

Základy biochemie KBC / BCH

Proteiny, peptidy a aminokyseliny

Inovace studia biochemie prostřednictvím e-learningu
CZ.04.1.03/3.2.15.3/0407



Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky.



Základy biochemie KBC/BCH, ZS 20011/12.

- Prof. Pavel PEČ
- <http://ibiochemie.upol.cz>

Další biochemická literatura

- Kodíček Milan, **Biochemické pojmy**, výkladový slovník
http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-002_v1/
- Berg, M. Jeremy, Tymoczko, L. John, Stryer Lubert:
BIOCHEMISTRY (6th Edition), W.H. Freeman and Company,
New York (2007); ISBN 0-7167-8724-5.
- Web: <http://bcs.whfreeman.com/biochem6/>
- Knihkupectví Malé centrum, Brno, Kotlářská 2 (Areál
PřF MU) <http://www.malecentrum.cz/>

Biochemická literatura

- Příklad interaktivní elektronické učebnice:
- http://orion.chemi.muni.cz/e_learning/biochemie.htm

Proteiny, peptidy a aminokyseliny:

- Předmět biochemie.
- Aminokyseliny a peptidy.
- Sekvencování peptidů a problematika peptidových syntéz.
- Přírodní peptidy: hormony, antibiotika, jedy, toxiny.
- Proteiny. Rozdělení proteinů. Purifikace proteinů. Elektroforéza proteinů. Metody stanovení molekulové hmotnosti proteinů. Strukturní typy proteinů.
- Určení třírozměrné struktury proteinů.
- Základy imunologie.

Úvod

- Biochemie popisuje struktury, organizaci a funkci živé hmoty na molekulární úrovni.
- **Dělíme na tři základní oblasti:**
 1. Strukturní chemie složek živé hmoty a vztah mezi biologickou funkcí a chemickou strukturou.
 2. Studium metabolismu - sledy chemických reakcí probíhajících v živé hmotě.
 3. Molekulární genetika - uchovávání a přenos informací.

Kořeny biochemie

- F. Wöhler - 1828 - syntéza močoviny z anorganických látek
- Bratři Eduard a Hans Buchnerové - 1897 - bezbuněčný extrakt z kvasinek katalyzuje fermentaci (reakce „in vitro“).
- J. B. Sumner - 1926 - krystaluje enzym ureasu, protein z luštěniny *Canavalia ensiformis*
- Současný rozvoj biologie buňky
- Historický pohled na úlohu deoxyribonukleové kyseliny (DNA) v buňce
- Objev 1869 F. Miescher; 1953 - James Watson a Francis Crick - struktura DNA - start molekulární biologie.

Biochemie jako disciplína a interdisciplinární věda

- Biochemie vychází hlavně z poznatků **organické chemie** a ostatních chemických oborů.
- Dále z poznatků medicíny, nauky o výživě, mikrobiologie, fyziologie, buněčné biologie, biofyziky a genetiky.
- Co sama biochemie ? Zaměřuje se na strukturu biomolekul a jejich reakce, na enzymy a biologickou katalýzu, na vysvětlení metabolických cest a jejich regulaci a na principy životních procesů, které mohou být vysvětleny chemickými zákony.

Chemické prvky živé hmoty:

- První úroveň: C, H, O, N
- Druhá úroveň: Na, K, Mg, Ca, Cl, S, P
- Třetí úroveň: Co, Cu, Fe, Mn, Zn
- Čtvrtá úroveň: Al, As, B, Br, Cr, F, Ga, I, Mo, Se, Si, V
- Proč C a ne Si ??

