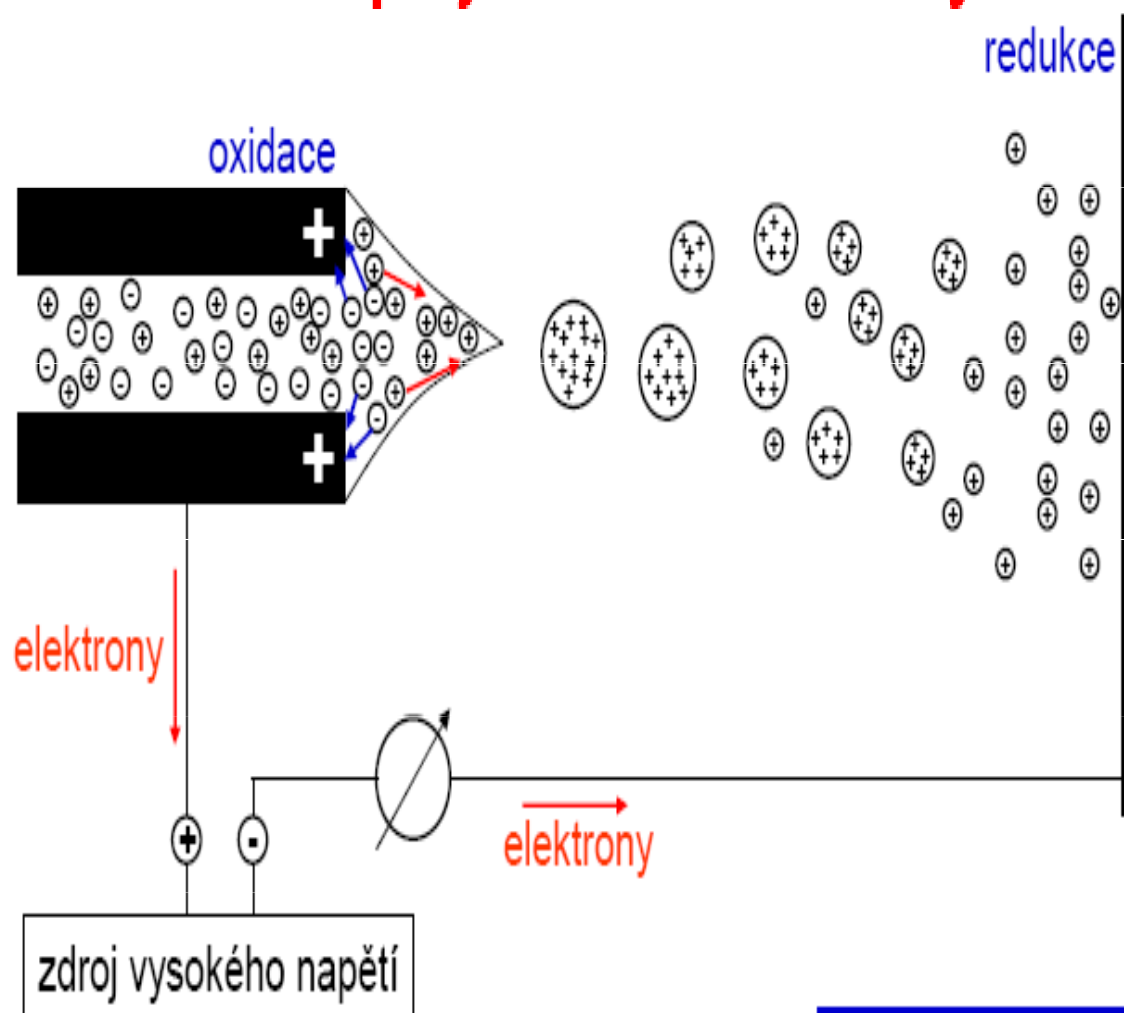


MS – NC 2002 (Tanaka, Fen)

(a) Electrospray ionization (ESI)



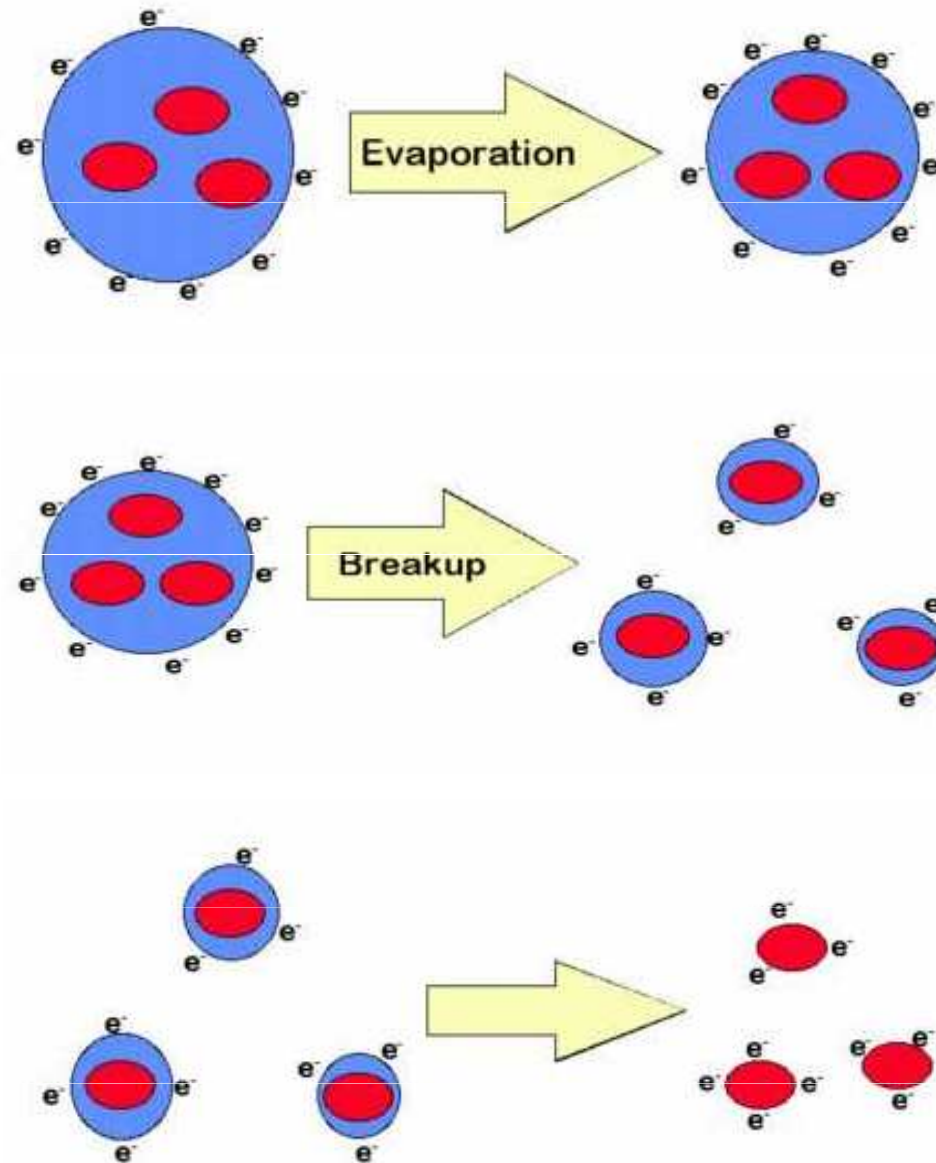
Electrospray (ESI) Tanaka



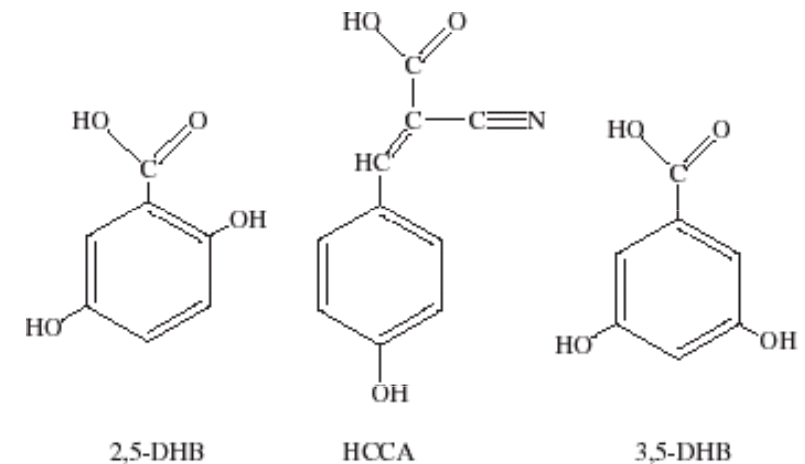
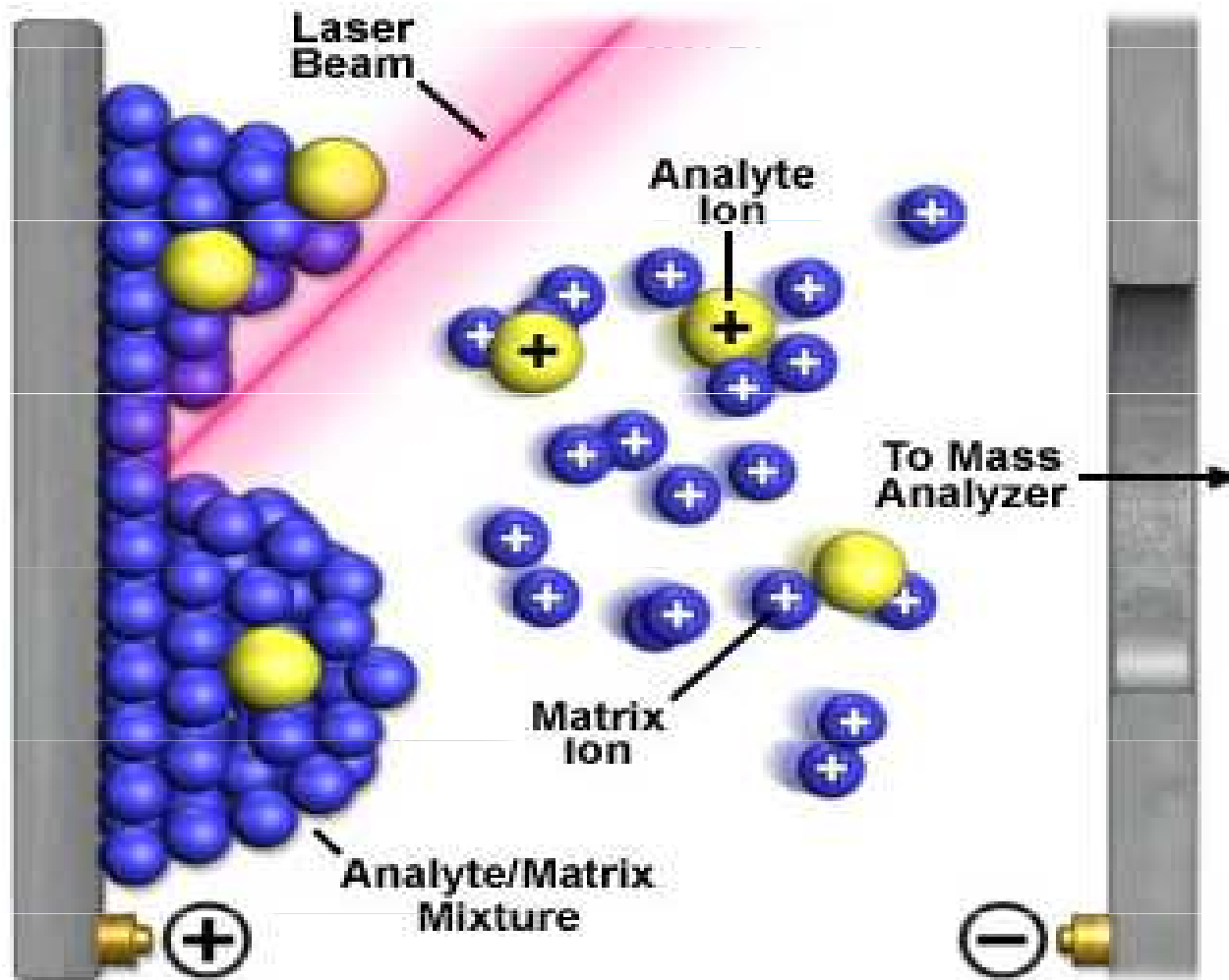
$[M+H]^+$
 $[M+NH_4]^+$
 $[M-H]^-$
 $[M \pm zH]^{z \pm}$

$t_{N_2} \approx 50 - 400 \text{ }^\circ\text{C}$ (přidatné)
Napětí: 2 - 8 kV
Průtok m. f. 0,001 - 1 ml/min
Ionizace za
atmosférického tlaku
Těkavé přísady: octan amonný,
mravenčí k.
Netěkavé přísady: fosfátové
pufry

Ionizace



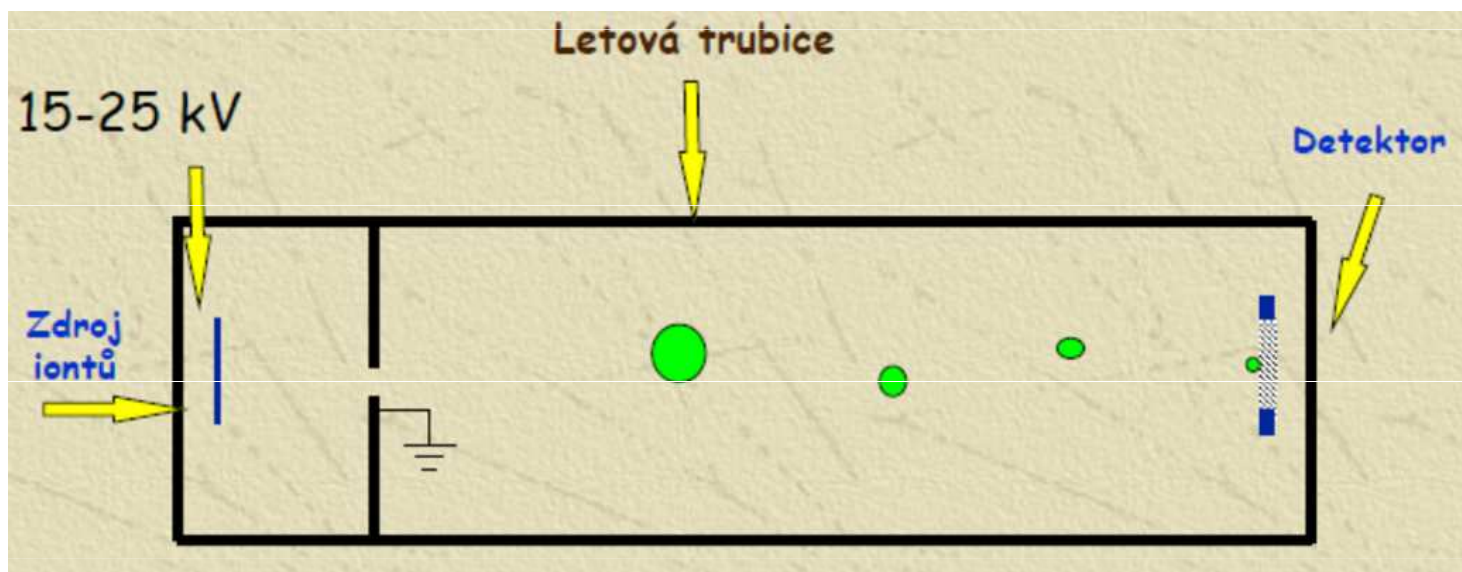
Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation (MALDI) Fen



Analyzátor doby letu (TOF)



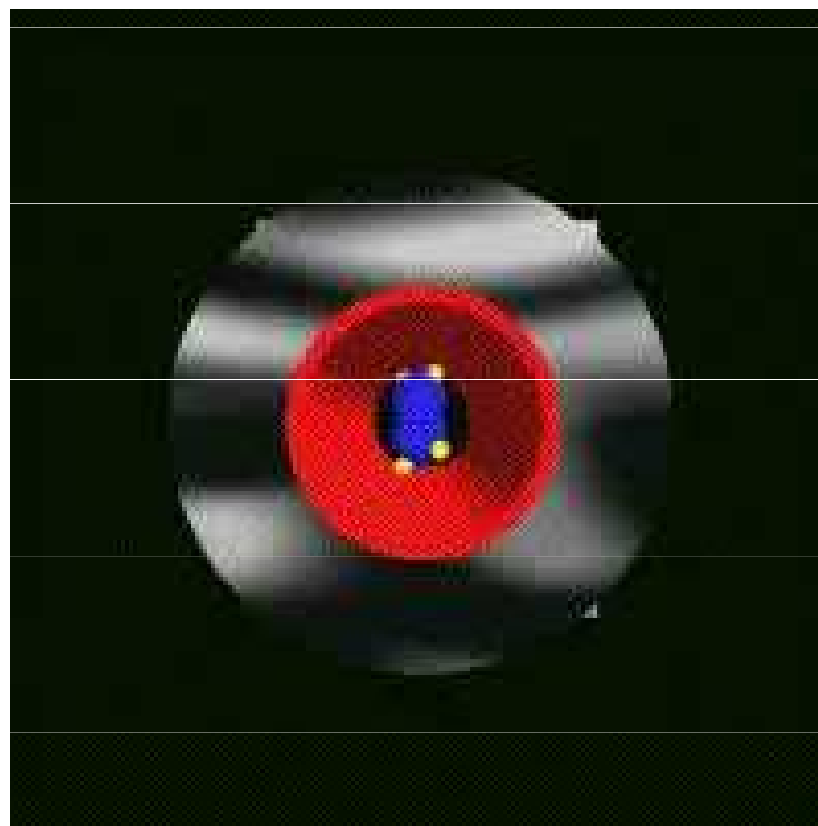
Analyzátor doby letu (TOF)



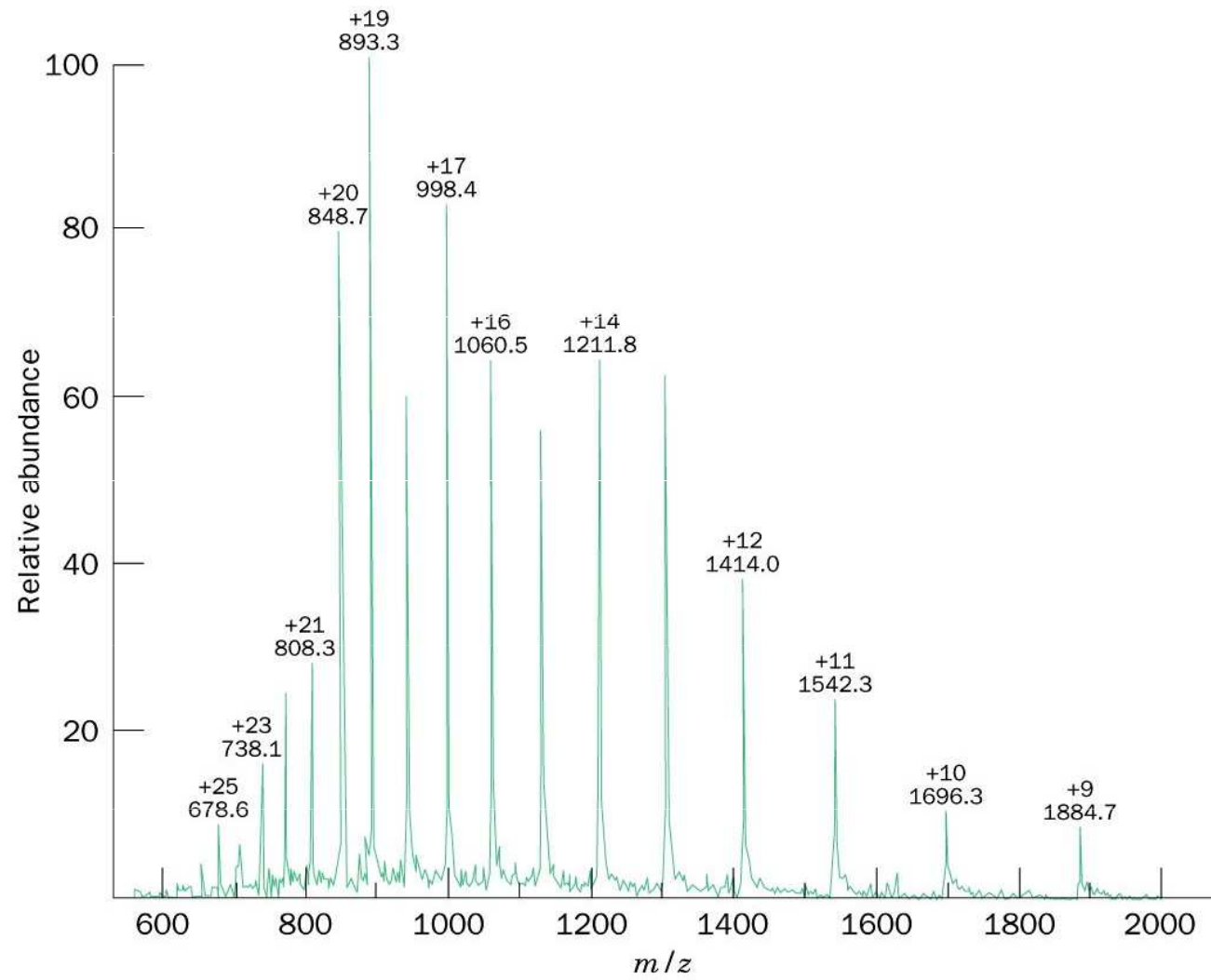
Kvadrupol



Hexapole, 9.5 mm Quadrupoles and 19 mm Quadrupoles



MS



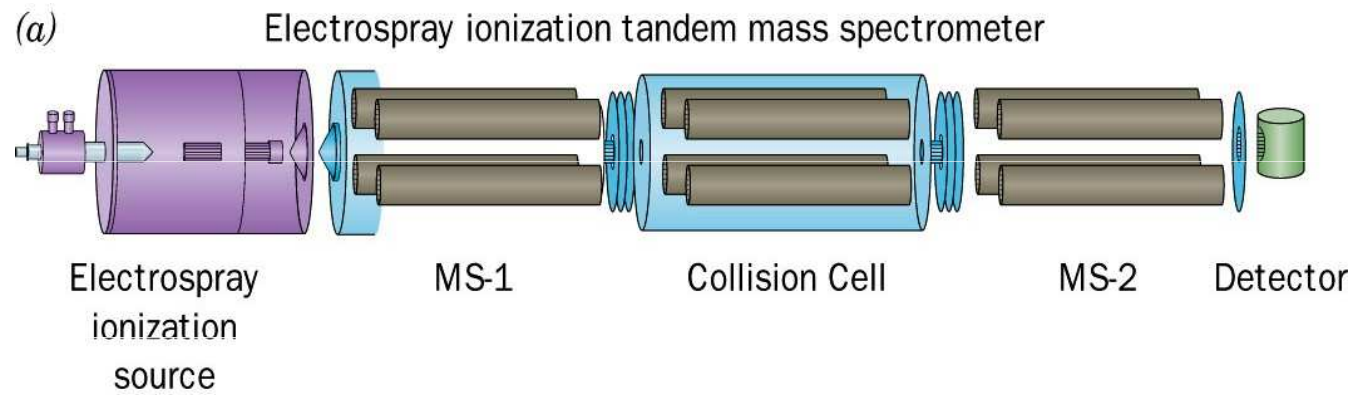
Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation (MALDI)



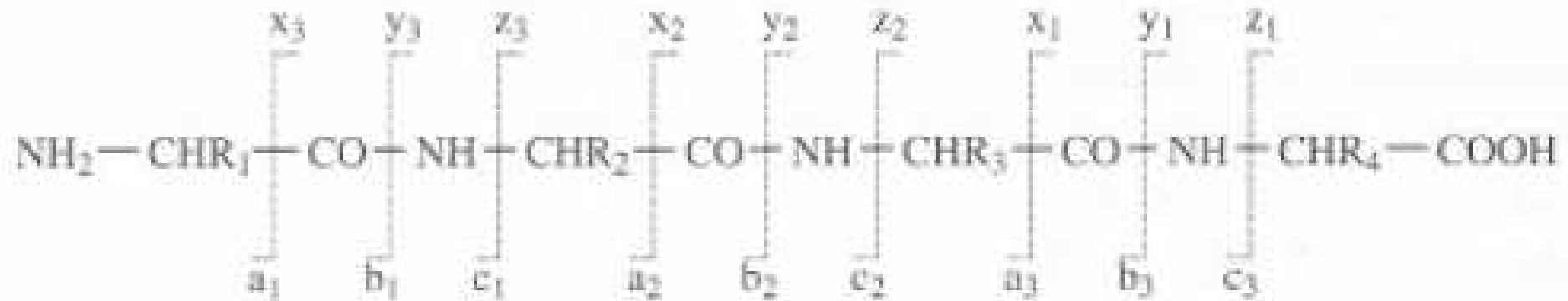
Analyzátor doby letu (TOF)



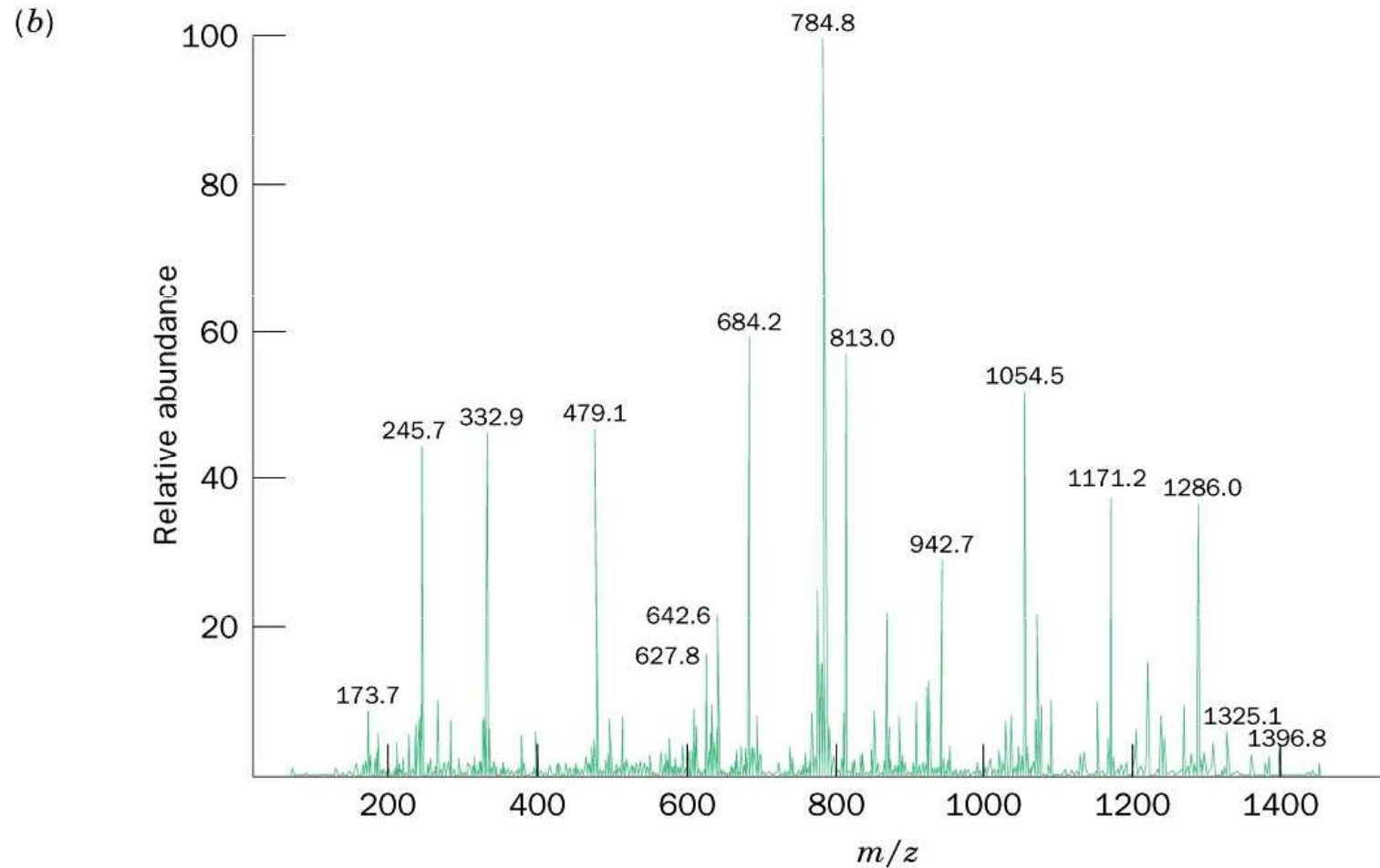
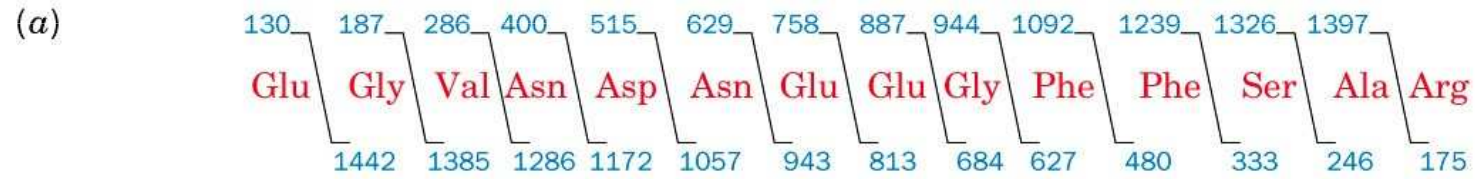
Tandemová MS-MS



Tandemová MS-MS



Tandemová MS-MS



Syntéza peptidů

1953 - oxytosin (9 AMK) DE VIGNEAND

Proč syntéza peptidů

- Proteinové inženýrství
- Příprava modifikovaných peptidů
- Příprava peptidových léčiv a vakcín

Pravidla syntézy

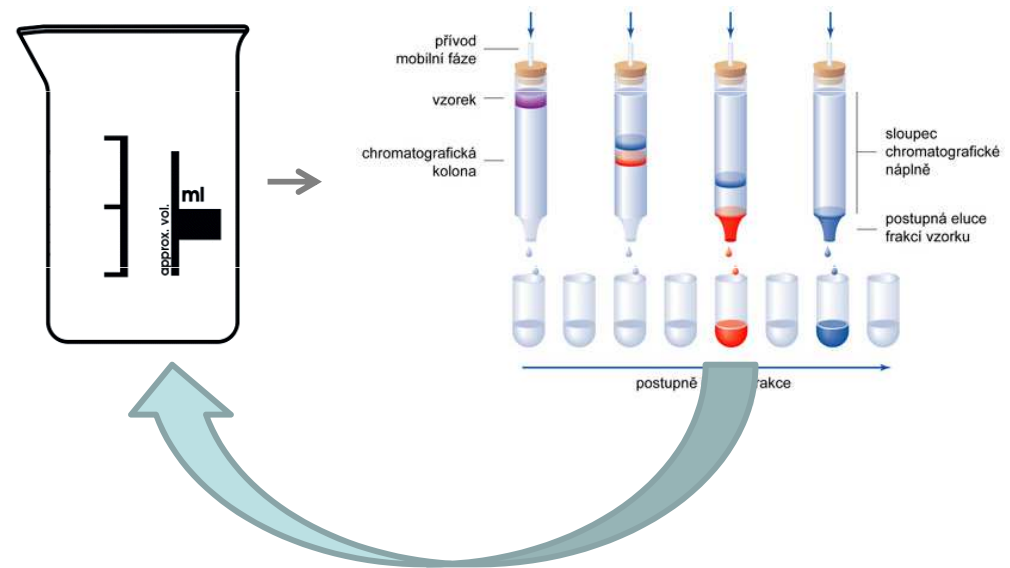
- Pořadí AMK je dáno genetickým kódem
- COOH málo reaktivní, musí se aktivovat
- Je nutné blokovat další skupiny aby se zabránilo vedlejším reakcím, blokace musí být reverzibilní
- Nesmí být narušena L-konfigurace
- Co největší výtěžek (90 % u dekaeptidu = celkový 39%)

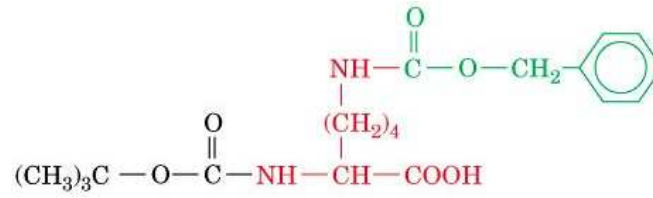
V ROZTOKU



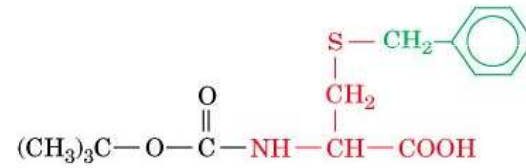
X – chránicí skupina

Y – aktivační skupina

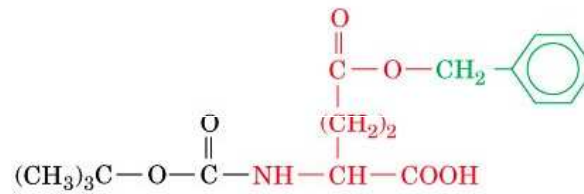




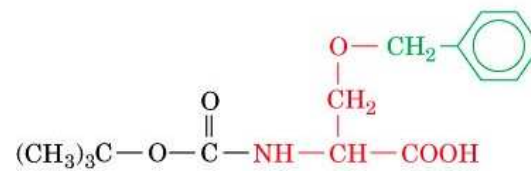
Boc, *N*^ε-benzyloxycarbonyl-Lys



Boc, *S*-benzyl-Cys

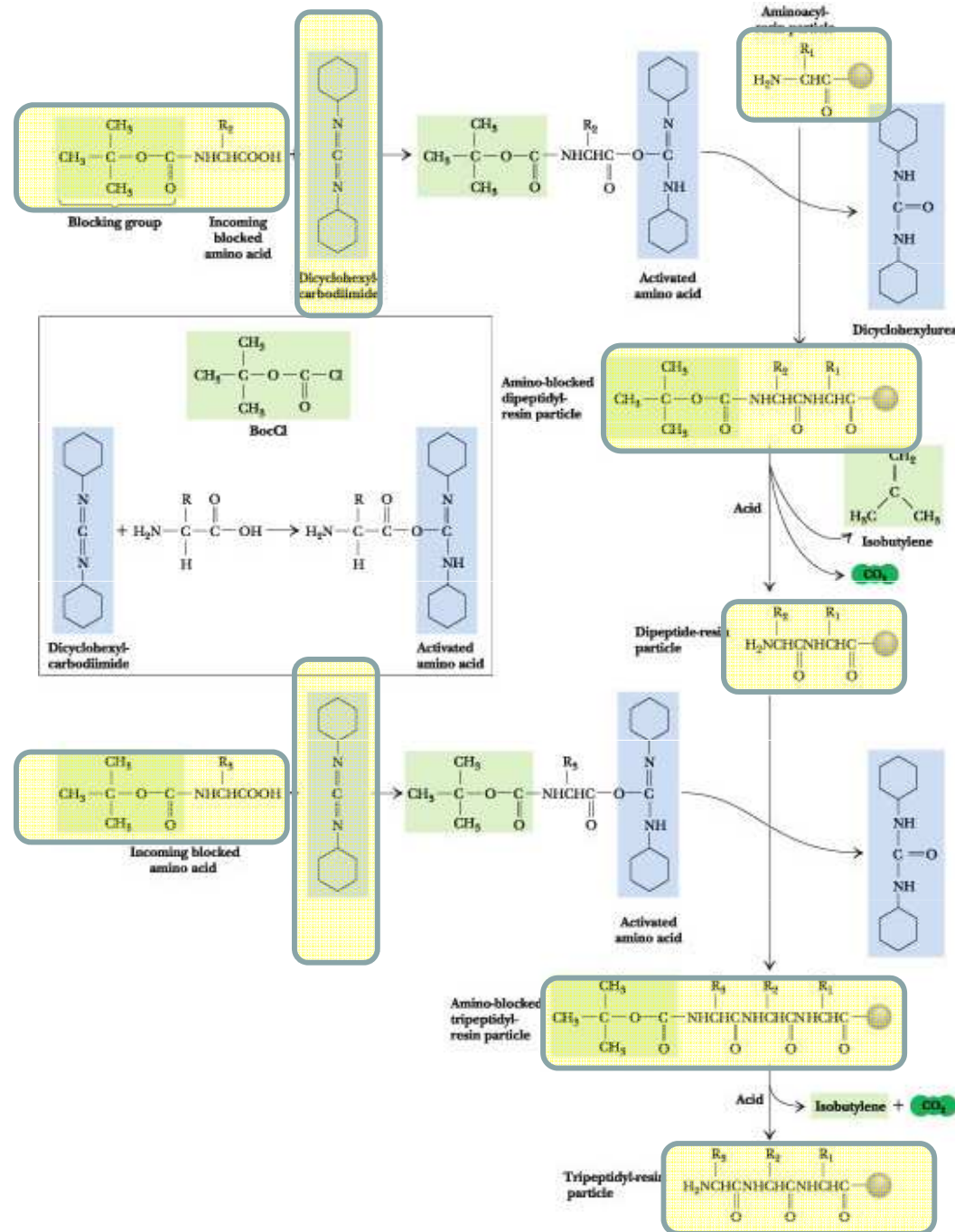


Boc-Glu, γ -Benzyl ester



Boc, *O*-benzyl-Ser

Bruce Merrifield
1962



Imobilizovaná AMK

Volná aktivovaná AMK
s blokovanou aminoskupinou

Aktivace

Reakce - dipeptid

Odstranění blokování

Atd.

Atd.

Tripeptid

Syntetizátor peptidů



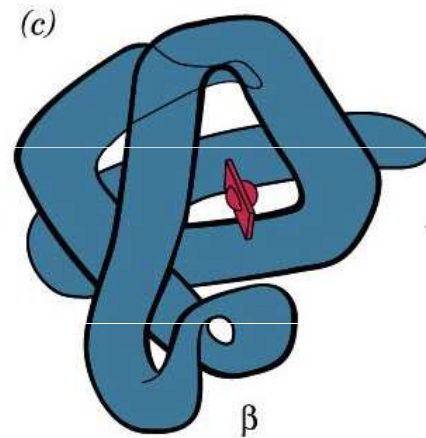
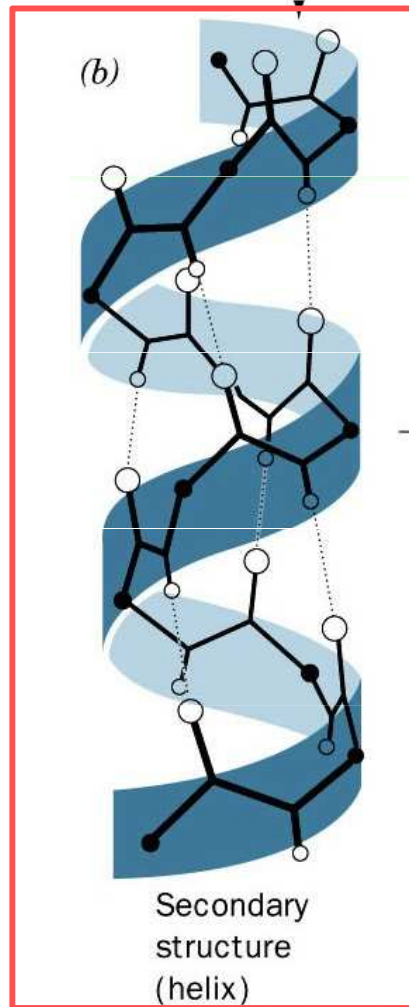
Syntéza peptidů

1953 - oxytosin (9 AMK) DE VIGNEAND

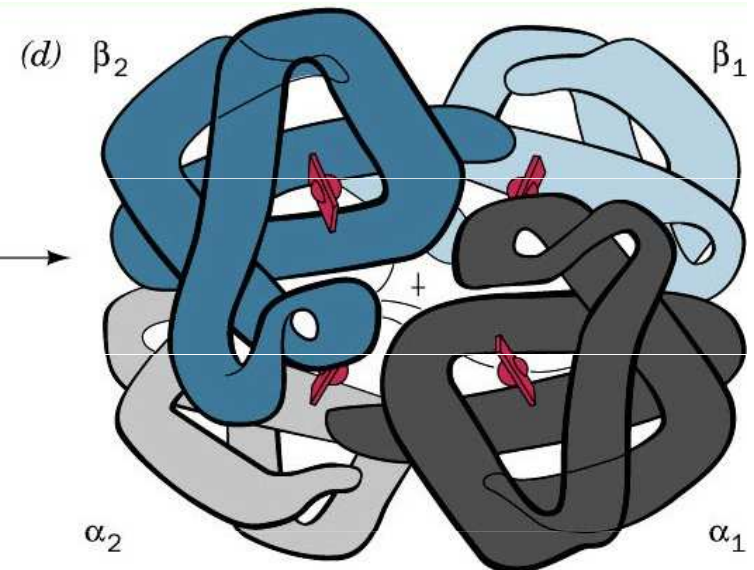
1962 - syntéza na pevné fázi - MERRIFIELD

**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)



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



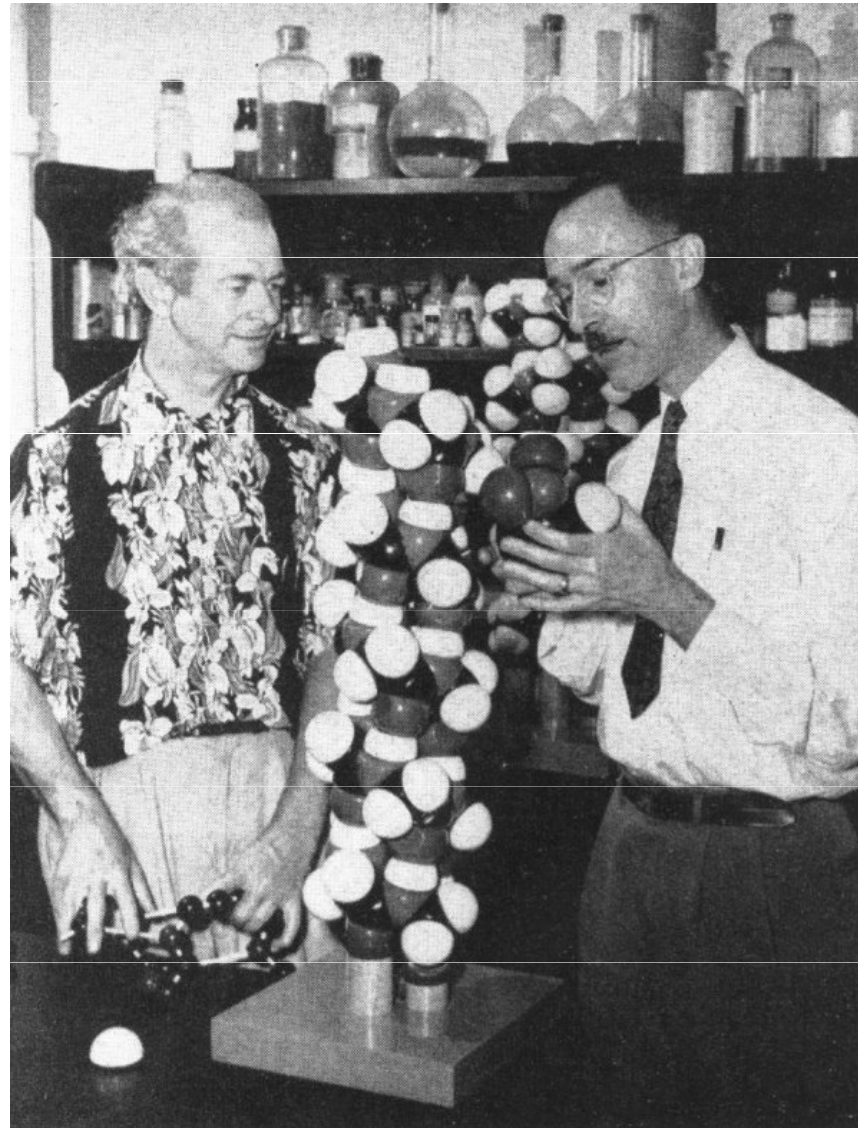
Quaternary structure:
the four separate chains
of hemoglobin assembled
into an oligomeric protein

Sekundární struktura

Polypeptidový skelet

peptidická vazba - PAULING a COREY

30 až 40.léta

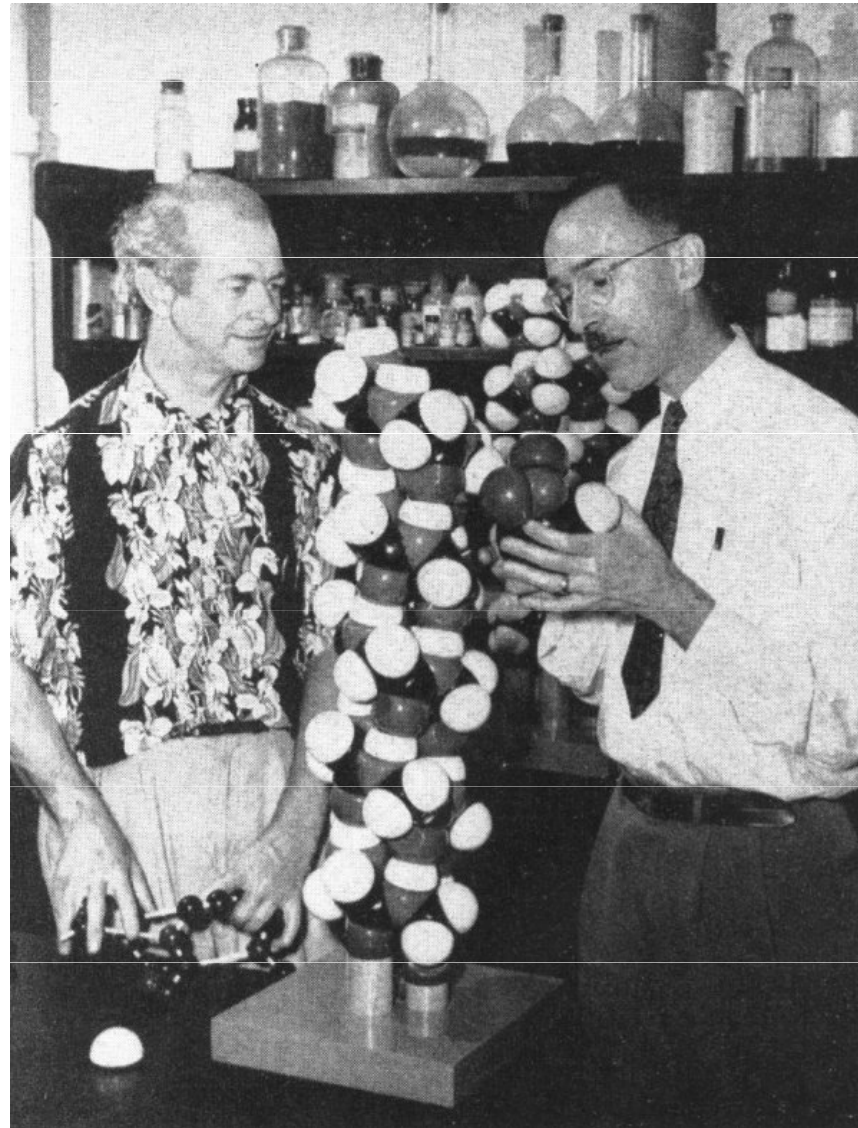


L.P. NC chemie 1954
NC mír 1962

Sekundární struktura

peptidická vazba - PAULING a COREY

30 až 40.léta



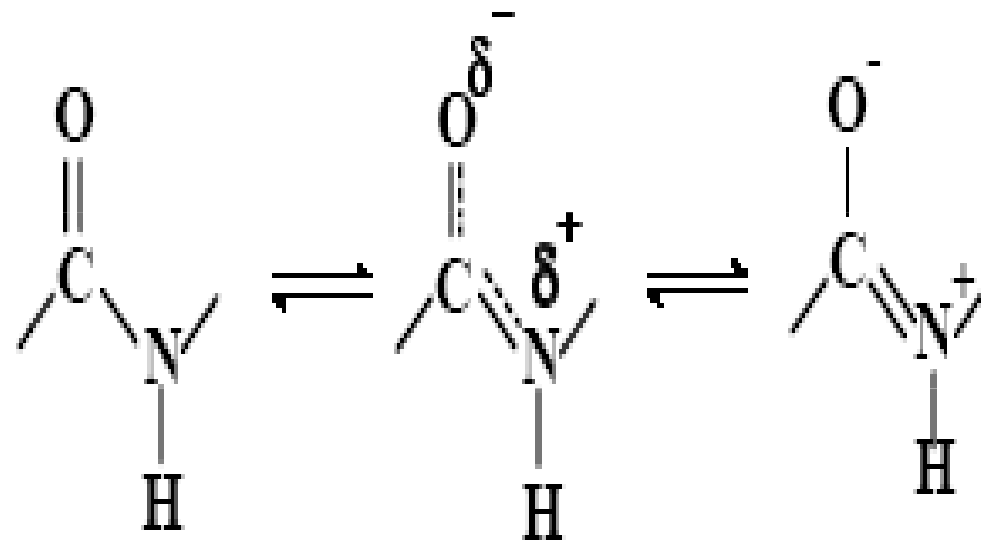
L.P. NC chemie 1954
NC mír 1962

Sekundární struktura

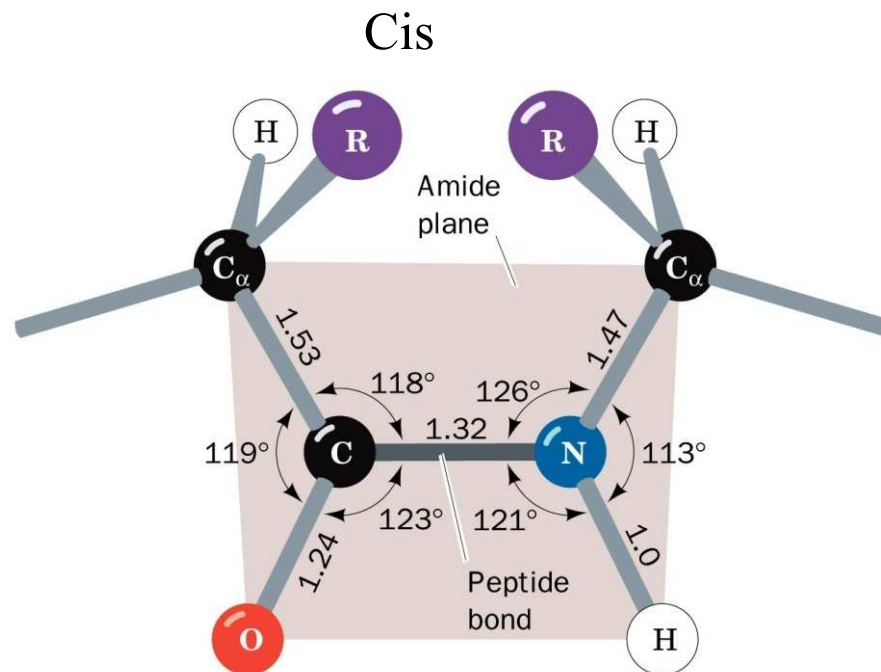
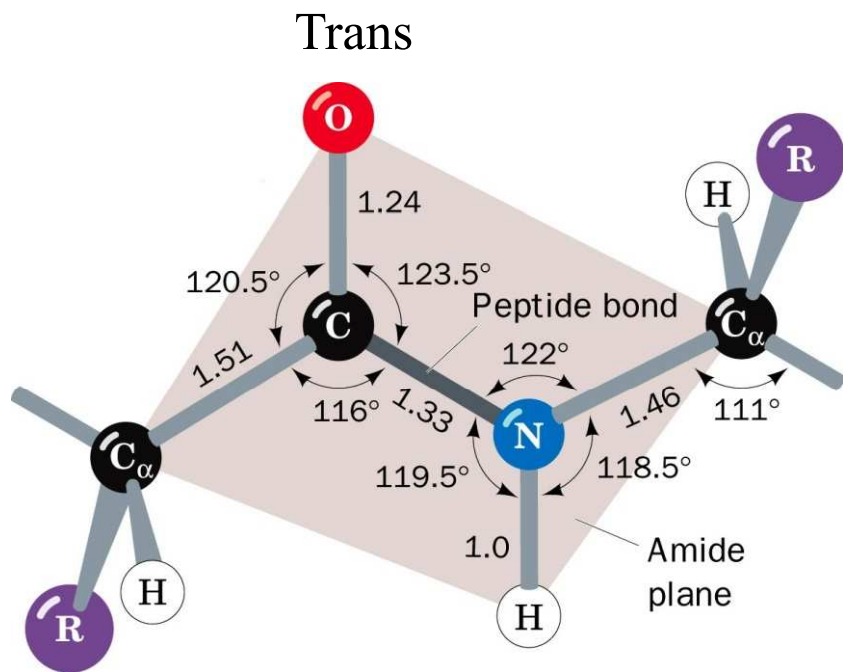
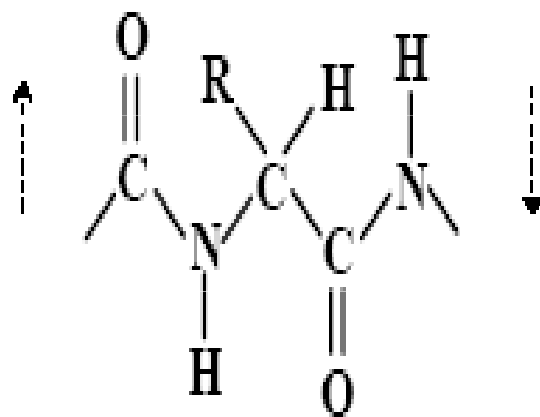
peptidická vazba - PAULING a COREY

30 až 40.léta

A. Peptidická vazba leží v rovině

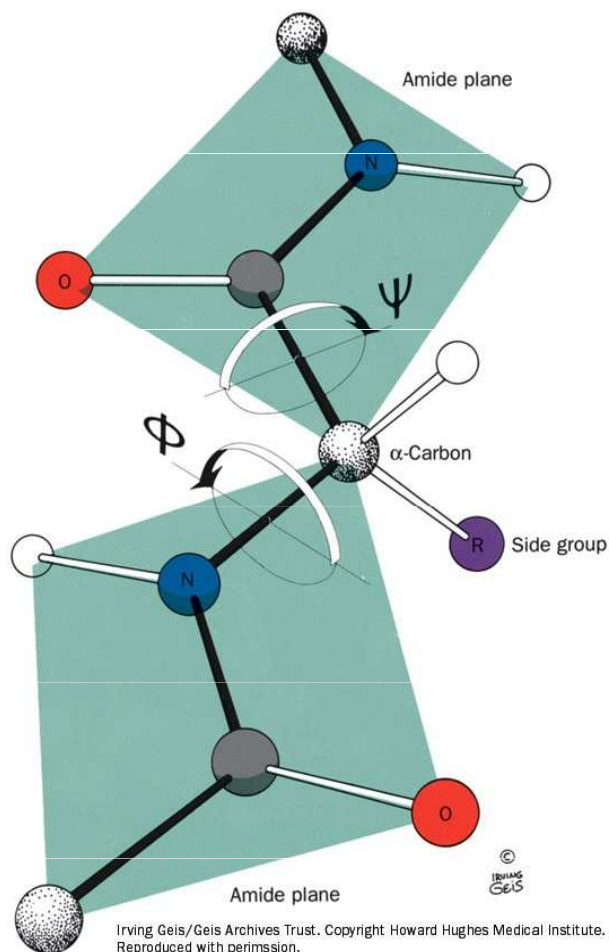
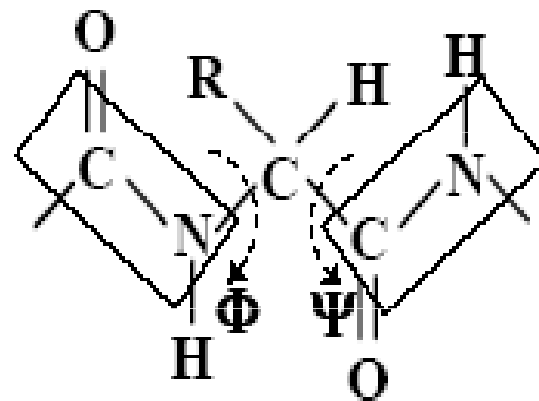


B. Peptidické vazby jsou v trans konfiguraci

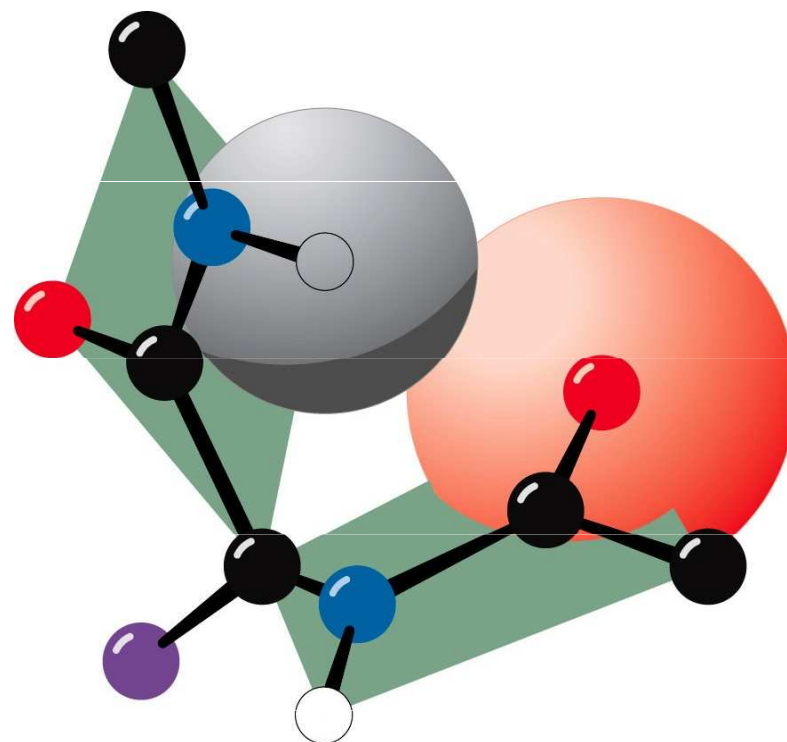


C. Peptidické vazby ležící v rovině mohou svírat určité torzní uhly

ϕ, ψ

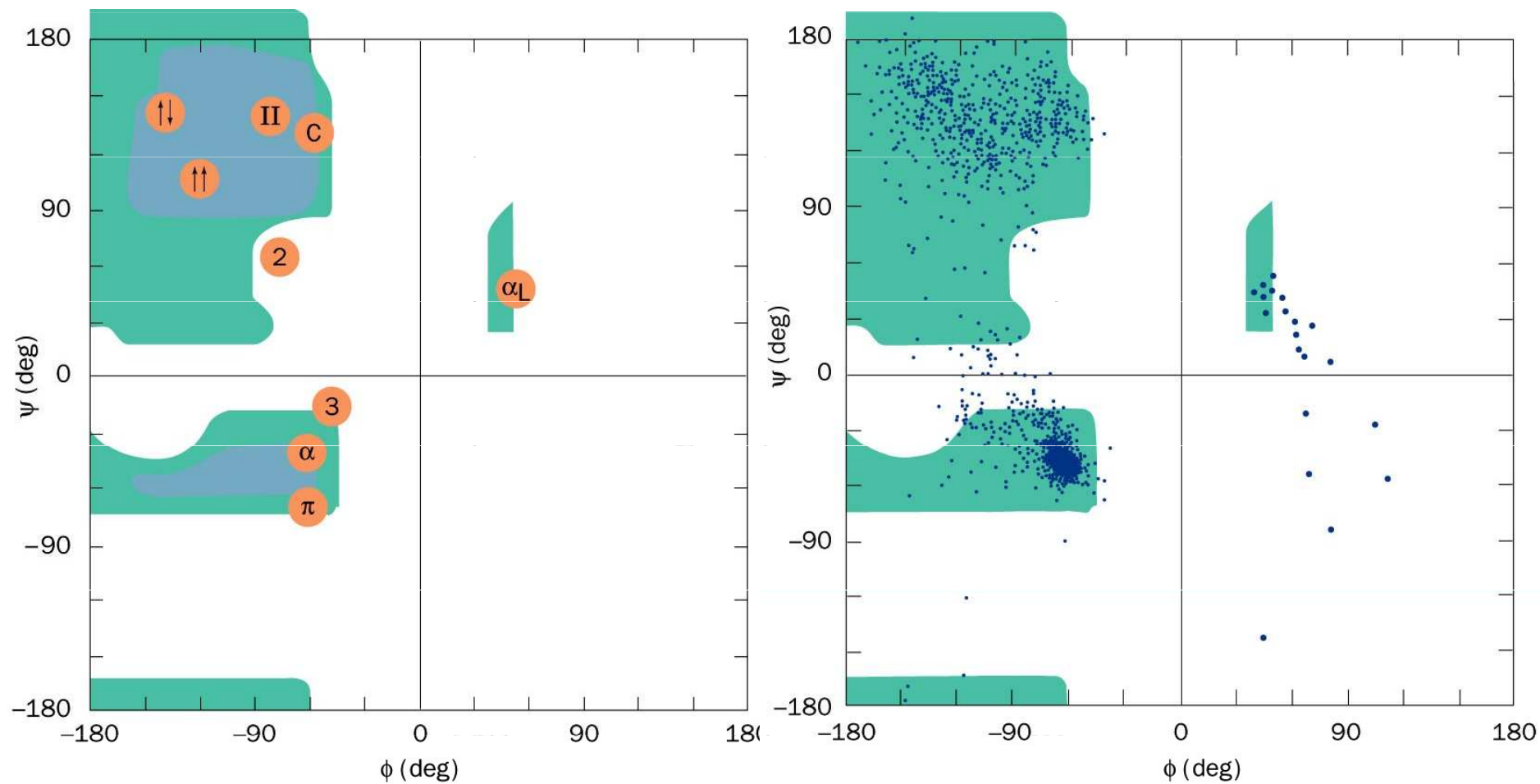


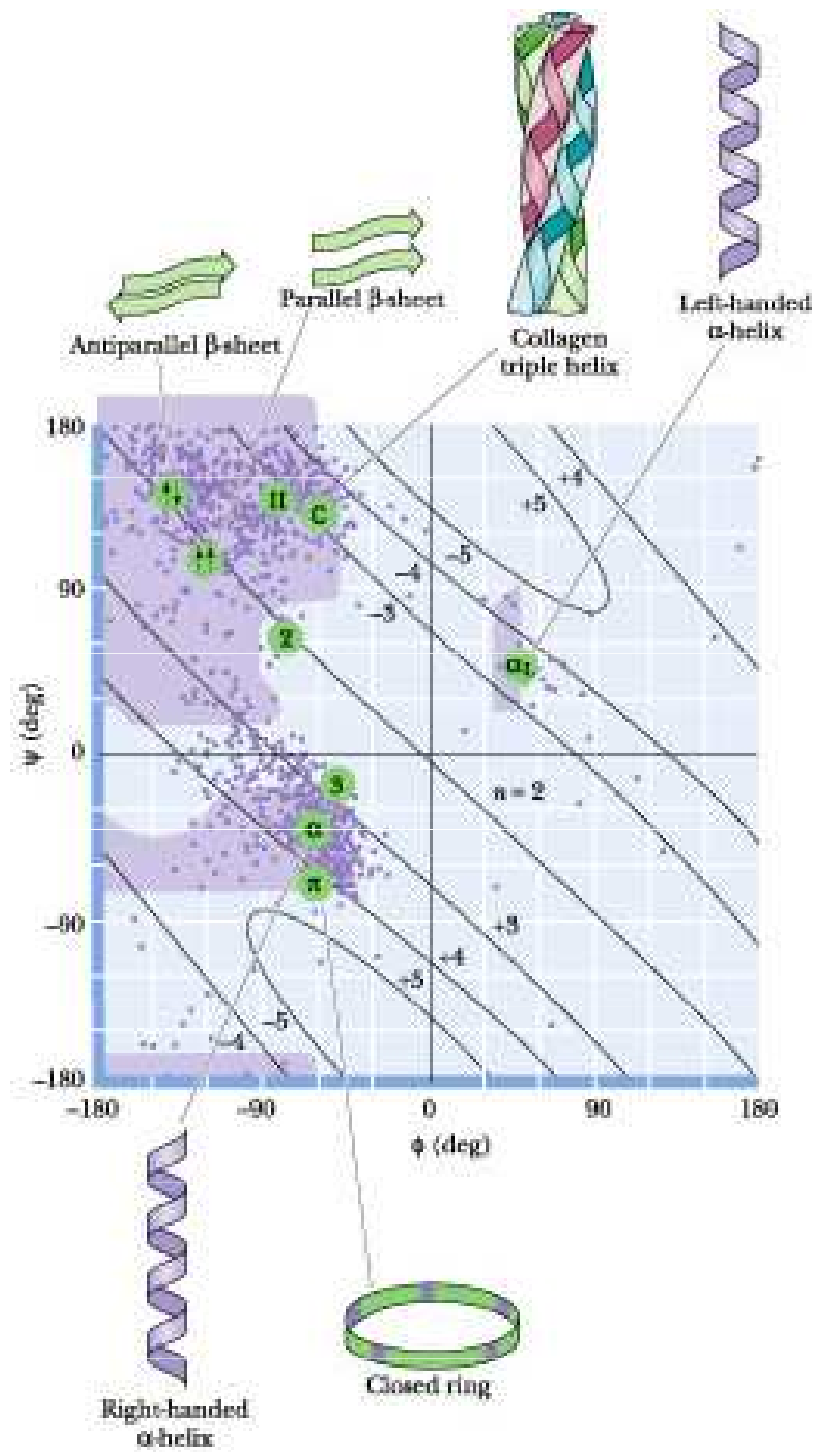
Irving Geis/Geis Archives Trust. Copyright Howard Hughes Medical Institute. Reproduced with permission.



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

Ramachandrov diagram stability sekundárných struktur białkovin





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

Typy sekundárních struktur :

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

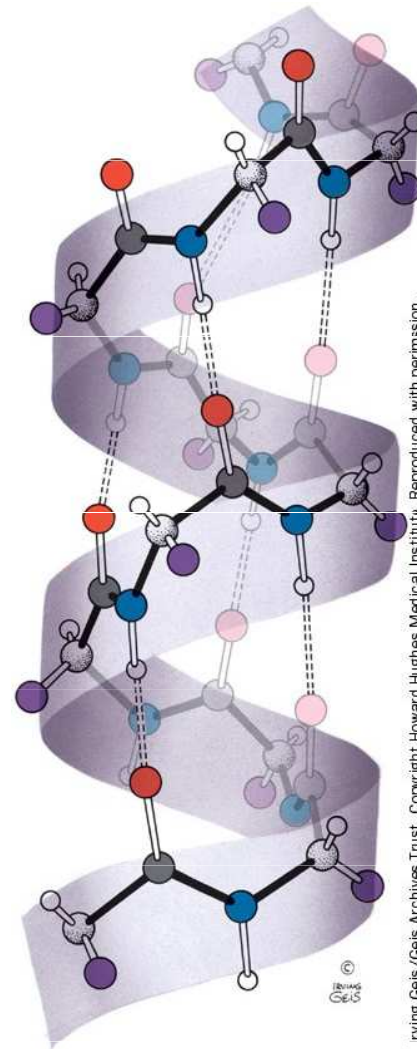
- β struktury - skládaný list - paralelní (-139, +135) a
antiparalelní (-119, +113)

B. Ohybové - β ohyb

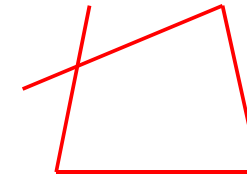
C. Nepravidelné

α - helix

- Torzní úhly
- Počet AMK na závit
- Výška závitů



3,6 AMK na závit

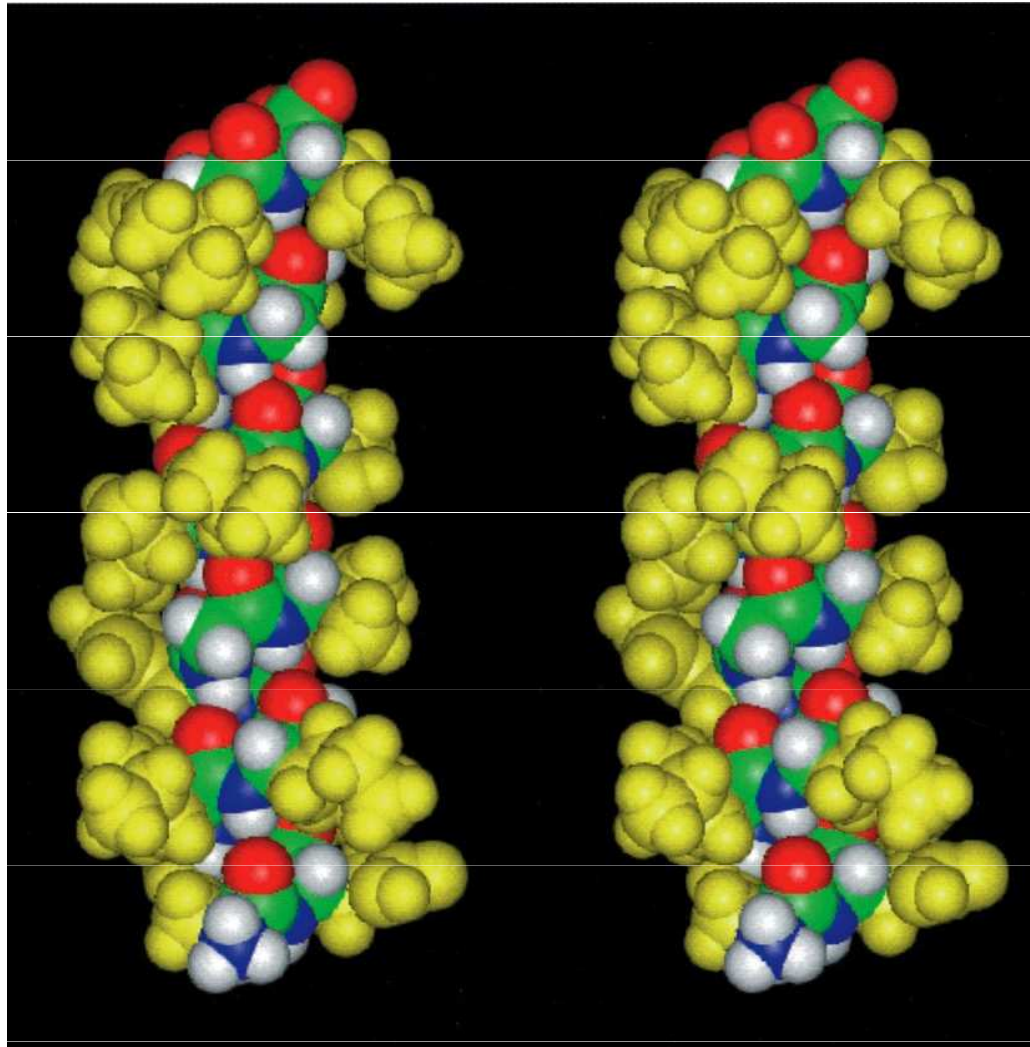


H můstek mezi C=O n -té peptidické vazby a N-H $n+4$ peptidické vazby



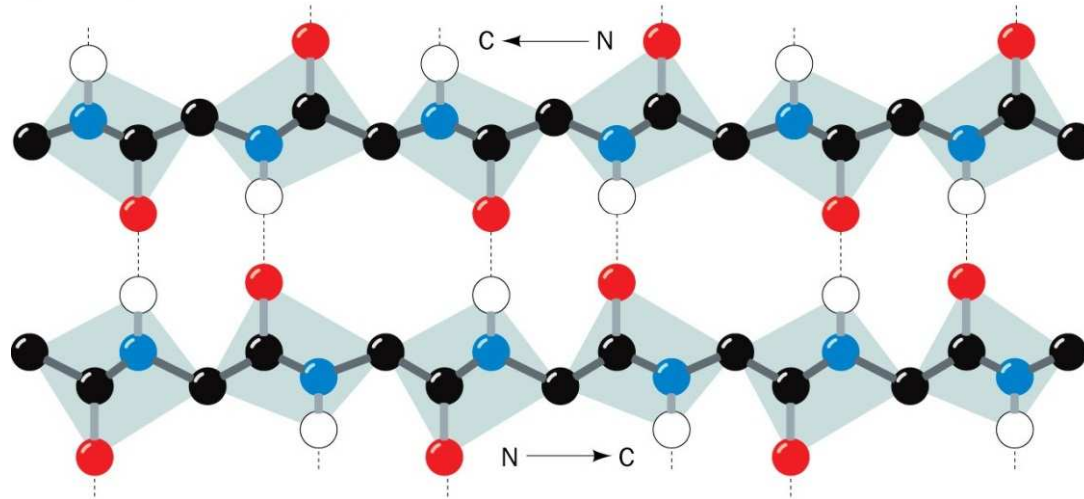
Optimální vzdálenost 0,28 nm

α - helix



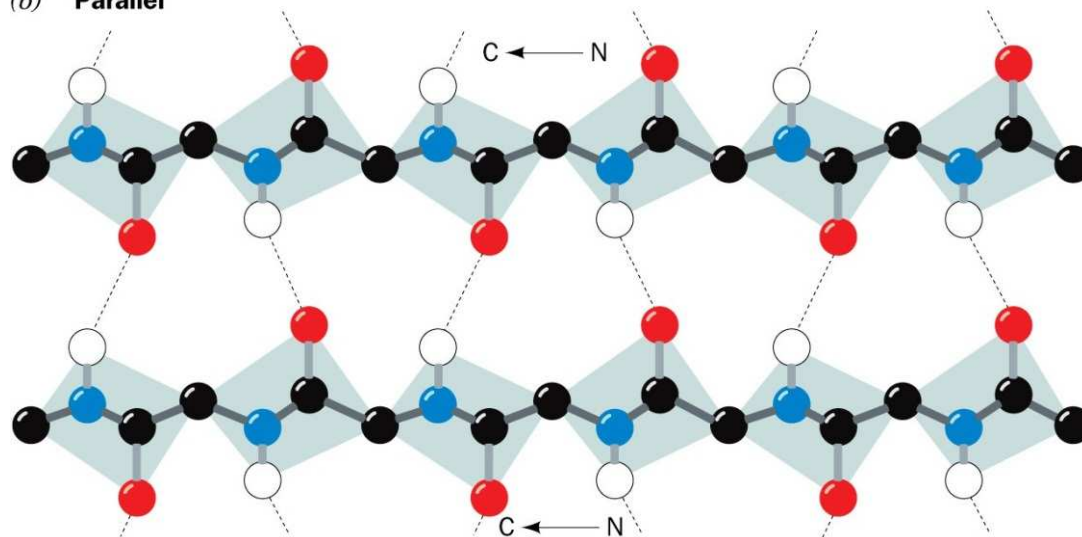
β - sheet

(a) Antiparallel



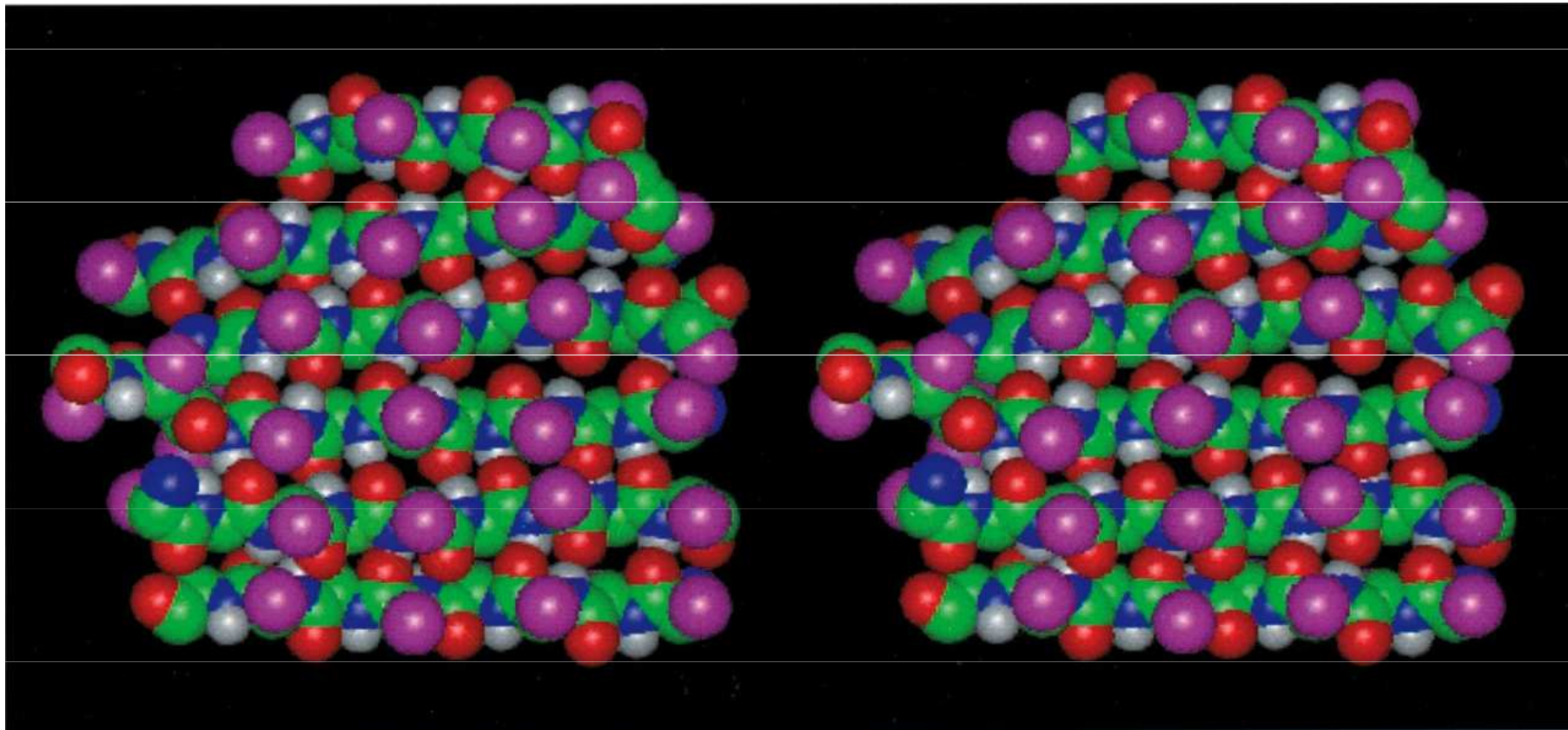
Irving Geis/Geis Archives Trust. Copyright Howard Hughes Medical Institute. Reproduced with permission.

(b) Parallel



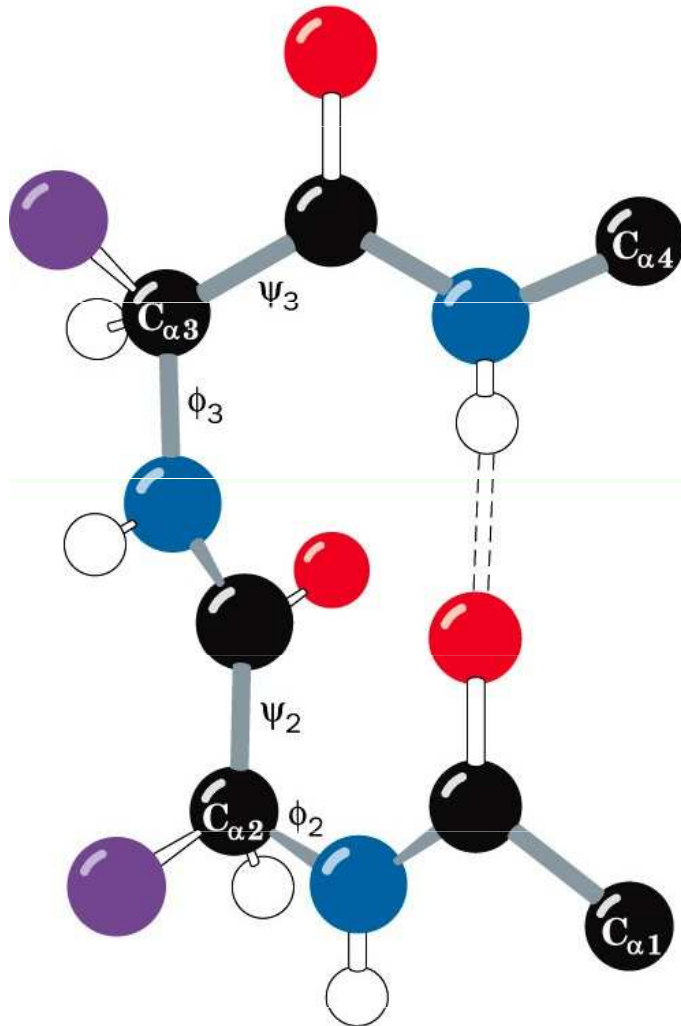
Irving Geis/Geis Archives Trust. Copyright Howard Hughes Medical Institute. Reproduced with permission.

