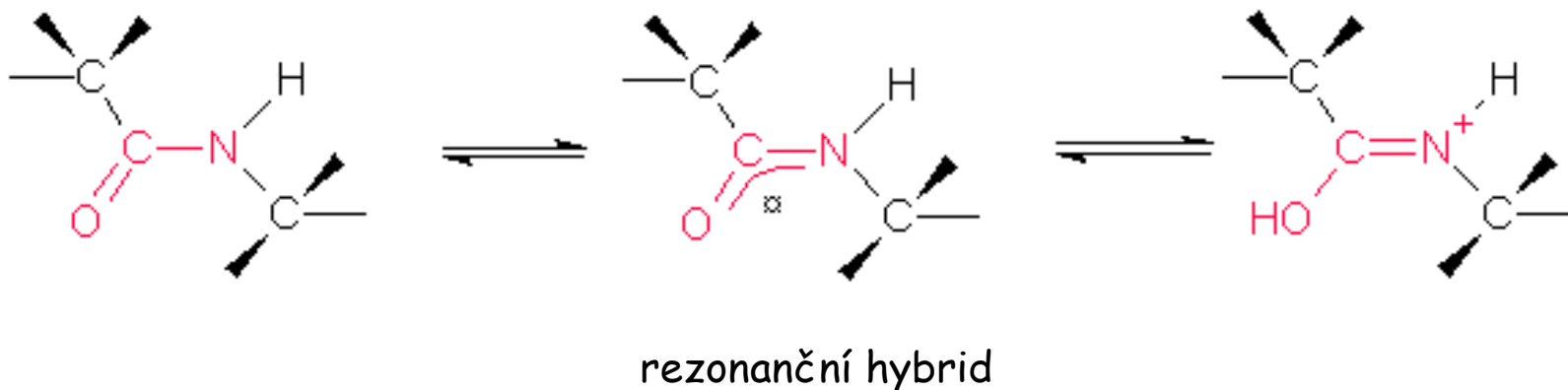




# Peptidová vazba

Pauling (1951): peptidová vazba je **rezonanční hybrid** dvou mezních forem



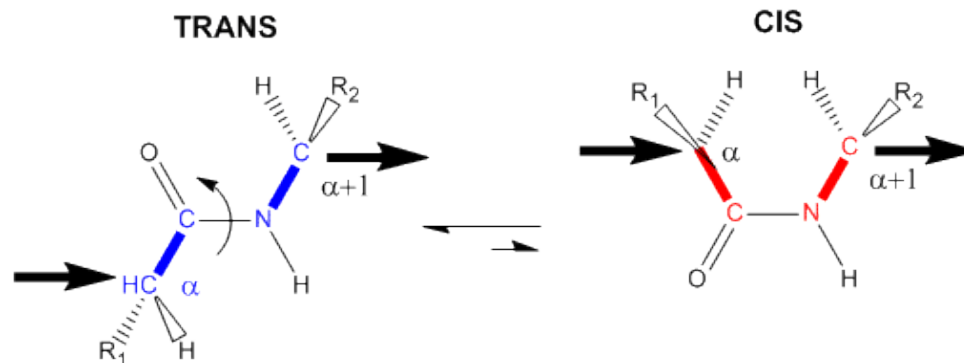
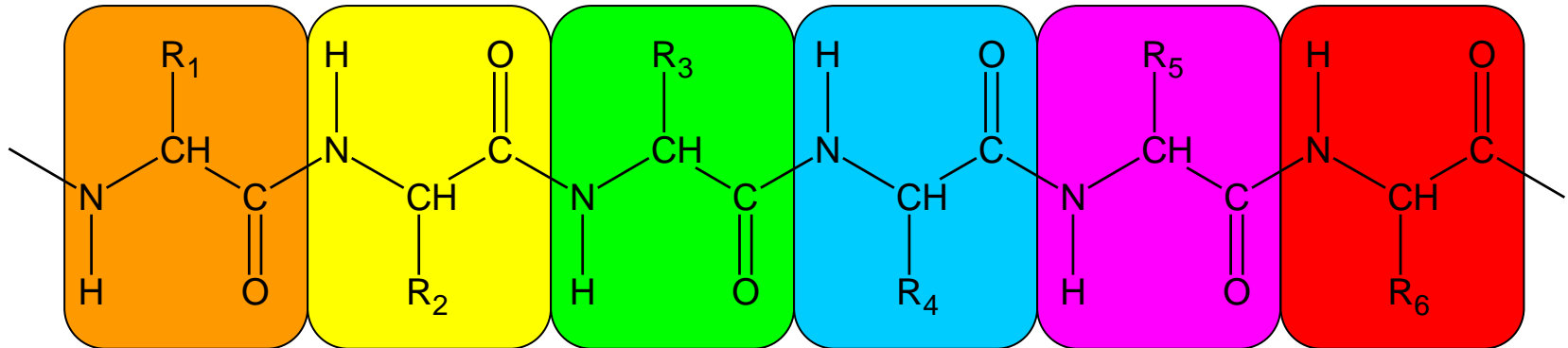
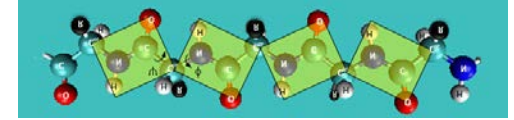
Částečný charakter dvojné vazby rezonančního hybridu za fyziologických podmínek brání rotaci - **všechny čtyři atomy jsou v jedné rovině**

# Hierarchie struktur

- **Primární**
  - Sekvence aminoacylů - kolik a jak seřazeny
- **Sekundární**
  - Uspořádání - vztah sousedních monomerů
- **Terciární**
  - Tvar molekuly v prostoru, uspořádání řetězce jako tělesa
- **Kvarterní**
  - Agregační stav funkční jednotky, nadmolekulární úroveň

# Primární struktura peptidů a bílkovin

pořadí aminokyselin v bílkovinném řetězci



Existuje **trans** a **cis** forma peptidické vazby. Pozice **trans** je díky stérickým zábranám **stabilnější** než **cis** a je prakticky **u všech aminokyselinových zbytků**

## Počet a druh AK

určuje základní vlastnosti  
velikost, polarita, náboje - pI

## Pořadí aminoacylů

sekvence, **primární struktura**  
determinuje finální vlastnosti

## Směr sekvence

Od N k C konci  
Koncová skupina může  
být derivatizována (N-acyl, amid, ester)

Podle délky aminokyselinového řetězce rozlišujeme:

2-10 aminokyselin → **oligopeptidy**

11-100 aminokyselin → **polypeptidy**

100 a více aminokyselin → **proteiny**

# Sekundární struktura

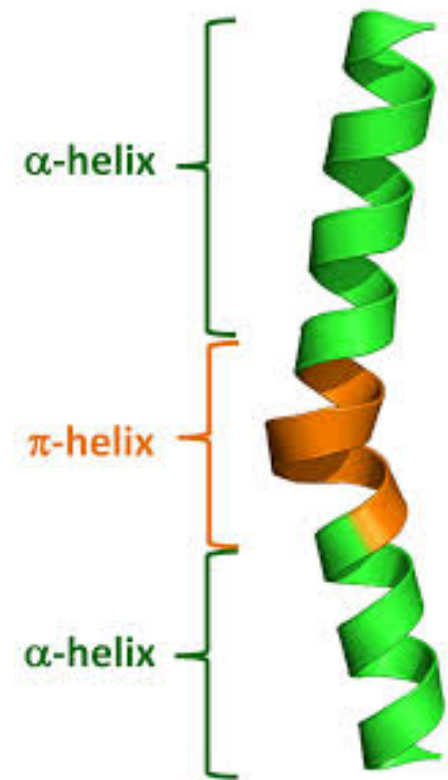
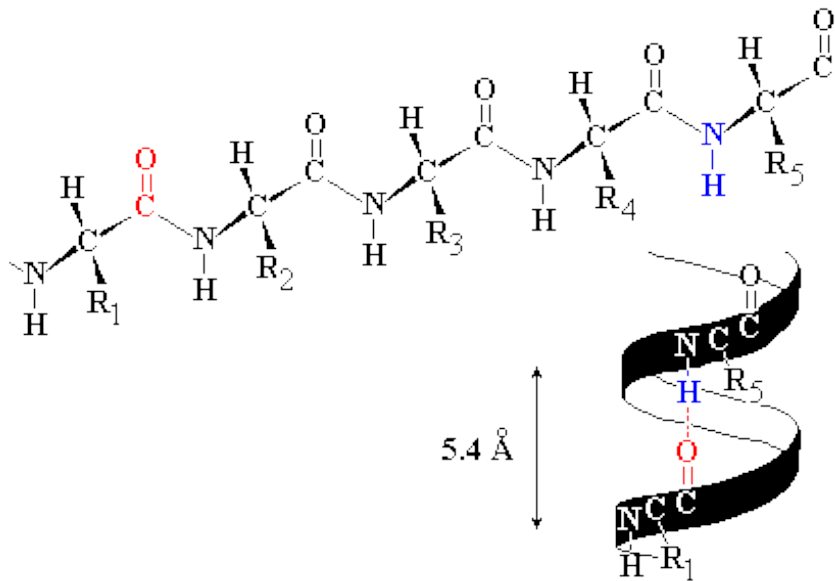
uspořádání hlavního řetězce (primární struktury)

- pravidelné
  - šroubovice
  - hřeben
- ohybové
- nepravidelné

# Sekundární struktura

„pravidelné šroubovice (helixy)“

helixy se liší průměrem závitů, stoupavostí  
a směrem otáčení

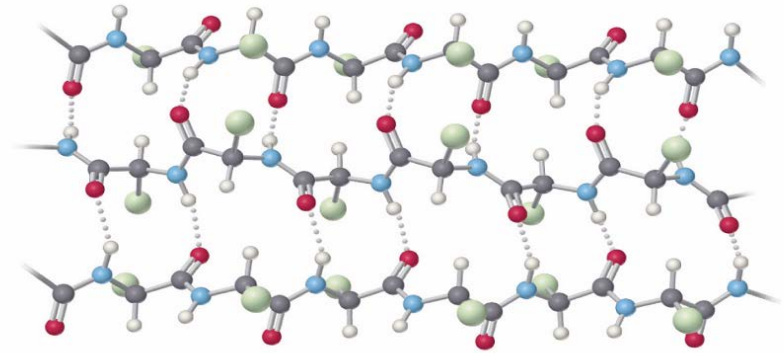


nejčastěji se vyskytuje  **$\alpha$ -helix**

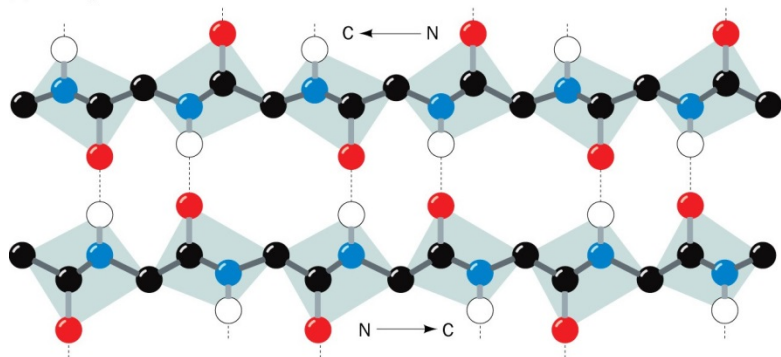
kruh tvořený 13 atomy  
výška závitů 0,54 nm  
pro L-AMK stabilnější pravotočivá konfigurace

# Sekundární struktura

„pravidelné hřebeny ( $\beta$ -skládaný list)“

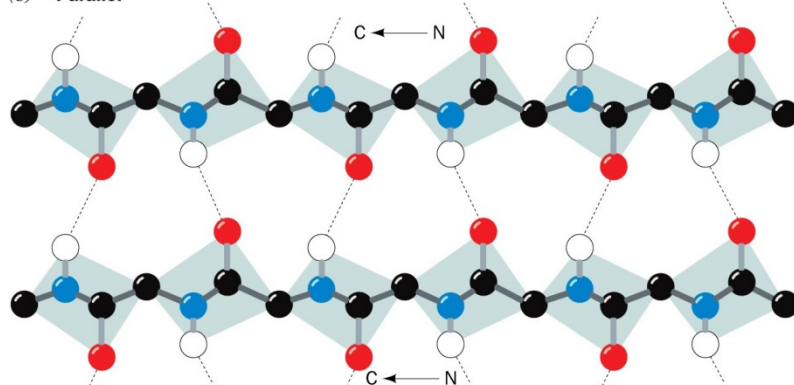


(a) Antiparallel

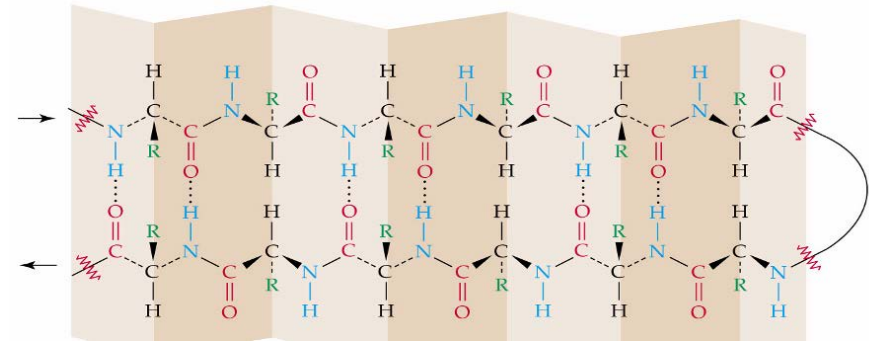


Irving Geis/Geis Archives Trust. Copyright Howard Hughes Medical Institute. Reproduced with permission.

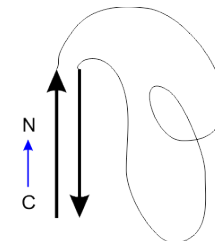
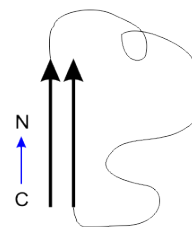
(b) Parallel



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



postranní řetězce AMK zbytků vystupují střídavě kolmo nad a pod rovinu „hřebenu“  
rozlišujeme paralelní a antiparalelní strukturu

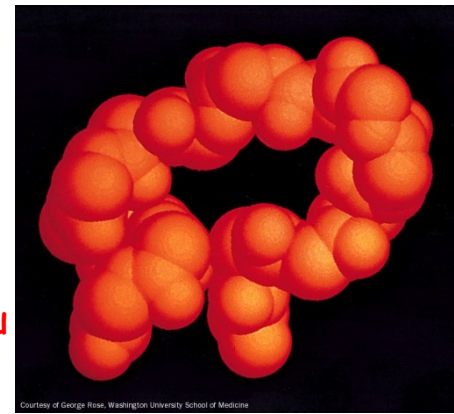




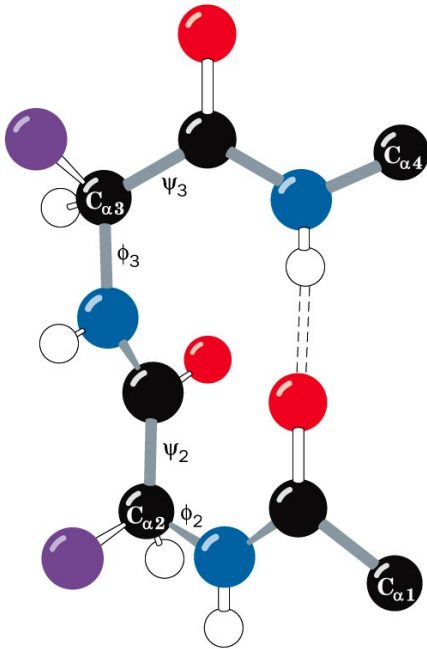
# Sekundární struktura

„ohybové struktury“

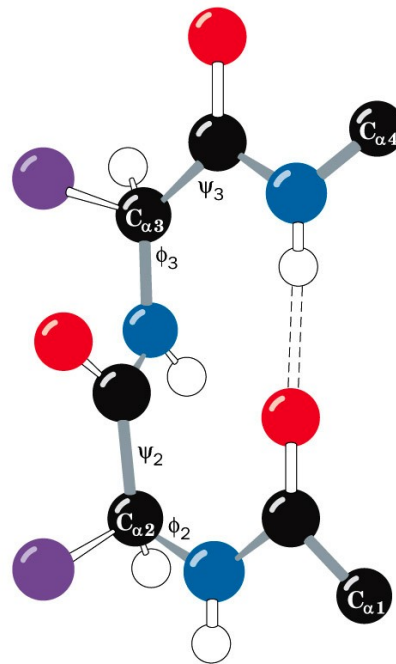
organizované otočení průběhu polypeptidového řetězce do protisměru



(a) Type I  $\beta$  bend



(b) Type II  $\beta$  bend



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

několik typů:

- obdoba jedné smyčky  $\alpha$ -helixu
- $\beta$ -ohyb „reverzní smyčka“

**prionový protein**  
součást neuronů  
převaha  **$\alpha$ -helix**

—————→  
konformační změna

**prion**  
rozpad neuronů  
převaha  **$\beta$ -skládaný list**



vzniklý prion se zabalí tak, že je extrémně odolný (UV, nejsilnější dezinfekční činidla, 300°C) a zároveň funguje jako matrice, podle které se přeměňují další prionové proteiny

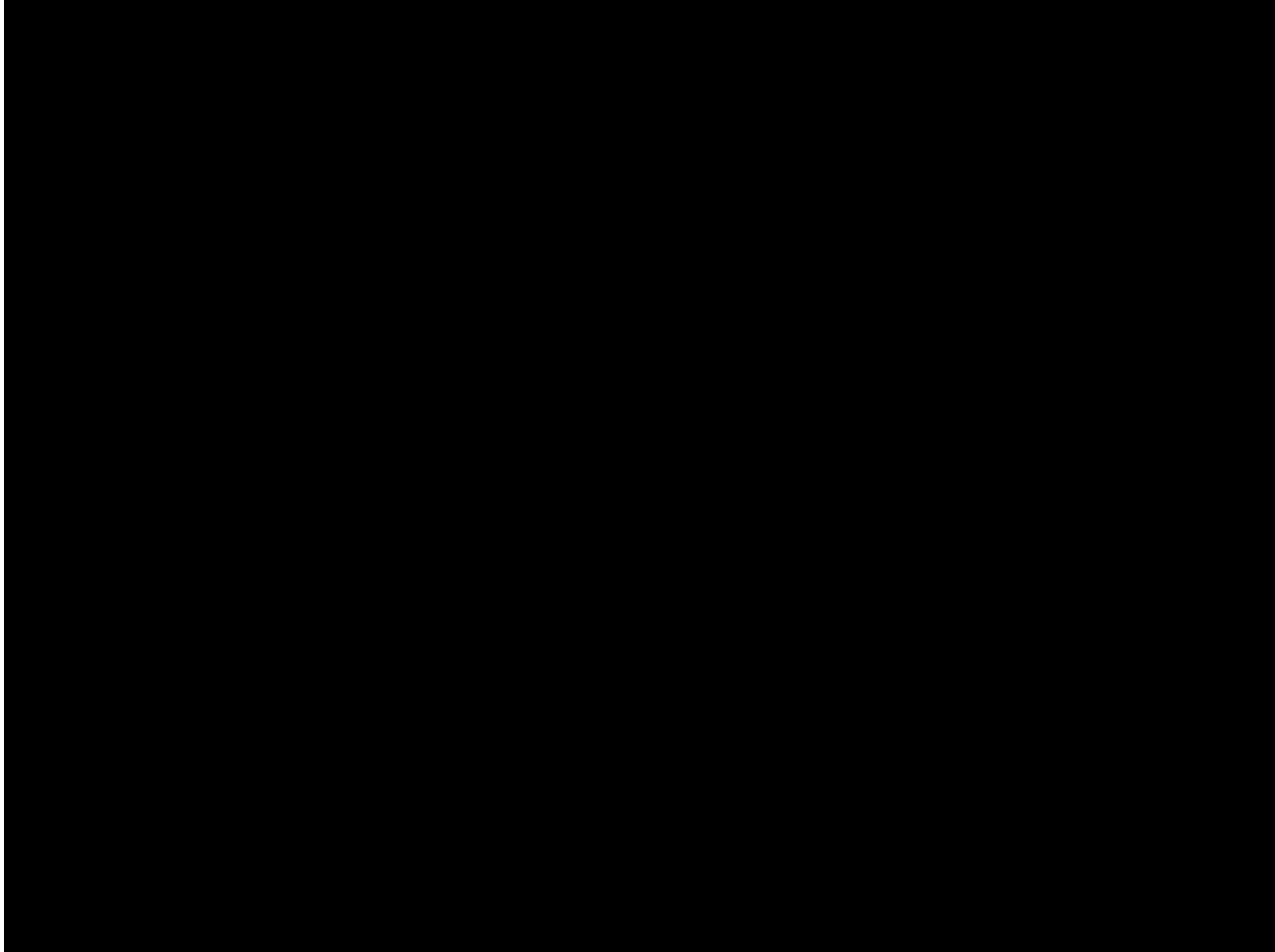
**prionové nemoci:**

Skrapie „klusavka“ u ovcí

1986 Anglie Nemoc šílených krav, známá pod zkratkou BSE (bovinní spongiformní encefalopatie)

1995 Anglie „nová“ Creutzfeldt-Jakobova nemoc (u lidí)

# Terciární struktura

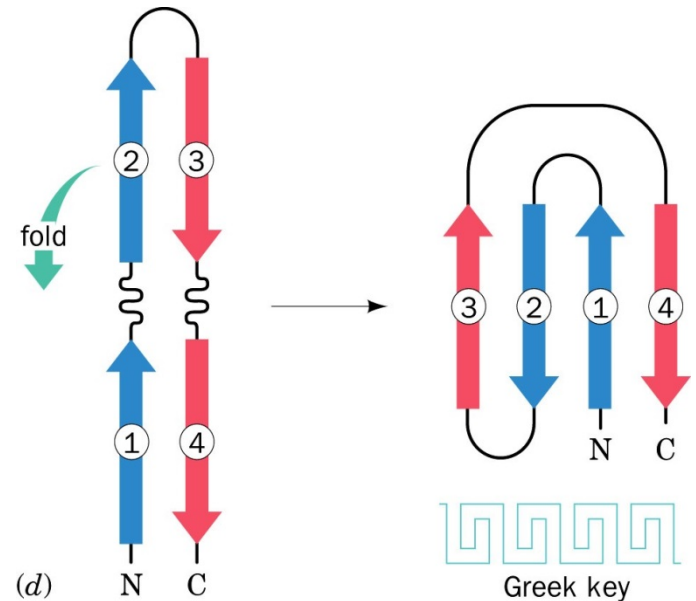
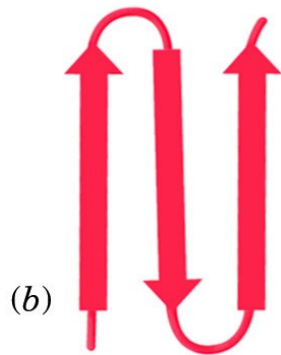
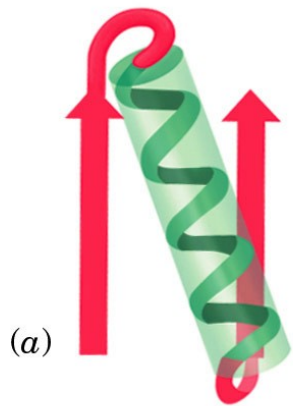


# Terciární struktura

celkové uspořádání hlavního řetězce

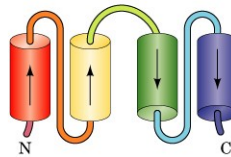
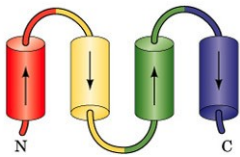
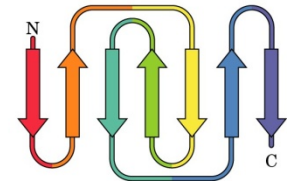
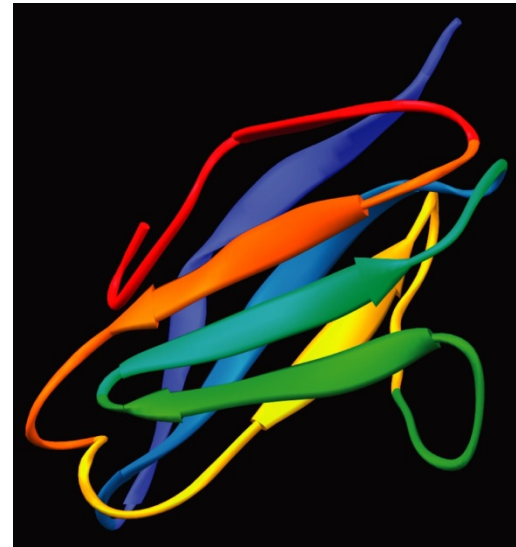
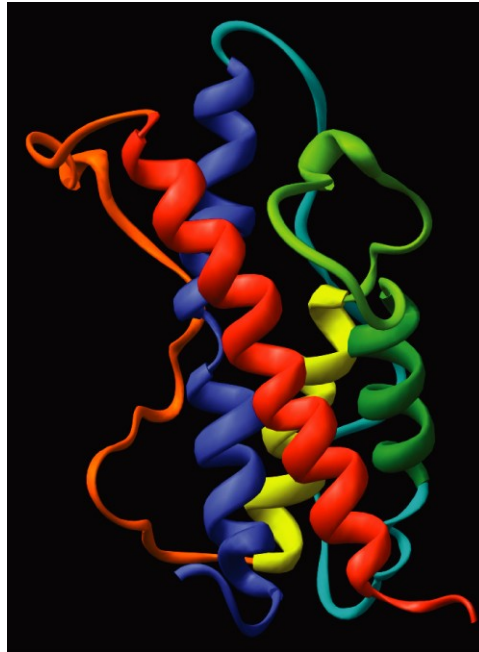
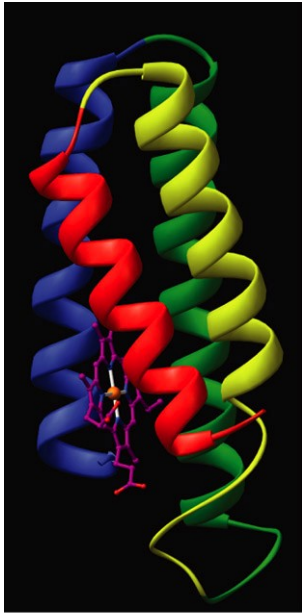
terciární struktura je výsledkem interakcí mezi jednotlivými úseky řetězce