Uhlíkový šovinismus (nadřazenost)

- Křemík má řadu nevýhod oproti uhlíku:
- Atomy Si jsou mnohem větší, mají vyšší hmotnost a atomový poloměr. Těžko se tvoří dvojně a trojně kovalentní vazby.
- Silany (sloučeniny s vodíkem), analogie alkanů, jsou silně reaktivní s vodou - rozkládají se.
- Silikony, polymery vážící křemík přes kyslík, jsou velmi stabilní. Komplexní silikony s dlouhými řetězci jsou zase méně stabilní než odpovídající uhlíkaté sloučeniny.
- Oxid křemičitý je analogem oxidu uhličitého. Je to známá pevná látka nerozpustná ve vodě.
- Dovedete si představit oxid křemičitý jako produkt aerobní respirace ??

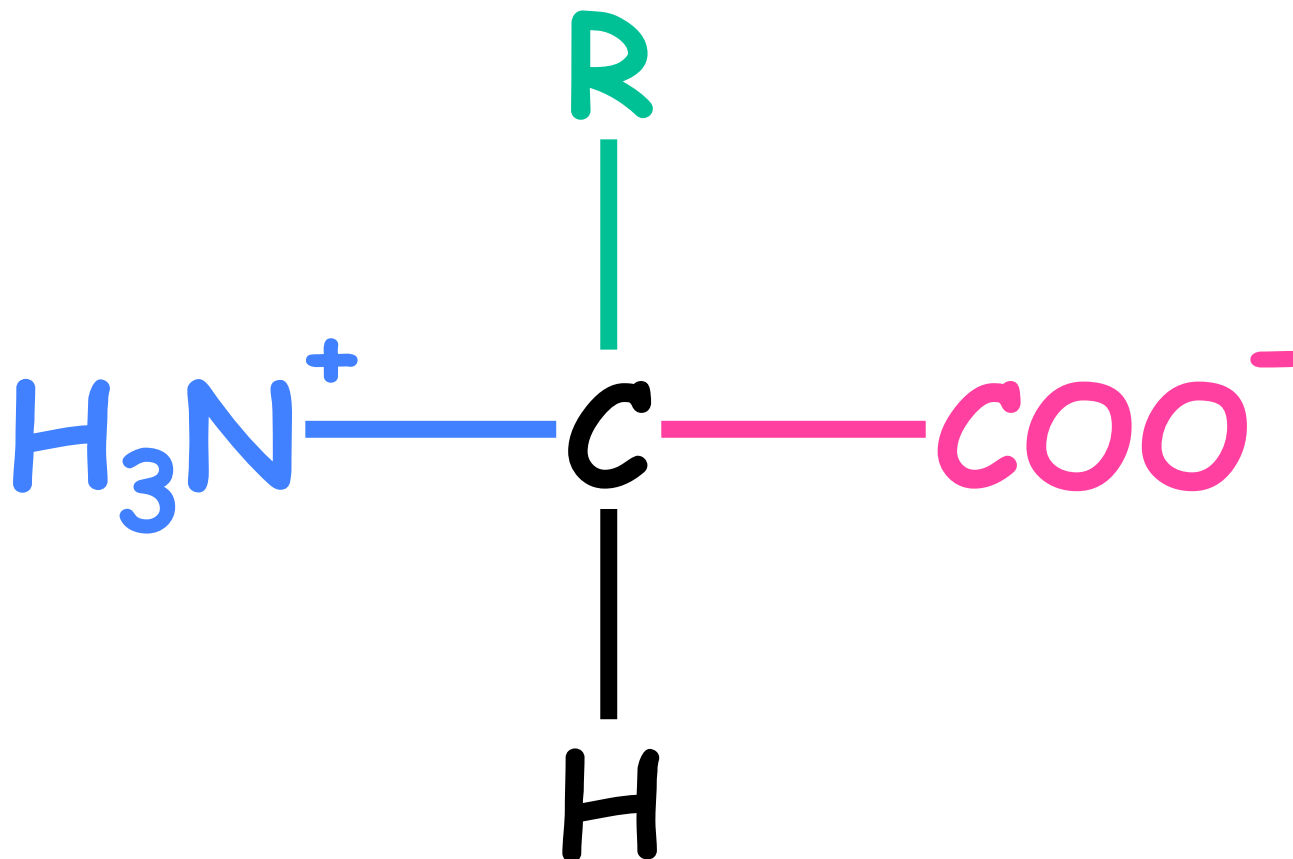
Šovinismus

- Cogniard je příjmení dvou bratrů - francouzských (pařížských) dramatiků:
- Hippolyta Cogniarda (1807-1882) a
- Théodora Cogniarda (1806-1872).
- V jejich hře „La Cocarde Tricolore“ (Tříbarevná kokarda) z roku 1831 vystupuje postava napoleonského vojáka **Chauvina**, jehož postoje jsou typické pro šovinismus.