β - sheet

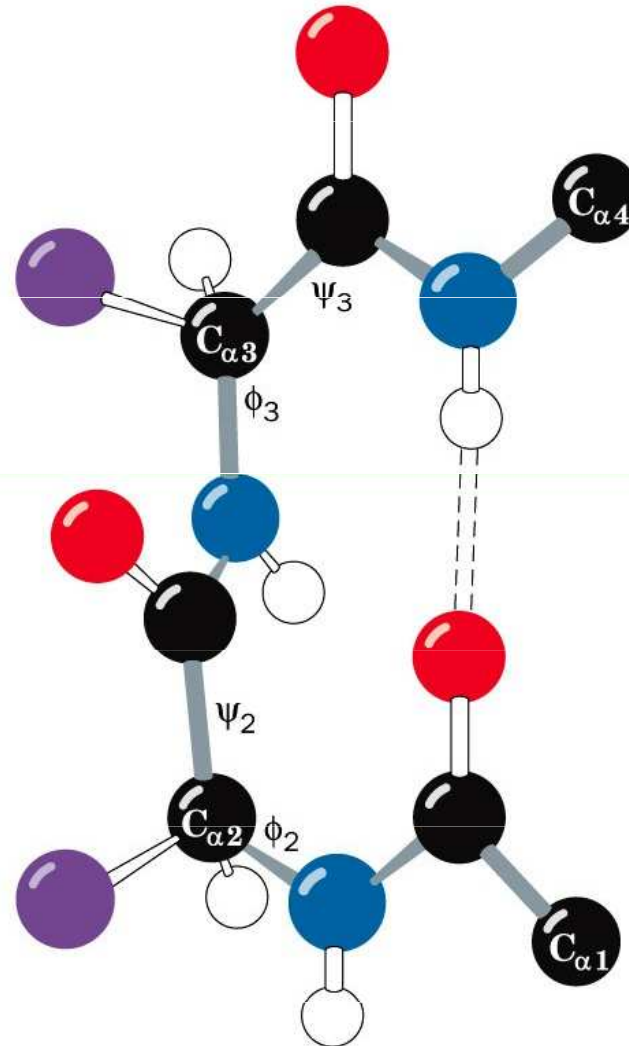


β - turn

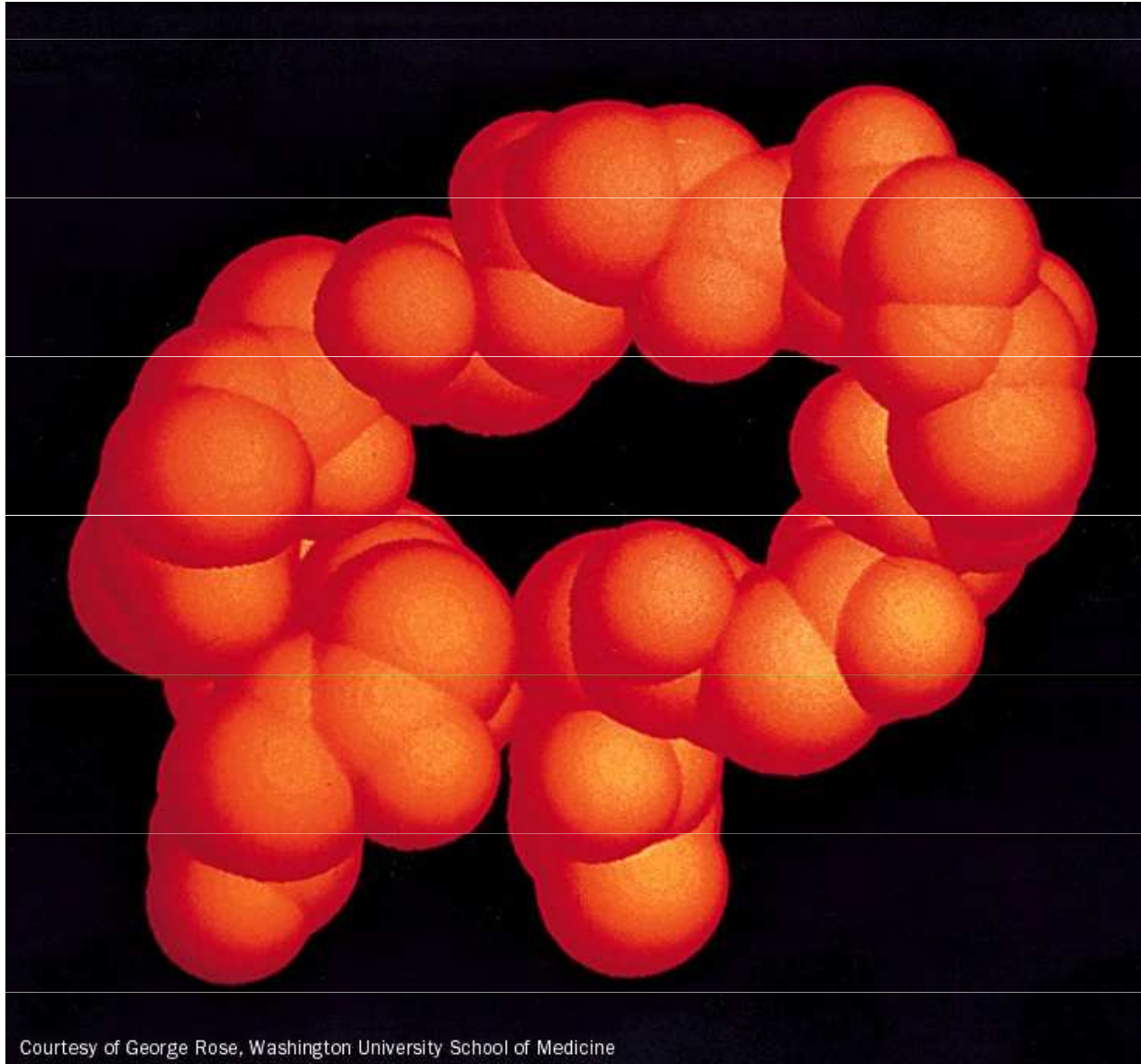
(a) Type I β bend



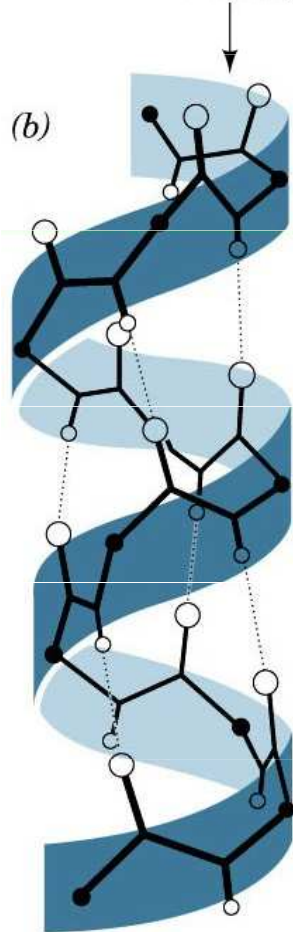
(b) Type II β bend



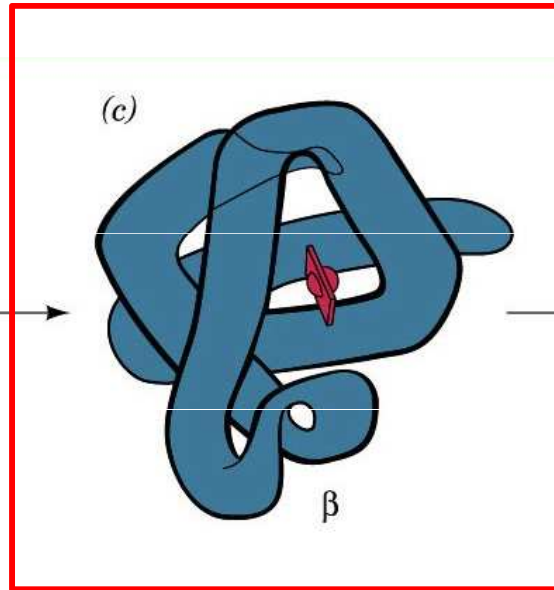
β - turn



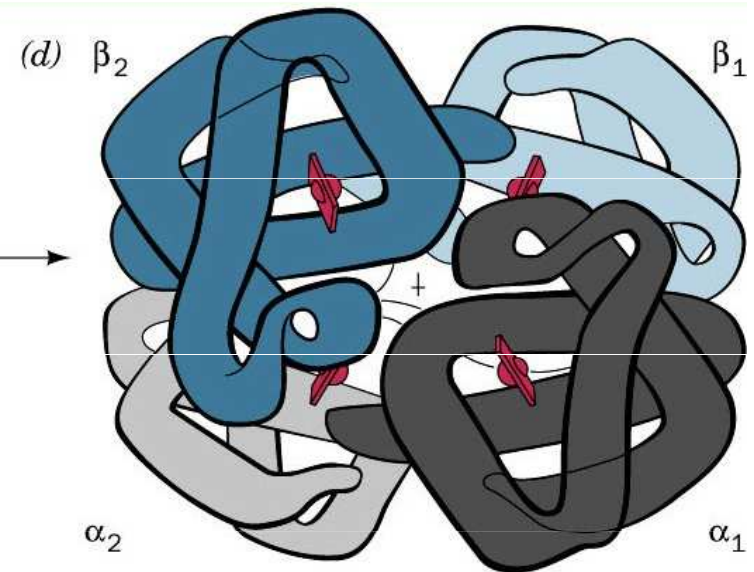
(a) – Lys – Ala – His – Gly – Lys – Lys – Val – Leu – Gly – Ala –
Primary structure (amino acid sequence in a polypeptide chain)



Secondary structure (helix)



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



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

Terciální struktura

Polypeptidový skelet + vedlejší řetězce AMK

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

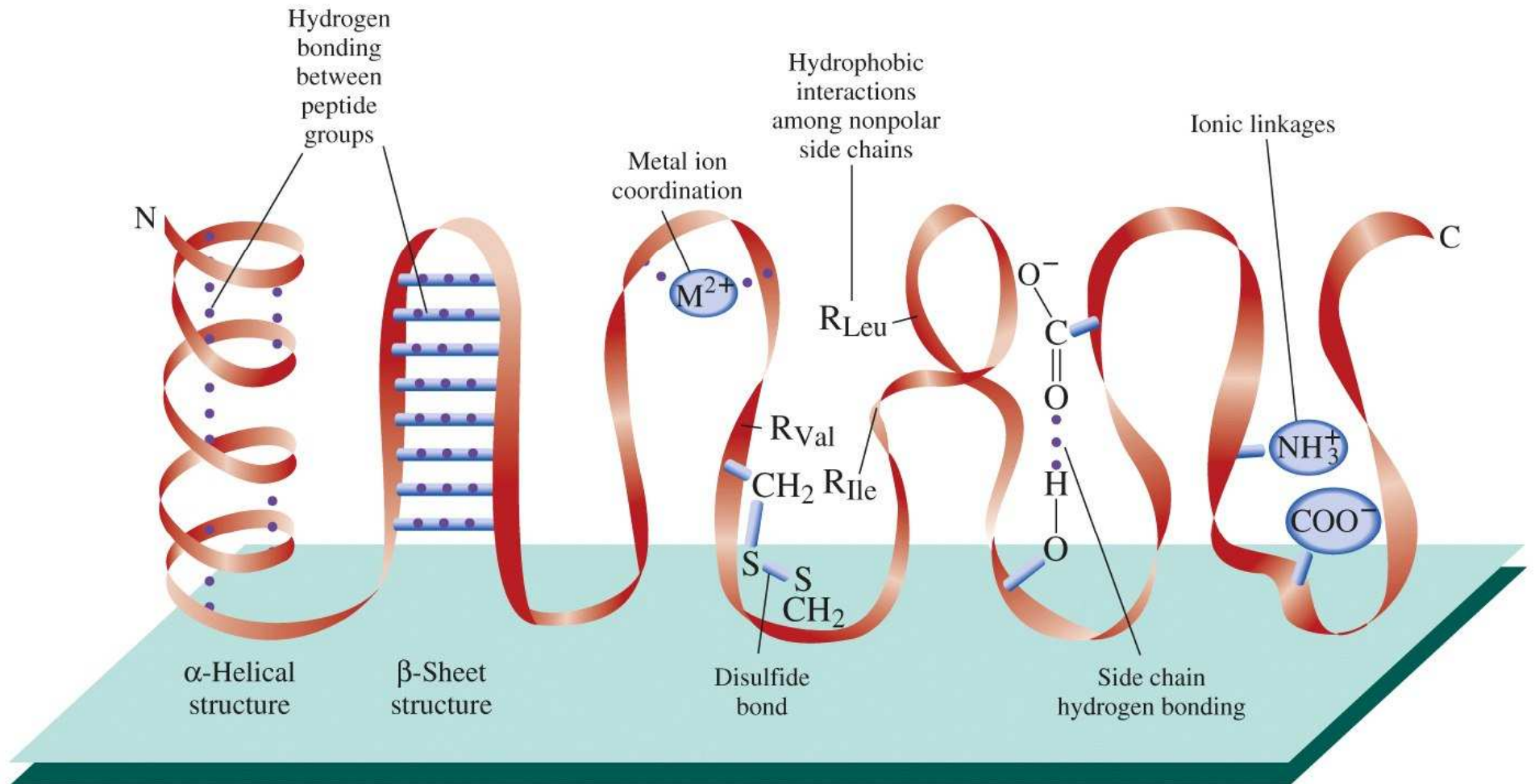
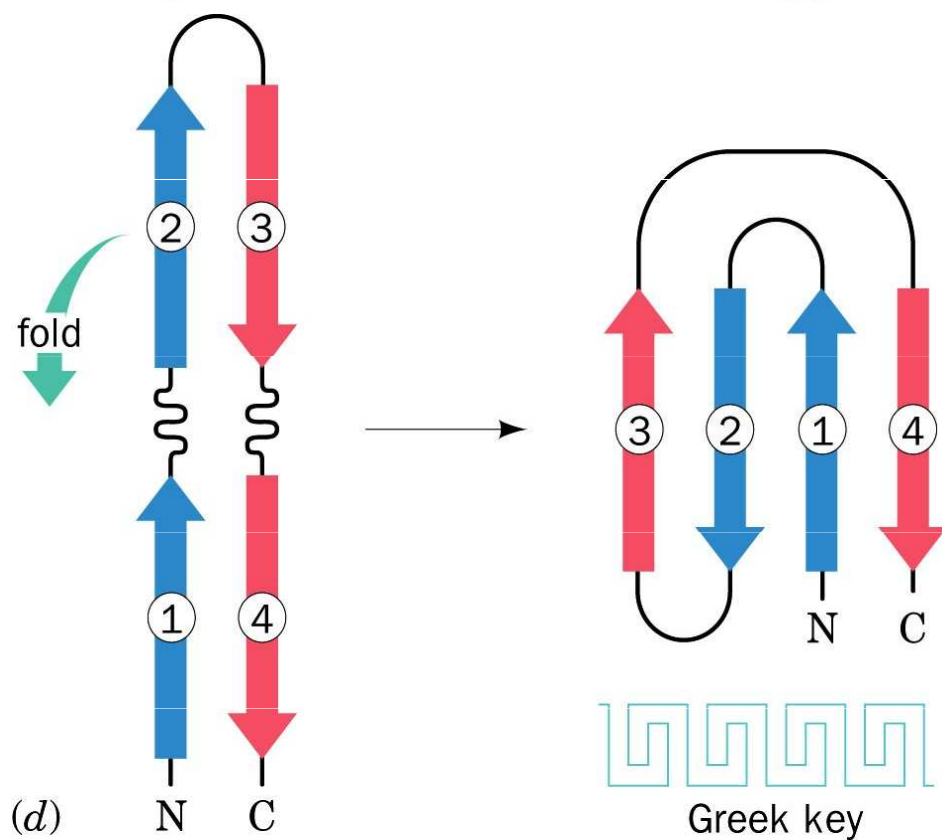
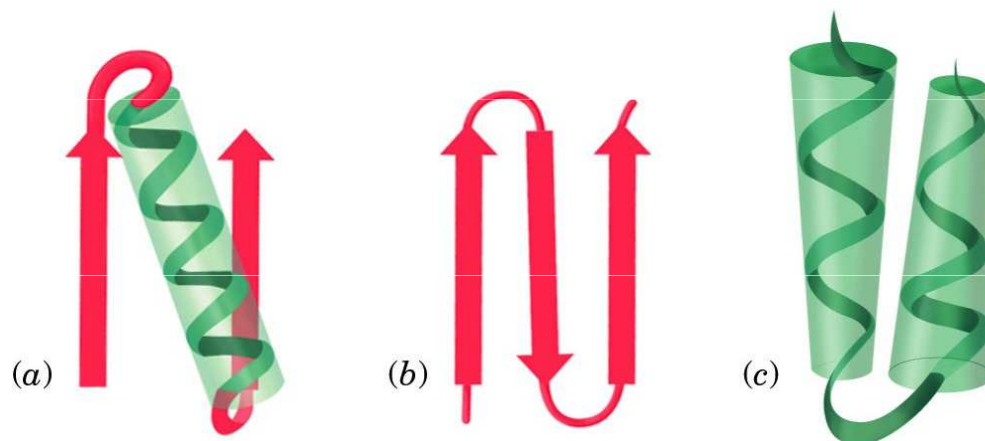
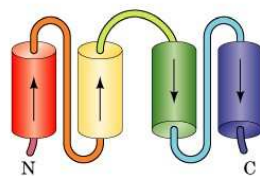
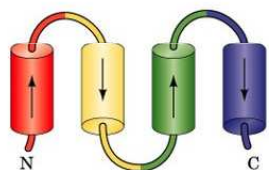
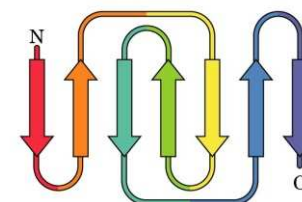
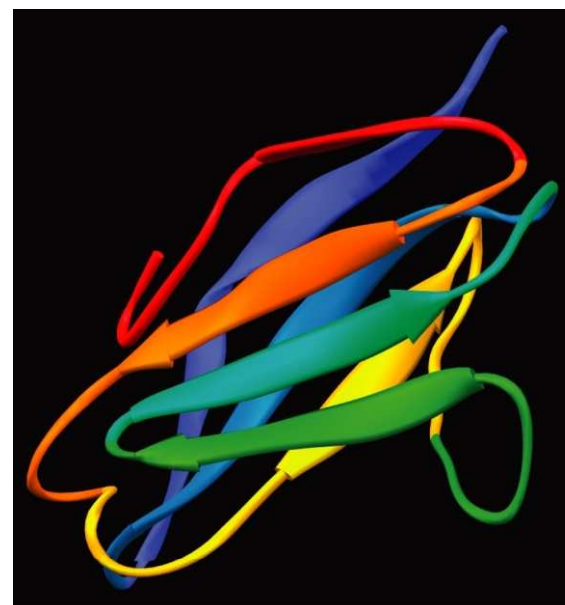
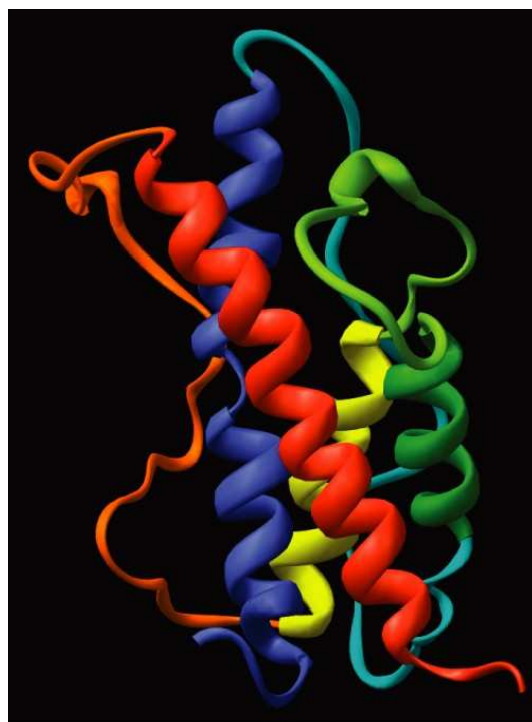
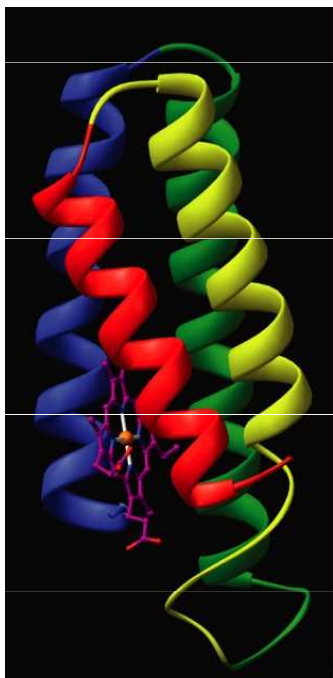


Figure 4-3 Concepts in Biochemistry, 3/e
 © 2006 John Wiley & Sons

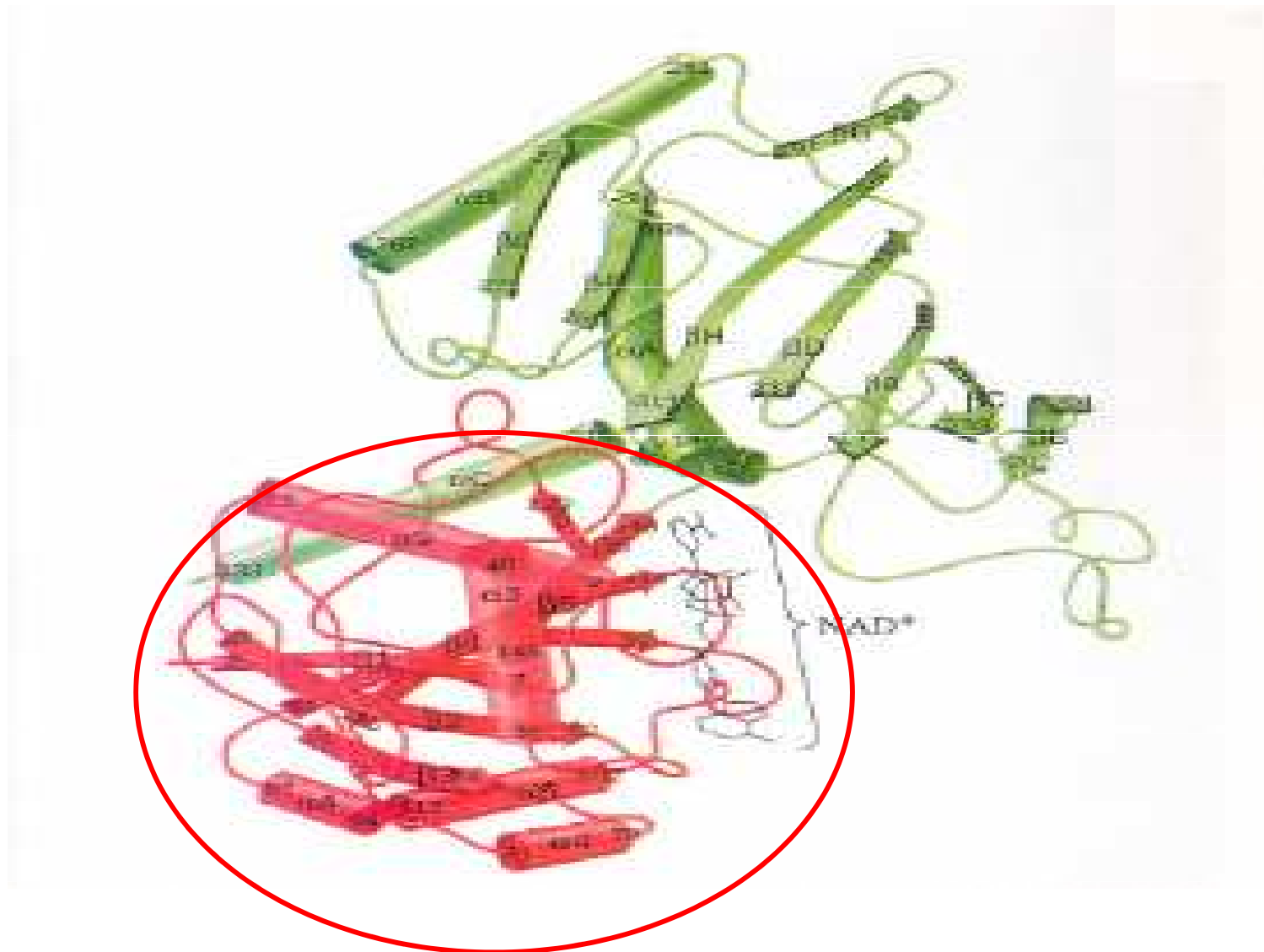
Strukturní motivy

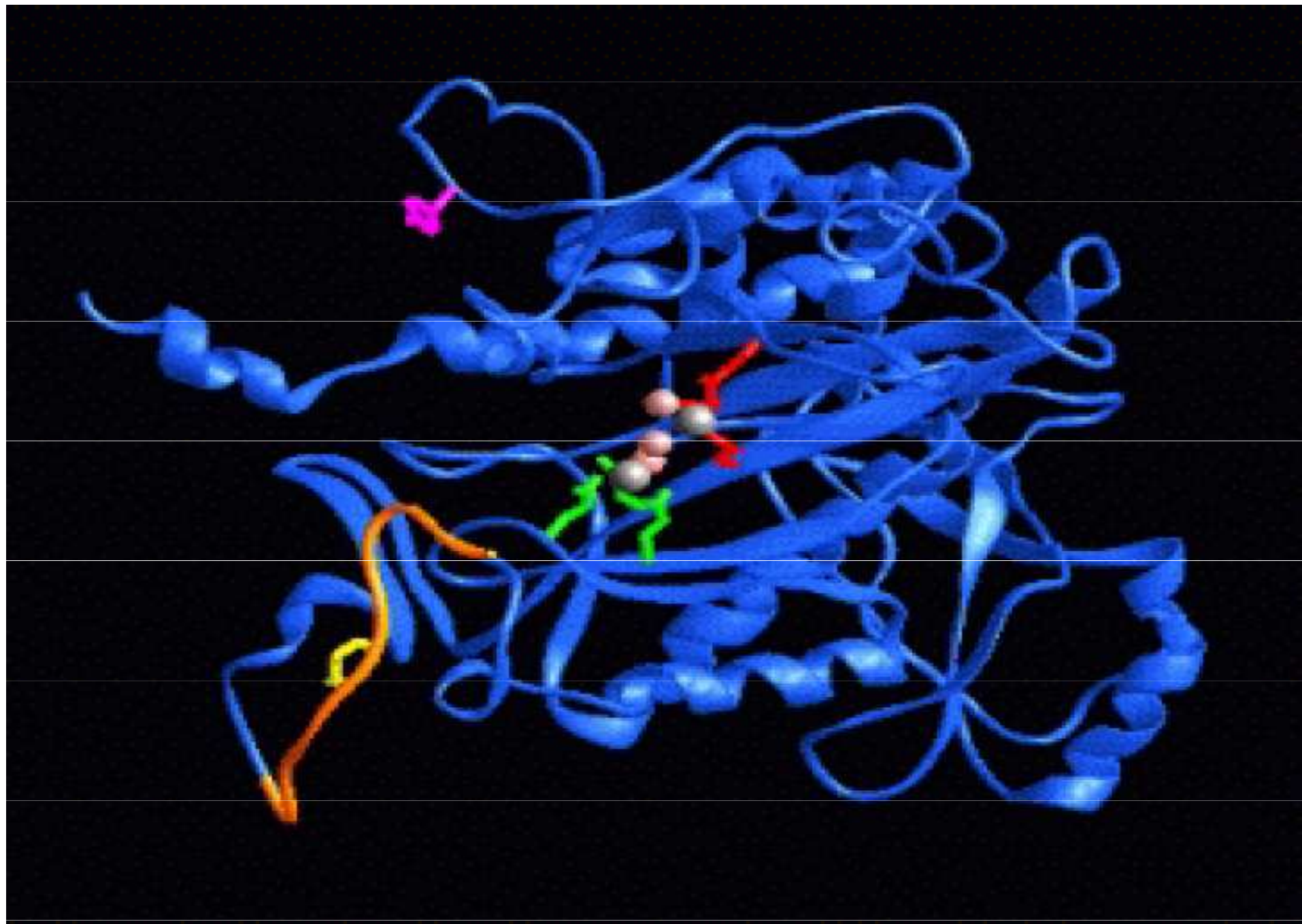


Strukturní motivy

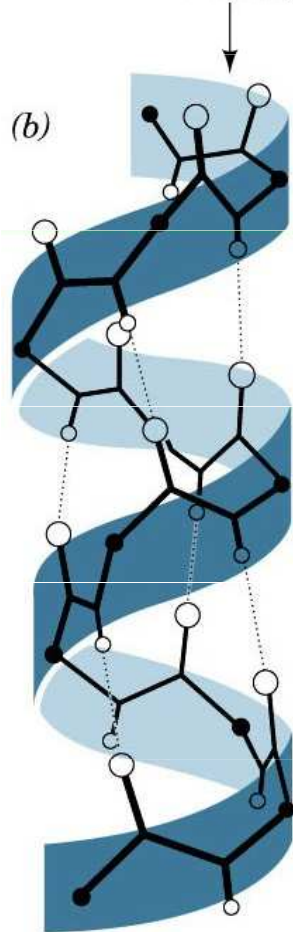


Strukturní domény – NAD⁺

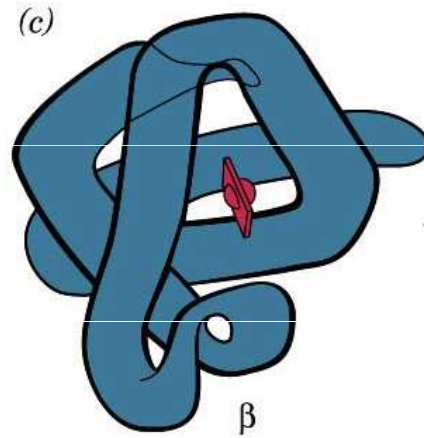




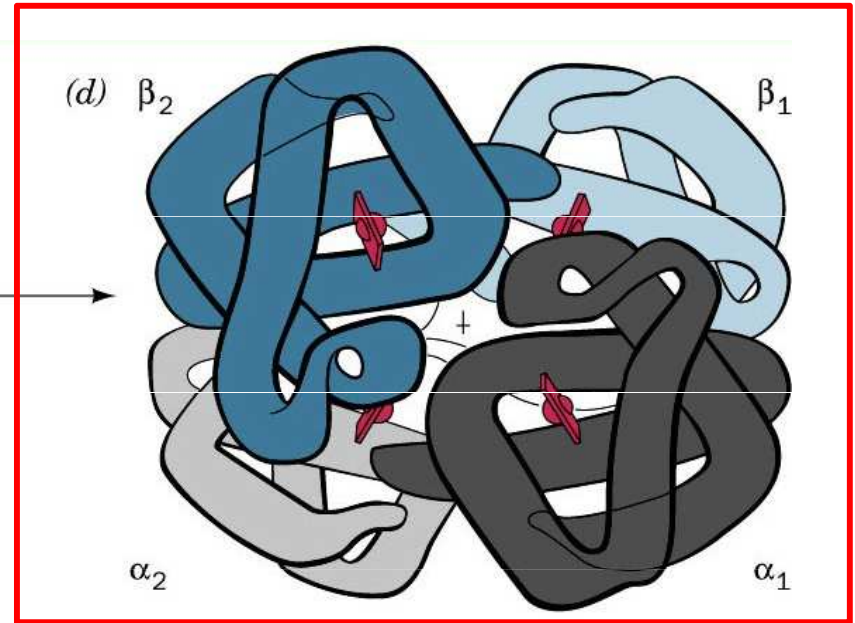
(a) – Lys – Ala – His – Gly – Lys – Lys – Val – Leu – Gly – Ala –
Primary structure (amino acid sequence in a polypeptide chain)



Secondary structure (helix)



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



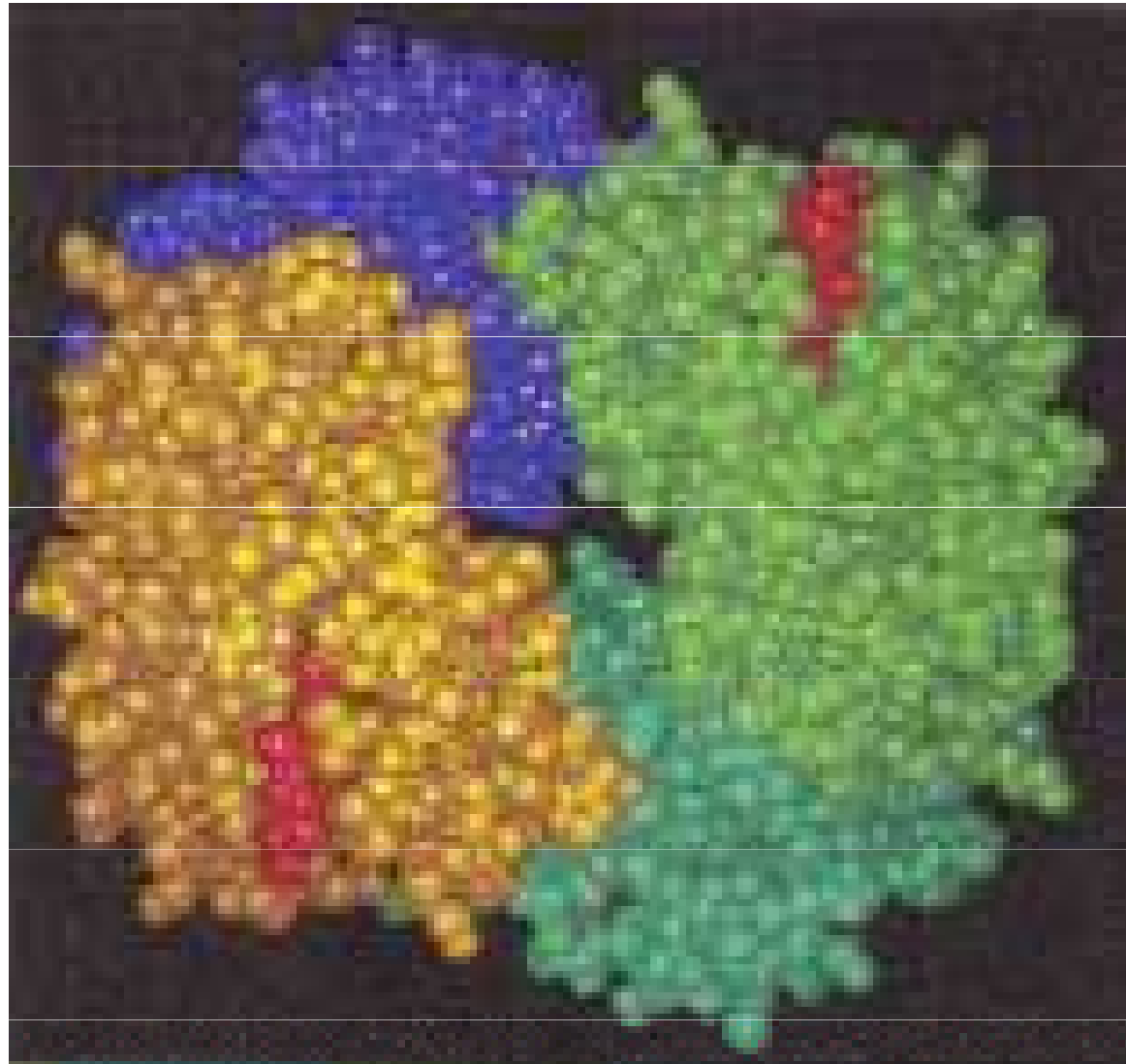
Quaternary structure:
the four separate chains
of hemoglobin assembled
into an oligomeric protein

Kvarterní struktura

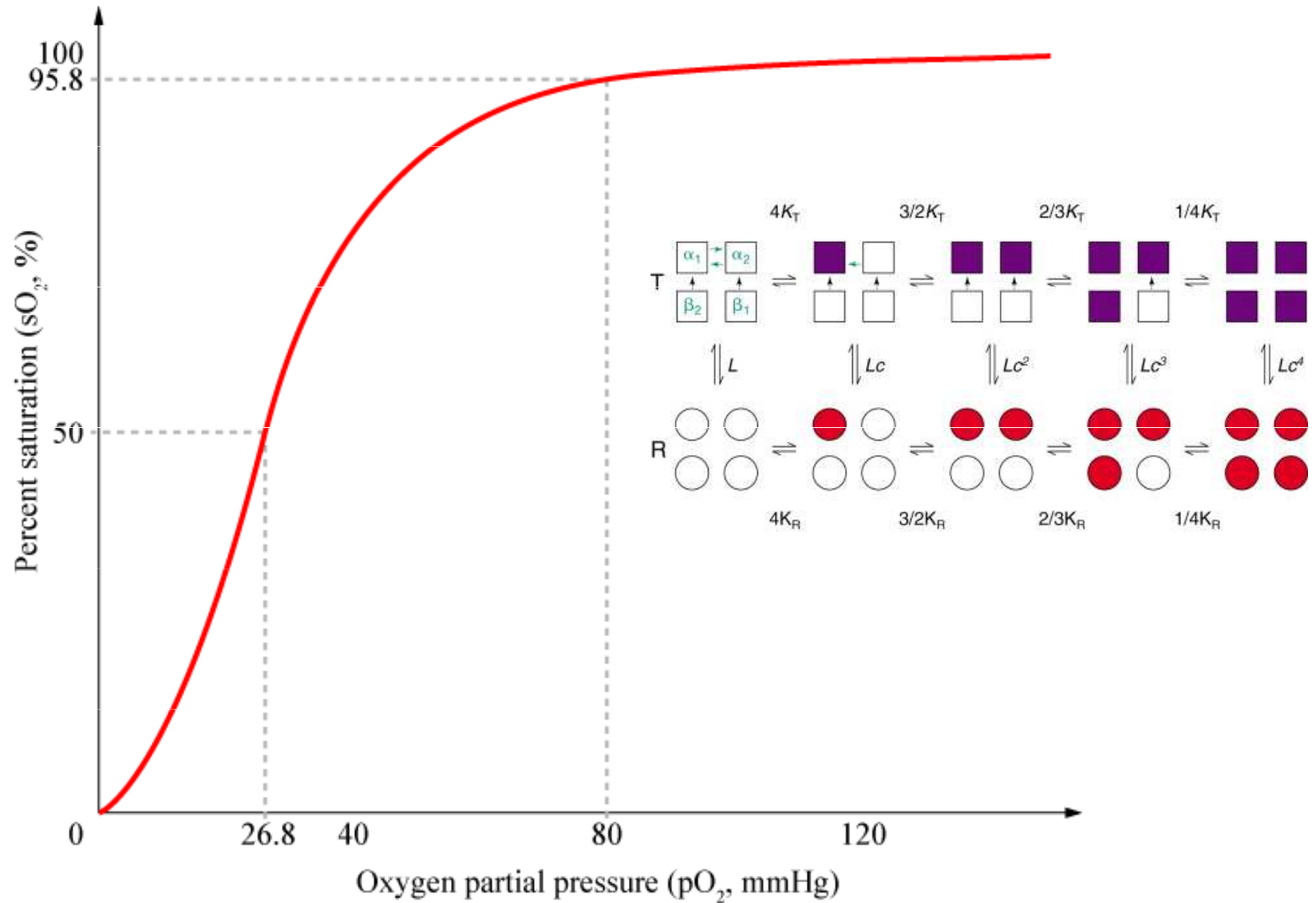
Podjednotkové složení – více polypeptidických řetězců

- **Usnadnění proteosyntézy**
- **Možnost regulací – allosterie, izoenzymy**
- **Multienzymové komplexy – enzymové továrny**

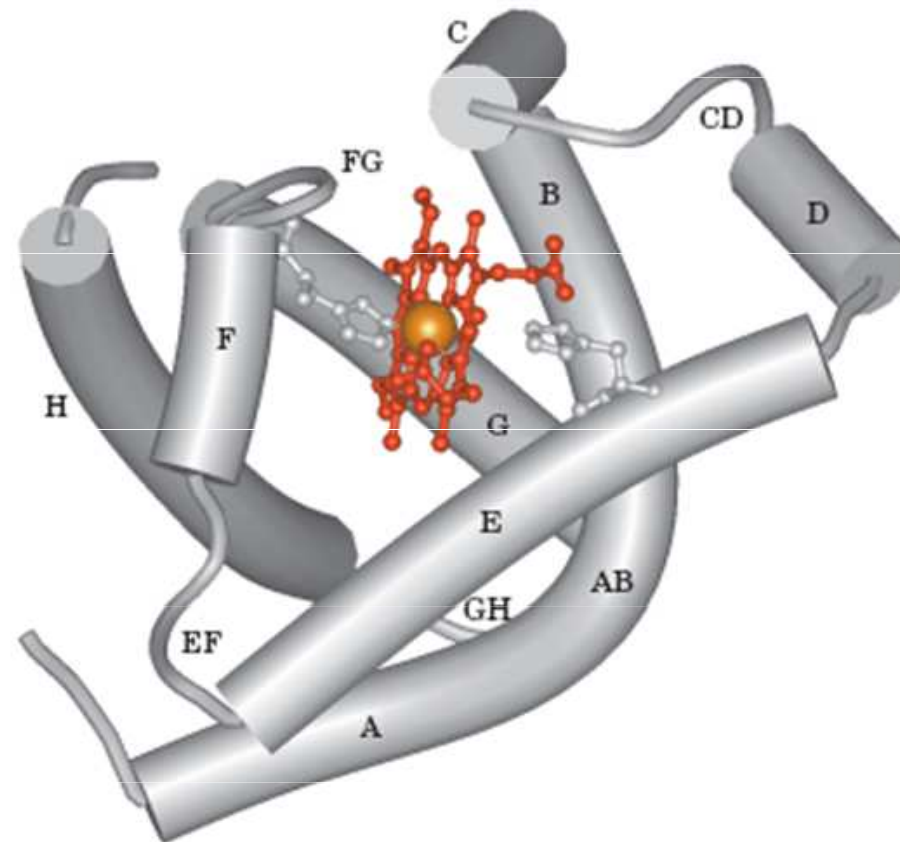
Hemoglobin



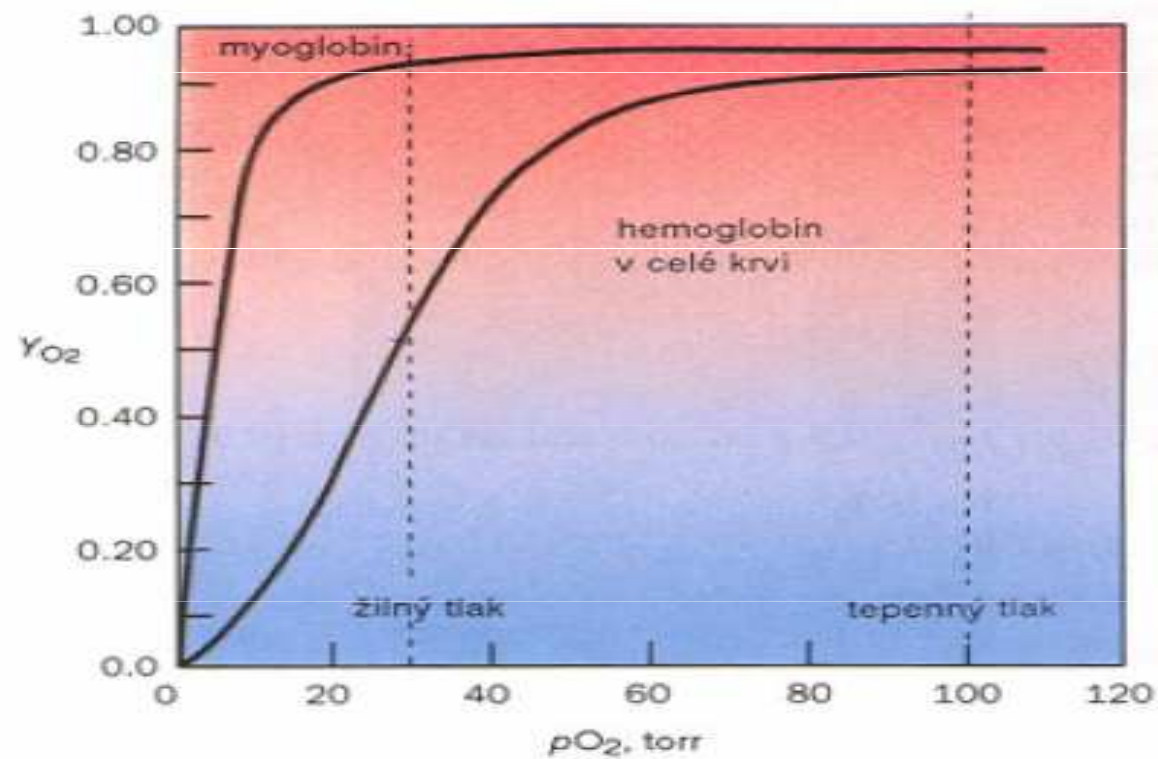
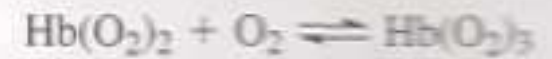
Hemoglobin allosterie



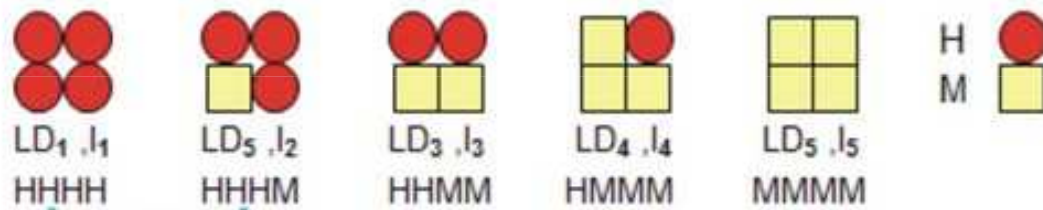
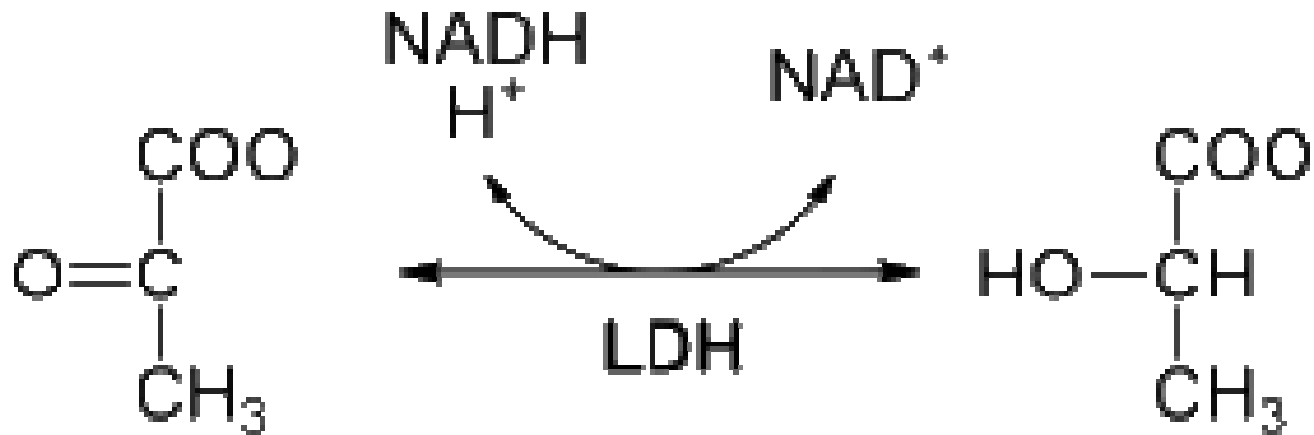
Myoglobin



Hb versus Mb



Laktátdehydrogenáza



Sátra



GLYKOLÝZA



glukosa

$2\text{ADP} + 2\text{P}_i$

2NAD^+

fruktosa-1,6-bisfosfát

2ATP

2NADH

2 pyruvát

anaerobní mléčné kvašení

aerobní oxidace

anaerobní alkoholové kvašení

CITRÁTOVÝ CYKLUS

2NADH

2NADH

6O_2

2NADH

2NAD^+

2NAD^+

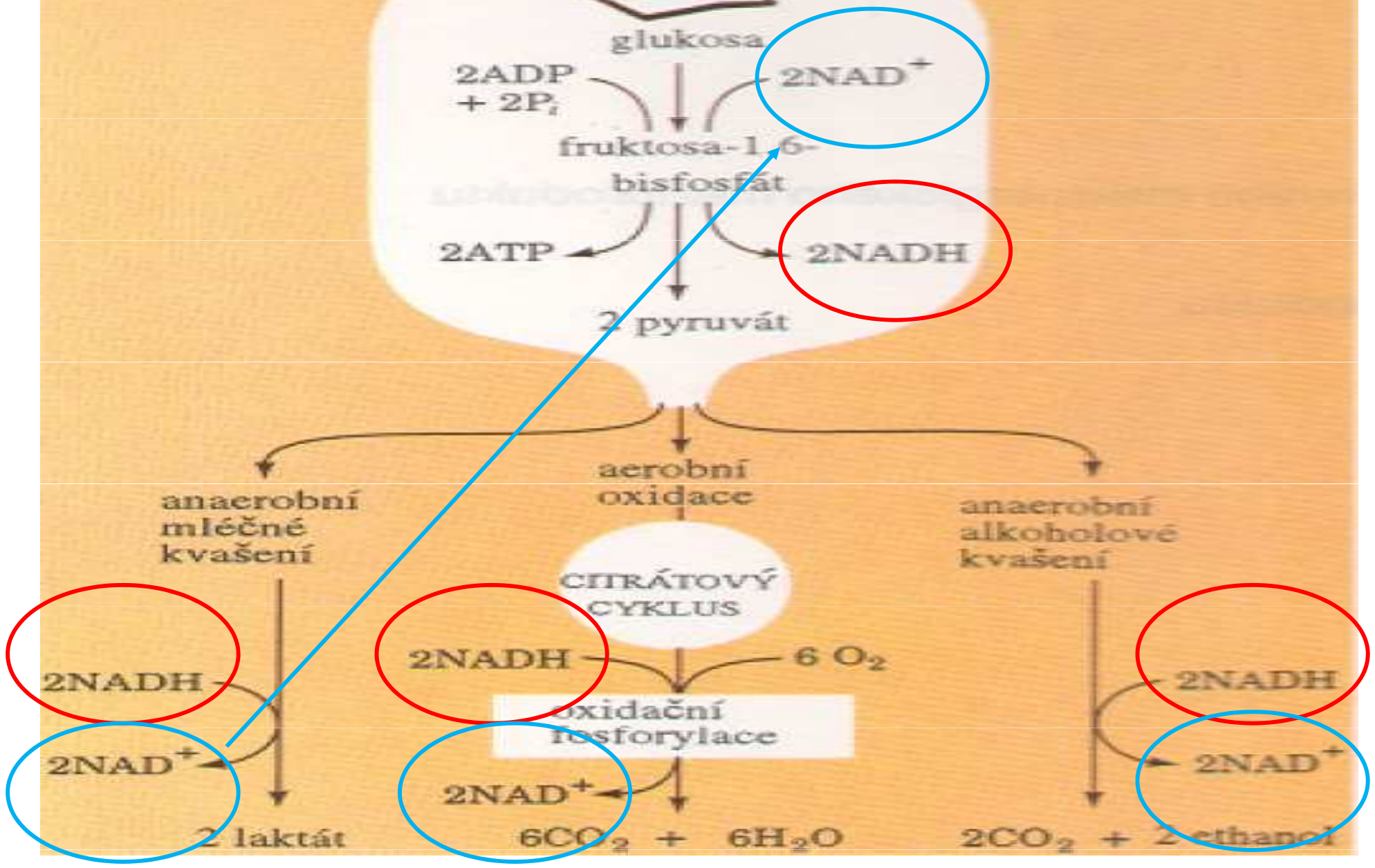
2NAD^+

2 laktát

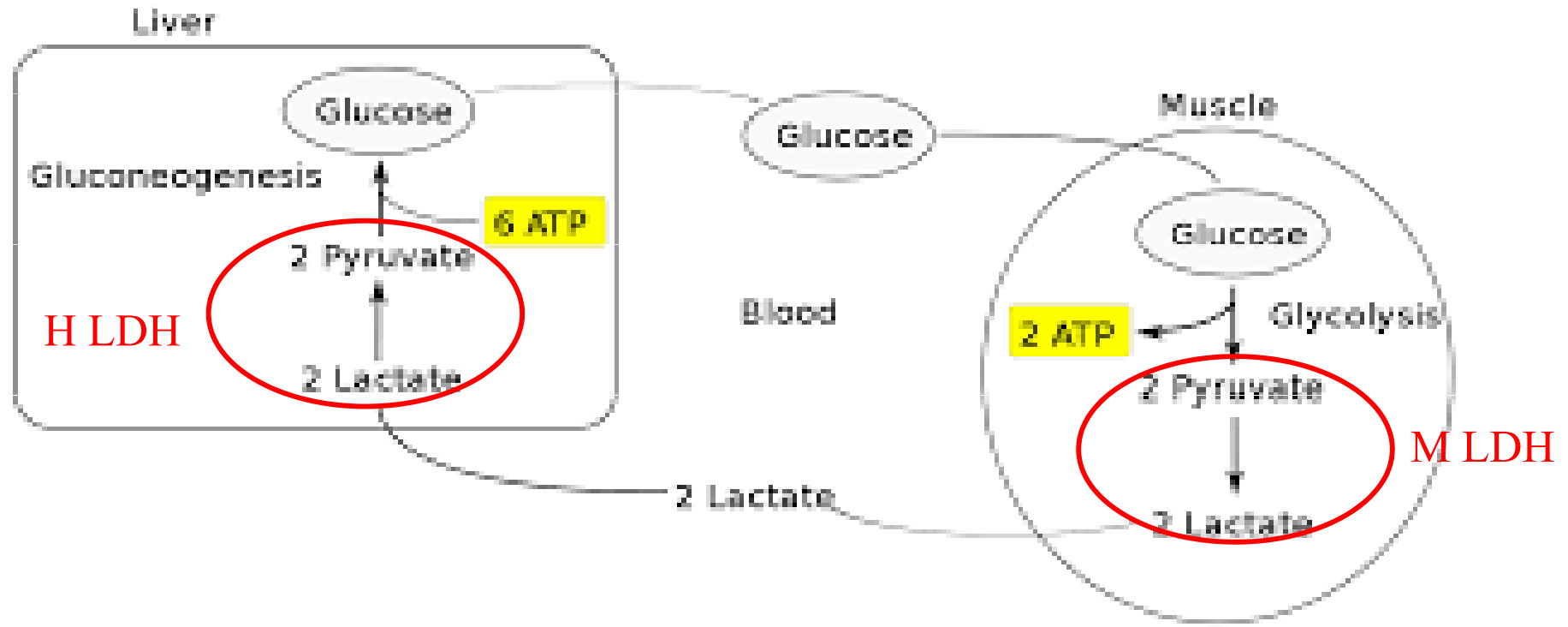
$6\text{CO}_2 + 6\text{H}_2\text{O}$

$2\text{CO}_2 + 2\text{ethanol}$

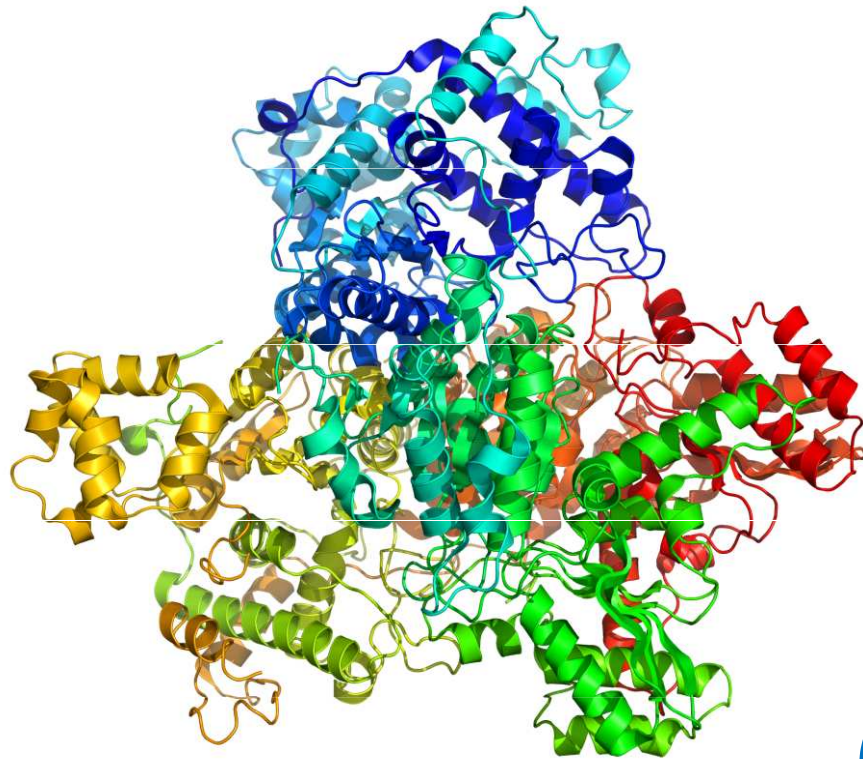
oxidační fosforylace



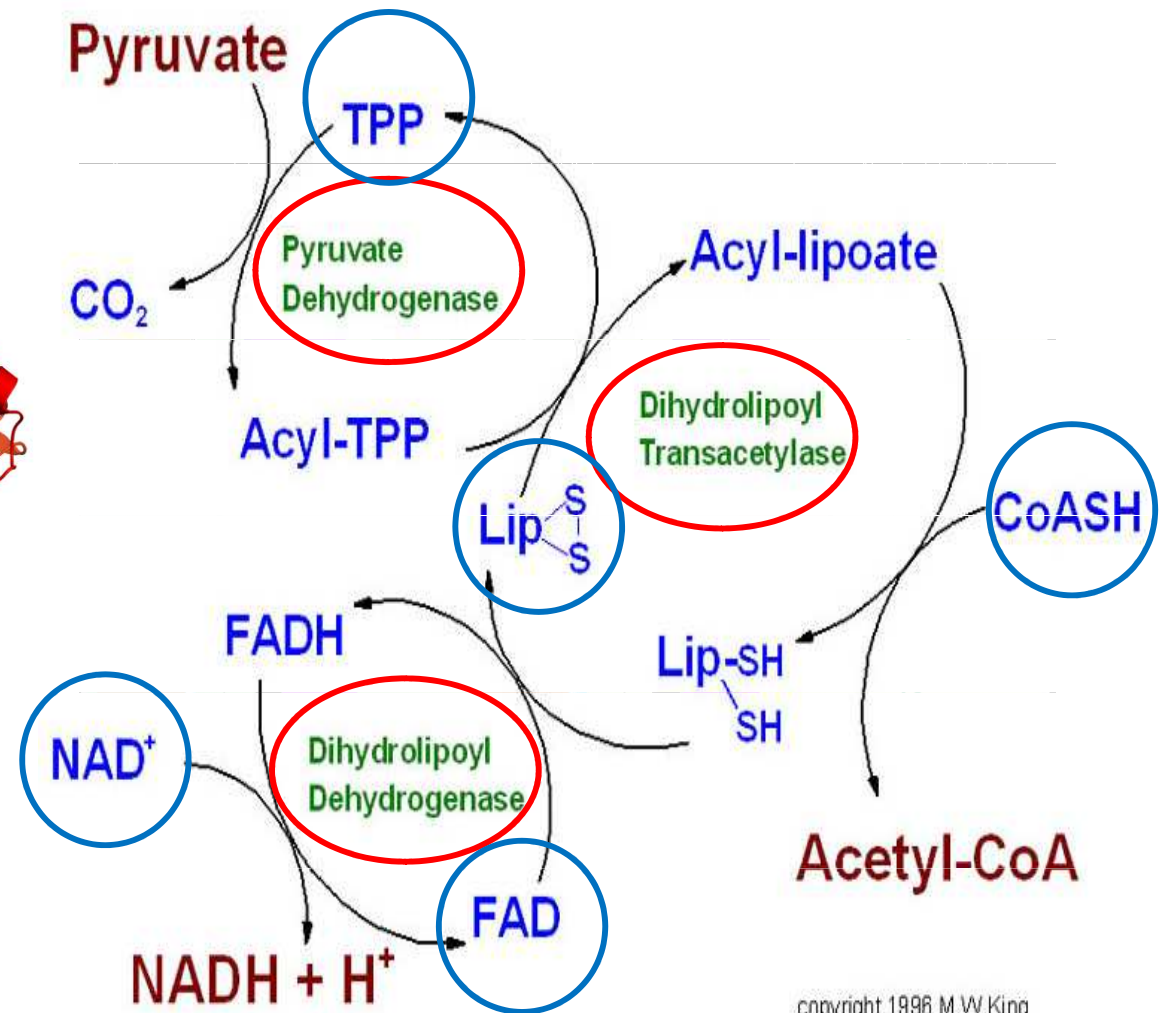
Corriho cyklus



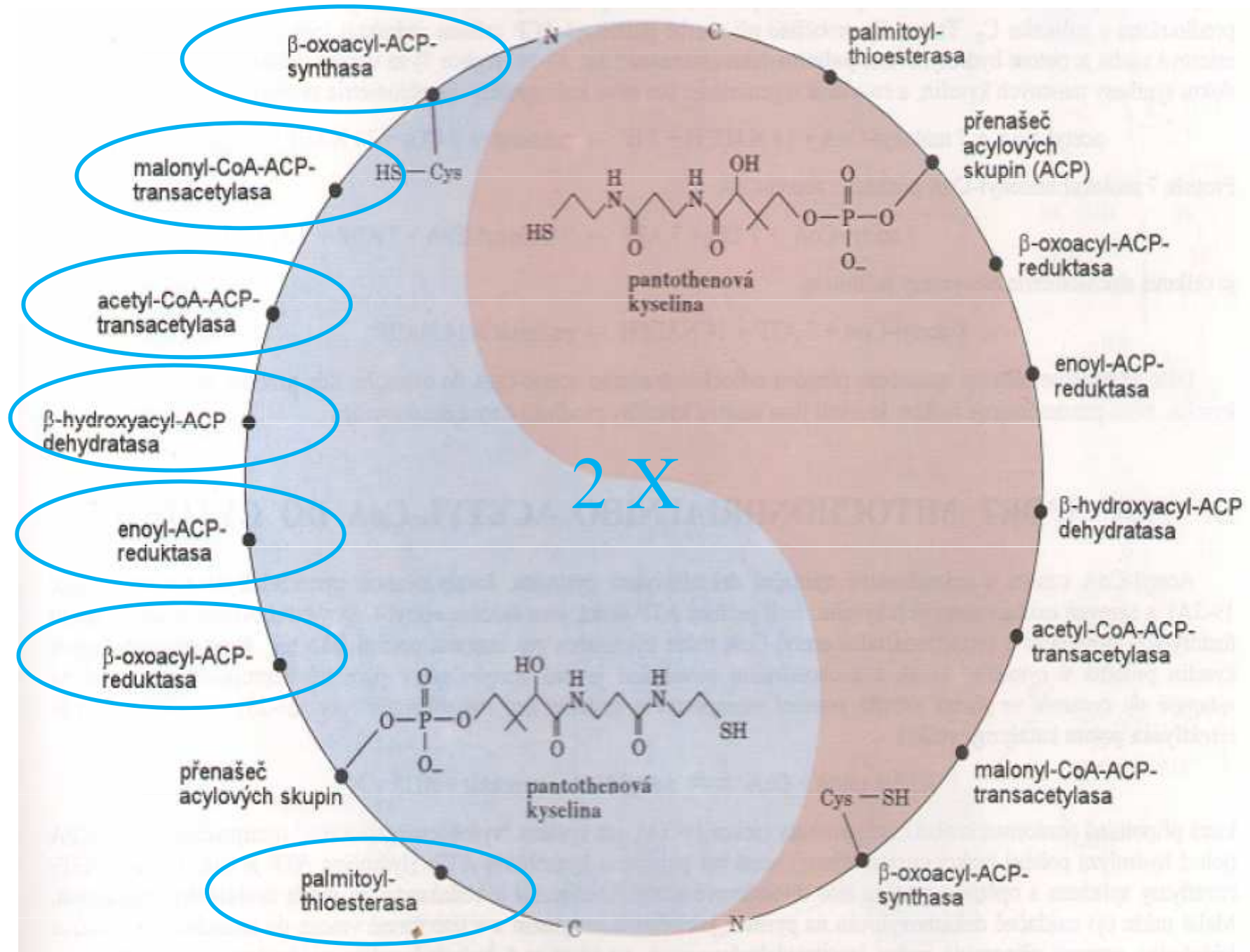
Pyruvátdehydrogenáza



- 3 enzymy
- 5 kofaktorů



Synthasa mastných kyselin



Kvarterní struktura

Podjednotkové složení - nekovalentní spojení - vodíkové můstky

- kovalentní spojení - bisulfidické můstky

Stanovení podjednotkového složení - SDS PAGE

Studium konformace bílkovin

RTG difrakce - studium krystalů - BRAGG 1913

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

Rtg difrakce

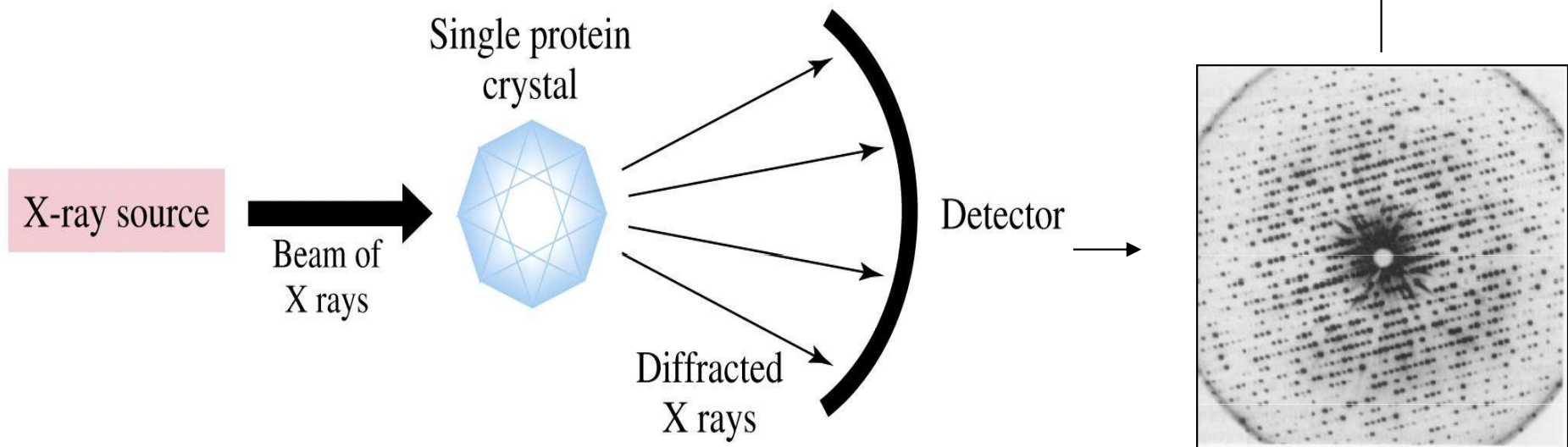
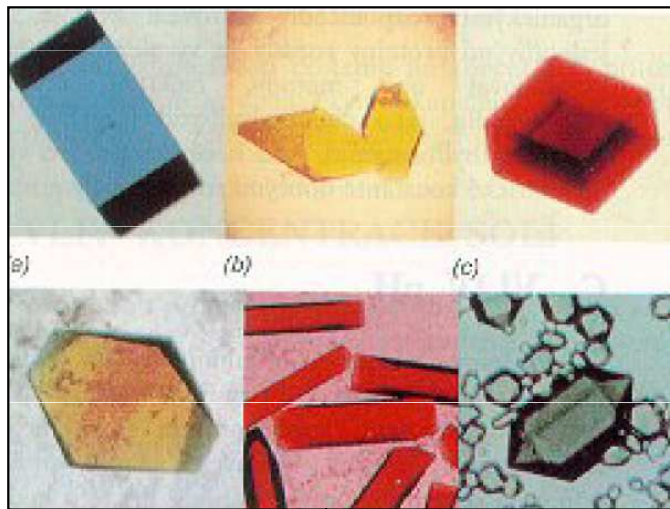
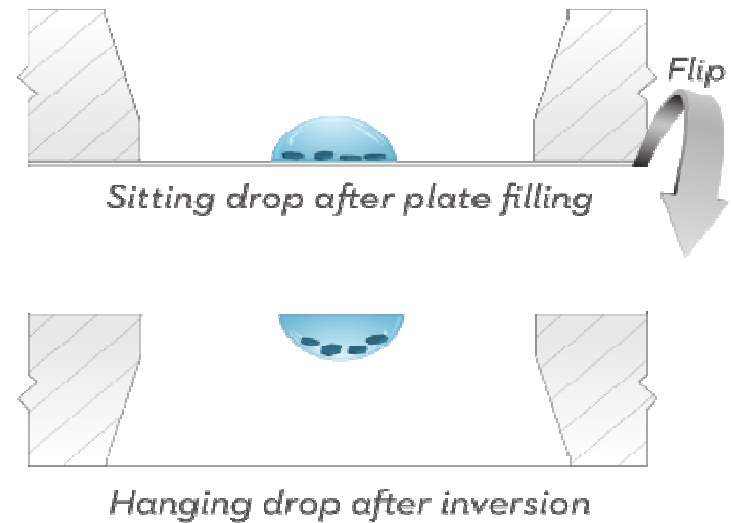
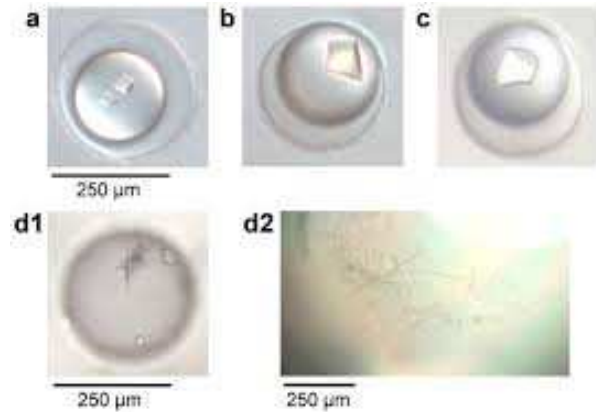
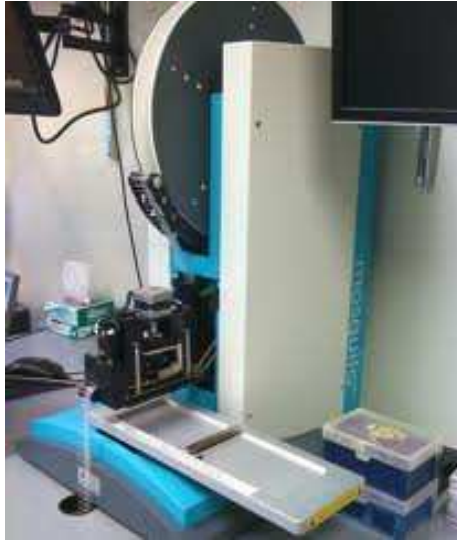
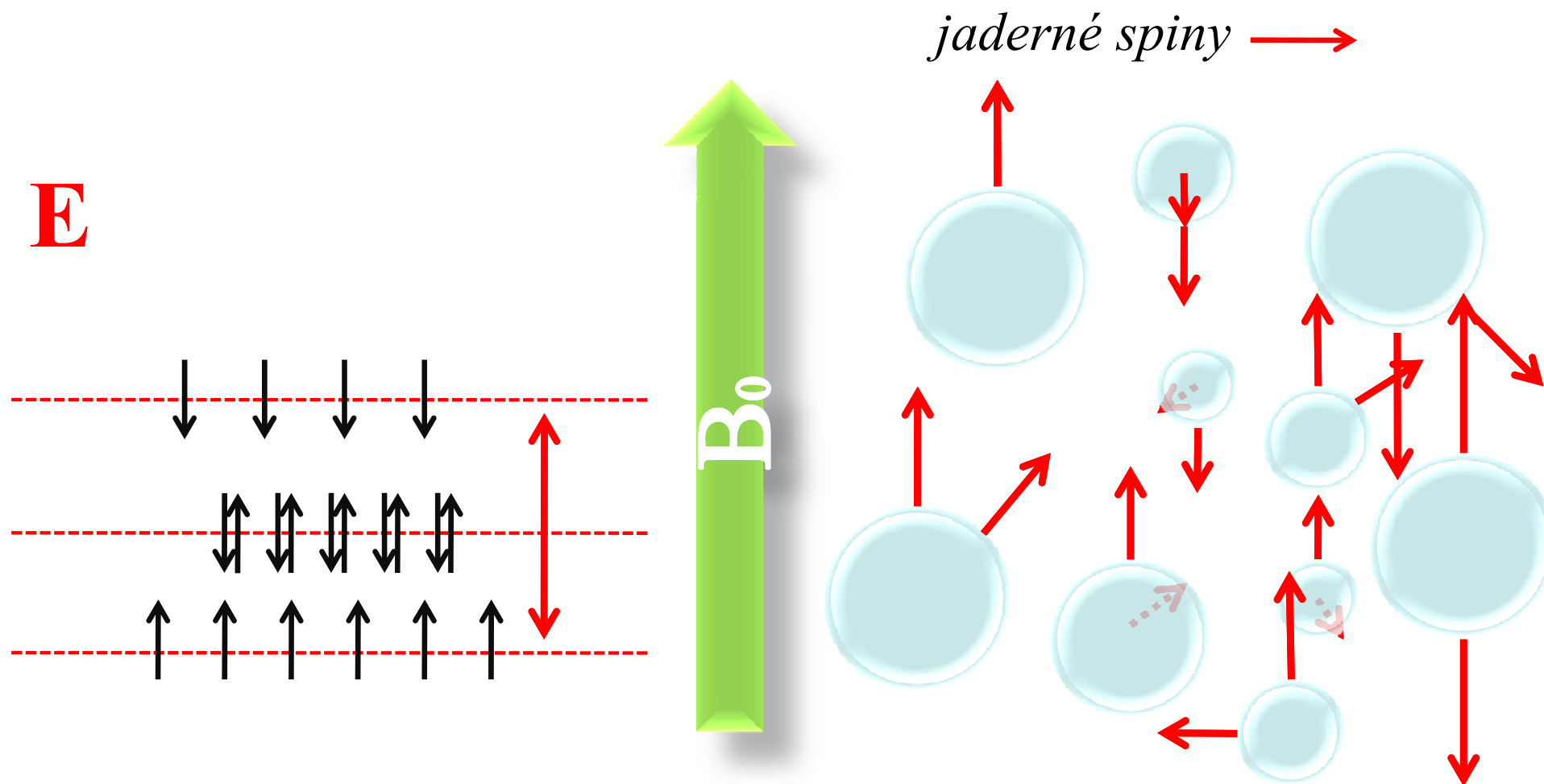


Figure 4-15 Concepts in Biochemistry, 3/e
© 2006 John Wiley & Sons

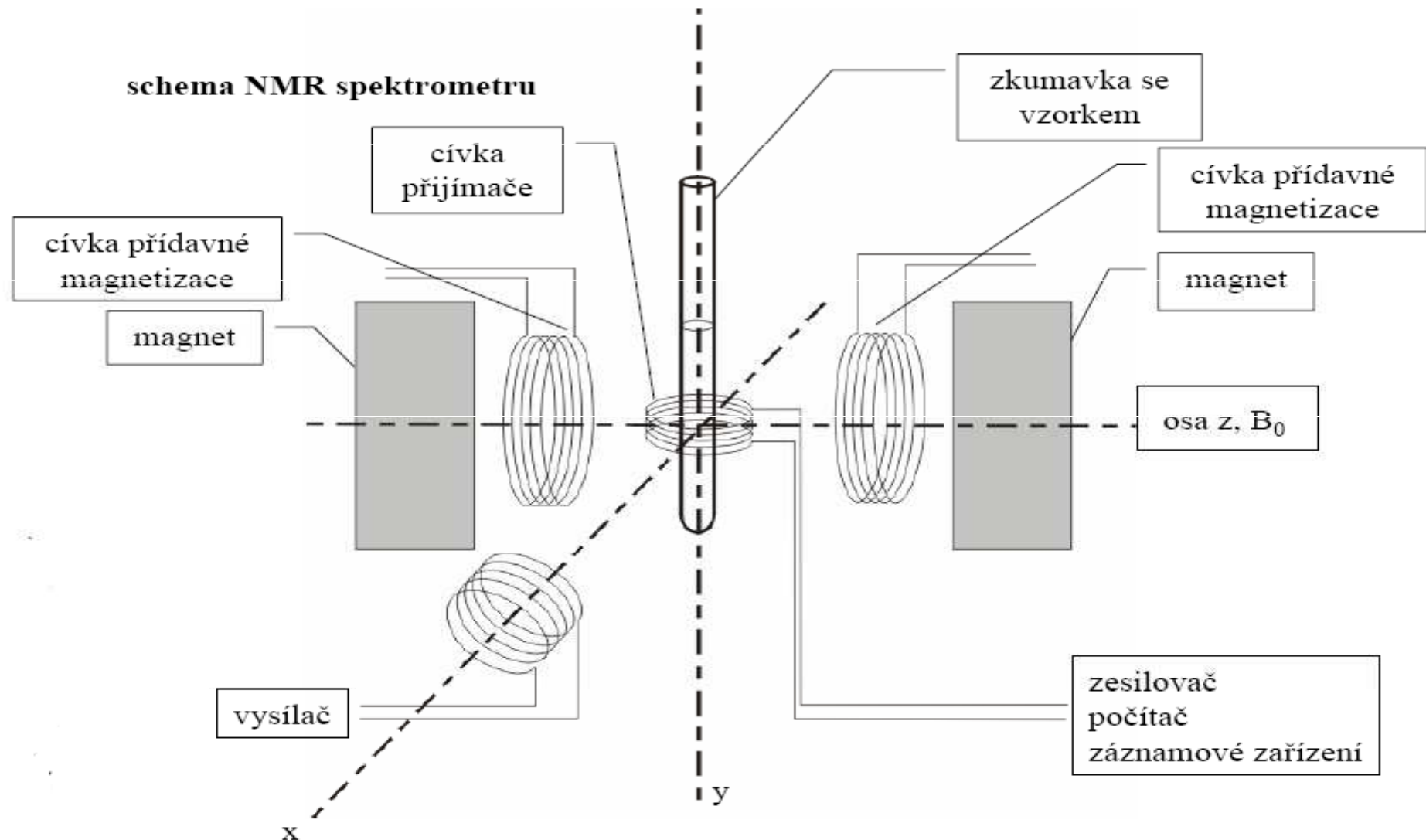
Rtg difrakce



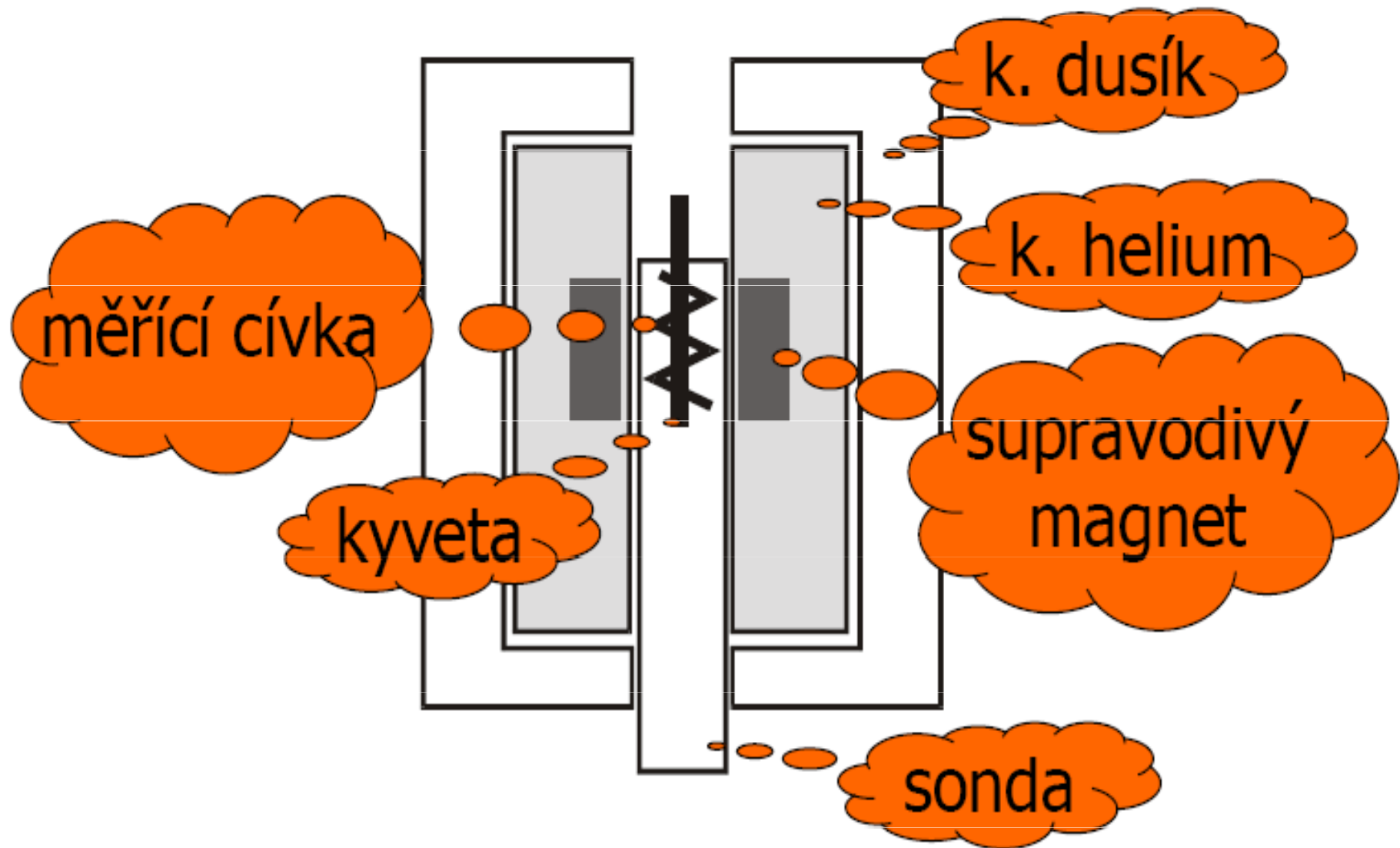
NMR podstata – ^1H , ^{13}C , ^{19}F , ^{23}Na , ^{31}P