## strukturní motivy



# Terciární struktura

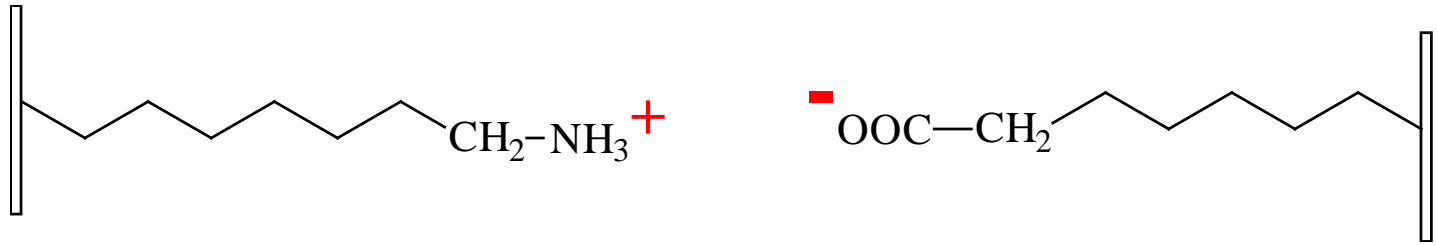
## strukturní motivy



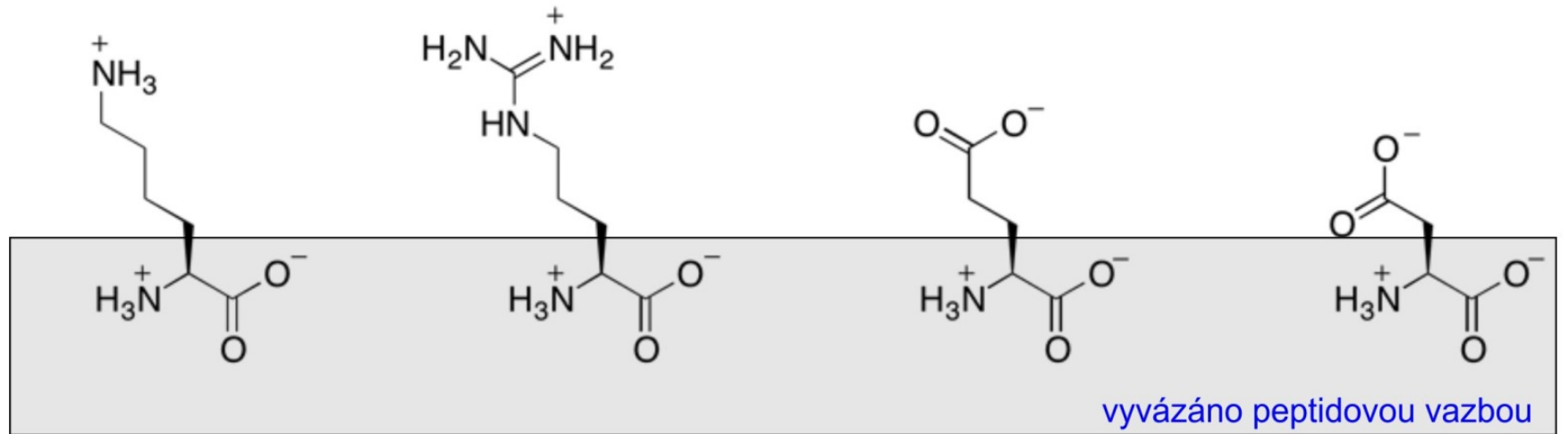
# Elektrostatické interakce

$$F = 1/d^2$$

*F ... přitažlivá síla*  
*d ... vzdálenost*



u aminokyselin:



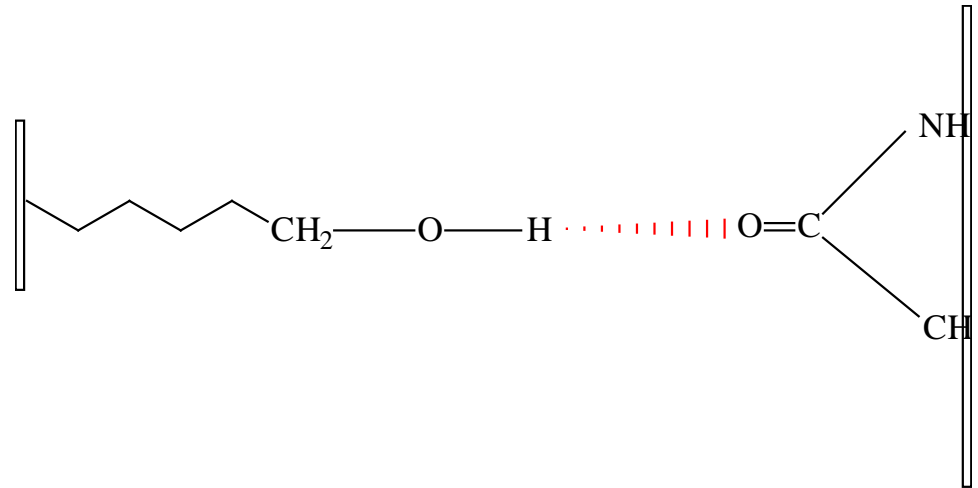
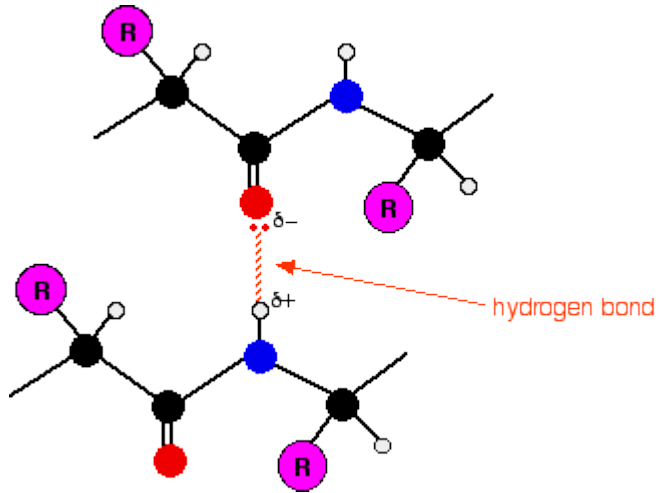
Lysin (Lys)

Arginin (Arg)

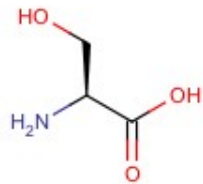
Glutamát (Glu)

Aspartát (Asp)

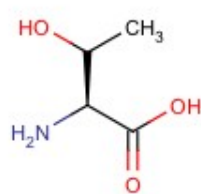
# Polární interakce



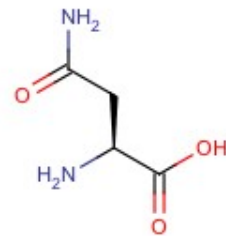
u aminokyselin:



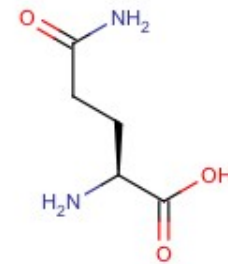
Serine



Threonine

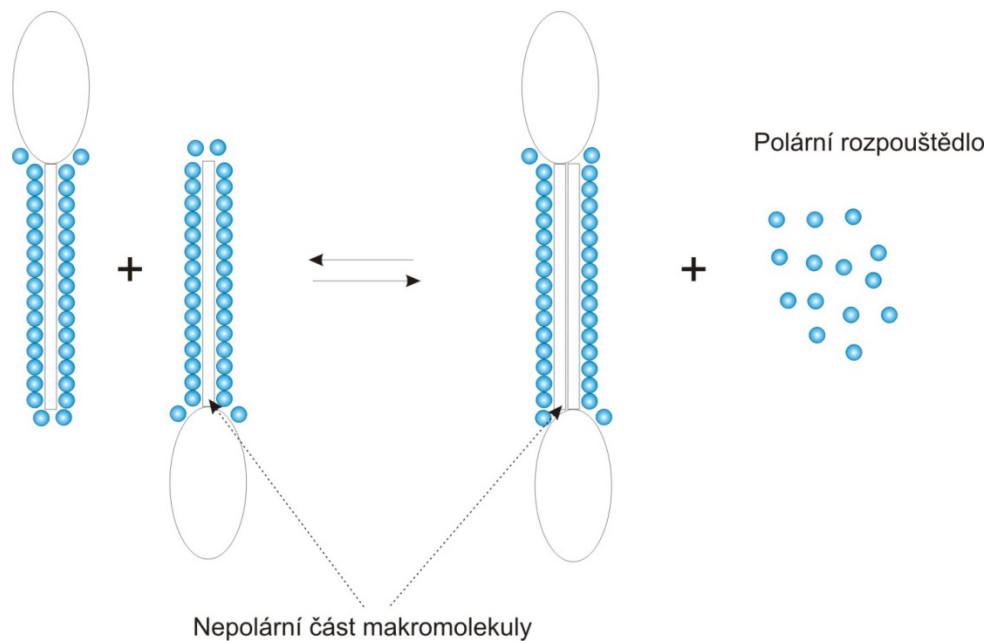


Asparagine

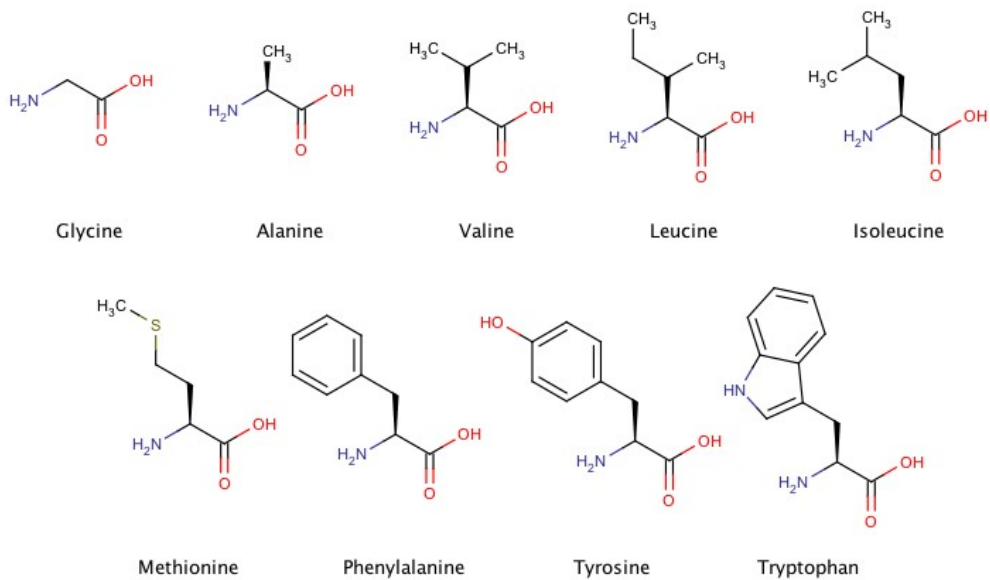


Glutamine

# Hydrofobní interakce

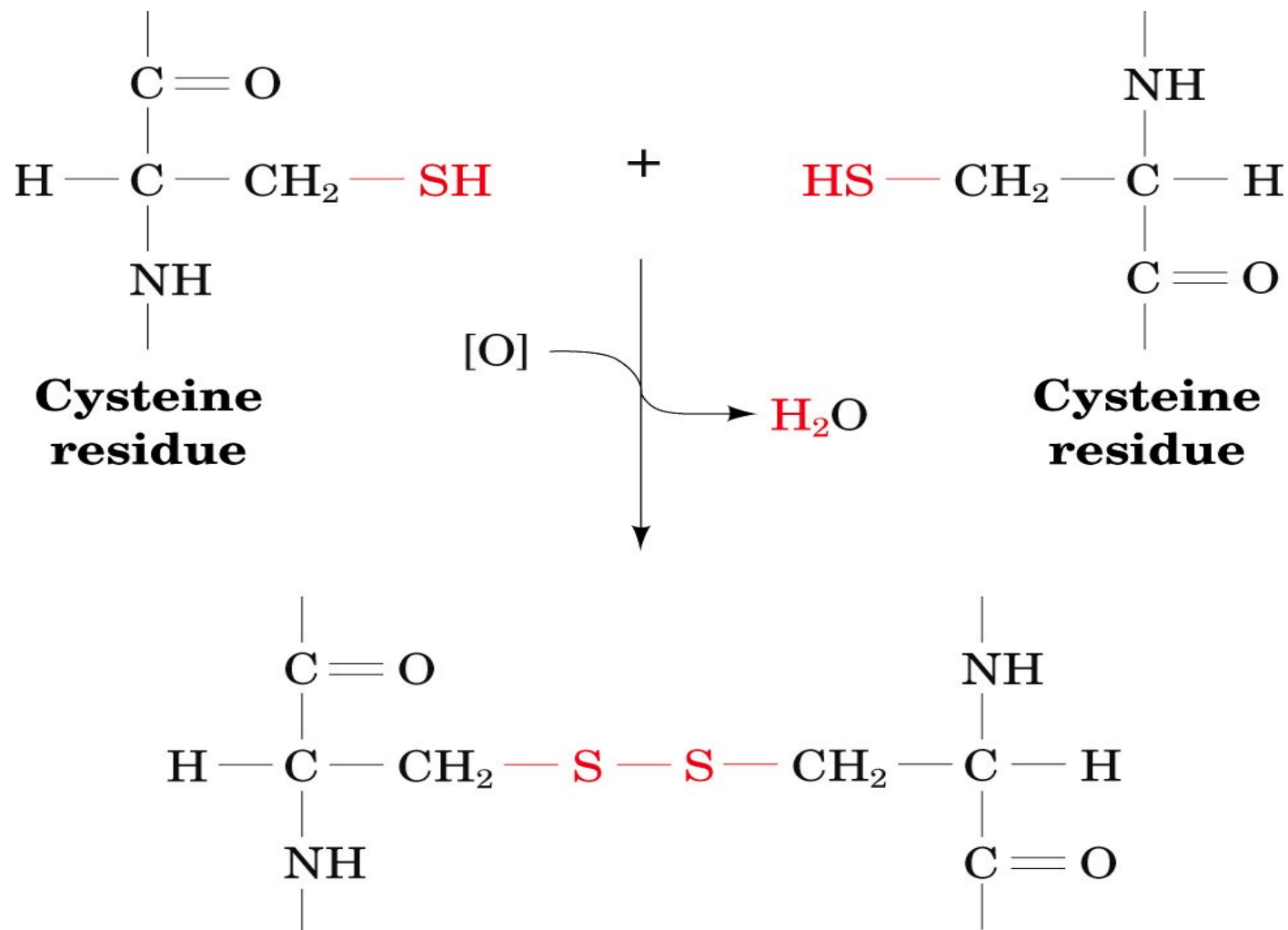


u aminokyselin:

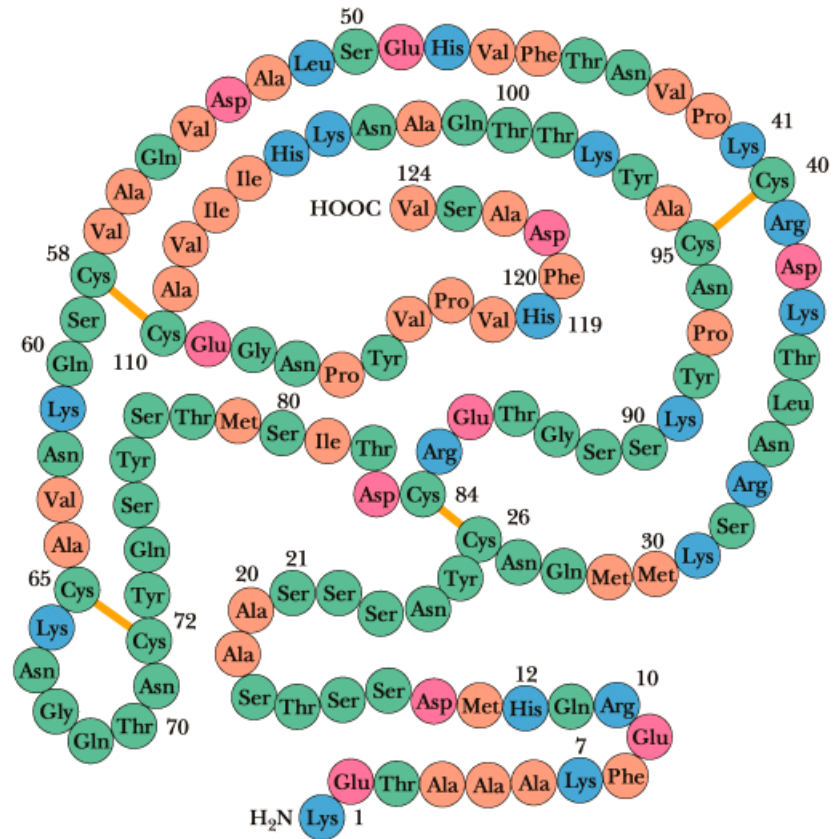
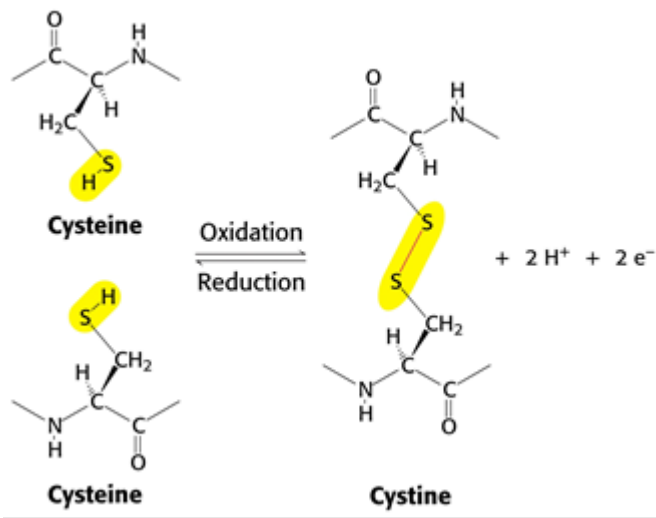




# Disulfidické můstky - kovalentní vazba



# Příklad vzniku kovalentních bisulfidových vazeb na formování terciární struktury - RNasa



RNAza je první chemicky připravený enzym (maturace ?)

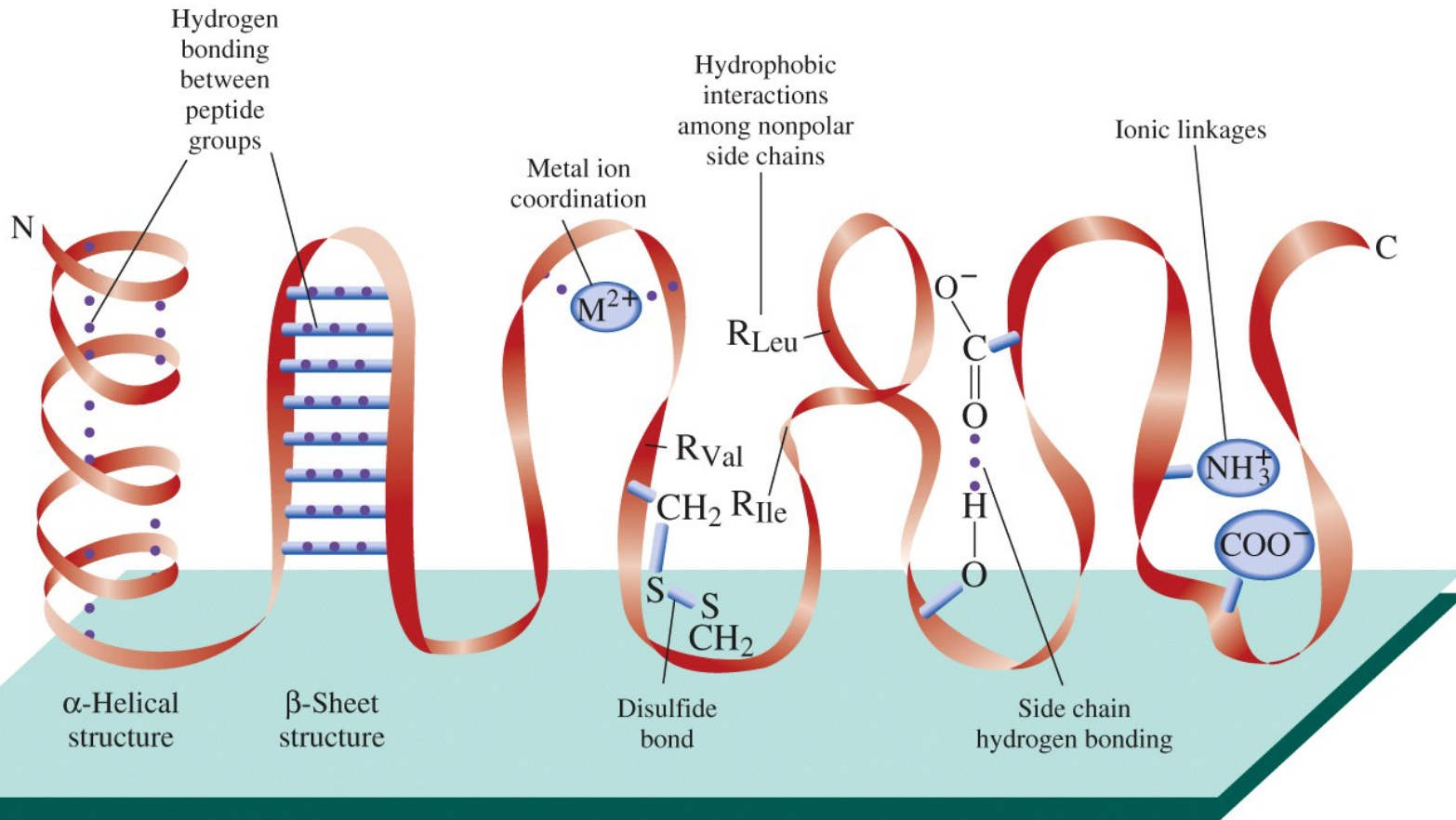
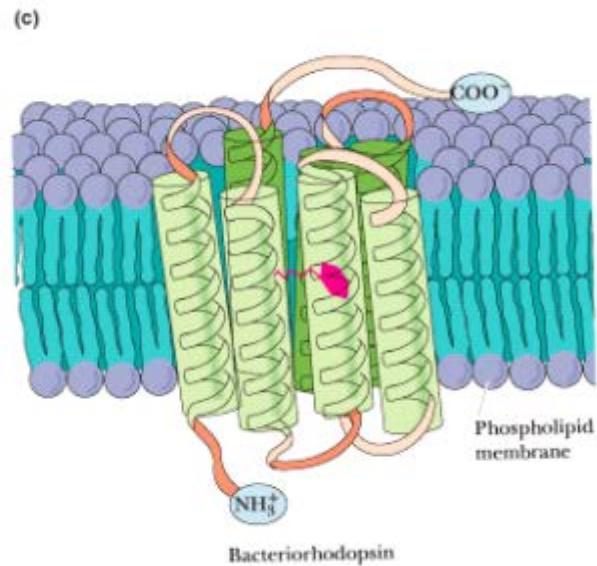
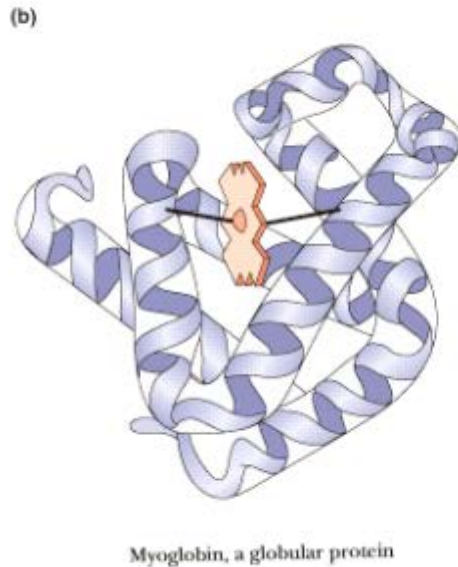


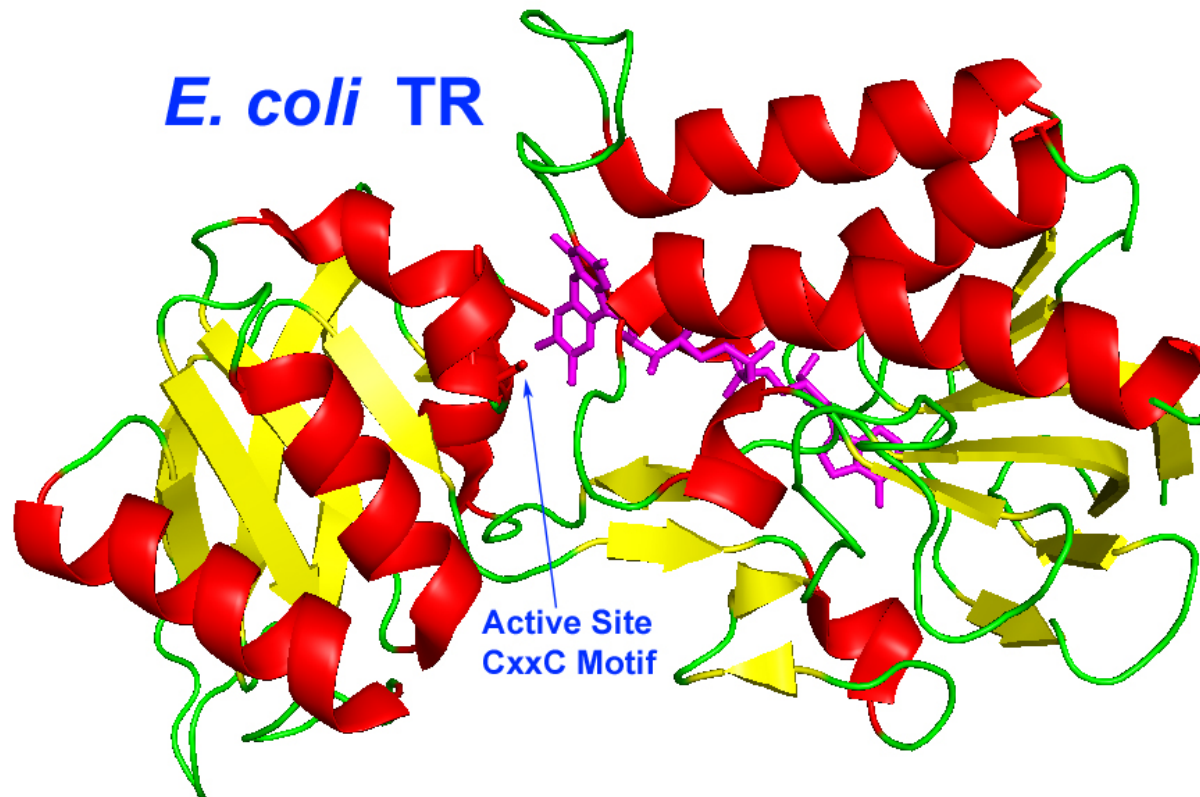
Figure 4-3 Concepts in Biochemistry, 3/e  
 © 2006 John Wiley & Sons

- Typy terciární struktury
  - Fibrilární (skleroproteiny)
  - Globulární (sferoproteiny)
  - Membránové



## Strukturní domény

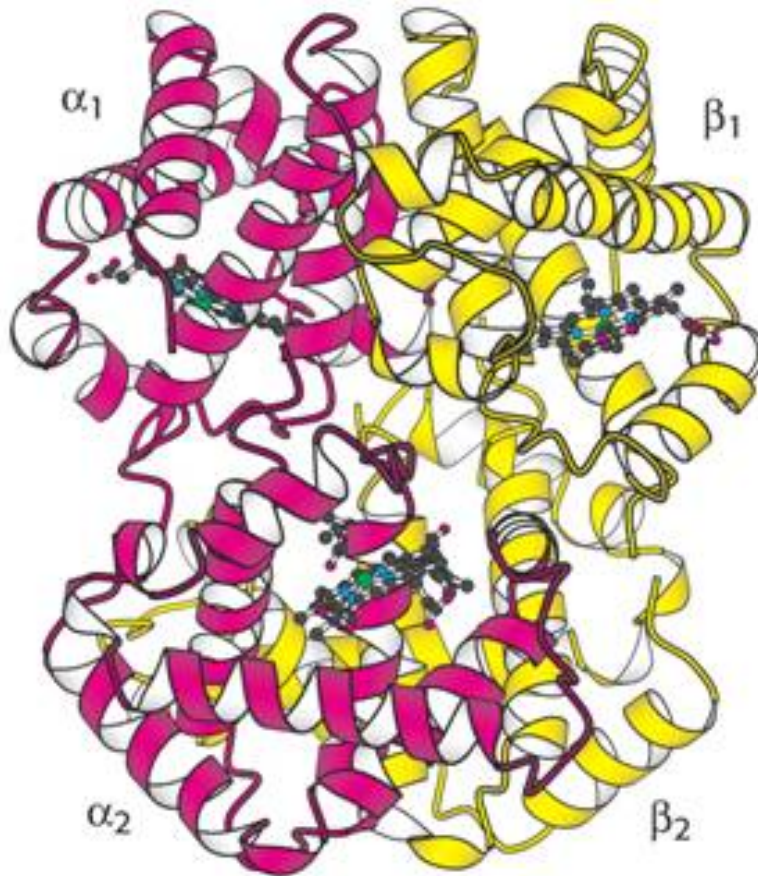
- Relativně samostatné kompaktní globulární oblasti
- Odděleny obvykle neuspořádaným úsekem
- Flexibilita struktury
- Často nositeli specifických vlastností - funkcí v rámci proteinu (katalytická, regulační, membránová kotva ...)



thioredoxinreduktasa

# Kvarterní struktura

spojení několika podjednotek (peptidových řetězců) do jedné molekuly (proteinu)