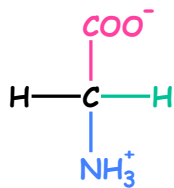
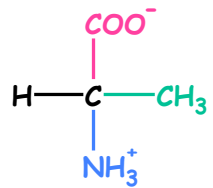
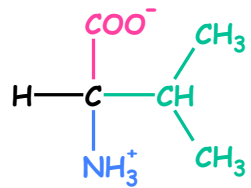
Aminokyseliny, peptidy a proteiny.

Aminokyseliny

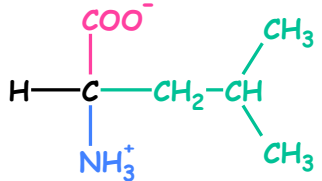
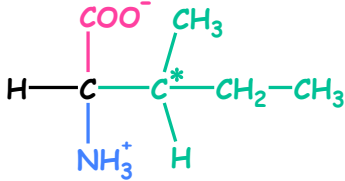
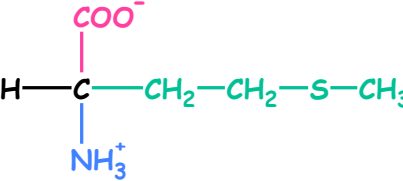
Základní struktura α -aminokyselin. Proteinogenní aminokyseliny (20) dělíme podle charakteru vedlejšího řetězce R do tří skupin:



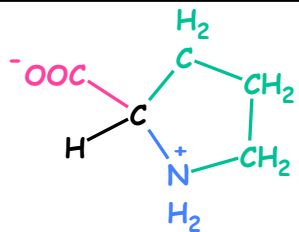
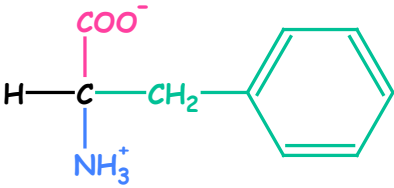
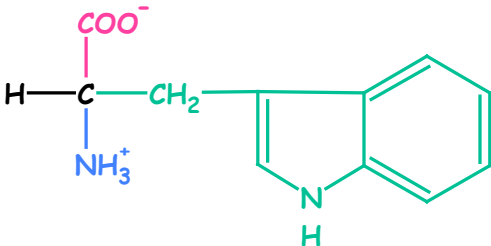
Tab. 1 - 1 Struktura, zkratky, výskyt v proteinech a pK hodnoty ionizovatelných skupin proteinogenních aminokyselin

Aminokyseliny s nepolárním vedlejším řetězcem	Strukturní vzorec a molekulová hmotnost	Průměrný výskyt v proteinech (%)	pK ₁ α-COO ⁻	pK ₂ α-NH ₃ ⁺	pK _R vedlejší řetězec
Glycin Gly G	 Molekulová hmotnost: 75,07	7,2	2,35	9,78	
Alanin Ala A	 Molekulová hmotnost: 89,09	7,8	2,35	9,87	
Valin Val V	 Molekulová hmotnost: 117,15	6,6	2,29	9,74	