NMR



Blokové schéma



NMR

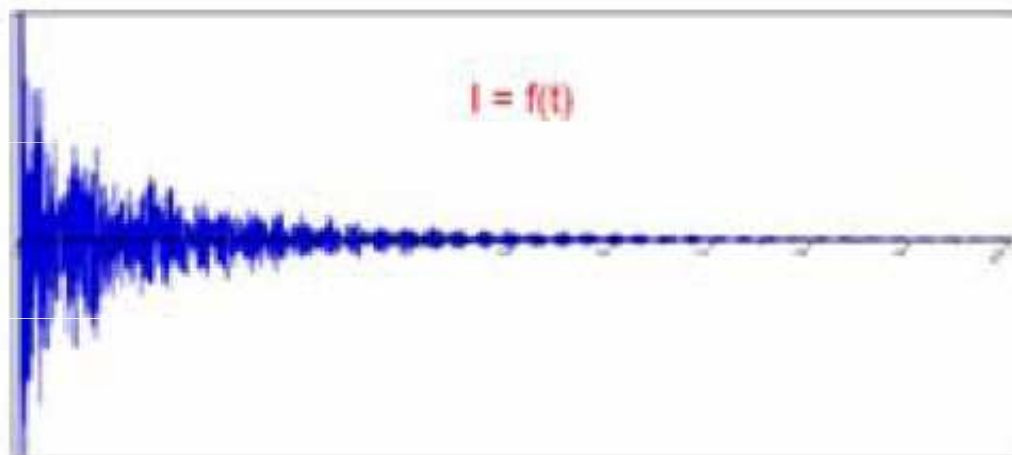
počítač

elektronika

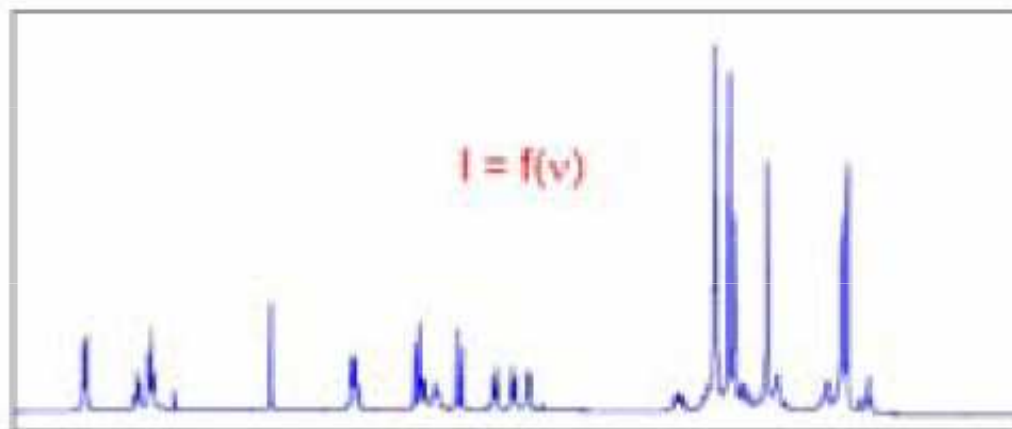
supra-
vodivý
magnet



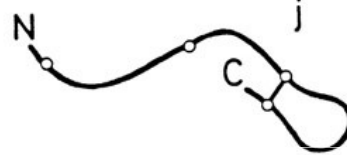
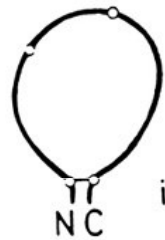
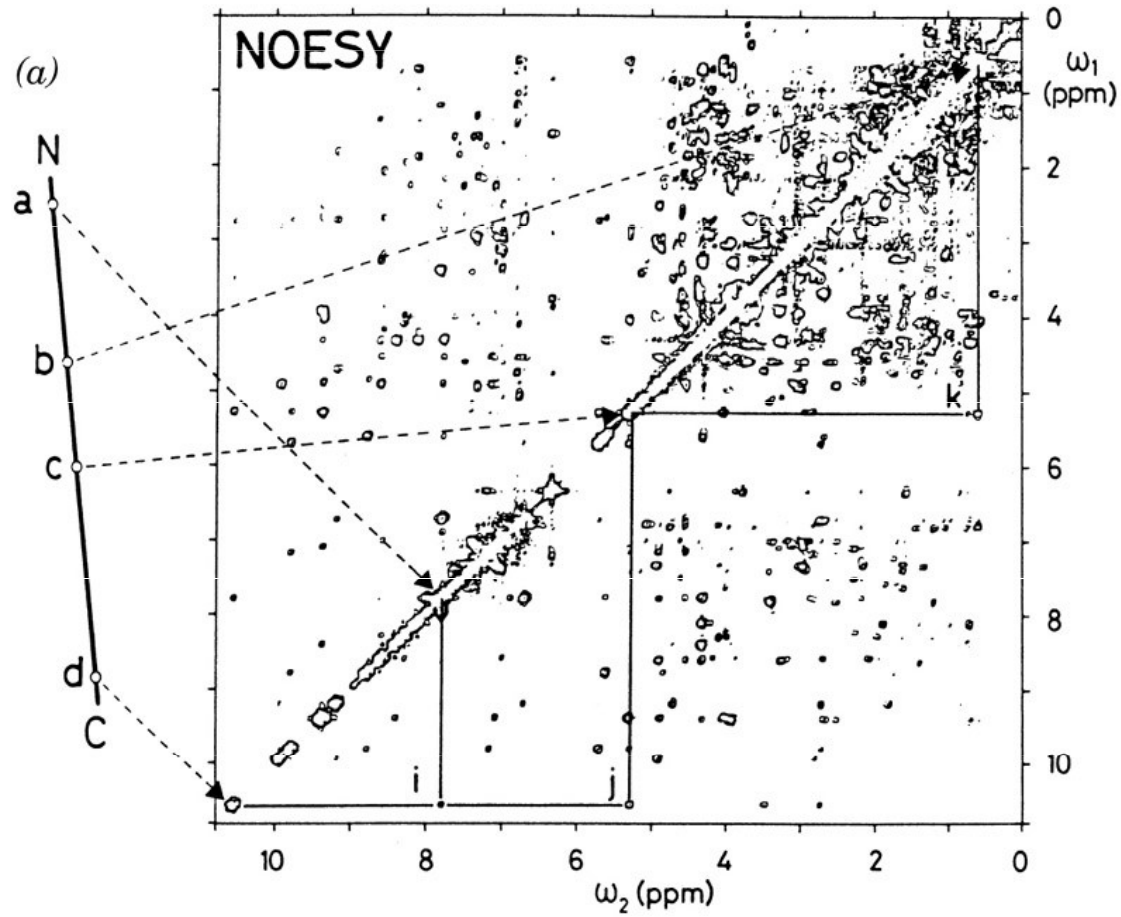
NMR spektrum



Po zpracování Fourierovou transformací dostaneme:

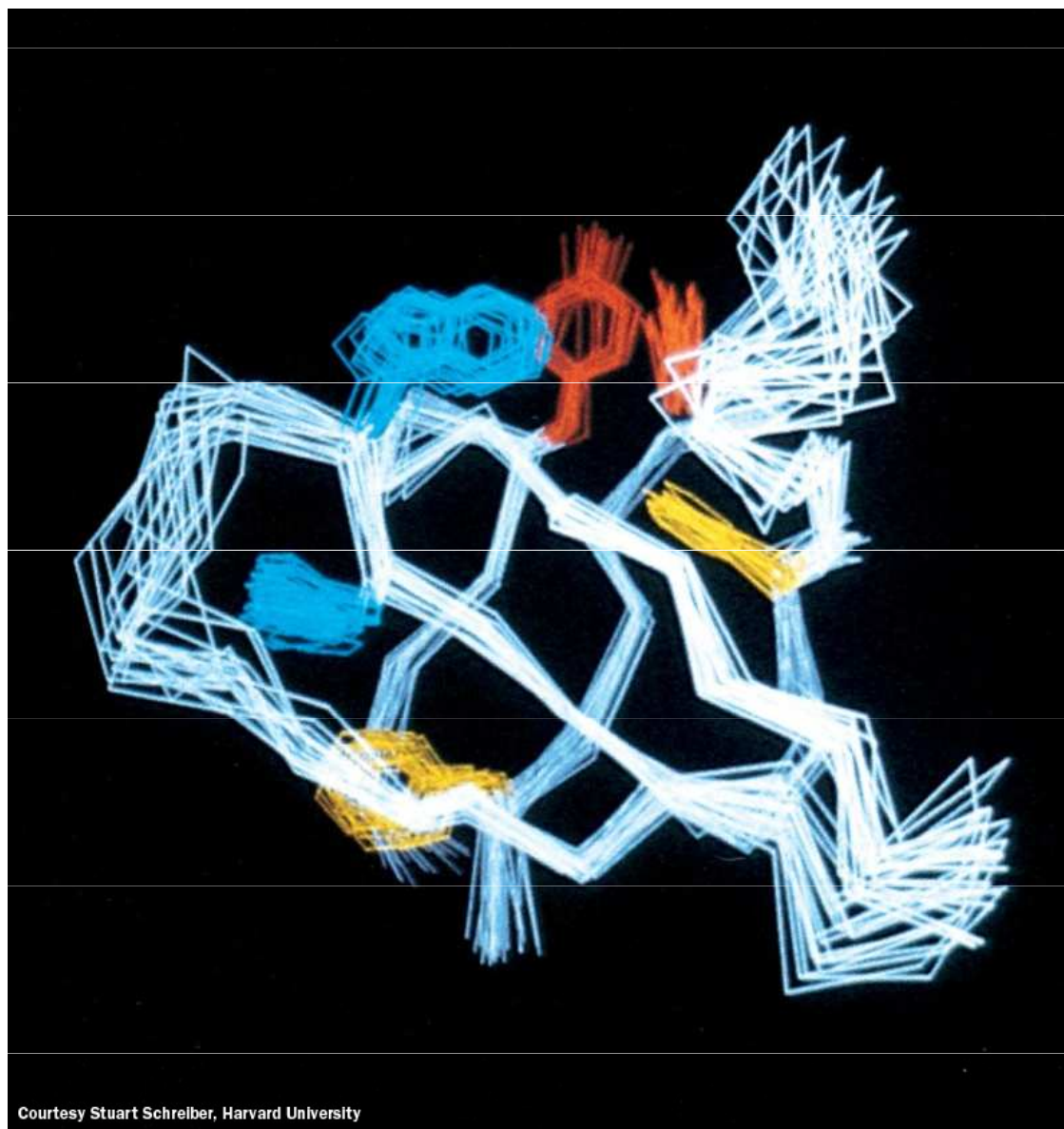


NMR spektrum



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

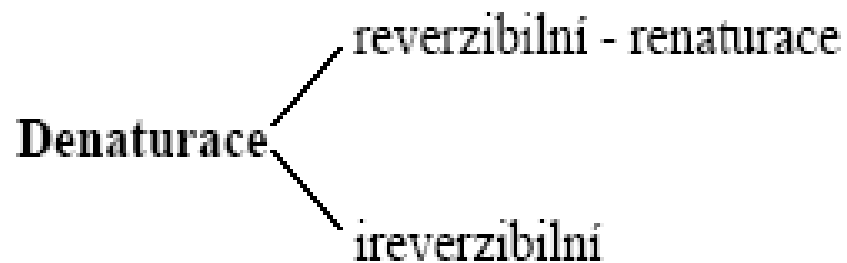
NMR



Courtesy Stuart Schreier, Harvard University

Stabilita konformace

Denaturace - fyzikální faktory - T, záření, tlak,
- chemické faktory - pH, organická rozpouštědla,
detergenty, těžké kovy, močovina,

Denaturace 

```
graph LR; A[Denaturace] --- B[reverzibilní - renaturace]; A --- C[ireverzibilní]
```

Denaturace - renaturace

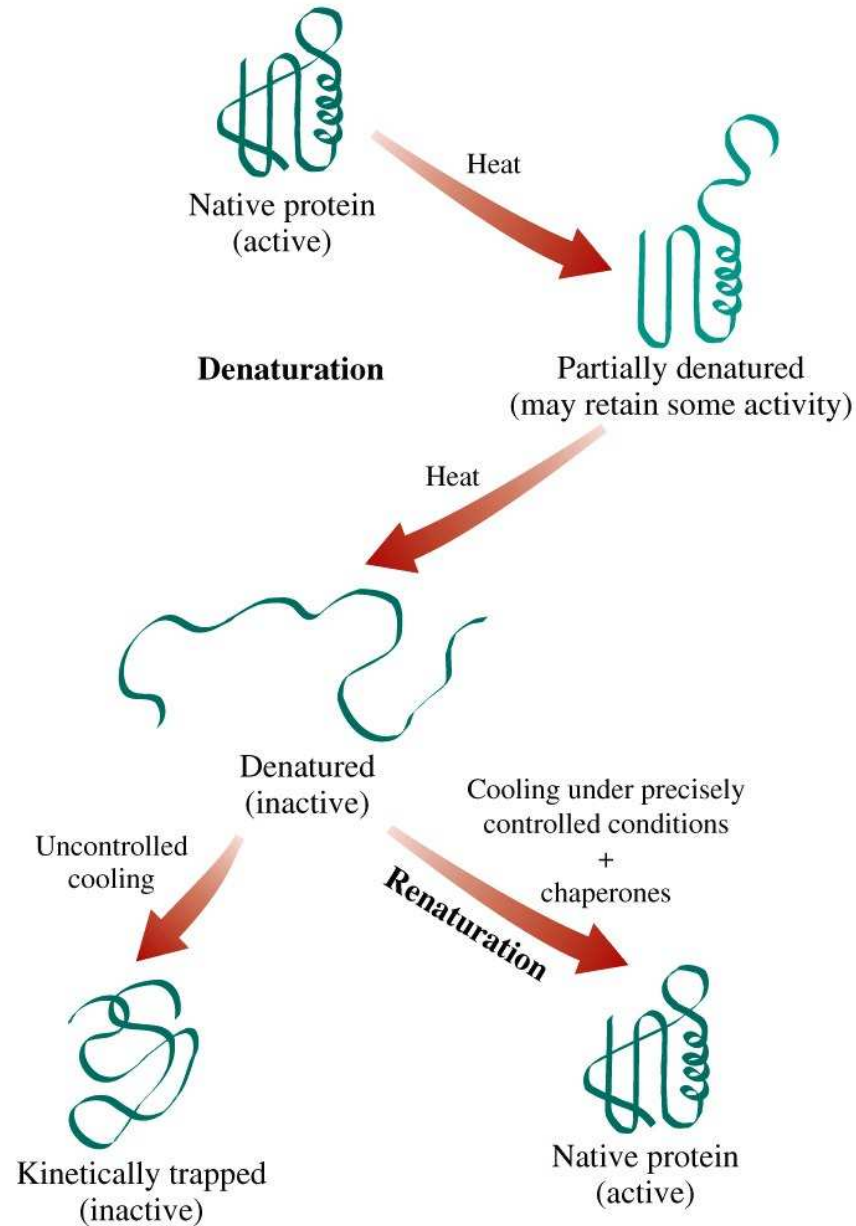
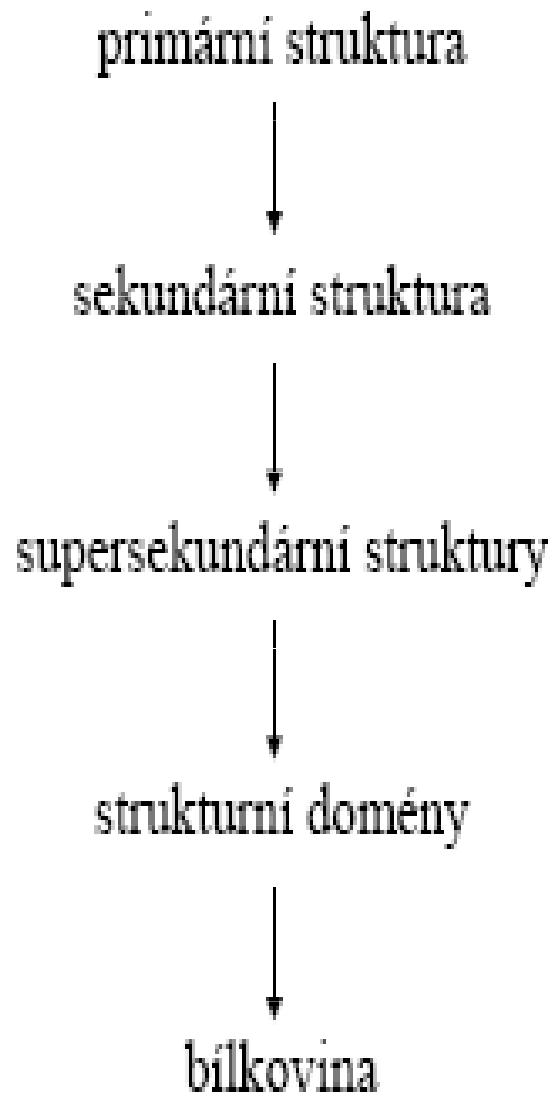


Figure 4-14 Concepts in Biochemistry, 3/e
© 2006 John Wiley & Sons

Vznik prostorové struktury - skládání, svinutí - „FOLDING“



Skládání – folding bílkovin

- Bílkoviny se za fyziologických podmínek skládají do svých nativních konformací spontánně – informace musí být v primární struktuře

Levinthal Paradox

(Cyrus Levinthal)

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

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

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

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

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

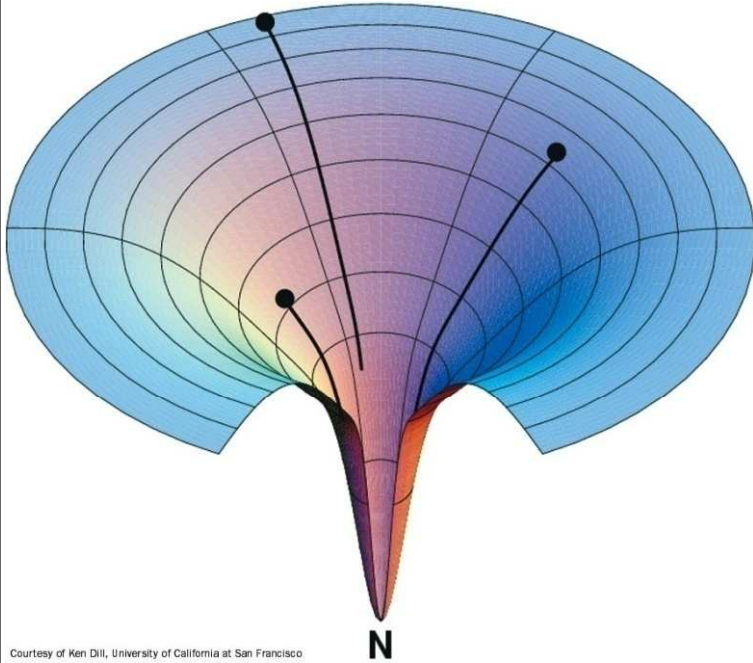
Skládání – folding bílkovin

- Bílkoviny se za fyziologických podmínek skládají do svých nativních konformací spontánně – informace musí být v primární struktuře
- Nativní konformace odpovídá minimu Gibsovy energie

Ideální

Landscape theory

Hledání

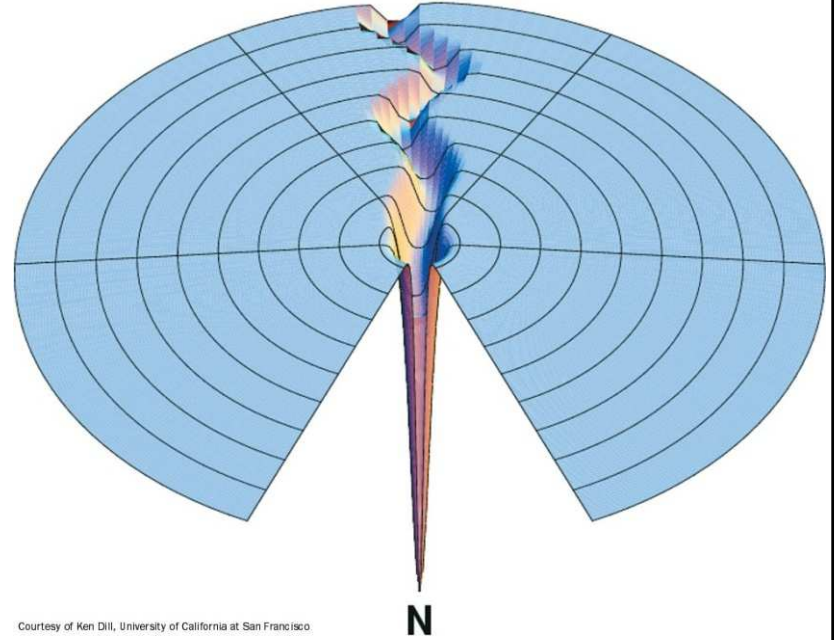


Courtesy of Ken Dill, University of California at San Francisco

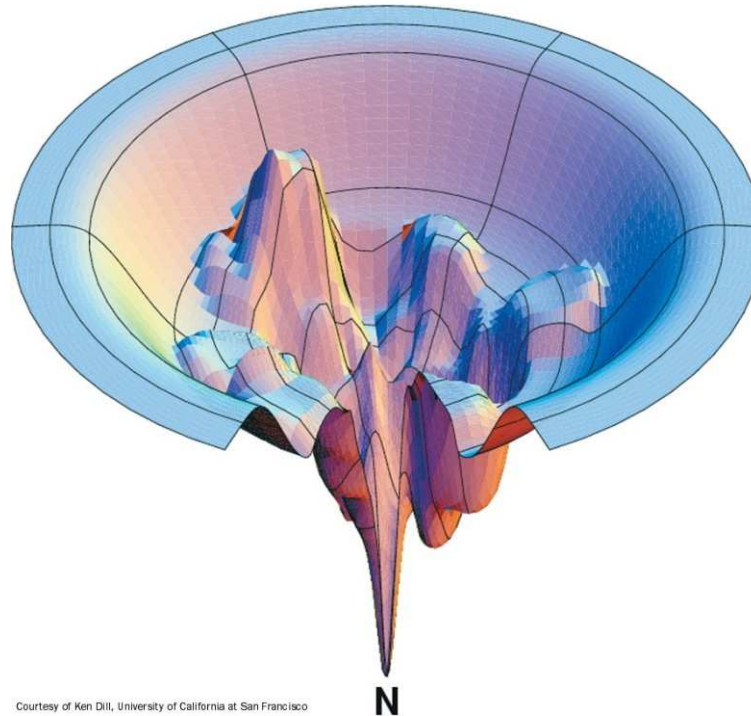


Peter Wolynes

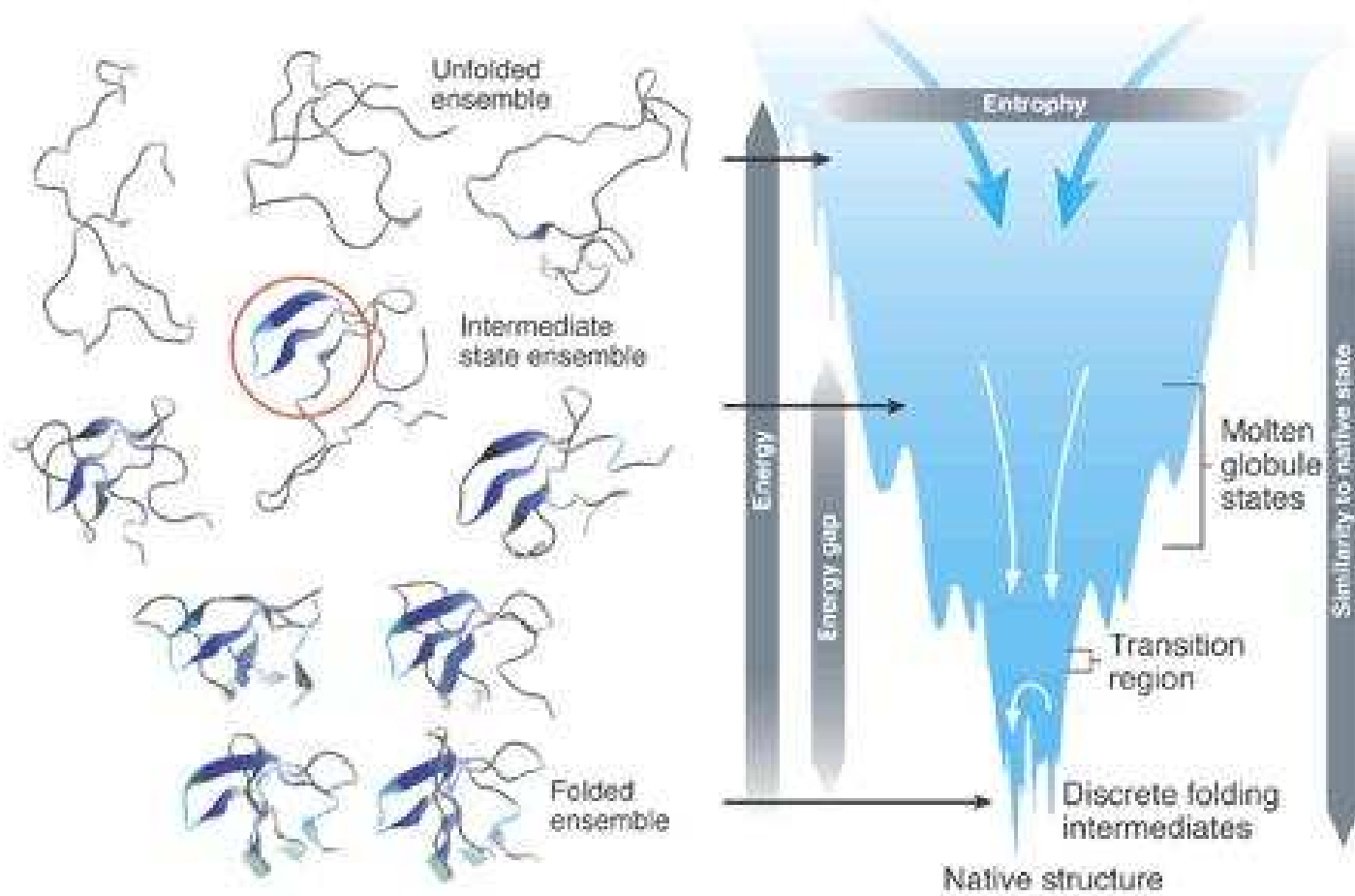
Přes intermediáty

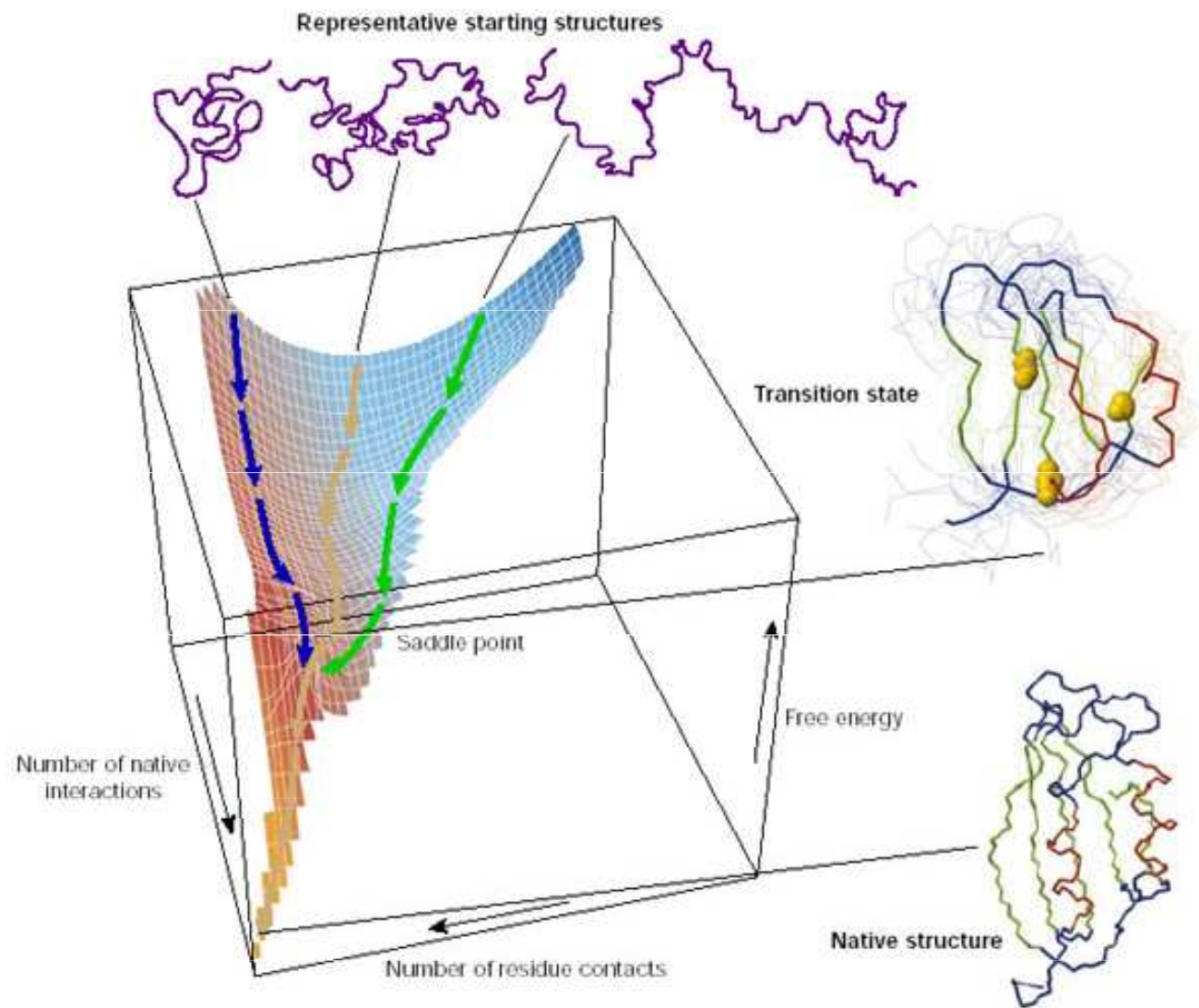
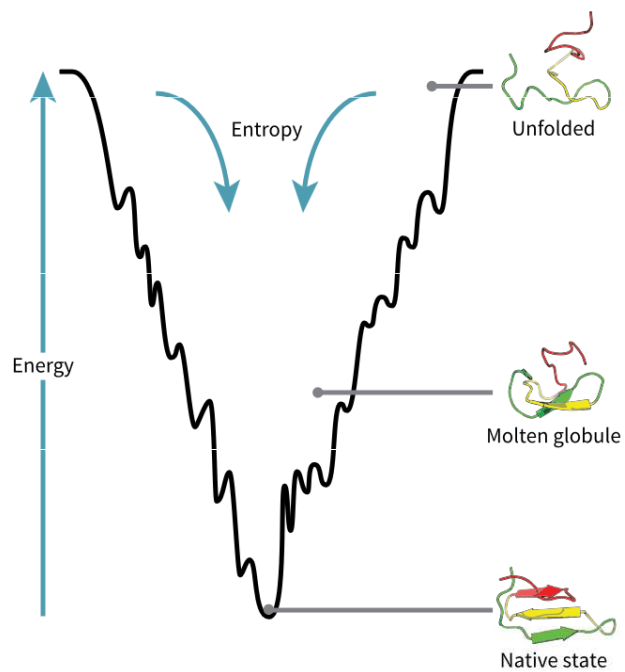


Courtesy of Ken Dill, University of California at San Francisco



Courtesy of Ken Dill, University of California at San Francisco

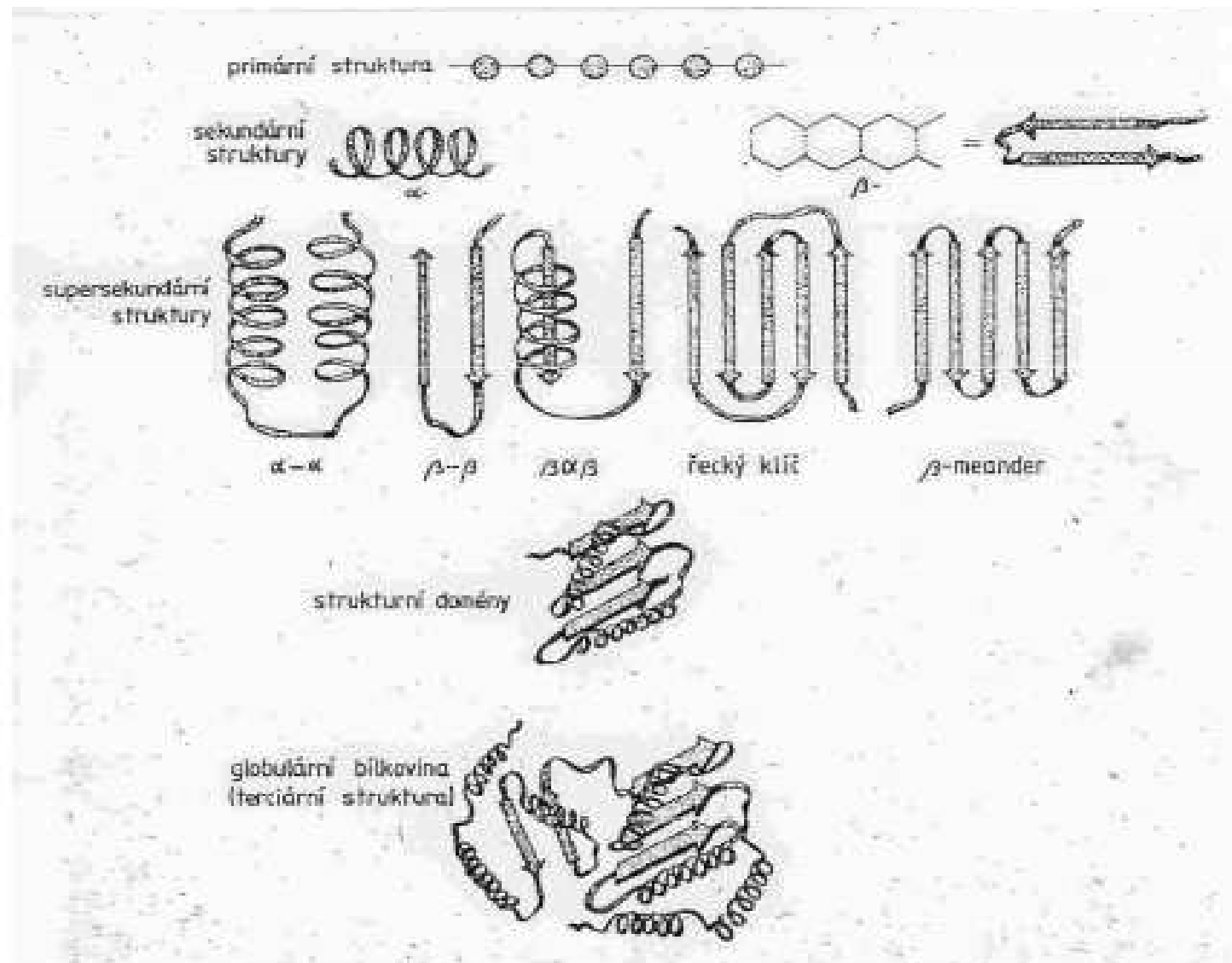


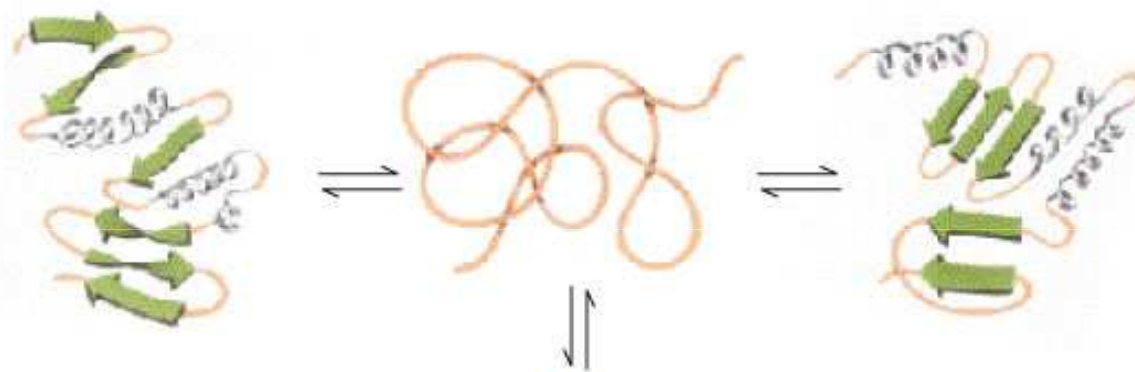


Skládání – folding bílkovin

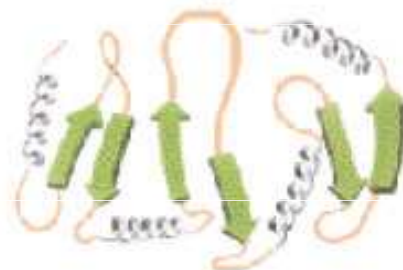
- Neprobíhá náhodným způsobem
- Probíhá postupně:
 - a. malé dočasné periodické struktury
 - b. supersekundární struktury
 - c. strukturní domény a "roztavená" globule
 - d. závěrečné úpravy za účasti enzymů

POSTUP SKLÁDÁNÍ BÍLKOVIN

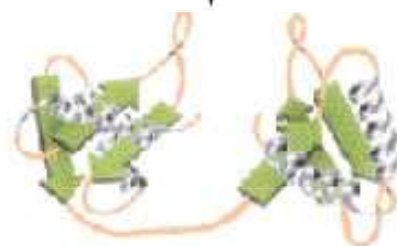




(1) The rapid and reversible formation of local secondary structures



(2) Formation of domains through the cooperative aggregation of folding nuclei



(3) "Molten globule" formation of the assembled domains

(4) An adjustment in the conformation of the domains



(5) Final protein monomer

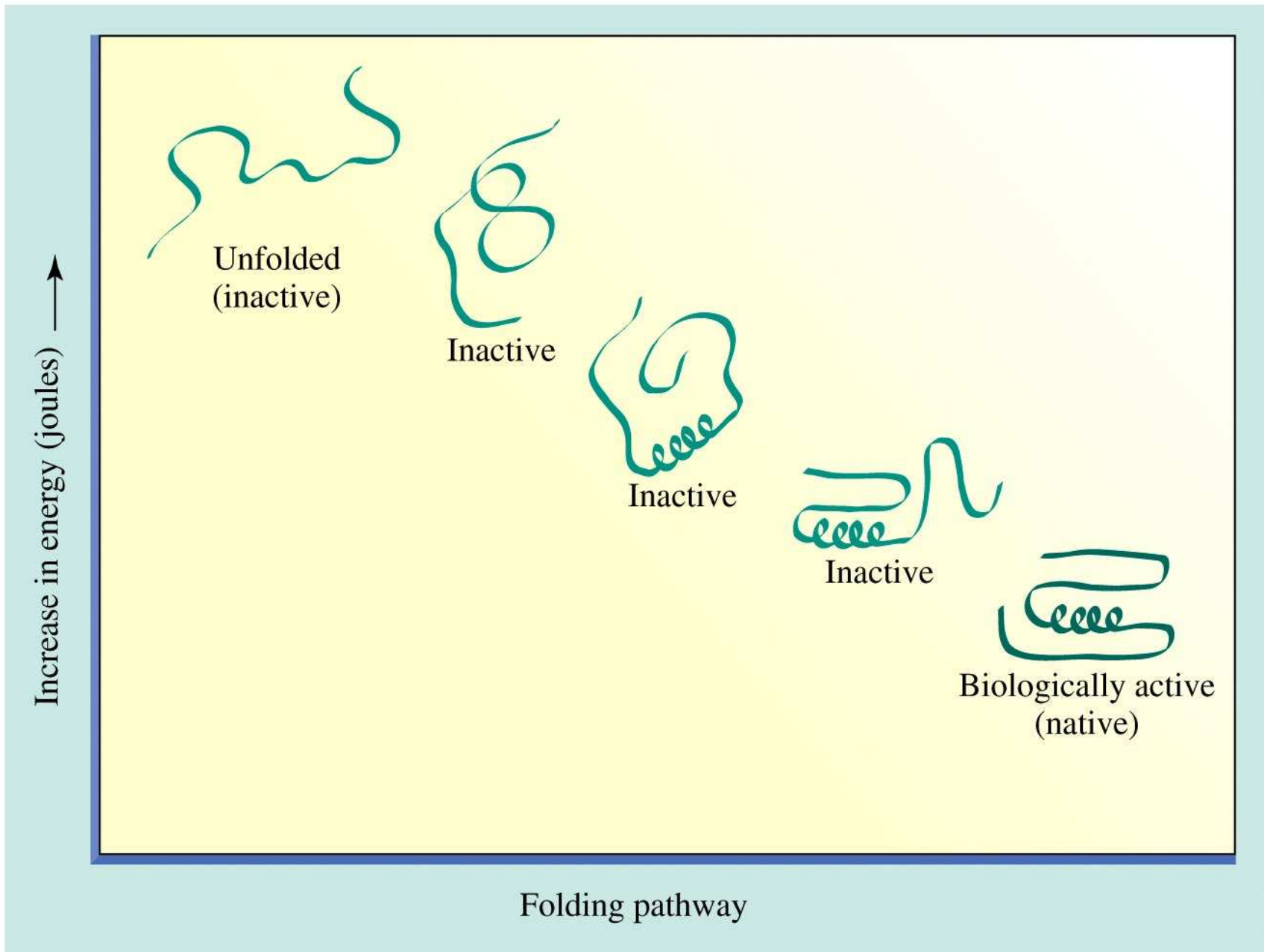


Figure 4-13 Concepts in Biochemistry, 3/e
© 2006 John Wiley & Sons

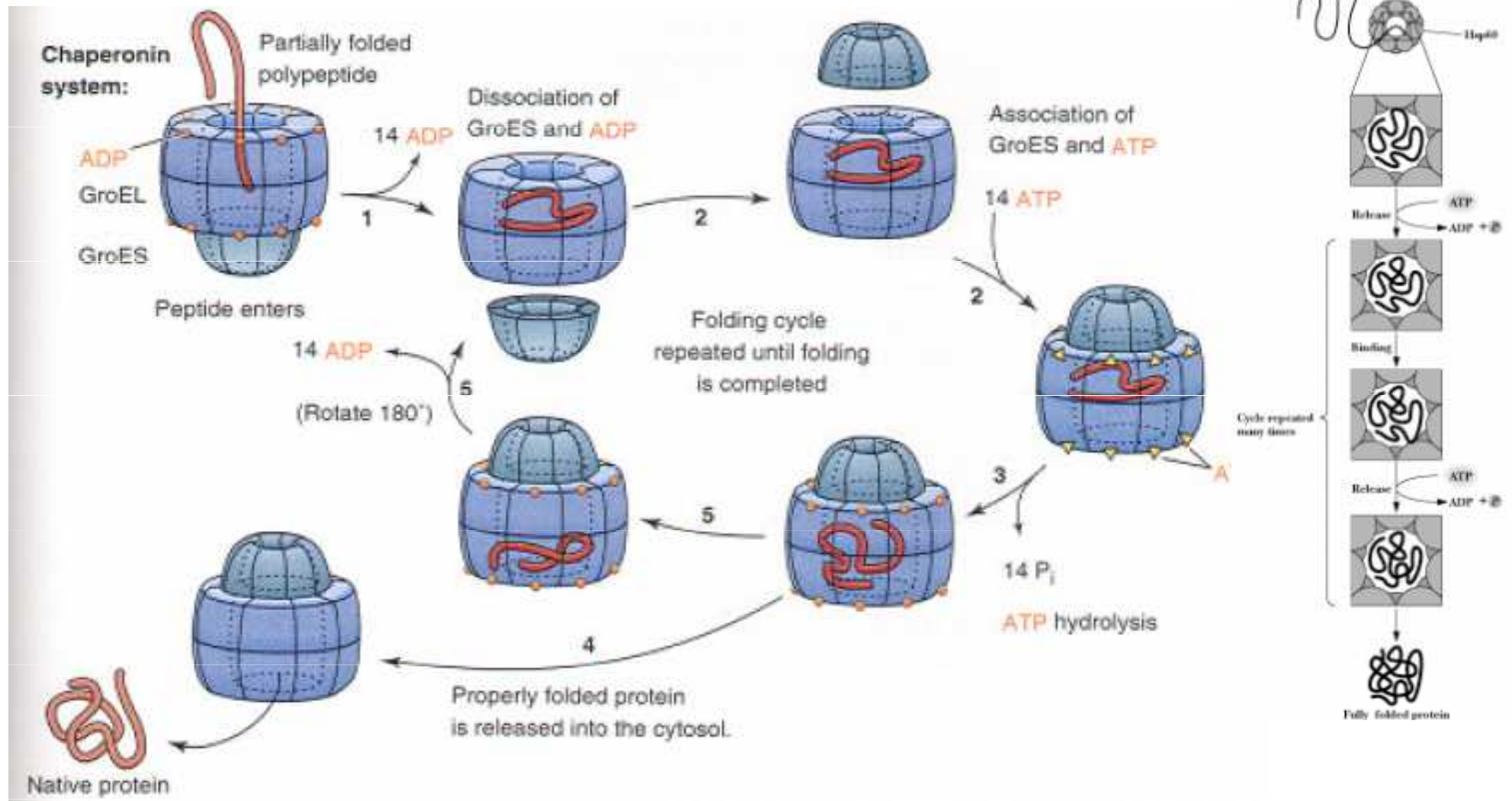
Skládání – folding bílkovin

- 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?

Chaperony (Heat shock proteins)

- 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

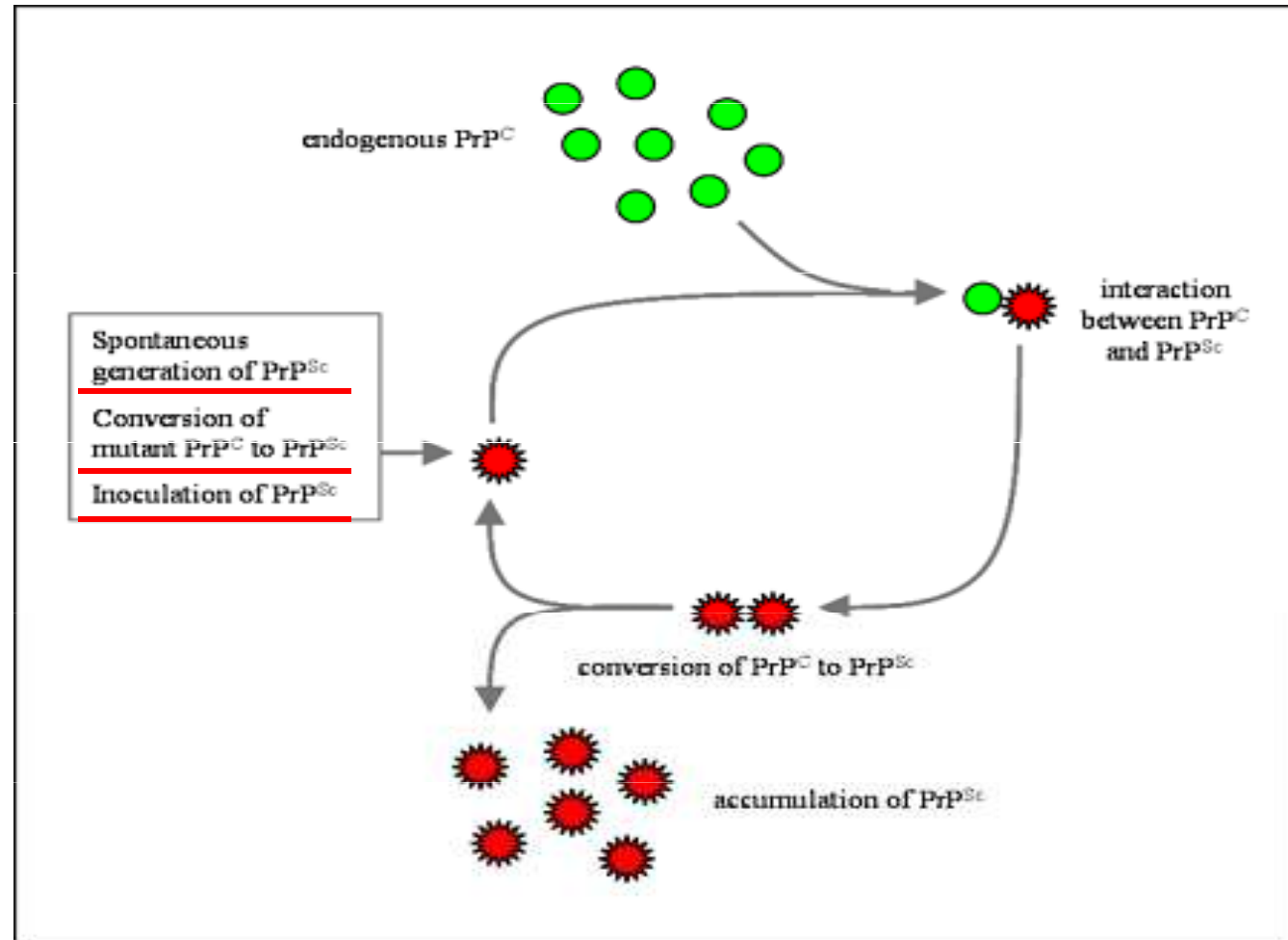
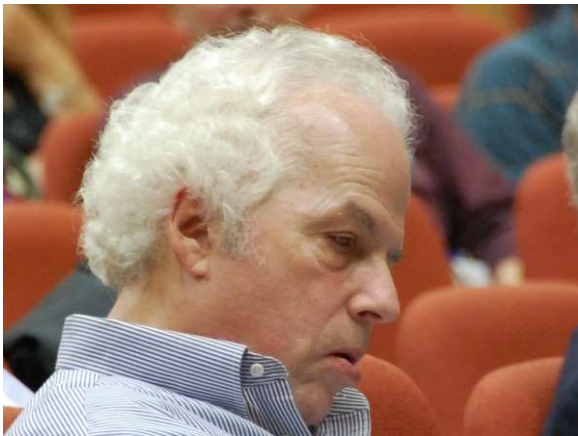


ATPasa

Scrapie - BSE – CJD – Kuru

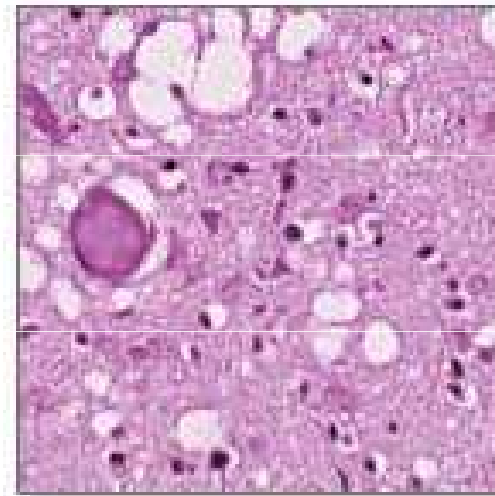
Priony (Proteinaeous infectious particles)

Stanley B. Prusiner
PT 1982 NC 1997



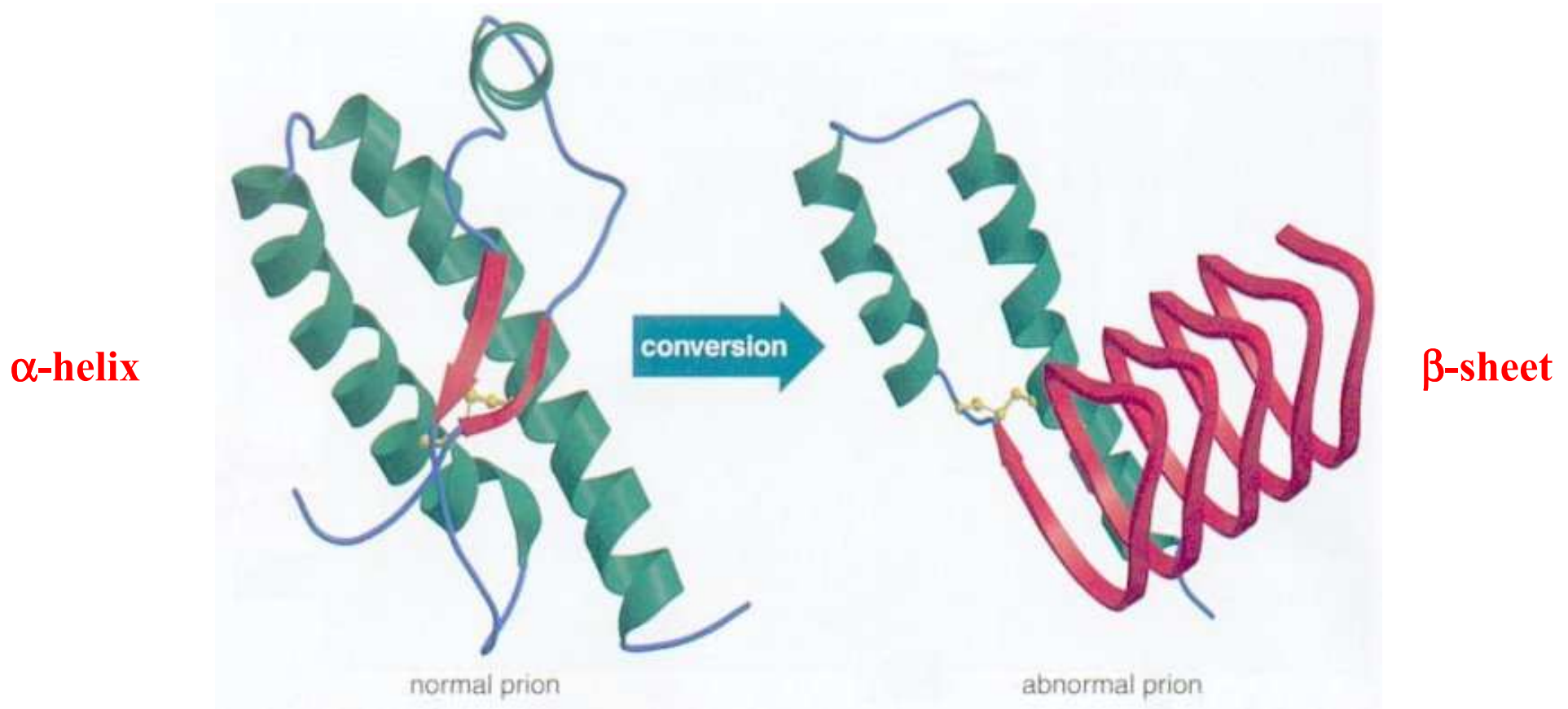
CJD

Brain shrinkage and deterioration occurs rapidly



Brain section showing spongiform pathology characteristic of Creutzfeldt-Jakob

PrP^C - PrP^{Sc}

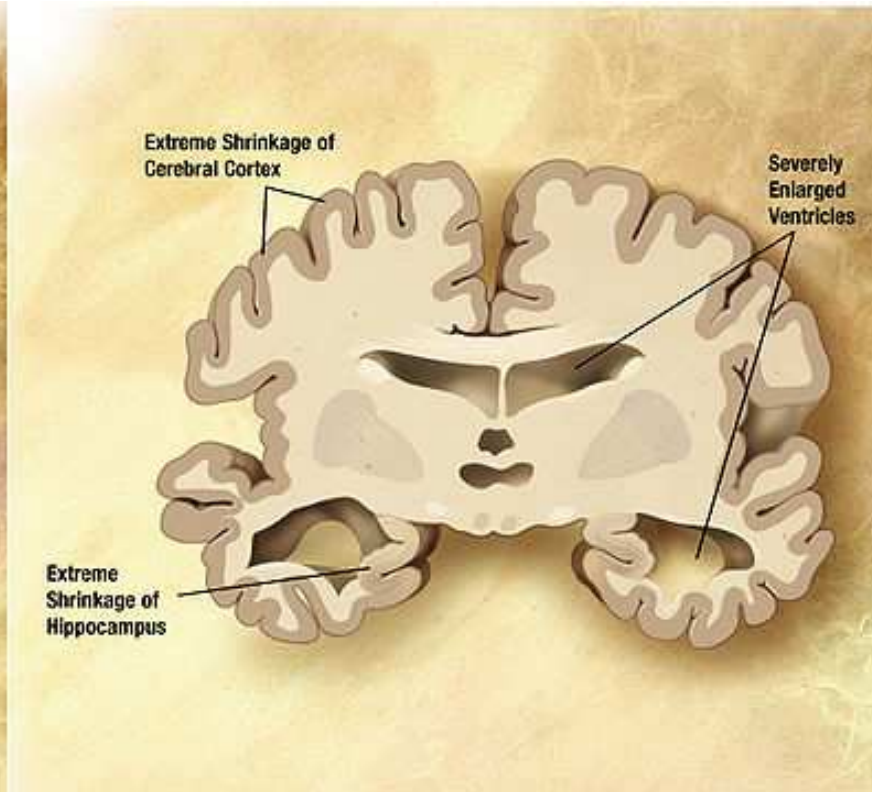
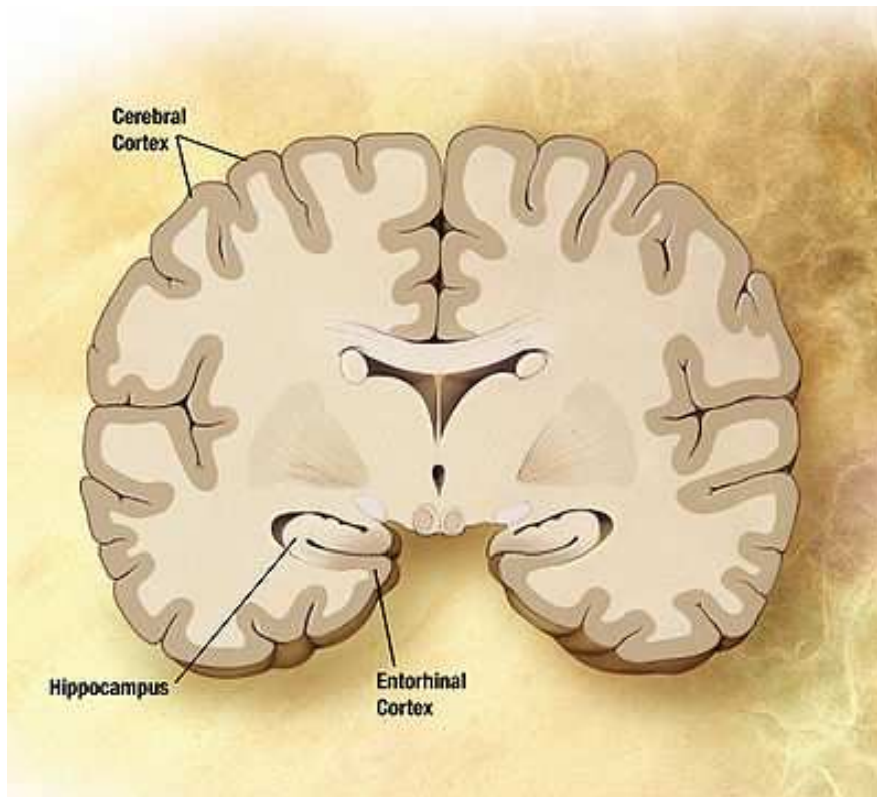


Odolný proteolýze

Dělal se pokus se spálením mozku postižených zvířat při 600 °C,
popel se infikovala asi 1/3 exponovaných zvířat

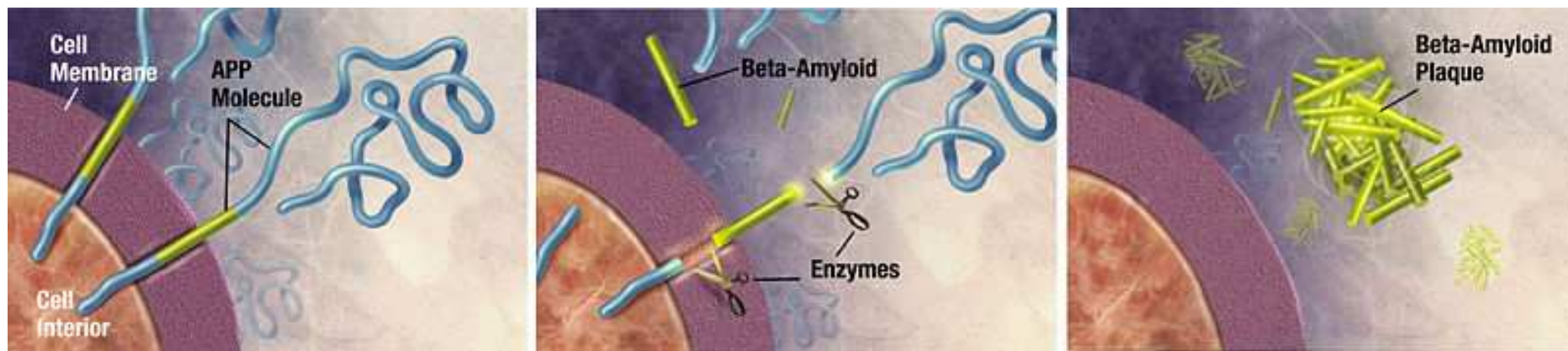
Alzheimer

tvorba β -amyloidu, formace plaku



Alzheimer

tvorba β -amyloidu, formace plaku

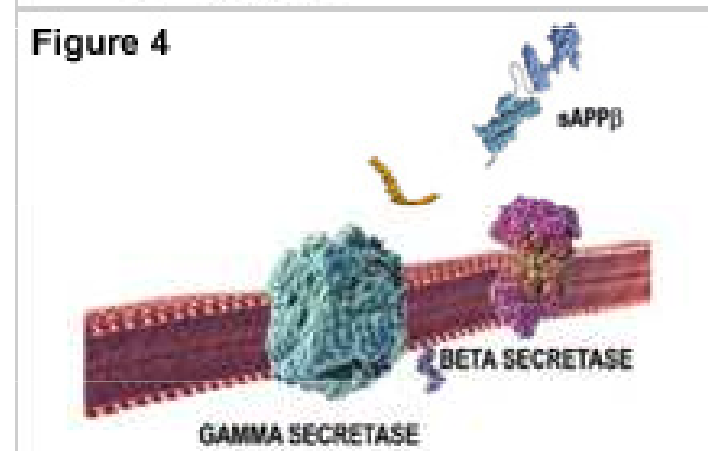
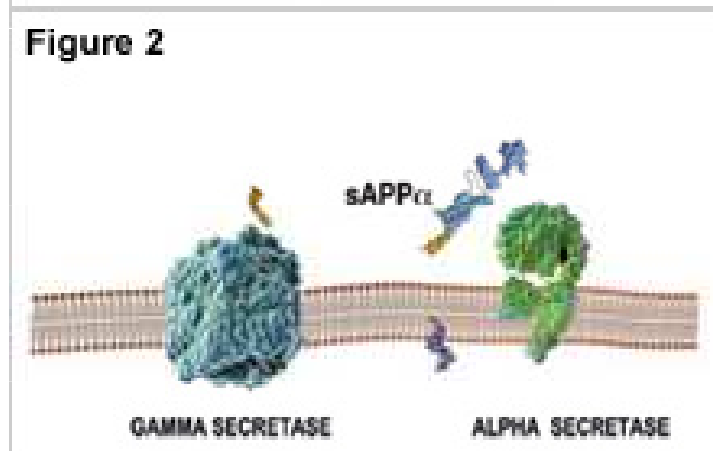
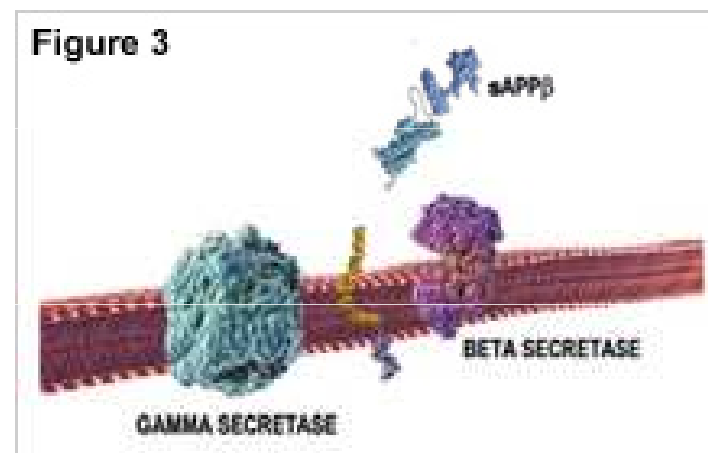
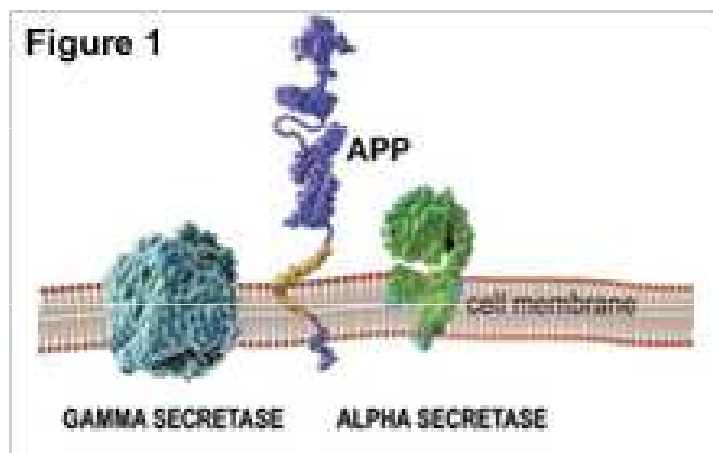


Alzheimer

tvorba β -amyloidu, formace plaku

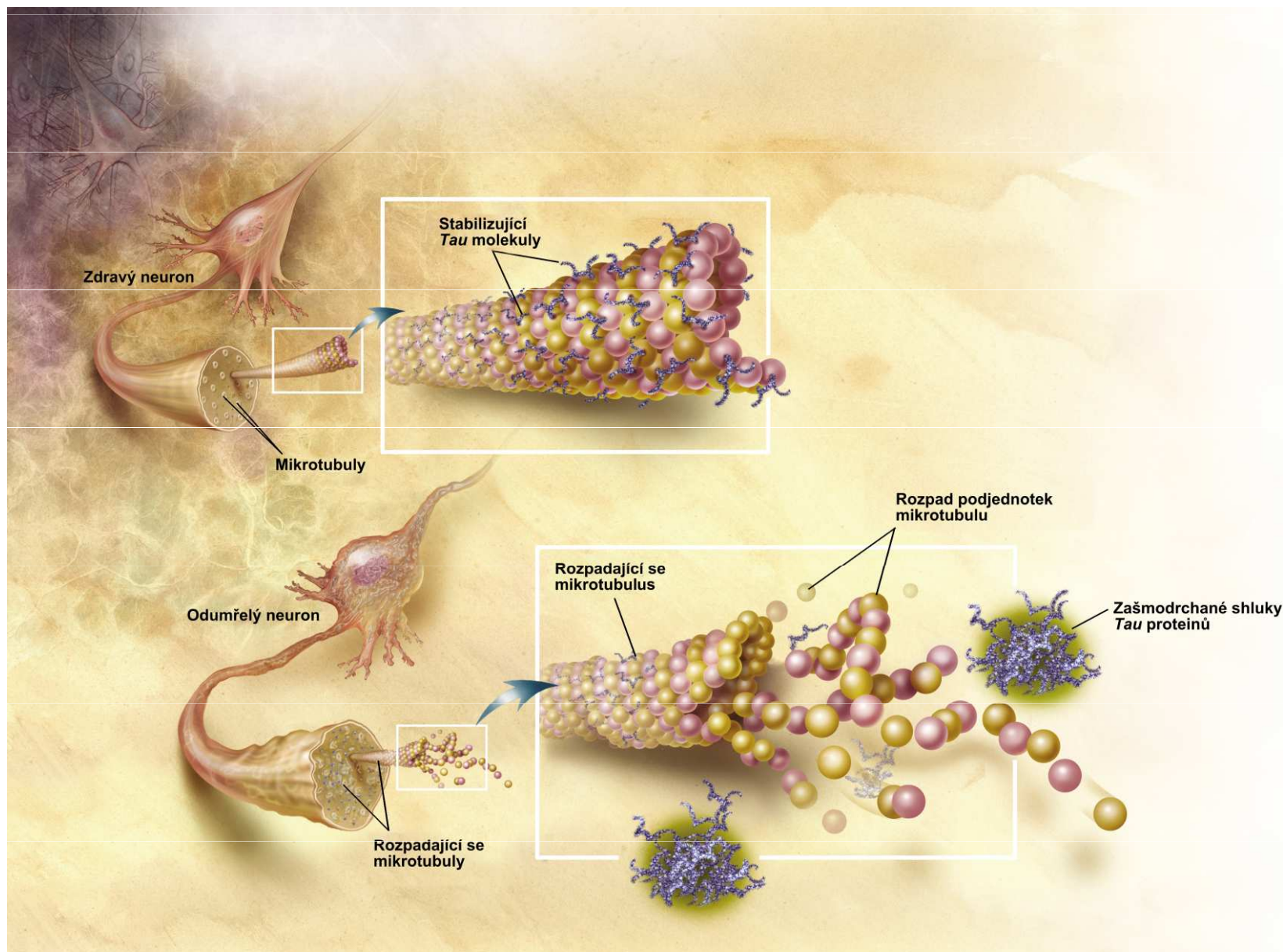
Normální

Patologický



Alzheimer

zánik acetylcholinergních neuronů, Tau proteiny



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

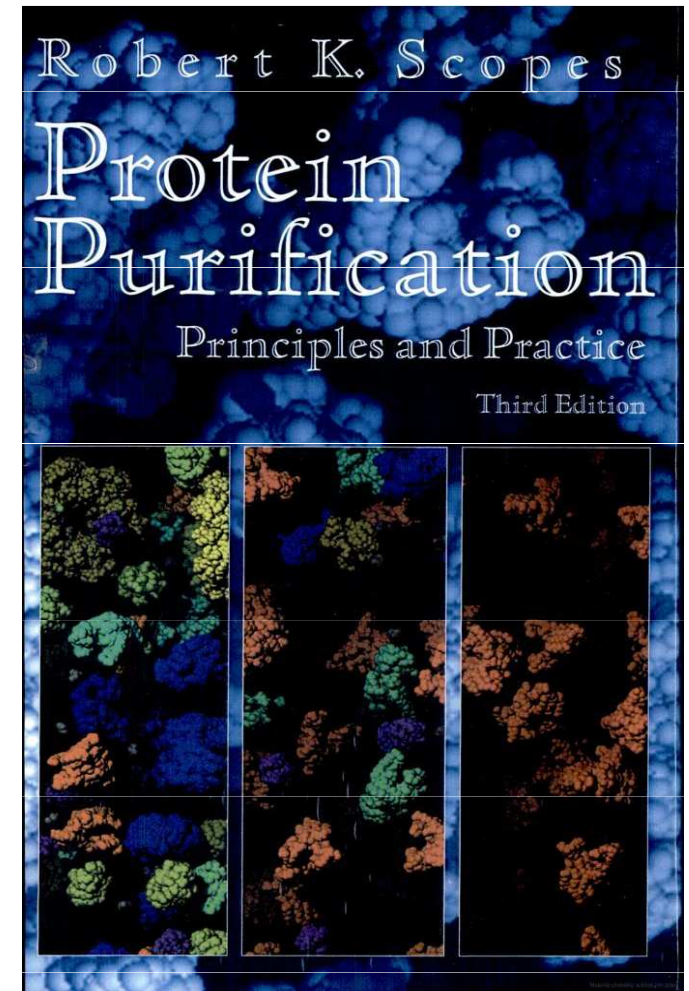
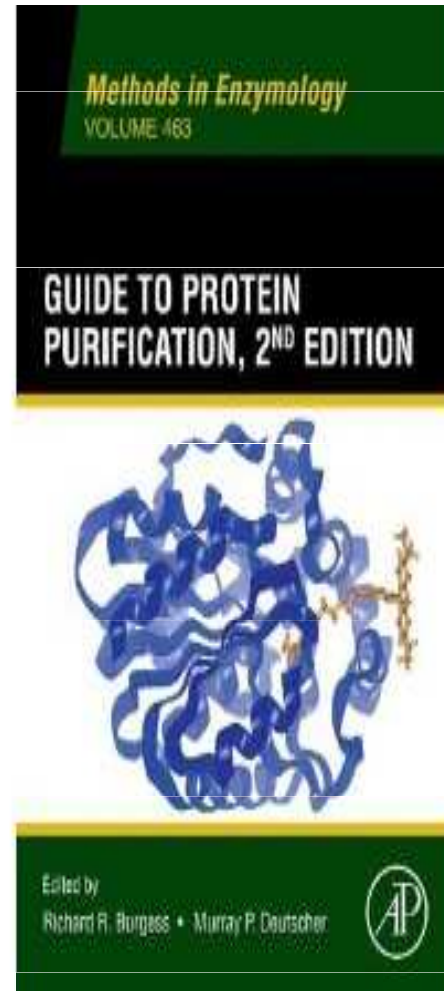
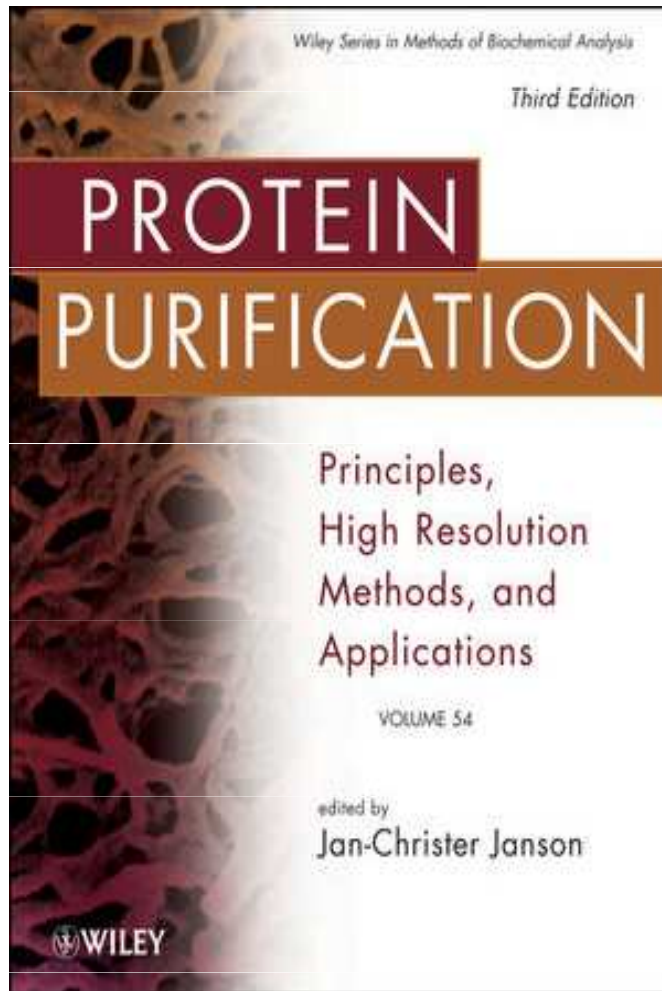
- izoelektrická fokusace

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

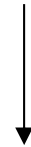
Problémy se vzorkem

- Komplexnost
- Malá množství
- Labilita

Plánování separace bílkovin

Cíl izolace

- Získání homogenní bílkoviny
- Zachování biologické aktivity
- Čistota



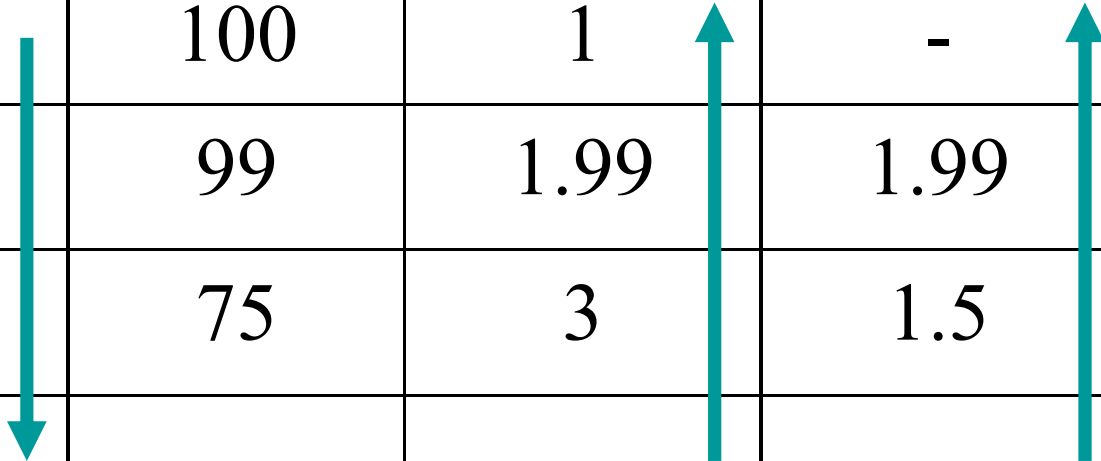
Závěr : získat vzorek o patřičné
čistotě s vynaložením
patřičného úsilí