## hemoglobin

2 podjednotky  $\alpha$   
(lehké řetězce, 141 aminokyselin)  
2 podjednotky  $\beta$   
(těžké řetězce, 146 aminokyselin)

**hemoglobin je tetramer**

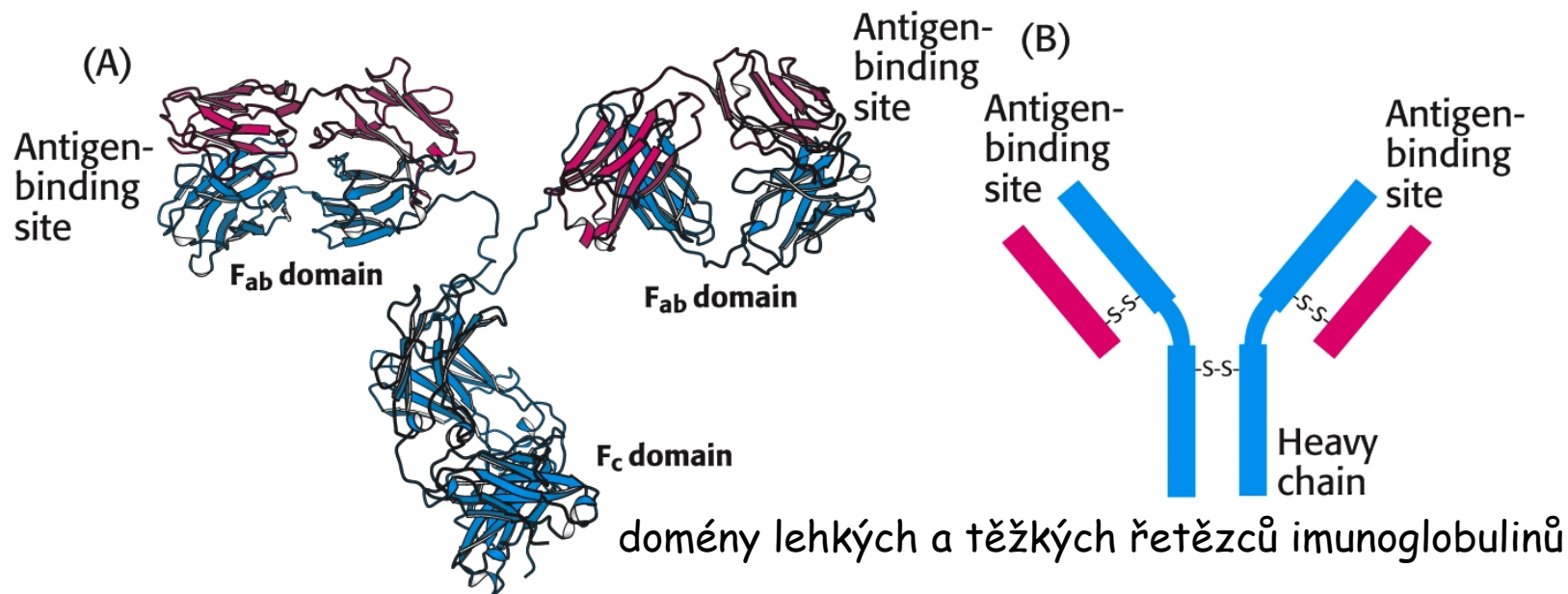
- Tvorba agregačního stavu funkční bílkoviny
  - Nekovalentní - iontové, polární, hydrofobní
  - Kovalentní, hlavně -S-S-můstky (ne peptidickou vazbou)

Agregát z více samostatných řetězců

- Podjednotky stejné - homo
- Různé - hetero

- Smysl agregace

- Organizační - multienzymové systémy
- Regulační - kooperativita
- Stabilizační

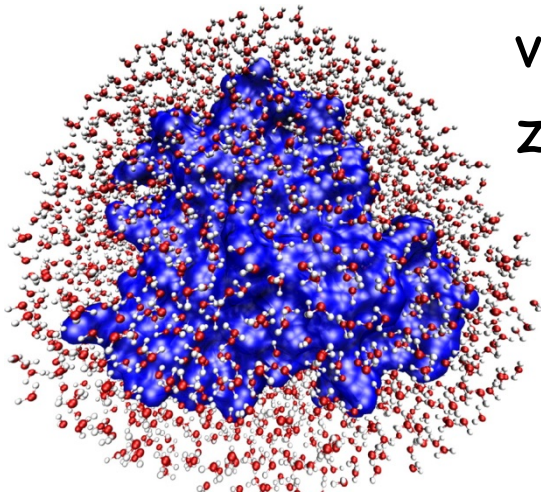


# Chování peptidu (proteinu) v roztoku

- Interakce bílkovinné molekuly s prostředím tvar, vlastnosti, konformace
- Orientace R podle polarity polární x nepolární (cytoplasma x membrána)
- Solvatační obal, interakce s prostředím (voda, ionty - pH)

## Ovlivnění rozpustnosti - srážecí metody

vliv iontové síly (vsolování, vysolování) + pH změna polarity prostředí (etanol)



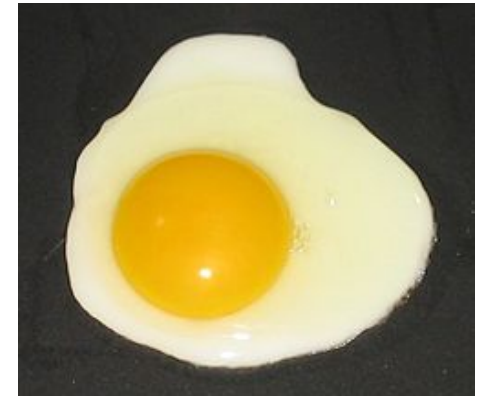


# Denaturace peptidů (bílkovin)

změny struktury bílkovin, způsobené účinkem fyzikálních a chemických faktorů většinou vedou k nevratné ztrátě biologických vlastností

k denaturaci dochází:

- změnou pH
- zvýšením teploty (var)
- přidáním organických rozpouštědel
- přidáním látek rušících disulfidické můstky (merkaptoetanol)
- účinkem těžkých kovů



může být i nevratná - po odstranění denaturačních podmínek se vrací biologické vlastnosti proteinu

např. přidáním snadno solvatujících iontů do roztoku „vysolení“

# Denaturace bílkovin



# Příklady peptidů

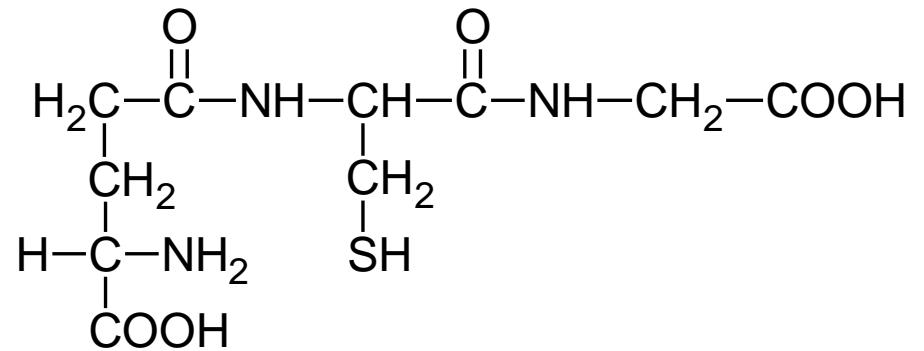
2-10 AK → oligopeptidy

11-100 AK → polypeptidy

funkce peptidů:

- hormony - oxytocin, insulin
- antibiotika - penicilin
- rostlinné jedy - amanitin (muchomůrky), včelí toxin

vznikají při odbourávání bílkovin nebo je organismus sám syntetizuje



## Glutathion:

tripeptid ( $\gamma$ -Glu-Cys-Gly)

vazby se účastní  $\gamma$ -karboxylová skupina kyseliny glutamové  
biologický "redoxní" činitel, vratně odevzdává elektrony

## Vasopresin:

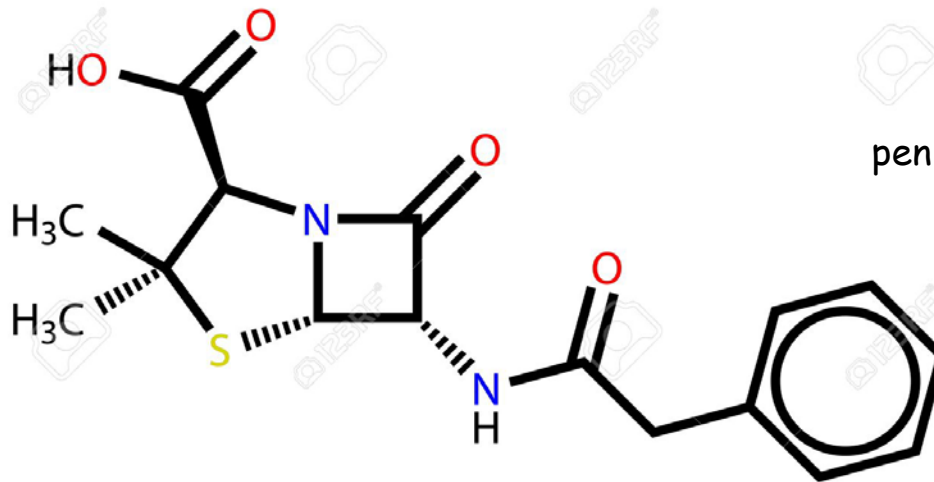
- nonapeptid
- hormon hypofýzy řídící hospodaření organismu s vodou

## Insulin:

hormon slinivky břišní, obsahuje 51 aminokyselin  
snižuje hladinu krevního cukru

## Penicilin:

antibiotikum produkované plísní *Penicillium Notatum*



penicilin G (benzylpenicilin)

valin

cystein

kyselina

## Fleming, penicilin a Nobelovy ceny



září roku 1928 **Alexandr Fleming** zapomenutá petriho miska



po deseti letech...

1938 britští bakteriologové **Howard W. Florey** a **Ernst B. Chain** - grant na látky ničící stafylokoky



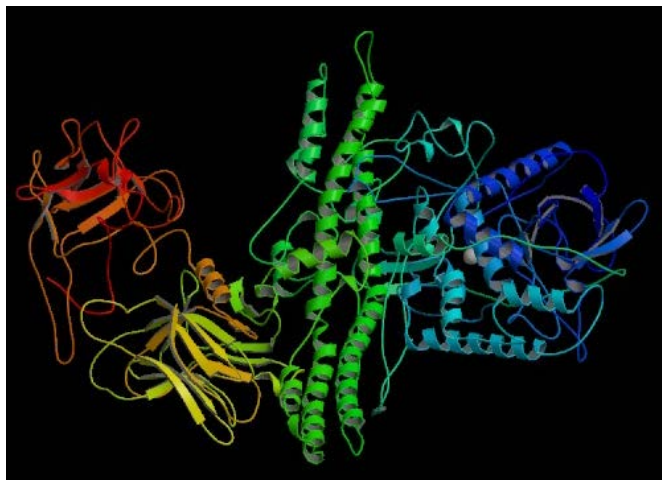
**Norman Heatley** - příprava syntetického penicilinu

Velkovýroba se podařila zavést až v USA (1942), penicilin byl určen pouze pro vojáky, k civilnímu obyvatelstvu se dostal až po válce

1945 nobelova cena Fleming, Florey a Chain



# Botulotoxiny



Bakterie *Clostridium botulinum*

polypeptidy

pravděpodobně nejsilnější jed 1,3-2,1 ng/kg nitrožilně, 10-13 ng/kg při inhalaci

Názvem *C. botulinum* se označují 4 biologicky odlišné skupiny klostridií, které produkují neurotoxin stejných fyziologických vlastností, ale různých antigenních typů A-G

Přehled botulotoxinů

Rok objevu	Země	Zdroj	Označení
1895	Belgie	šunka	B
1904	Německo	konzerva fazolí	A
1922	USA	kuřata	C
	Austrálie	skot	C
1928	Jižní Afrika	skot	D
1936	USA	ryby	E
	Ukrajina	ryby	E
1958	Dánsko	domácí paštika	F
1970	Argentina	půda	G
2013	?	dítě s botulismem	H=hybrid F/A

# Proteiny

jsou tvořeny více než 100 aminokyselinami

vznikají proteosyntézou

dělení proteinů podle celkového tvaru:

- ◆ skleroproteiny (fibrilární bílkoviny):
  - nerozpustné ve vodě, vláknitá struktura
  - podpůrná a strukturní funkce
  
- ◆ sféroproteiny (globulární bílkoviny):
  - rozpustné ve vodě, globulární struktura
  - odlišné funkce (zásobní, protilátky, enzymy,...)



- **jednoduchý - složený protein**
  - Apoprotein - bílkovinná součást - základ
  - Prostetická skupina - nebílkovinná součást - pevně (většinou kovalentně) vázaná
  
- **typy prostetických skupin**
  - **glykoproteiny** obsahující sacharidovou komponentu. Jej výskyt je však poměrně obecným jevem, takže bílkoviny s obsahem do 5% sacharidové složky takto často nenazveme.
  - **metaloproteiny** obsahující kovy. Podle jeho charakteru specifikujeme jako např. feroproteiny (podskupina hemoproteinů), molybdo-, kupro- atd.
  - **fosfoproteiny**
  - **lipoproteiny** - agregáty bílkovin s lipidy a dalšími hydrofobními molekulami
  - **chromoproteiny** - strukturně nejednotná skupina charakterisovaná barevností (výraznou absorbcí světla)

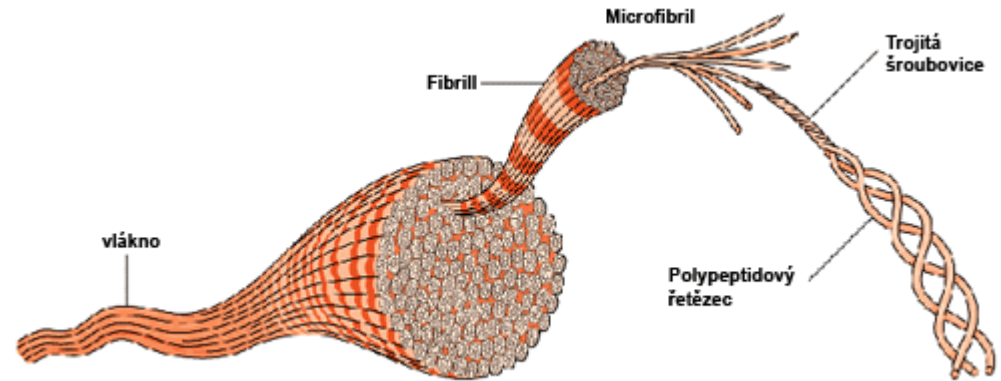
# Funkce proteinů

- Katalytická
  - Enzymy
- Strukturní
  - Zejména fibrilární, ale i globulární
  - Kontraktilní
- Transportní
  - Polární prostředí - přenos nepolárních látek - Hb
  - Nepolární prostředí - membrány - přenos polárních látek
- Obranné
- Signální
- Regulační

# Strukturní proteiny

- Proteiny s konstrukční a podpůrnou funkcí
  - oporné struktury živočišných tkání a buněk (u rostlin celuloza)
  - kostra, cytoskelet
  - i mimobuněčný materiál (vazivo)
  - kontraktilní - pohyb, změna tvaru
- Fibrilární - skleroproteiny (*z řeckého sclerós -tuhý, tvrdý*)
  - naprostá většina
  - nerozpustné ve vodě
  - vláknitá struktura
  - nejhojnější jsou kolageny (až 25% všech savčích proteinů)
- Globulární - sféroproteiny (*z řeckého sfaira -koule*)
  - Menšina - aktin (polymerace za vzniku mikrofilament - cytoskelet)
  - Přechod globulární - fibrilární (fibrinogen - fibrin)

# kolageny



skupina fibrilárních proteinů s nejpevnější strukturou  
hlavní vláknitá složka kůže, kostí, šlach, chrupavek

primární struktura

bohatá na glycin (cca 30%) a prolin

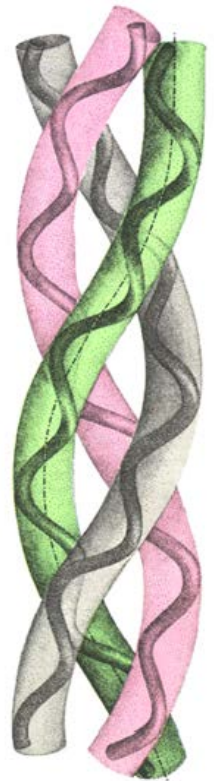
hojně zastoupený hydroxyprolin a hydroxylysin

sekundární struktura

**levotočivá** šroubovice (málo místa- proto Gly, Pro)

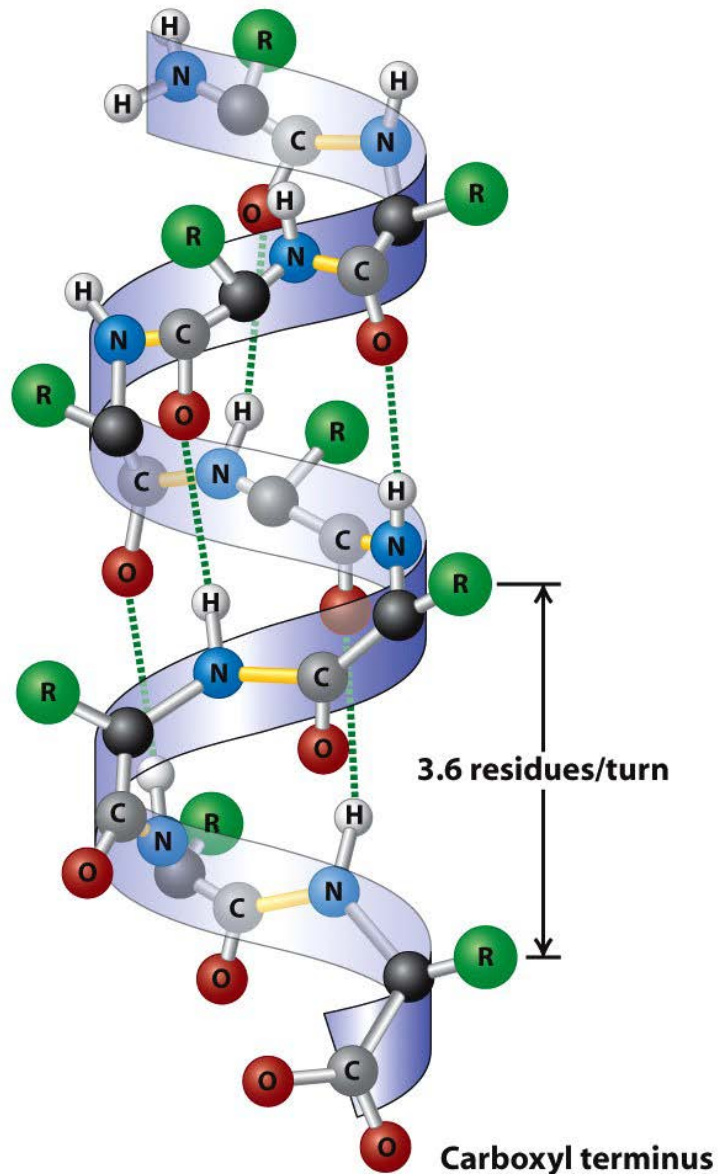
terciální struktura

trojvláknový pravotočivý helikální „prut“ - **tropokolagen**



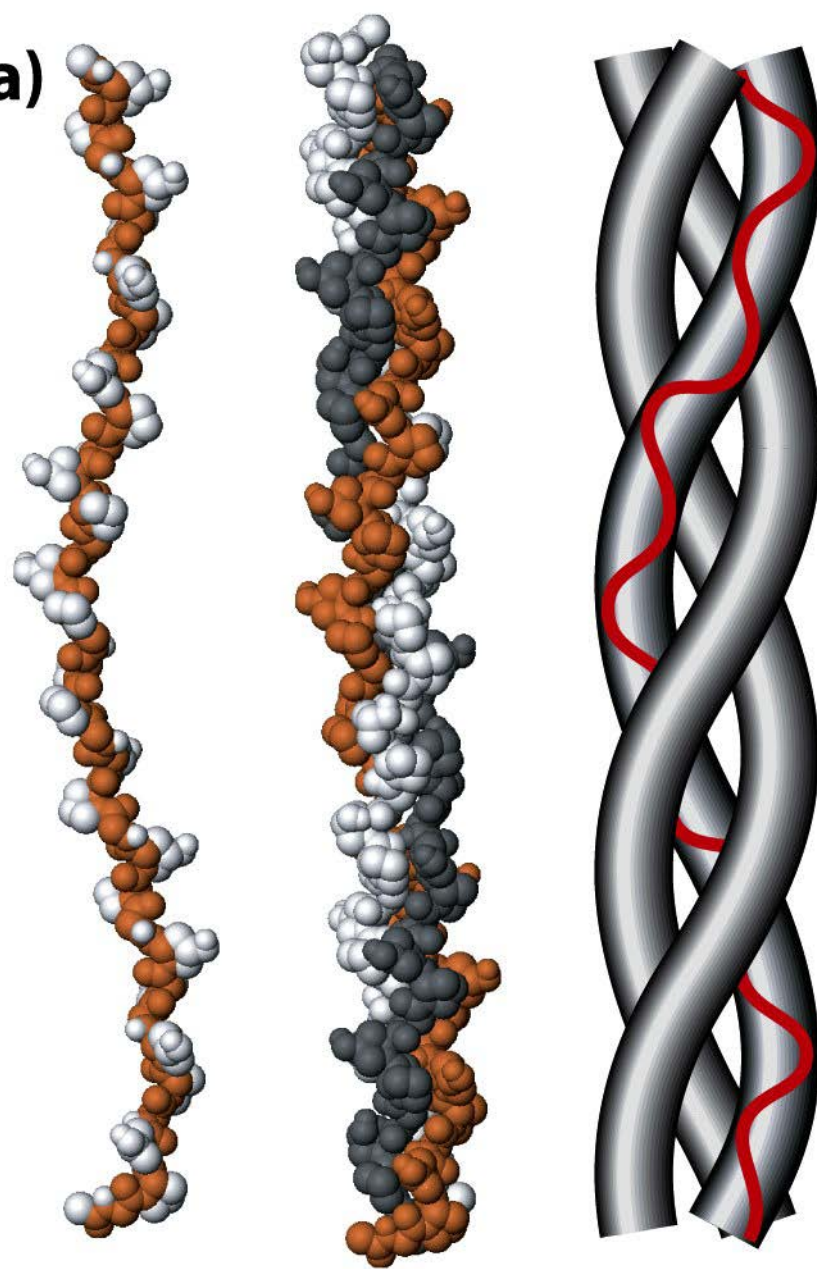
tropokolagen

Amino terminus



kruh tvořený 13 atomy  
výška závitů 0,54 nm  
pro L-AMK stabilnější pravotočivá konfigurace

(a)



kolagen

# kolageny

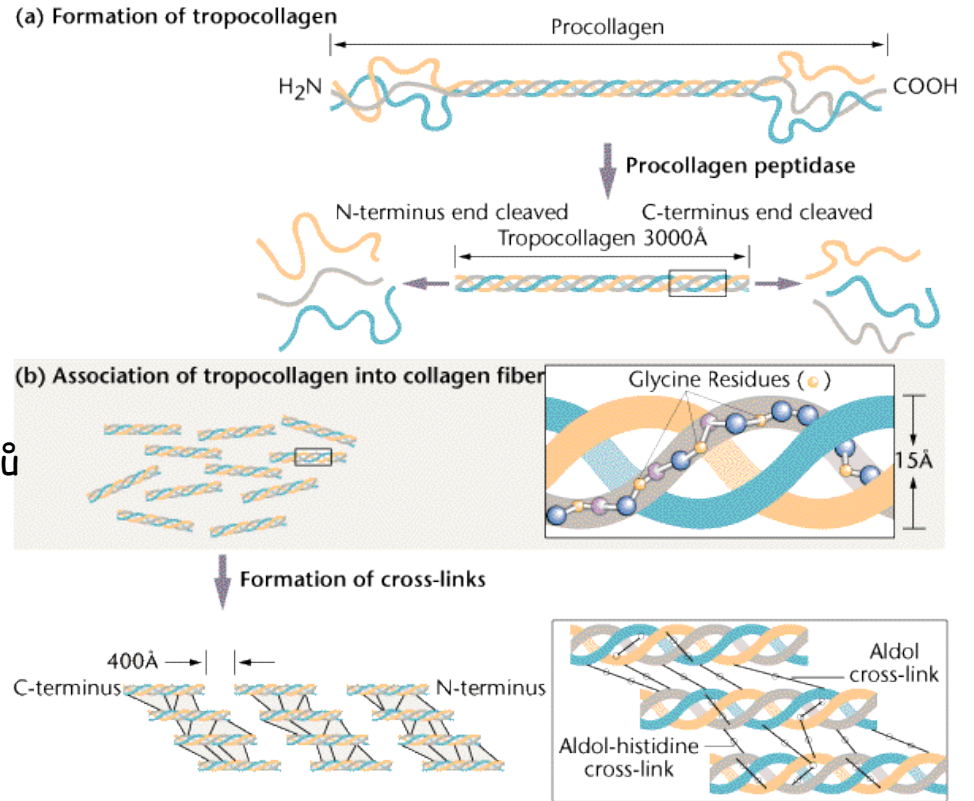
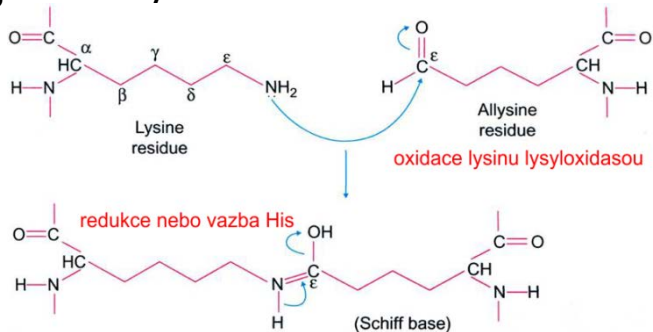
## prekurzor - prokolagen

posttranslační úprava ve fibroblastech  
hydroxylace některých zbytků prolinu a lysinu  
stabilita - podílí se askorbát  
glykosylace některých hydroxylysinů

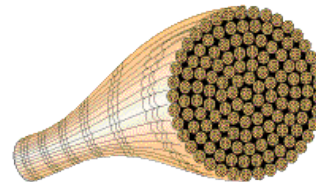
po chemické modifikaci - vznik trojitých helixů  
proteolýza v extracelulárním prostoru

## vzniklý tropokolagen spontánně agreguje - kolagenní vlákna

tropokolagenová vlákna se spojují s posunem o  $\frac{1}{4}$  délky  
vznikají „mezery“ - začlenění minerální složky



(Klug & Cummings 1997)



kolagenová vlákna zpevněna *histidin*-aldolovými příčnými vazbami

# $\alpha$ - keratiny

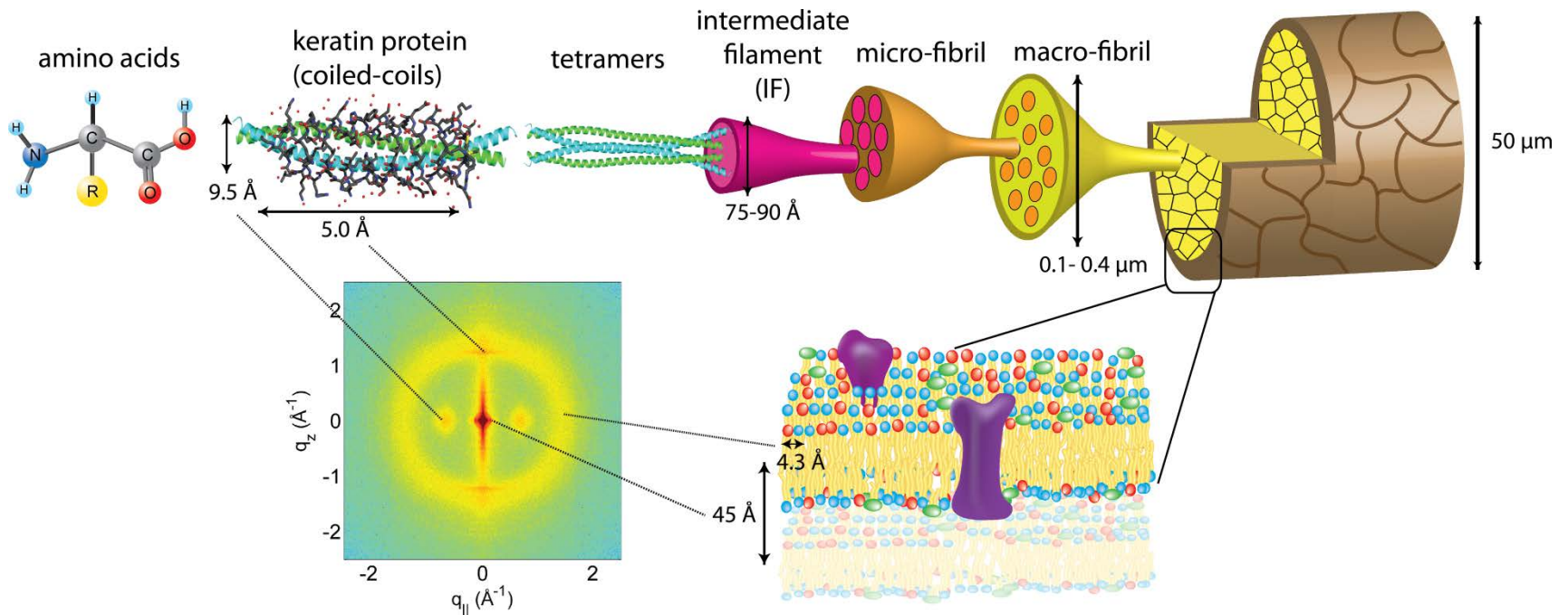
základ struktury je **pravotočivá  $\alpha$ -šroubovice**, která se postupně stáčí do superšroubovic o 3 podjednotkách - **protofibril** a **mikrofibril** tvořených 11 protofibrilami

Velká množství Cys (měkké a tvrdé keratiny) a hydrofobních AMK

lidské vlasy, kůže a nehty, ovčí vlna

struktura je stabilisována meziřetězcovými vodíkovými a disulfidovými můstky

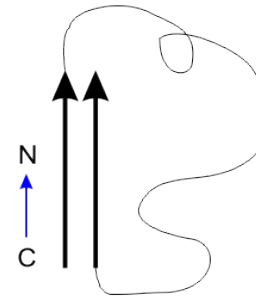
- změna  $\alpha$  -  $\beta$  při tahu ve vlhkém stavu
- přerušlení S- můstků redukčními činidly (thioglykolová k.)