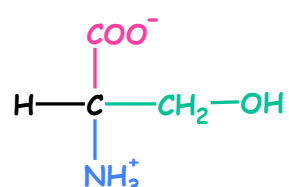
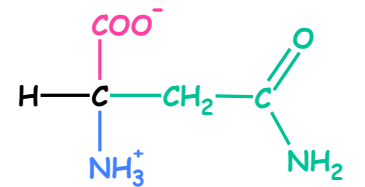
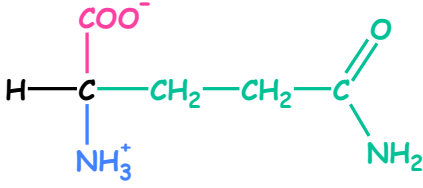
Tab. 1 - 1 Struktura, zkratky, výskyt v proteinech a pK hodnoty ionizovatelných skupin proteinogenních aminokyselin

Aminokyseliny s nepolárním vedlejším řetězcem	Strukturní vzorec a molekulová hmotnost	Průměrný výskyt v proteinech (%)	pK ₁ α -COO ⁻	pK ₂ α -NH ₃ ⁺	pK _R vedlejší řetězec
Leucin Leu L	 Molekulová hmotnost: 131,17	9,1	2,33	9,74	
Isoleucin Ile I	 Molekulová hmotnost: 131,17	5,3	2,32	9,76	
Methionin Met M	 Molekulová hmotnost: 149,21	2,2	2,13	9,28	

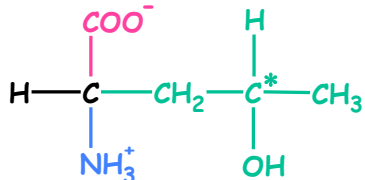
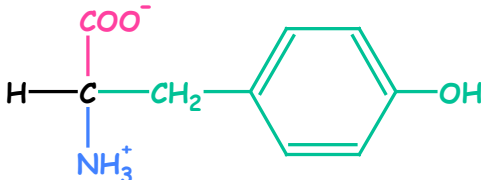
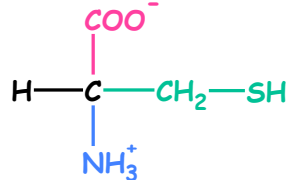
Tab. 1 - 1 Struktura, zkratky, výskyt v proteinech a pK hodnoty ionizovatelných skupin proteinogenních aminokyselin

Aminokyseliny s nepolárním vedleším řetězcem	Strukturní vzorec a molekulová hmotnost	Průměrný výskyt v proteinech (%)	pK ₁ $\alpha\text{-COO}^-$	pK ₂ $\alpha\text{-NH}_3^+$	pK _R vedlejší řetězec
Prolin Pro P	 Molekulová hmotnost: 115,13	5,2	1,95	10,64	
Fenylalanin Phe F	 Molekulová hmotnost: 165,19	3,9	2,20	9,31	
Tryptofan Trp W	 Molekulová hmotnost: 204,22	1,4	2,46	9,41	

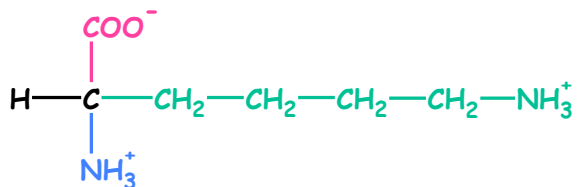
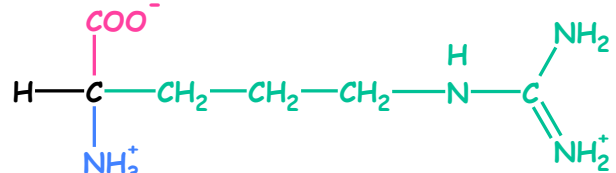
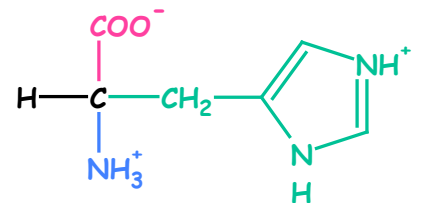
Tab. 1 - 1 Struktura, zkratky, výskyt v proteinech a pK hodnoty ionizovatelných skupin proteinogenních aminokyselin