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

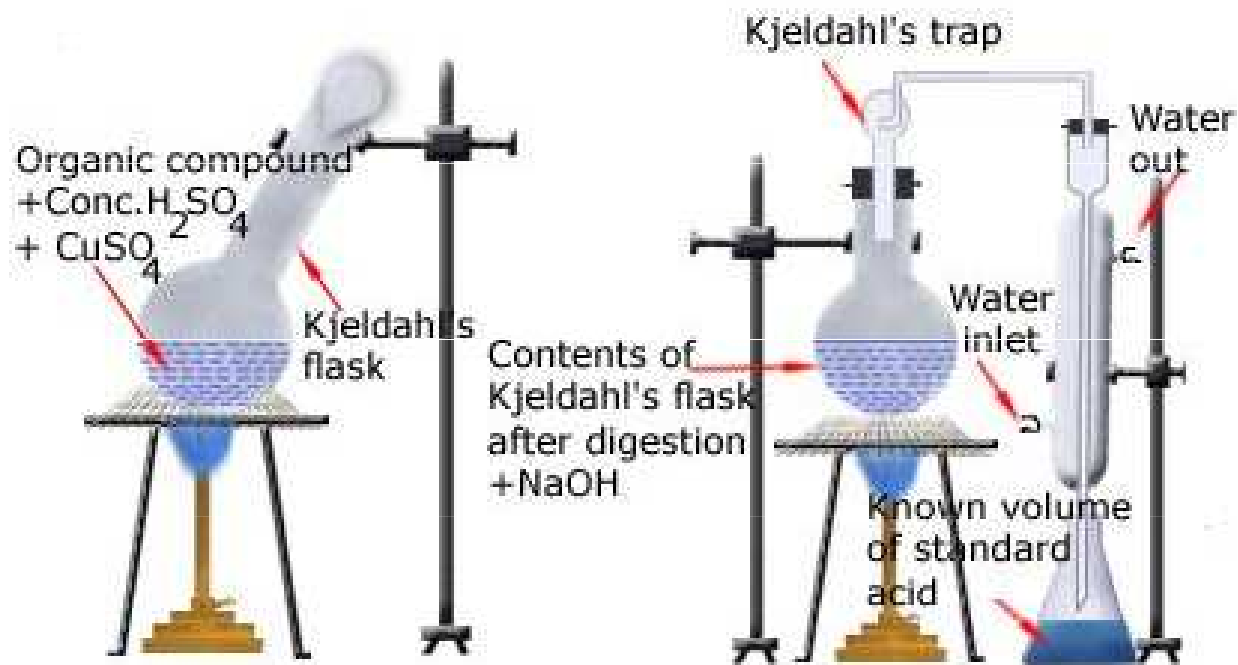
na základě
optických vlastností

na základě
elektrochemických vlastností

Kjeldahlova metoda – stanovení N_2

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

Kjeldahlova metoda – stanovení N_2

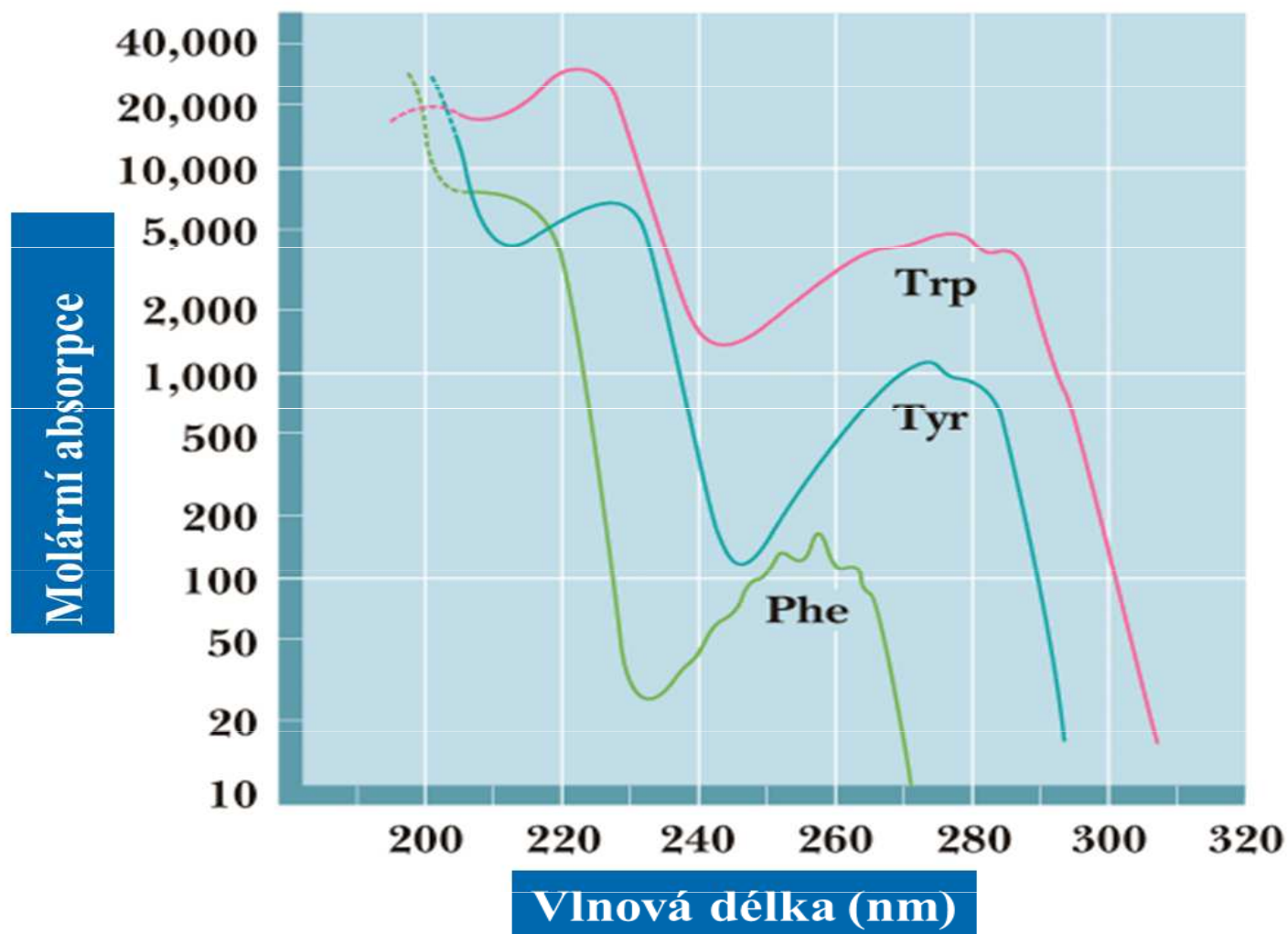


UV spektrofotometrie

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

Výhody - nedestruktivní metoda
- není třeba kalibrace

UV spektrofotometrie



UV spektrofotometrie

Vzorce pro přímé UV stanovení:

$$c \text{ (mg/mL)} = 1.55 A_{280} - 0.76 A_{260}$$

$$c \text{ (mg/mL)} = (A_{235} - A_{280})/2.51$$

$$c \text{ (mg/mL)} = (A_{224} - A_{233})/5.01$$

$$c \text{ (mg/mL)} = A_{205} [27 + 120 (A_{280}/A_{205})]$$

UV spektrofotometrie

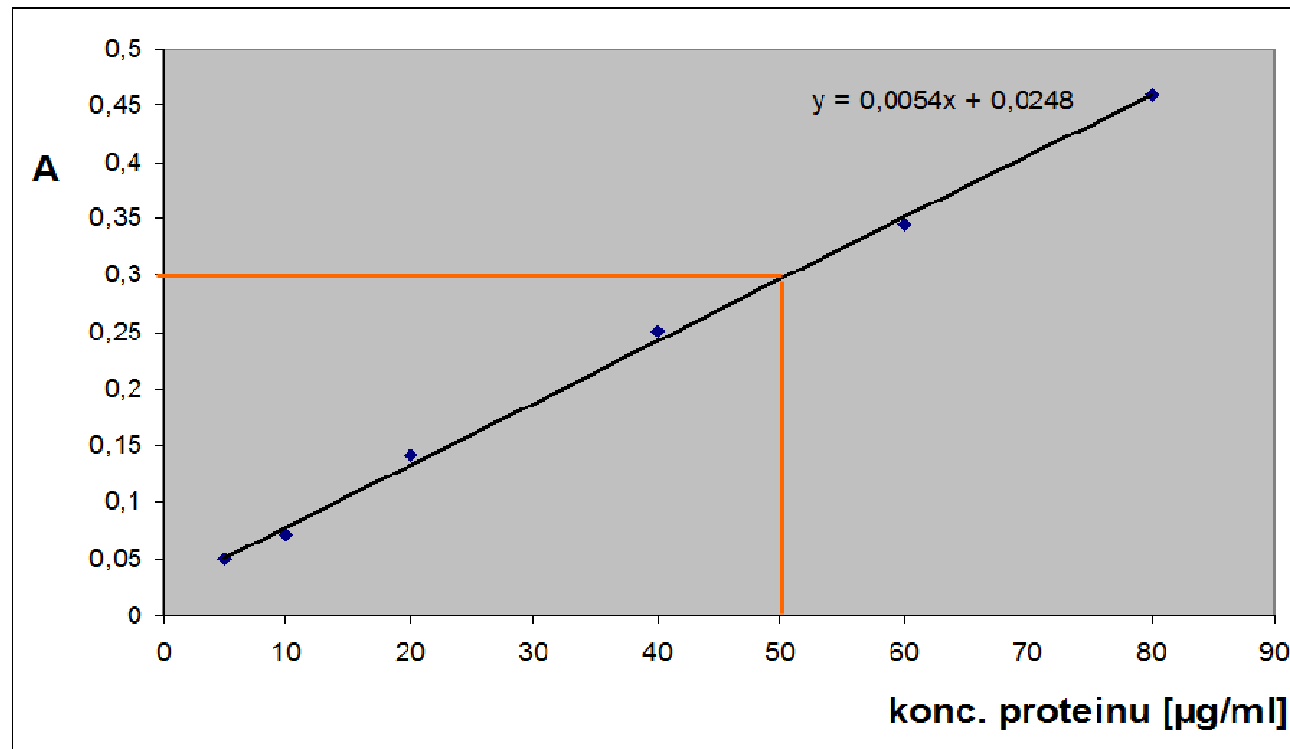
Edelchova metoda

při znalosti aminokyselinového složení je možné spočítat extinkční koeficient proteinu e_{280} . Podmínkou je přítomnost tryptofanu nebo tyrosinu v molekule.

$$e_{280} = n\text{Trp}.5500 + n\text{Tyr}.1490 + n\text{Cys}.125 \text{ (M}^{-1}\text{.cm}^{-1}\text{)}$$

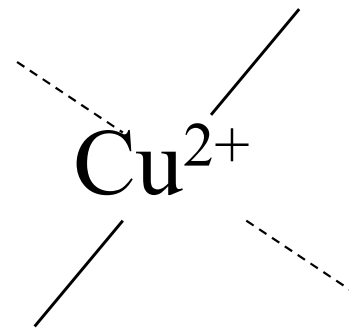
VIS spektrofotometrie

- Přídavek činidla → barevný derivát
- Destruktivní metoda
- Nutná kalibrační závislost

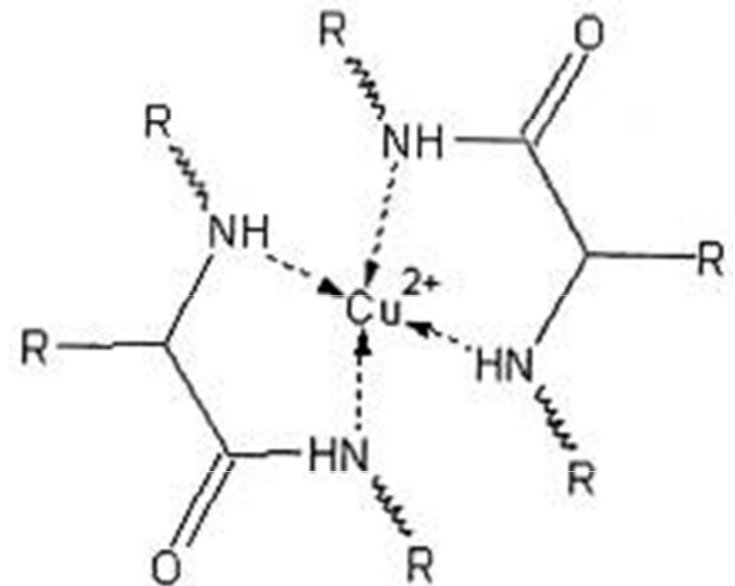


Biuretová metoda

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



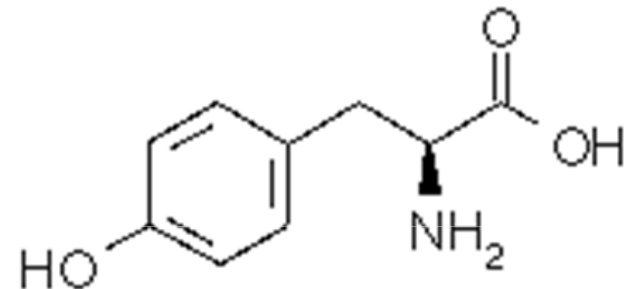
Měření : 540 – 560 nm
310 nm



Folinova metoda

Princip : hydroxyfenolová skupina tyrosinu redukuje fosfomolybdenany (Folin Ciocalteovo reagens) na molybdenovou modř

Měření : 725 nm



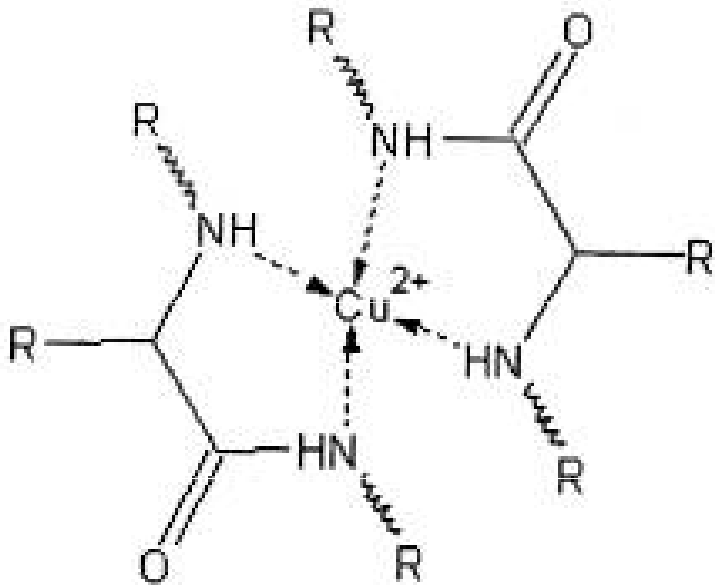
tyr y Tyrosin

Lowryho metoda

Princip : kombinace Folinovy a Biuretové metody

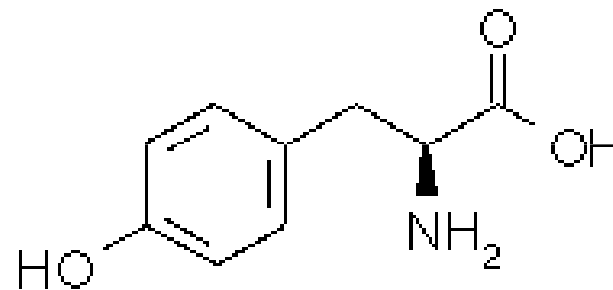
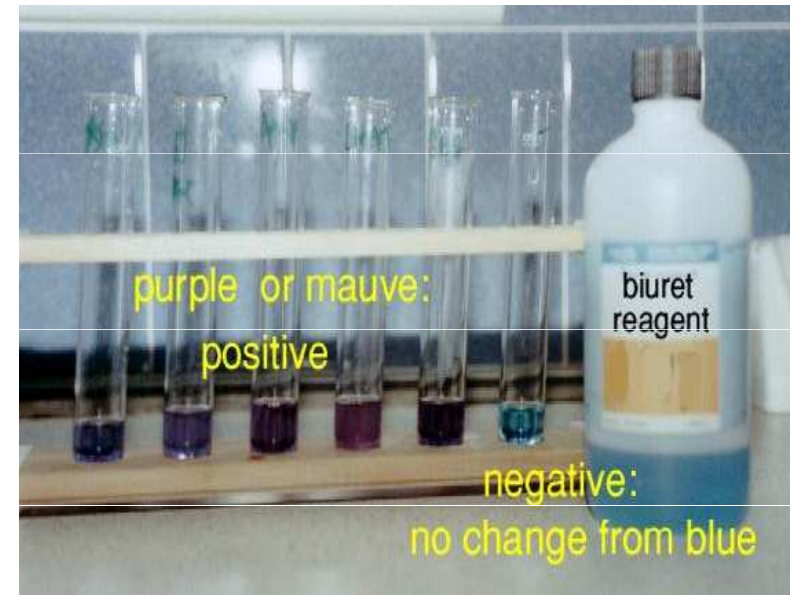
Měření : 600 nm

Lowryho metoda



biuret ↑

Lowry ↓

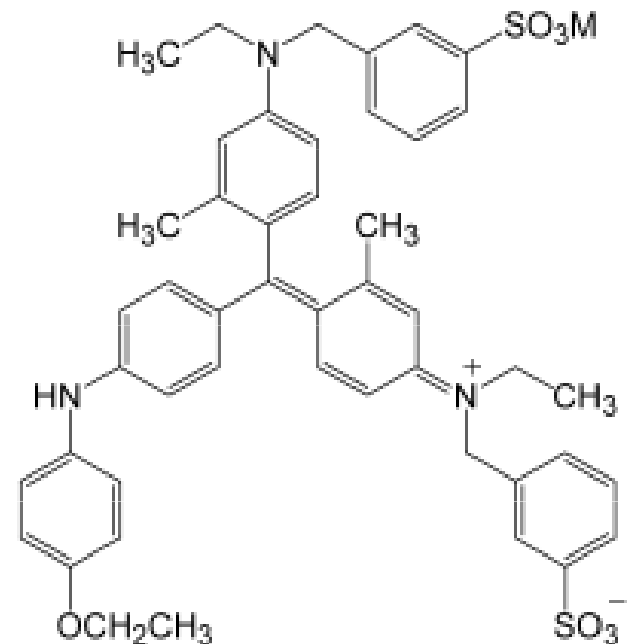


tyr y Tyrosin

Metoda dle Bradfordové

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

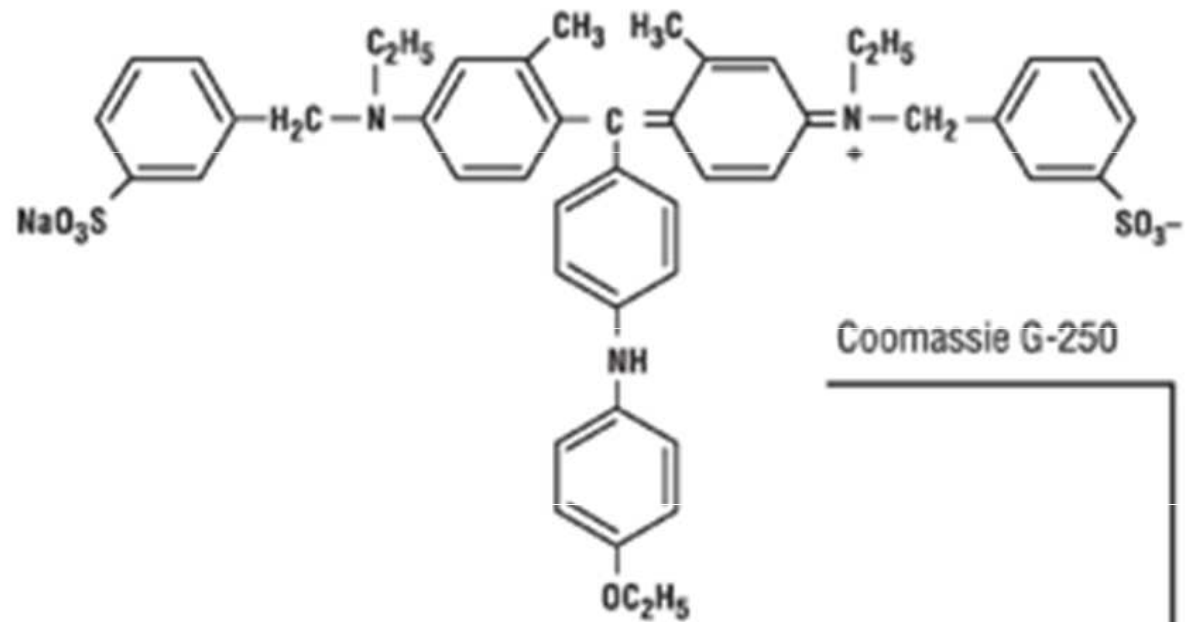
Meření : 595 nm



Metoda dle Bradfordové

PROTEIN
Basic and Aromatic
Side Chains

+



Coomassie G-250

465 nm

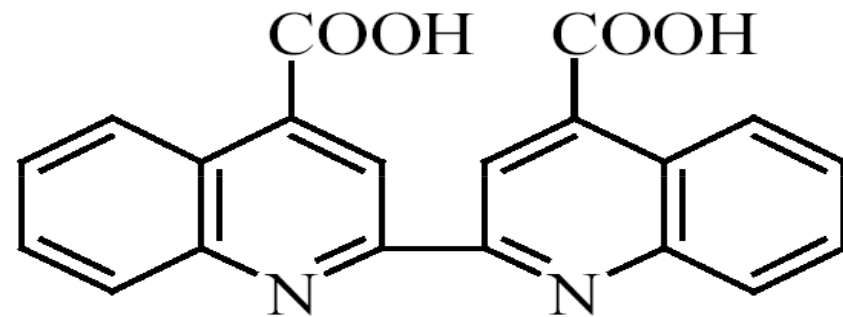


A_{max} = 595 nm

Protein-Dye Complex

BCA metoda

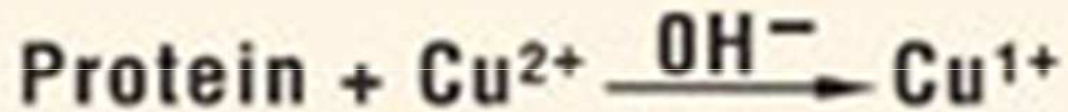
Princip : Na^+ sůl k. bicinchoninové (BCA),
komplexuje Cu^+ tvořené reakcí peptidové
vazby s Cu^{2+}



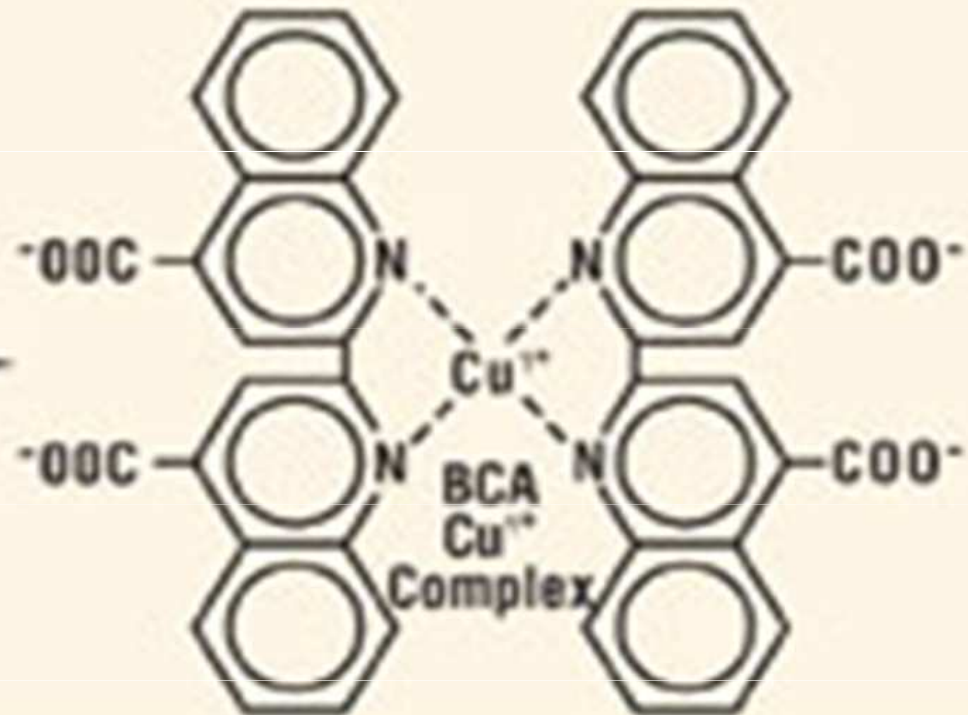
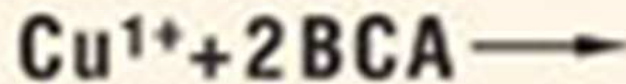
Měření : 562 nm

BCA metoda

STEP 1.



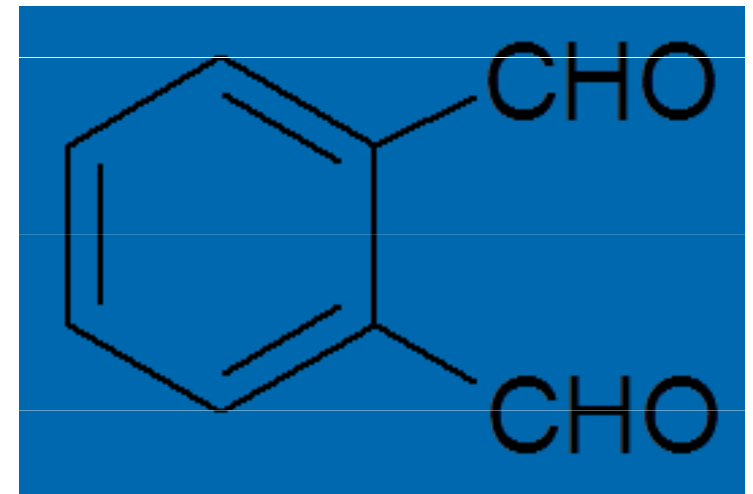
STEP 2.



Fluorescence

Princip : - vazba fluoroforu na
bílkovinu → měření vzniklé
fluorescence (OPA)

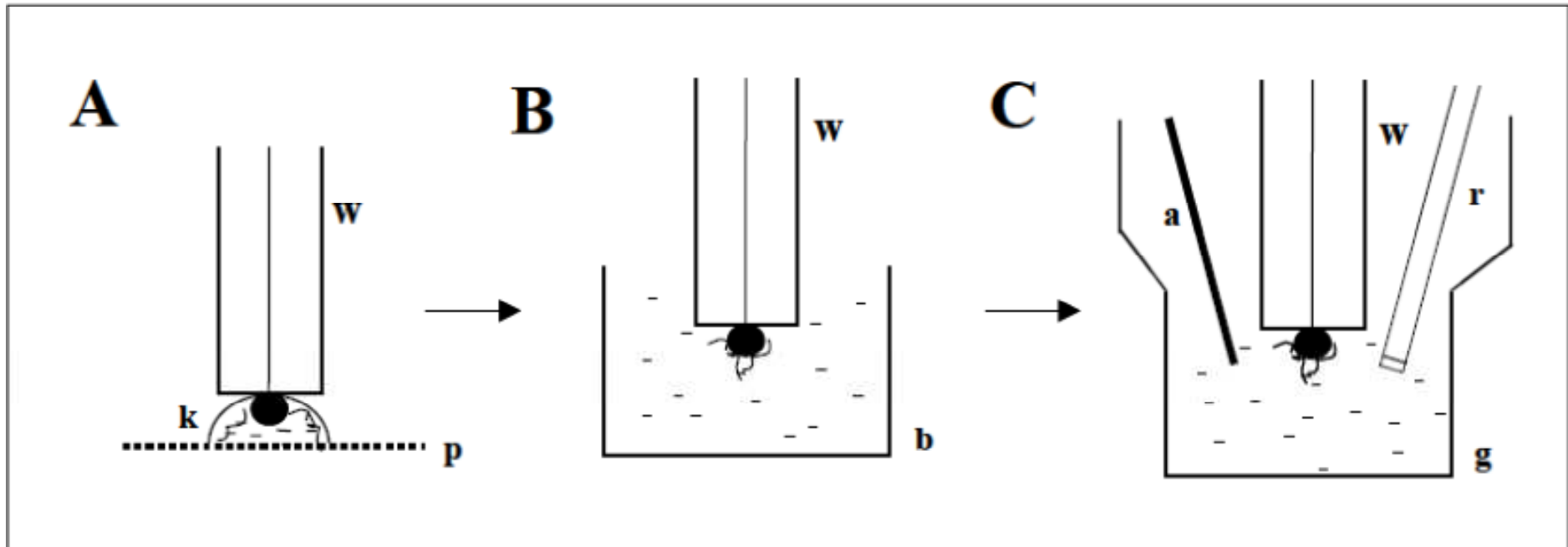
Měření : exc.340 nm
em.440 nm



- zhášení fluorescence přidavkem
bílkoviny

Polarografie

Princip : Brdičkova reakce – SH skupiny bílkoviny vstupují v přítomnosti Co^{2+} katalytické reakce na Hg elektrodě \rightarrow proud



Nejčastěji používané metody

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

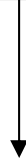
Stanovení biologické aktivity

Enzymatické, imunologické, toxické,
hormonální receptorové atdf.

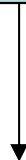
Vlastní separace

Obecné schéma

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, tabák
huseníček (*Arabidopsis*)

Nevýhoda – problematický růst za
definovaných podmínek

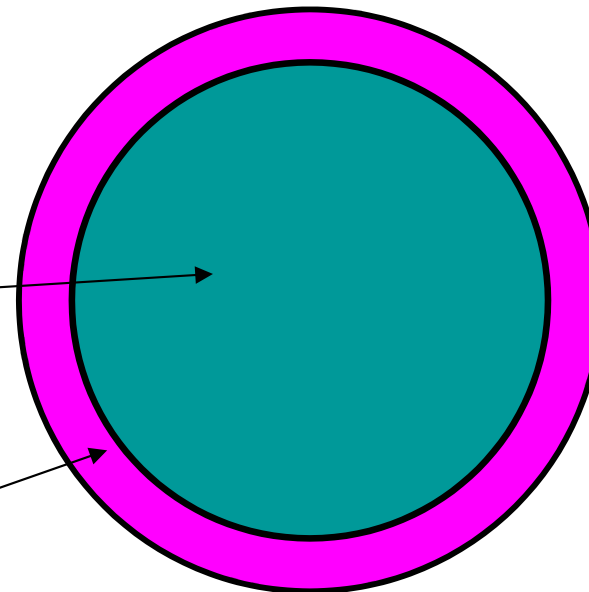
Rozbití a extrakce

Bakterie

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

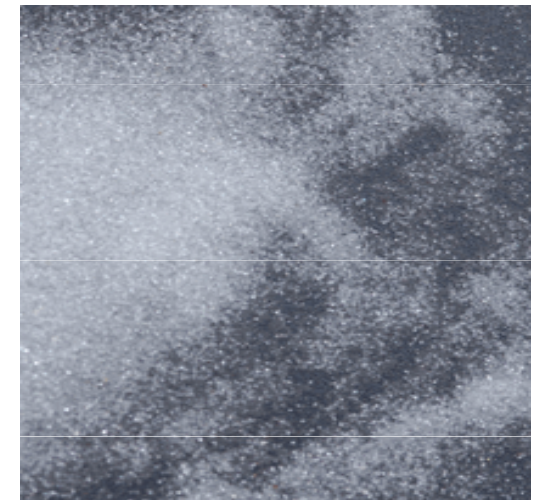
cytoplasma

periplasma



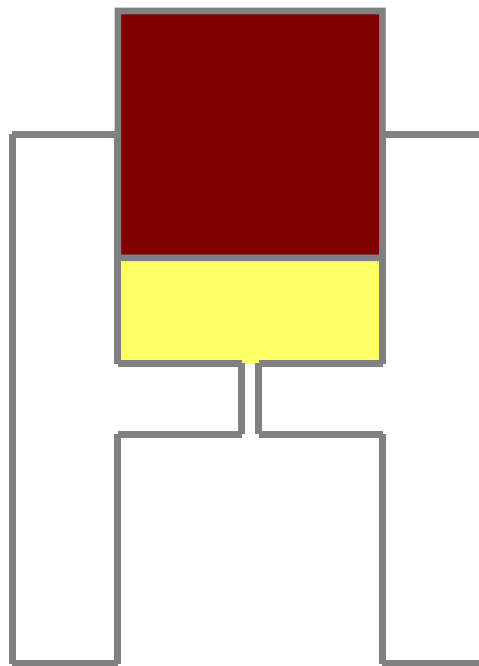
Balotina

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

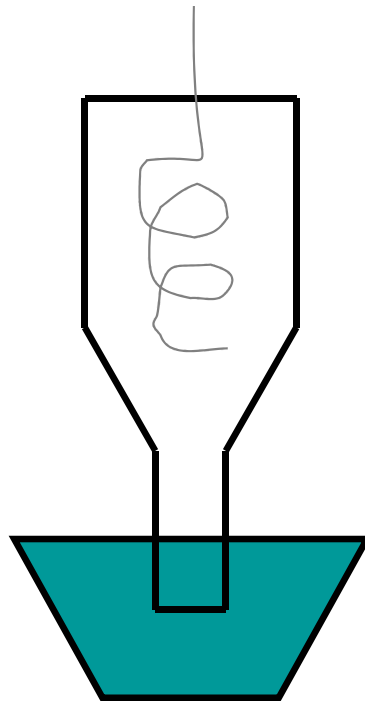


Mechanical Press



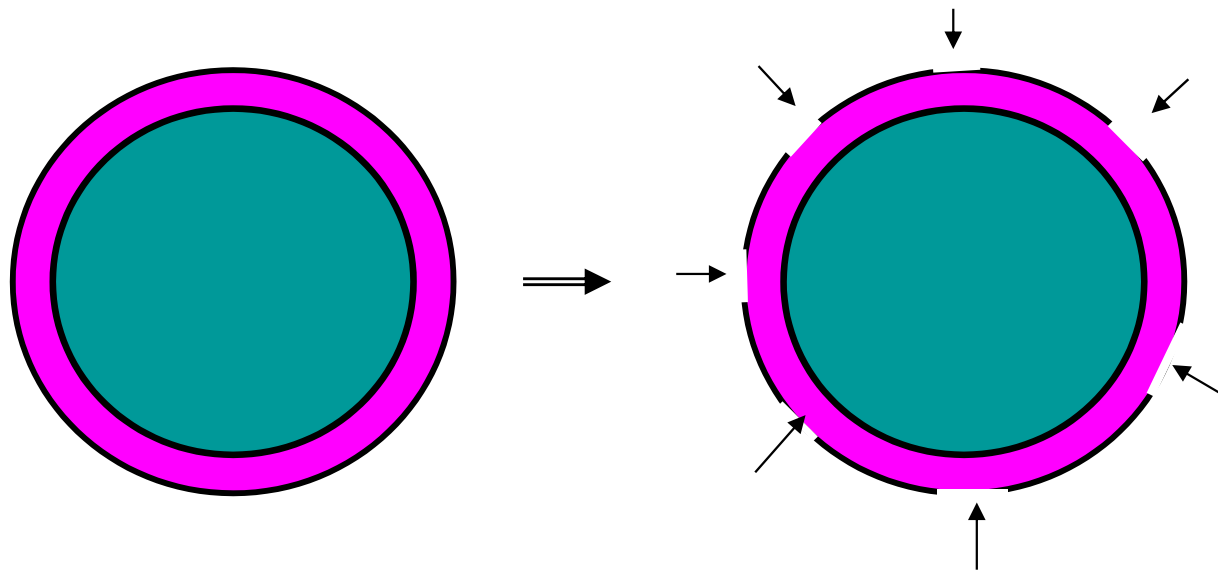
Ultrazvuk

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 H₂O – bakterie popraskají

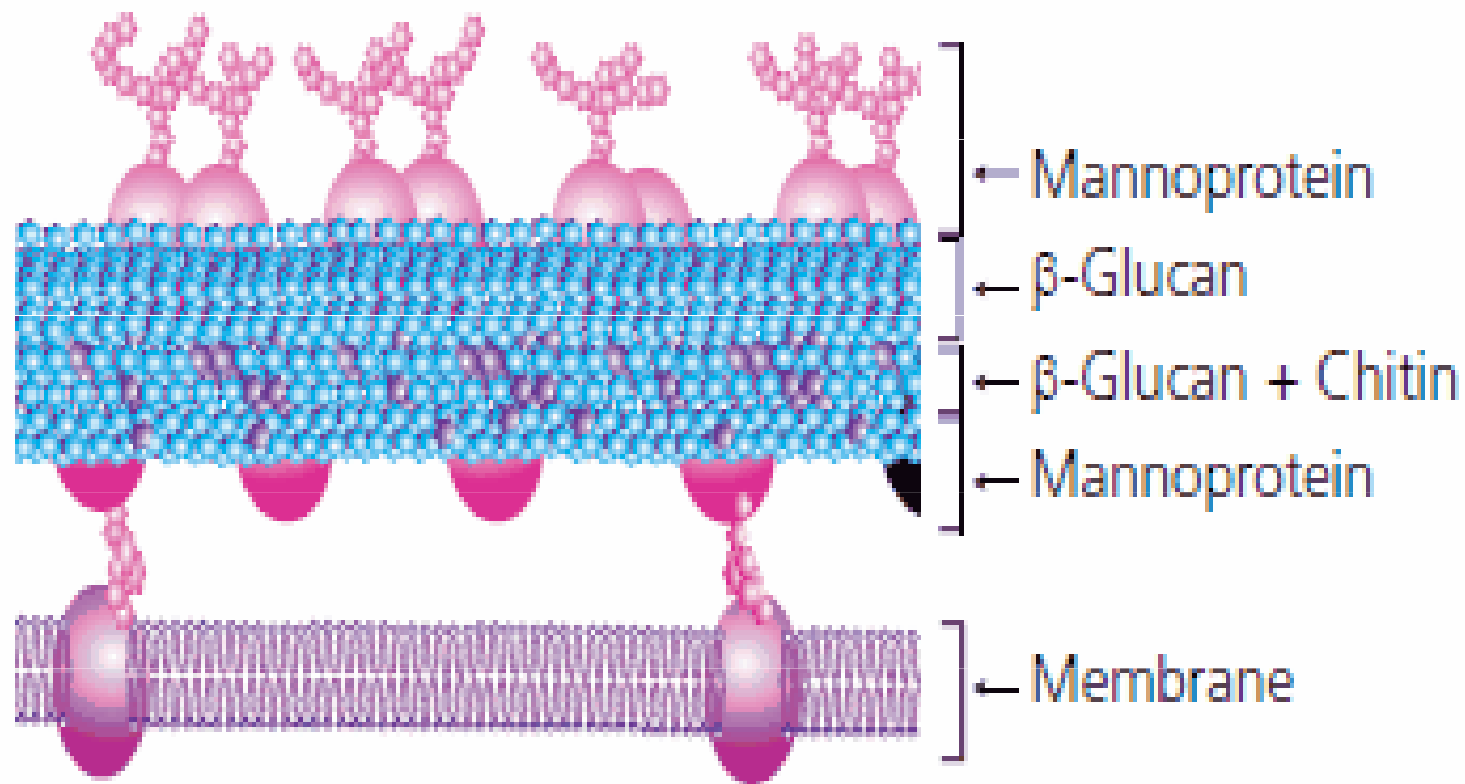


Další

- Alumina Al_2O_3 – roztírání v třecí misce
- Opakované zmrazování a rozmrazování

Kvasinky

Yeast Cell Wall



Kvasinky

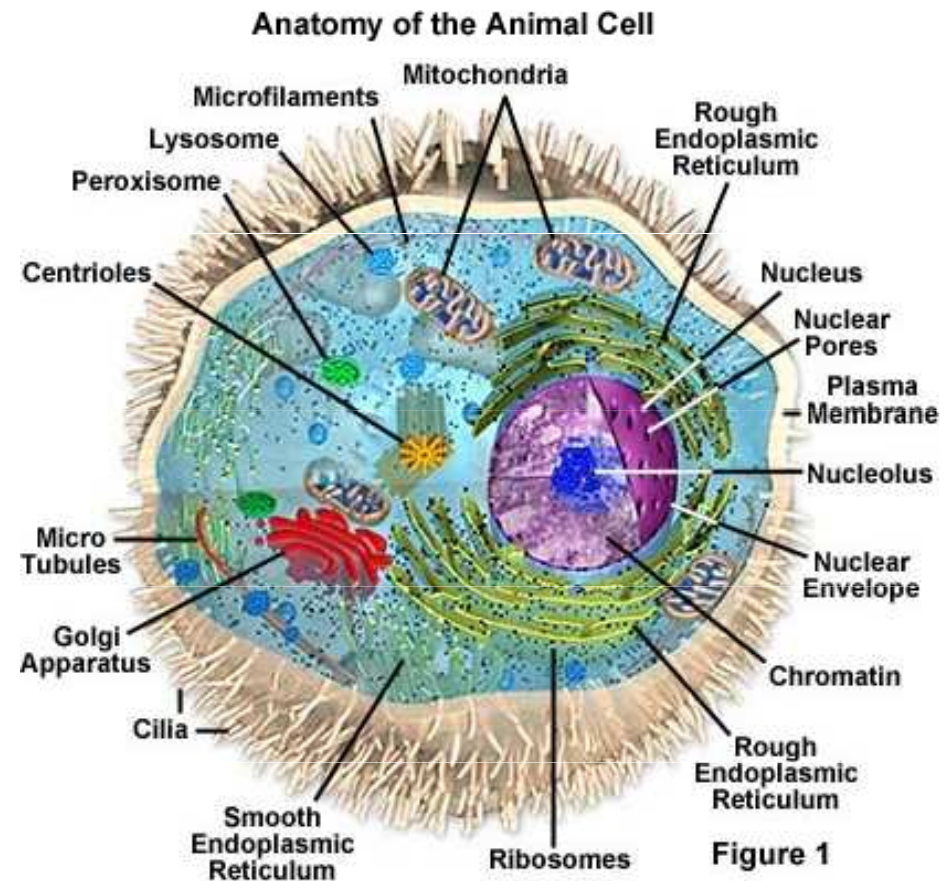
Toluenová autolýza

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

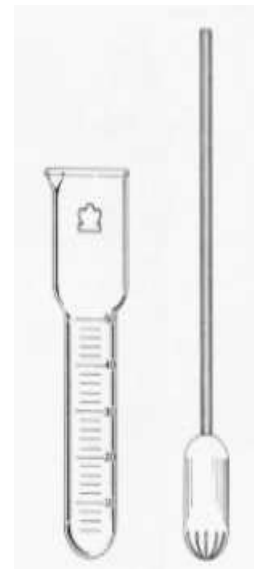


Živočišné tkáně

- Třecí miska s pískem



- Ruční homogenizatory – Potter – Elvehjemův

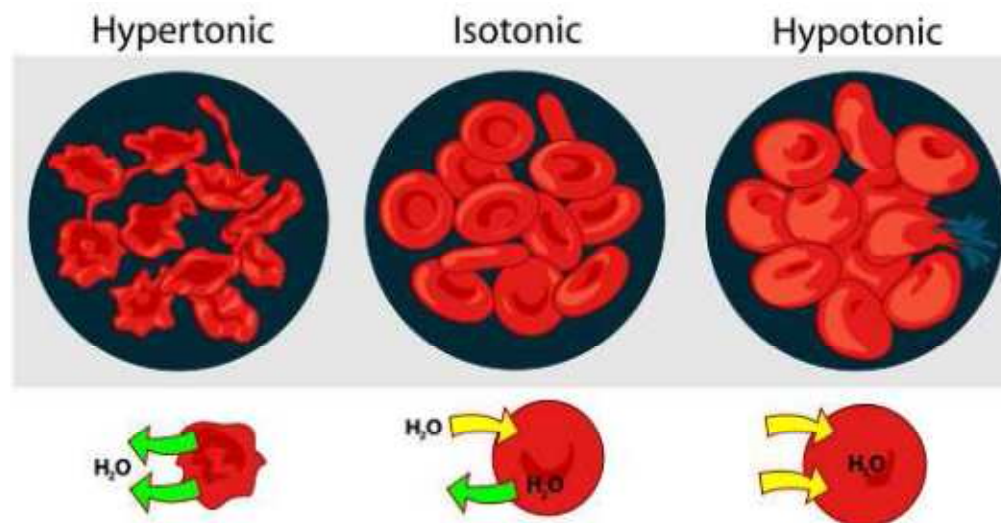


Živočišné tkáně

- Mixery

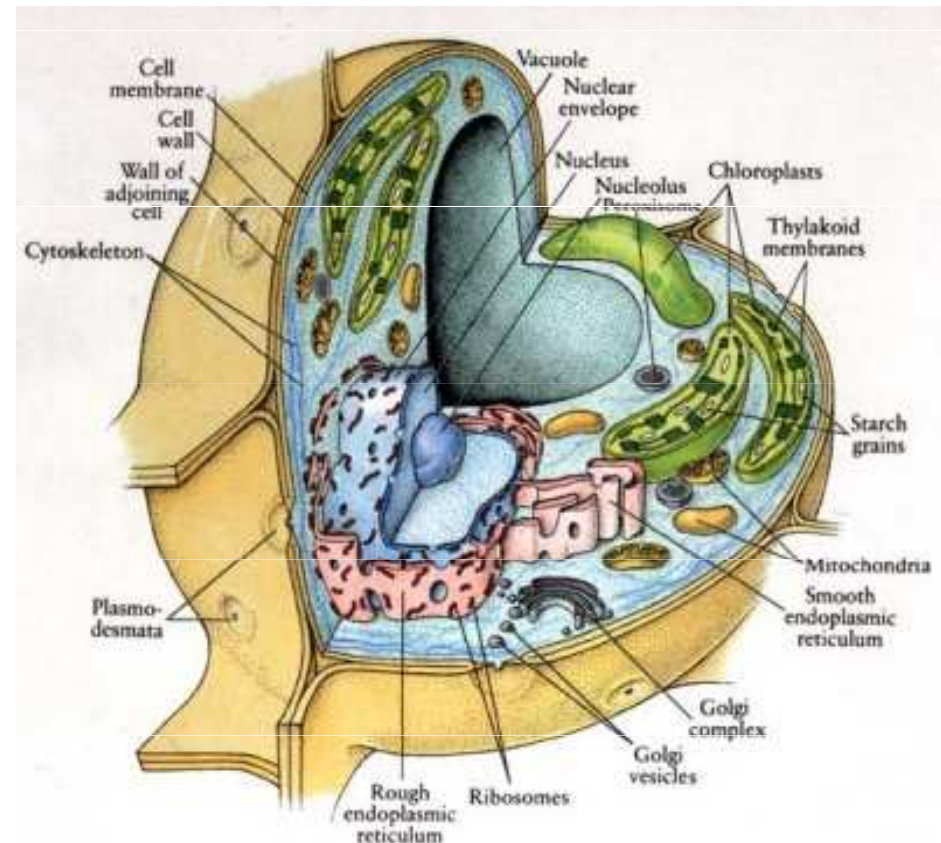


- Osmotická lyse - erythrocyty



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, β -merkaptoethanol, kovové ionty, inhibitory proteas

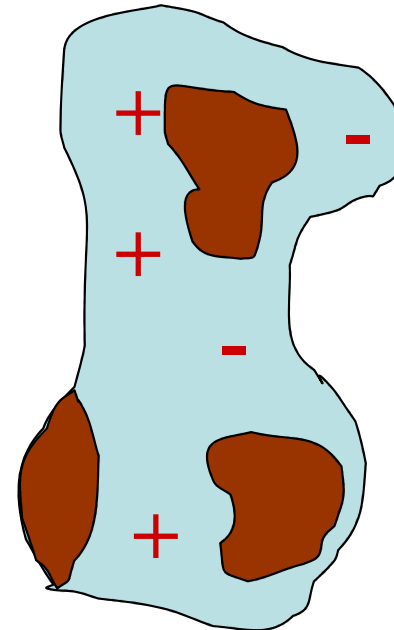
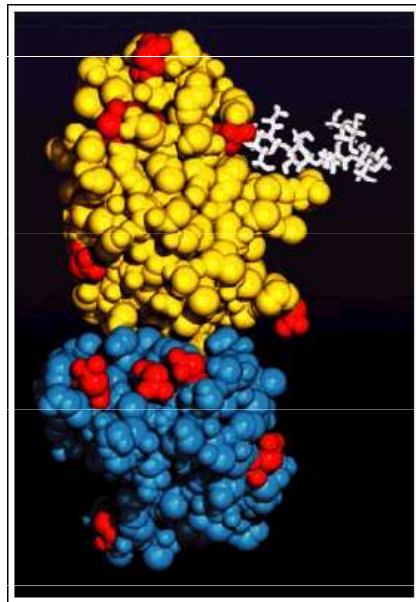
Srážecí metody

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

Rozpusťnost bílkoviny

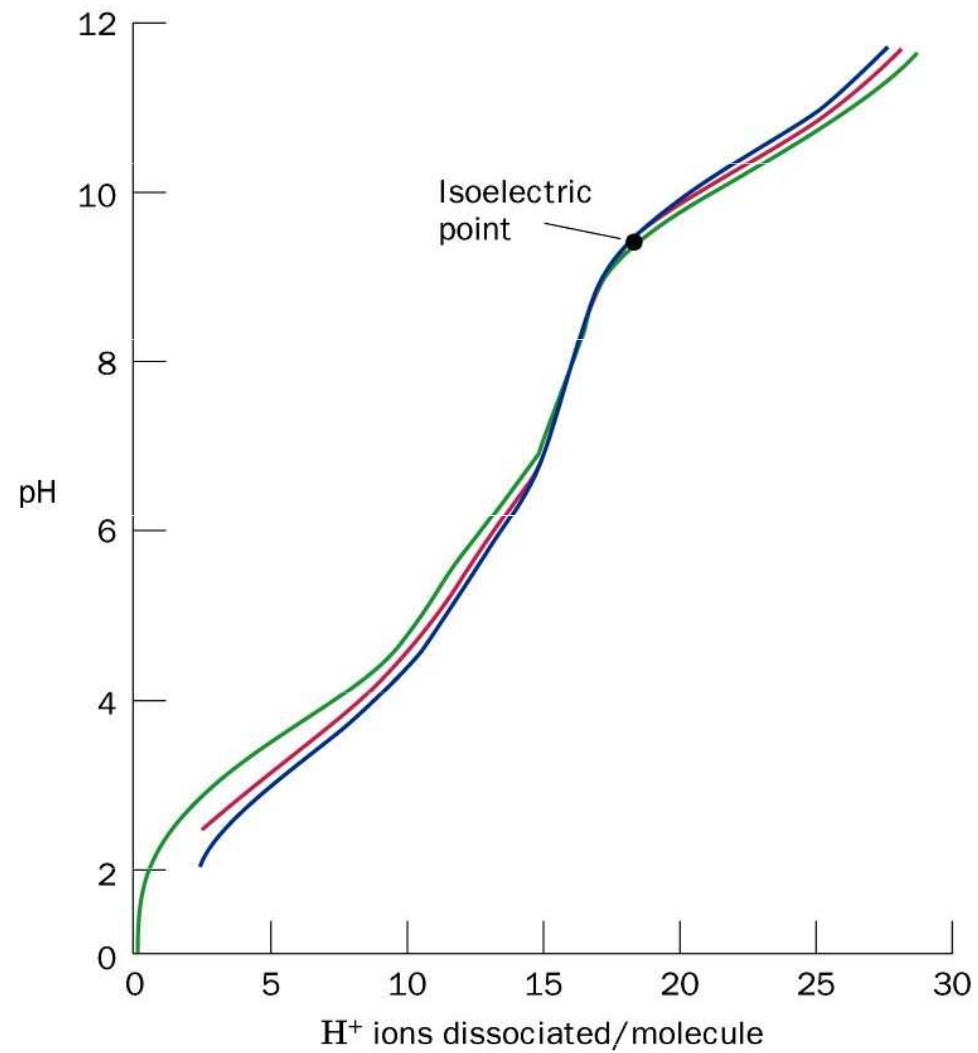
- Vlastnostmi bílkoviny – distribuce hydrofobních a hydrofilních skupin na povrchu bílkoviny



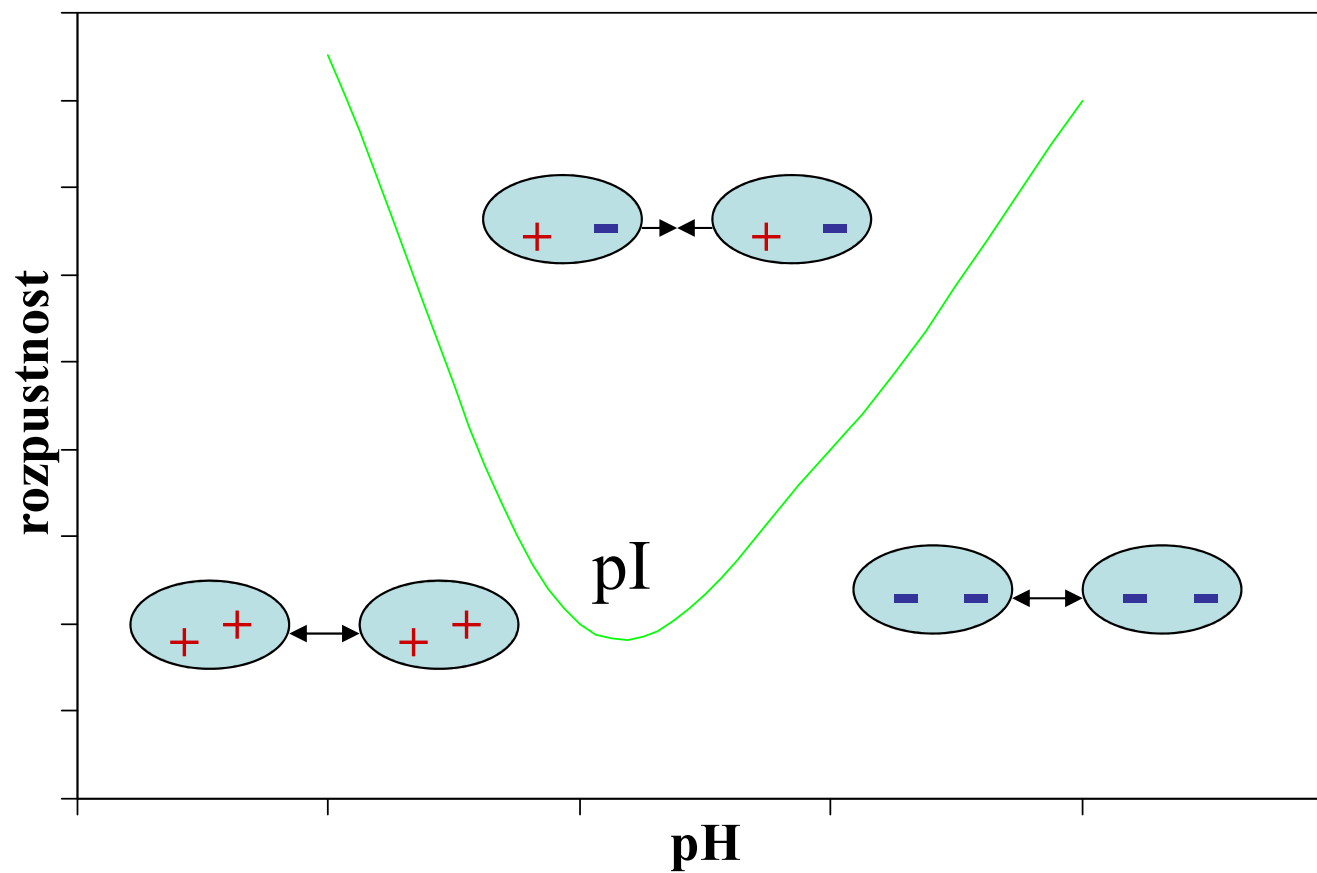
Rozpustnost bílkoviny

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

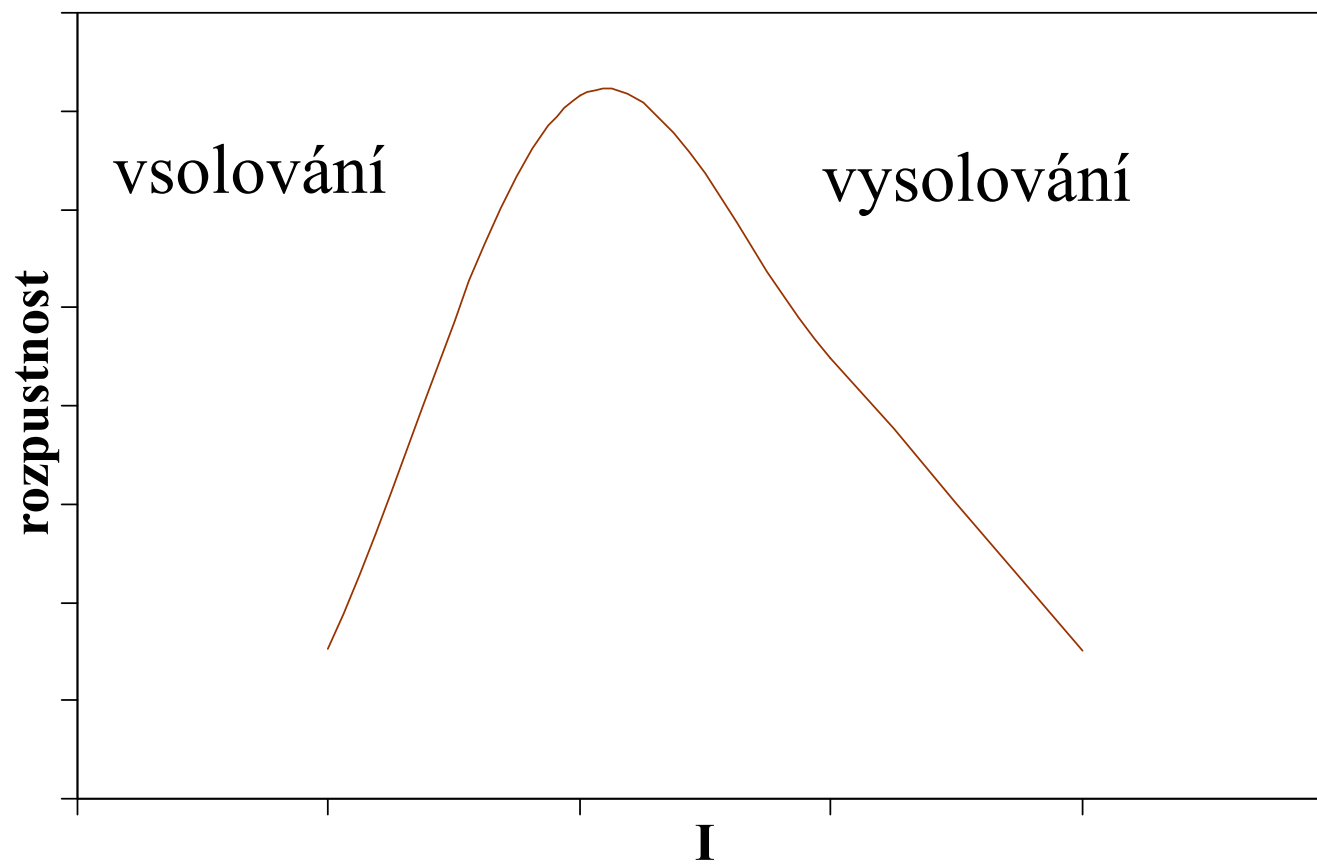
Titrační křivka



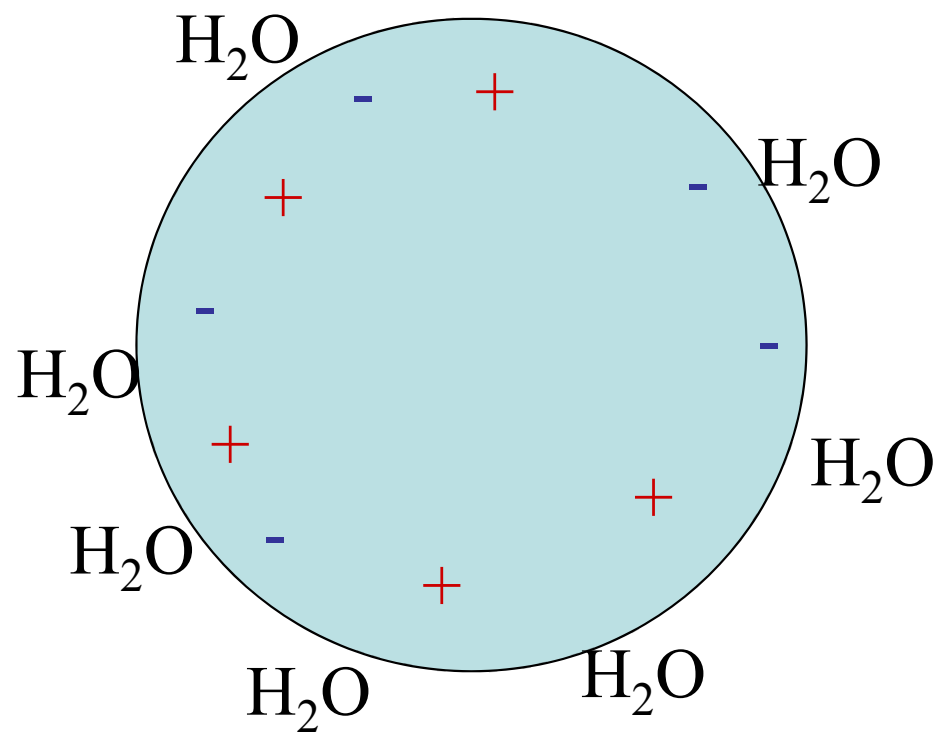
Izoelektrická precipitace



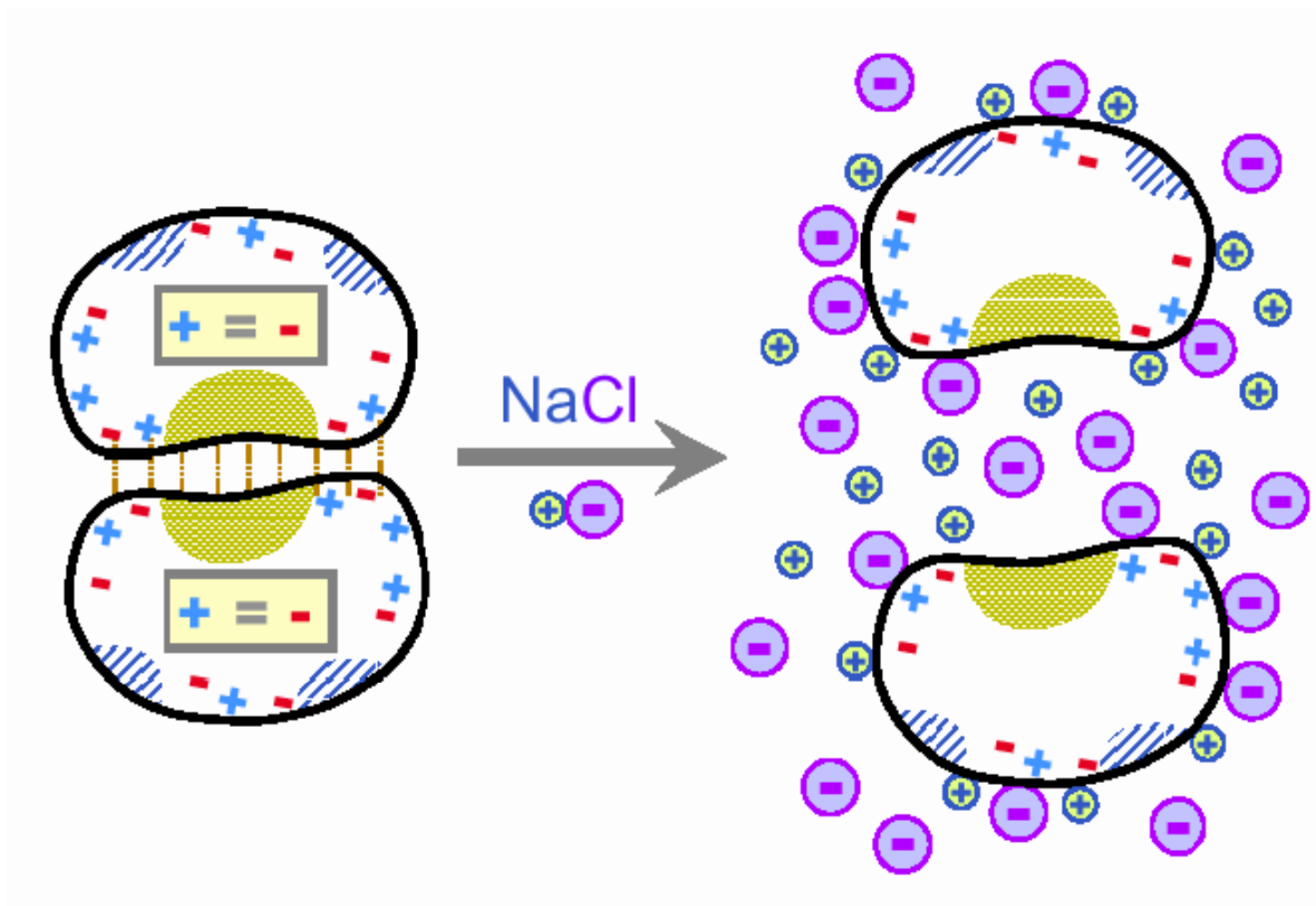
Srážení neutrálními solemi



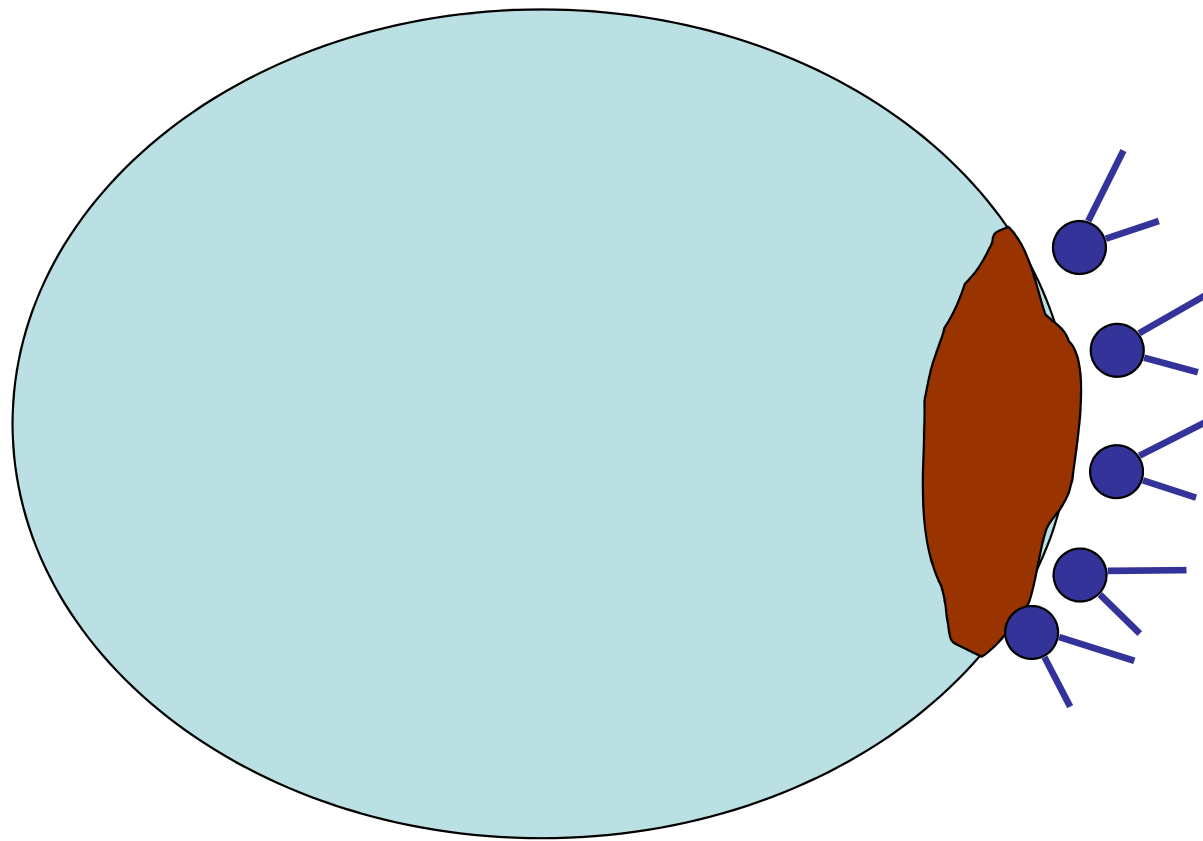
Vsolování



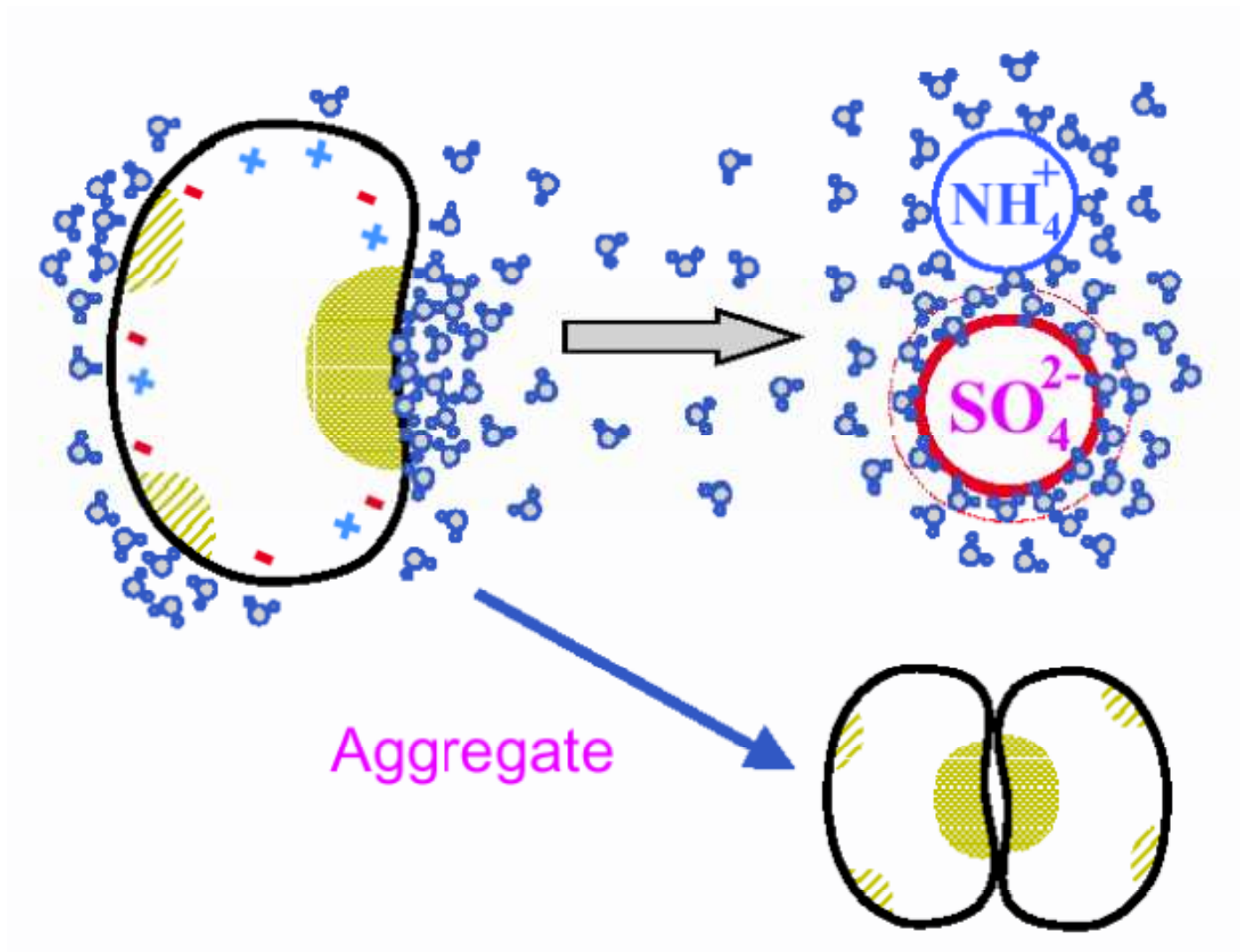
Vsolování

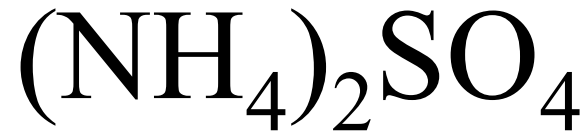


Vysolování



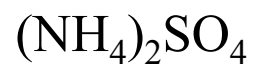
Vysolování



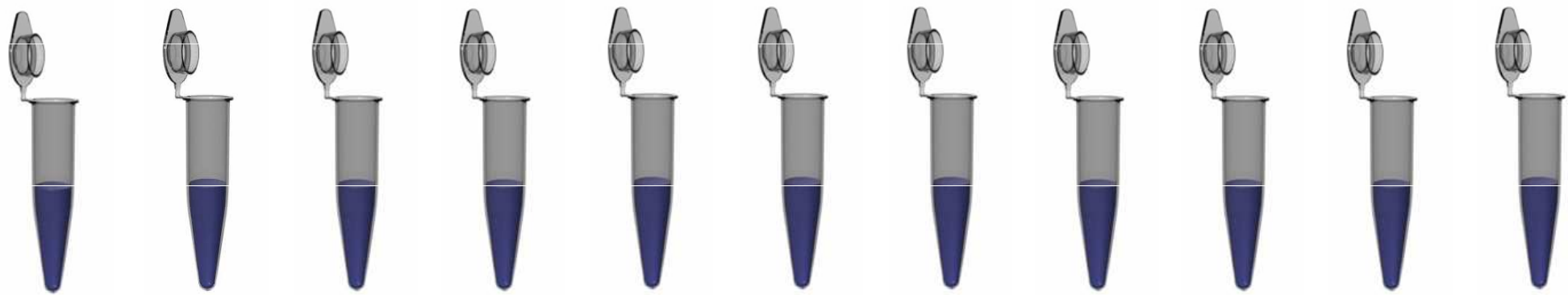


- Rozpustnost se málo mění s teplotou
- Saturevaný roztok 4 M - hustota $1,235\text{g/cm}^3$
umožňuje centrifugaci agregovaných bílkovin
(hustota $1,29\text{ g/cm}^3$)
- Levný
- Stabilizuje bílkoviny
- Relativně čistý

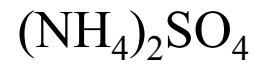
Srážecí křivka



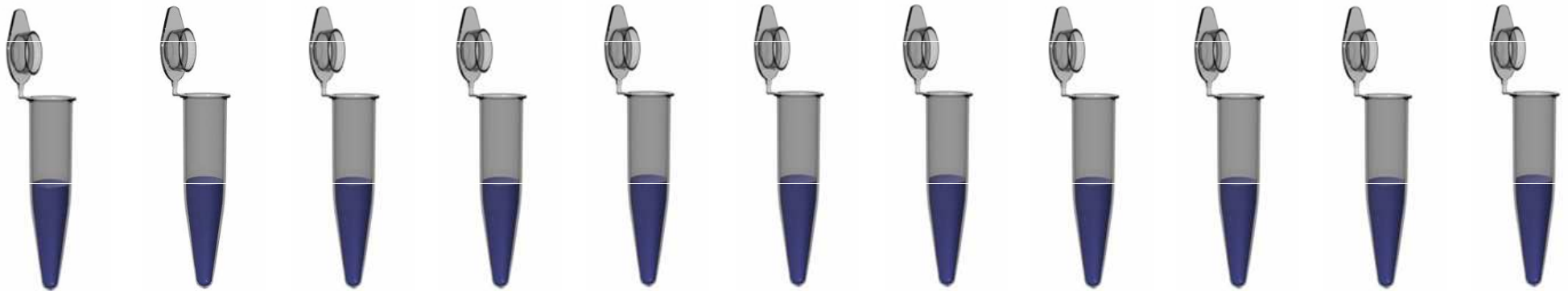
0 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 %



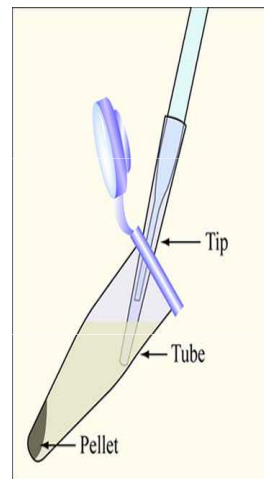
Srážecí křivka



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

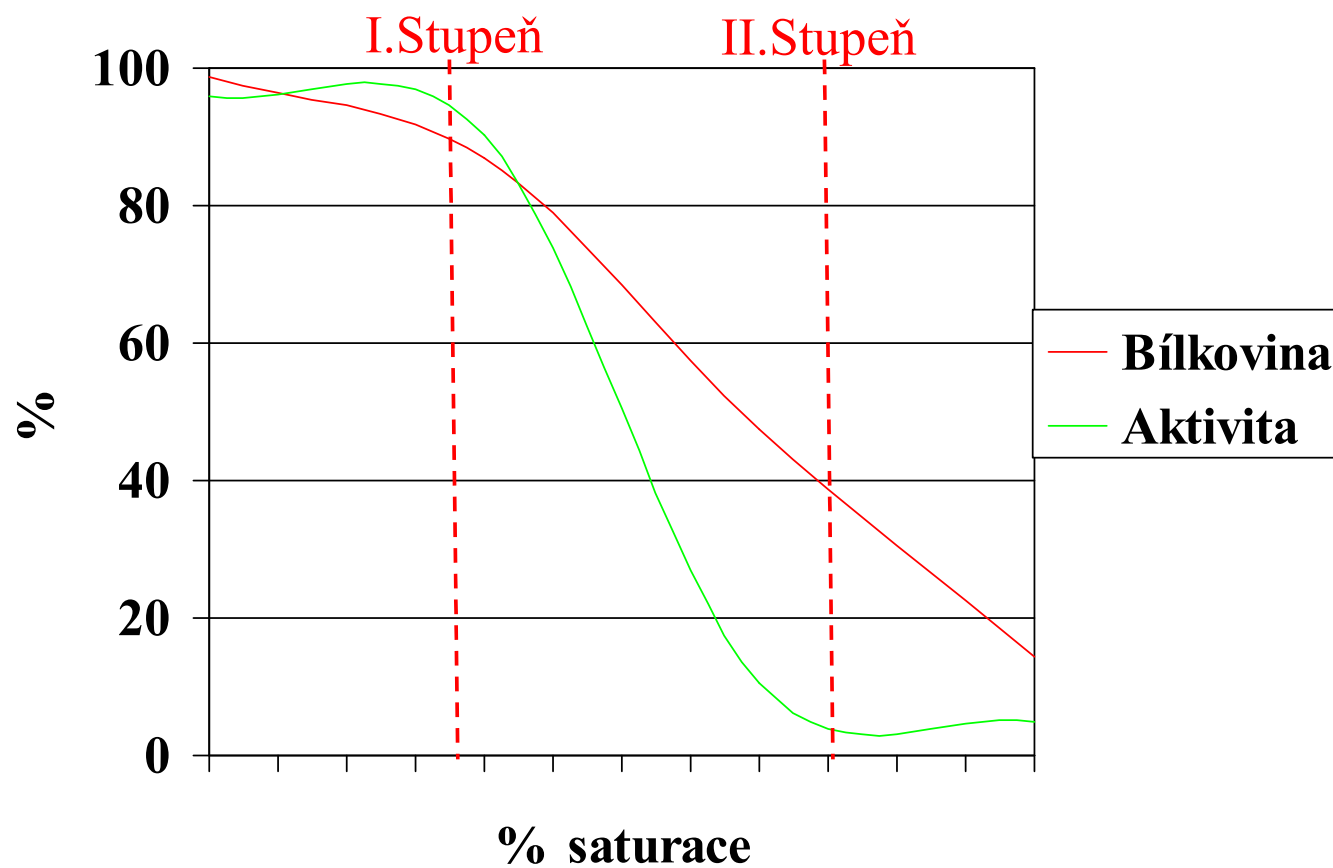


Koncentrace bílkoviny ←



→ Aktivita bílkoviny

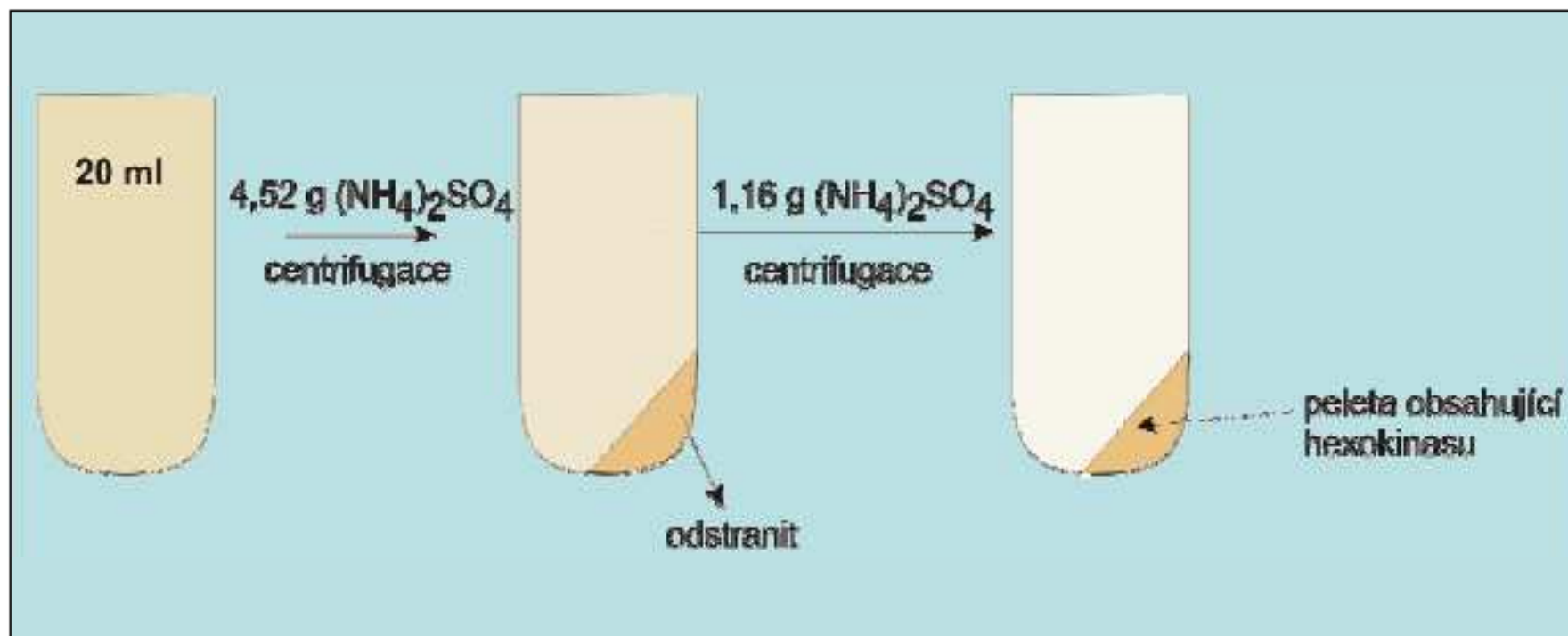
Srážení - dvojstupňově



Srážení - dvojstupňově

I. Stupeň

II. Stupeň



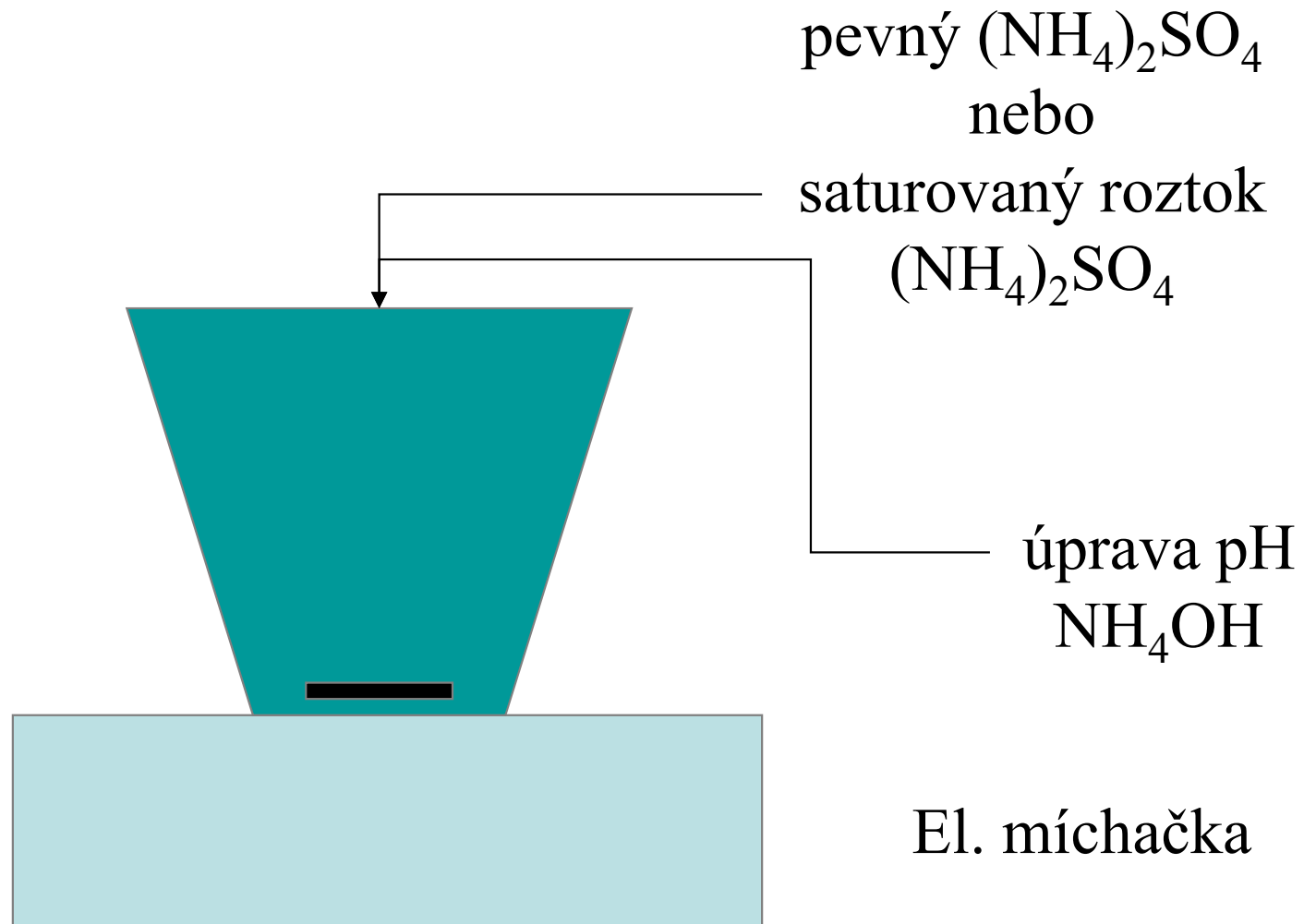
Přidané množství

- Tabulky
- Vzorce

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

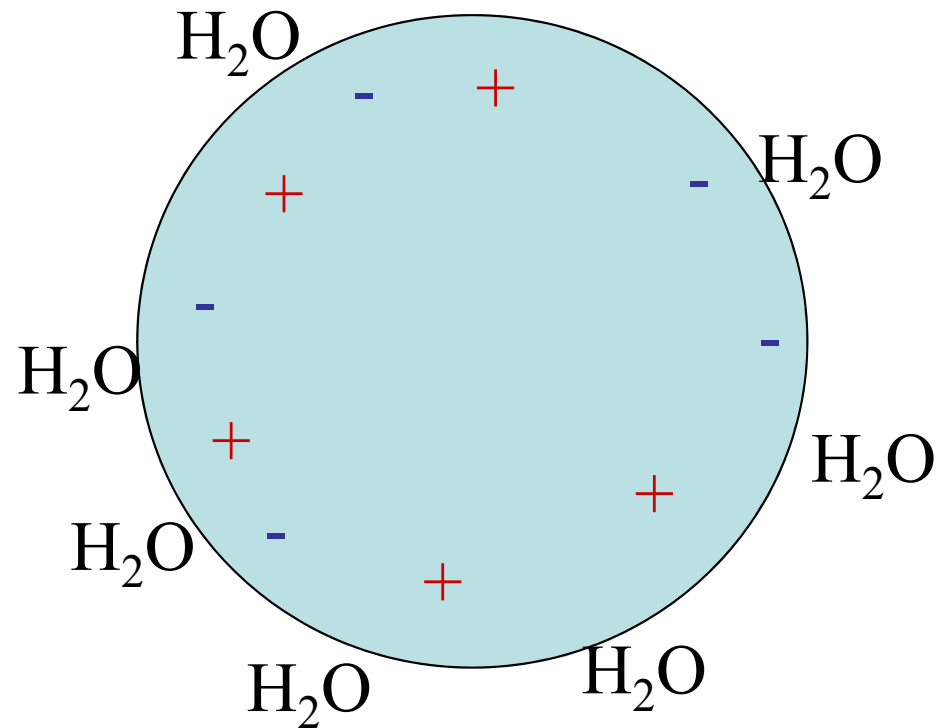
Provedení

Chlazení
Míchání 10-30'
Centrifugace



Srážení org.rozpouštědly mísitelnými s vodou

- Rozpouštědla ruší solvatační obal bílkoviny



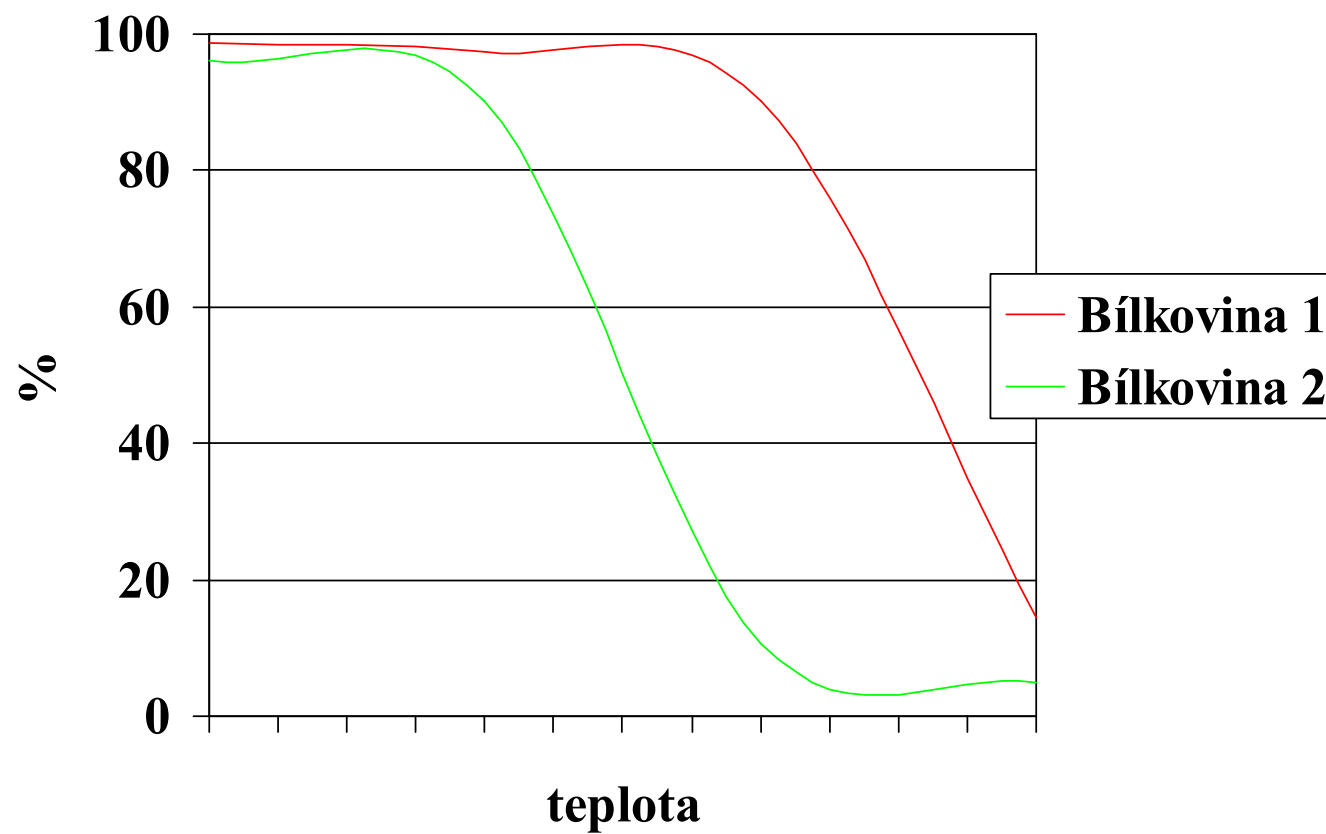
Srážení org.rozpouštědly mísitelnými s vodou