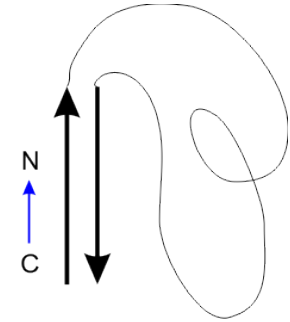
## $\beta$ - keratiny, fibroin

### Struktura skládaného listu

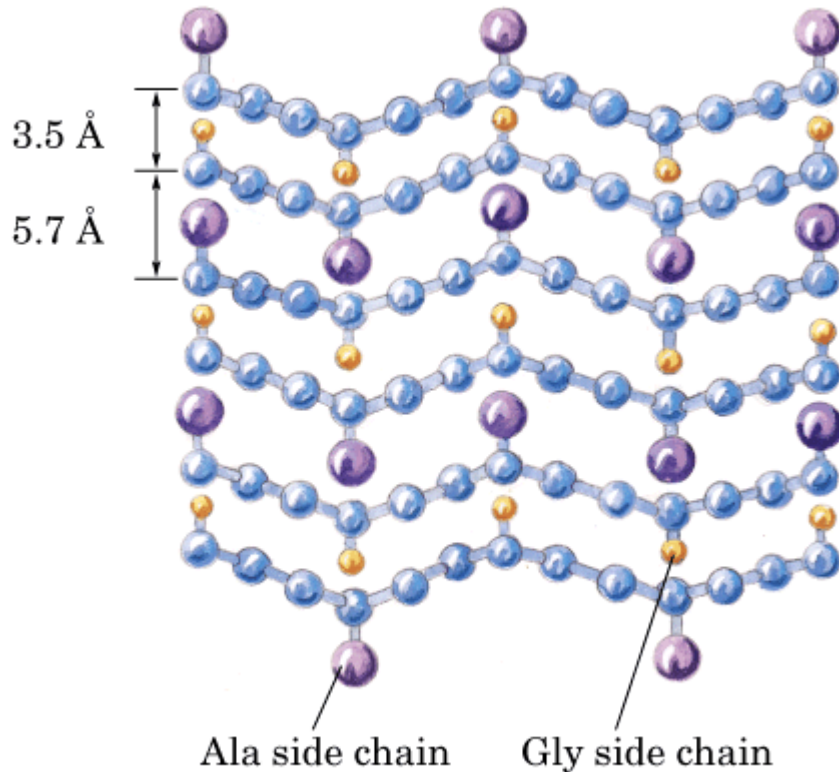
- fibroin antiparalelní
- $\beta$ -keratin paralelní struktura



paralelní



antiparalelní



(a)

### fibroin

**základ hedvábných a pavoučích vláken**

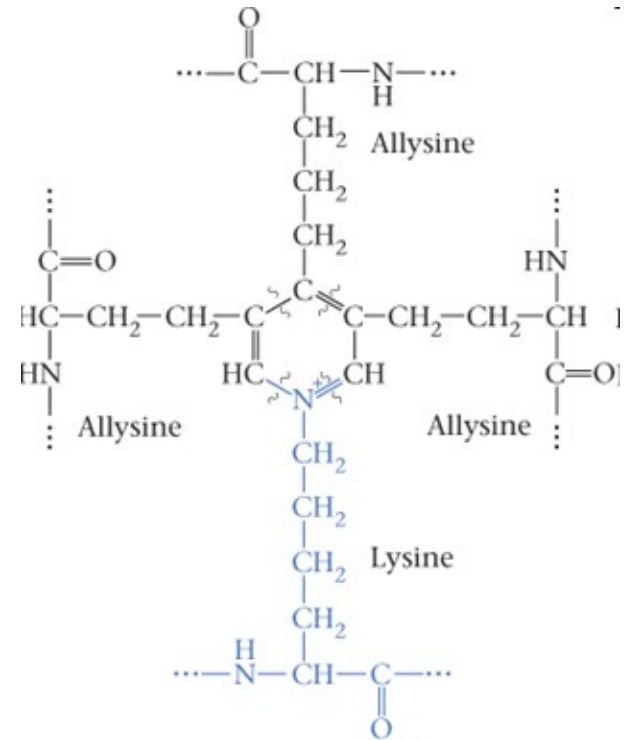
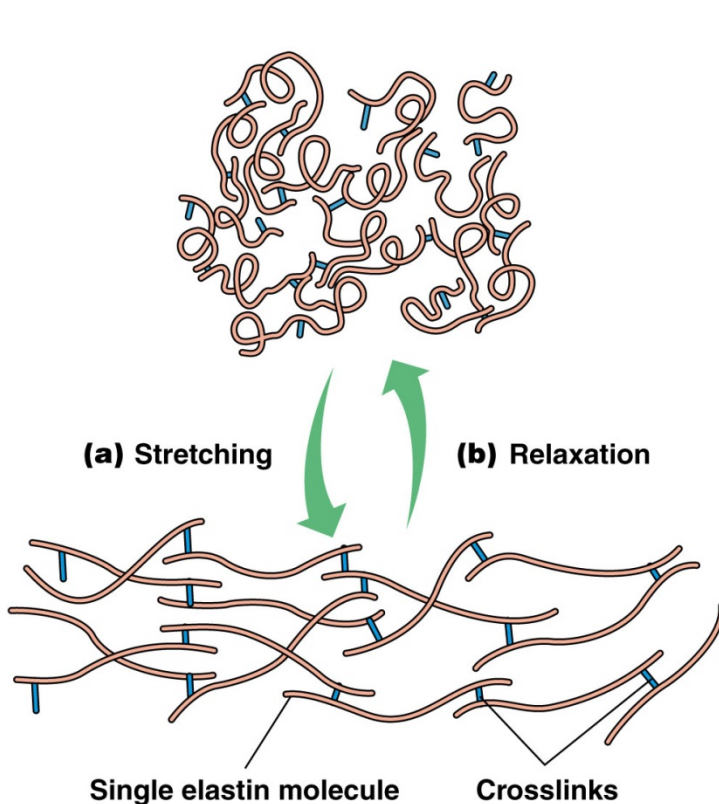
Střídají se zbytky Ala a Gly, které směřují na opačné strany  $\beta$  struktury  
Zasunují se řetězce Ala - Ala, Gly - Gly



# elastin

hlavní součást pružných vláken (stěny cév, kůže)

- Šroubovice méně uspořádána než u kolagenu
- vlákna bohatá na alifatické aminokyseliny, Pro a Lys
- volné zohýbané úseky spojeny příčnými vazbami
- výrazné síťování neobvyklé deriváty- **desmosin**



tři ze čtyř Lys zoxidováno lisyloxidasou - pak spontánně

# Transportní proteiny

Nepolární látky v polárním prostředí (krev)

Transport na větší vzdálenosti

Vazba látky na bílkovinu - globulární s hydrofobními oblastmi

- Kyslík - hemoglobin, myoglobin
- Mastné kyseliny, lipidy apod.

Polární látky v nepolárním prostředí (membrány)

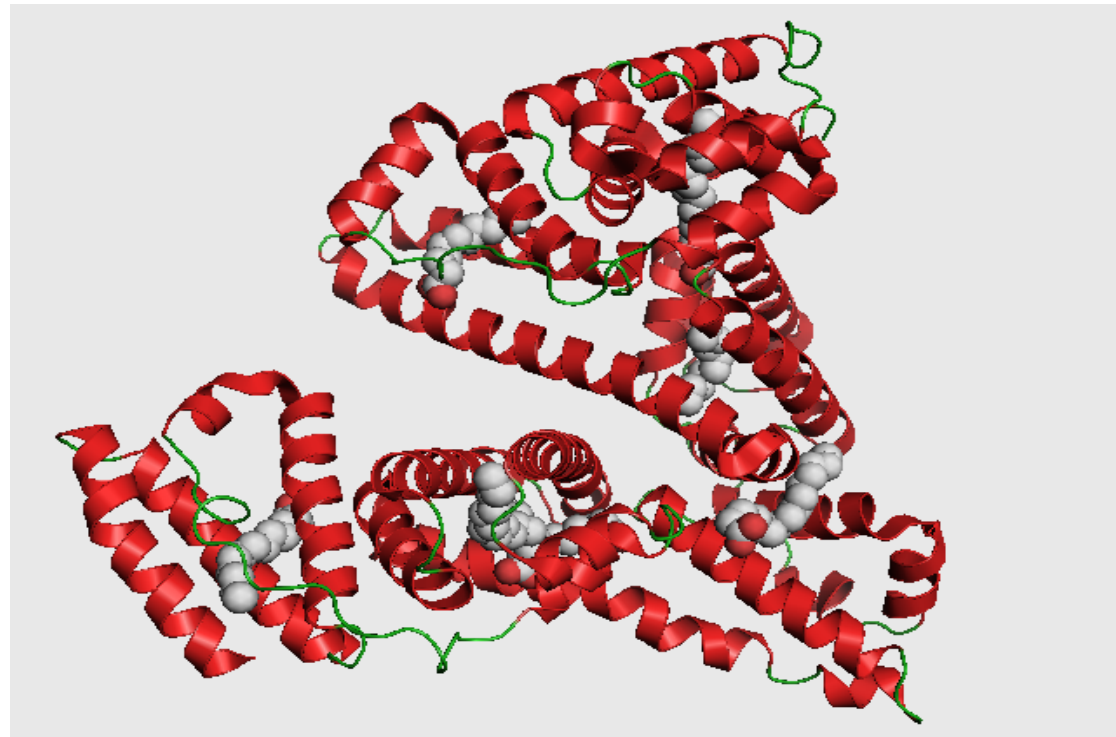
Speciální přenašečové systémy - kapitola biomembrány

# Nepolární látky v polárním prostředí

## Albumin

transport mastných kyselin (7 na molekulu), žlučových kyselin, steroidů, léků  
hydrofobní kapsa obalena polárními úseky  
přenos dalších látek - léčiva  
vratná vazba přenášených látek (obecně)

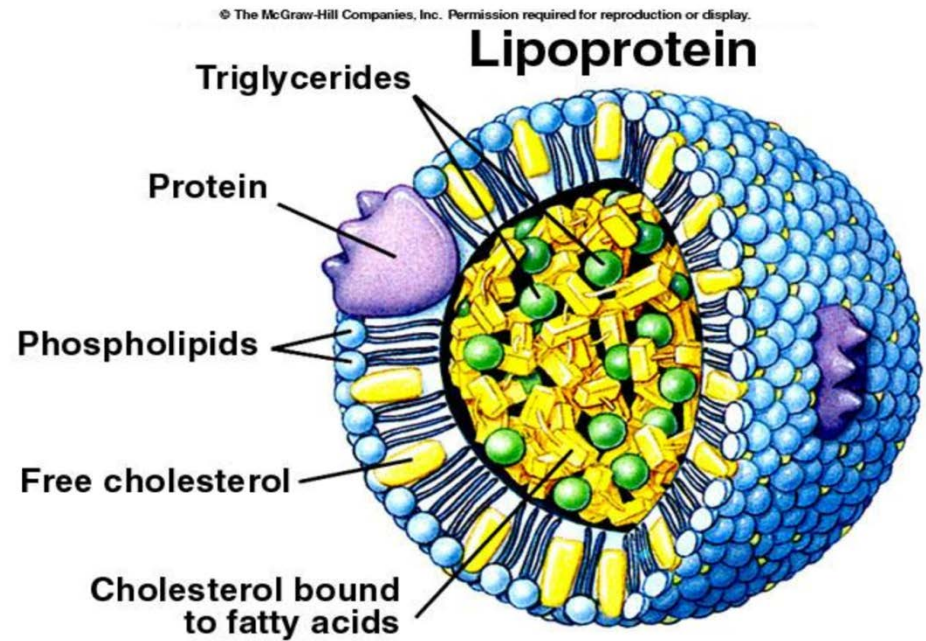
HSA  
cca 60% všech bílkovin v séru  
proteinová rezerva



# Nepolární látky v polárním prostředí

## Transport lipidů - lipoproteiny

- Cholesterol
- Tuky aj. lipidy
- Karotenoidy



## Dělení podle chování při ultracentrifugaci

- Chylomikrony, VLDL, IDL, LDL, HDL)

## Dělení podle velikosti náboje (elfo)

- Chylomikrony,  $\alpha$ -lipoproteiny, pre- $\beta$ -lipoproteiny,  $\beta$ -lipoproteiny

## Lipoproteiny

Komplexní útvary, agregáty mnoha molekul

Různá struktura, složení, velikost

Nepolární komponenty obaleny fosfolipidy a apoproteiny

# Nepolární látky v polárním prostředí

## Transport kyslíku

### Hemoglobin

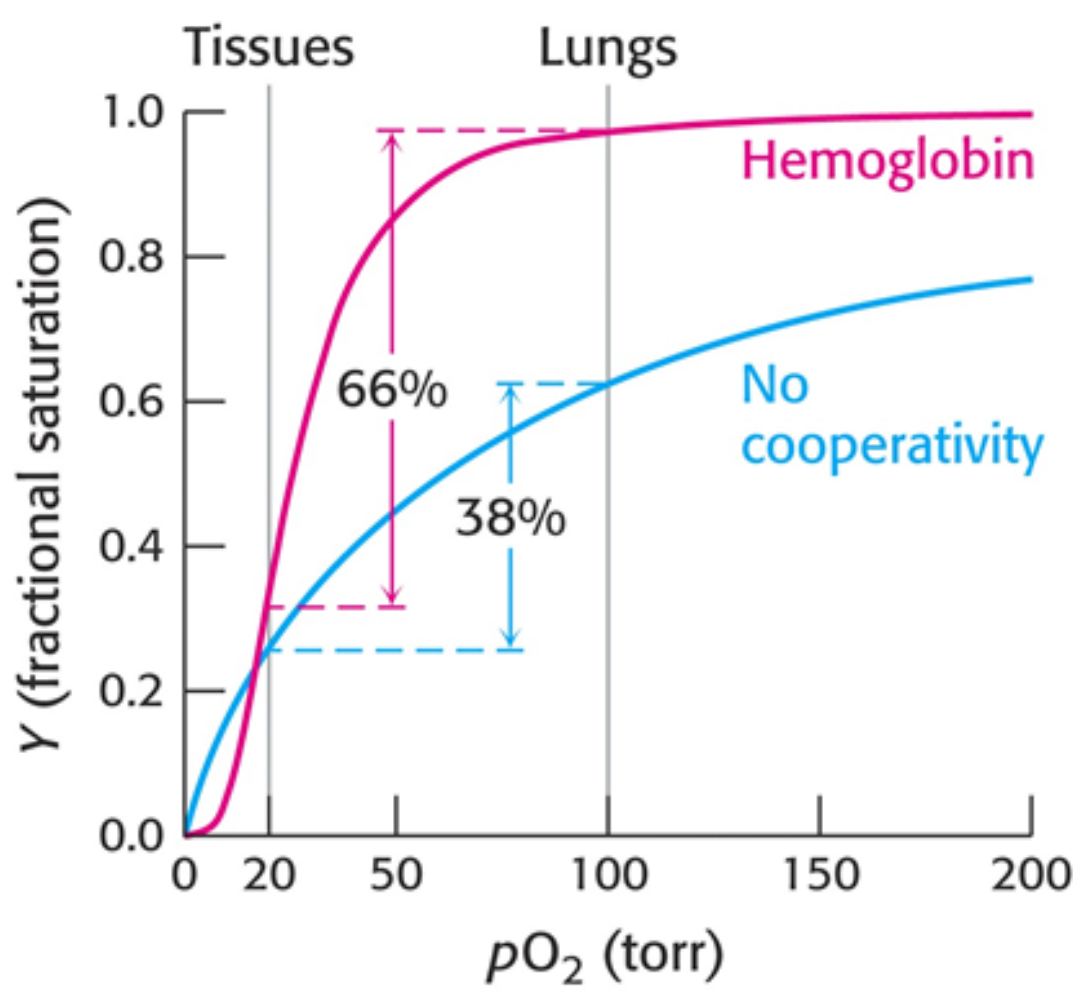
#### Jiné přenašeče

- myoglobin - svalové buňky, monomer
- hemerytrin ( $\text{Fe}^{2+}$ , nehemový,  $2\text{Fe}:\text{O}_2$ , někteří mořští bezobratlí)
- hemocyanin ( $\text{Cu}^{2+}$ , nehemový,  $2\text{Cu}:\text{O}_2$ , měkkýši)

# Hemoglobin

Fysiologickou funkcí Hb je přenos kyslíku v krvi - transport kyslíku z plic ( $p_{O_2}=13.3$  kPa) do tkání ( $p_{O_2}=2.6$  kPa)

Stupeň nasycení Hb kyslíkem (tj.  $HbO_2/(HbO_2 + Hb)$ ) závisí na jeho parciálním tlaku  $p_{O_2}$  v okolním prostředí - červená křivka (torr = 133 Pa)

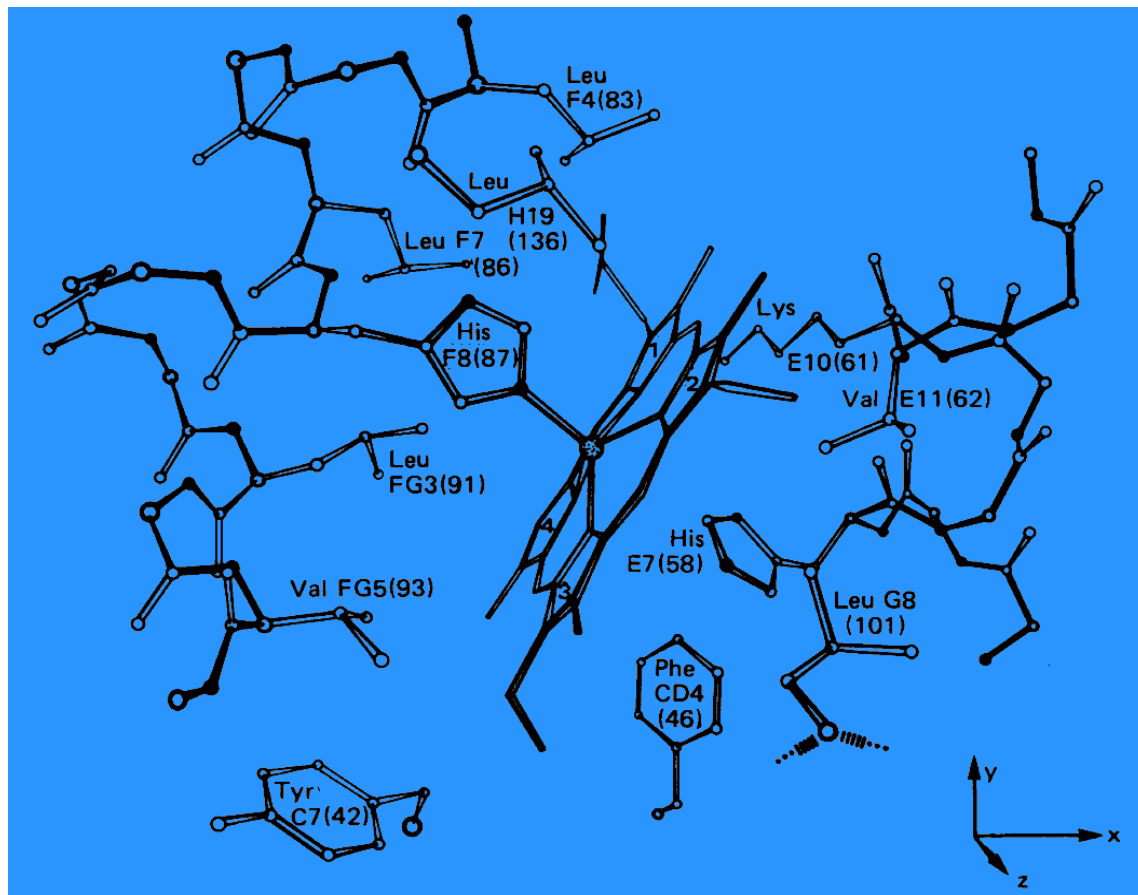
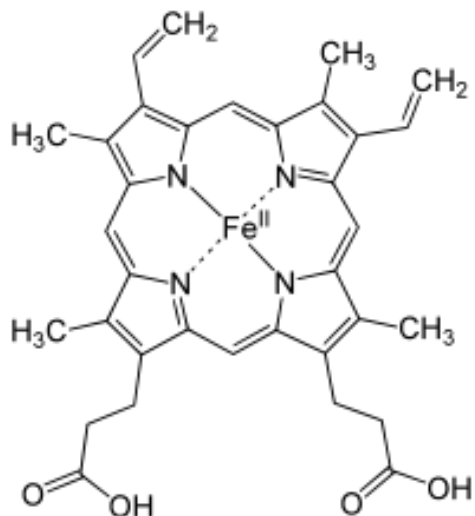


# Monomer hemoglobinu

V každé podjednotce je vázán jeden hem jako prostetická skupina koordinační vazbou  $\text{Fe}^{2+}$  na zbytky His přímo na proximální His F8 zprostředkovaně na distální His E7

## Hem (protoporfyrin IX)

Hem má železo ve formě  $\text{Fe}^{2+}$   
Oxidací na  $\text{Fe}^{3+}$  vzniká **hemin**  
hemoglobin se mění na **methemoglobin**



# Tetramer hemoglobinu

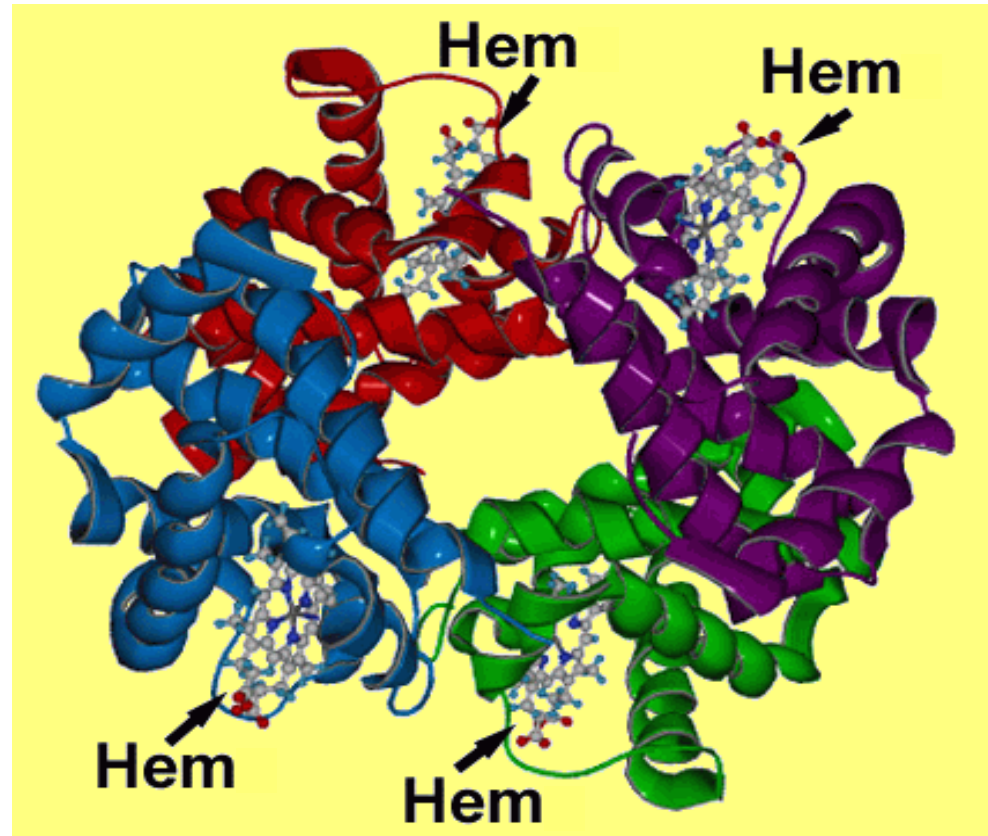
## Hb dospělých jedinců (HbA)

HbA<sub>1</sub> je hlavní forma u dospělých a dětí starších 7 měsíců (2  $\alpha$ - a 2  $\beta$ -podjednotky)

HbA<sub>2</sub> 2 - 3% celkového HbA (2  $\alpha$ - a 2  $\delta$ -podjednotky)

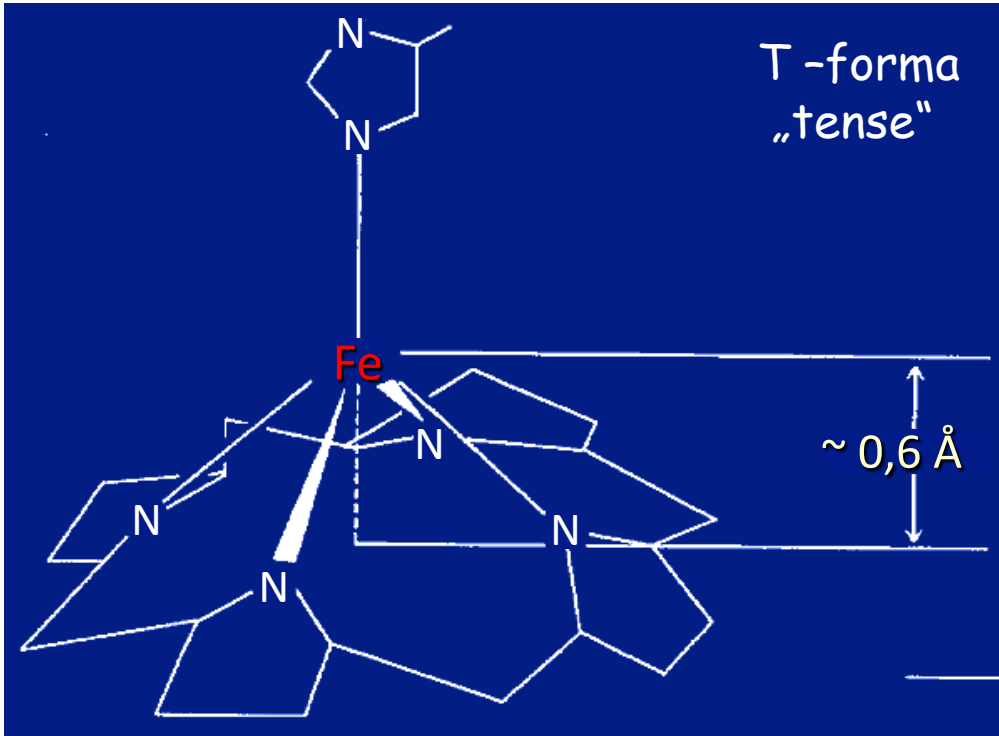
## Fetální Hb (HbF)

u plodu a novorozenců HbF (2  $\alpha$ - a 2  $\gamma$ -podjednotky)





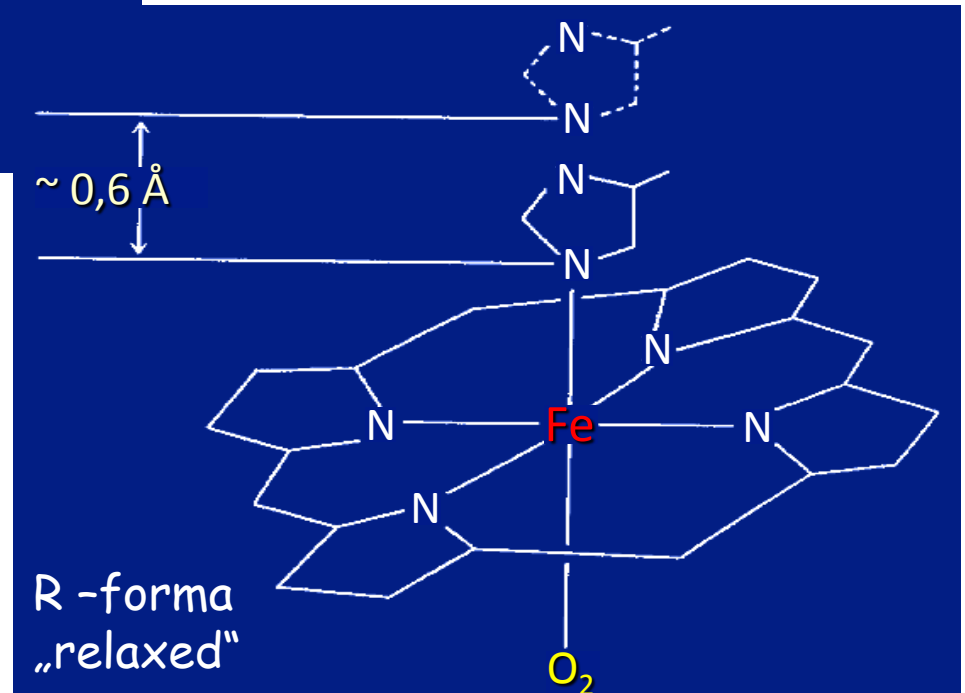
# Allosterické chování hemoglobinu



změna konformace vyvolaná vazbou kyslíku na  $\text{Fe}^{2+}$  jedné z podjednotek

důsledek:  
vazba další molekuly  $\text{O}_2$  je snazší

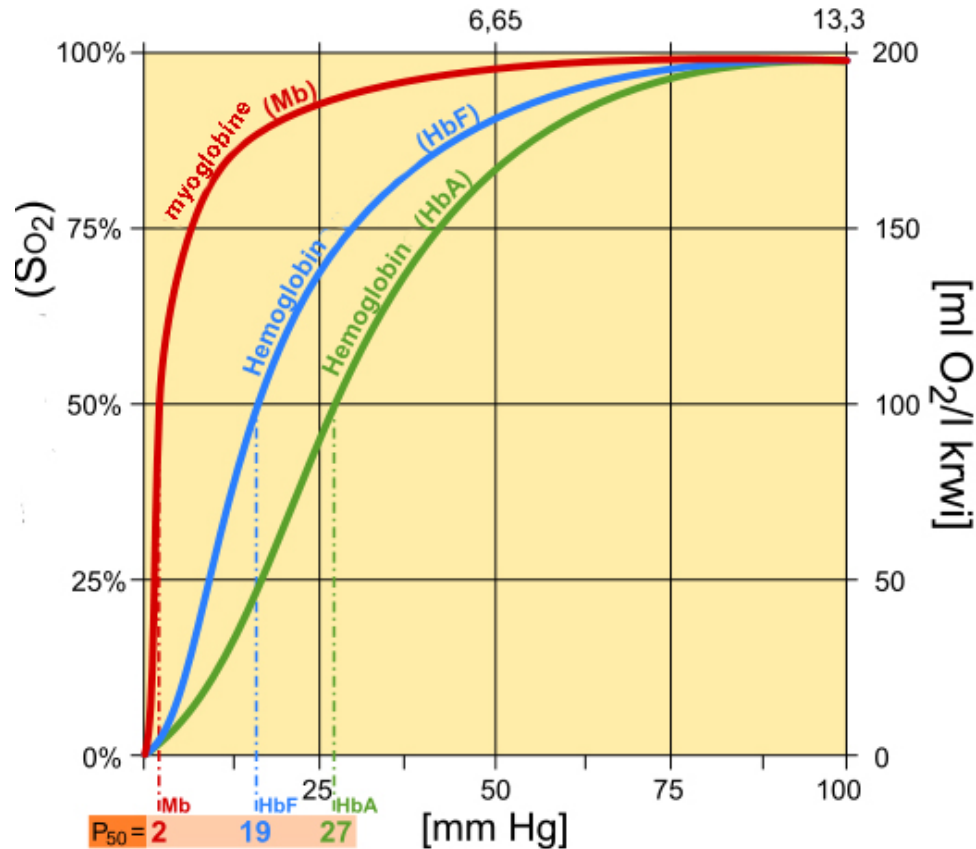
sigmoidní saturační křivka



# Fetální hemoglobin

Hb F má vyšší afinitu ke  $O_2$  než HbA váže  $O_2$  při nižších parciálních tlacích než HbA  
Po narození HbF je nahrazován HbA během prvních týdnů života (žloutenka)

transport kyslíku z arteriální krve matky ( $p_{O_2}=5-10$  kPa) do tkání ( $p_{O_2}=2.6$  kPa)  
( $P_{O_2}$ )



**Myoglobin** - zásobárna kyslíku ve svalových buňkách (nehodí se pro transport)

# Vliv pH a $\text{CO}_2$ na saturaci hemoglobinu - Bohrův efekt

Preference pracujícího svalu - laktát:

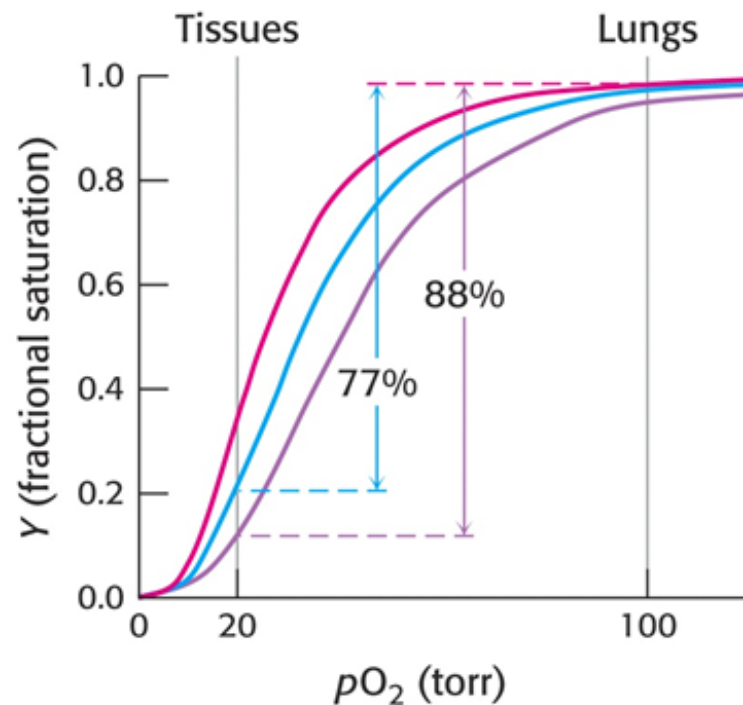
roste pH

roste množství bisfosfoglycerátu

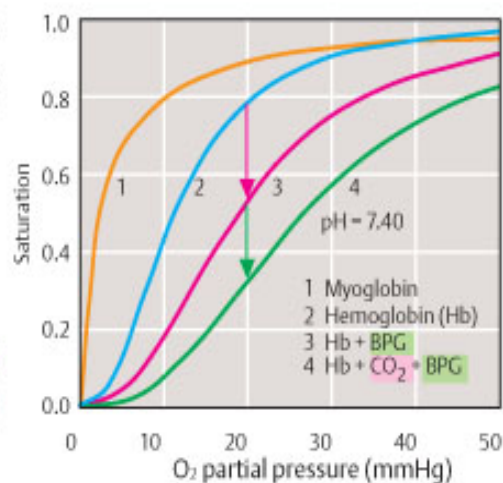
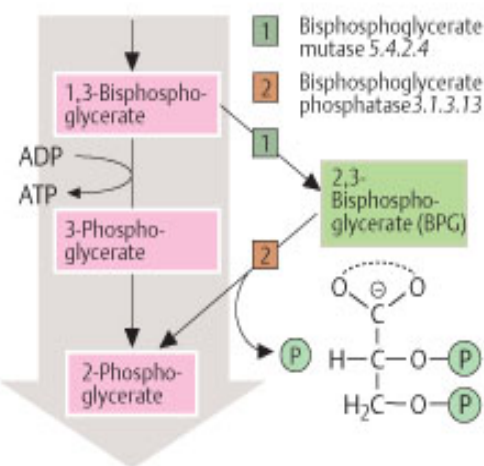
roste  $\text{CO}_2$  (procesy získávání energie)

**Množství využitelného kyslíku se zvyšuje**

- pH 7.4, no  $\text{CO}_2$
- pH 7.2, no  $\text{CO}_2$
- pH 7.2, 40 torr  $\text{CO}_2$



## A. Regulation of $\text{O}_2$ transport

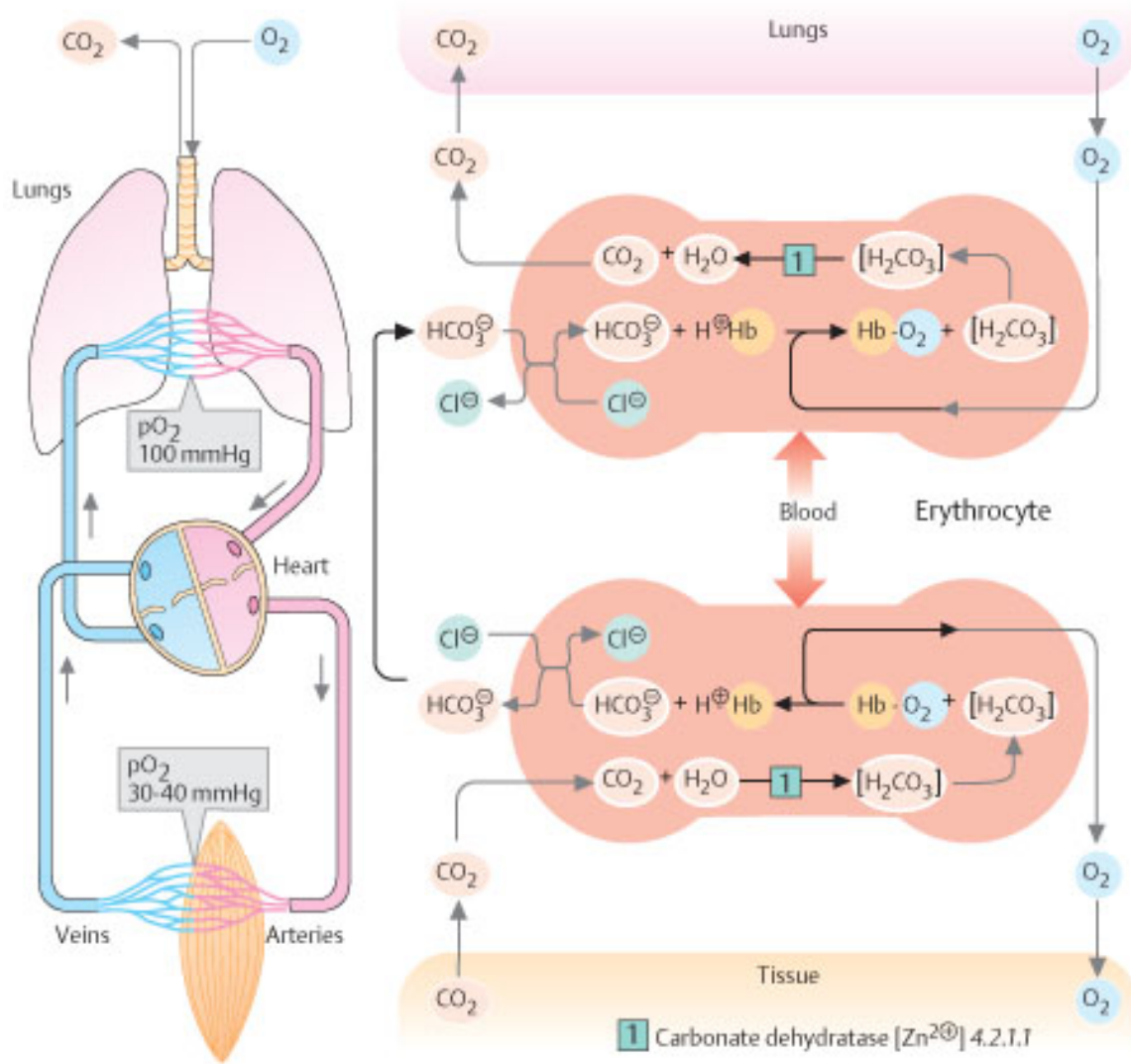


1. BPG metabolism

2. Saturation curves

# Transport kyslíku a CO<sub>2</sub> v těle

## - D. Hemoglobin and CO<sub>2</sub> transport

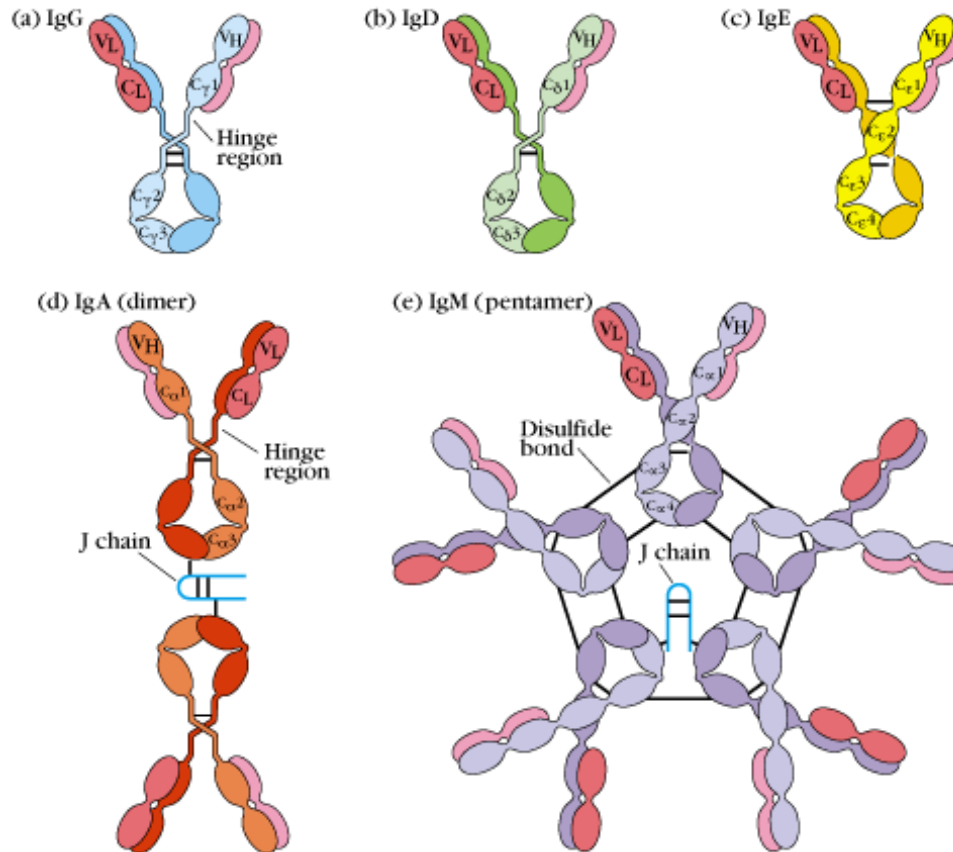


# Signální a obranné bílkoviny

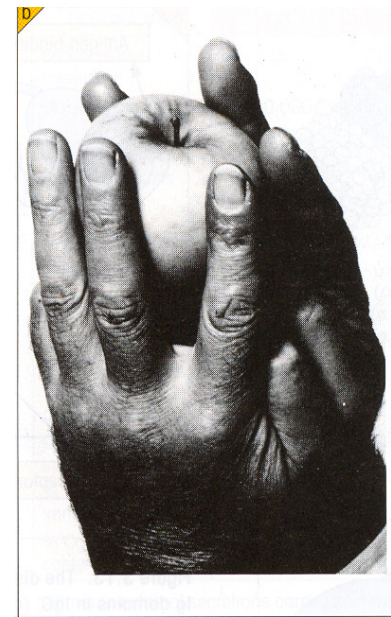
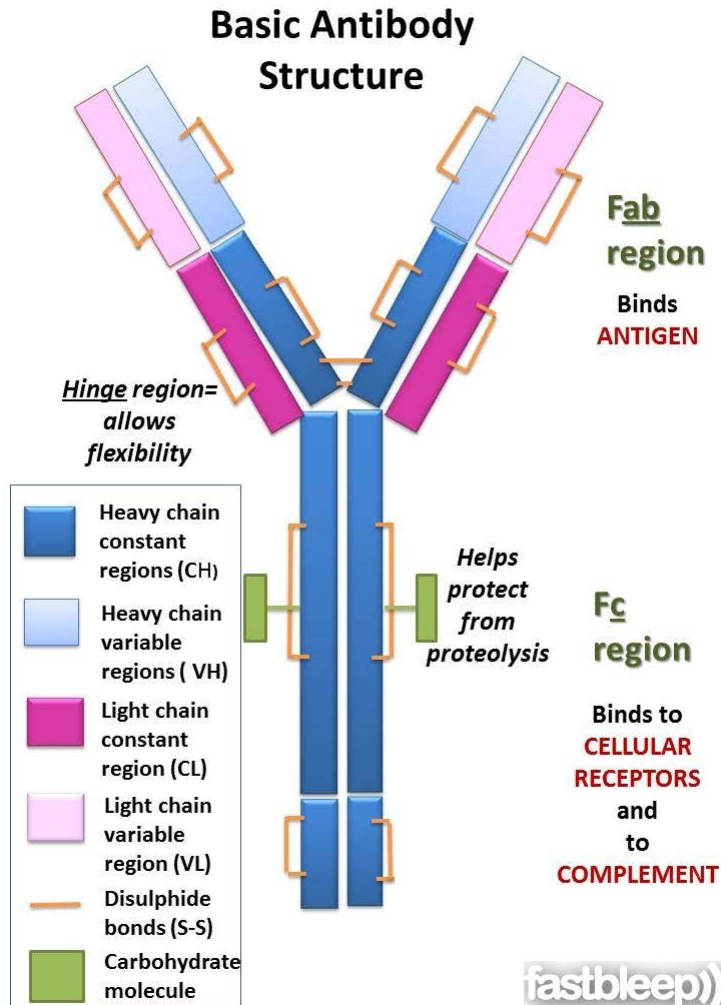
- Obě funkce se často překrývají
  - Obranná funkce - signál
  - Signalizace při obraně - interferony
- Příklady
  - bílkoviny imunitního systému
  - systém srážení krve

# bílkoviny imunitního systému

- Základní součásti **imunoglobuliny**
- 5 základních typů - G, A, M, D a E
- Liší se strukturou i funkcí
- Vykazující společné základní znaky jak struktury tak funkce.



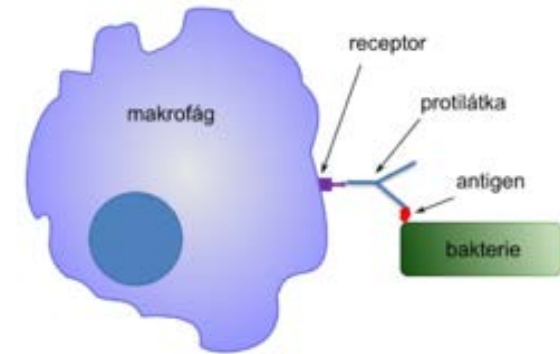
Z hlediska strukturního i funkčního lze IgG rozdělit na část (doménu, fragment) konservativní (konstantní -  $F_c$ ) a variabilní (vaznou -  $F_v$  nebo  $F_{ab}$ ).



Variabilní část má velmi specifickou strukturu a je odpovědná za vazbu skupin (molekul nebo jejich částí) označovaných jako **antigeny**

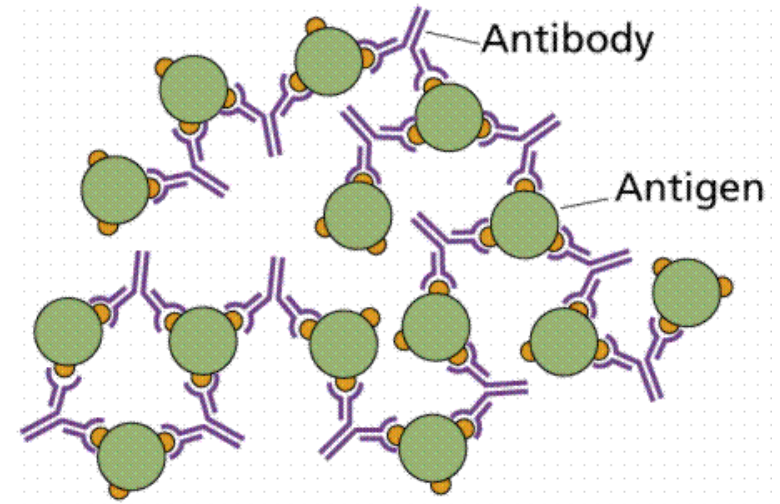
Úseky makromolekul způsobující imunitní rozpoznání - **antigenní determinanty (epitopy)**

# základní funkce imunoglobulinů



Oponizace - označení buněk určených k fagocytose  
Vazba antigenu - síťování, precipitace

Antigen x Imunogen, haptén  
Indukovaná produkce  
Imunologická paměť





# Využití imunoglobulinů

- Vakcíny
- Terapeutické účely
  - Pasivní imunizace (podání hotových protilátek)
  - Cílená distribuce léčiv
  - Protinádorová léčiva
- Bioanalytika, diagnostika
  - Separace a purifikace proteinů
  - Imunoanalýza (RIA, EIA, FIA)

# Srážení krve

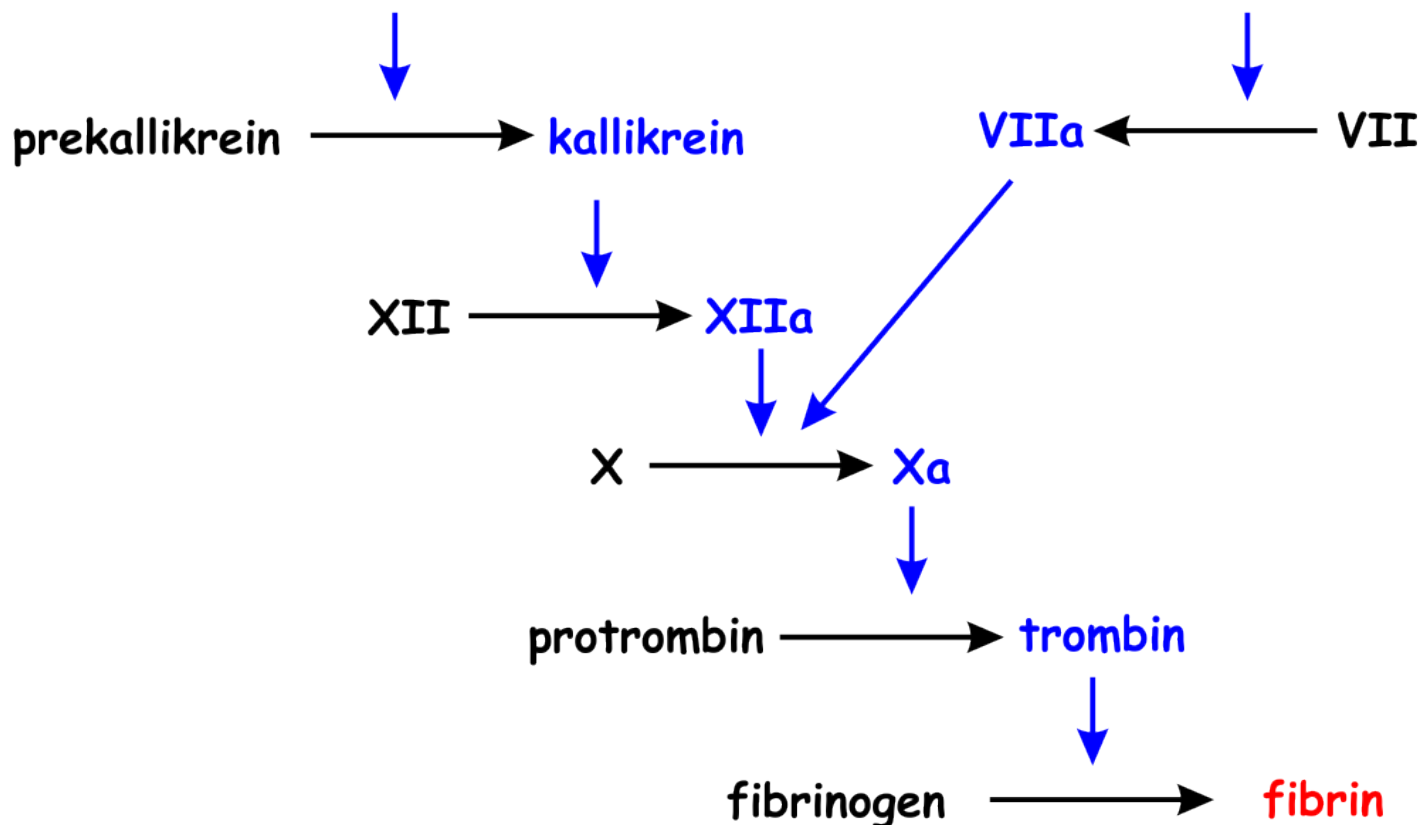
kaskádovitá aktivace proteolytickým štěpením neaktivní formy  
některé koagulační faktory jsou schopny aktivovat své vlastní prekursory  
**obrovské zesílení účinku**

## Vnitřní systém

obnažená kolagenní vlákna  
(negativně nabitý smáčivý povrch)

## Vnější systém

uvolnění tromboplastinu (poškození tkáně)  
proteínofosfolipidová směs z hlubších vrstev cévní stěny



# Metody - Aminokyseliny, proteiny

## Důvody zjišťování primární struktury proteinů

objasnění vyšších struktur proteinů

každý protein má unikátní strukturu a funkce, ta je dána primární

porovnání sekvencí

evoluce, taxonomie

klinické aplikace (mutace příčinou řady chorob)

defektní protein už při změně jediné AK

# URČOVÁNÍ PRIMÁRNÍ STRUKTURY

- A. Purifikace bílkoviny - získání homogenní bílkoviny
- B. Aminokyselinové složení - určení počtu jednotlivých AMK zbytků (kyselá hydrolýza 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