- 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

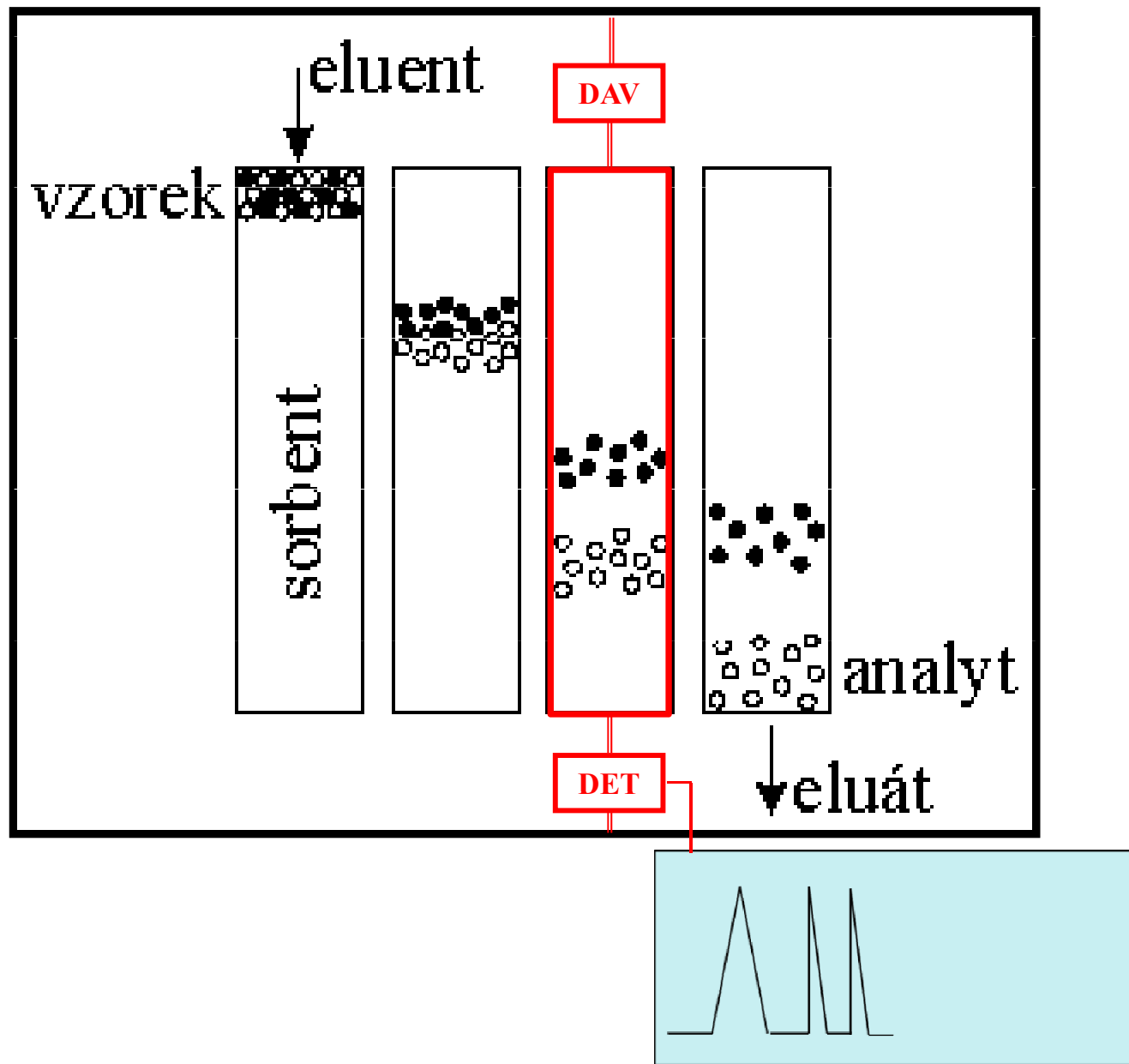


Chromatografické metody

Podstata

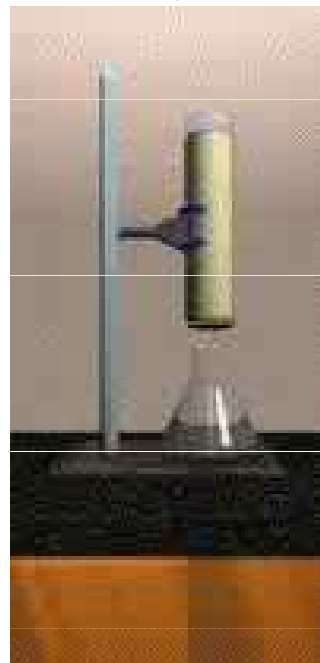
*„Při chromatografii dochází
k neustálému vytváření
rovnovážných stavů separované látky
mezi dvě fáze – stacionární a
mobilní.“*

Chromatografie



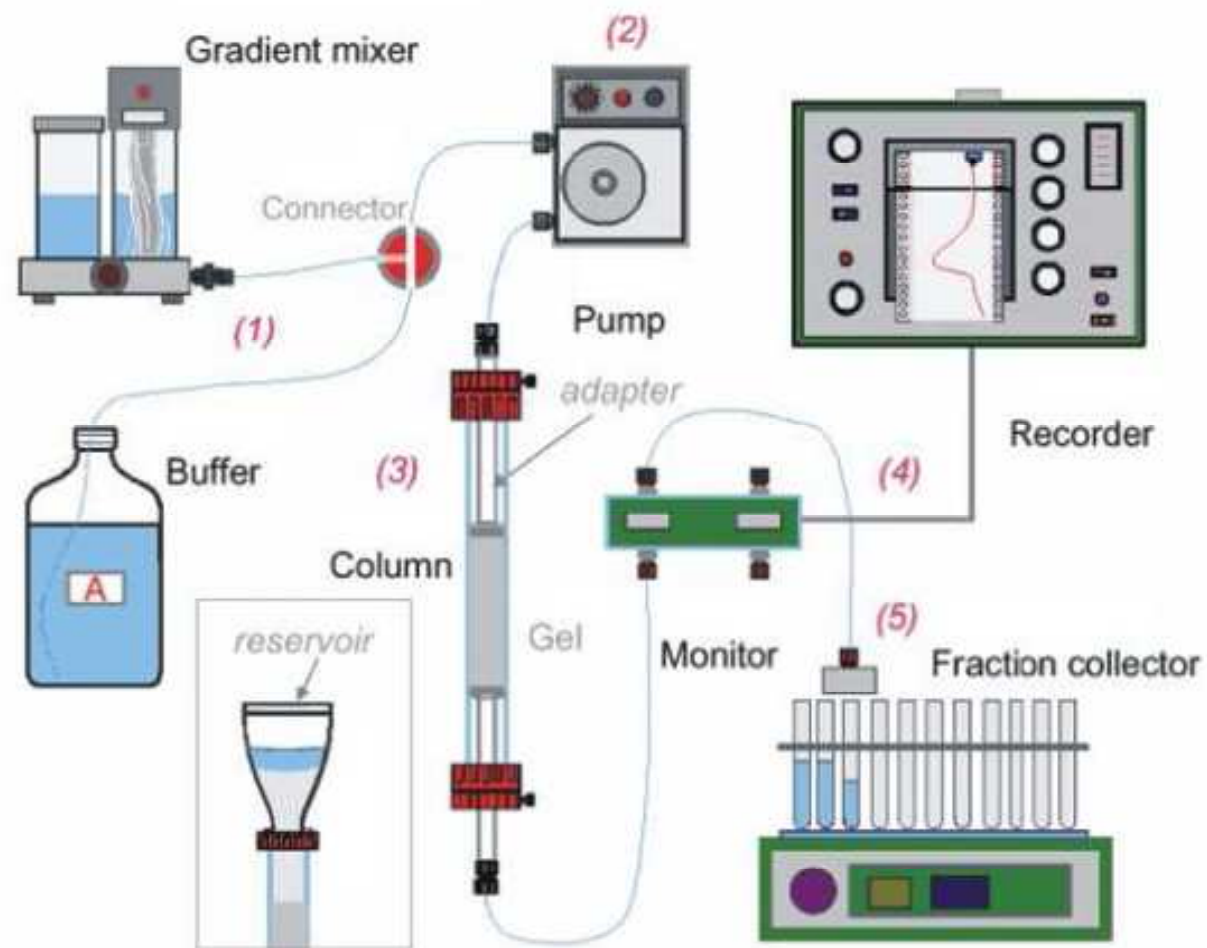
Chromatografie

Mobilní fáze ↙
↘ izokratická eluce
gradientová eluce

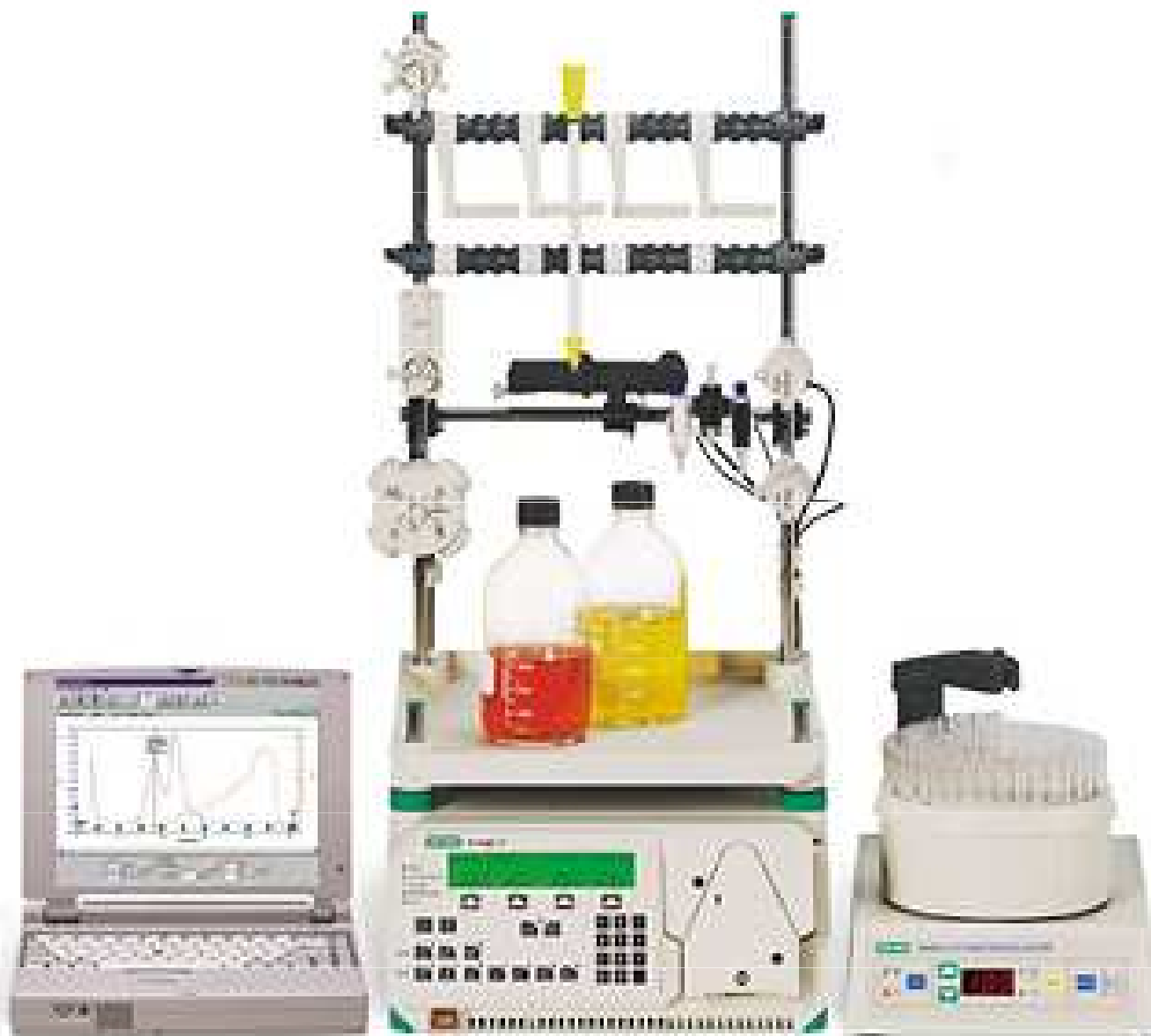


← Stacionární fáze

Zařízení pro LPC



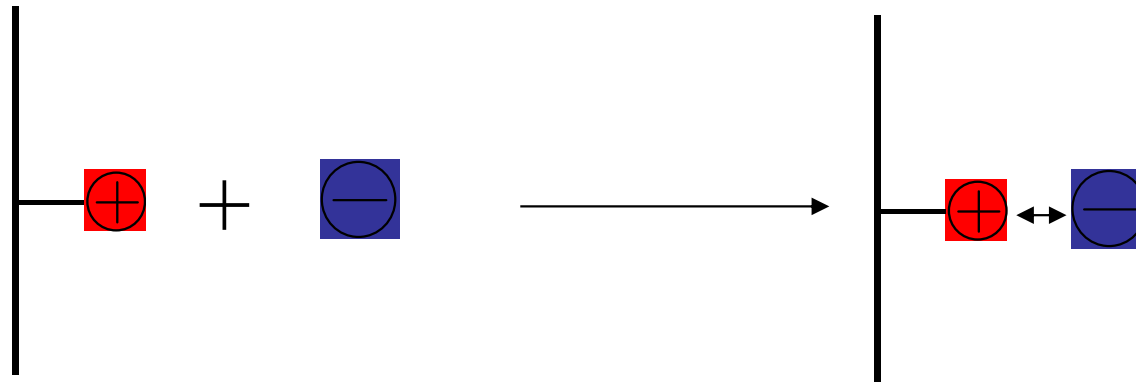
Zařízení pro LPC



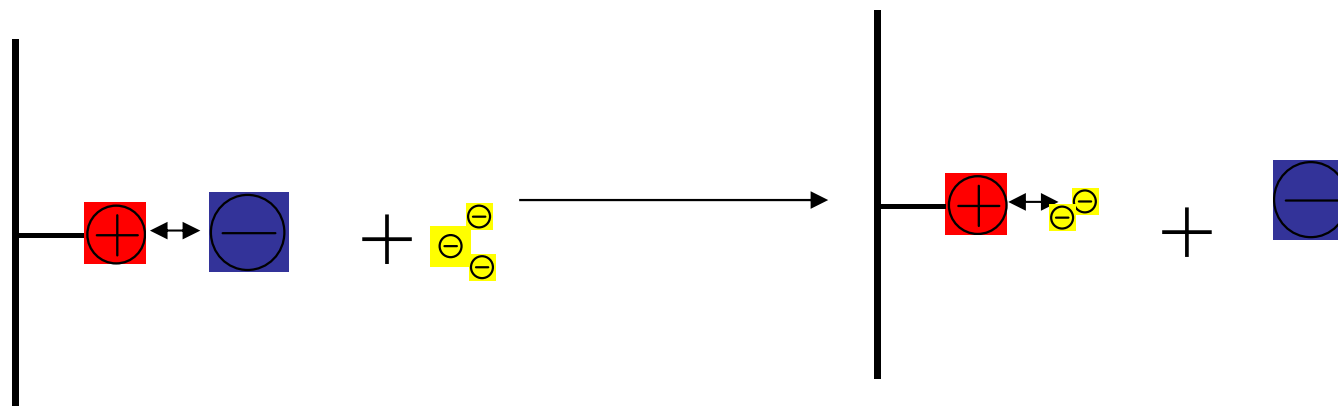
Ionexová chromatografie

elektrostatická interakce

Vazba



Eluce



Ionexy

- Katexy - - vazba kationtů

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

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

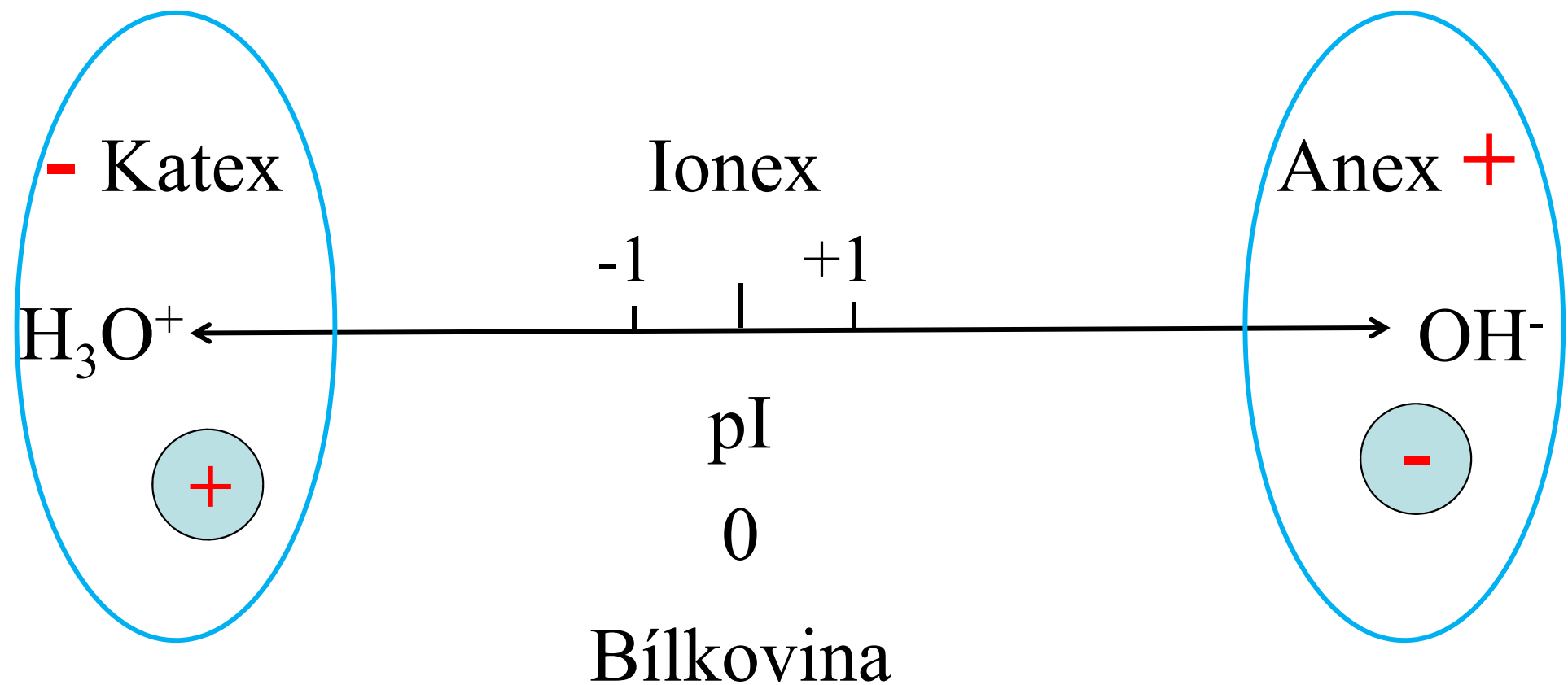
- Anexy - + vazba aniontů

silné - dietylaminoetyl(DEAE)

slabé – trietylaminoetyl(TEAE)

Volba podmínek – pH + typ ionexu

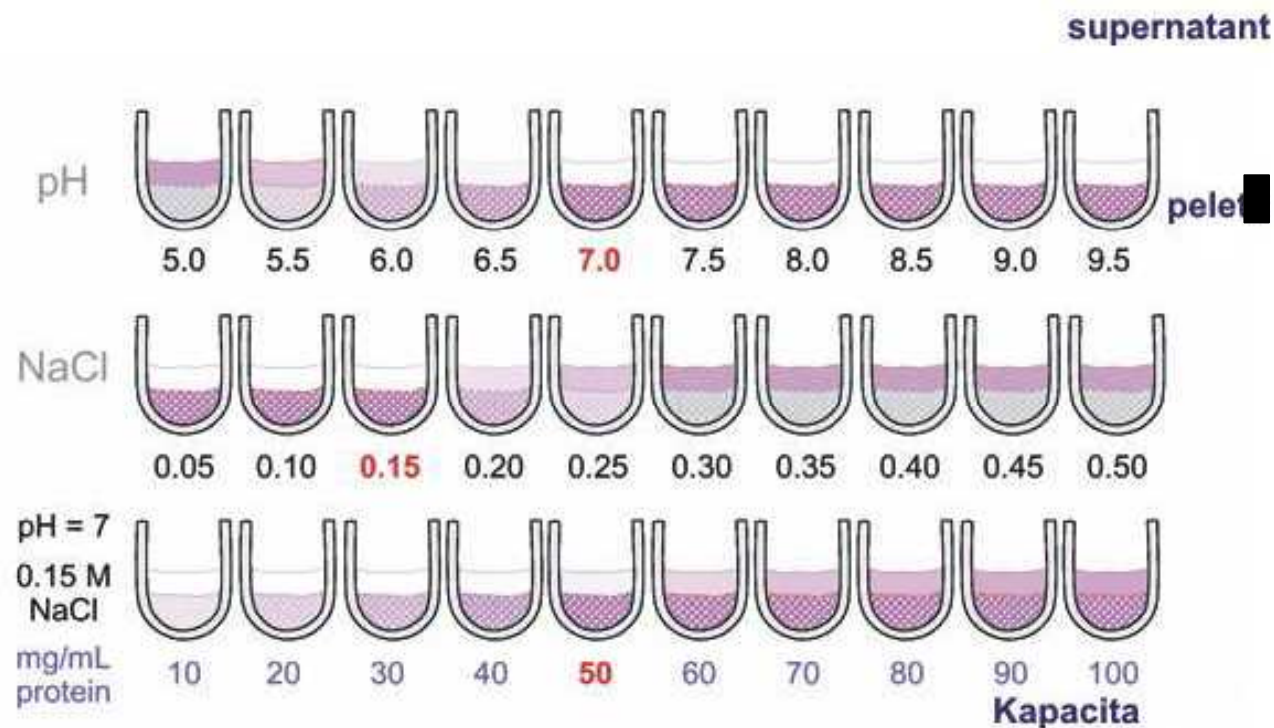
pI bílkoviny je znám



Volba podmínek – pH + typ ionexu

pI bílkoviny není znám

- Metoda pokusů a omylů

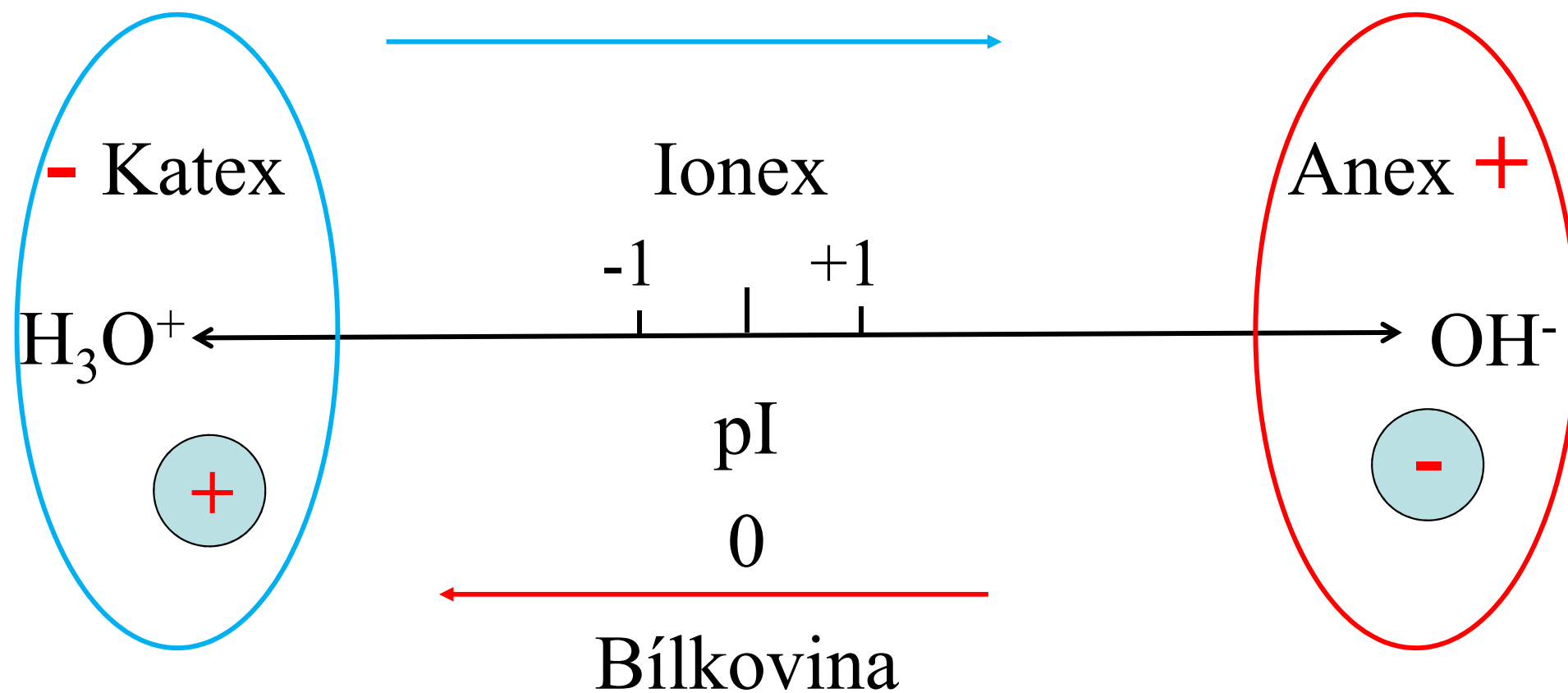


- Metoda titračních křivek

Ionexová chromatografie

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

Použití – purifikace, zakoncentrování, výměna pufry



Ionexová chromatografie

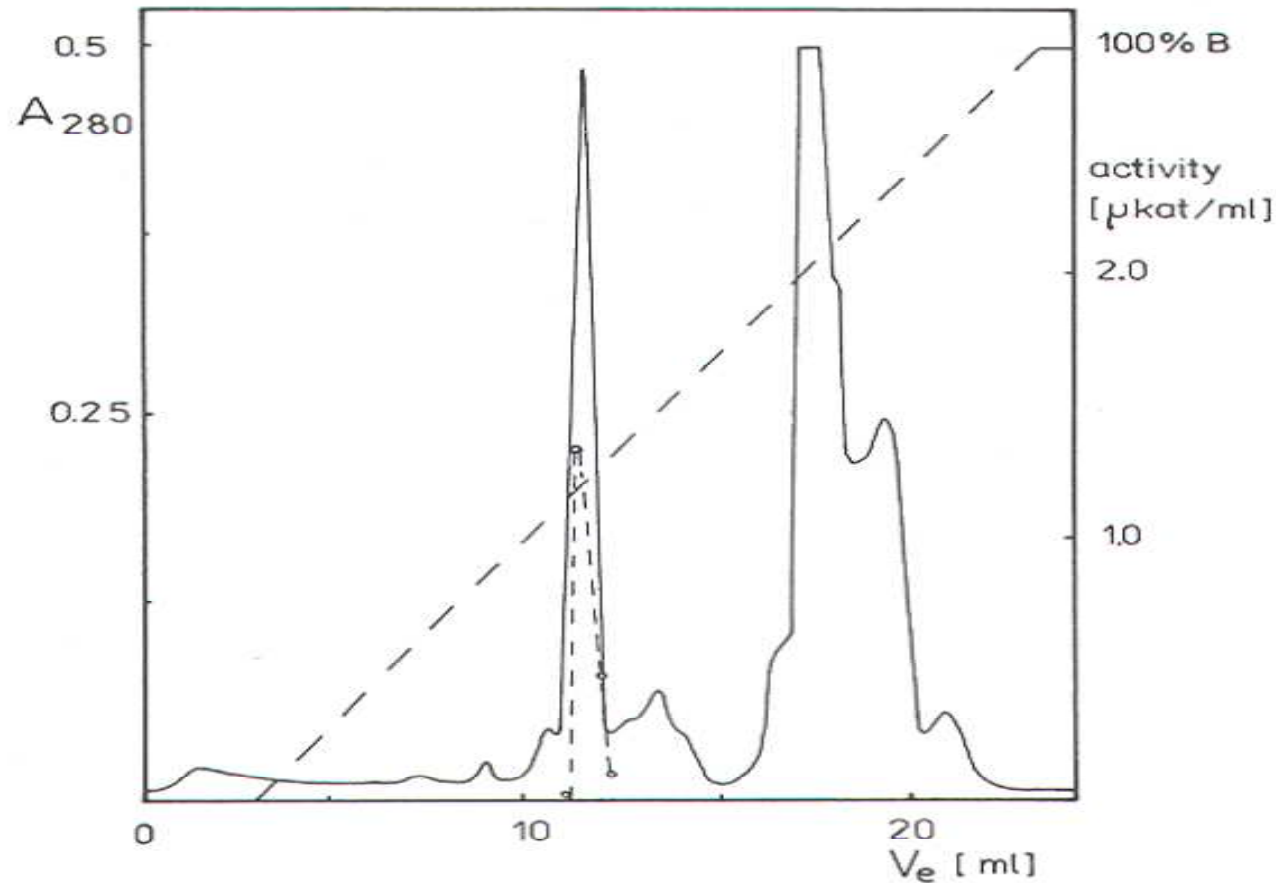


Fig. 2. Chromatography of partially purified G6P-DH on a Mono Q column. Buffers: (A) 0.05 M sodium phosphate (pH 7.4); (B) same as A but with 1 M sodium chloride; flow-rate, 1 ml/min. Lines symbol as in Fig. 1. Approximately 10 mg of protein were applied to the column.

Hydrofobní chromatografie

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

Použití : purifikace bílkovin

Hydrofobní chromatografie

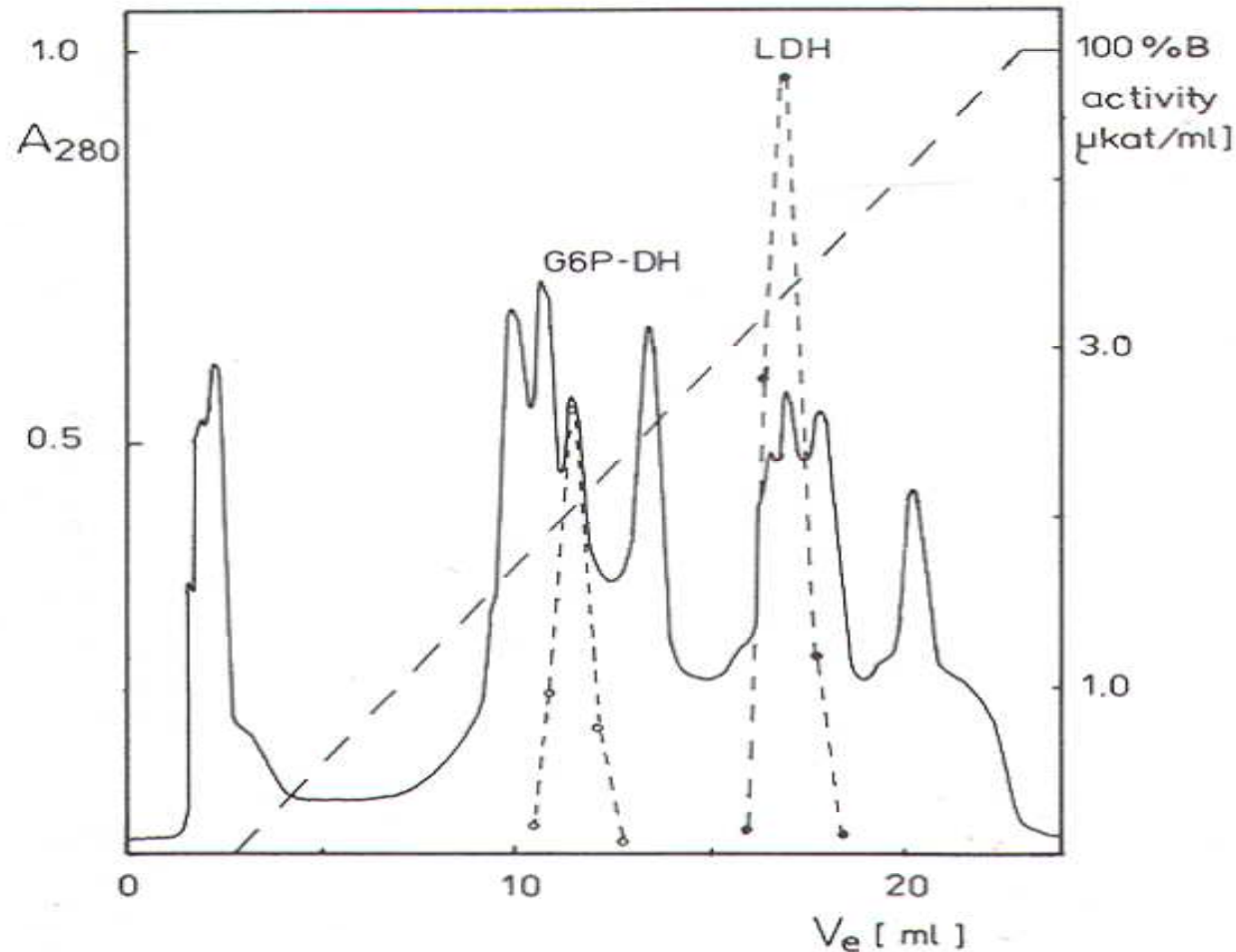
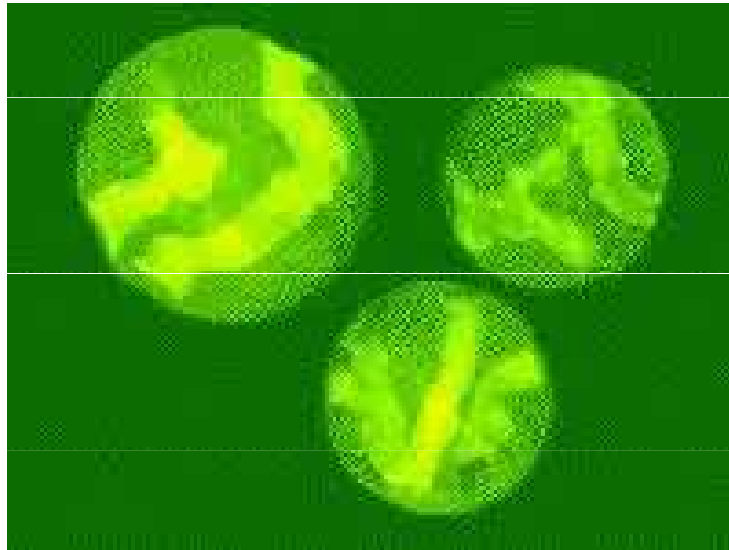


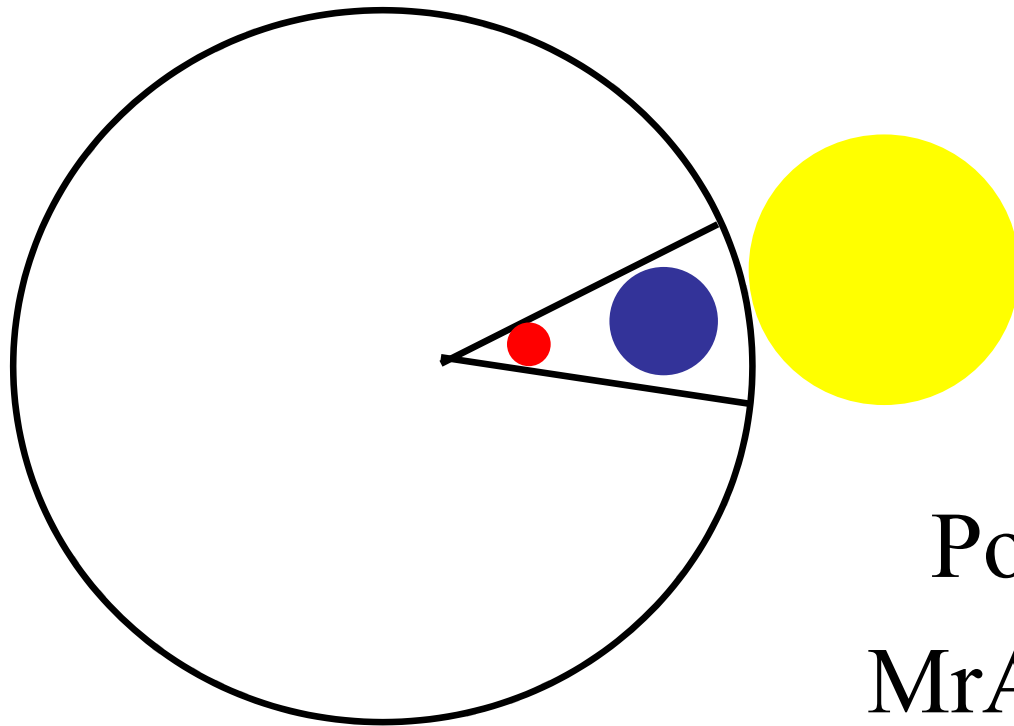
Fig. 1. Chromatography of crude enzyme preparation on a Phenyl-Superose column. Buffers: (A) 0.05 M sodium phosphate (pH 7.4) with 1.7 M sodium sulphate and 1 mM EDTA; (B) 0.05 M sodium phosphate (pH 7.4); flow-rate, 0.5 ml/min. V_e , elution volume; solid line, absorbance at 280 nm (A_{280}); dashed lines, gradient; (○) G6P-DH activity; (●) LDH activity. Approximately 10 mg of protein were applied to the column.

Gelová permeační chromatografie



Gelová permeační chromatografie

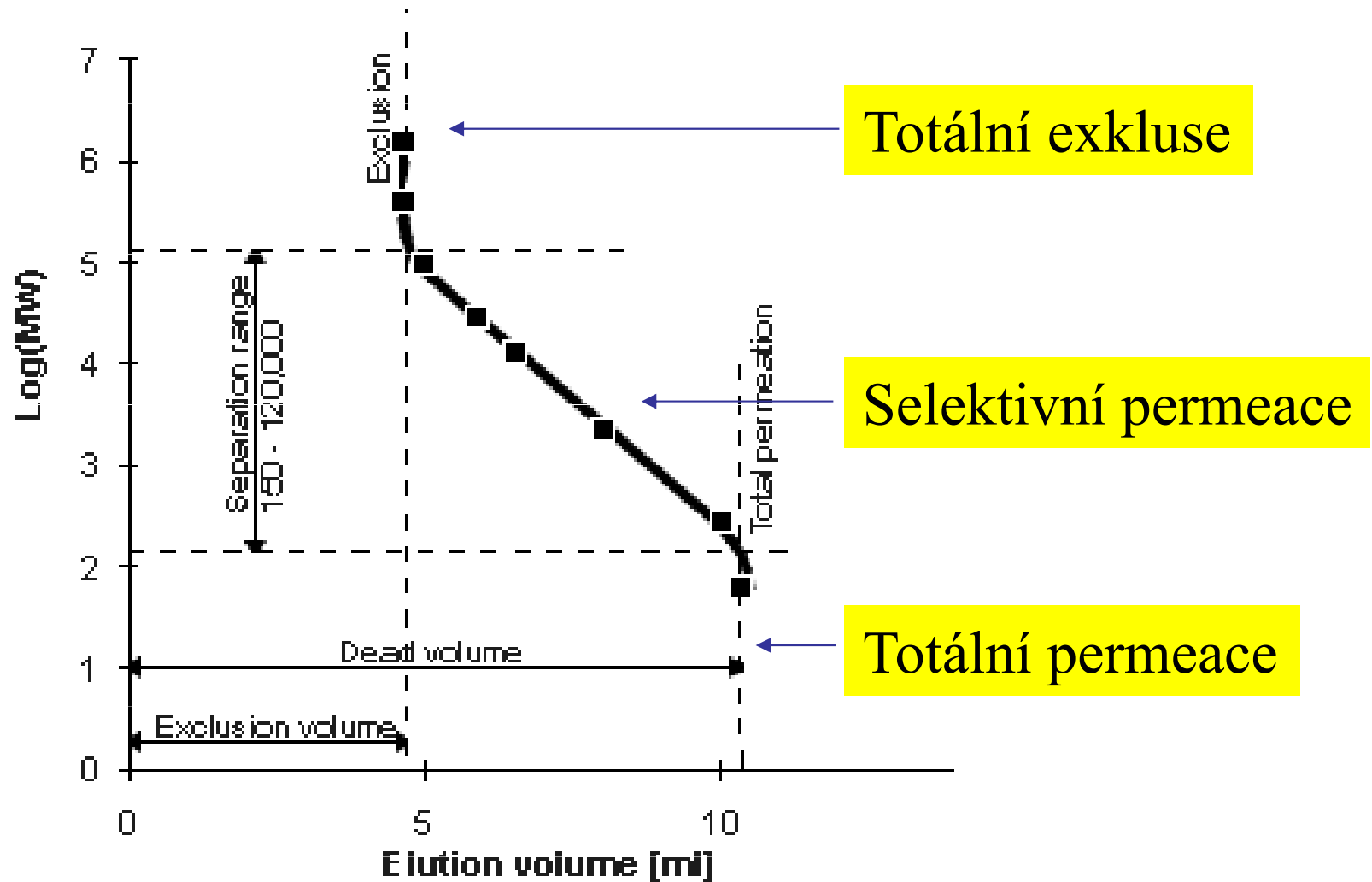
Princip - stérická exkluze
- omezená difuze



Pořadí eluce :

$MrA > MrB > MrC$

Gelová permeační chromatografie



Gelová permeační chromatografie

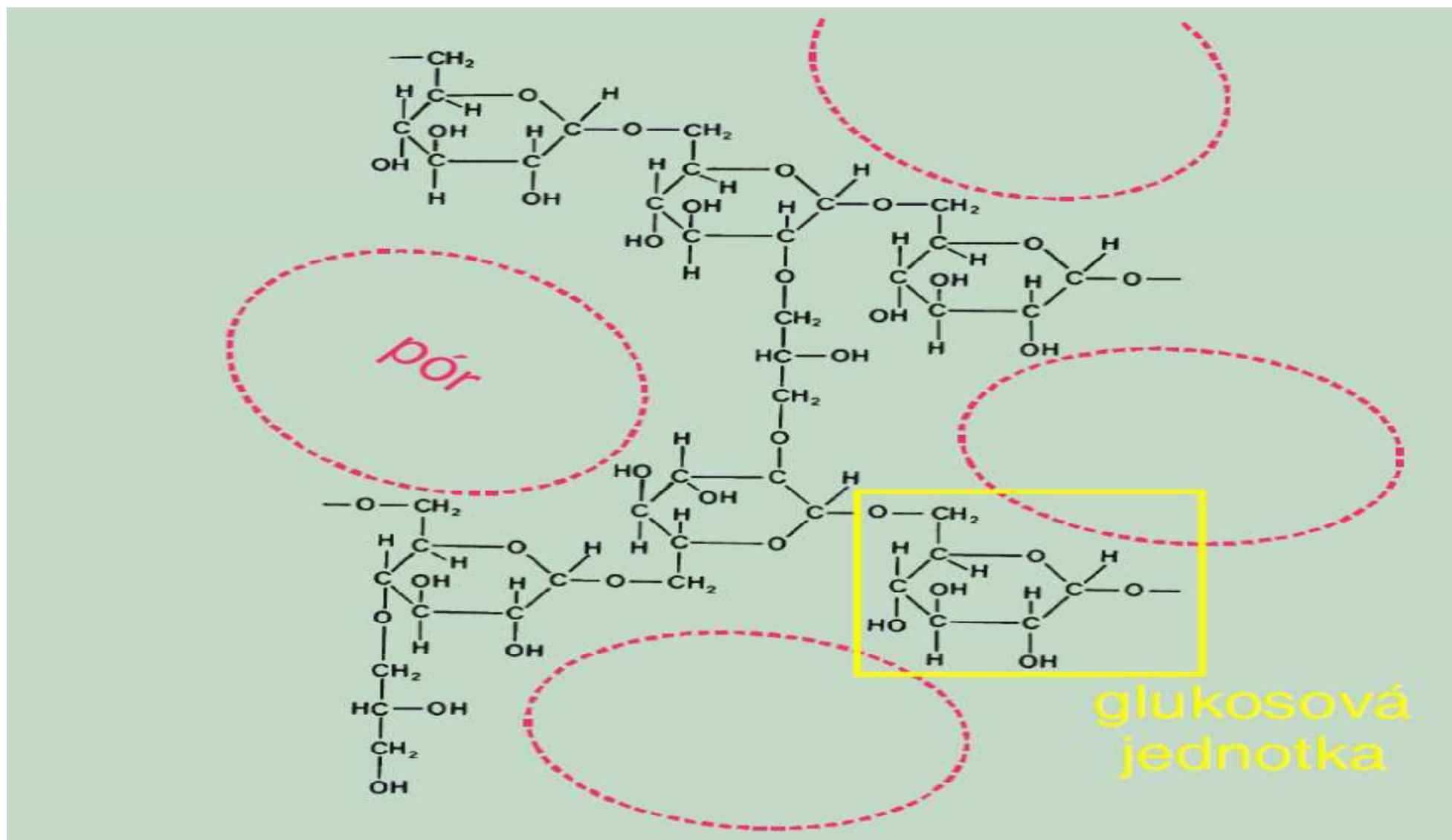
Pharmacia LPC

- Sephadex dextran
- Sepharose agarosa
- Sephacryl glukosa + akryamid
- Sephacel cellulosa

Pharmacia FPLC

- Superose agarosa
- Superdex síťovaná agarosa a dextran

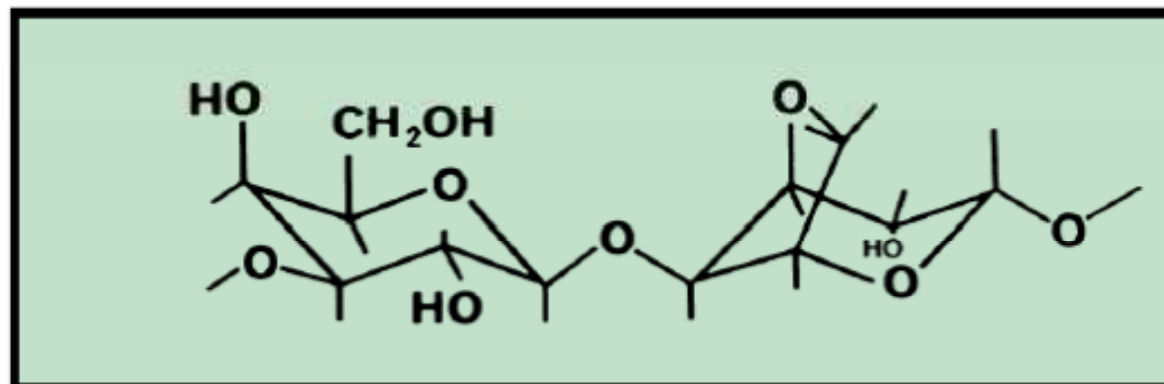
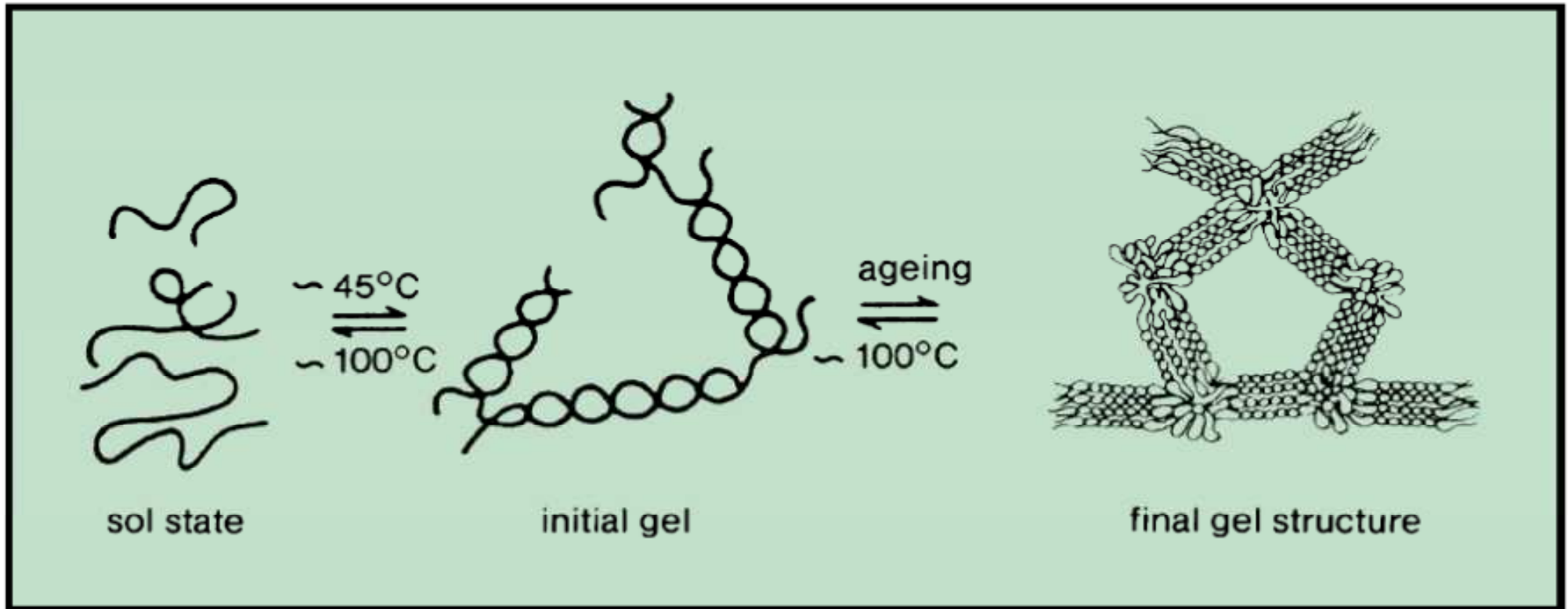
Sephadex



Sephadex

Gel type	Dry bead size μm	Fractionation range		Fractionation range		Swelling factor ml/g
		Globular proteins		Dextrans		
Sephadex G-10	40 – 120	–	700	–	700	2 – 3
Sephadex G-15	40 – 120	–	1 500	–	1 500	2.5 – 3.5
Sephadex G-25 Coarse	100 – 300	1 000 –	5 000	100 –	5 000	4 – 6
Sephadex G-25 Medium	50 – 150	1 000 –	5 000	100 –	5 000	4 – 6
Sephadex G-25 Fine	20 – 80	1 000 –	5 000	100 –	5 000	4 – 6
Sephadex G-25 Superfine	10 – 40	1 000 –	5 000	100 –	5 000	4 – 6
Sephadex G-50 Coarse	100 – 300	1 500 –	30 000	500 –	10 000	9 – 11
Sephadex G-50 Medium	50 – 150	1 500 –	30 000	500 –	10 000	9 – 11
Sephadex G-50 Fine	20 – 80	1 500 –	30 000	500 –	10 000	9 – 11
Sephadex G-50 Superfine	10 – 40	1 500 –	30 000	500 –	10 000	9 – 11
Sephadex G-75	40 – 120	3 000 –	80 000	1 000 –	50 000	12 – 15
Sephadex G-75 Superfine	10 – 40	3 000 –	70 000	1 000 –	50 000	12 – 15
Sephadex G-100	40 – 120	4 000 –	150 000	1 000 –	100 000	15 – 20
Sephadex G-100 Superfine	10 – 40	4 000 –	100 000	1 000 –	100 000	15 – 20
Sephadex G-150	40 – 120	5 000 –	300 000	1 000 –	150 000	20 – 30
Sephadex G-150 Superfine	10 – 40	5 000 –	150 000	1 000 –	150 000	18 – 22
Sephadex G-200	40 – 120	5 000 –	600 000	1 000 –	200 000	30 – 40
Sephadex G-200 Superfine	10 – 40	5 000 –	250 000	1 000 –	150 000	20 – 25

Sepharosa



Sepharosa

Gel type	Approx. % agarose	Bead size μm	Fractionation range Globular proteins.	Fractionation range Dextrans
Sepharose 6B	6	45 – 165	10 000 – 4 000 000	10 000 – 1 000 000
Sepharose 4B	4	45 – 165	60 000 – 20 000 000	30 000 – 5 000 000
Sepharose 2B	2	60 – 200	70 000 – 40 000 000	100 000 – 20 000 000

Gel type	Bead size μm	Fractionation range Globular proteins	Fractionation range Dextrans
Superose 12 prep grade	20 – 40	1 000 – 300 000	ND
Superose 12	8 – 12	1 000 – 300 000	ND
Superose 6 prep grade	20 – 40	5 000 – 5 000 000	ND
Superose 6	11 – 15	5 000 – 5 000 000	ND

Gelová permeační chromatografie

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

Použití : stanovení Mr, odsolování, purifikace

Gelová permeační chromatografie

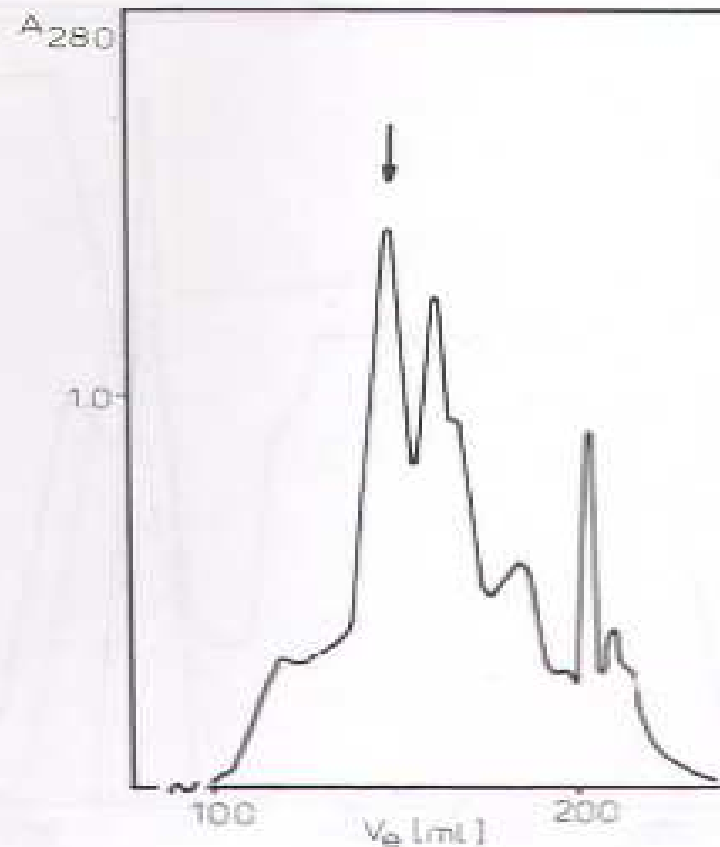


Figure 3

Chromatography of partially purified DAO on TSK 3000 SWG column. Buffer: 0.05 M potassium phosphate (pH 6.5) with 0.15 M sodium chloride; flow rate 5 ml/min. The symbols are as in Fig. 1. DAO activity is indicated by an arrow. Approximately 100 μ g of protein were applied to the column.

Gelová permeační chromatografie

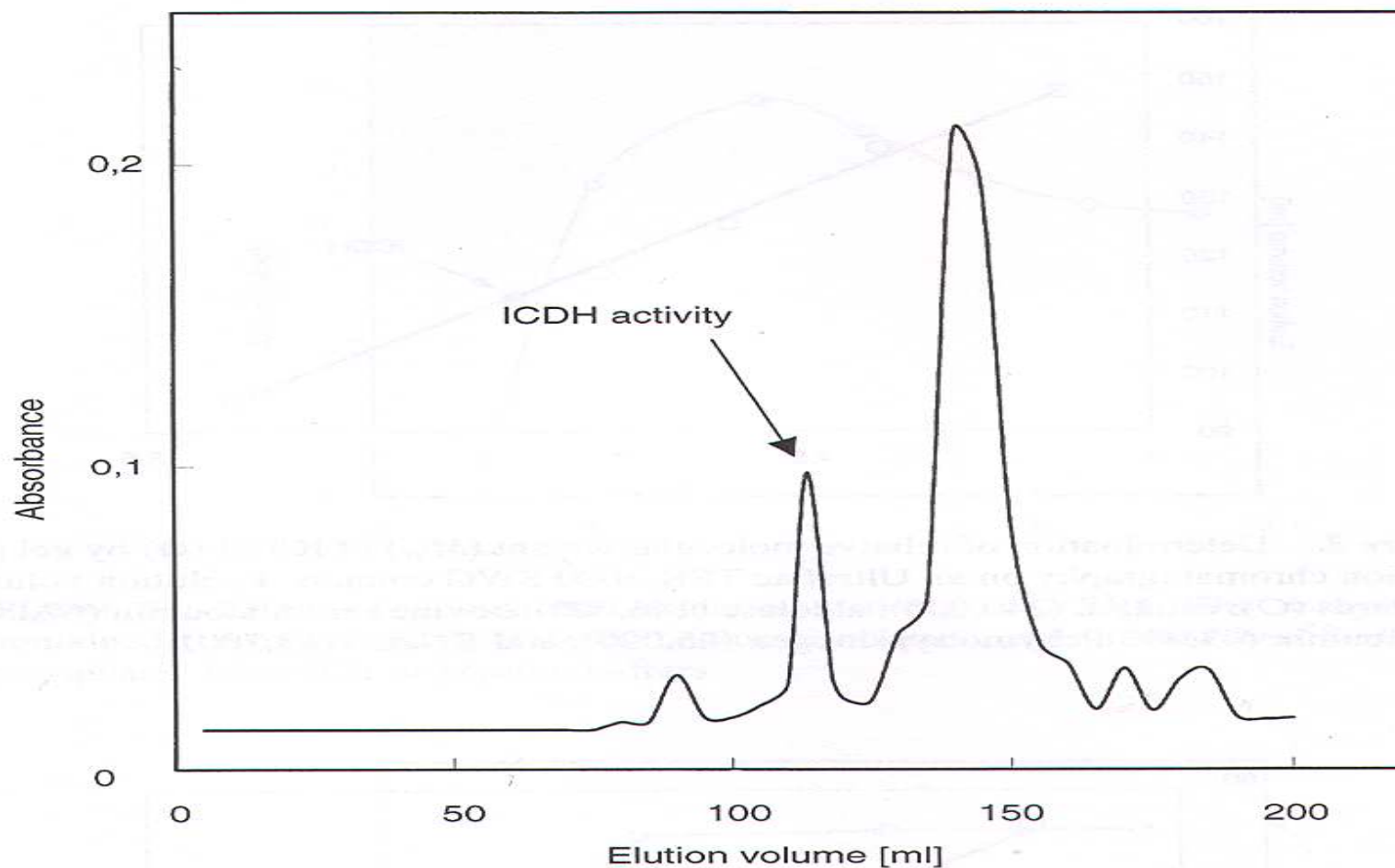


Figure 2. Chromatography of partially purified ICDH (after ammonium sulphate fractionation and ion exchange chromatography) on an UltraPac TSK G3000 SWG column. Buffer—20 mM sodium phosphate, pH 6.8; flow-rate 5 mL/min. (V_e) elution volume; (—) A_{280} ; (---) ICDH activity. Approximately 10 mg of protein was loaded onto the column.

Gelová permeační chromatografie

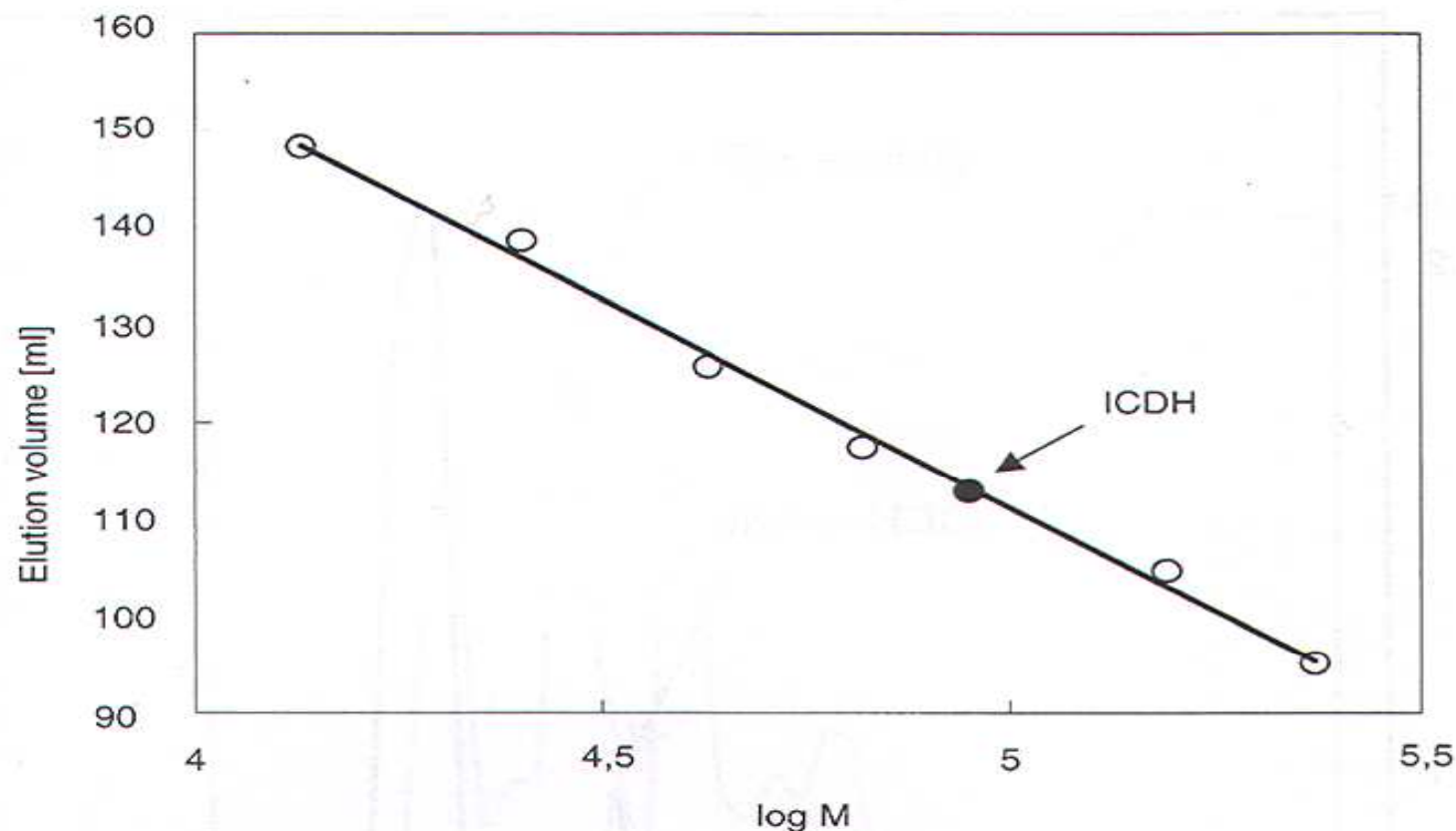
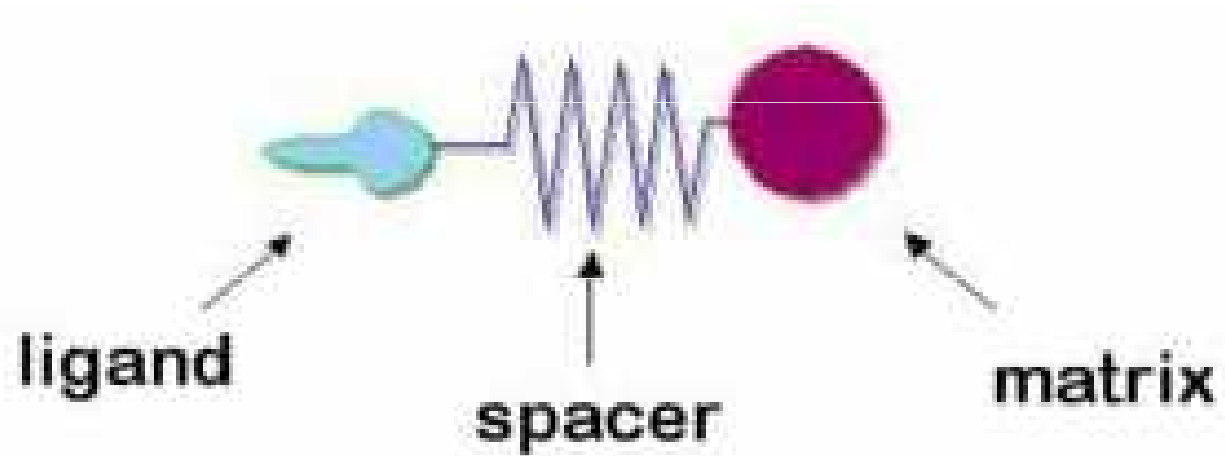
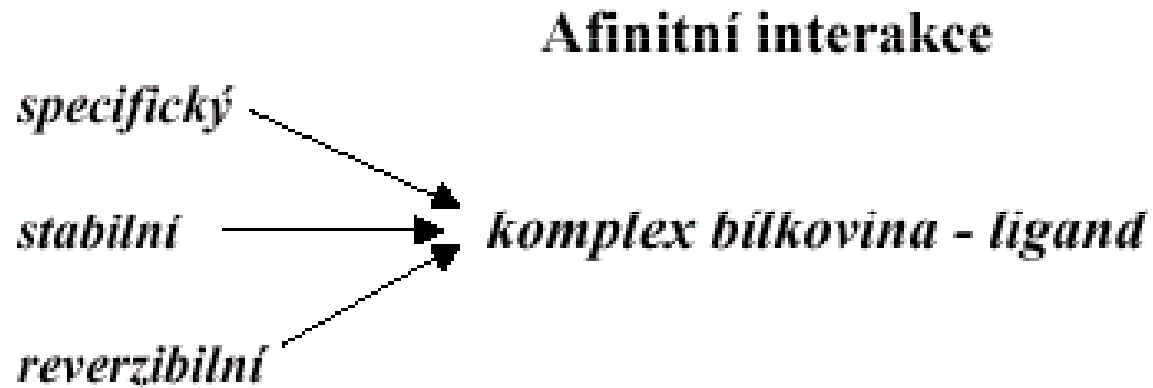


Figure 3. Determination of relative molecular weight (M_w) of ICDH (●) by gel permeation chromatography on an UltroPac TSK 3000 SWG column. V_e elution volume; standards (○): catalase (240,000), aldolase (146,000), bovine serum albumin (67,000), ovalbumin (43,000), chymotrypsinogen (25,000), and RNase (13,700).