## Purifikace bílkovin

- příprava dostatečného množství vstupního materiálu
- desintegrace

### vlastní purifikační metody

- chromatografie

využití základních typů interakcí:

elektrostatická (iontová) - **ionexová chromatografie** - anex, katex

hydrofobní (dispersní) - **hydrofobní (a reverzněfázová) chromatografie**

hydrofilní - hydrofilní chromatografie

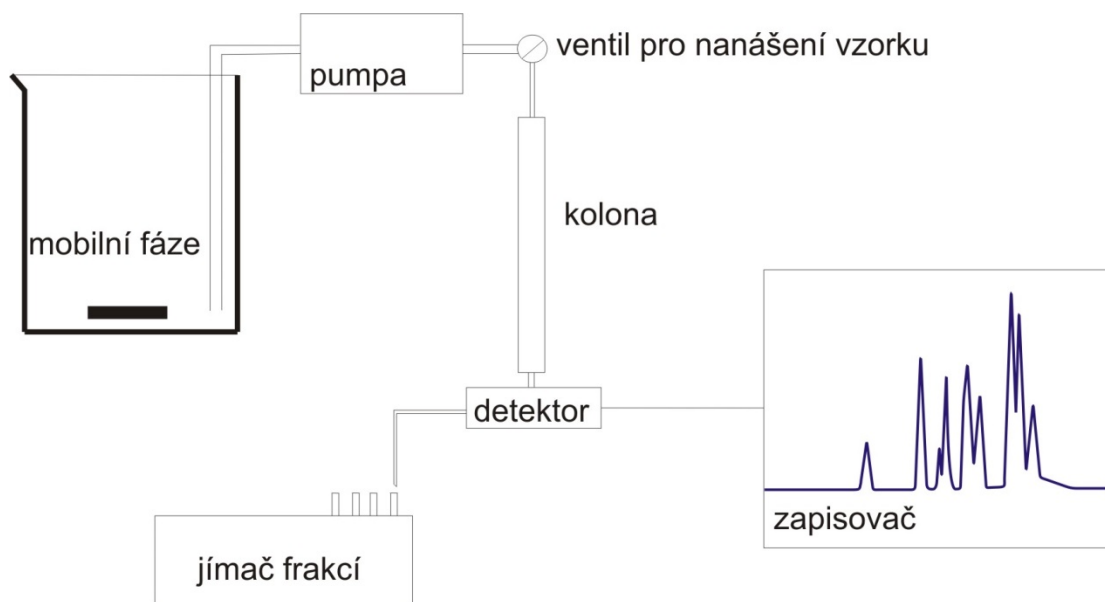
+ **gelová permeační chromatografie**

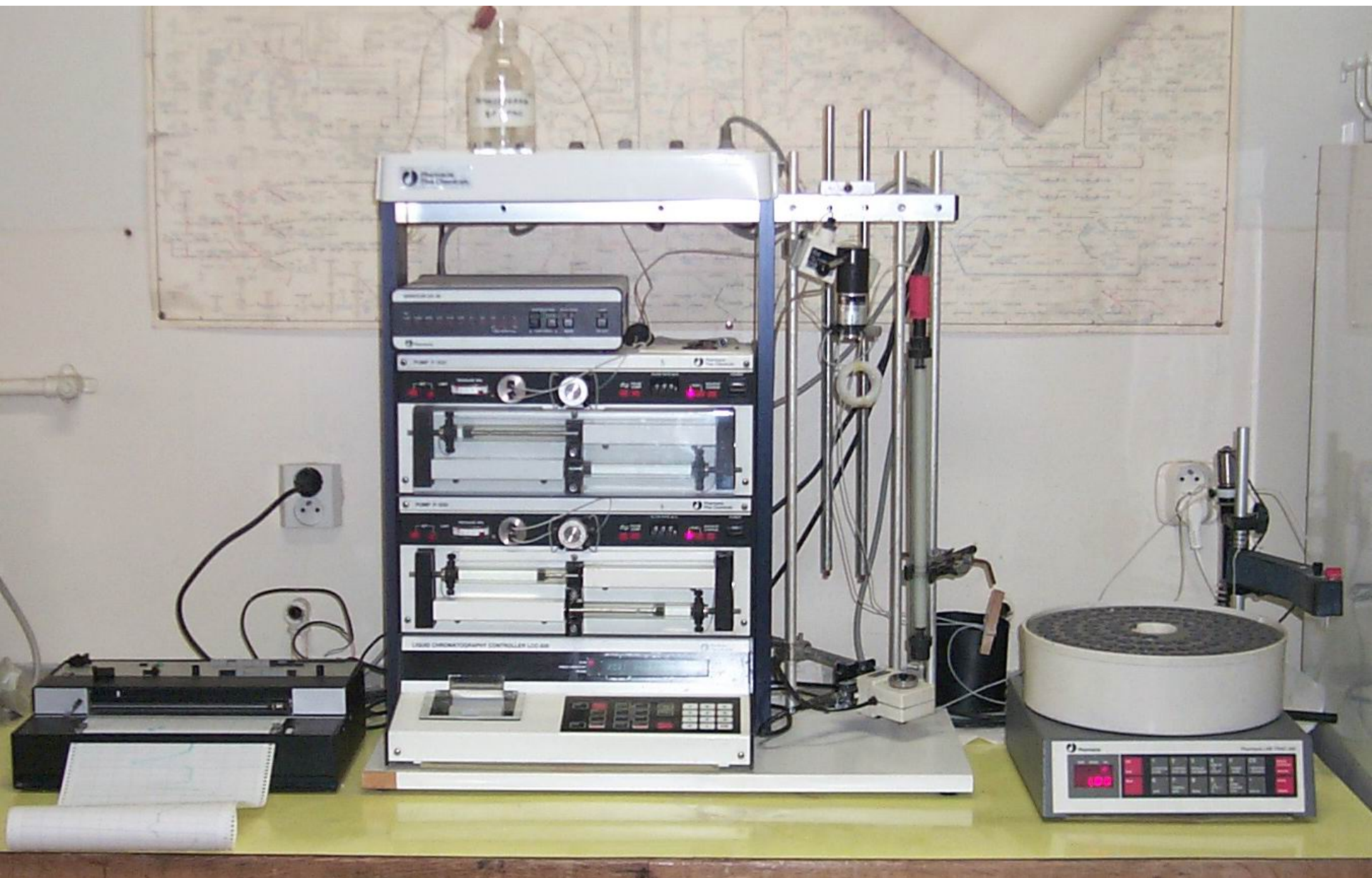


- srážecí metody, jsou založeny na změně rozpustnosti  
viz. solvatační obal (iontová síla, pH, polarita)
- membránové separace
- preparativní elektroforéza
- krystalisace
- preparativní centrifugace

# Průběh chromatografické separace

1. příprava sorbentu
2. naplnění sorbentu do kolony
3. příprava vzorku a ekvilibrace kolony
4. eluce a jímání separovaných proteinů







purifikovaný protein



kyselá hydrolýza	<i>6M HCl, 100 -120 °C, 10 - 100 hod</i>
bazická hydrolýza	<i>2 - 4 M NaOH, 100 °C, 4 - 8 hod</i>
enzymová	<i>Pronáza</i>



aminokyselinová analýza - ionexová nebo reverzně fázová chromatografie

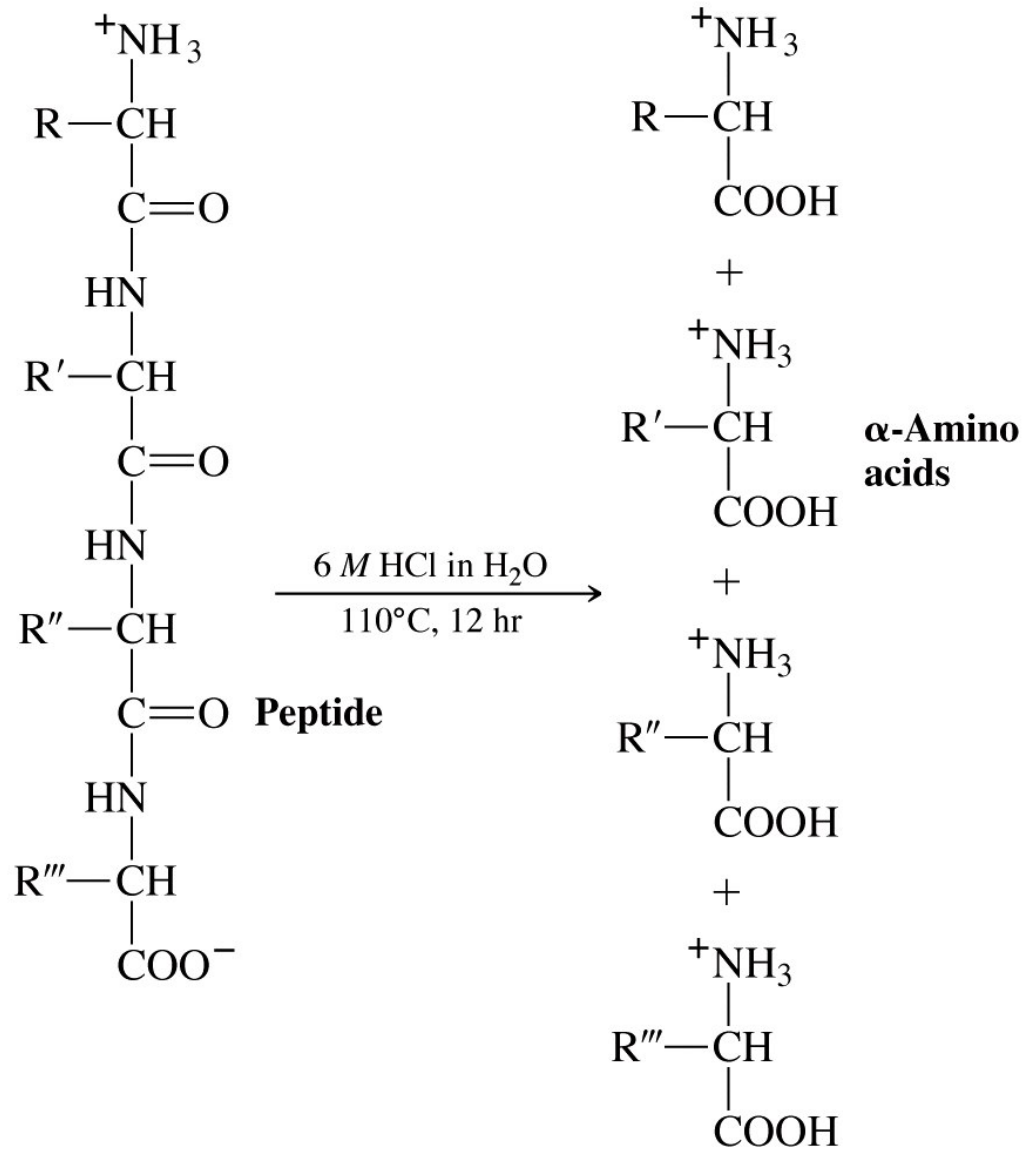
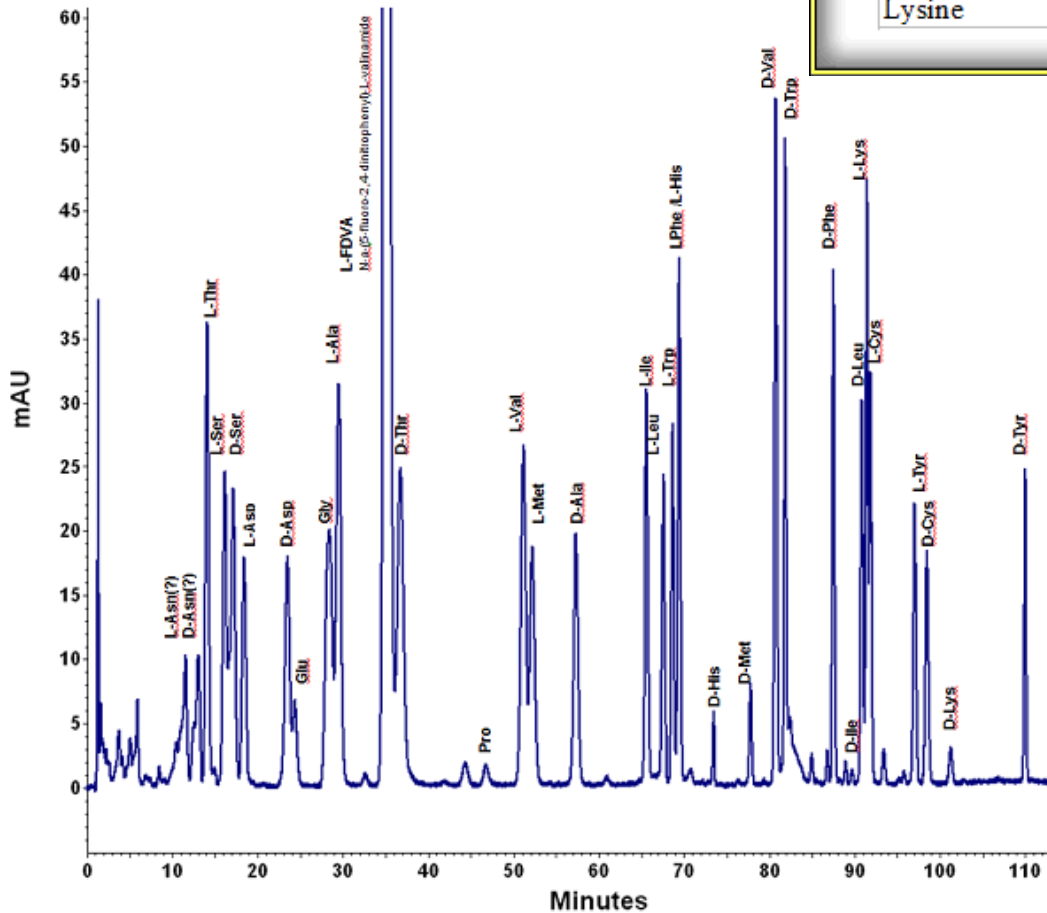


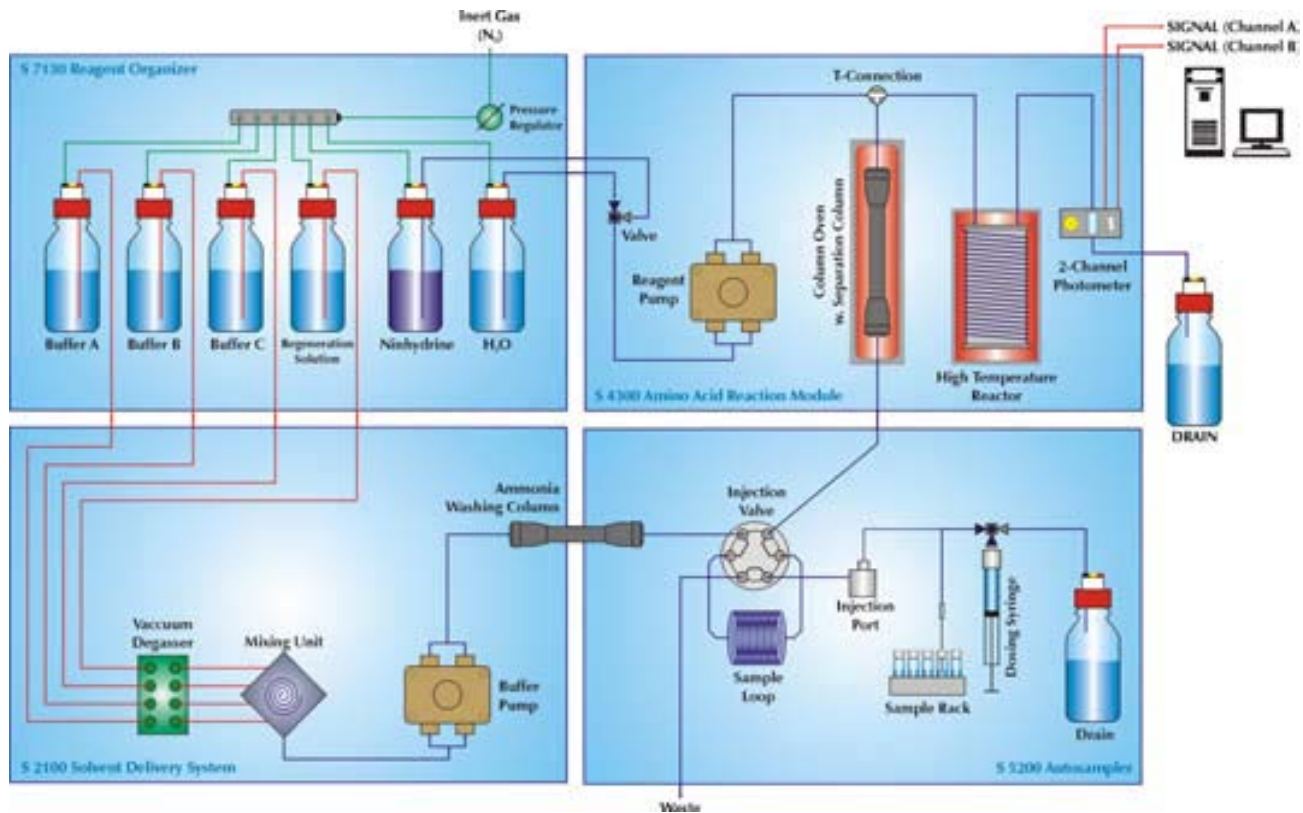
Figure 3-15 Concepts in Biochemistry, 3/e  
 © 2006 John Wiley & Sons

# průběh separace aminokyselin

Glycine	34.7%	Leucine	1.8%
Alanine	10.90%	Valine	1.6%
Proline	9.8%	Histidine	1.5%
Glutamate	6.8%	Phenylalanine	1.3%
Serine	6.3%	Methionine	1.2%
Arginine	6.2%	Isoleucine	1.0%
Hydroxyproline	5.5%	Hydroxylysine	0.9%
Aspartate	3.7%	Tyrosine	0.3%
Threonine	3.3%	Cysteine	0.0%
Lysine	3.2%	Tryptophan	0.0%



# AMK analyzátor



# AMK analyzátor



## Sekvenování

### **příprava proteinu pro sekvenování**

- určení počtu různých podjednotek v proteinu
- rozštěpení disulfidových vazeb
- rozdělení a vyčištění jednotlivých podjednotek
- stanovení AK složení podjednotek

### **sekvenace polypeptidových řetězců**

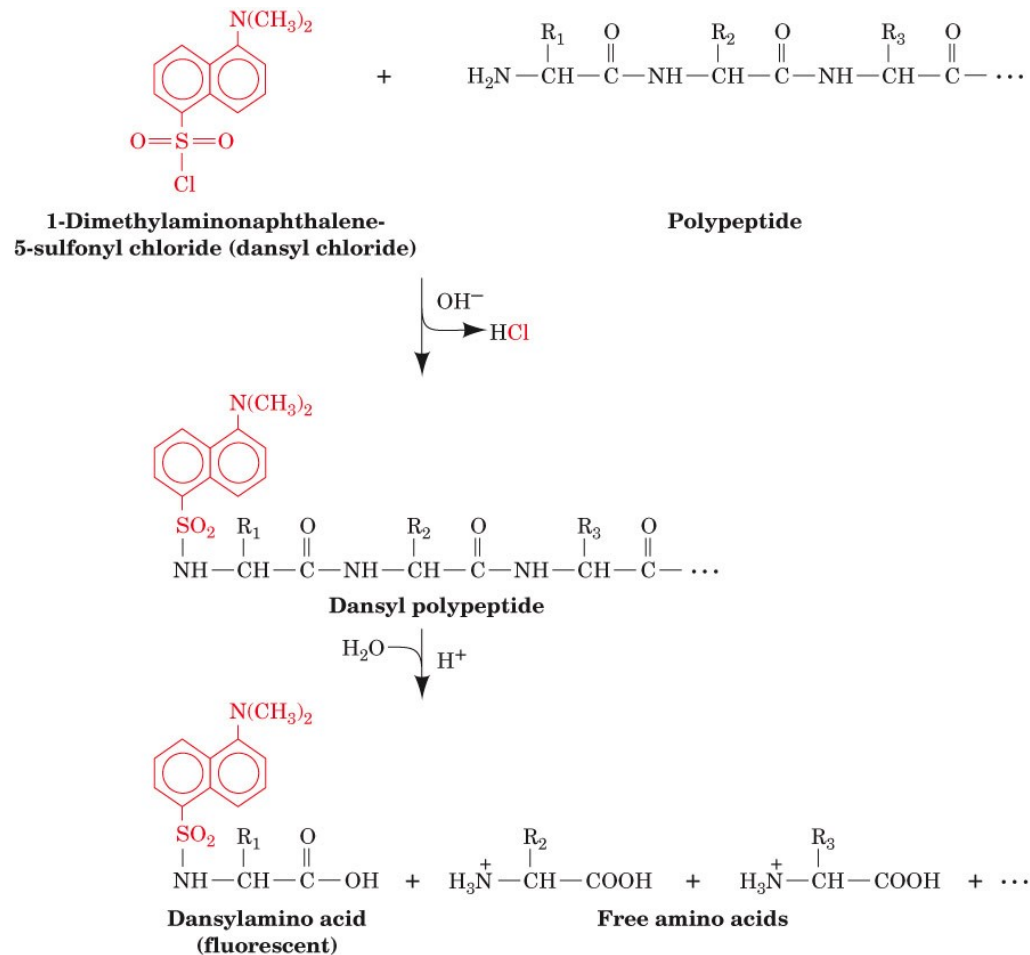
- rozštěpení jednotlivých podjednotek v určitých místech
- rozdělení a vyčištění fragmentů
- stanovení pořadí AK každého fragmentu
- opakování s použitím štěpení odlišné specifity

### **sestavení celé struktury**

- vyhledání míst, kde došlo ke štěpení na peptidové fragmenty
- porovnáním sekvencí skupin polypeptidů je lze složit do pořadí, ve kterém jsou v podjednotce
- lokalizace případných disulfidických vazeb v podjednotkách