Afinní chromatografie



Afinní interakce



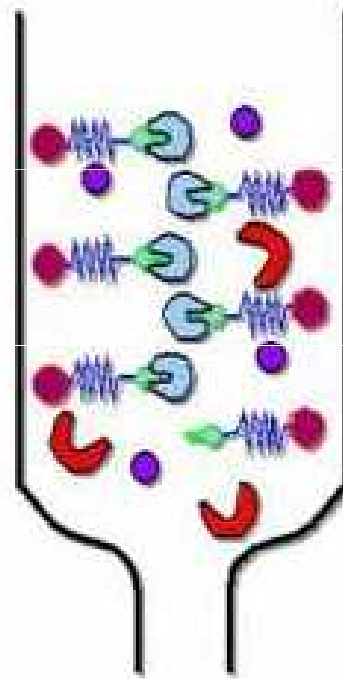
Afinní chromatografie nanesení vzorku



Afinní chromatografie

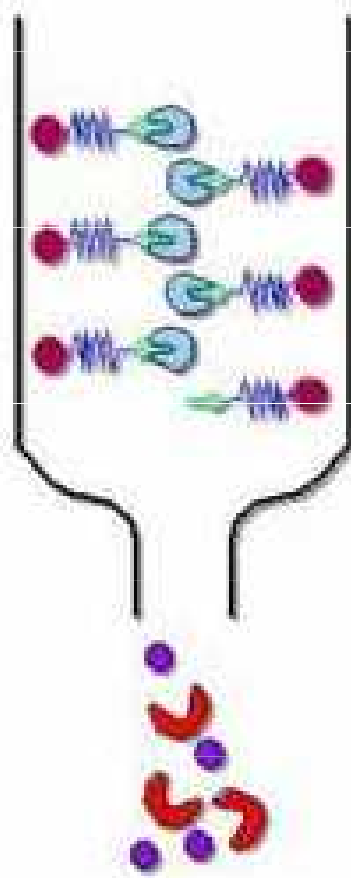
vznik interakce

SPECIFICITA



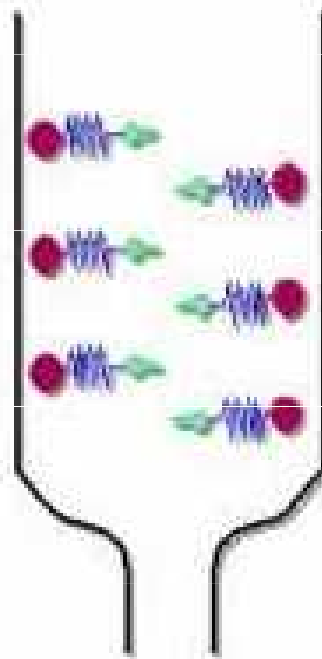
Afinní chromatografie vymytí balastů

STABILITA



Afinní chromatografie eluce

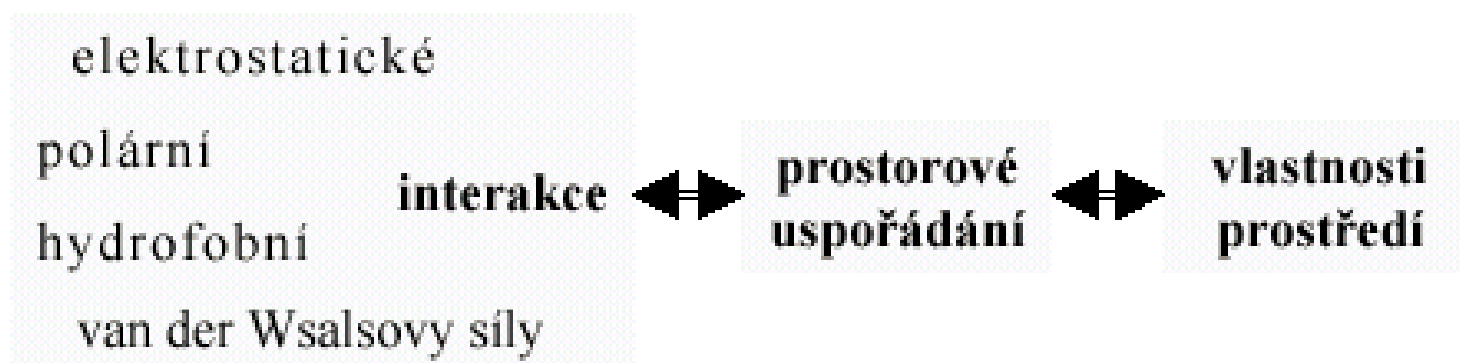
REVERZIBILITA



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	$10^{-14} - 10^{-6}$

Afinní interakce



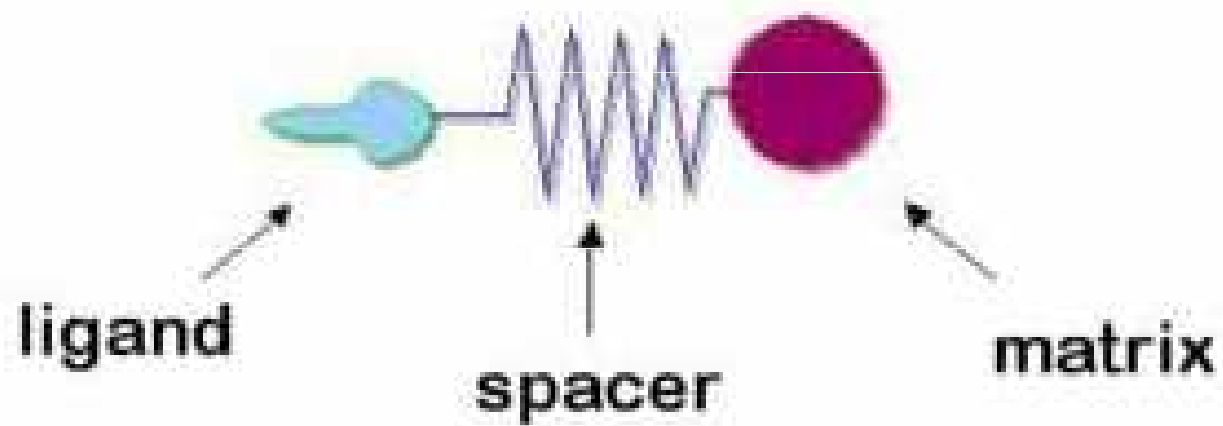
Předpoklady pro vznik komplexu

- Sterické – použití raménka (spacer)



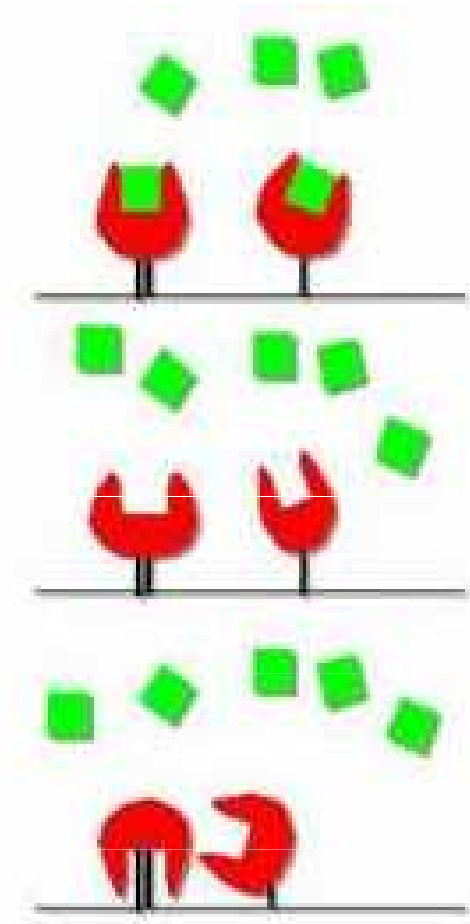
- Optimální pH, iontová síla

Afinní chromatografie



Předpoklady pro vznik komplexu

- Vazebné
- Konformační



Ligandy

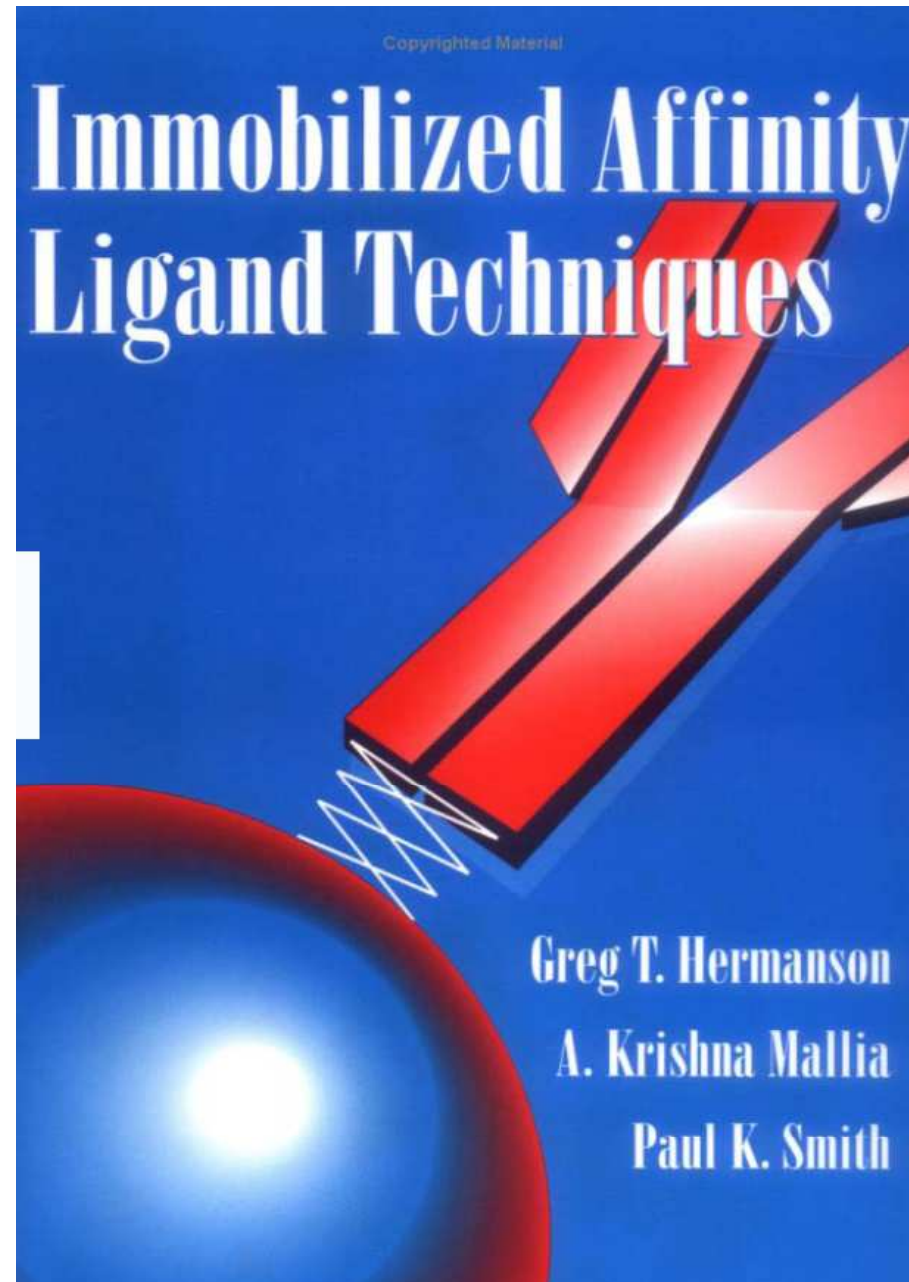
Monospecifické

- váží pouze jedinou biomakromolekulu
- nutné si připravovat individuálně

Skupinově specifické

- váží biomakromolekuly s podobnými vlastnostmi
- komerčně dostupné

Imobilizace ligandů



Skupinově specifické ligandy

skupinově specifický ligand	specifita
Protein A	Fc region IgG
Protein G	Fc region IgG
Lektiny	glukopyranosylové a mannopyranosylové skupiny
Cibacron Blue	široká skupina enzymů, NAD ⁺ dependentní enzymy, sérový albumin
Procion Red	NADP ⁺
Lysin	plasminogen, rRNA
Arginin	serinové proteasy
Benzamidin	serinové proteasy
Kalmodulin	proteiny regulované kalmodulinem
Heparin	kolagulační faktory, lipoproteiny, lipasy, hormony, steroidní receptory, nukleové kyseliny vázající enzymy
Streptavidin	Biotin a biotinylované látky
Oligo (dT, dA, ...)	mRNA, nukleasy
Kovové ionty	proteiny a peptidy obsahující dostupný His

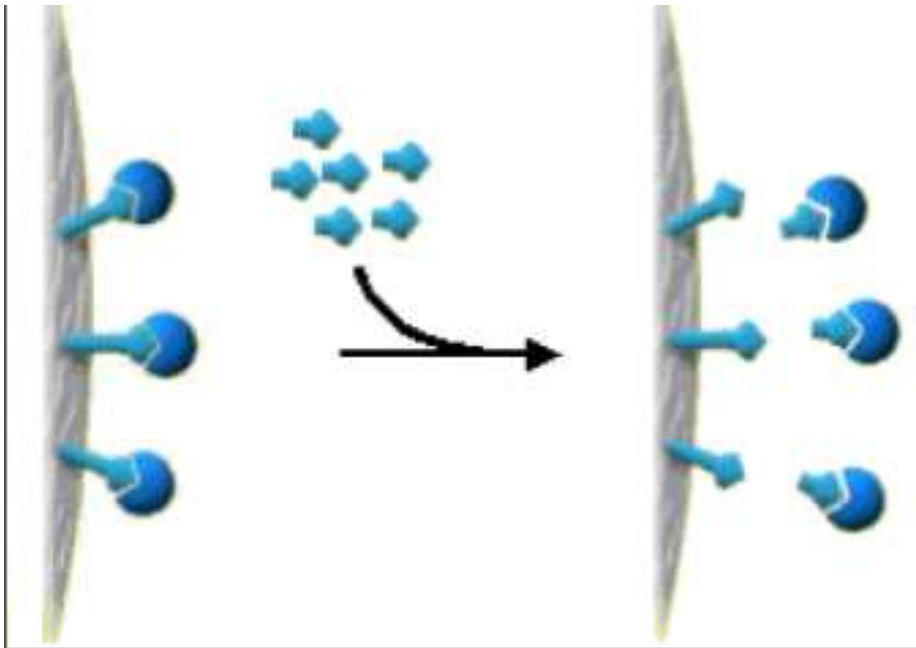
Provedení

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

Použití : analytické (stanovení K_D), purifikace

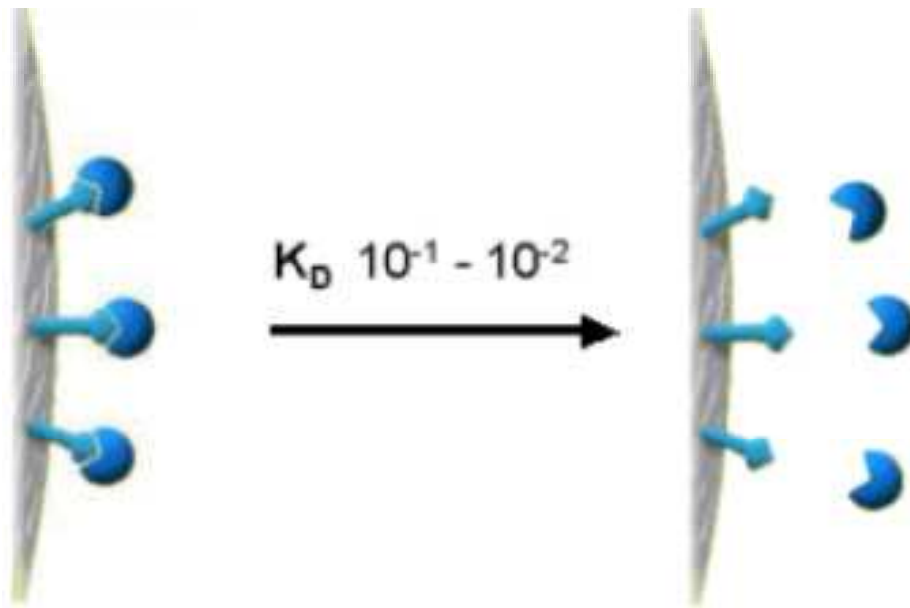
Eluce

- Eluce – selektivní - volným ligandem
nebo kompetičním činidlem



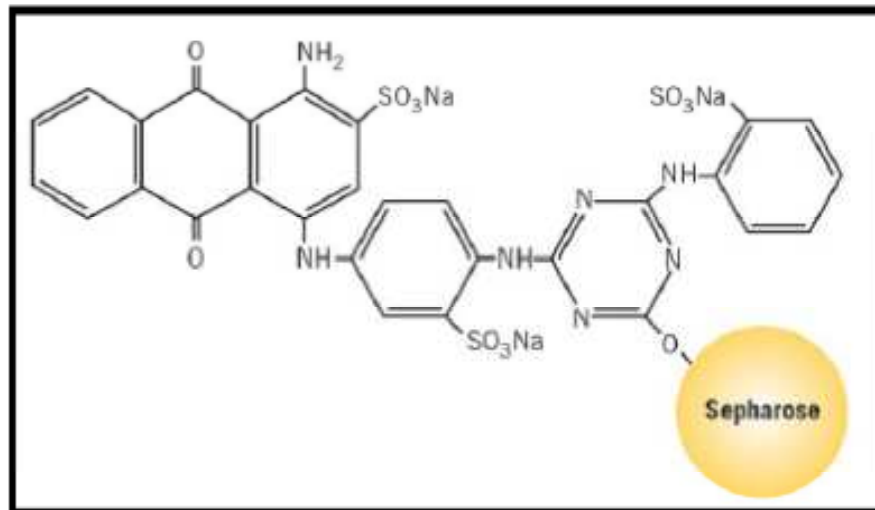
Eluce

- Eluce – neselektivní - změna pH,
iontové síly,
polarity



Skupinově specifické ligandy „dye ligand“

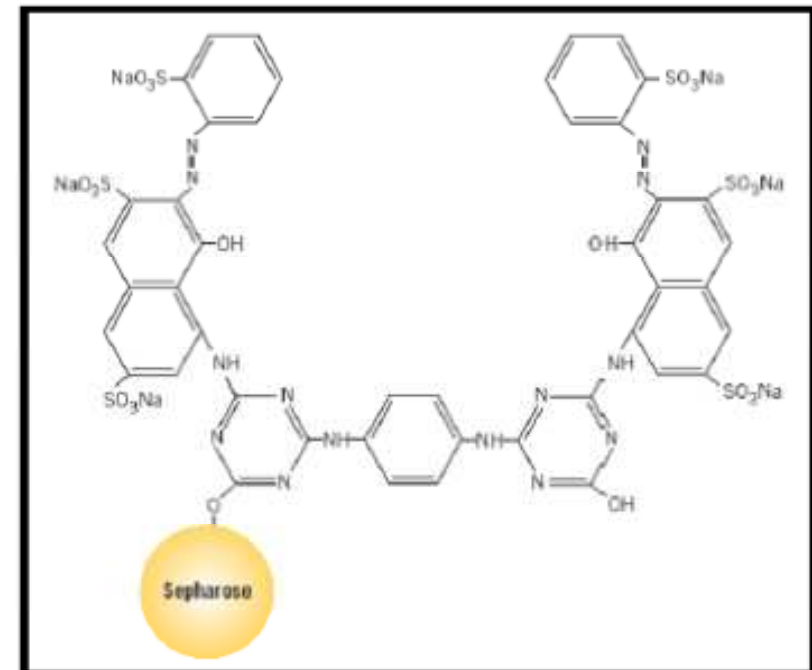
Cibacron™ Blue F3G-A
(Blue Sepharosa)



NAD^+

Dependentní dehydrogenasy

Procion™ Red
(Red Sepharosa)



NADP^+

Skupinově specifické ligandy

Cibacron Blue F4G-A

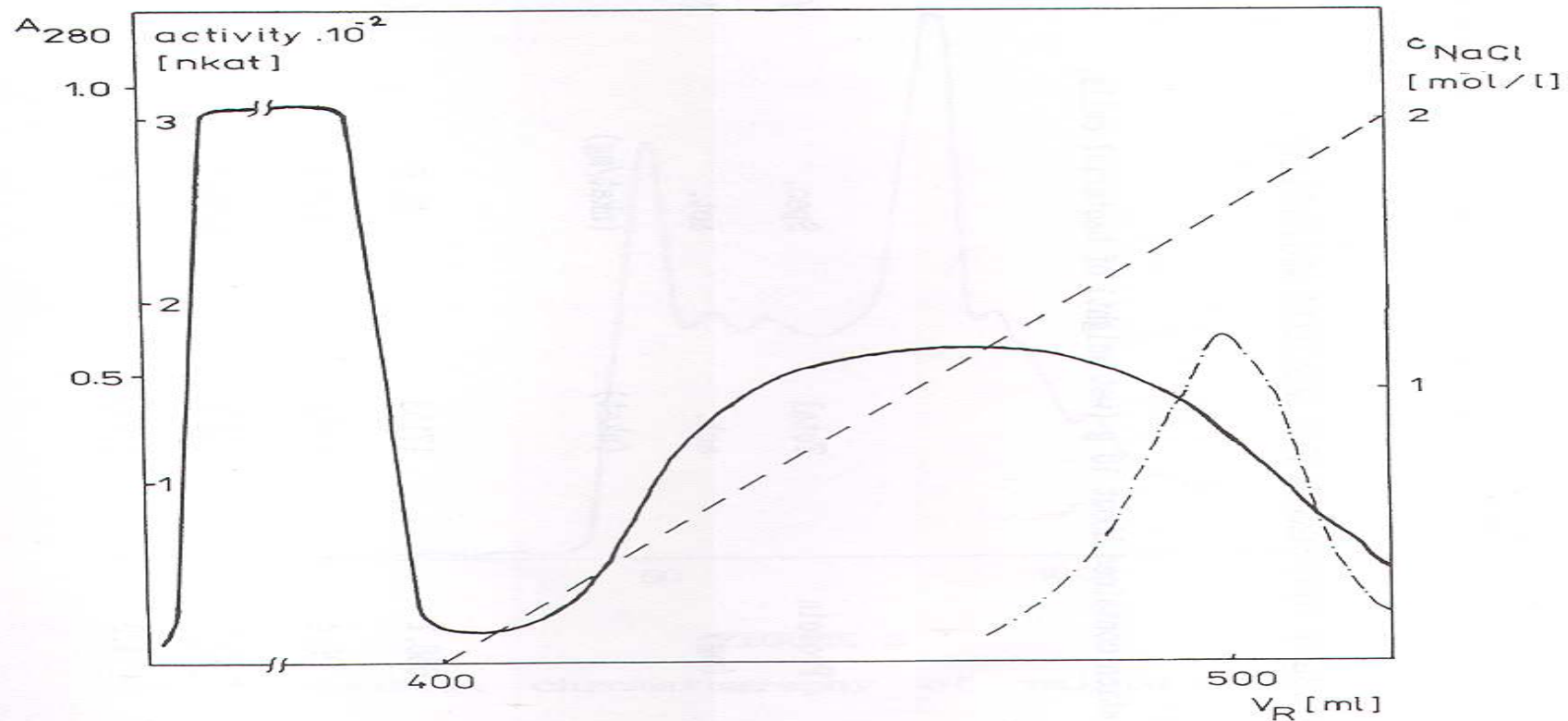
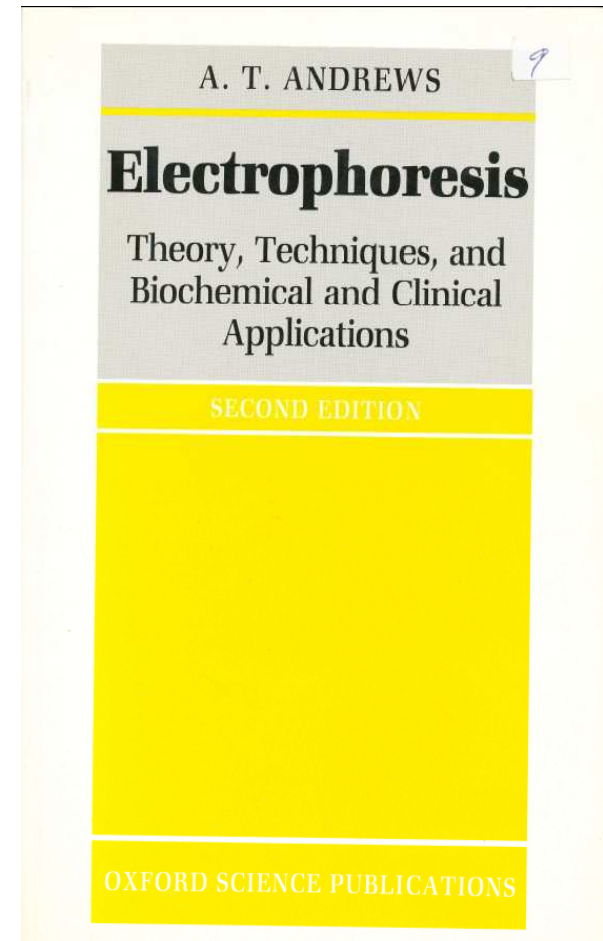
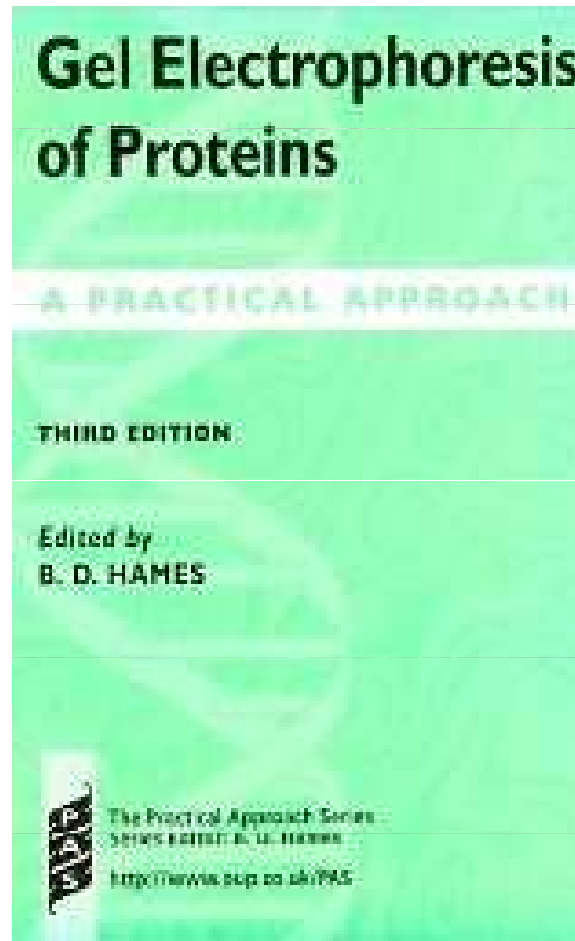
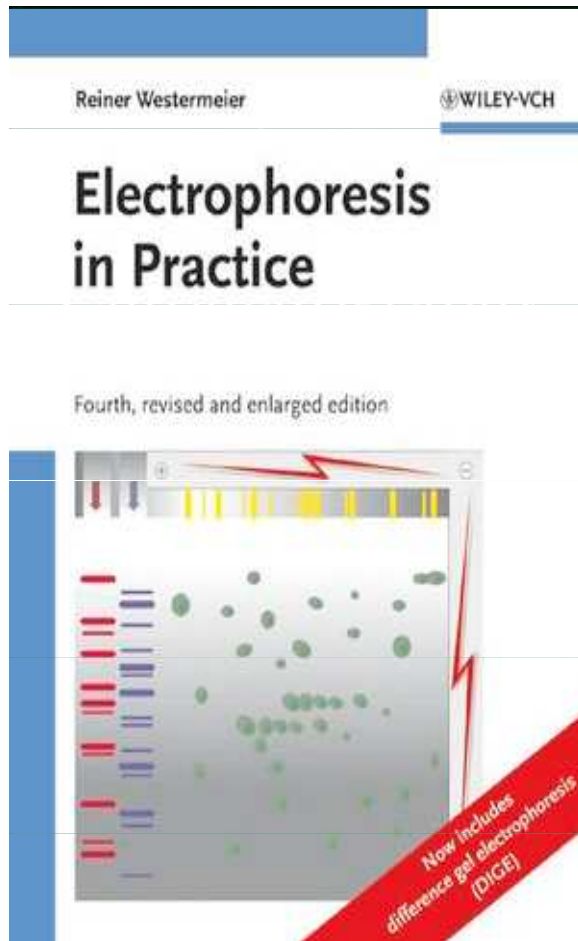


FIGURE 1

Affinity chromatography of malate dehydrogenase from *P.denitrificans* on Matrex Gel Blue A (step 2). V_e , elution volume; —, absorbance at 280 nm (A_{280}); -•-, enzyme activity; ----, NaCl gradient (buffer A, 0.02 mol/l sodium phosphate (pH 8.0); buffer B, the same as buffer A but with 1.8 mol/l NaCl and 5% ethylene glycol); flow rate, approx. 0.7 ml/min.

Elektromigrační metody

Literatura



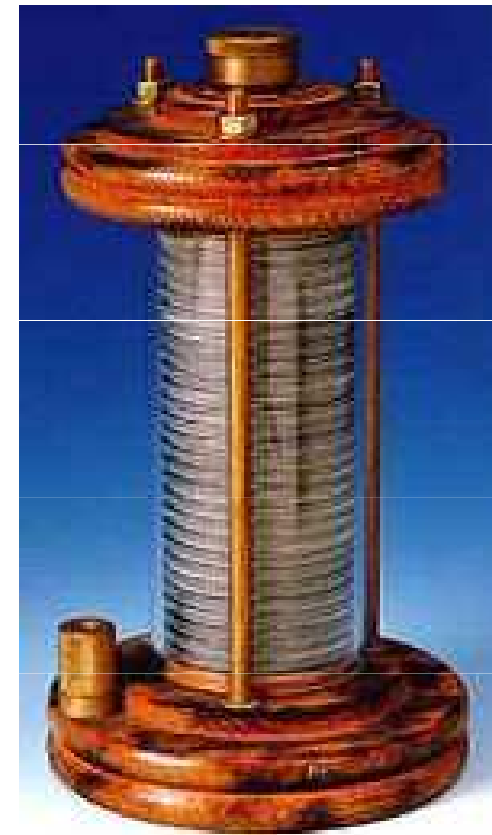
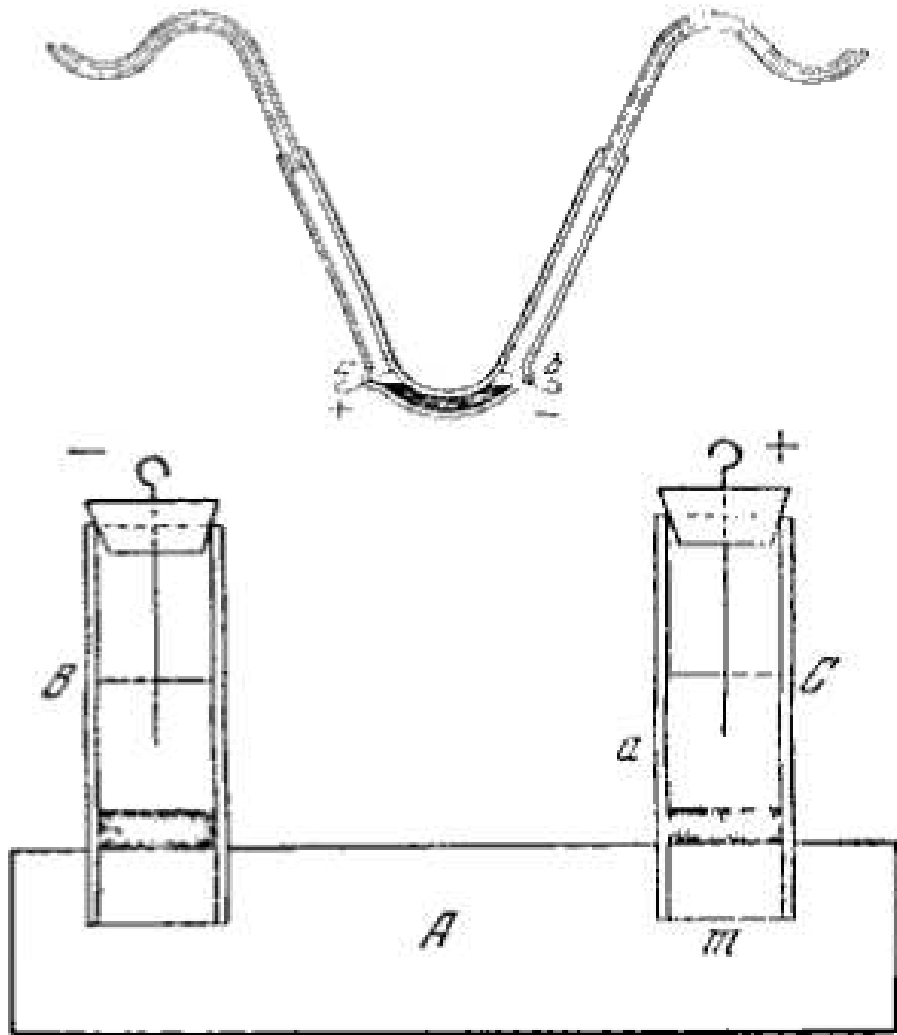
Podstata

*„Pohyb elektricky nabitých částic
v elektrickém poli“*

Frederic Reuss

(1807)

Katoforéza



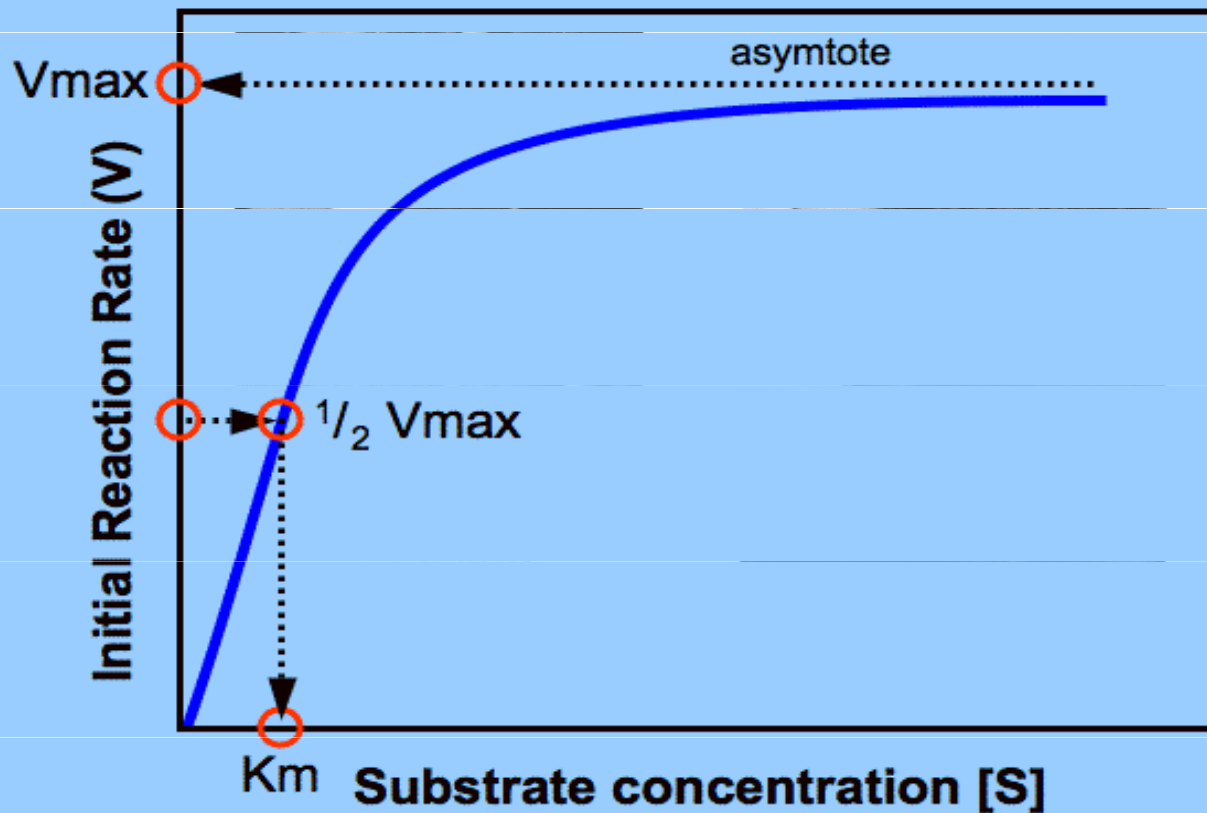
Elektroforéza

(1909)

Leonor Michaelis

Michaelis Menten Plot

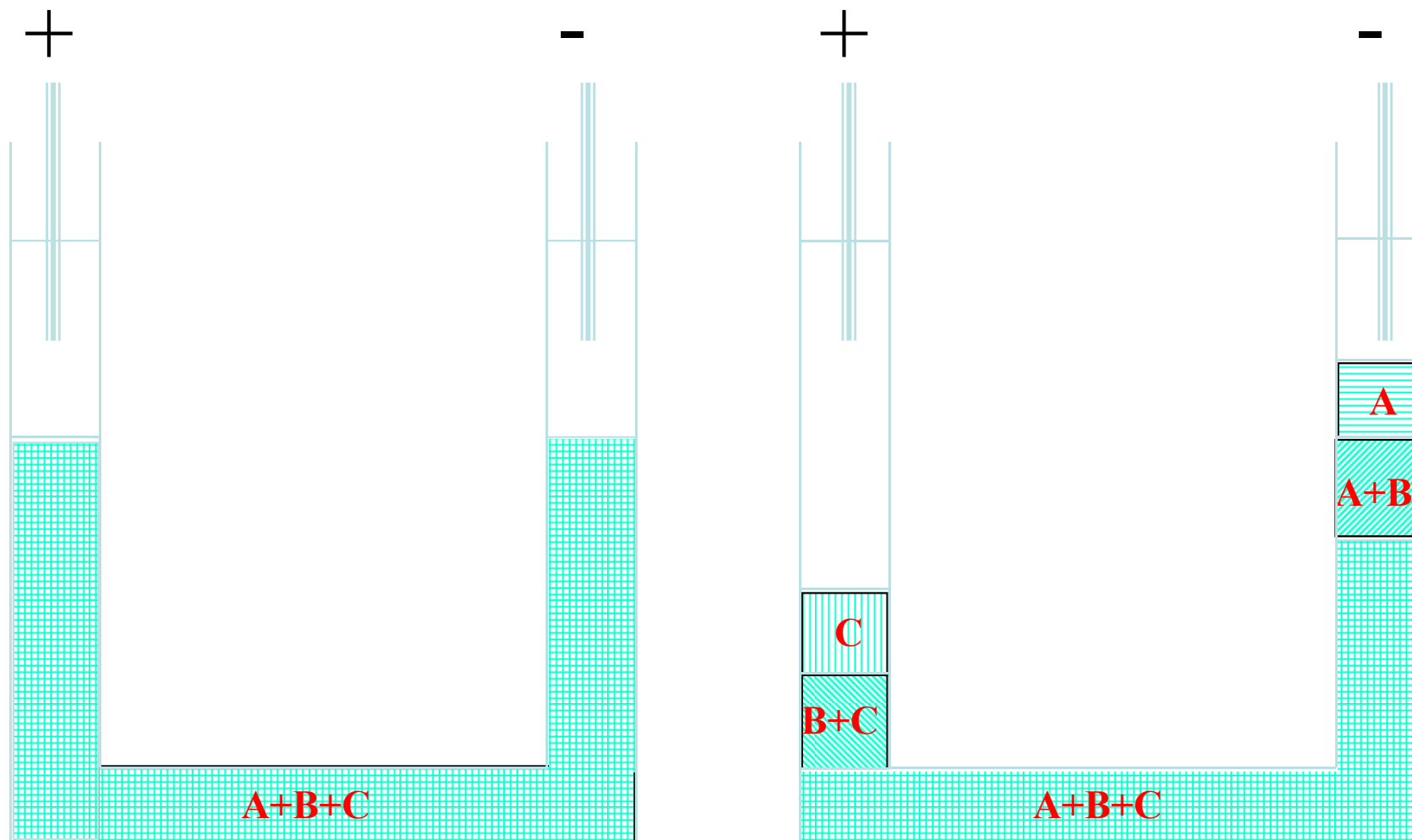
$$v = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{K_m + [S]}$$



Elektroforéza

- Volná
- Zónová

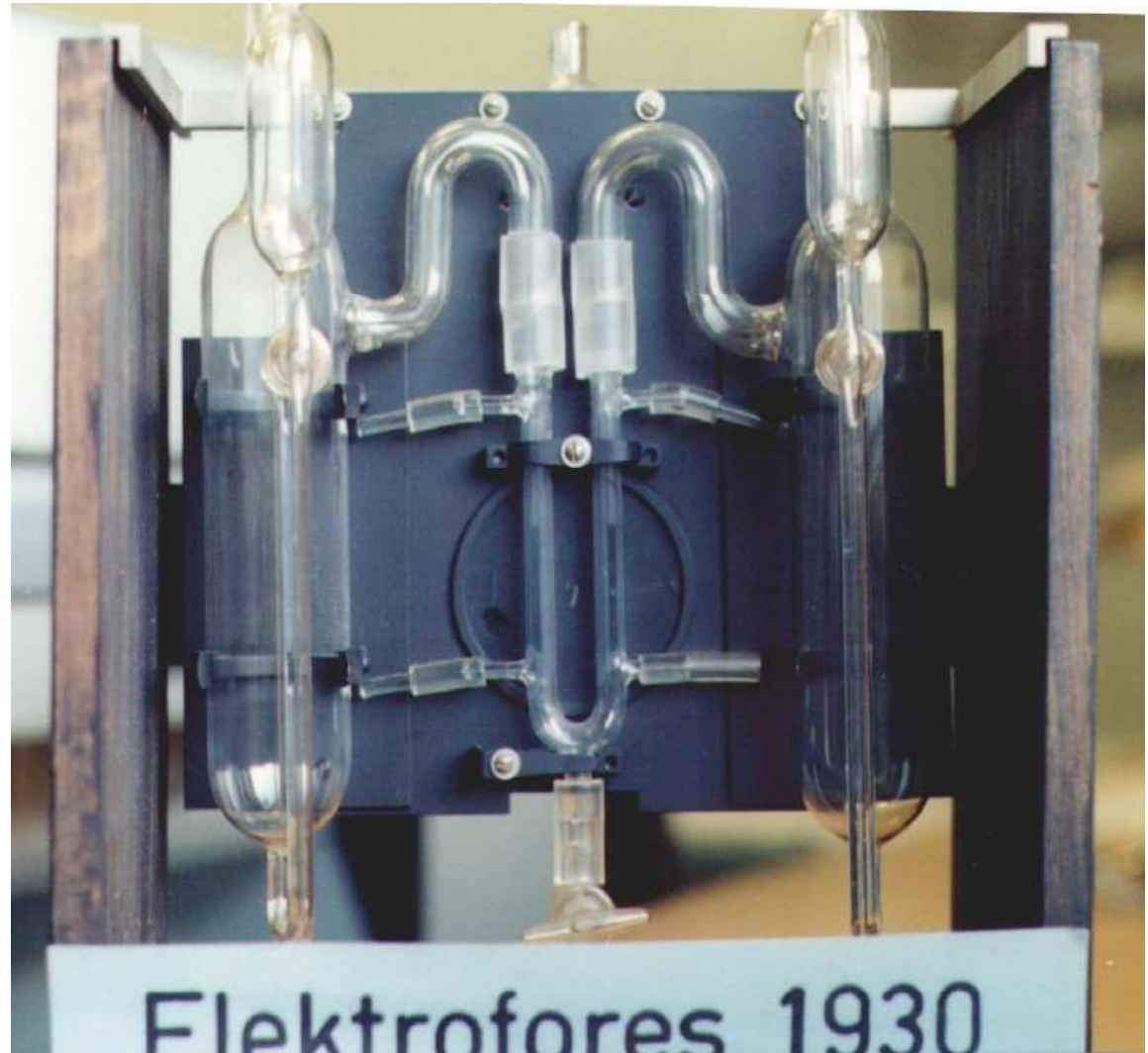
Volná elektroforéza



$$\mu_A > \mu_B > \mu_C$$

Volná elektroforéza

Arne Tiselius (1902 – 1971)



Volná elektroforéza

Arne Tiselius

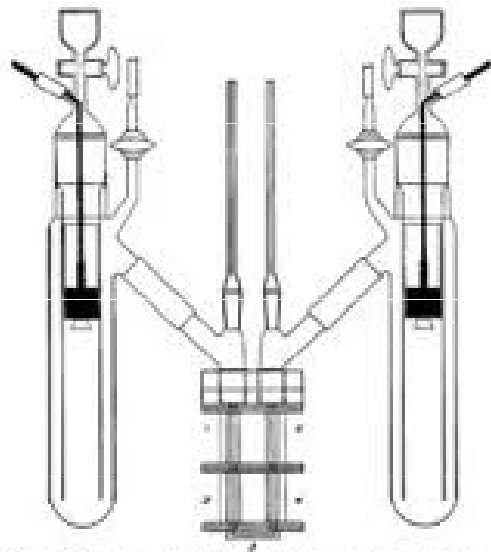
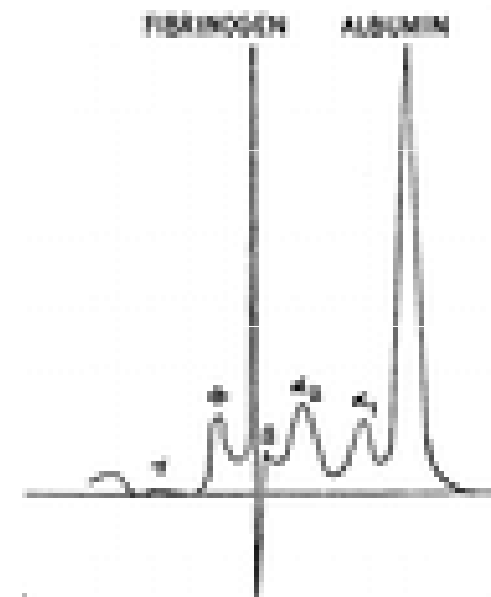


Fig. 3. Electrophoresis U-tube assembled with electrode containers for reversible electrodes.



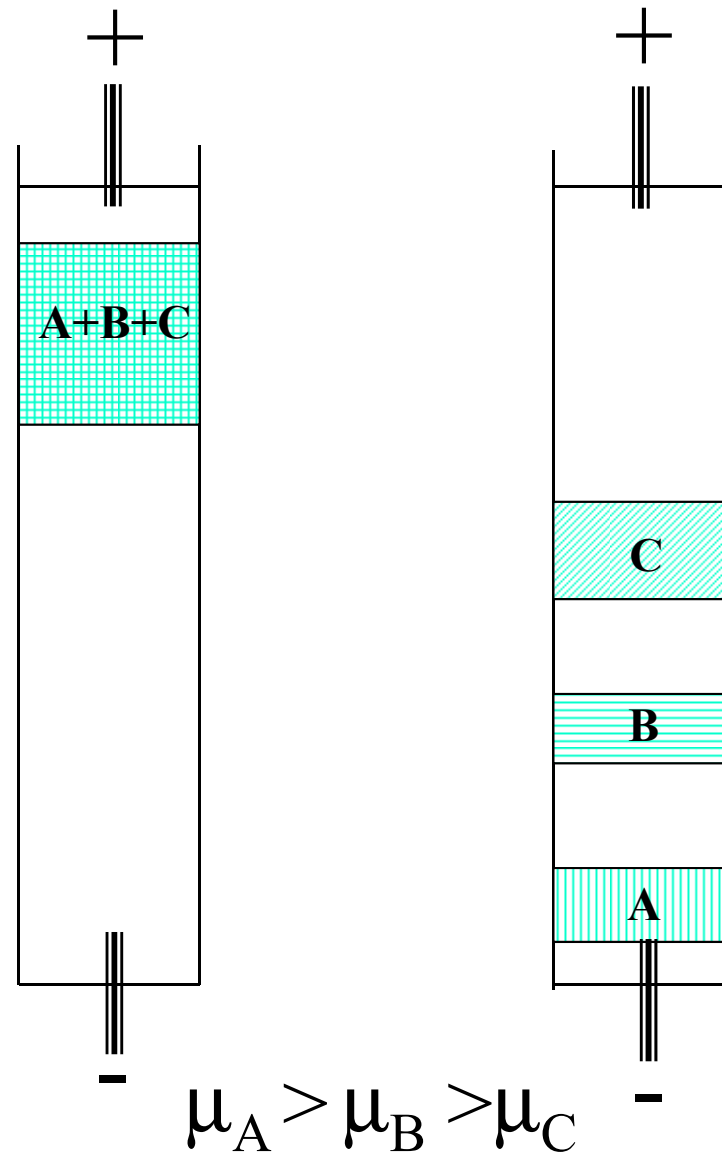
Volná elektroforéza

Arne Tiselius (1902 – 1971)

Nobelova cena 1948

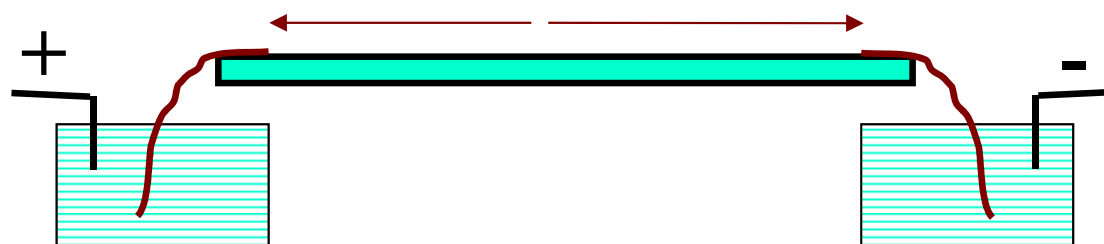


Zónová elektroforéza



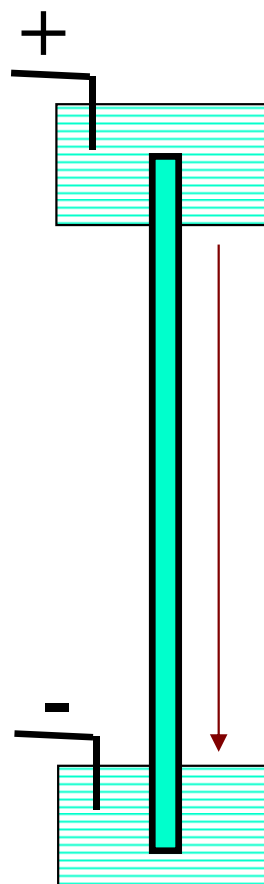
Upořádání

Horizontální



Upořádání

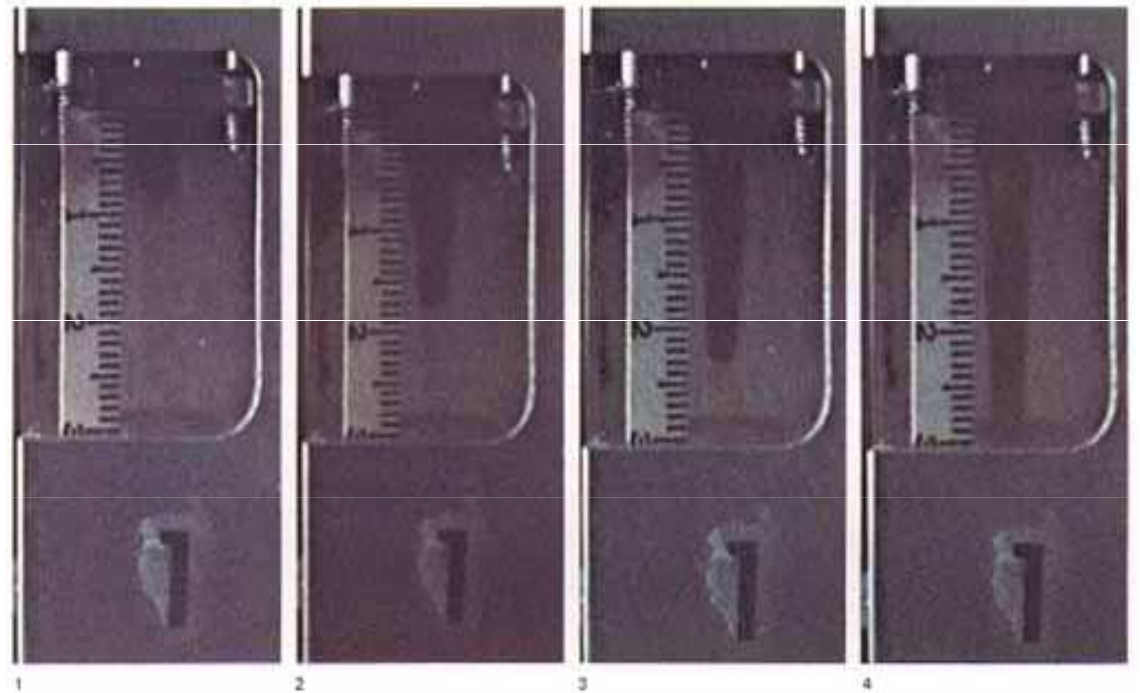
Vertikální



Skylab



Skylab



Stabilizace

- Rotací
- Gradienty hustoty
- Porézními medii
- Kapilárou

Porézní media

- 1939 *Papír*
- 1950 *Agarový gel*
- 1955 *Škrobový gel*
- **1957 Acetát celulosy**
- **1959 Polyacrylamidový gel**
- **1979 Agarosový gel**

Polyakrylamid

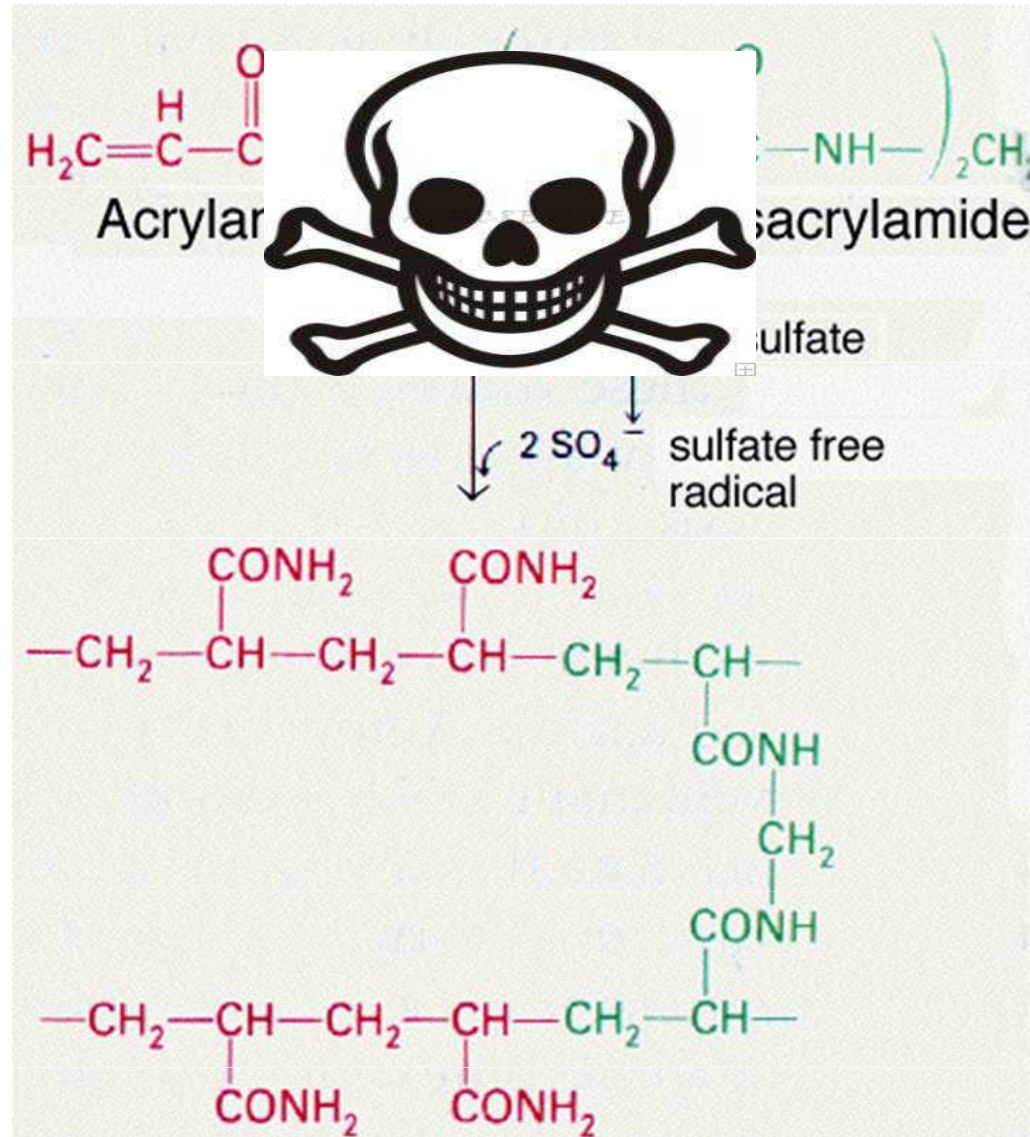
Složení – kopolymer akrylamidu a
N,N,- methylenbisakrylamidu

+ plně splňuje požadavky

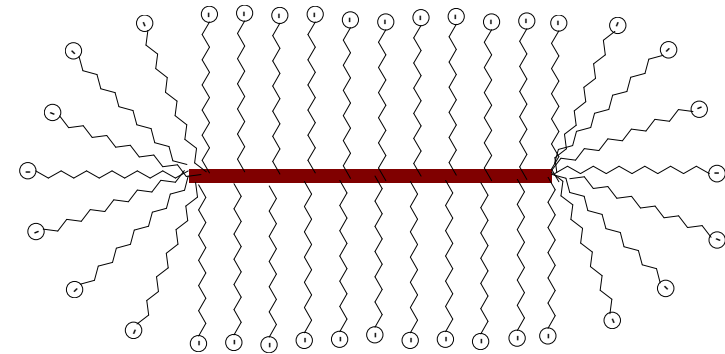
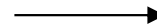
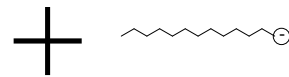
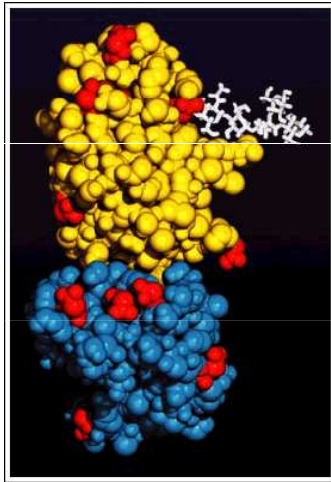
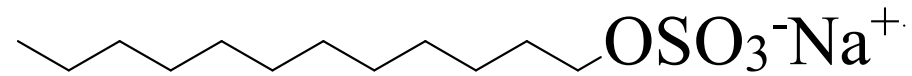
- **Monomery jsou neurotoxiny !!!!!!!**

Použití : analýza bílkovin

Polyakrylamid

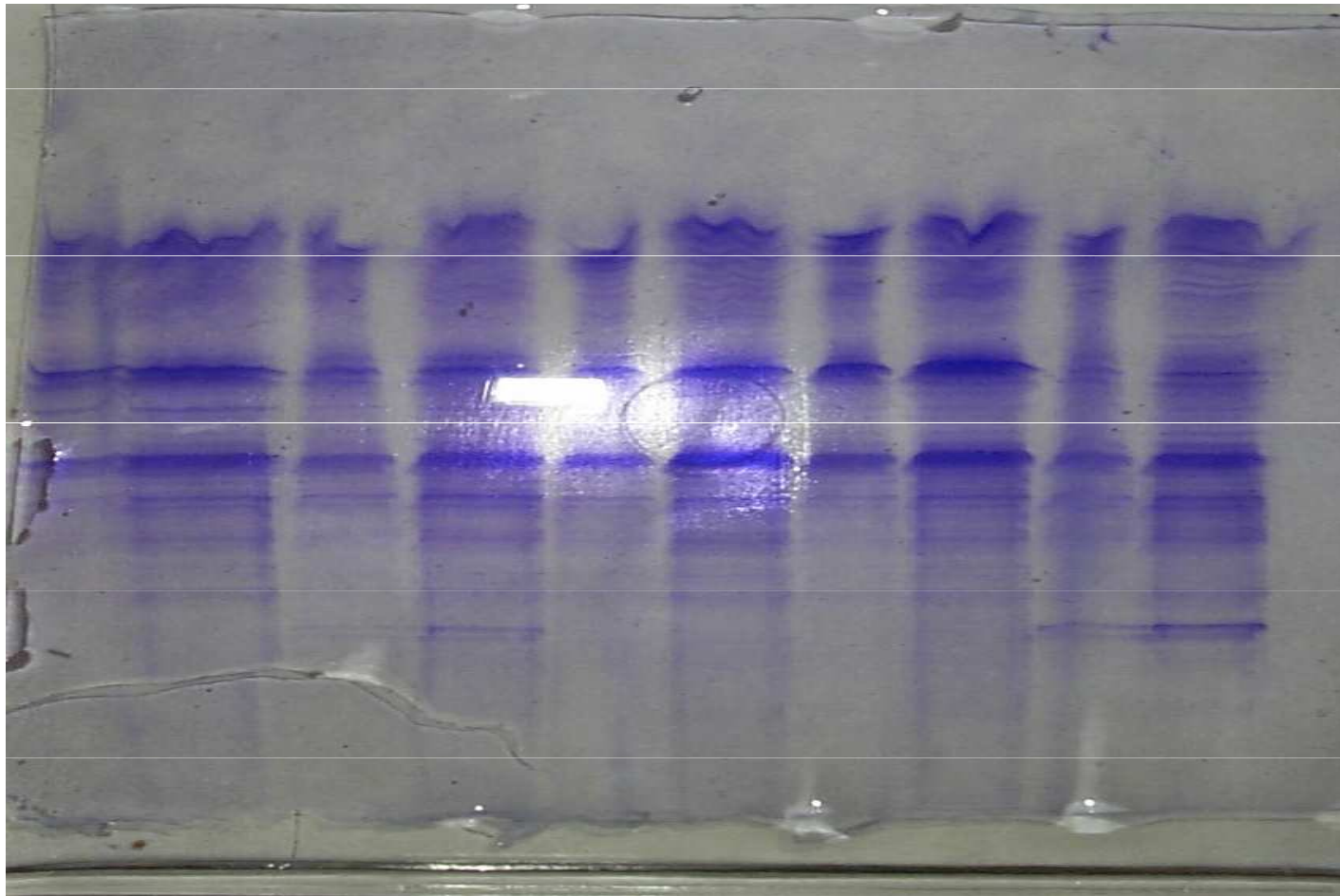


SDS PAGE



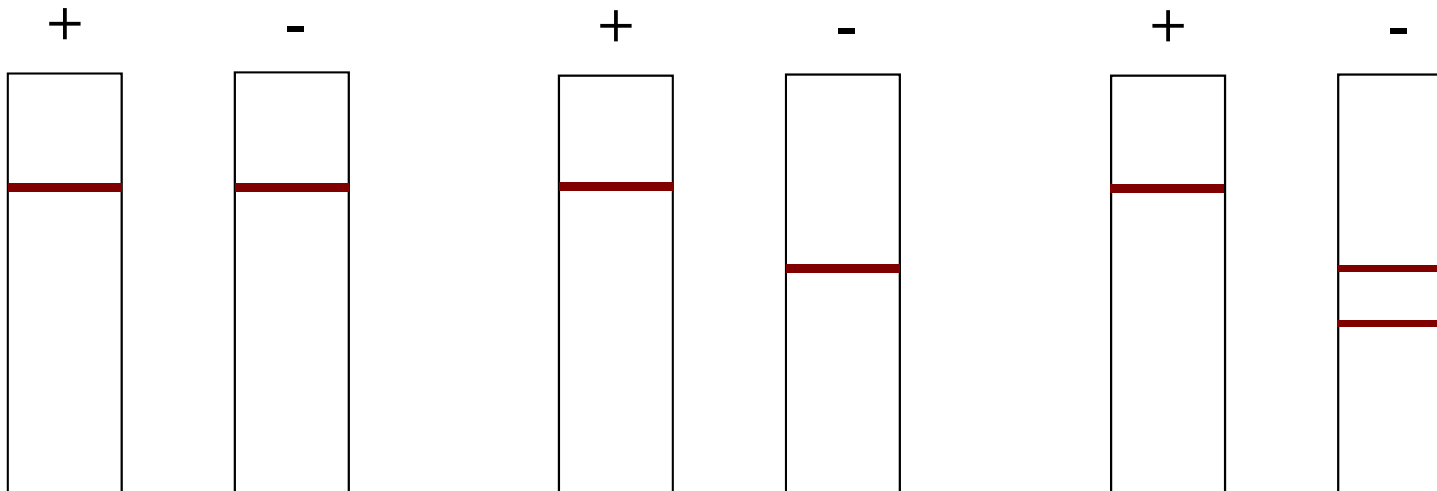
1 g bílkoviny váže 1.4 g SDS \Rightarrow
uniformní náboj na jednotku MW

SDS PAGE

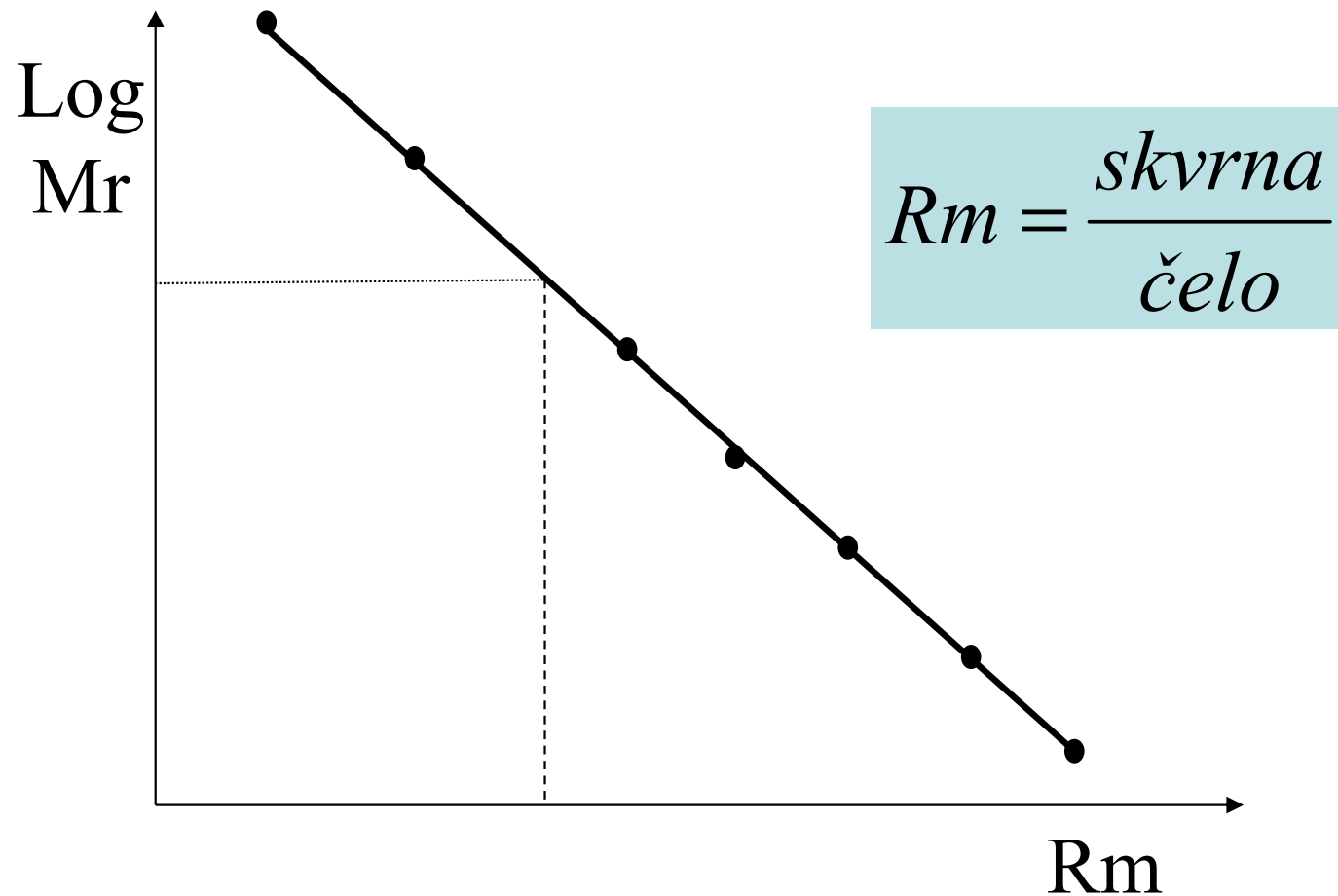


Použití SDS PAGE

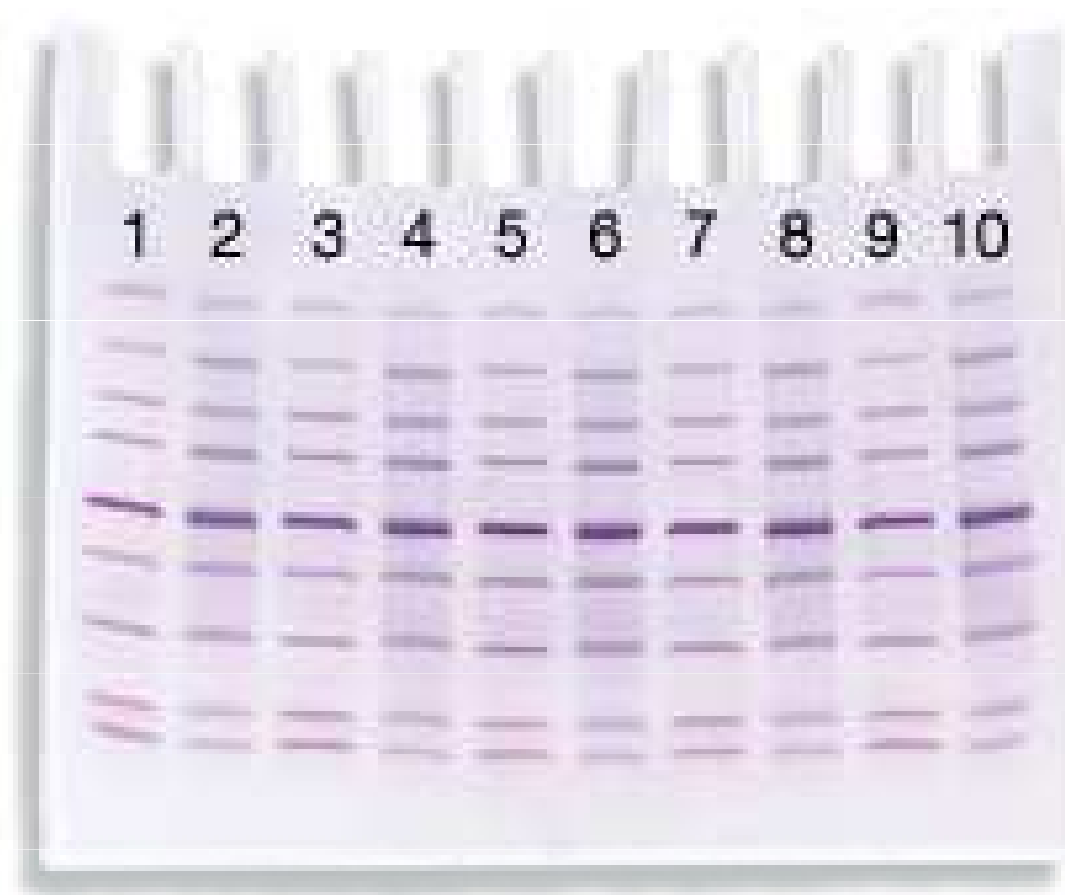
- Stanovení Mr
- Analýza komplexních směsí
- Sledování purifikace bílkovin
- Stanovení podjednotkového složení



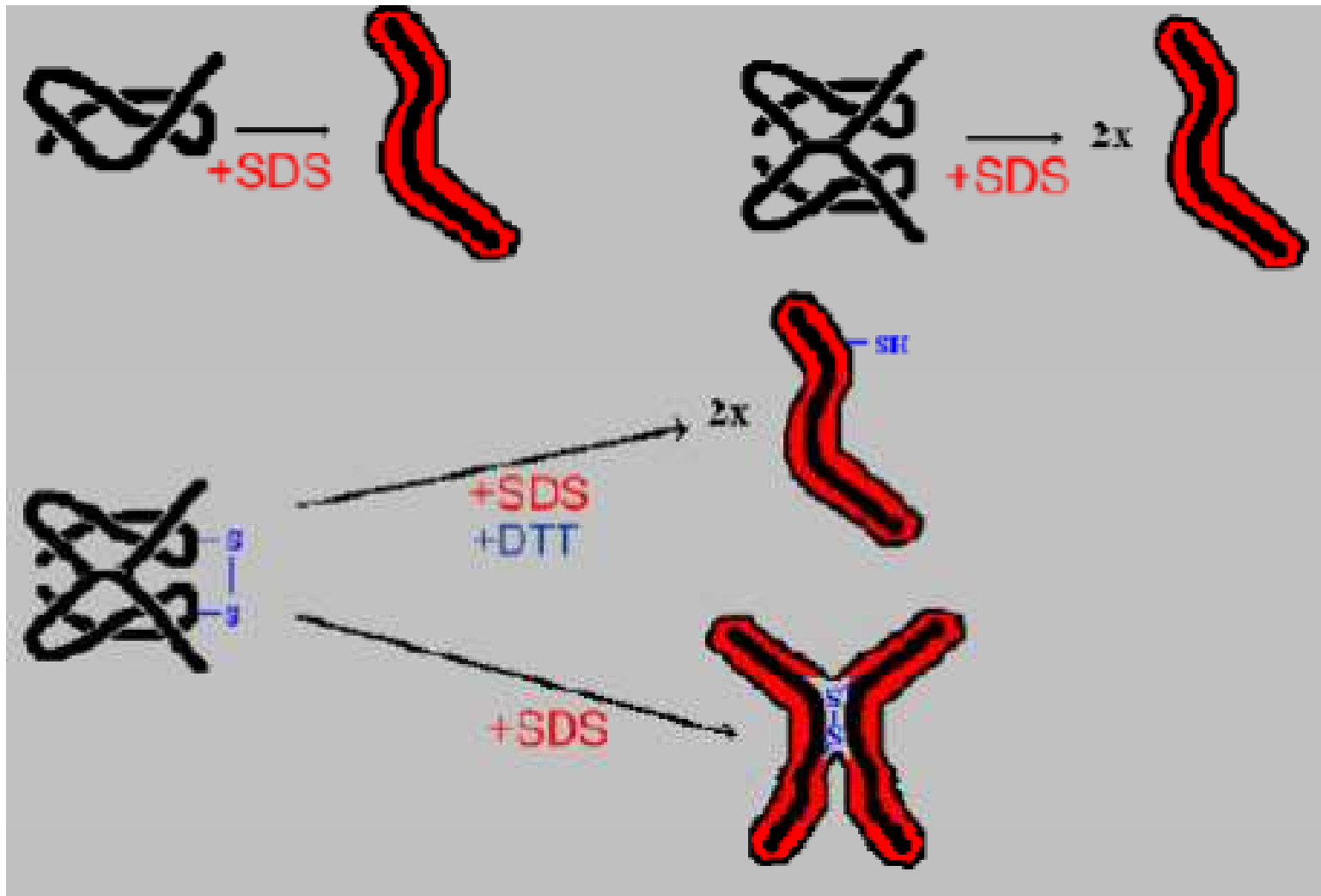
Stanovení Mr pomocí SDS PAGE



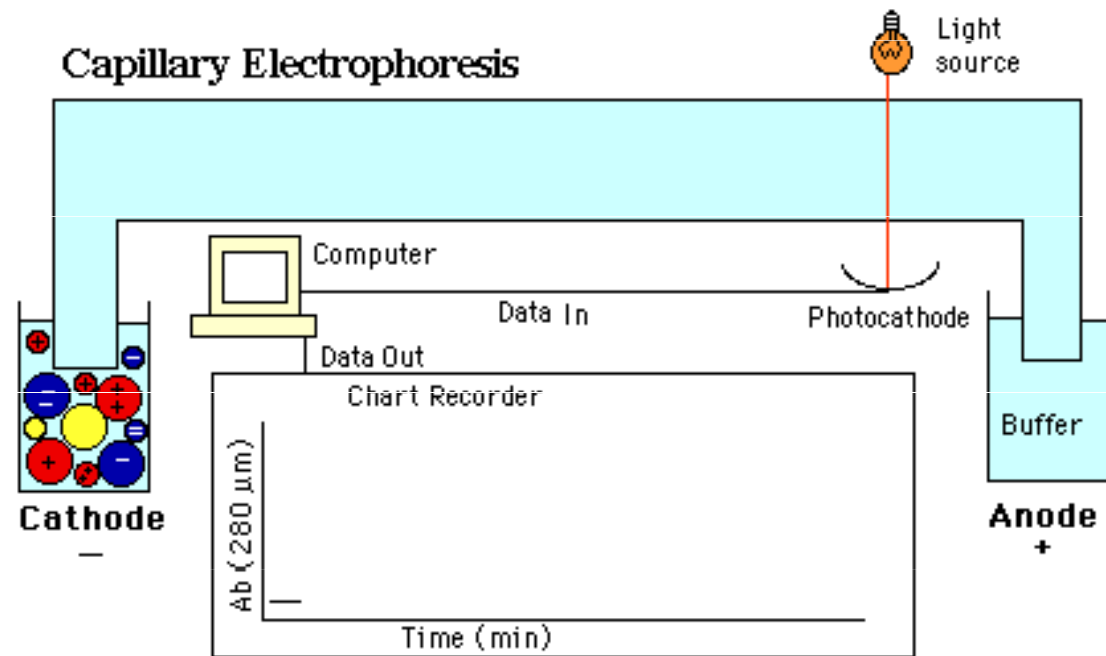
Stanovení Mr pomocí SDS PAGE - standardy



Stanovení Mr pomocí SDS redukující x neredukující

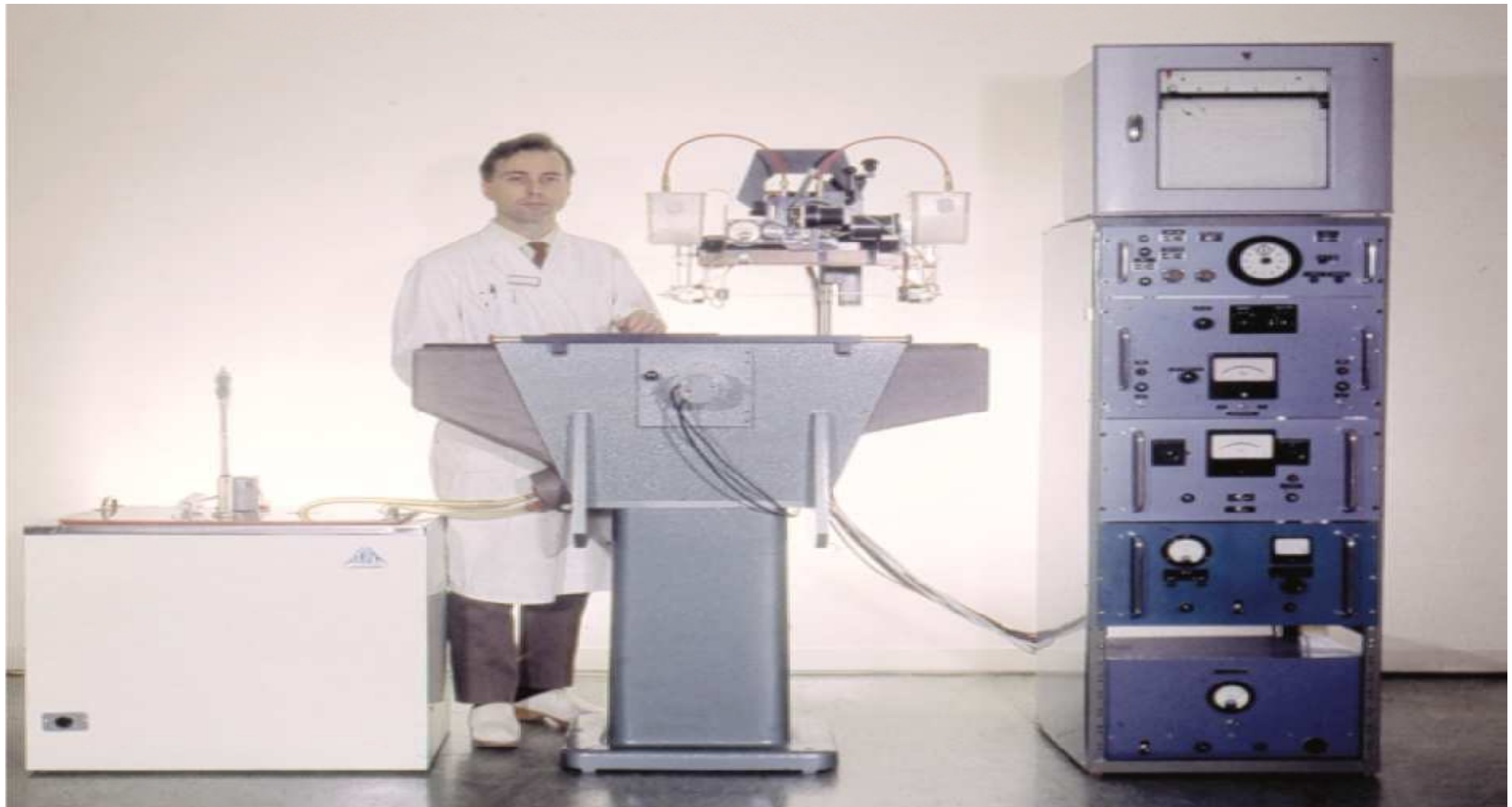


Kapilární elektroforéza



Kapilární elektroforéza

1967 - Hjerten
3 mm kapilára



Kapilární elektroforéza

1981 - Jorgenson Lukacsová

75 μm kapilára

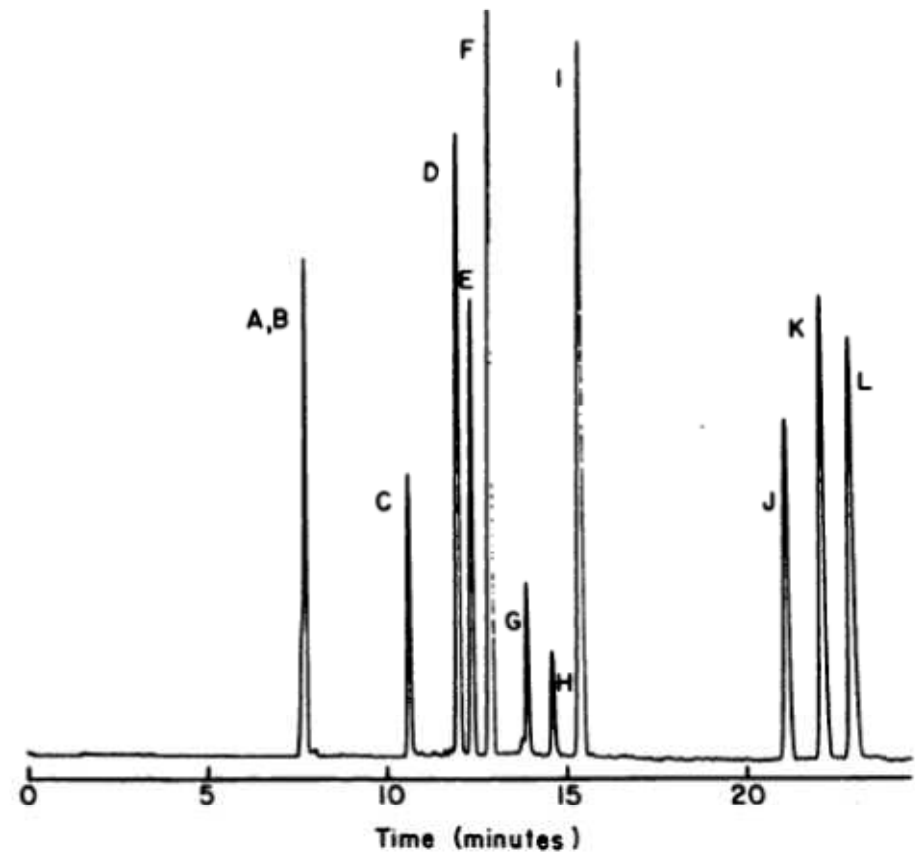
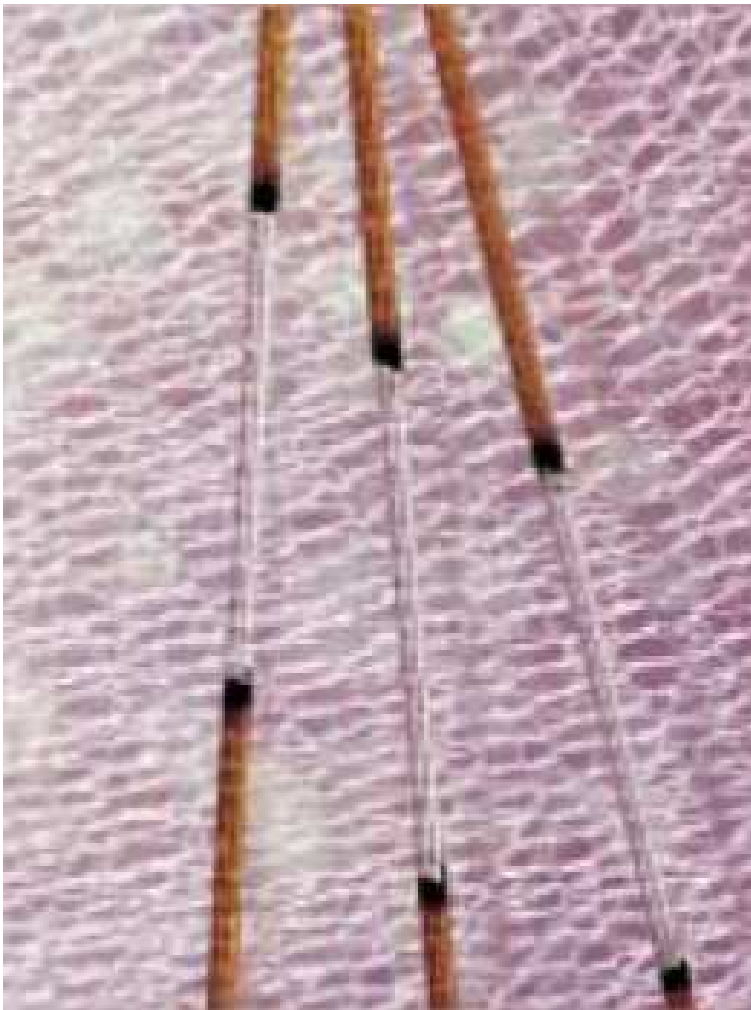
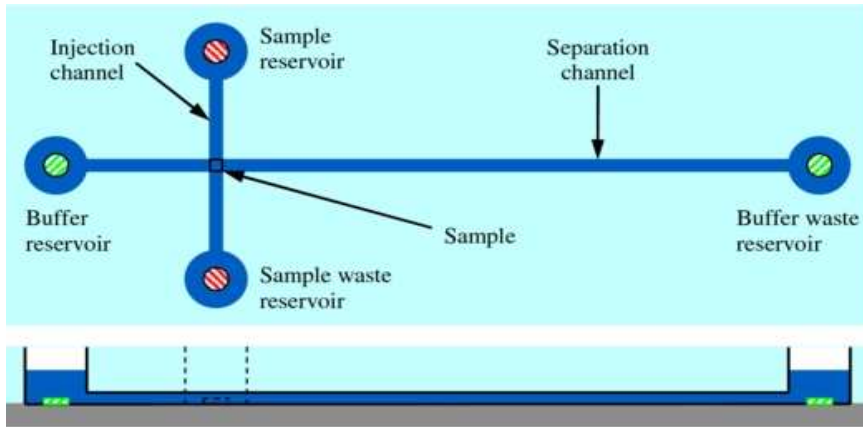


Fig. 1. Electropherogram of dansyl amino acids

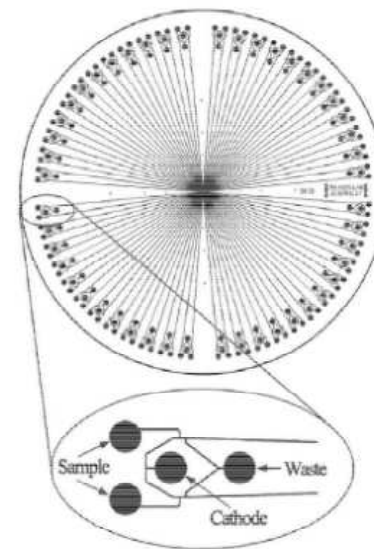
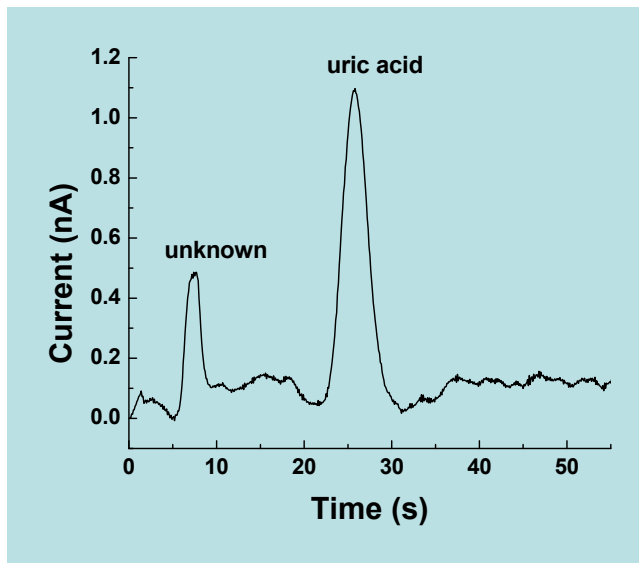
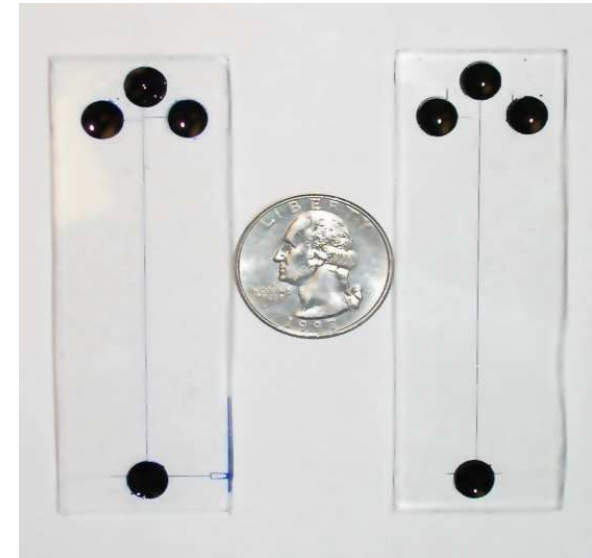
Beckman 1987



1997 μ CE

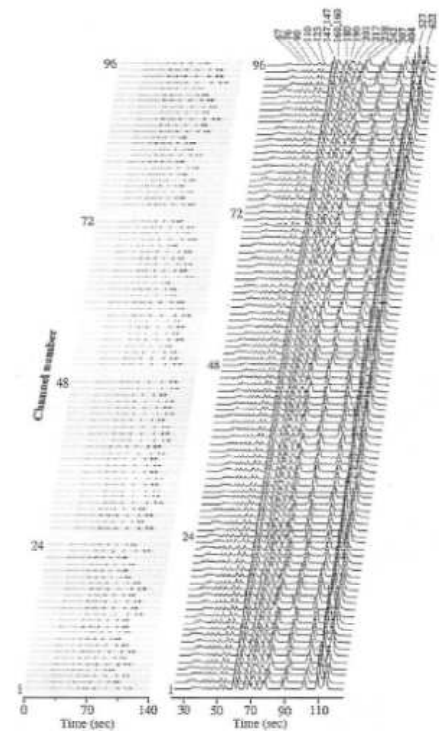


- Substrate
- Support material
- Channel
- Electrodes for electrophoresis in separation channel
- Optional electrodes for electrokinetic sample injection



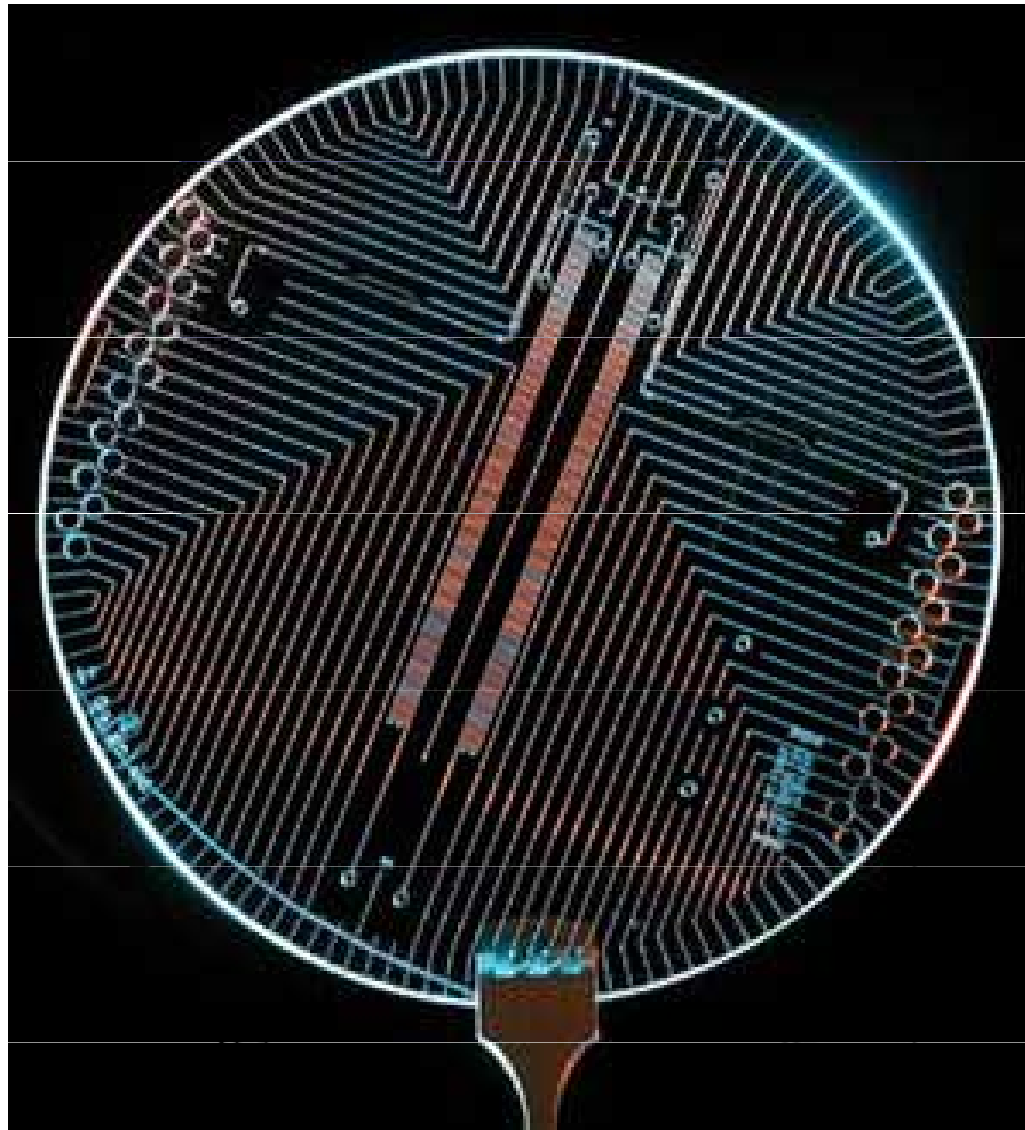
(b)

(a)



(c)

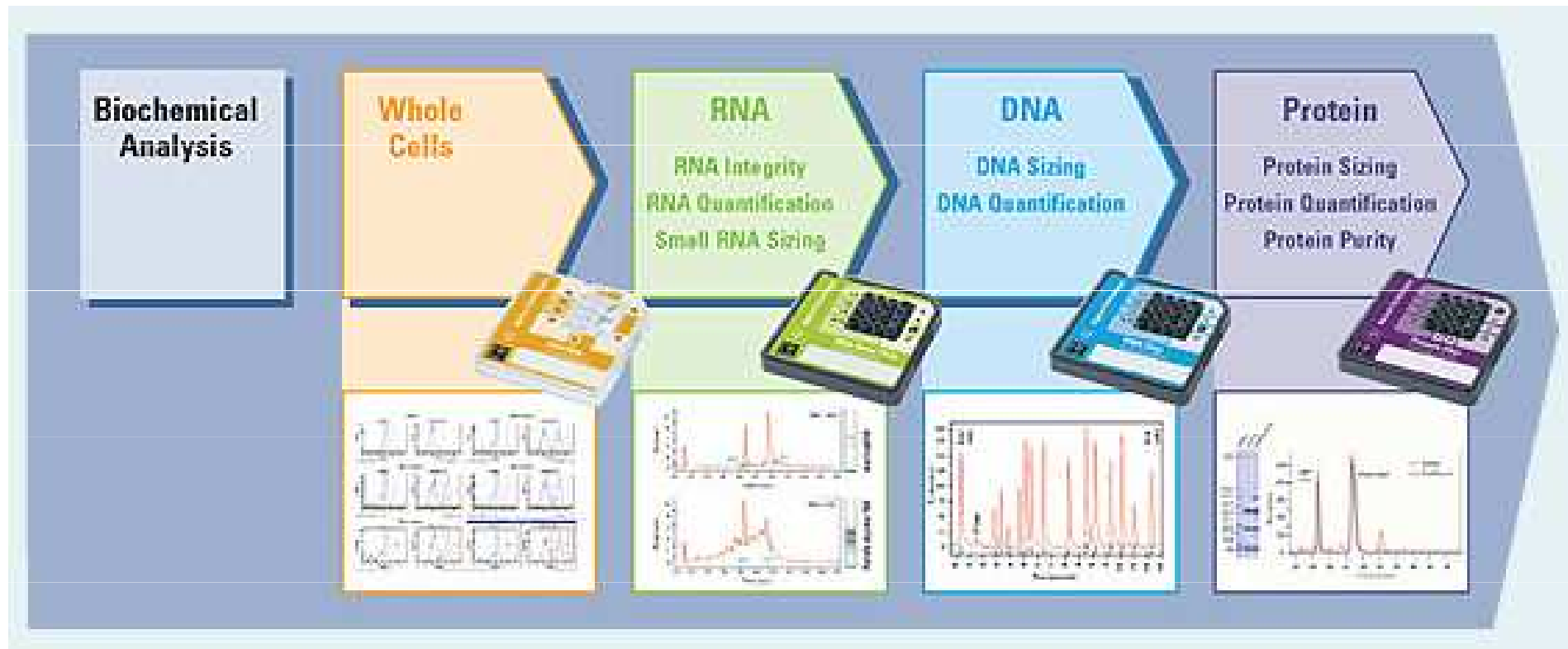
2013 NASA - Mars



Bioanalyser Agilent 2100

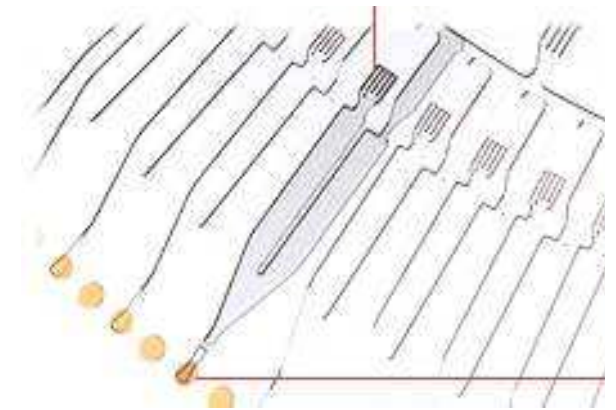
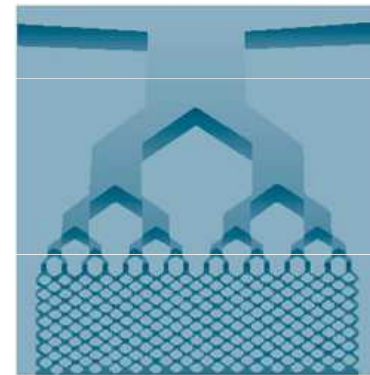
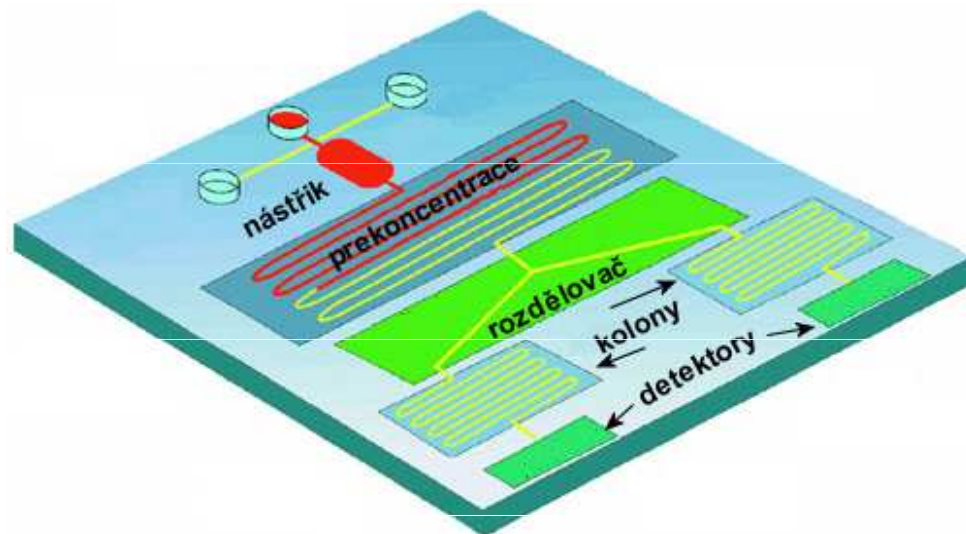


Bioanalyser Agilent 2100



Chipová chromatografie

struktury vyleptané do křemíkové (Si) destičky

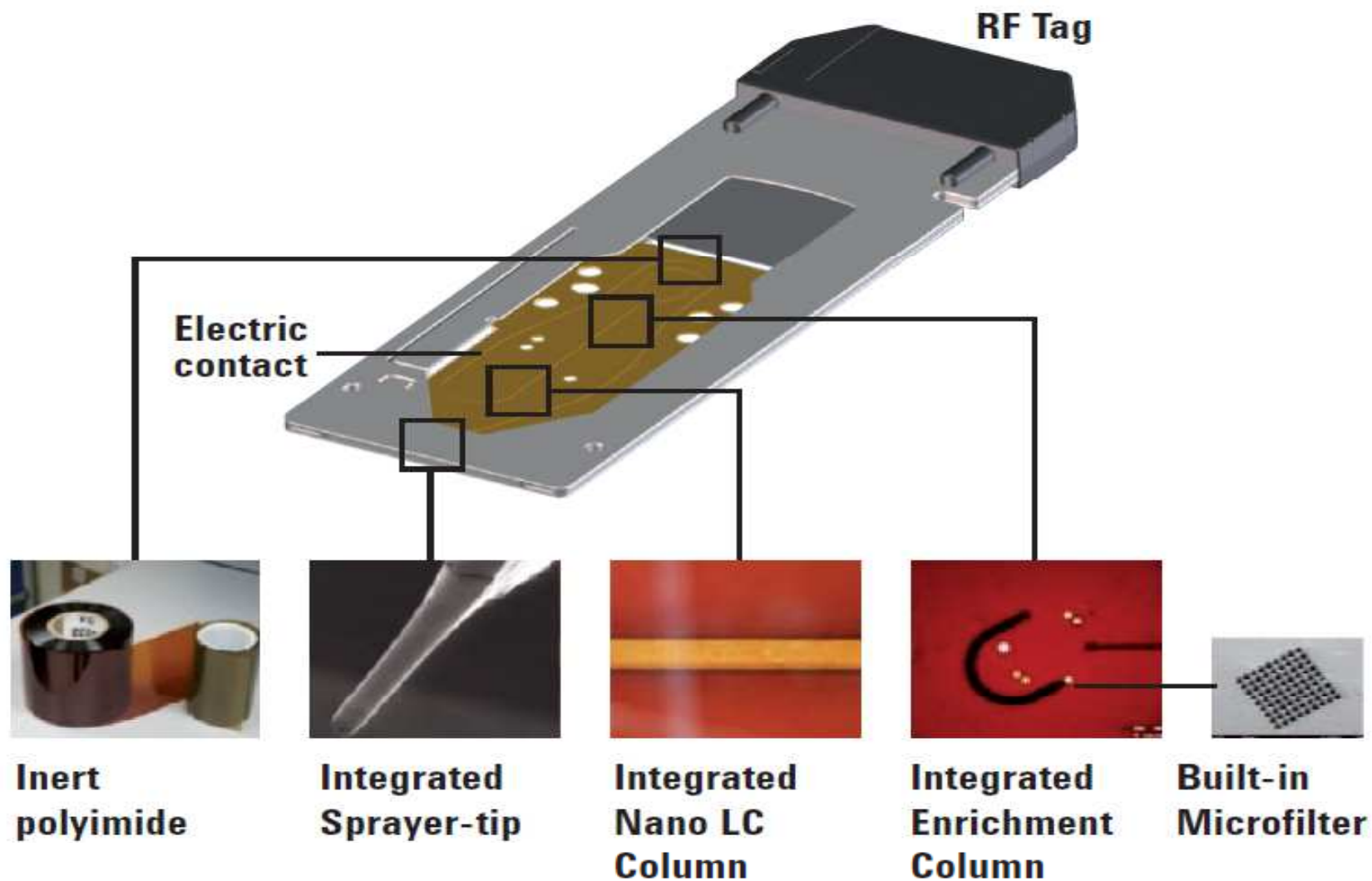


doprava MF: pumpa, odstředivá síla, el. staticky

výhody: rychlost analýzy, velikost,
malá spotřeba vzorku (< nl !)

nevýhody: práce s malými objemy
(povr. napětí, elektrostatické interakce)

Chipová chromatografie Agilent



Izoelektrická fokusace

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

Izoelektrická fokusace

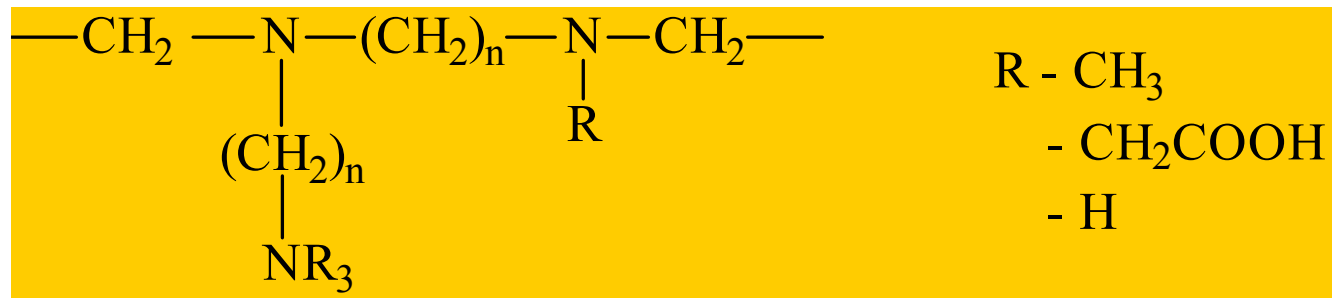
1961 Svensson – Rilbe (1968)



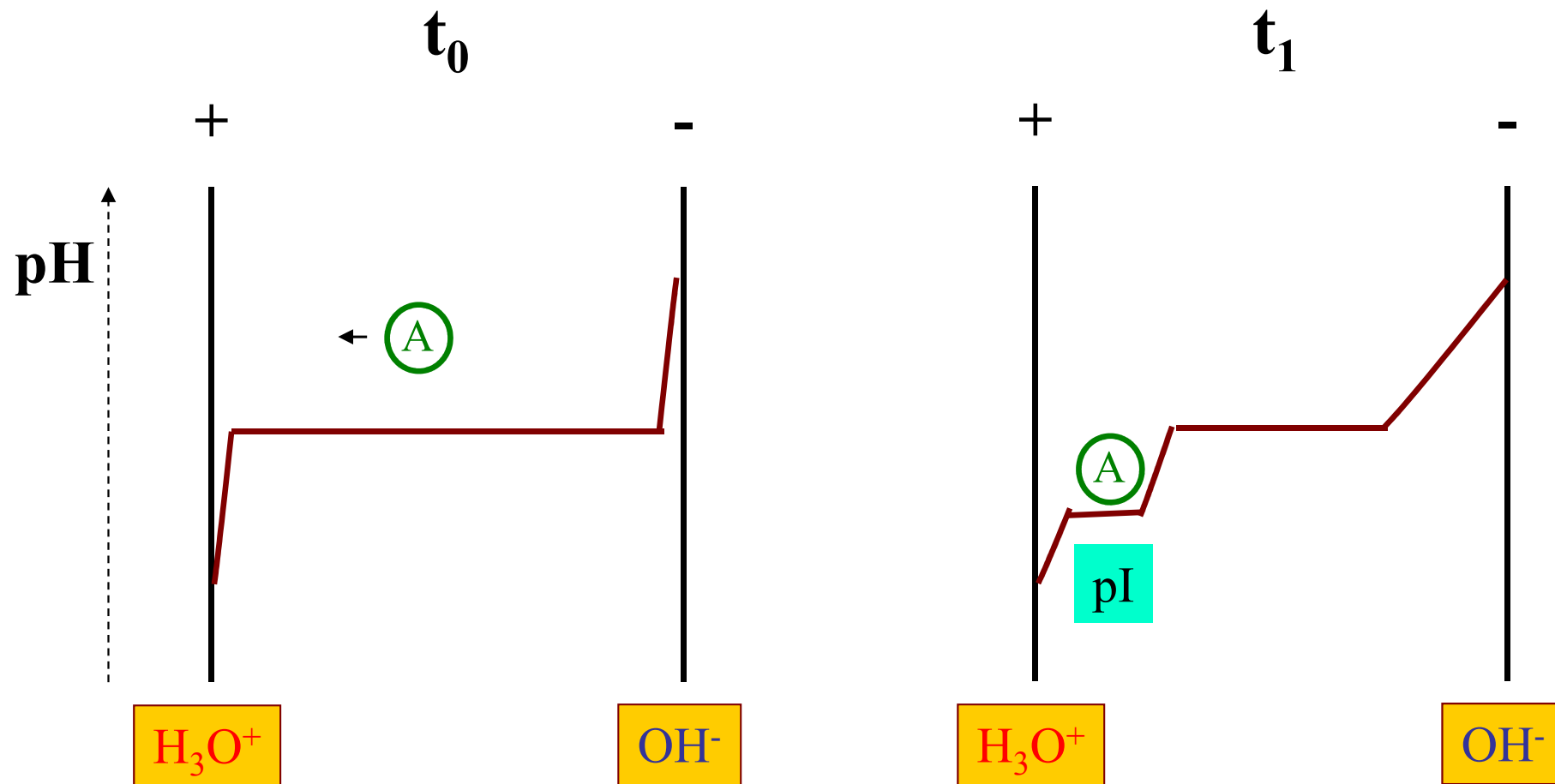
Tvorba gradientu



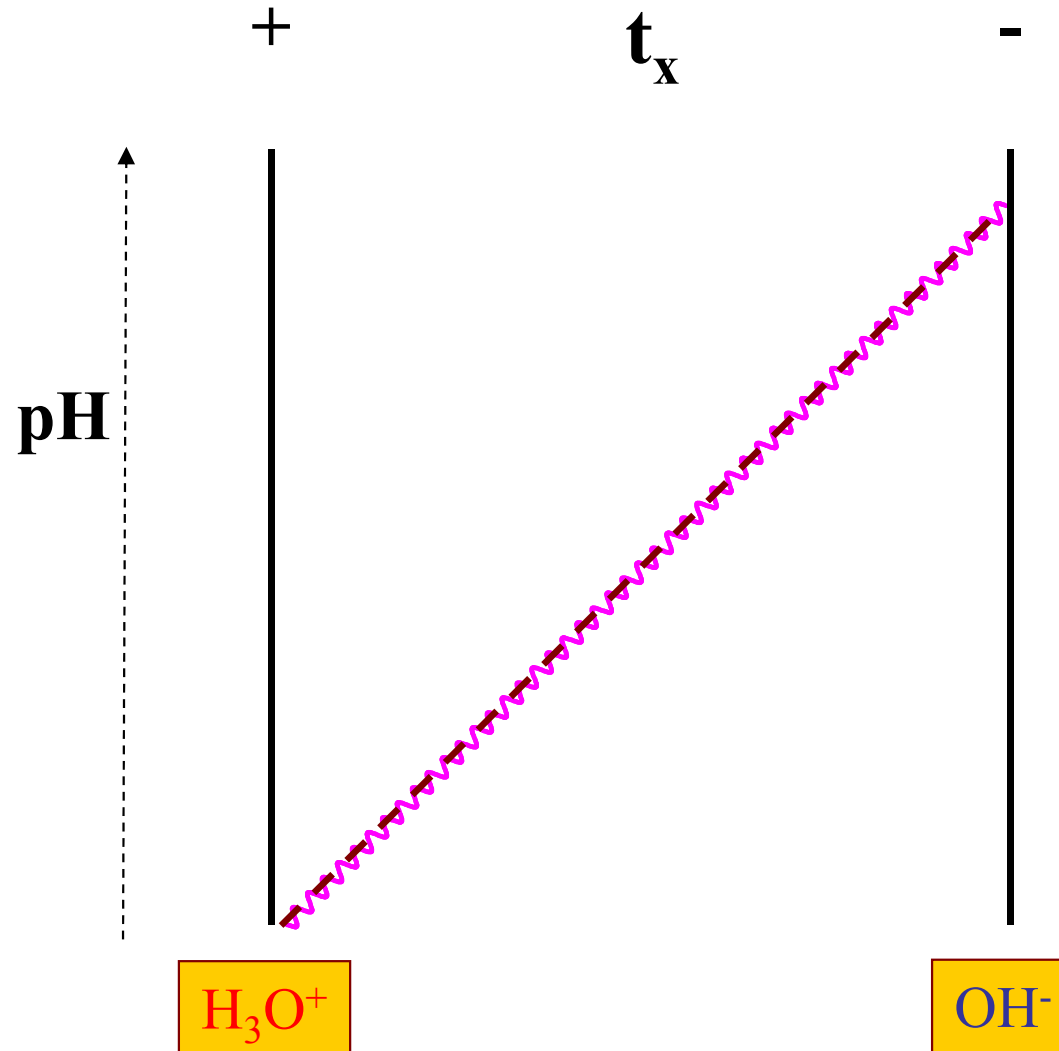
Ampholyty



Izoelektrická fokusace



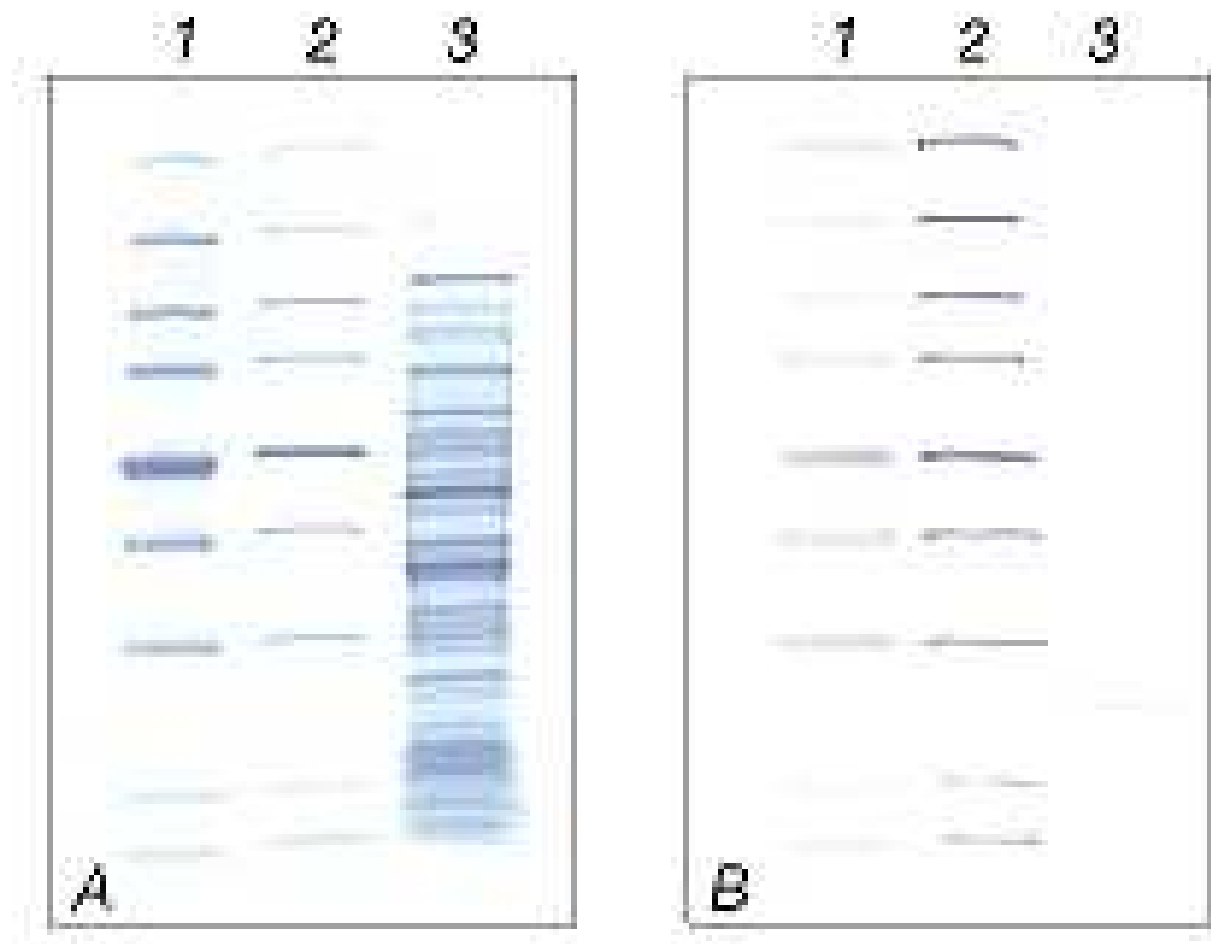
Izoelektrická fokusace



Izoelektrická fokusace analytická

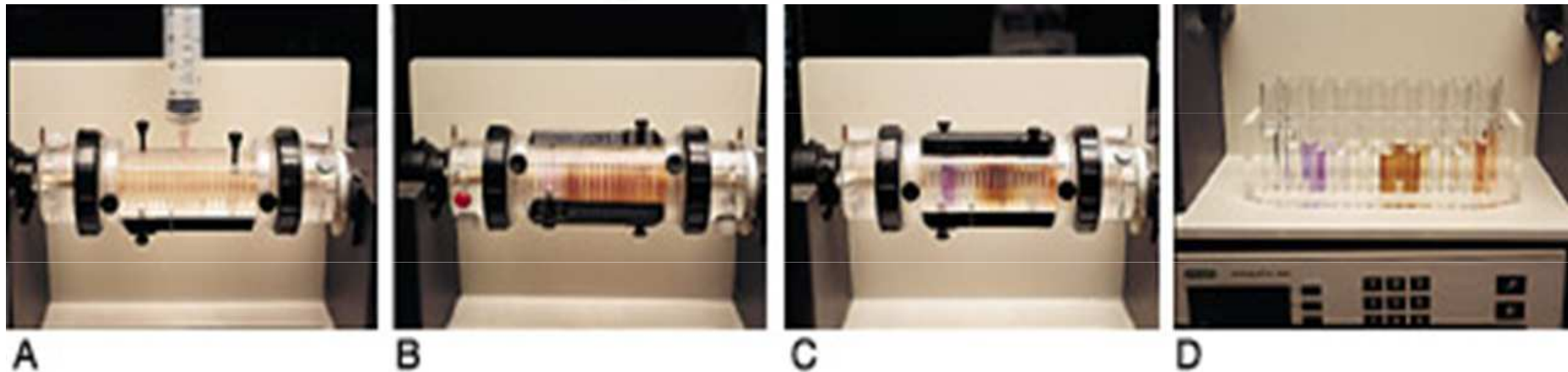
- Provedení - v gelech – PAGE, agarosa
- Použití - sledování komplexních směsí
 - izoenzymové složení
 - stanovení pI – rozřezání a eluce
 - μpH elektrody
 - pI standardy

Izoelektrická fokusace analytická



Izoelektrická fokusace preparativní

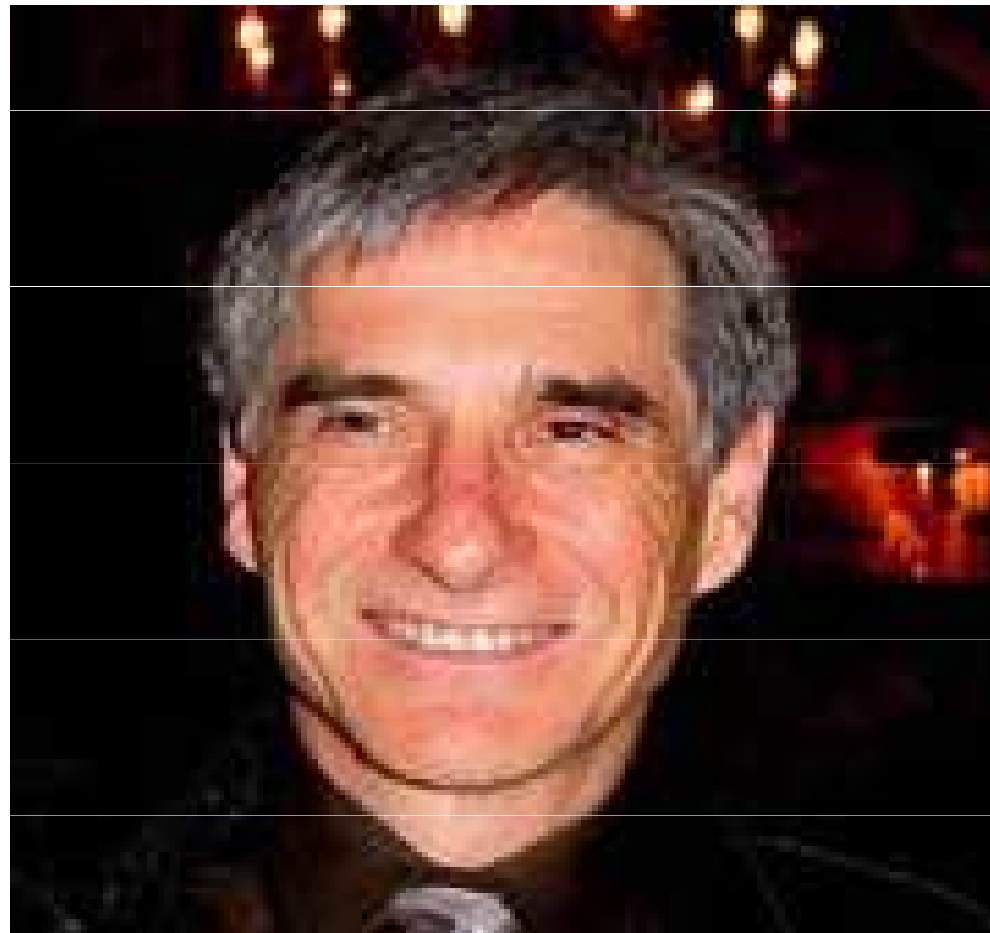
- Provedení - rotací – Rotofor (BioRad)



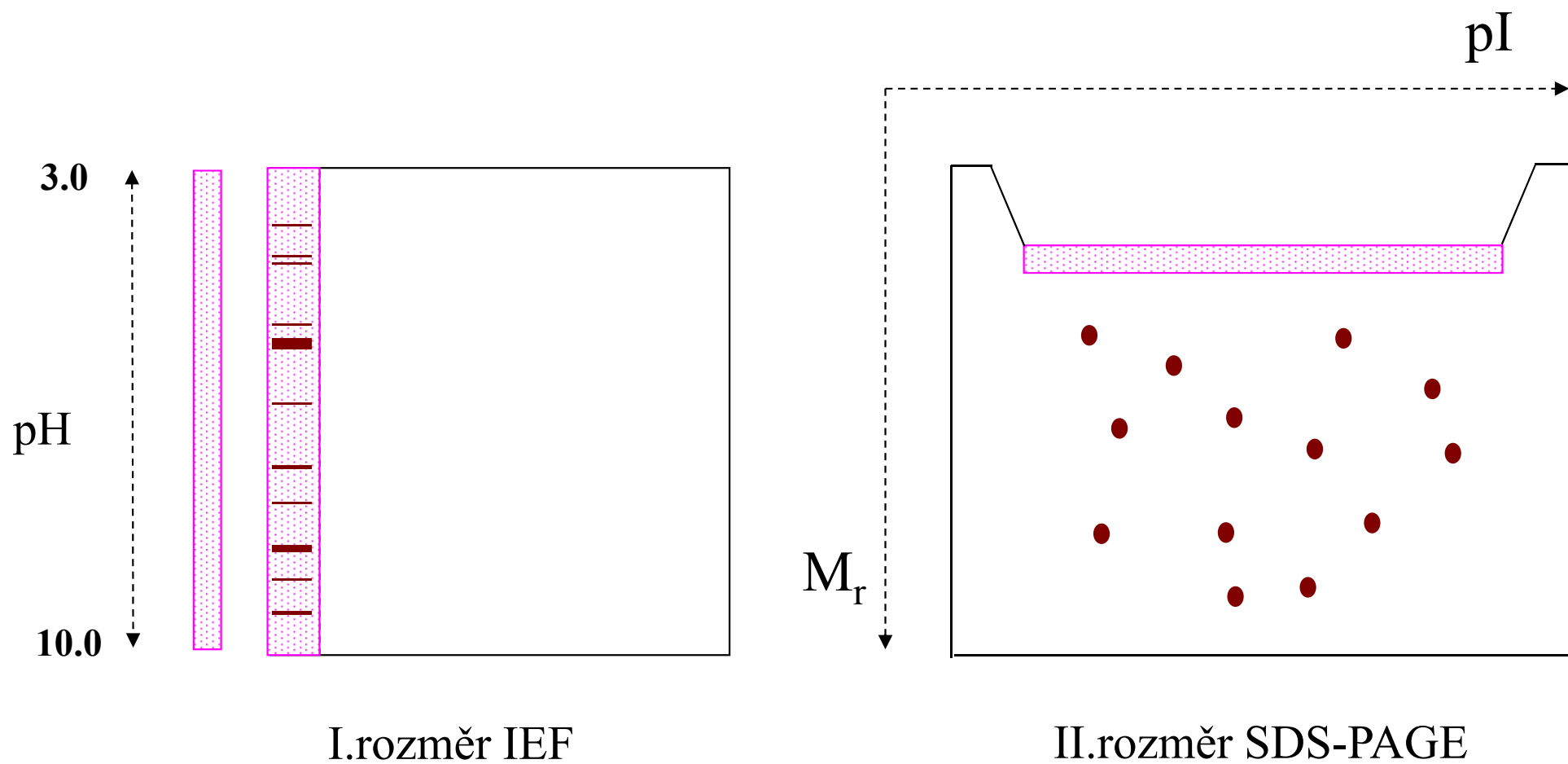
- Použití – izolace bílkovin

Dvojrozměrná elektroforéza

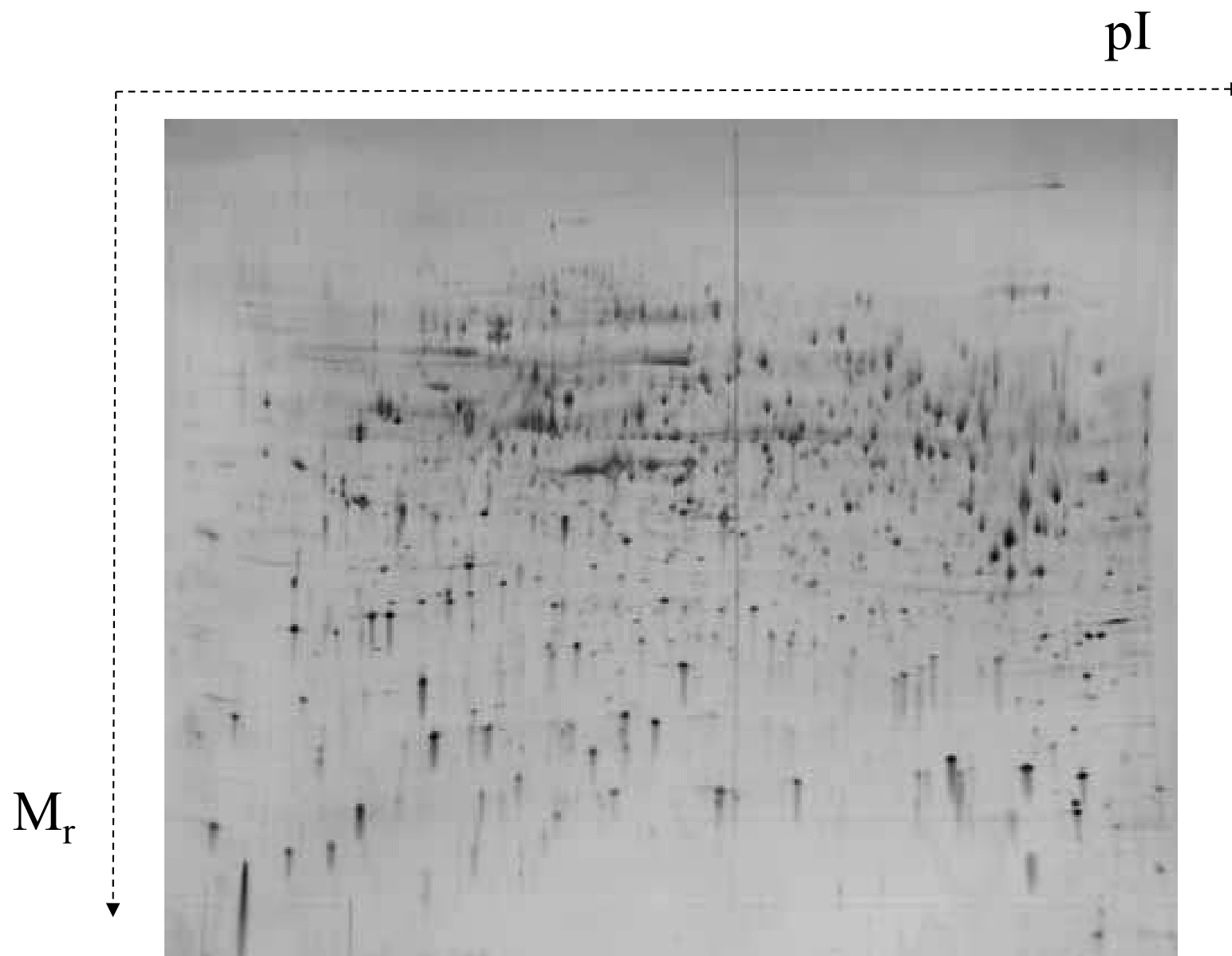
1975 O'Farrell



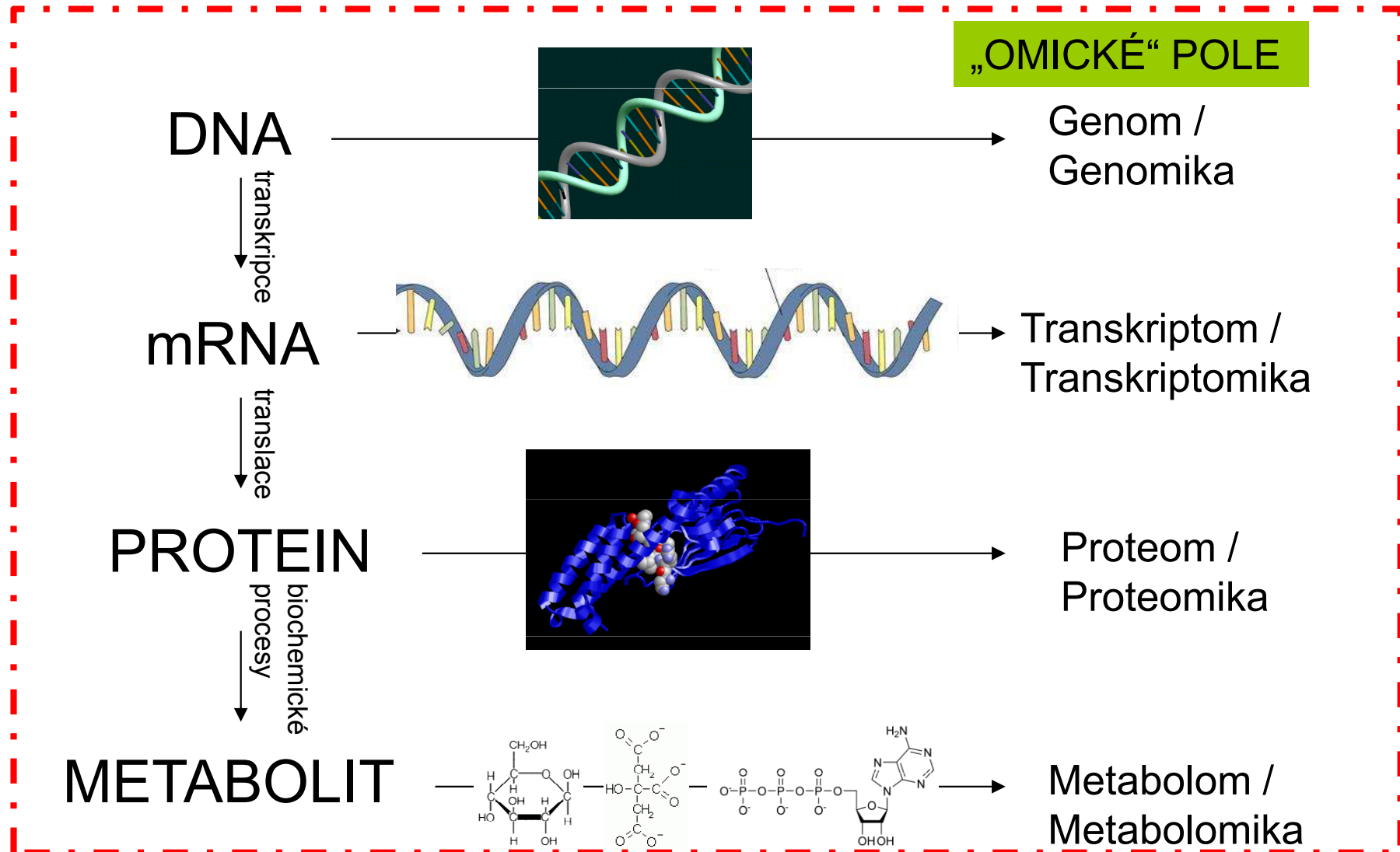
Dvojrozměrná elektroforéza



Dvojrozměrná elektroforéza

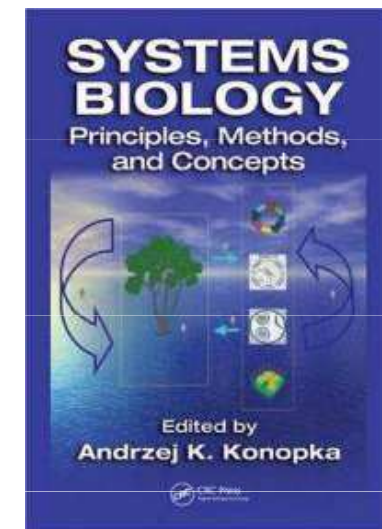
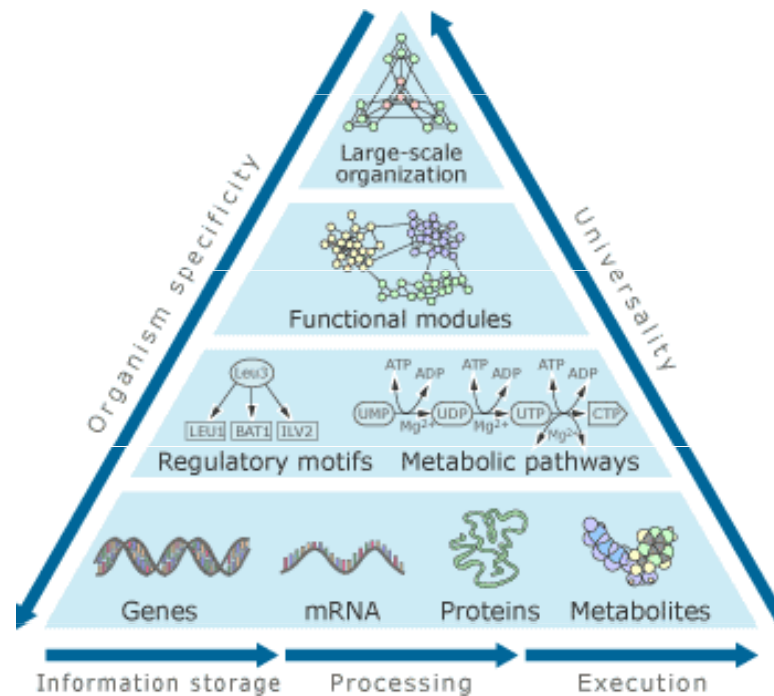


Studium procesů probíhajících v živých organismech

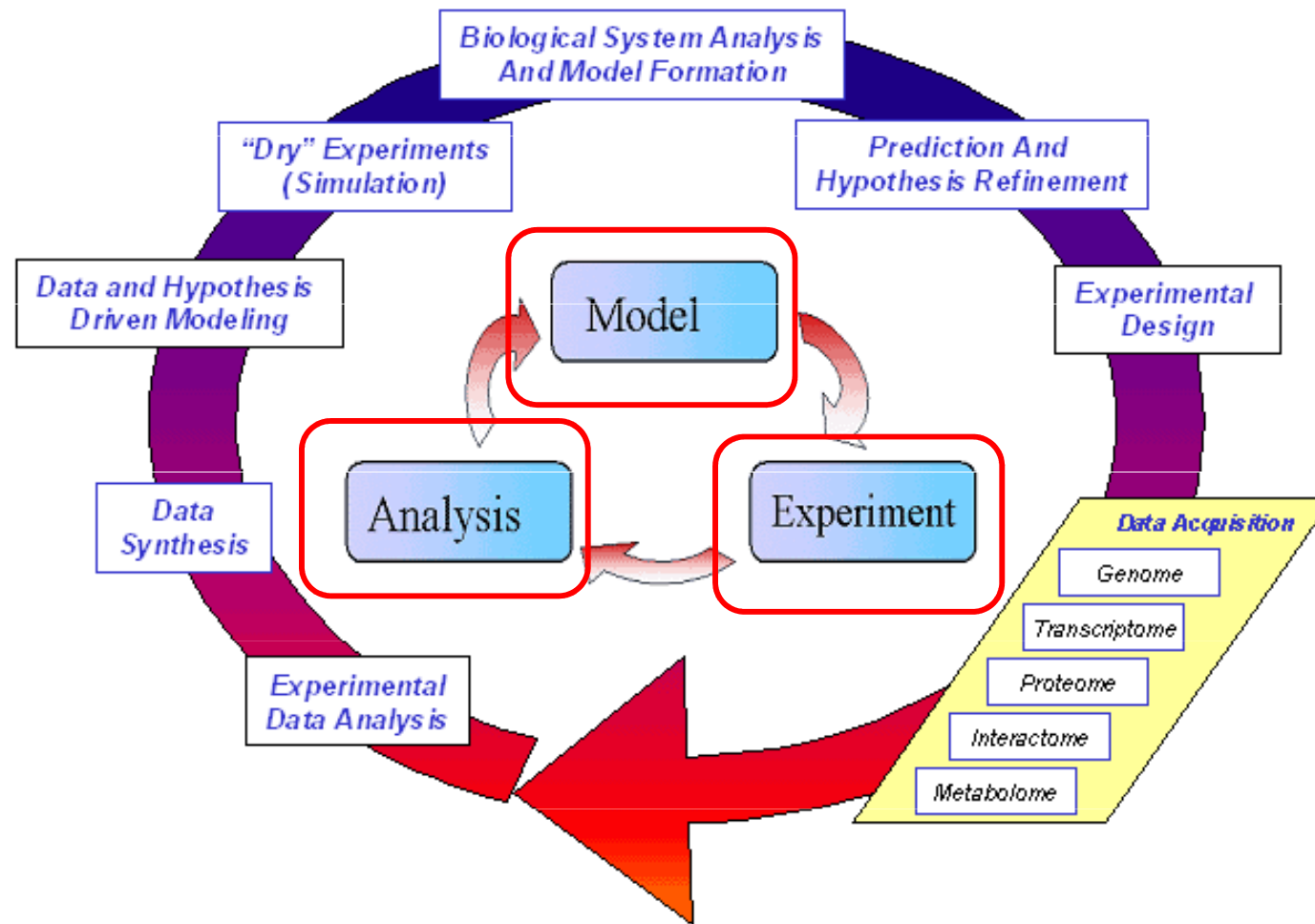


Systemová biologie

Systemová biologie



Systemová biologie





PROTEIN

J. J. Berzelius 1838

Proteios

PROTEOMIKA

Marc Wilkins 1994

PROTEOM

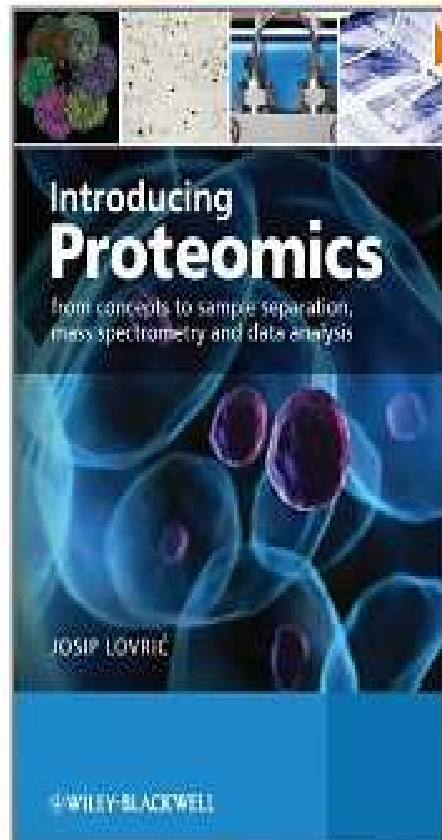
Kompletní sada bílkovin přítomných v daném okamžiku v buňce, nebo tkáni, zahrnující veškeré jejich modifikace, vzájemné interakce, lokalizaci a metabolický obrat.

PROTEOMIKA

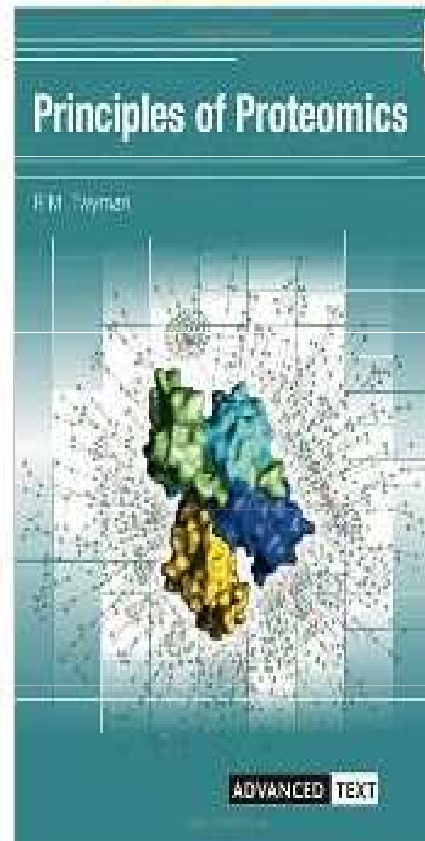
- **kvantitativní a kvalitativní charakterizace úplné sady bílkovin organely, buněčné linie, tkáně nebo organismu**
- **kvantitativní a kvalitativní porovnání proteomů za různých podmínek**

Literatura

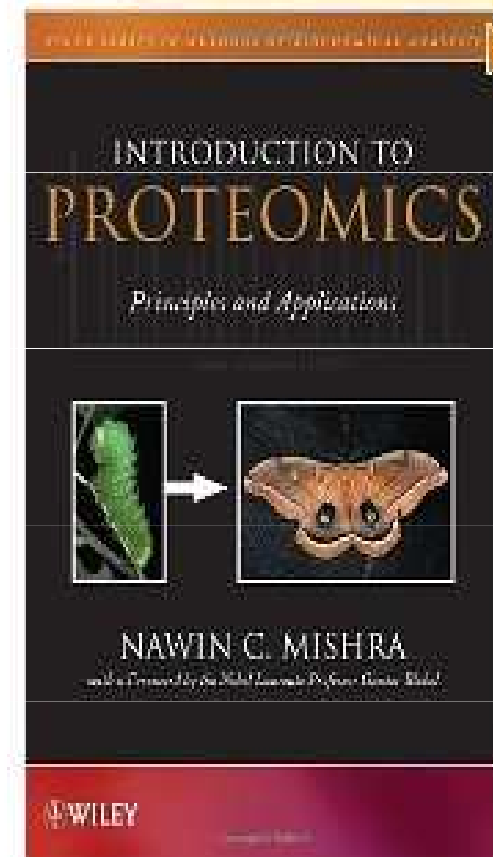
Click to **LOOK INSIDE!**



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 buňky (určit lokalizaci jednotlivých bílkovin).

Proč proteomika když máme genomiku ?

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

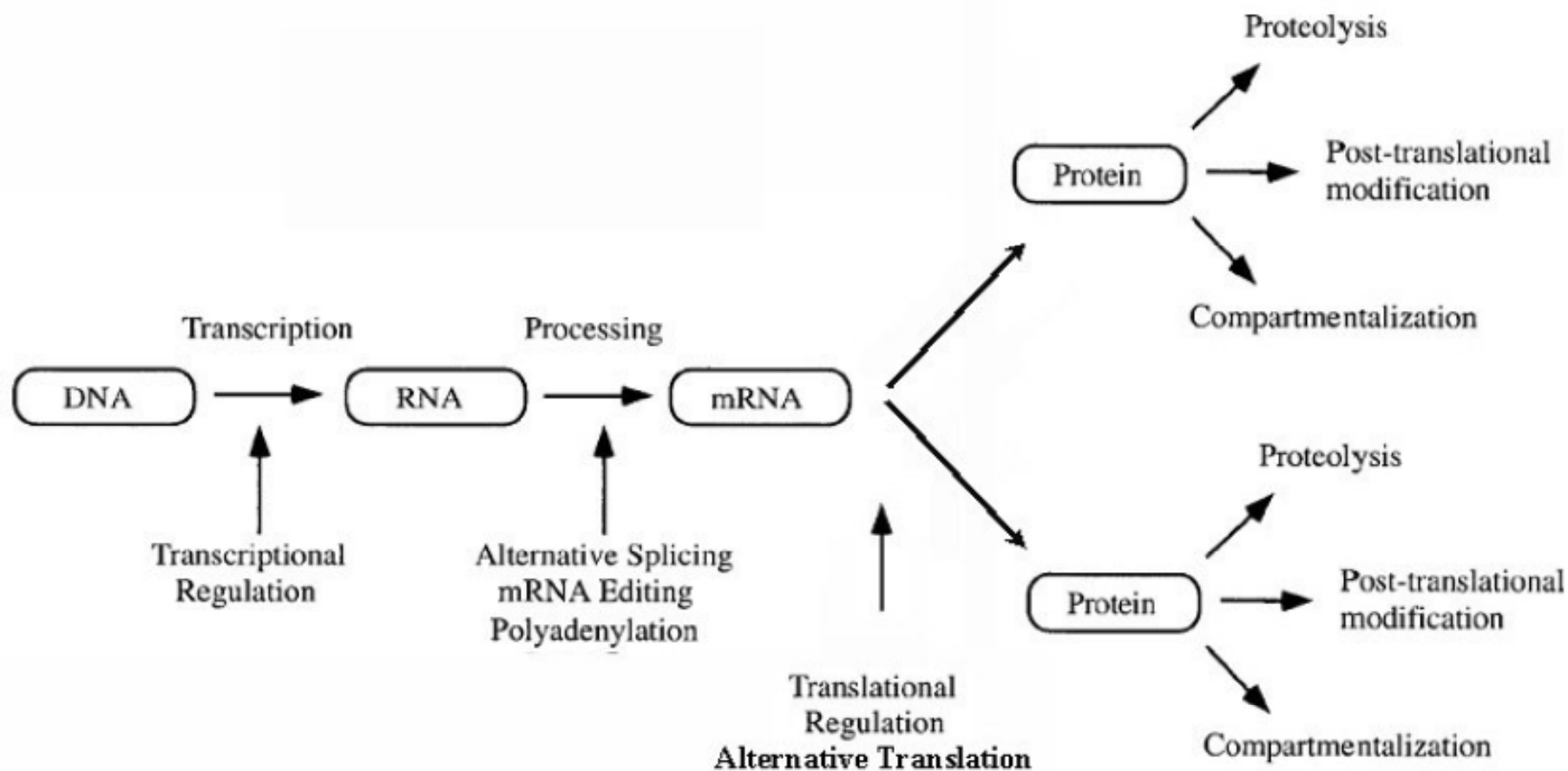
PROTOŽE PROTEINY A NIKOLIV GENY VYTVÁREJÍ FENOTYP !



JEDEN GENOM
DVA PROTEOMY



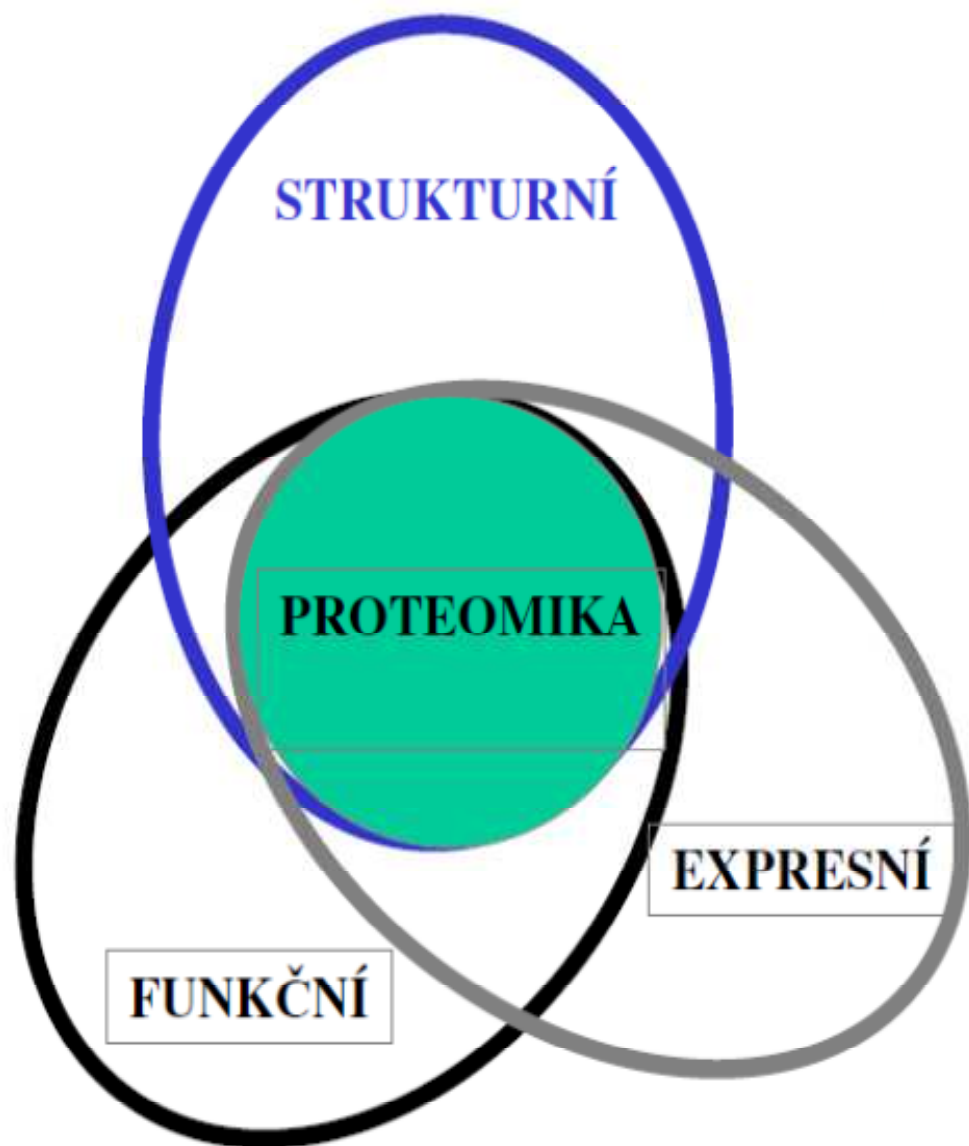
JEDEN GEN, MNOHO BĚLKOVIN



Cca 25-30 000 genů



Několik set tisíc bílkovin

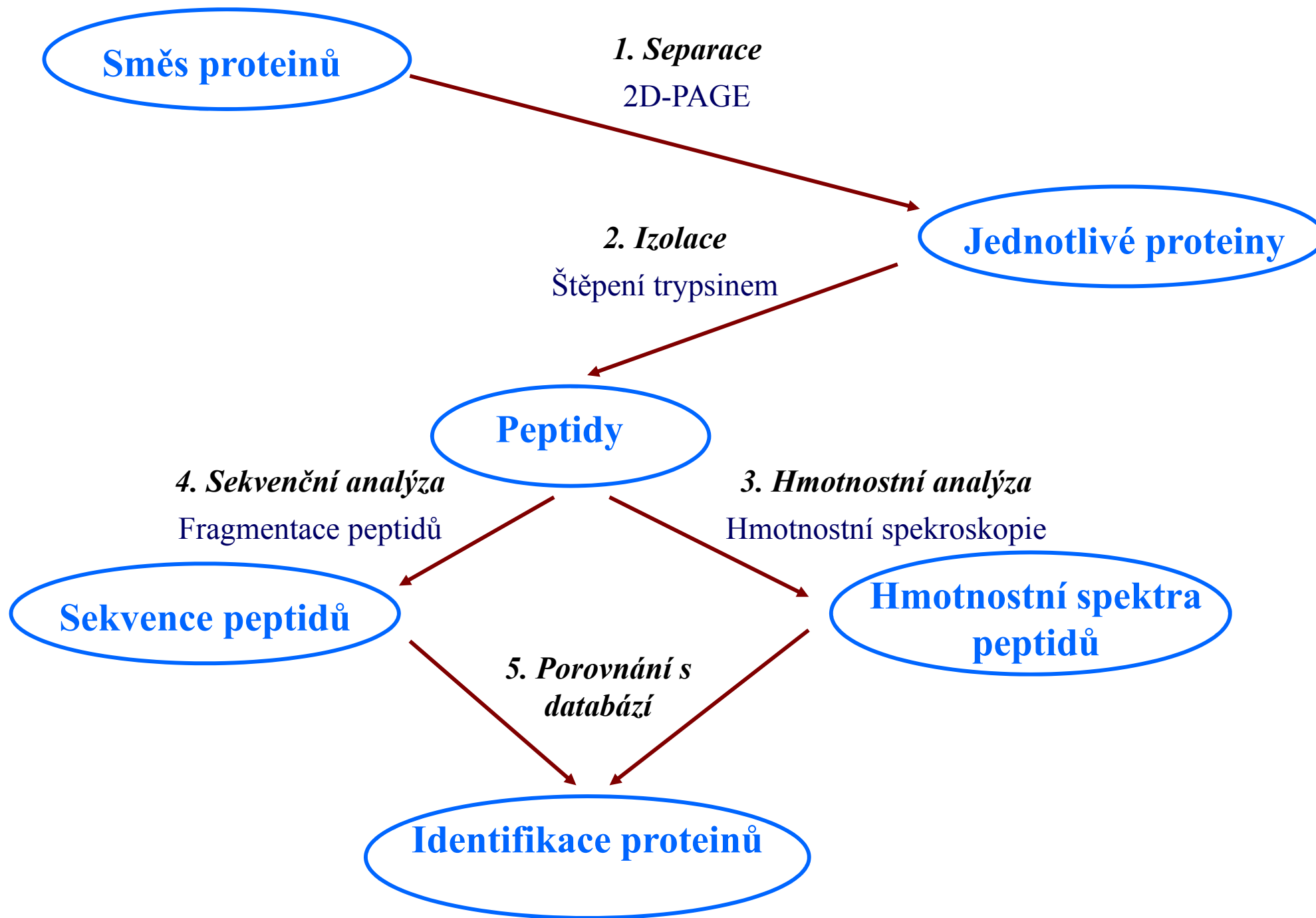


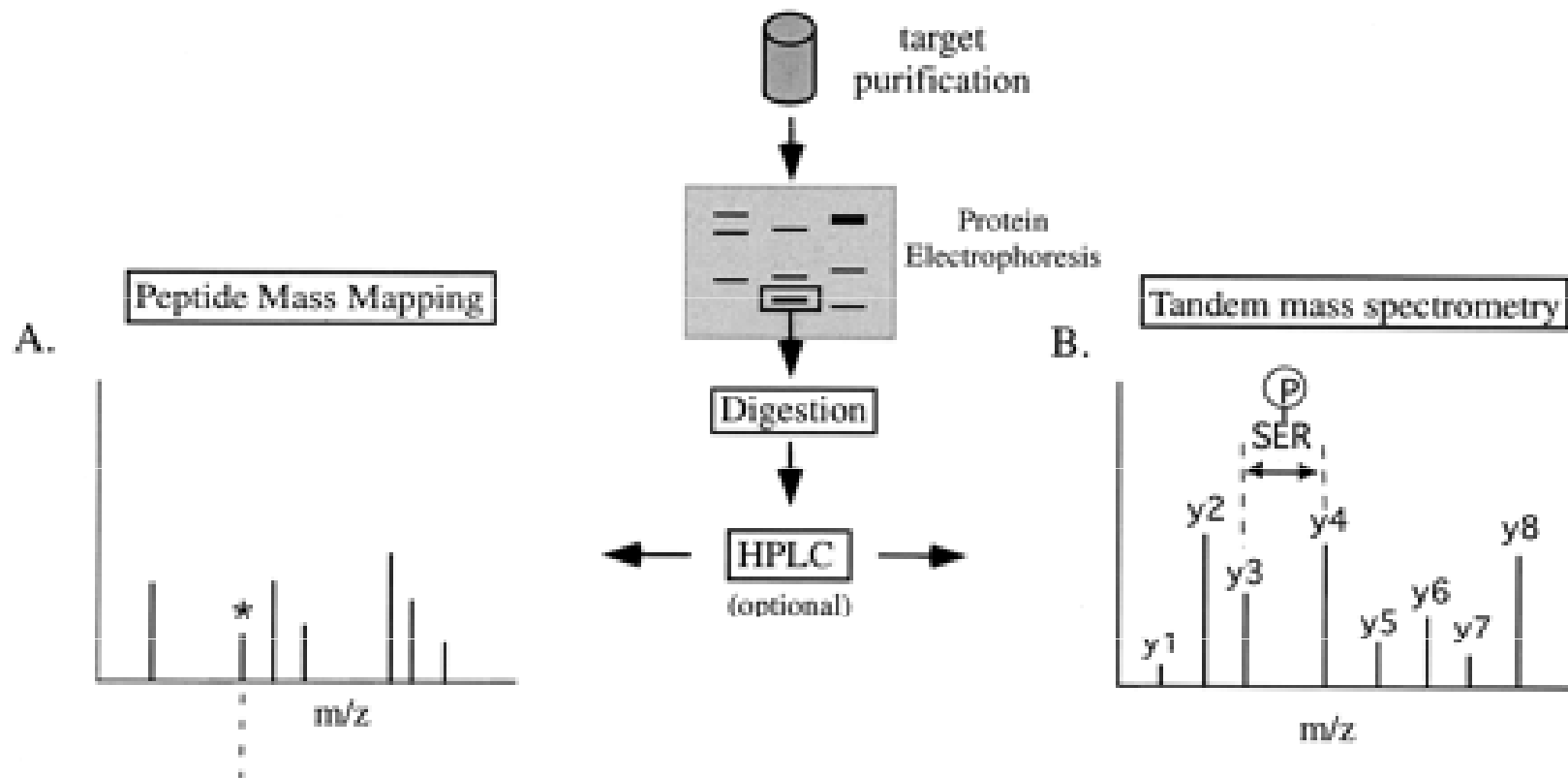
Aplikace proteomiky v medicíně (proteomika nemocí)

**Úloha proteinů ve vzniku
nemocí**

Exprese proteinů u nemocí

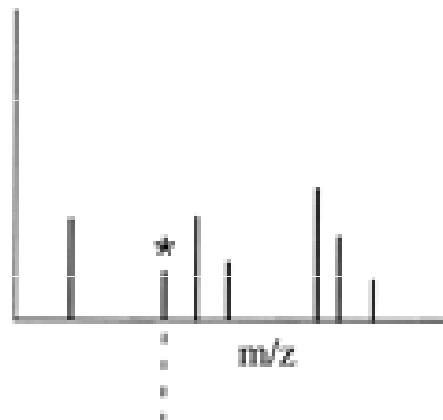
Základní schéma analýzy užívané v proteomice





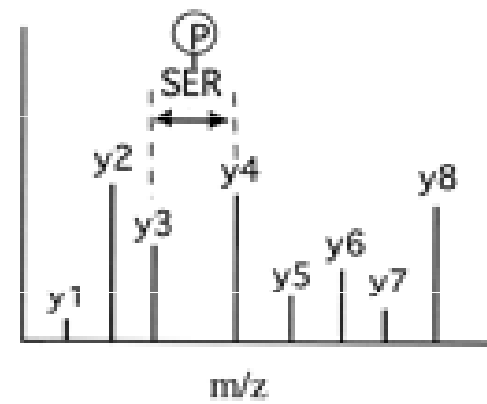
A.

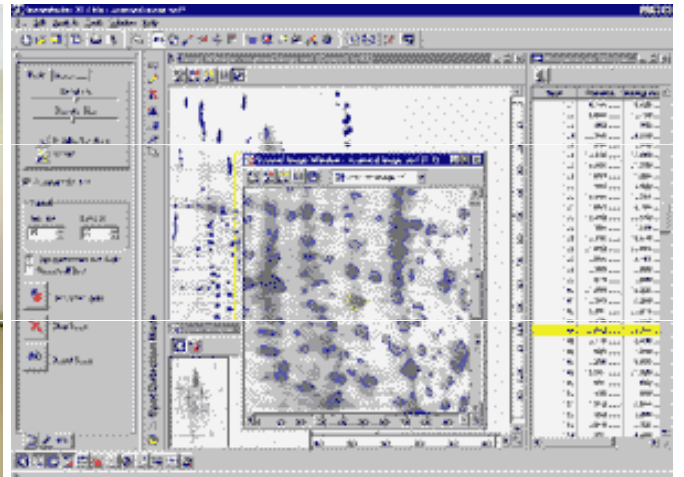
Peptide Mass Mapping



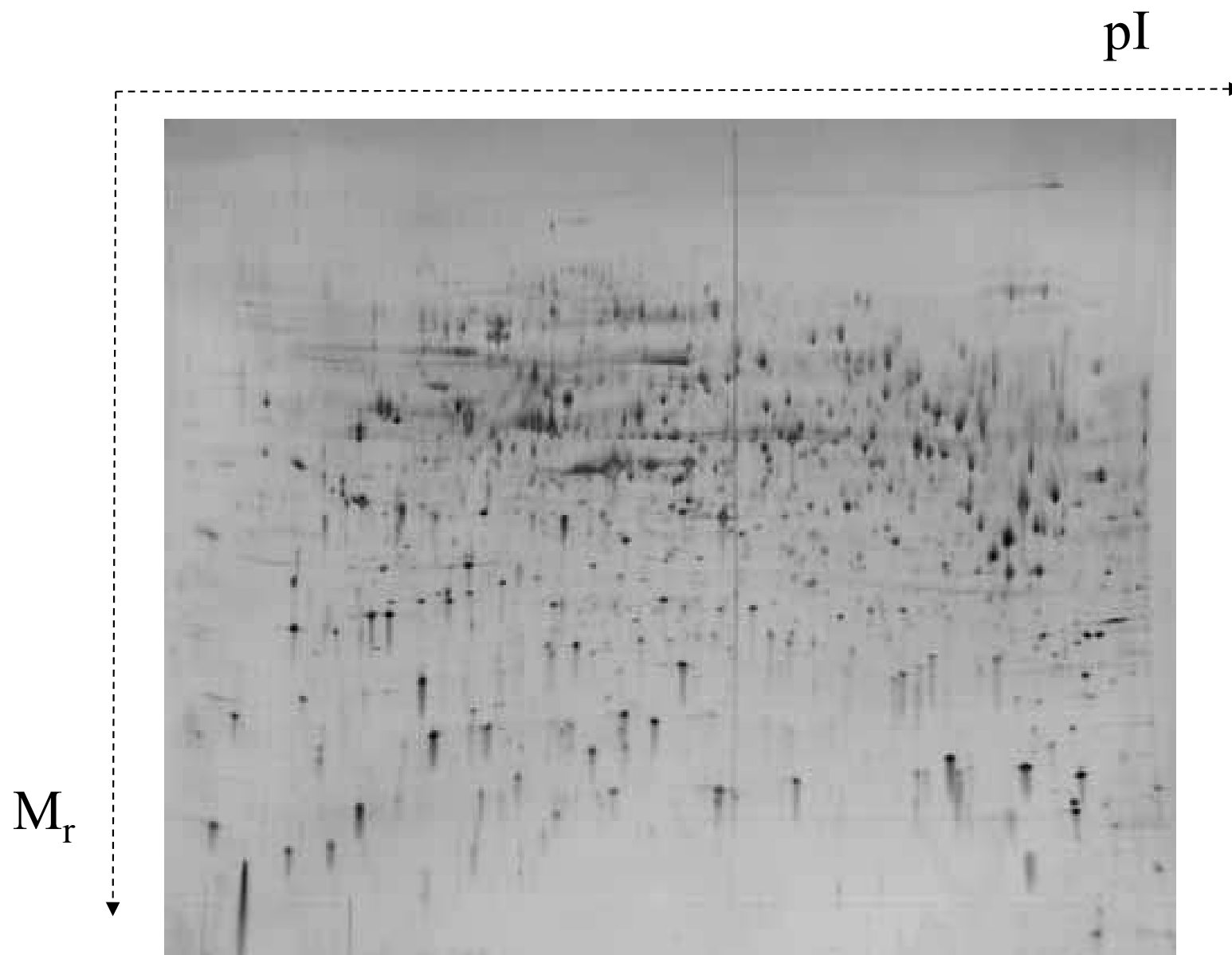
B.