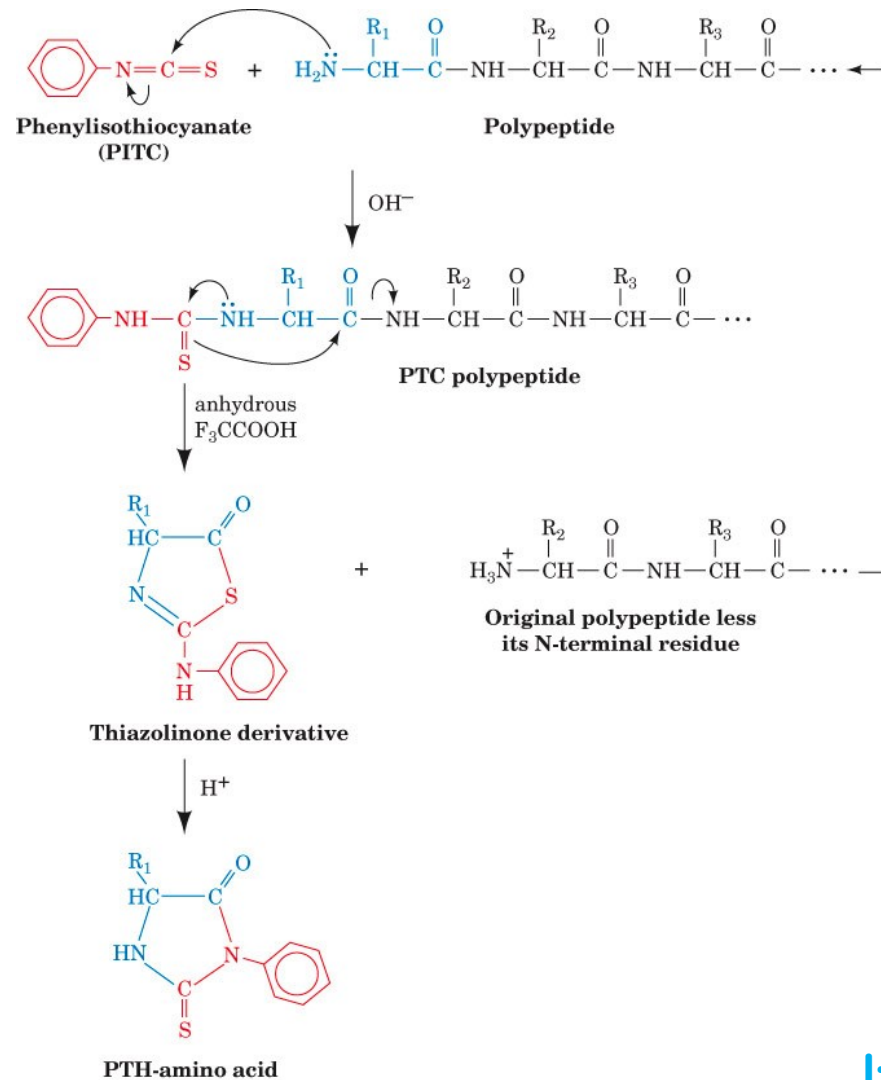
# Zjišťování N-koncových AMK

## Sangerova metoda



# Zjišťování N-koncových AMK

## Edmanova metoda



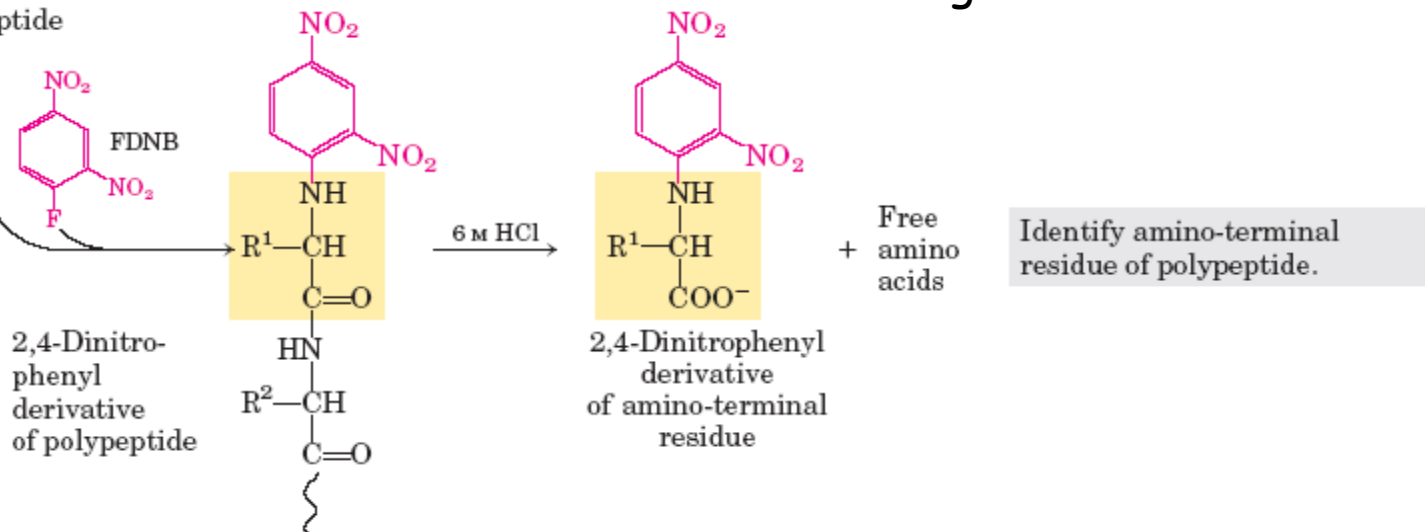
Ize automatizovat



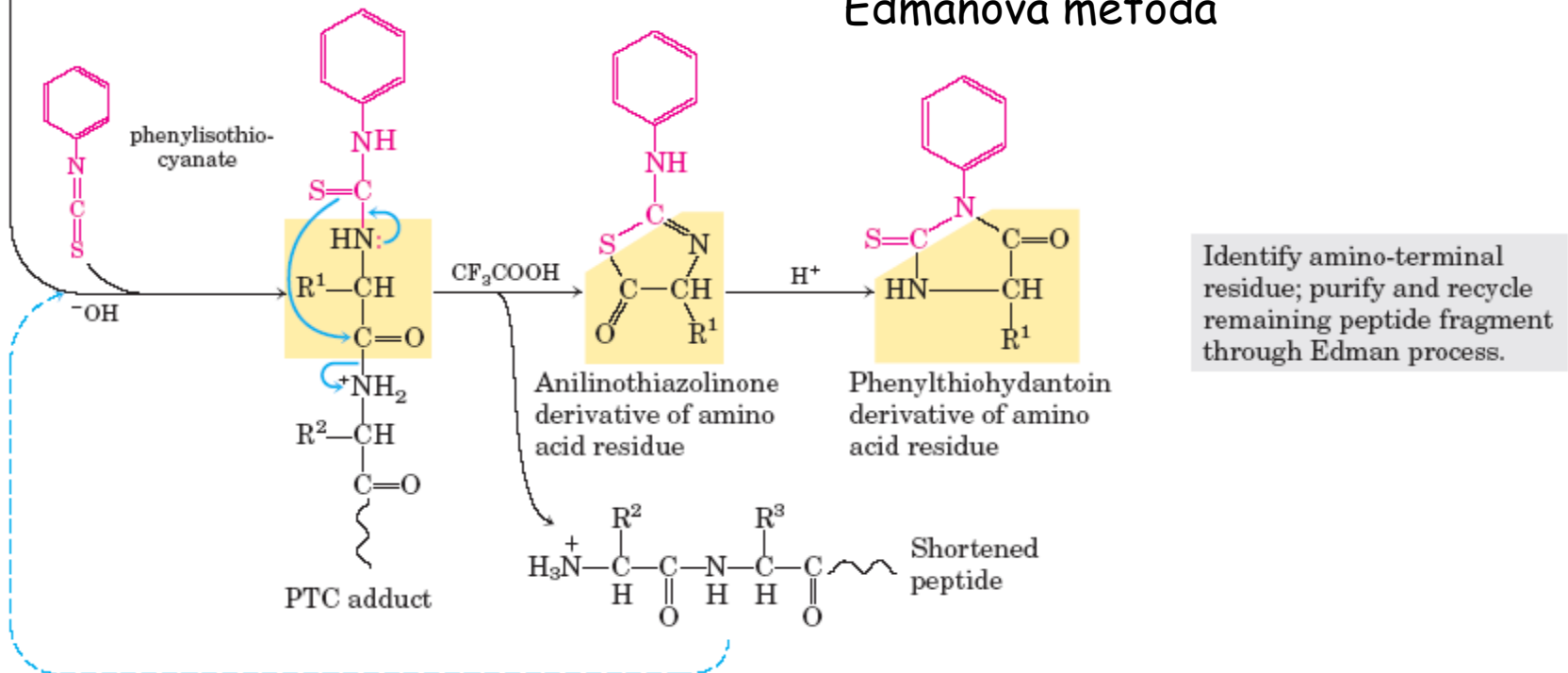


Polypeptide

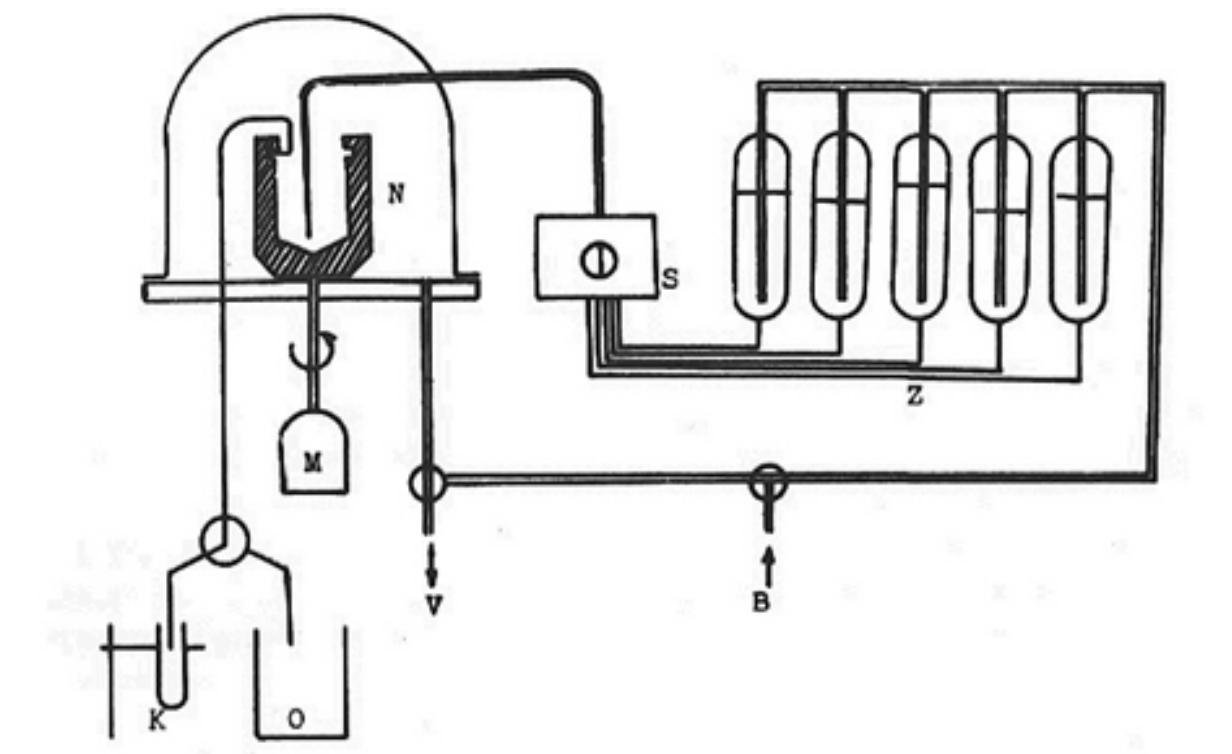
## Sangerova metoda



## Edmanova metoda



# Schéma sekvenátoru



protein nanesen v tenkém filmu a vysušen  
reaktanty přiváděny v organické (nebo plynné) fázi

# Zjišťování C-koncových AMK

C-koncová AK odbourávání karboxypeptidasami, hydrazinolýza, reakce s  $\text{LiBH}_4$ , (neexistuje ekvivalent Edmanova obourávání pro C-konec)

# Možnosti štěpení

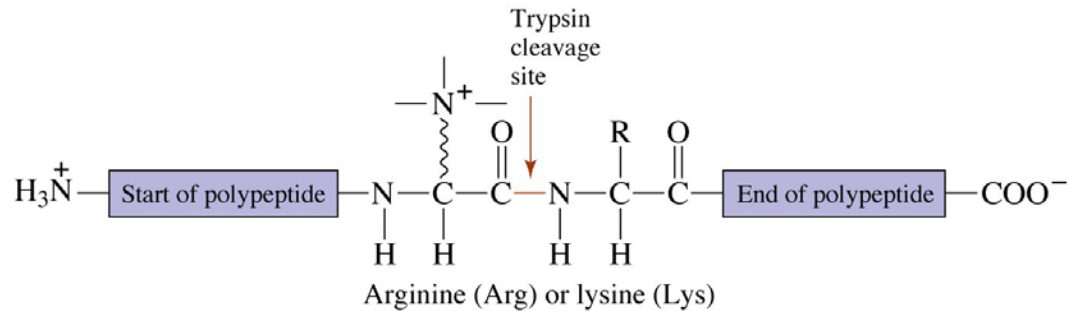


Figure 3-17a Concepts in Biochemistry, 3/e  
© 2006 John Wiley & Sons

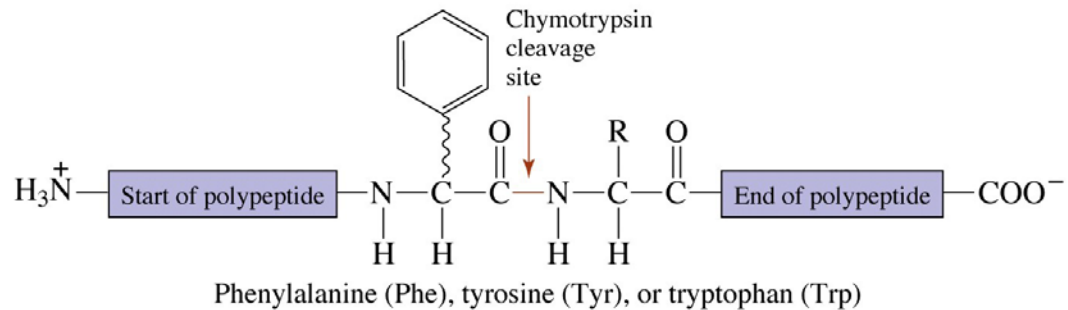


Figure 3-17b Concepts in Biochemistry, 3/e  
© 2006 John Wiley & Sons

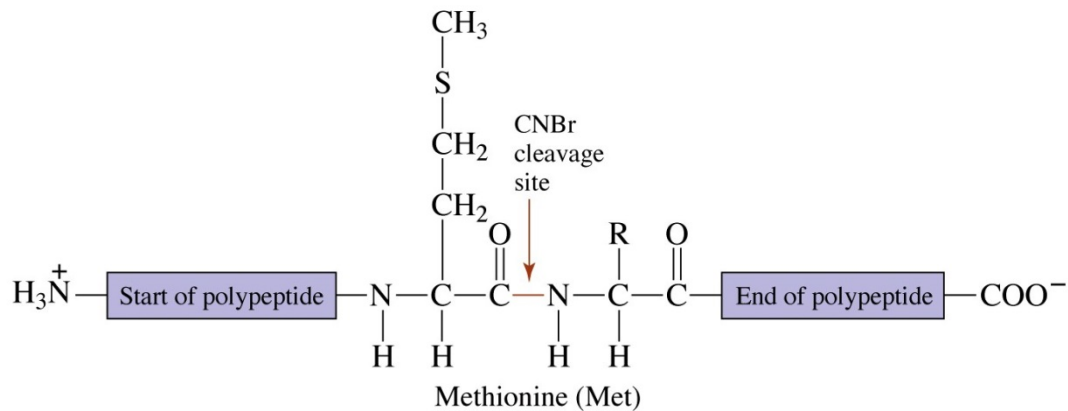


Figure 3-17c Concepts in Biochemistry, 3/e  
© 2006 John Wiley & Sons

# Metoda překrývajících se štěpů

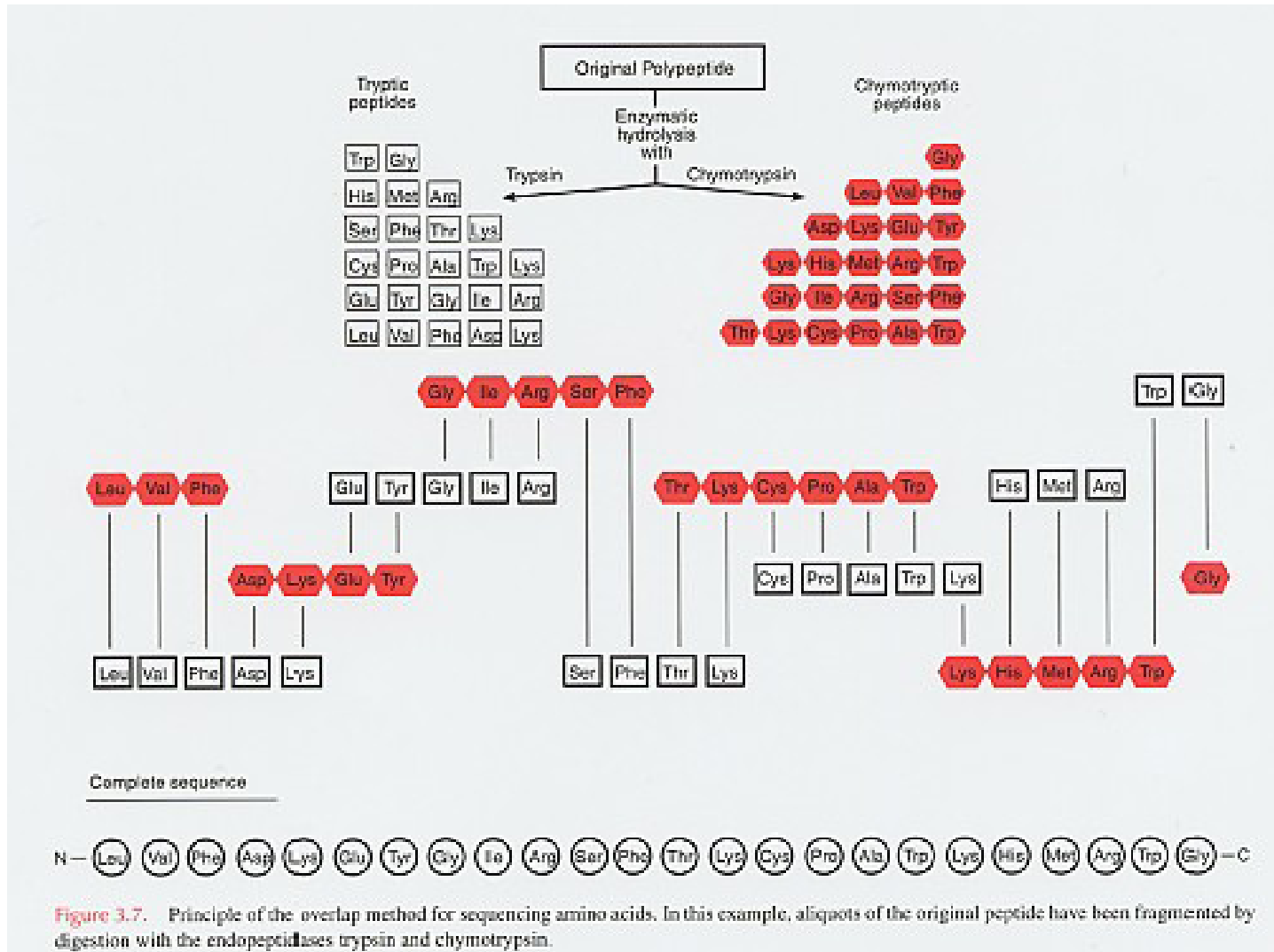


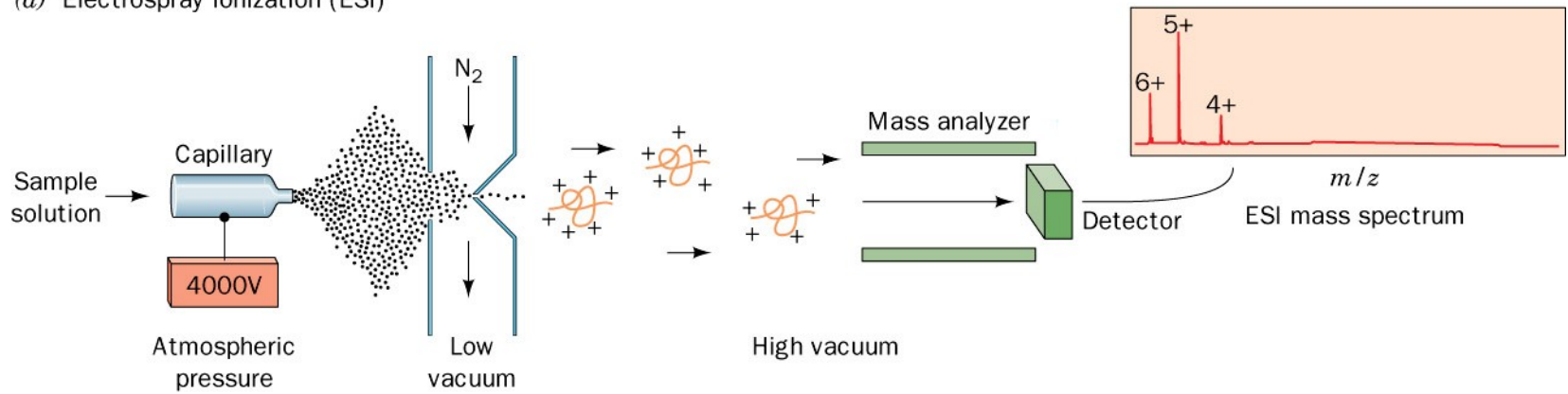
Figure 3.7. Principle of the overlap method for sequencing amino acids. In this example, aliquots of the original peptide have been fragmented by digestion with the endopeptidases trypsin and chymotrypsin.

## Další metody zjišťování aminokyselinové sekvence

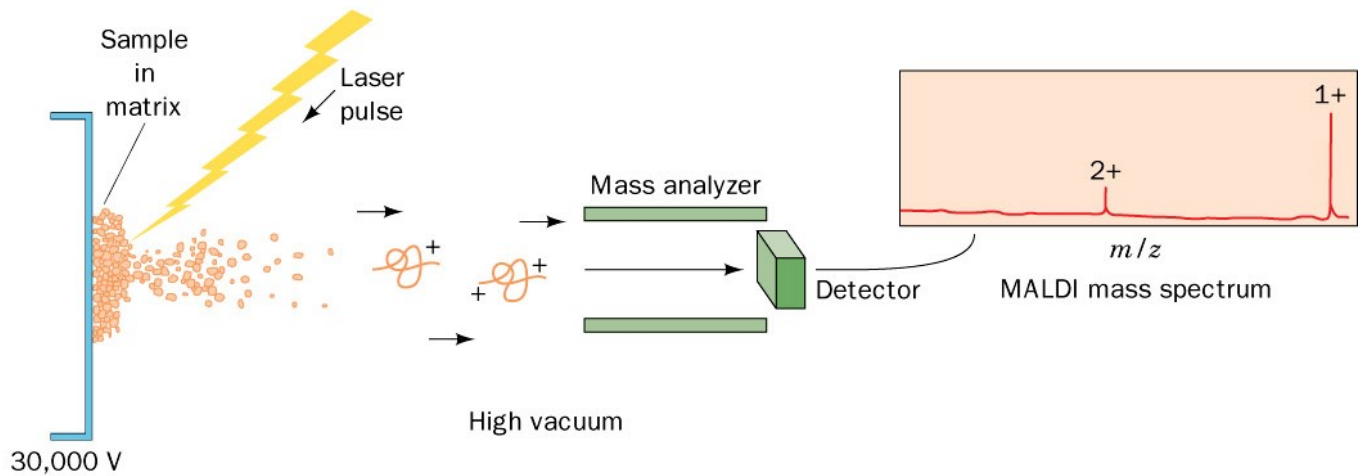
- „sekvenace“ pomocí hmotnostního spektrometru (peptidy)
- izolace genu pro daný protein, zjištění jeho nukleotidové sekvence a překlad do AK sekvence

# MS

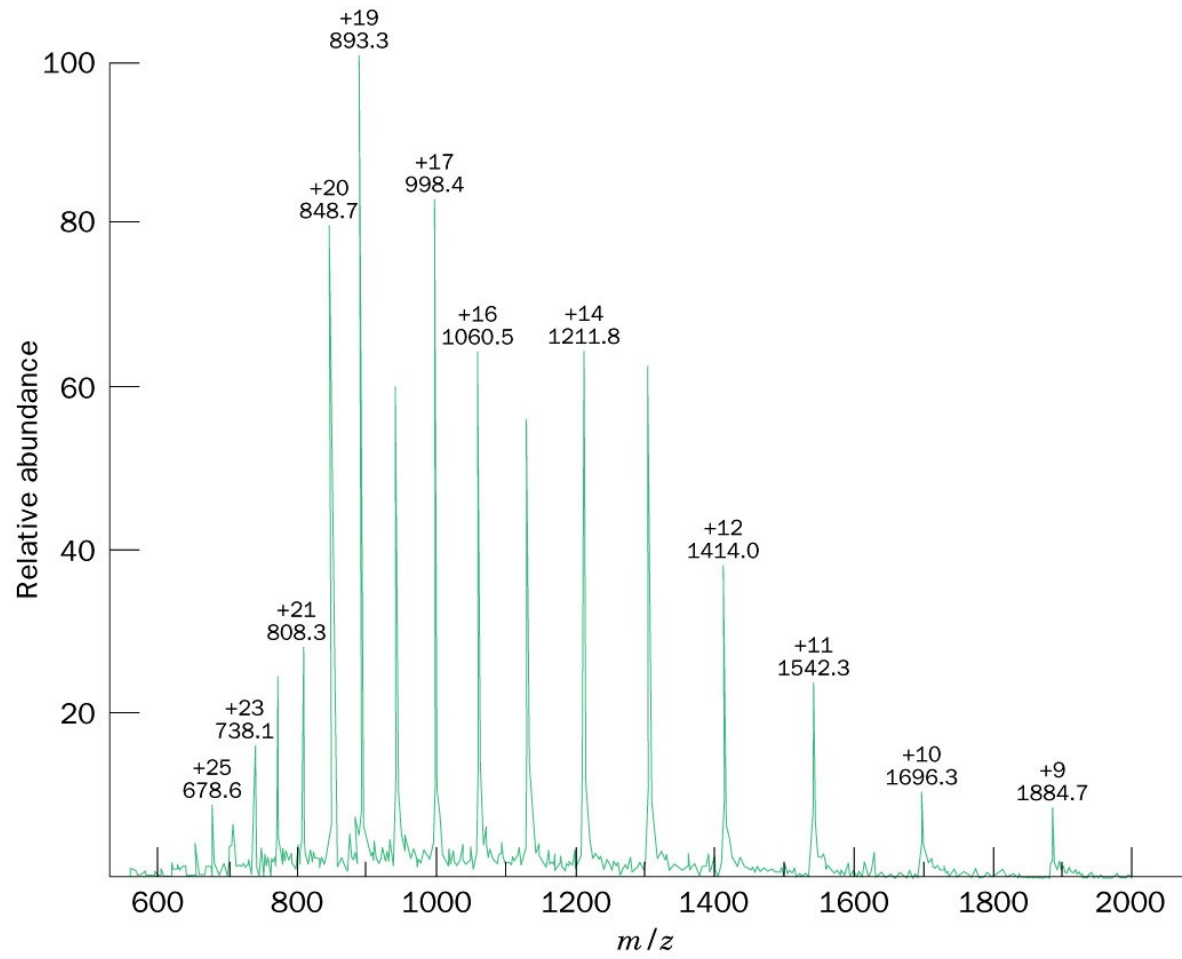
(a) Electrospray ionization (ESI)



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

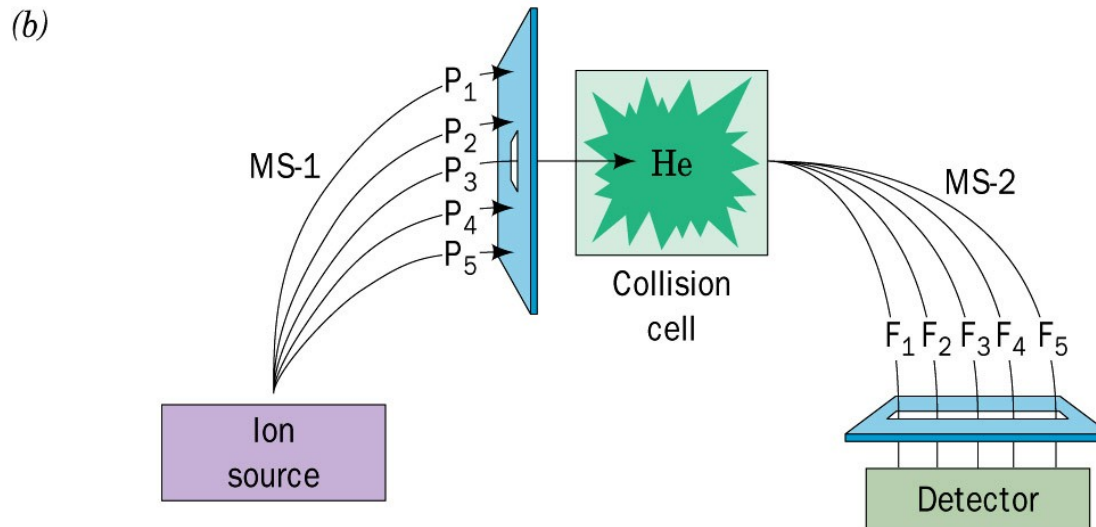
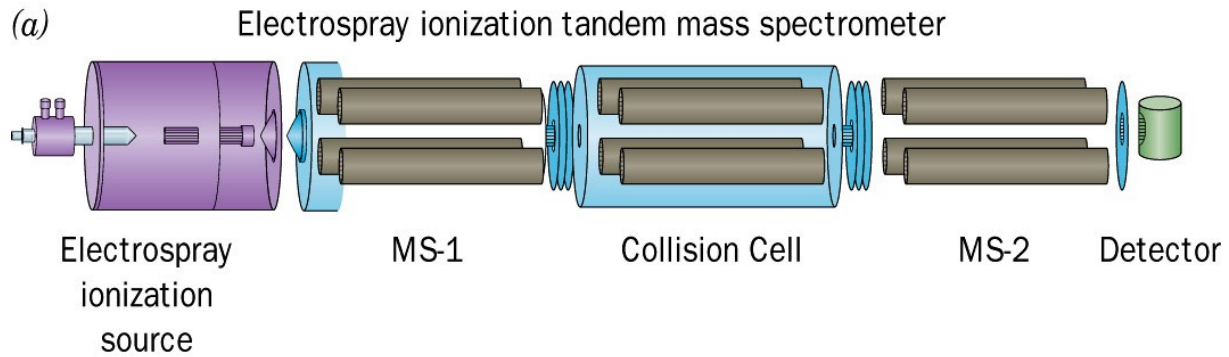


# MS

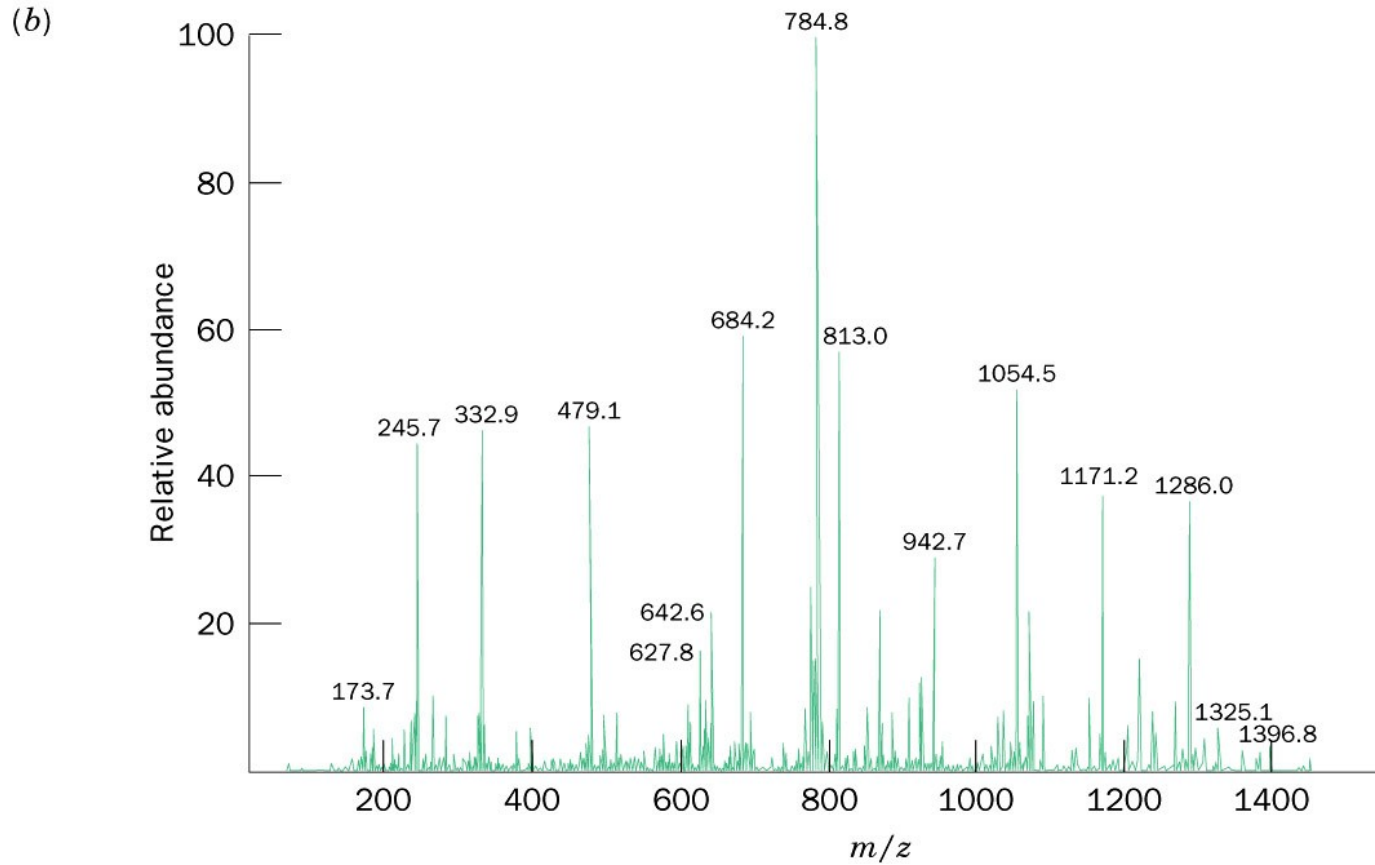
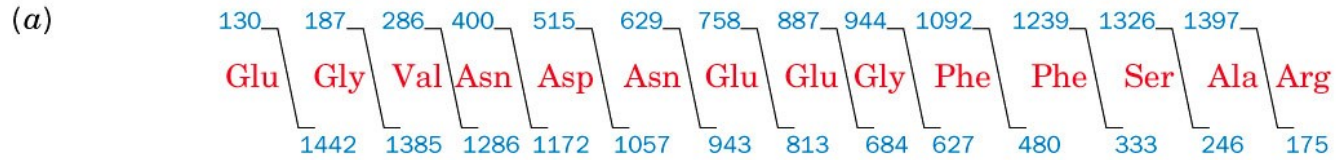