Tandem mass spectrometry





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:

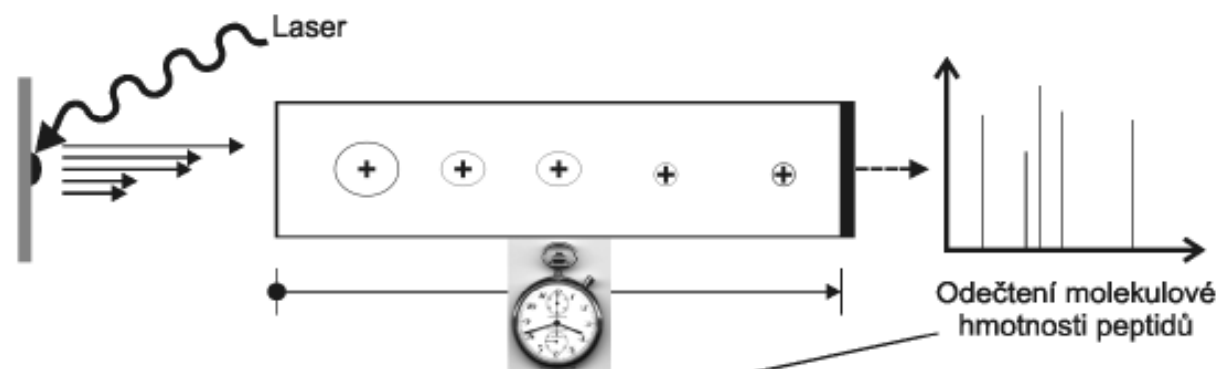
1. 2small
2. 1small

ID	X1	Y1	RE1	X2	Y2	RE2	std	baseline
1016	346	39	6031	337	43	11053	2511.0	0.508
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]

PEPTIDOVÉ MAPOVÁNÍ (PEPTIDE MASS FINGERPRINT)

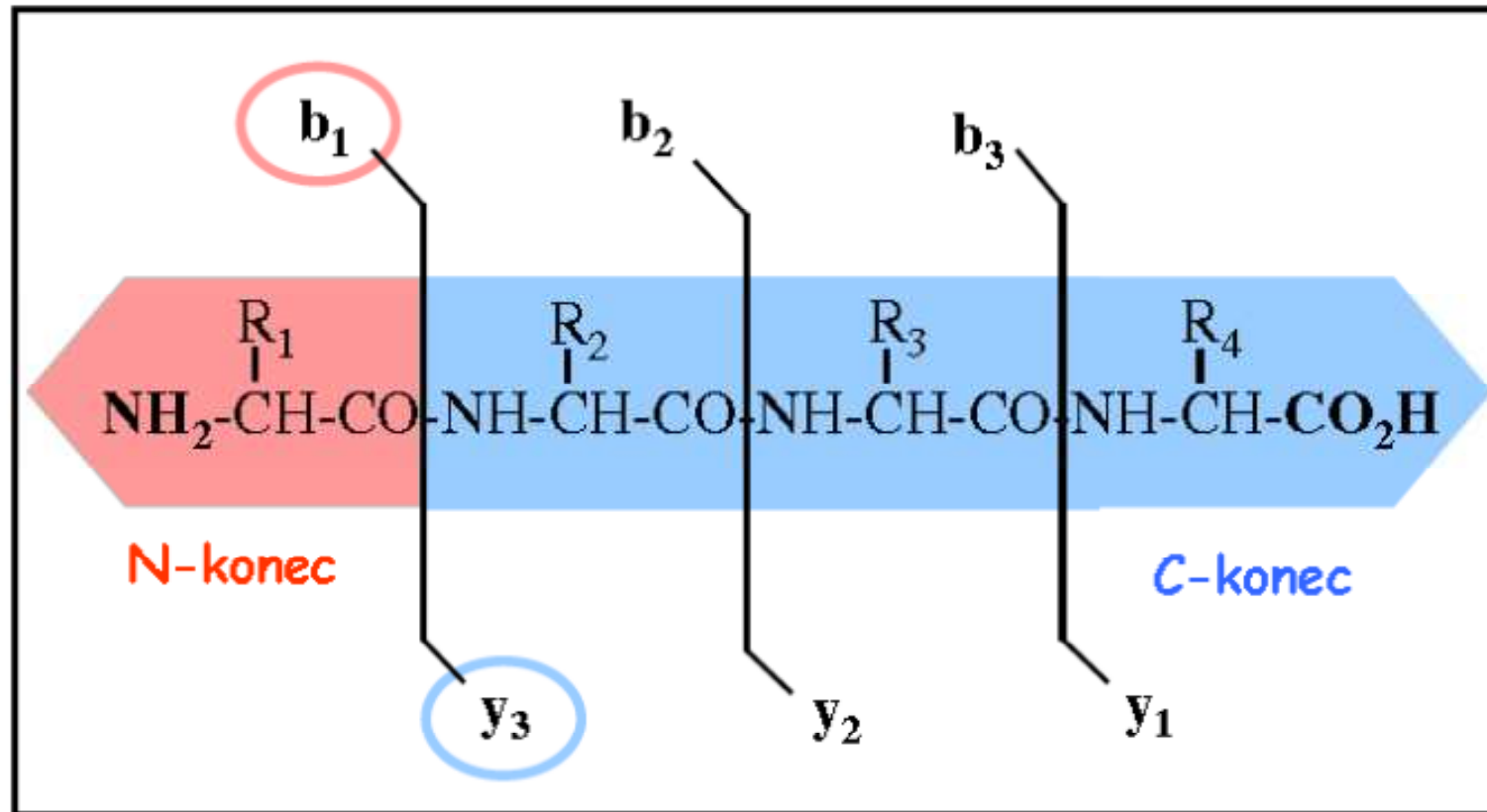
Identifikace proteinů peptidovým mapováním (MALDI TOF)



1059.5	Vyhledání v databázích	1059.5111 (K)KPAEDEWGK (T)	➔	Ferritin (lehká podjednotka)
1491.7		1491.7232 (R)DDVALEGVSHFFR (E)		
1591.8		1607.8069 (R)LGGPEAGLGEYLFER (L)		
1607.8		2359.0916 (R)TDPHLCDFLETHFLDEEVK (L)		
2359.0				

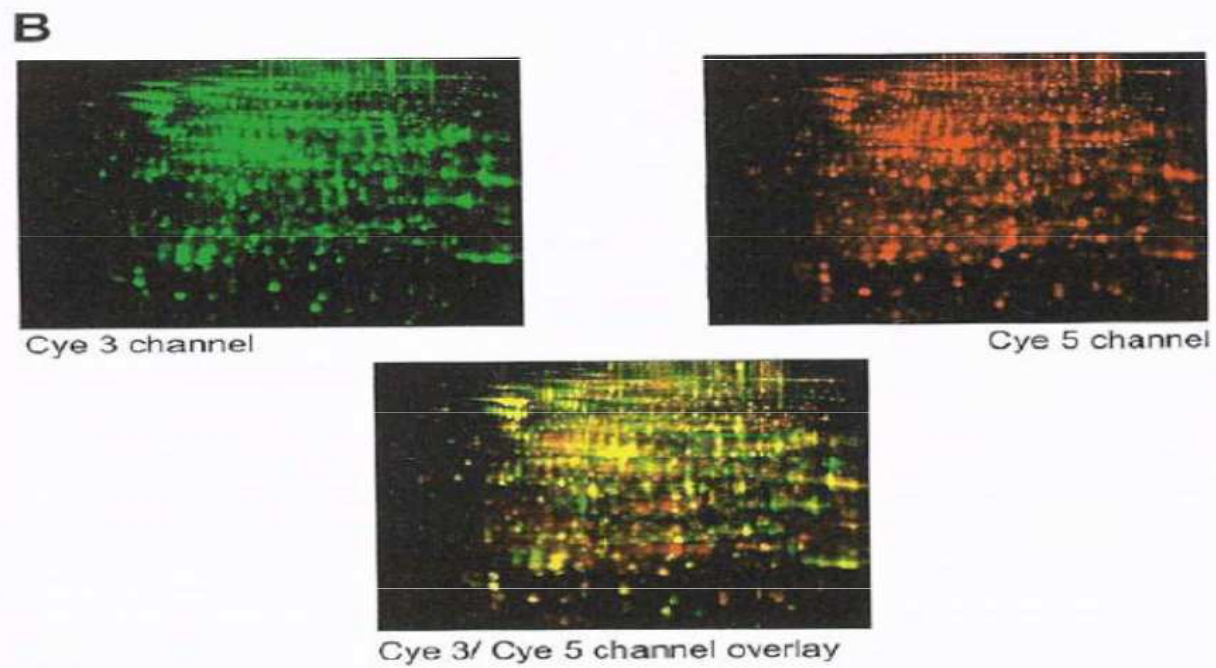
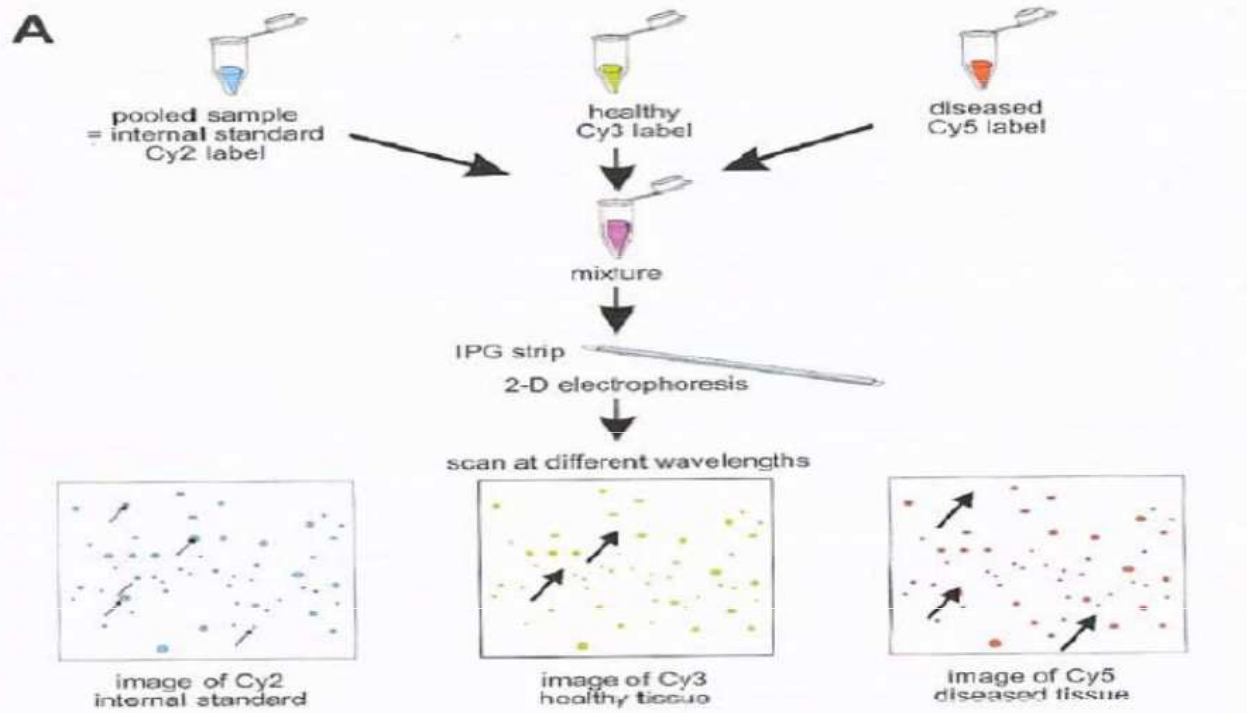
SSQIRQNYSTDVEAAVNSLVNLYLQASYTYLSLGFYFDRDDVALEGVSHFFRELAEKREG
YERLLKMQNQRRGGRALFQDIKKPAEDEWGTKTPDAMKAAMALEKKLNQALLDLHAL
GSARTDPHLCDFLETHFLDEEVKLIKKMGDHLTNLHRLGGPEAGLGEYLFERLTLKHD

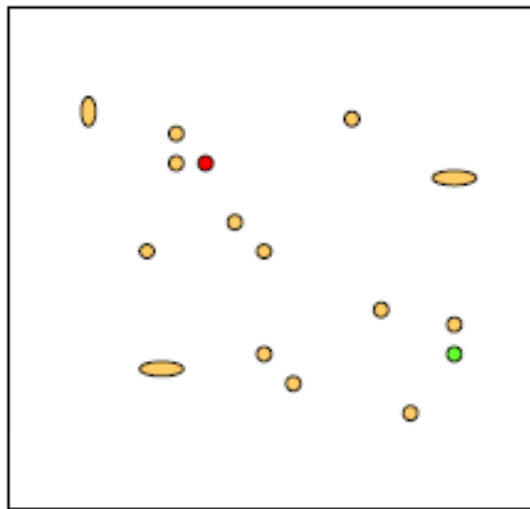
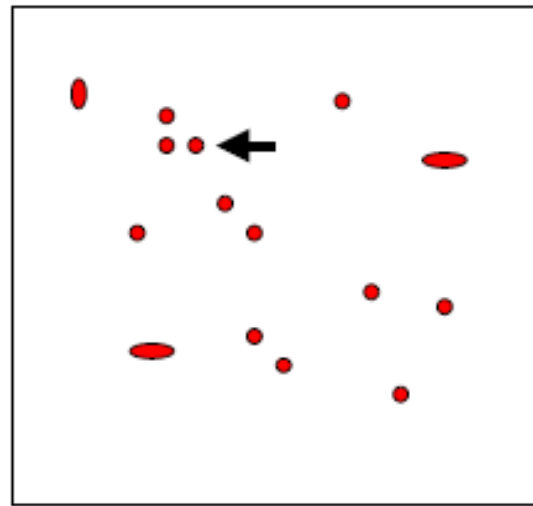
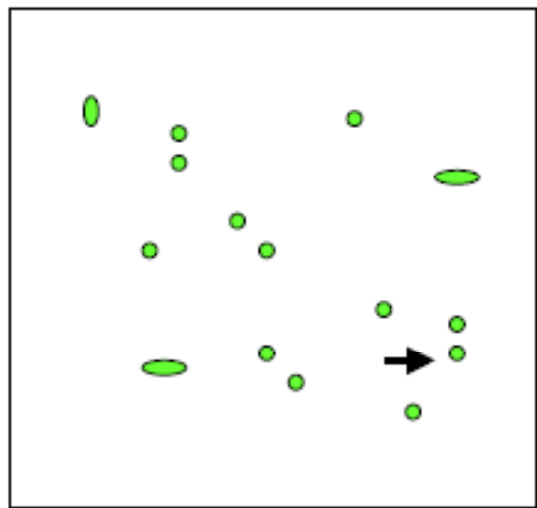
FRAGMENTACE PEPTIDU



Databáze

- <http://www.expasy.org/>





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

Podle chemického složení

A. Jednoduché

B. Složené ⇒ prosthetická skupina + apoprotein

Kvantitativní poměr mezi oběma složkami může být různý !!

Fosfoproteiny - H_3PO_4

Glykoproteiny - cukry

Metaloproteiny - kovy

Lipoproteiny - lipidy

Nukleoproteiny - nukleové kyseliny

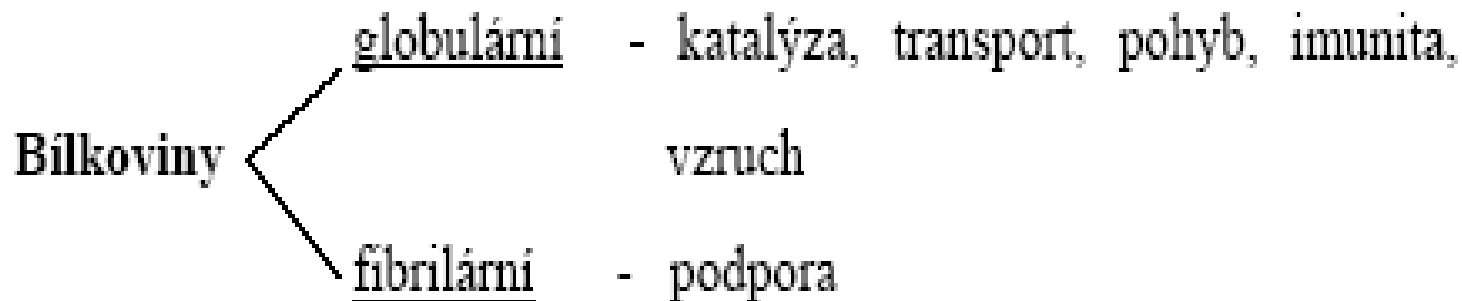
Rozdělení bílkovin

Podle celkového tvaru molekuly

A. Vláknité - fibrilární bílkoviny - SKLEROPROTEINY **NEROZPUSTNÉ**

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

B. Kulovité - globulární bílkoviny - SFEROPROTEINY **ROZPUSTNÉ**

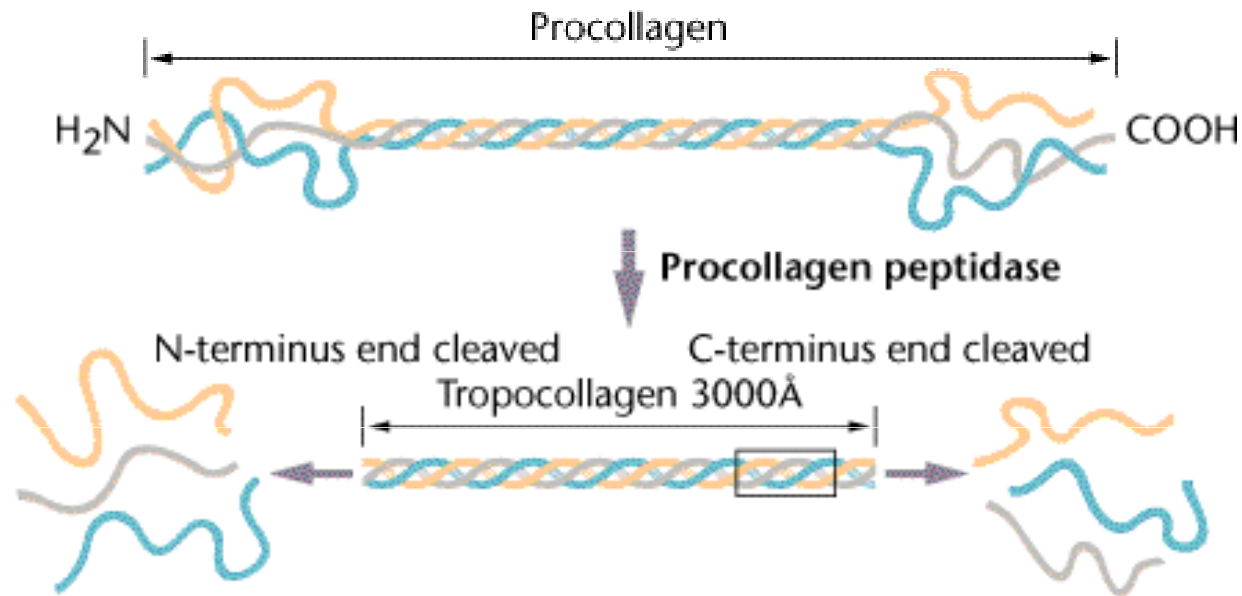


Kolagen (28 druhů)

<i>Typ</i>	<i>Molekulární složení</i>	<i>Lokalizace</i>
I	$[\alpha 1(\text{I})_2\alpha 2(\text{I})]$	kost, kůže, šlacha, ligamenta rohovka, cévy
II	$[\alpha 1(\text{II})]_3$	chrupavka, sklivec, nukleus pulposus
III	$[\alpha 1(\text{III})]_3$	kůže, cévy, retikulární vlákna v mnoha tkáních (plíce, játra, slezina, atd.)
V	$\alpha 1(\text{V})\alpha 2(\text{V})\alpha 3(\text{V})$	plíce, rohovka, kost, fetální membrány, doprovází kolagen I
XI	$\alpha 1(\text{XI})\alpha 2(\text{XI})\alpha 3(\text{XI})$	chrupavka, sklivec

Délka molekuly je 300 nm, α -řetězec obsahuje 1000 aminokyselin.

Molekulární struktura fibrilárních kolagenů



- pravotočivá trojitá šroubovice - 3 α -řetězce (levotočivá šroubovice s odstupem 18 aminokyselin na jednu otáčku)

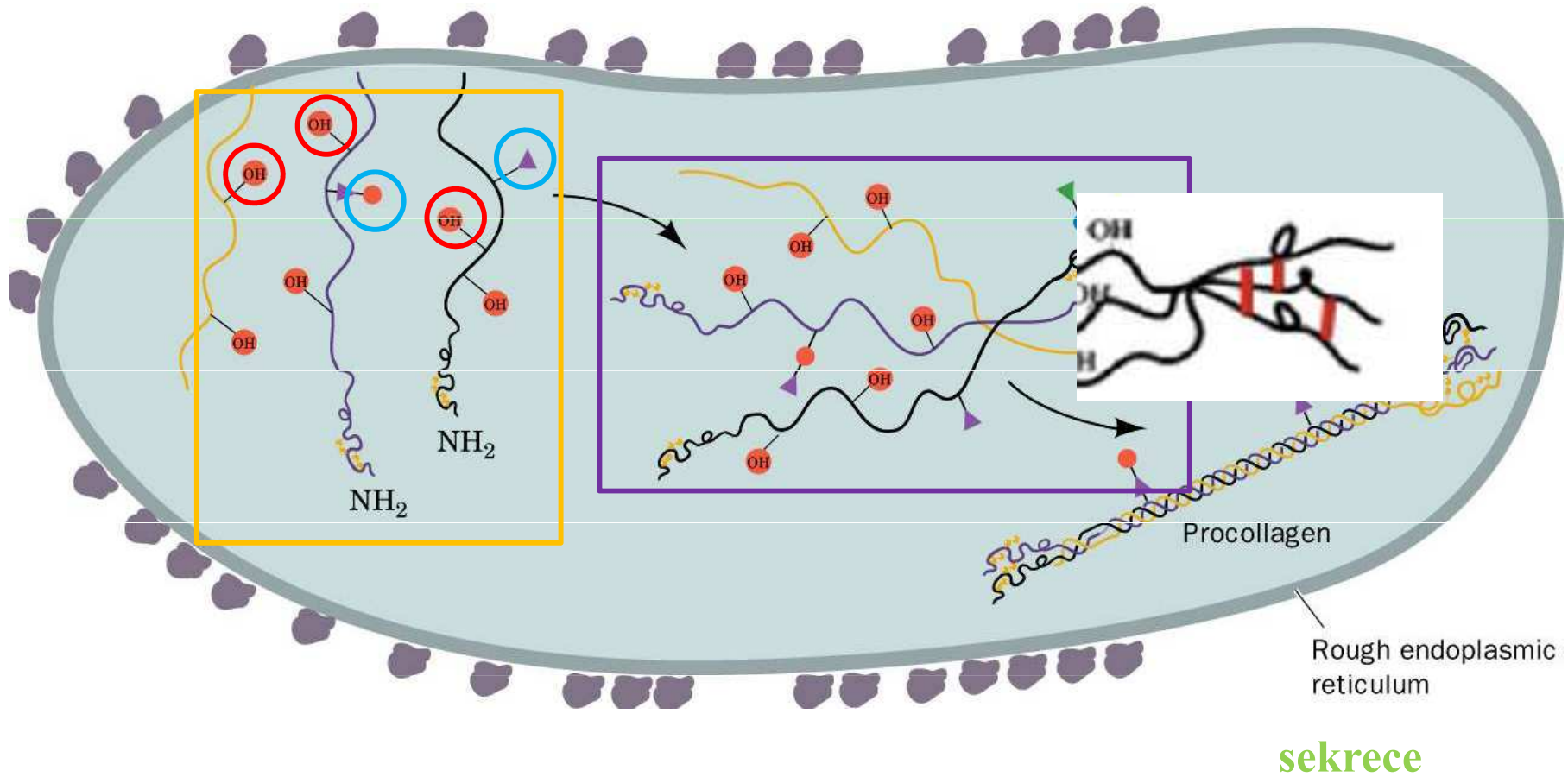
syntéza peptidů

hydroxylace

glykosylace

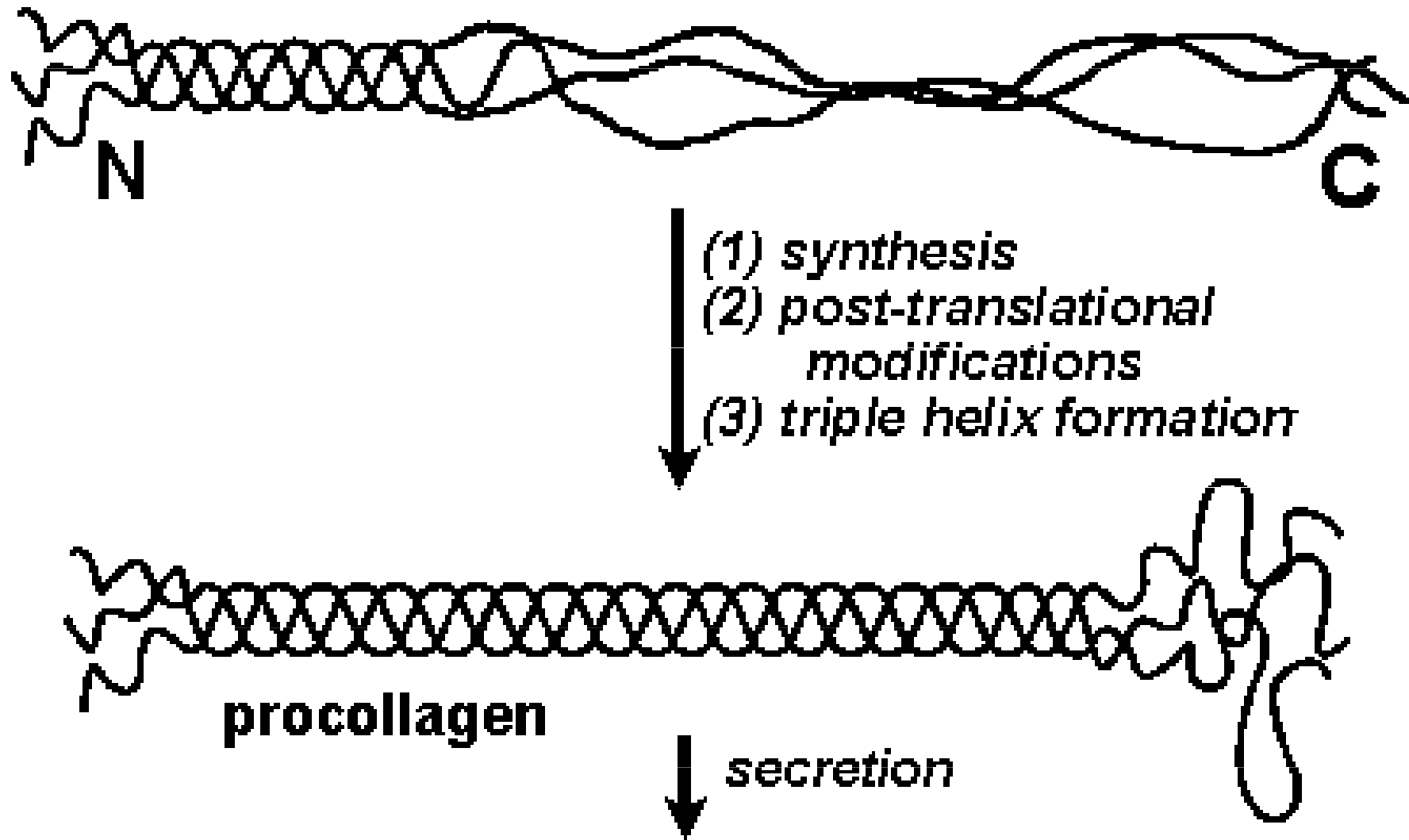
tvorba bisulfidických můstků

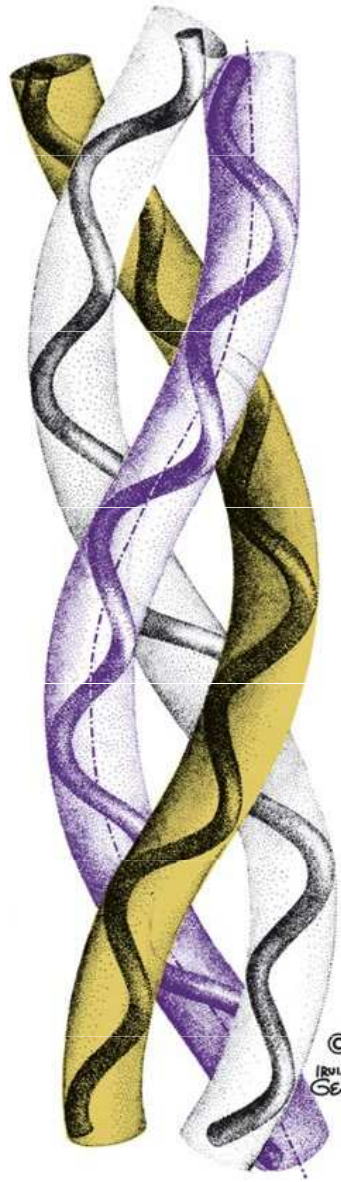
svinutí



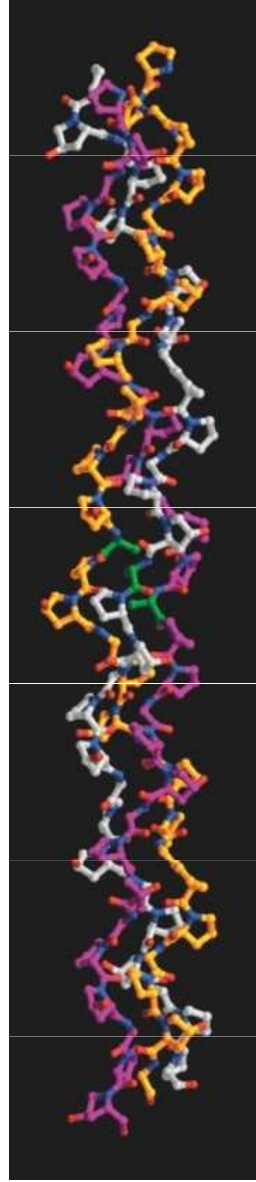
- Fibroblasty
- Chondroblasty
- Osteoblasty

Formation of collagen: intracellular processing

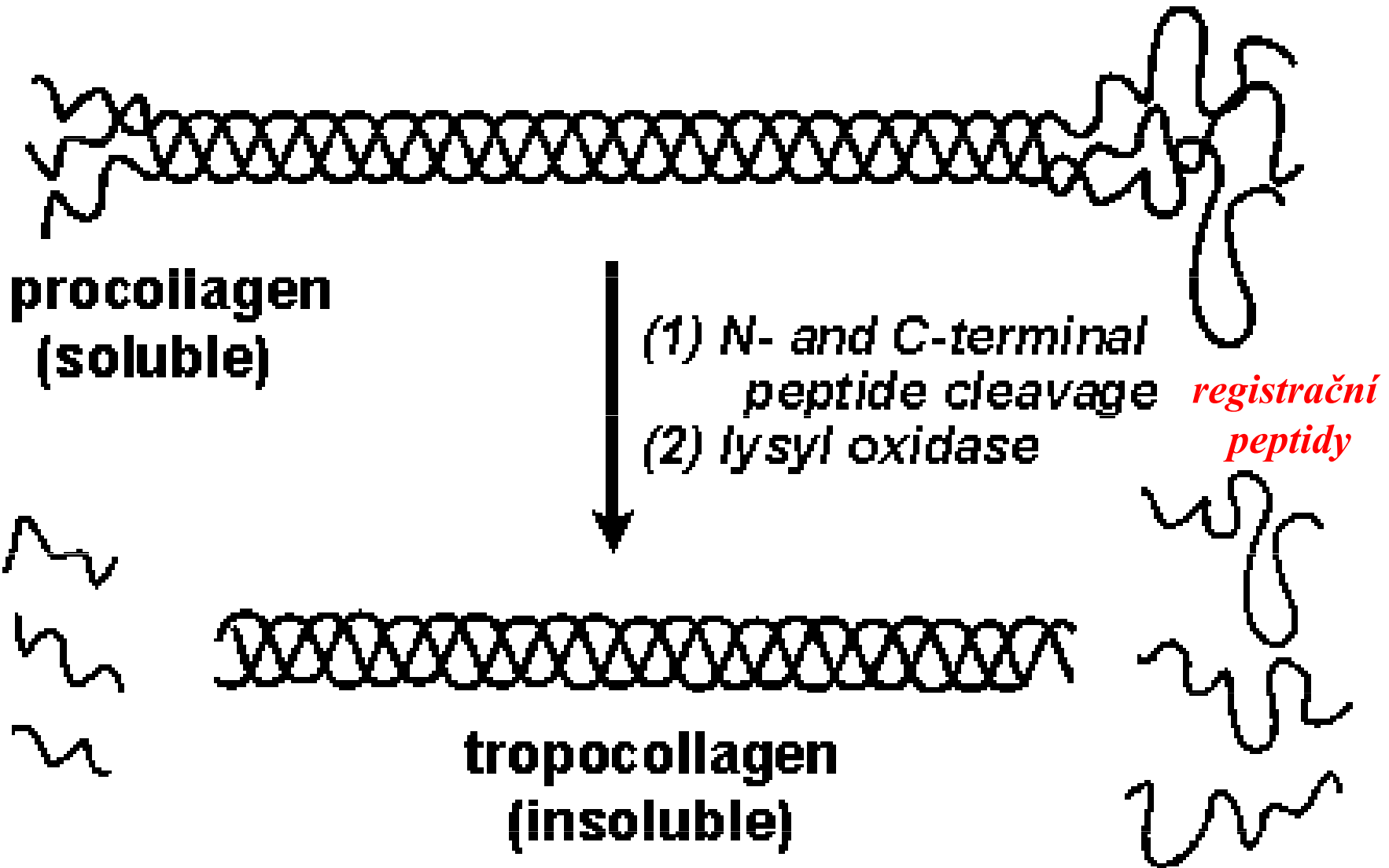




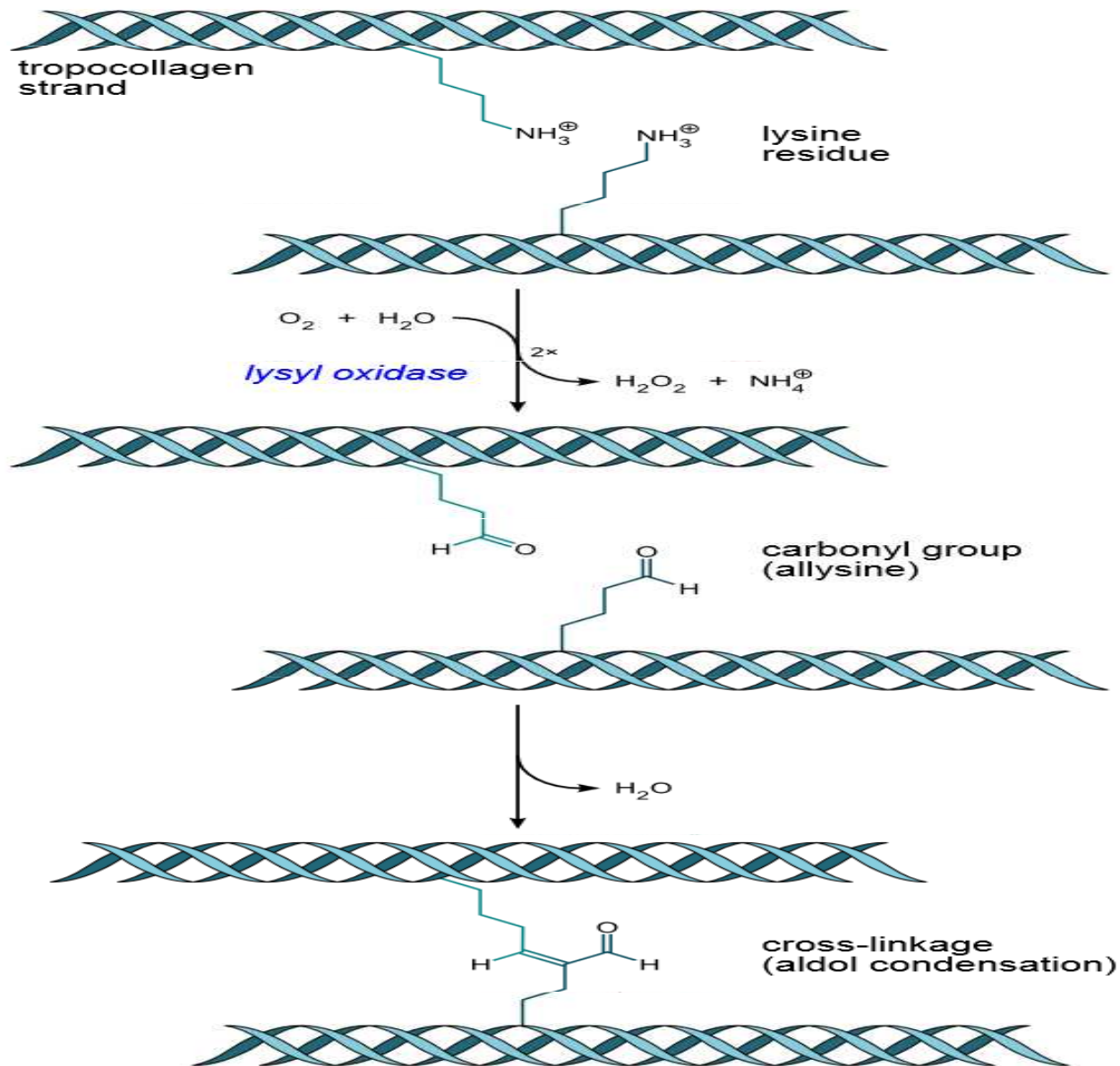
© IRVING GEIS
Irving Geis/Geis Archives Trust. Copyright Howard Hughes Medical Institute. Reproduced with permission.



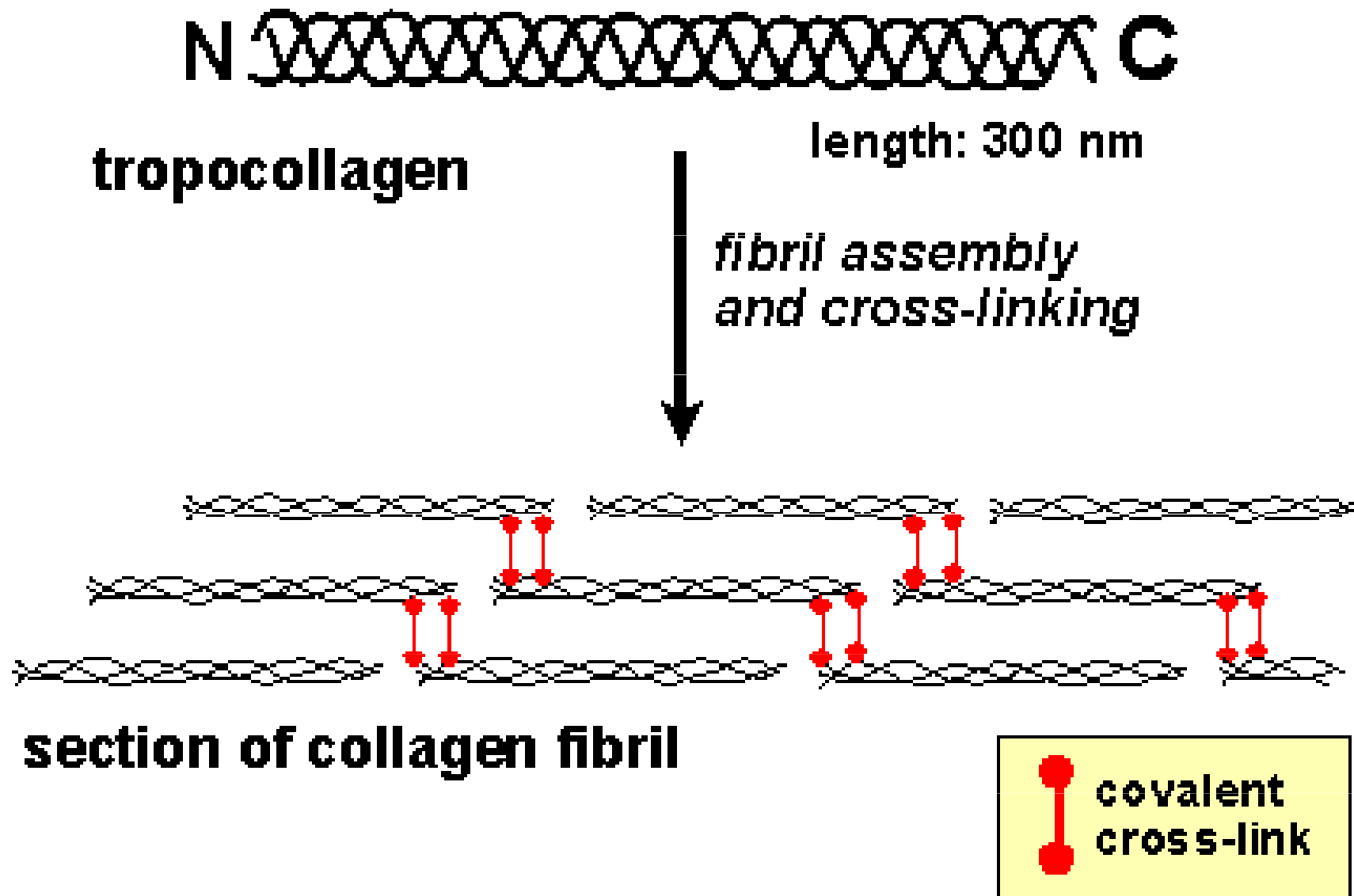
Formation of collagen: extracellular processing



Lysyloxidáza



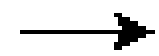
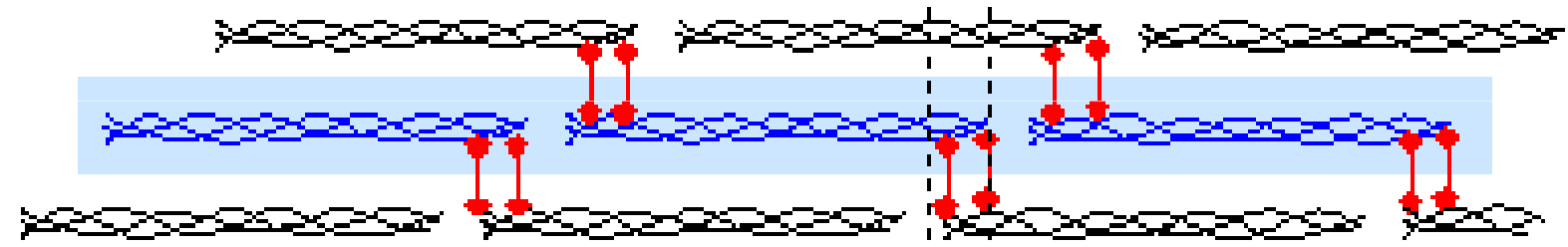
Formation of collagen: extracellular processing



Formation of collagen: extracellular processing

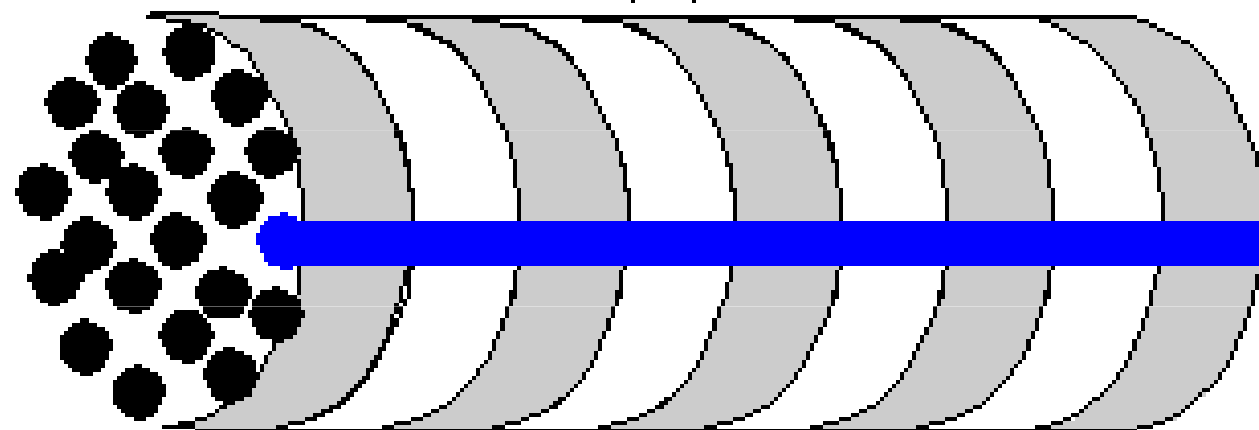
↓ *fibril assembly
and cross-linking*

section of collagen fibril

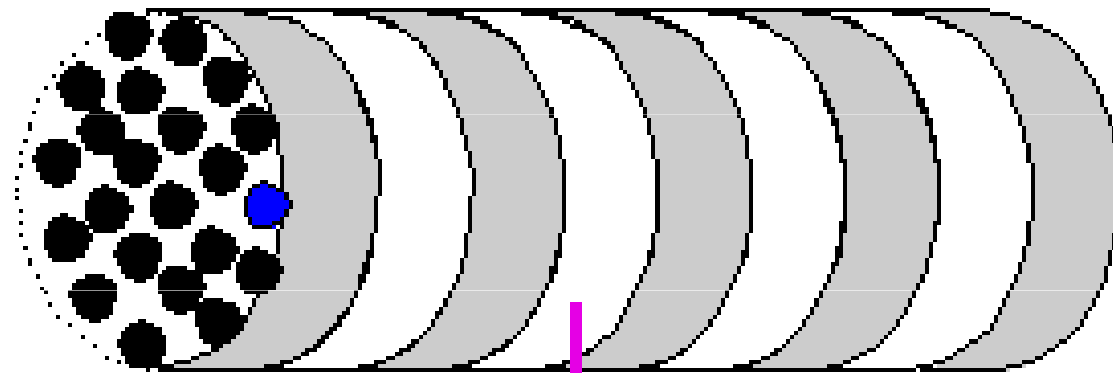


← 64-67 nm
"quarter-staggered array"

collagen fibril



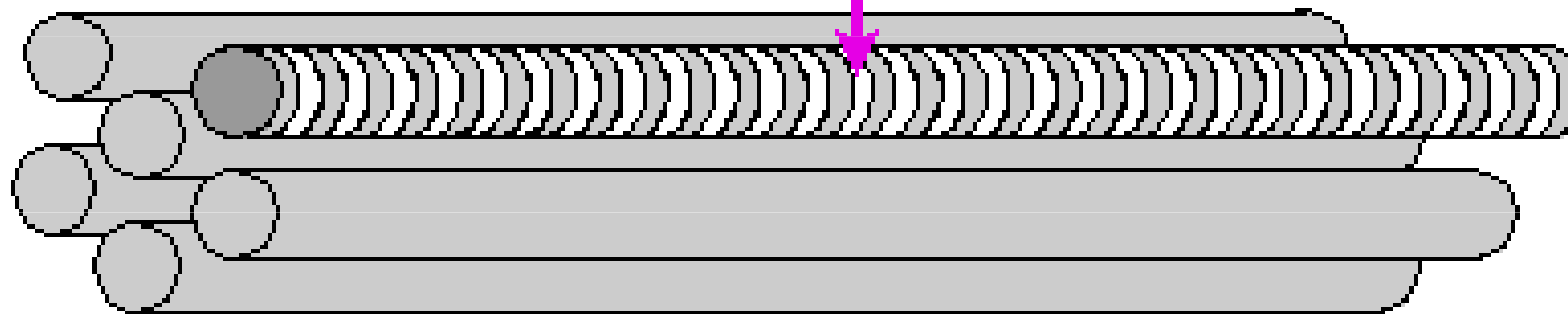
Formation of collagen: extracellular processing



collagen fibril

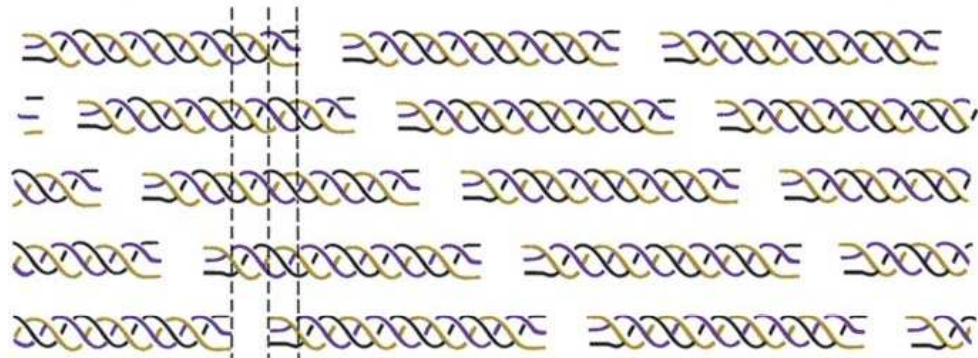
aggregation

collagen fiber

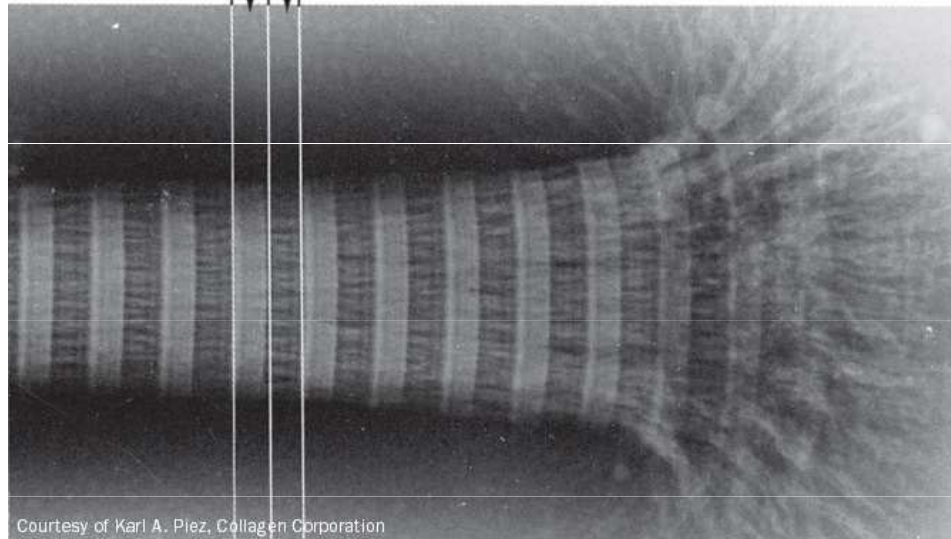


Collagen molecule 

Packing of molecules

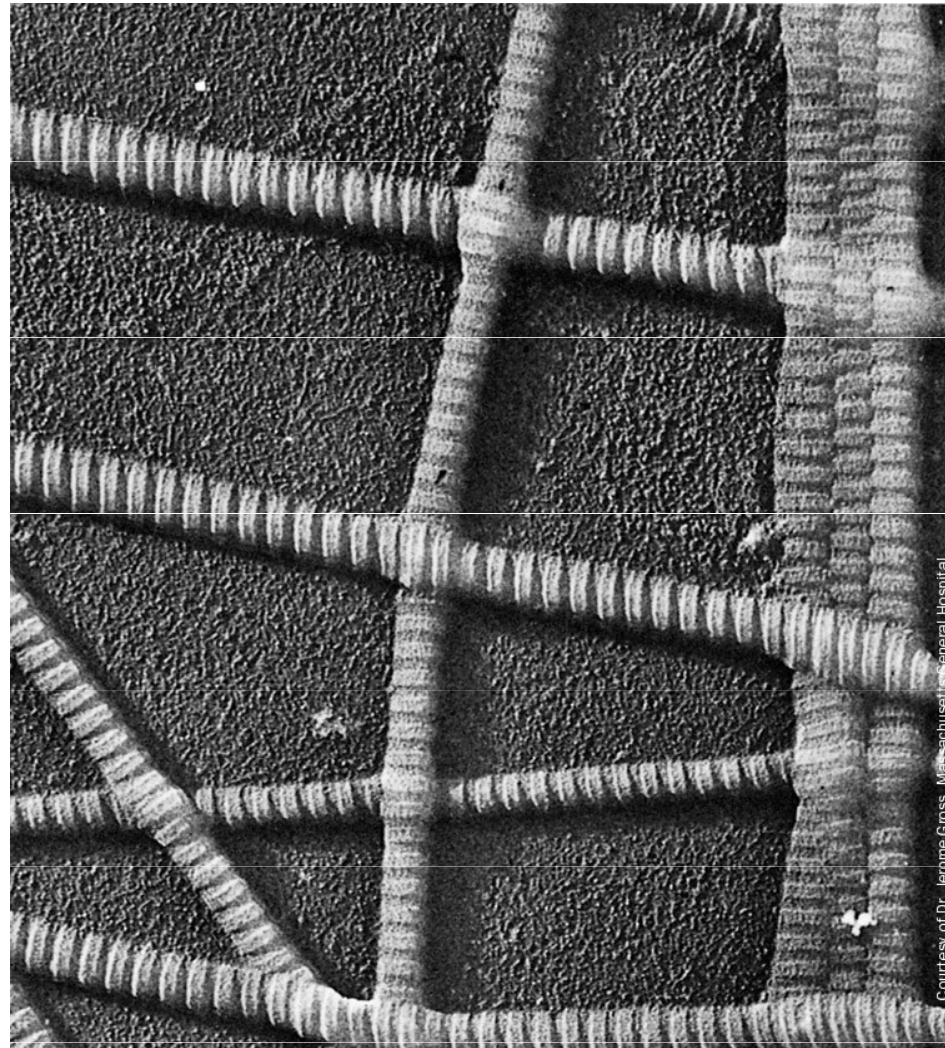


Hole zone ———— 0.6D
Overlap zone ———— 0.4D



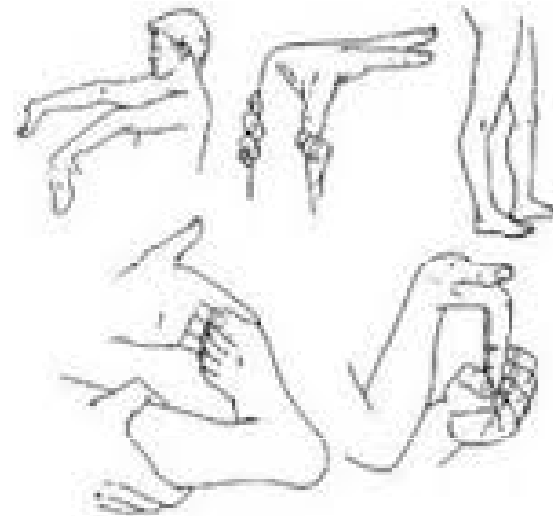
Courtesy of Karl A. Piez, Collagen Corporation

Kolagen v kůži

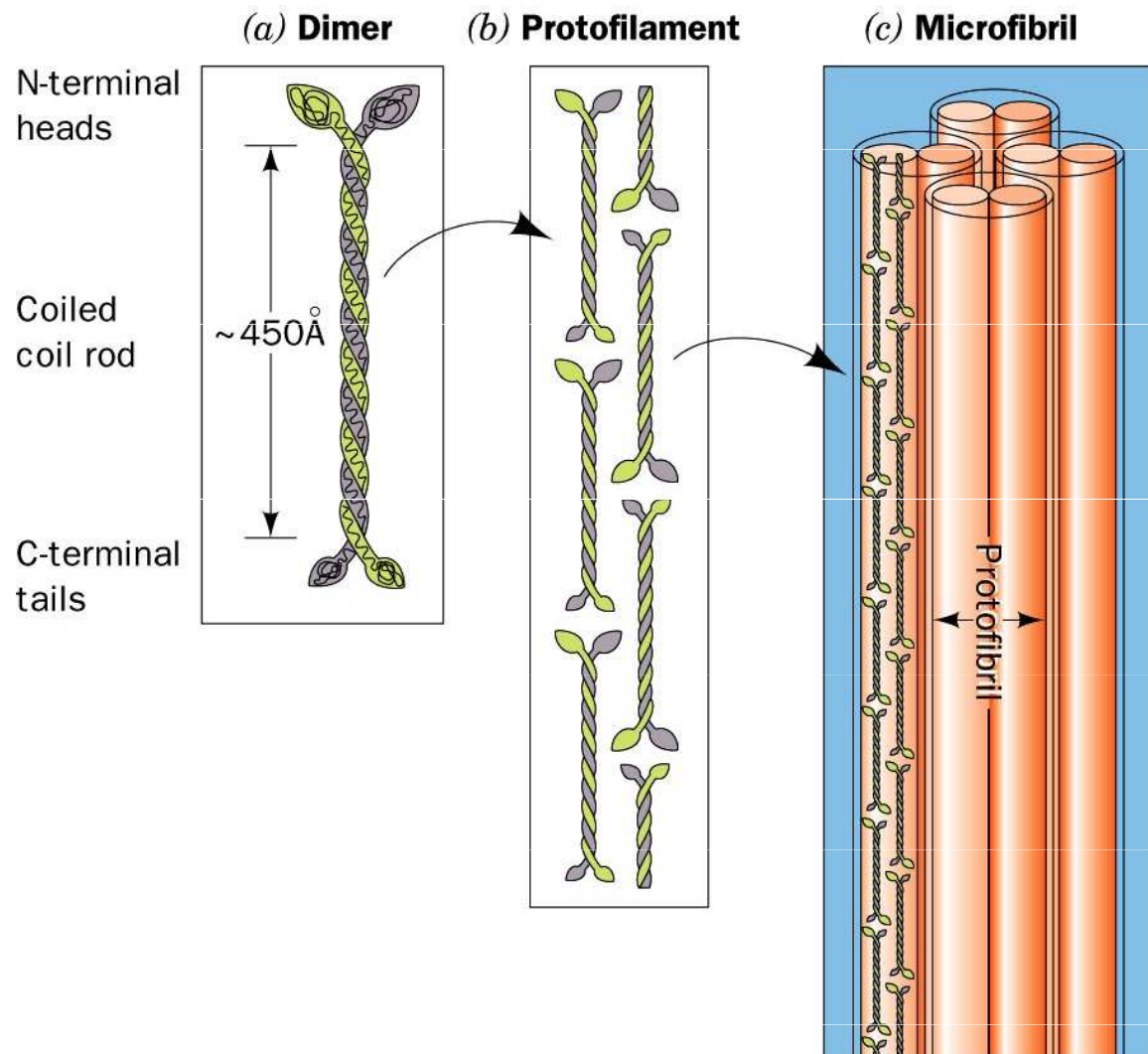


Courtesy of Dr. Jerome Gross, Massachusetts General Hospital

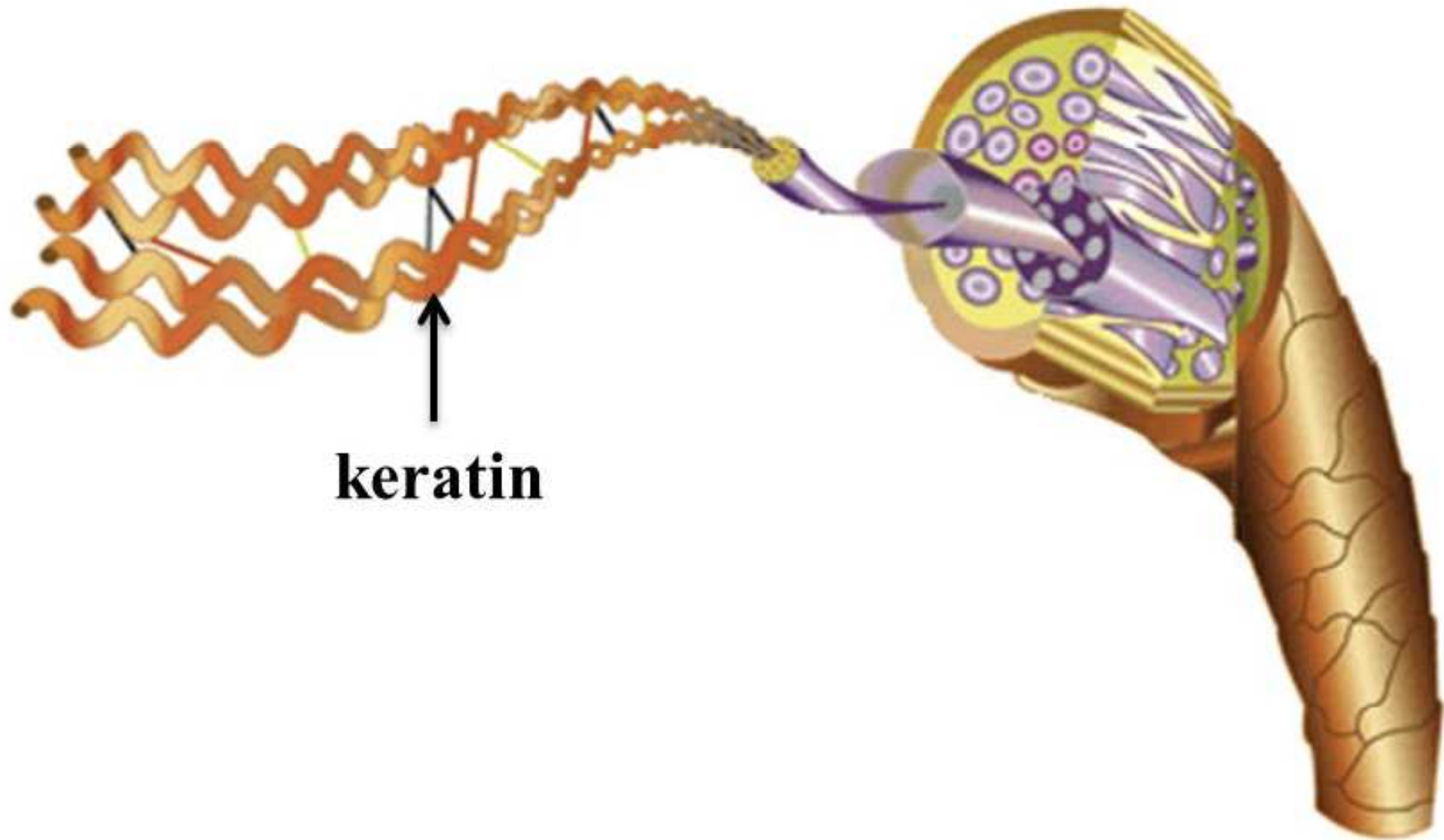
Ehlers–Danlos syndrom (EDS)



α - keratin

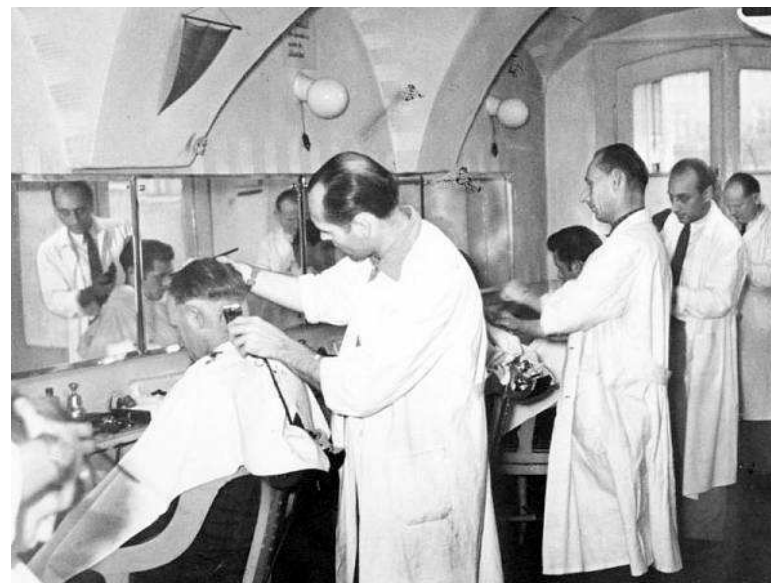


α – keratin - vlas

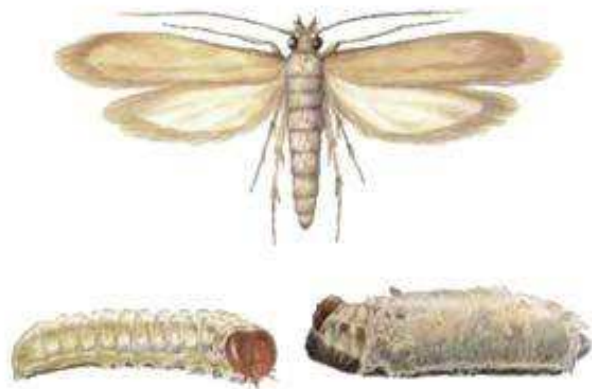


keratin

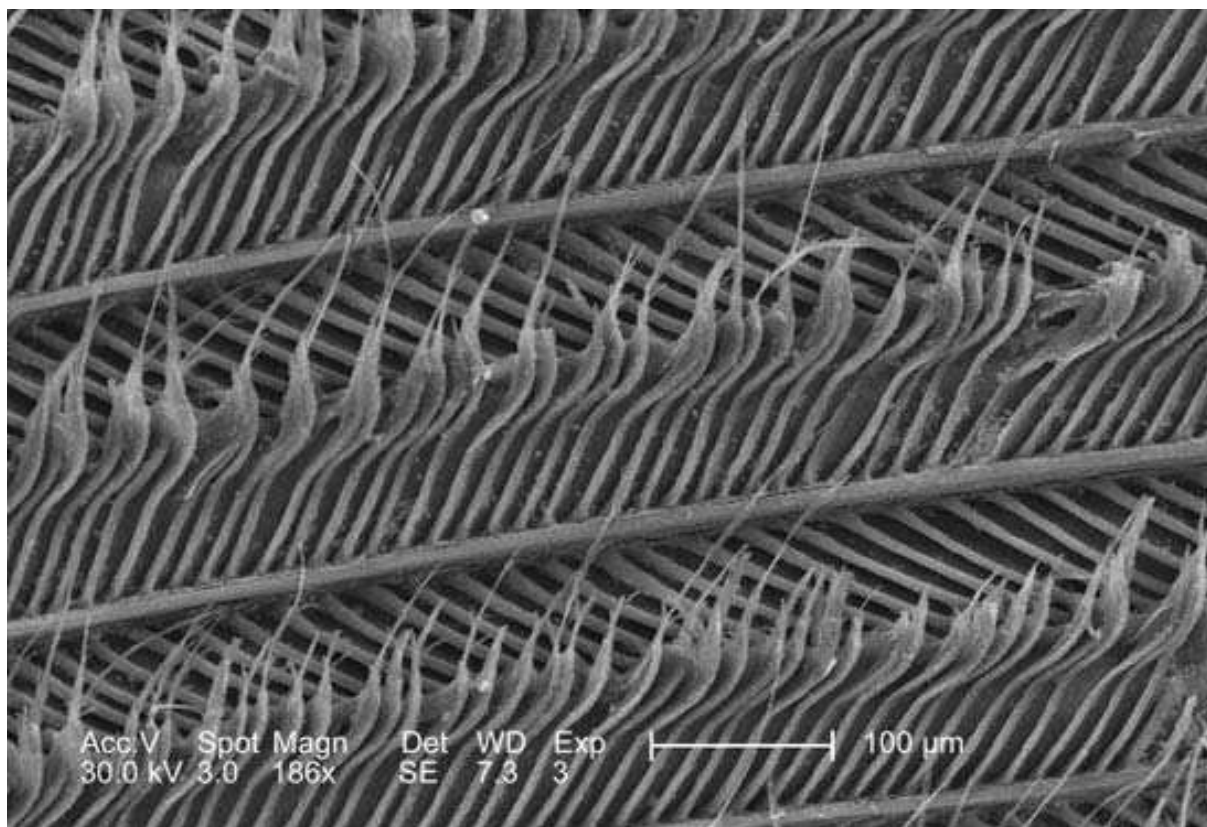
Trvalá ondulace



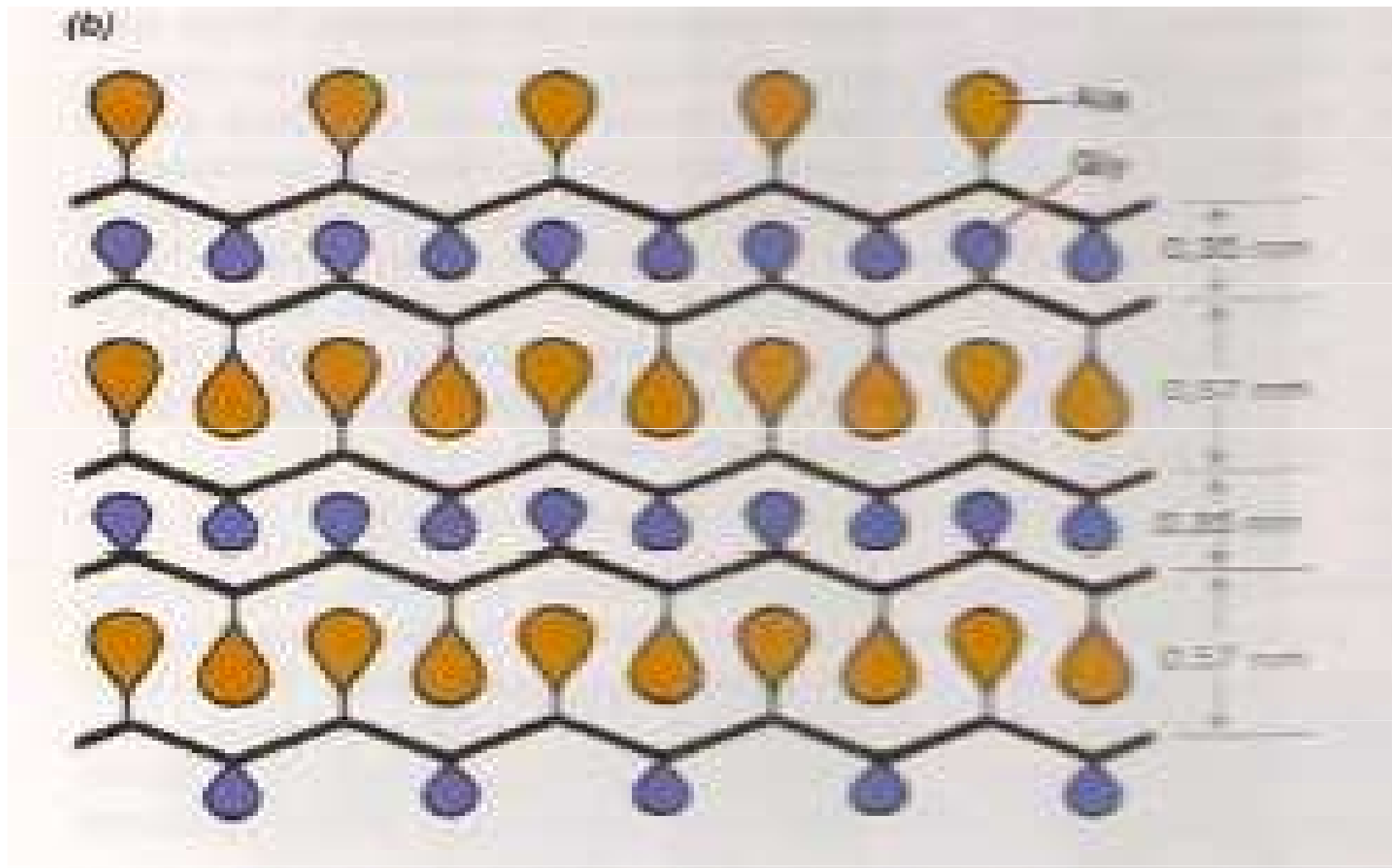
Mol šatní



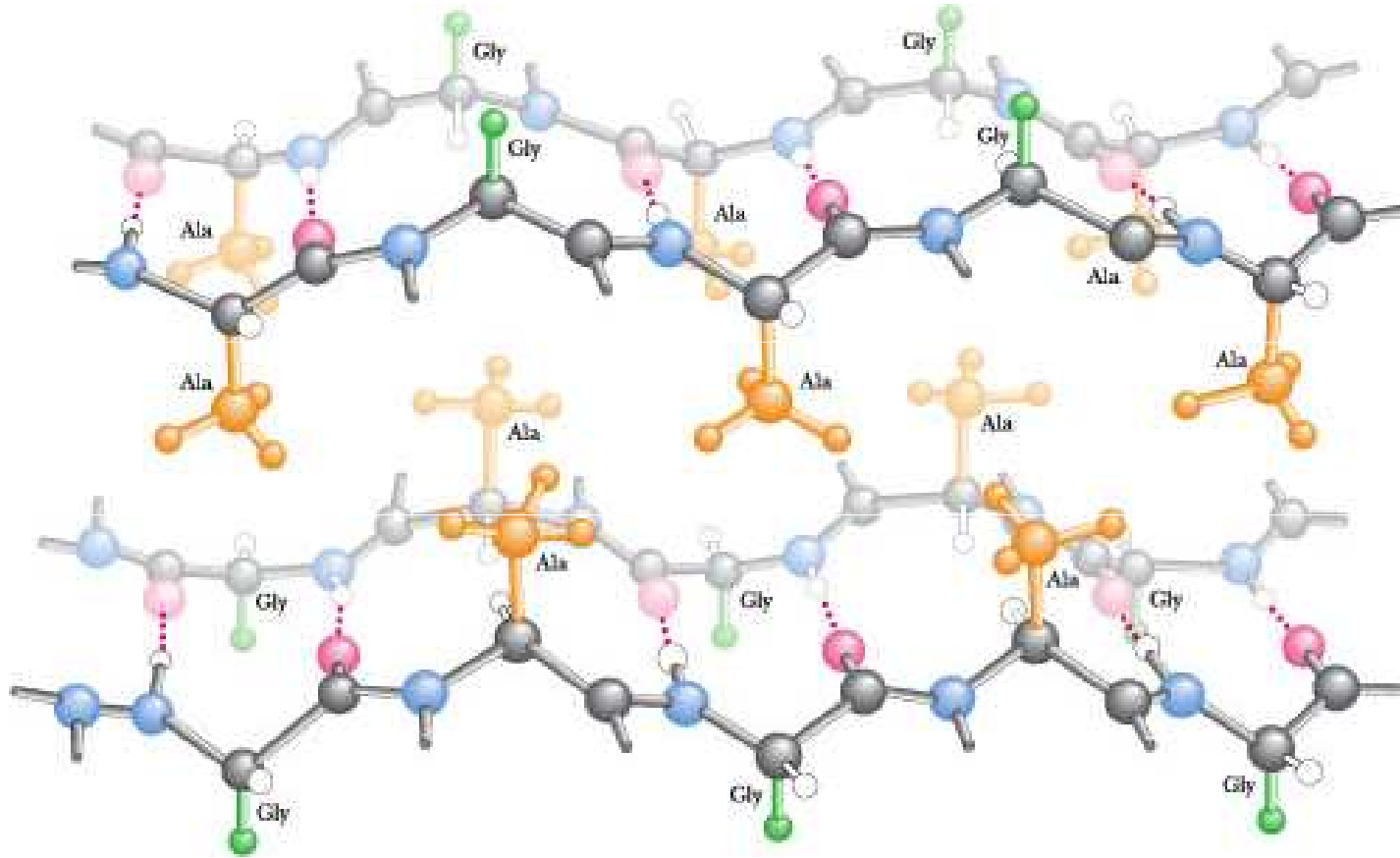
Peří



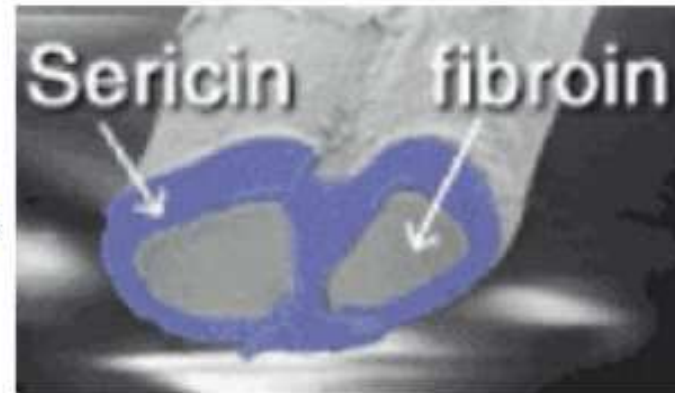
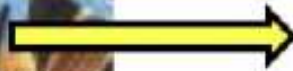
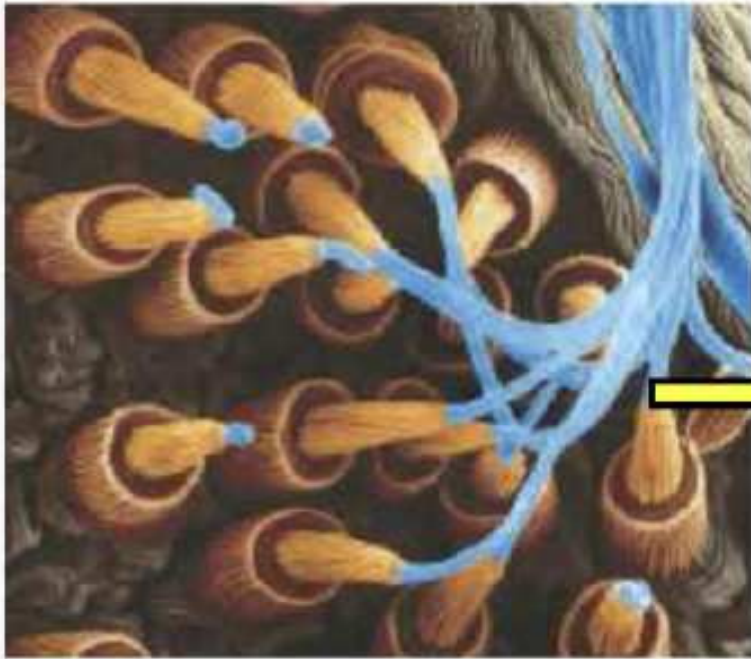
β - keratin



β - keratin



Hedvábí



Elastin

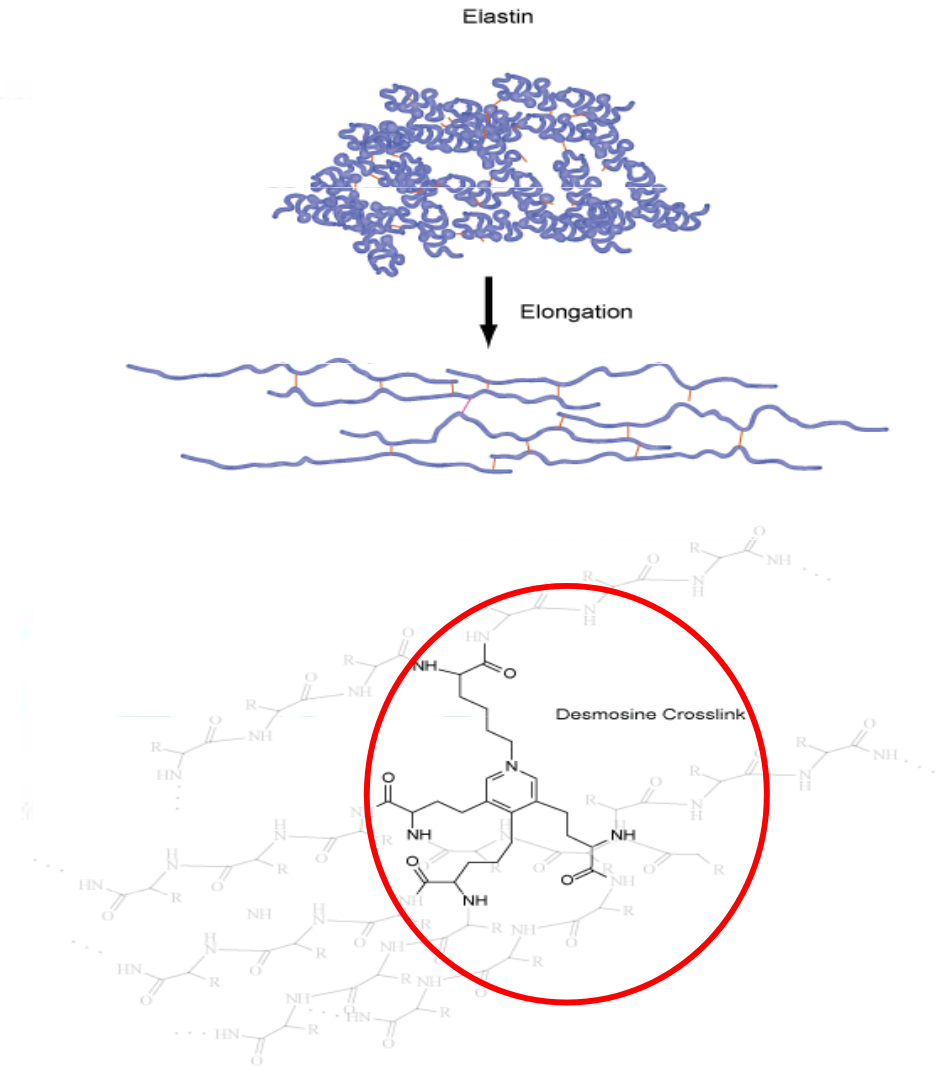
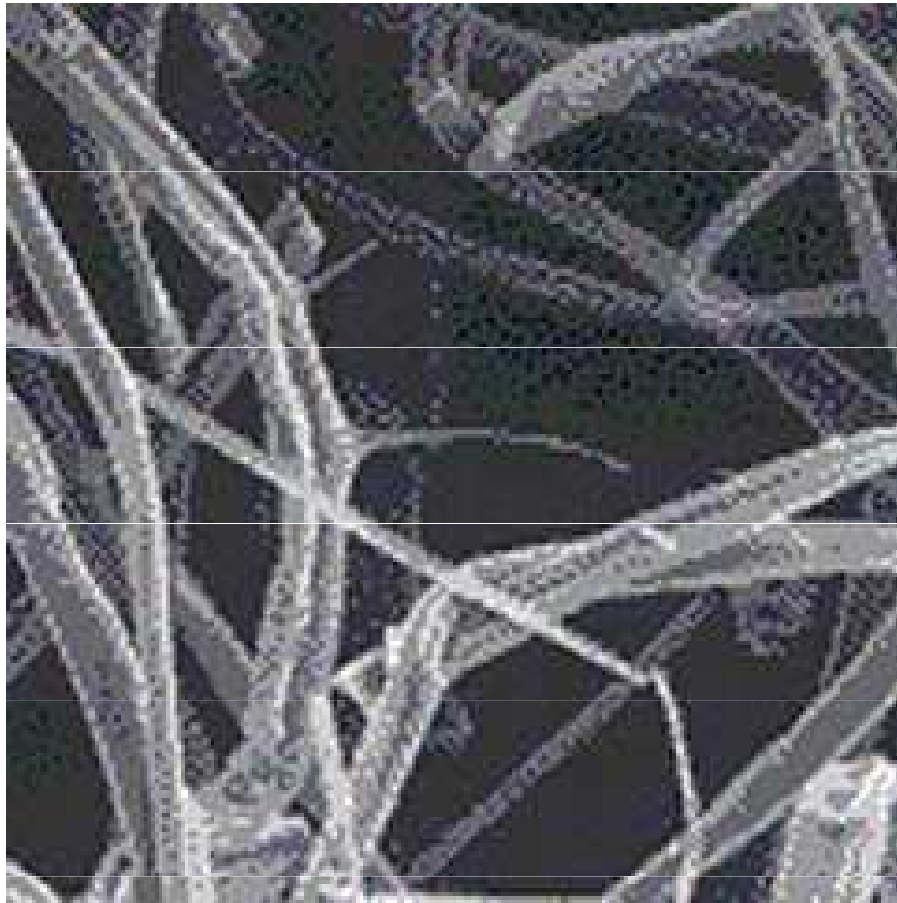


Figure 4-28 Essential Cell Biology, 2/e. (© 2004 Garland Science)