# MS-MS

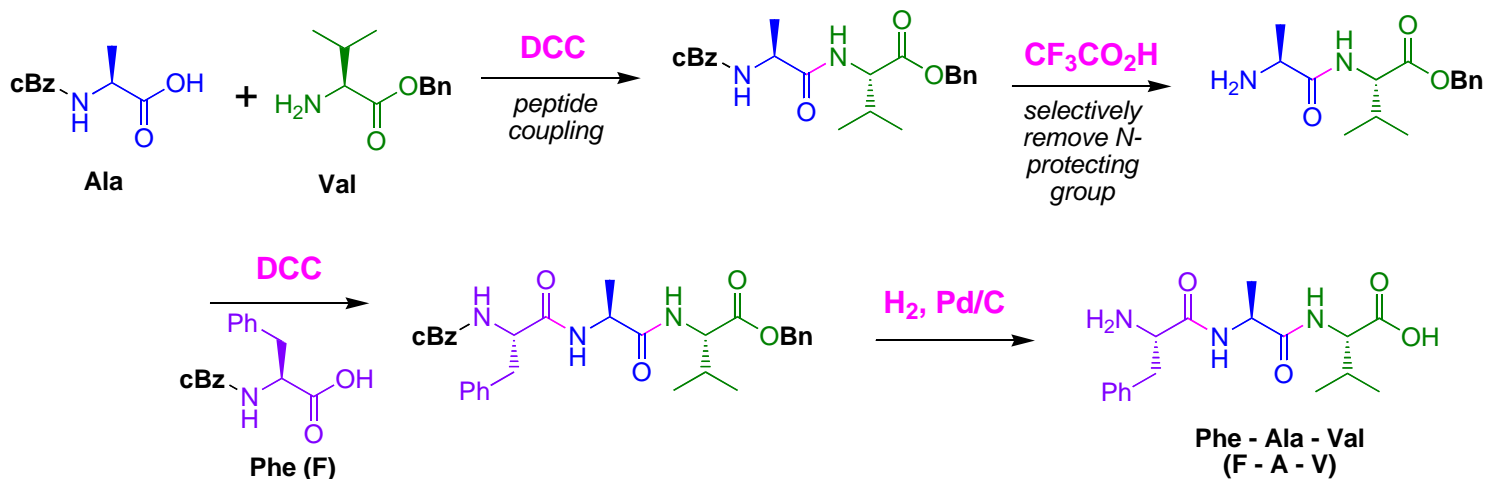
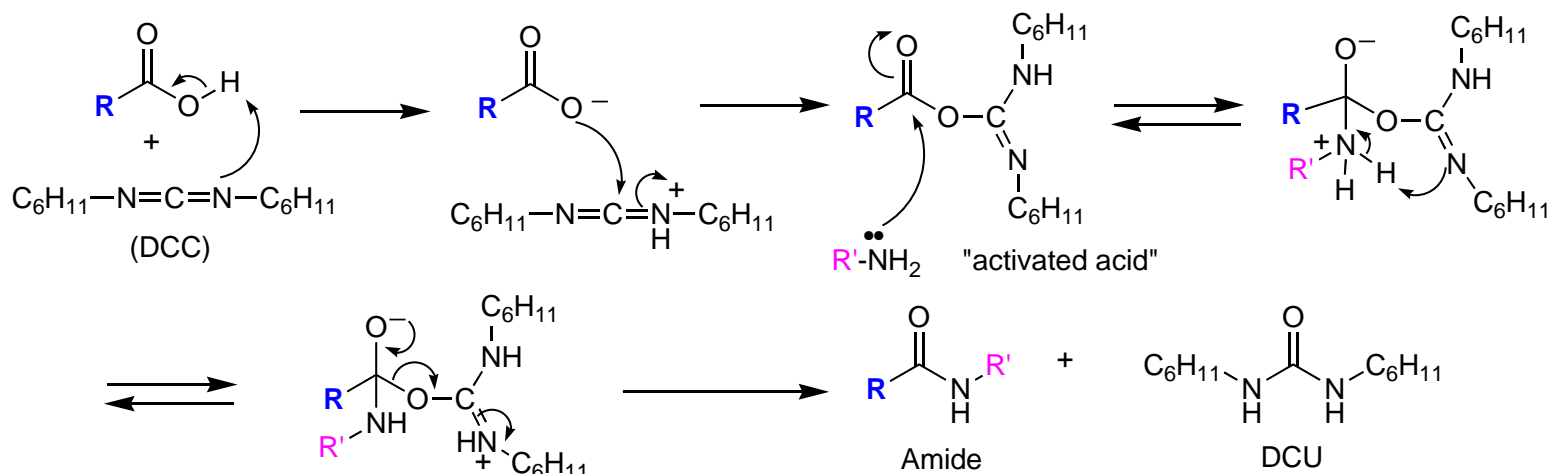


# MS-MS





27.17: Peptide Bond Formation. Amide formation from the reaction of an amine with a carboxylic acid is slow. Amide bond formation (peptide coupling) can be accelerated if the carboxylic acid is activated. *Reagent: dicyclohexylcarbodiimide (DCC)*



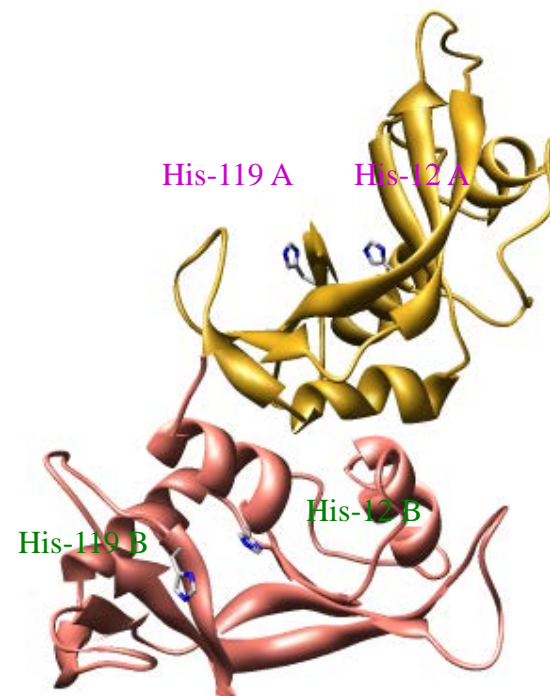


# Ribonuclease A- 124 amino acids, catalyzes the hydrolysis of RNA

## Solid-phase synthesis of RNase A:

Synthetic RNase A: 78 % activity  
0.4 mg was synthesized  
2.9 % overall yield  
average yield ~ 97% per coupling step

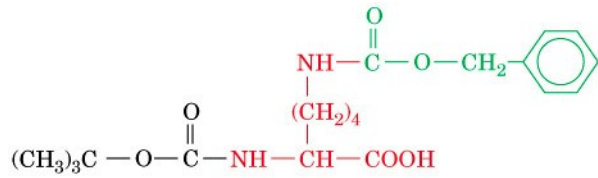
LYS	GLU	THR	ALA	ALA	ALA	LYS	PHE	GLU	ARG
GLN	HIS	MET	ASP	SER	SER	THR	SER	ALA	ALA
SER	SER	SER	ASN	TYR	CYS	ASN	GLN	MET	MET
LYS	SER	ARG	ASN	LEU	THR	LYS	ASP	ARG	CYS
LYS	PRO	VAL	ASN	THR	PHE	VAL	HIS	GLU	SER
LEU	ALA	ASP	VAL	GLN	ALA	VAL	CYS	SER	GLN
LYS	ASN	VAL	ALA	CYS	LYS	ASN	GLY	GLN	THR
ASN	CYS	TYR	GLN	SER	TYR	SER	THR	MET	SER
ILE	THR	ASP	CYS	ARG	GLU	THR	GLY	SER	SER
LYS	TYR	PRO	ASN	CYS	ALA	TYR	LYS	THR	THR
GLN	ALA	ASN	LYS	HIS	ILE	ILE	VAL	ALA	CYS
GLU	GLY	ASN	PRO	TYR	VAL	PRO	VAL	HIS	PHE
ASP	ALA	SER	VAL						



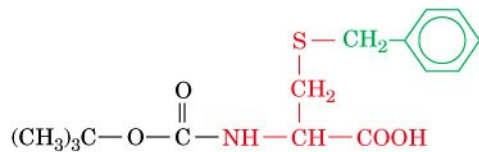
pdb code: 1AFL

R. Bruce Merrifield, Rockefeller University, 1984 Nobel Prize in Chemistry:

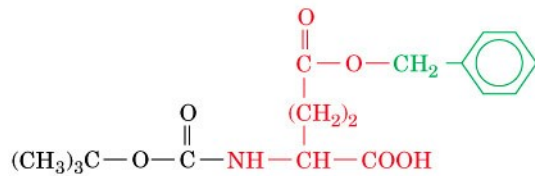
*“for his development of methodology for chemical synthesis on a solid matrix.”*



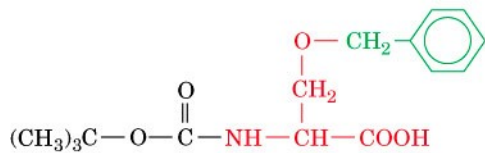
**Boc, *N*<sup>ε</sup>-benzyloxycarbonyl-Lys**



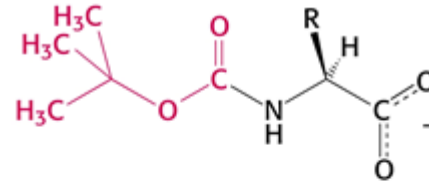
**Boc, *S*-benzyl-Cys**



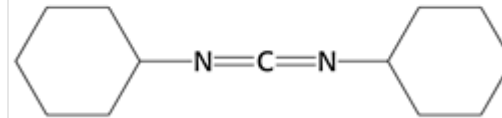
**Boc-Glu,  $\gamma$ -Benzyl ester**



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



***t*-Butyloxycarbonyl amino acid  
(*t*-Boc amino acid)**



**Dicyclohexylcarbodiimide  
(DCC)**

# Patologické hemoglobiny

Mutace v jednotlivých řetězcích Hb

HbS - patologický projev Srpkovitá anemie

## HBB Sequence in Normal Adult Hemoglobin (Hb A):

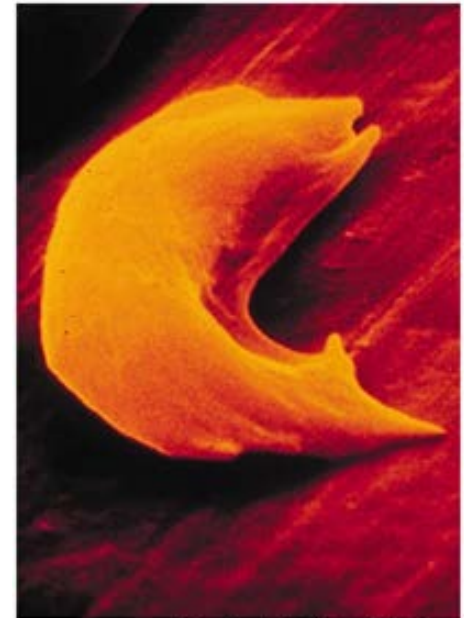
Nucleotide	CTG	ACT	CCT	GAG	GAG	AAG	TCT
Amino Acid	Leu	Thr	Pro	Glu	Glu	Lys	Ser
	3			6			9

## HBB Sequence in Mutant Adult Hemoglobin (Hb S):

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



© Stanley Flegler/Visuals Unlimited



© Stanley Flegler/Visuals Unlimited

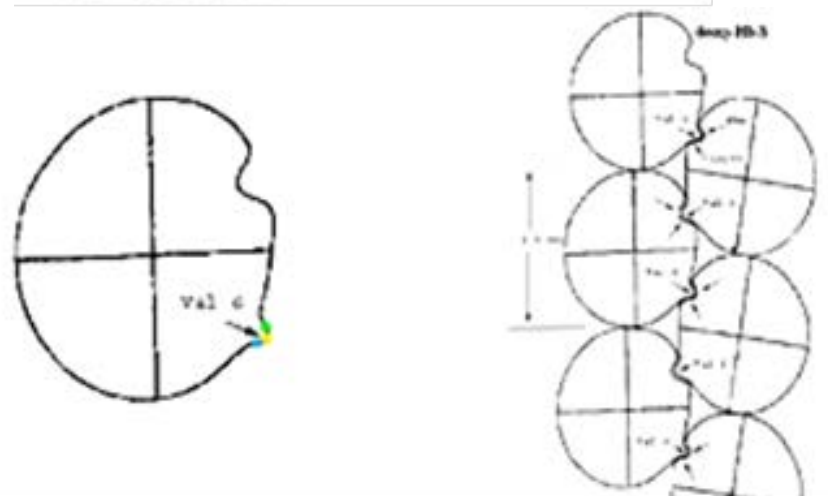
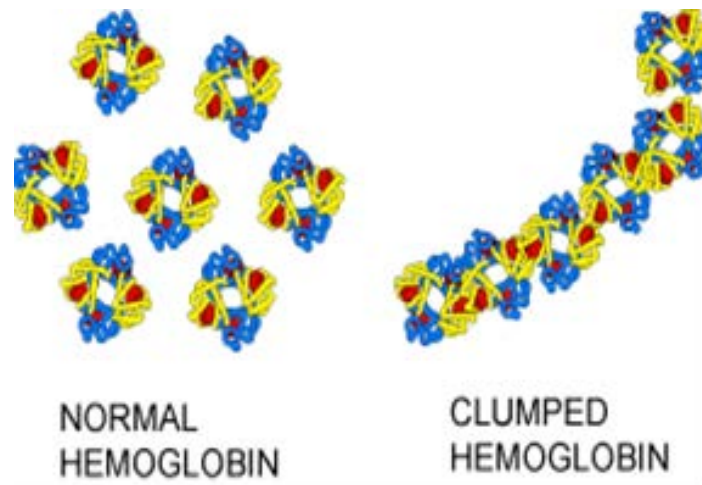
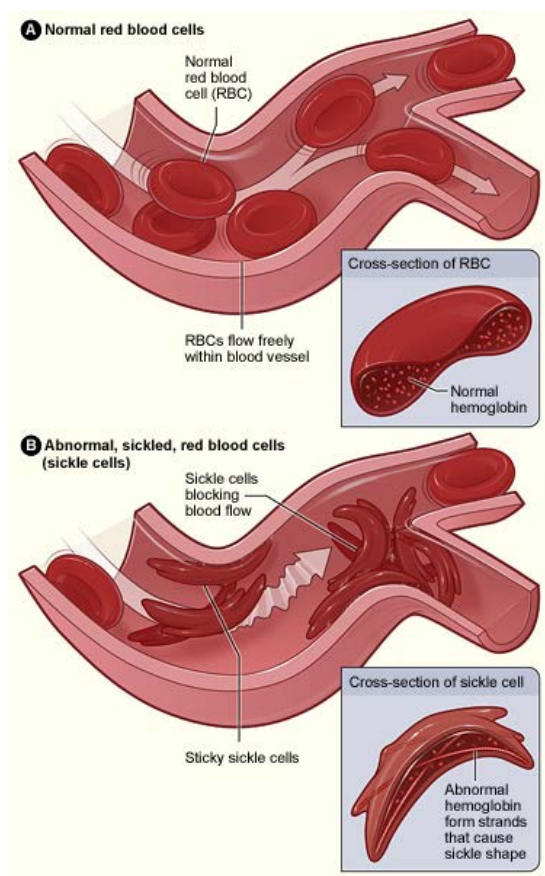


Záměna Glu za Val vytváří nepolární oblast

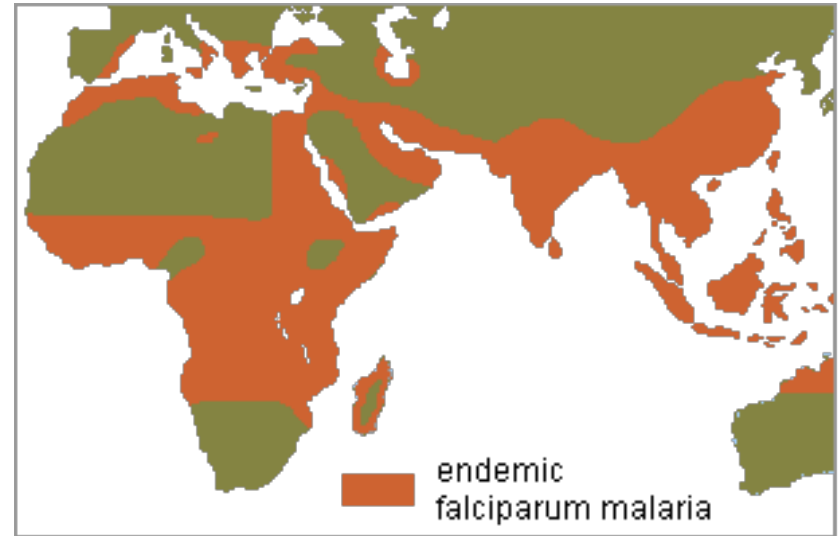
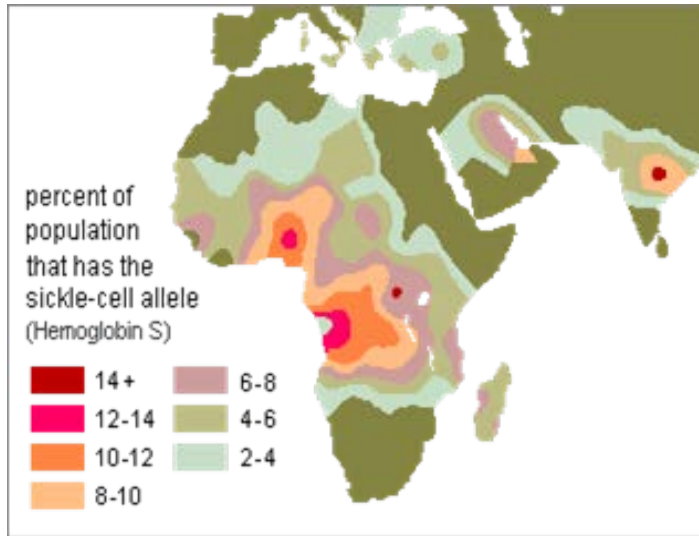
Místo tetrameru vznikají řetězkové aglomeráty připomínající strukturu aktinu

Fysiologický projev - ca 10 odvozených poruch

- Nedokonalý transportu kyslíku v krvi - odtud *srpkovitá anémie*
- Nevhodný tvar, životnost ca 20 dní (ca 120 u normálních)
- Ucpávání cév



## Korelace výskytu genu HbS a malarie



Malárie je parazitická infekce přenášená z člověka na člověka kousnutím infikované samičky komára rodu *Anopheles*. *Plasmodium falciparum* je prvok z kmene výtrusovci (Apicomplexa)

### Význam mutace

- Nevýhoda - anemie, malá výkonnost, kratší život
- Výhoda - odolnost proti *Plasmodium falciparum* prvok z kmene výtrusovci (Apicomplexa)

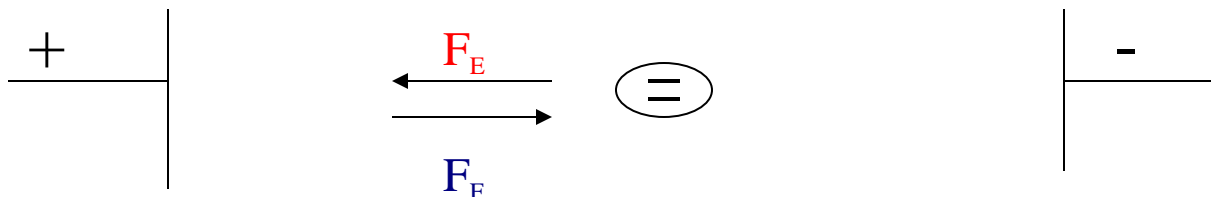
# Elektroforesa

$$v = \mu \cdot E$$

$v$  - rychlost iontu v elektickém poli

$E$  - intenzita elektrického pole

$\mu$  - elektroforetická pohyblivost



$F_E$  - elektrická síla

$$F_E = Q \cdot E$$

$Q$  - náboj iontu

$E$  - intenzita elektrického pole

$F_F$  - frikční síla

$$F_F = -6\pi\eta r v$$

$\eta$  - viskozita roztoku

$r$  - poloměr iontu

$v$  - rychlost iontu

Během elfo se vytvoří ustálený stav, ustálí se rychlost iontu. Platí:

$$F_E = F_F \quad \text{při určité rychlosti}$$



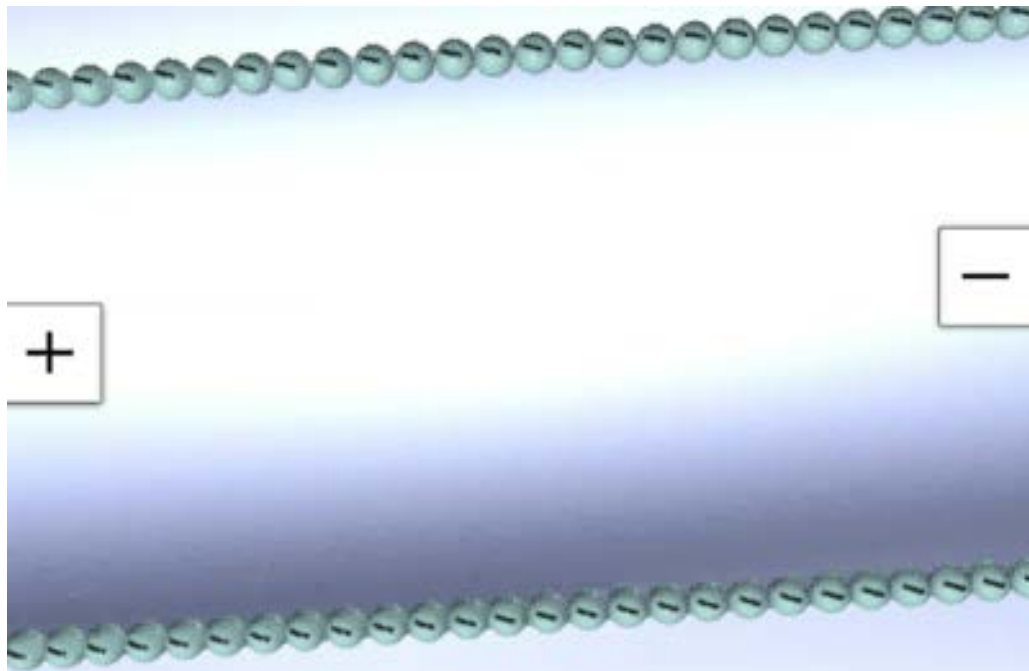
$$Q \cdot E = 6\pi\eta r v$$

$$v = \mu \cdot E$$

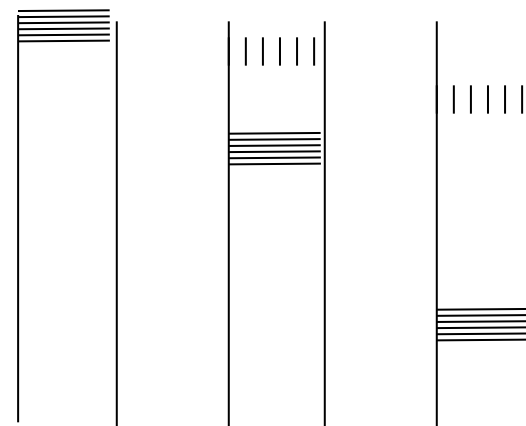


$$\mu = Q/6\pi\eta r$$

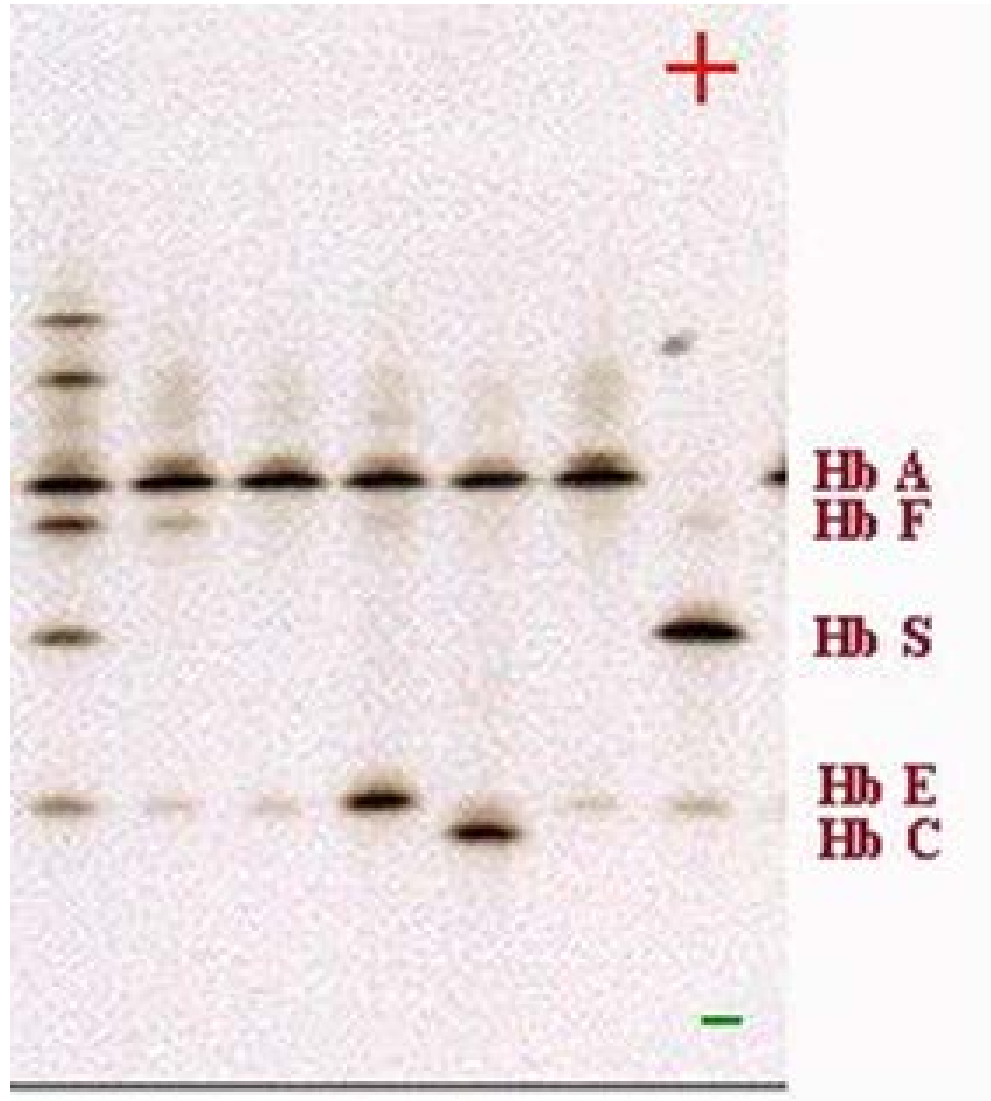
# Princip elektroforesy



## Zónová elektroforéza



# Rozlišení forem Hb elektroforezou



Anionty - směr k +  
HbS chybí jeden Glu - pomalejší