Aminokyseliny s polárním vedlejším řetězcem bez náboje	Strukturní vzorec a molekulová hmotnost	Průměrný výskyt v proteinech (%)	pK ₁ α -COO ⁻	pK ₂ α -NH ₃ ⁺	pK _R vedlejší řetězec
Serin Ser S	 Molekulová hmotnost: 105,09	6,8	2,19	9,21	
Asparagin Asn N	 Molekulová hmotnost: 132,12	4,3	2,14	8,72	
Glutamin Gln Q	 Molekulová hmotnost: 146,15	4,3	2,17	9,13	

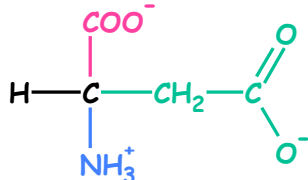
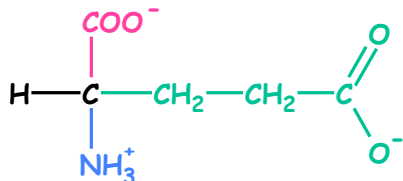
Tab. 1 – 1 Struktura, zkratky, výskyt v proteinech a pK hodnoty ionizovatelných skupin proteinogenních aminokyselin

Aminokyseliny s polárním vedlejším řetězcem bez náboje	Strukturní vzorec a molekulová hmotnost	Průměrný výskyt v proteinech (%)	pK ₁ α -COO ⁻	pK ₂ α -NH ₃ ⁺	pK _R vedlejší řetězec
Threonin Thr T	 Molekulová hmotnost: 133,15	5,9	2,09	9,10	
Tyrosin Tyr Y	 Molekulová hmotnost: 197,23	3,2	2,20	9,21	10,46 (fenol)
Cystein Cys C	 Molekulová hmotnost: 121,16	1,9	1,92	10,70	8,37 (sulfhydryl)

Tab. 1 - 1 Struktura, zkratky, výskyt v proteinech a pK hodnoty ionizovatelných skupin proteinogenních aminokyselin

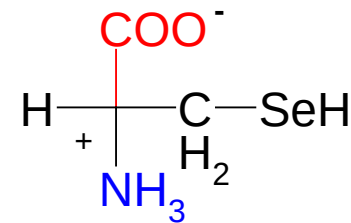
Aminokyseliny s polárním vedlejším řetězcem s nábojem (bazické)	Strukturní vzorec a molekulová hmotnost	Průměrný výskyt v proteinech (%)	pK ₁ $\alpha\text{-COO}^-$	pK ₂ $\alpha\text{-NH}_3^+$	pK _R vedlejší řetězec
Lysin Lys K	 Molekulová hmotnost: 147,19	5,9	2,16	9,06	10,54 ($\epsilon\text{-NH}_3^+$)
Arginin Arg R	 Molekulová hmotnost: 175,21	5,1	1,82	8,99	12,48 (guanidium)
Histidin His H	 Molekulová hmotnost: 155,10	2,3	1,80	9,33	6,04 (imidazol)

Tab. 1 - 1 Struktura, zkratky, výskyt v proteinech a pK hodnoty ionizovatelných skupin proteinogenních aminokyselin

Aminokyseliny s polárním vedlejším řetězcem s nábojem (kyselé)	Strukturní vzorec a molekulová hmotnost	Průměrný výskyt v proteinech (%)	pK ₁ α -COO ⁻	pK ₂ α -NH ₃ ⁺	pK _R vedlejší řetězec
Asparagová kyselina Asp D	 Molekulová hmotnost: 133,10	5,3	1,99	9,90	3,90 (β-COO ⁻)
Glutamová kyselina Glu E	 Molekulová hmotnost: 147,13	6,3	2,10	9,47	4,07 (γ-COO ⁻)

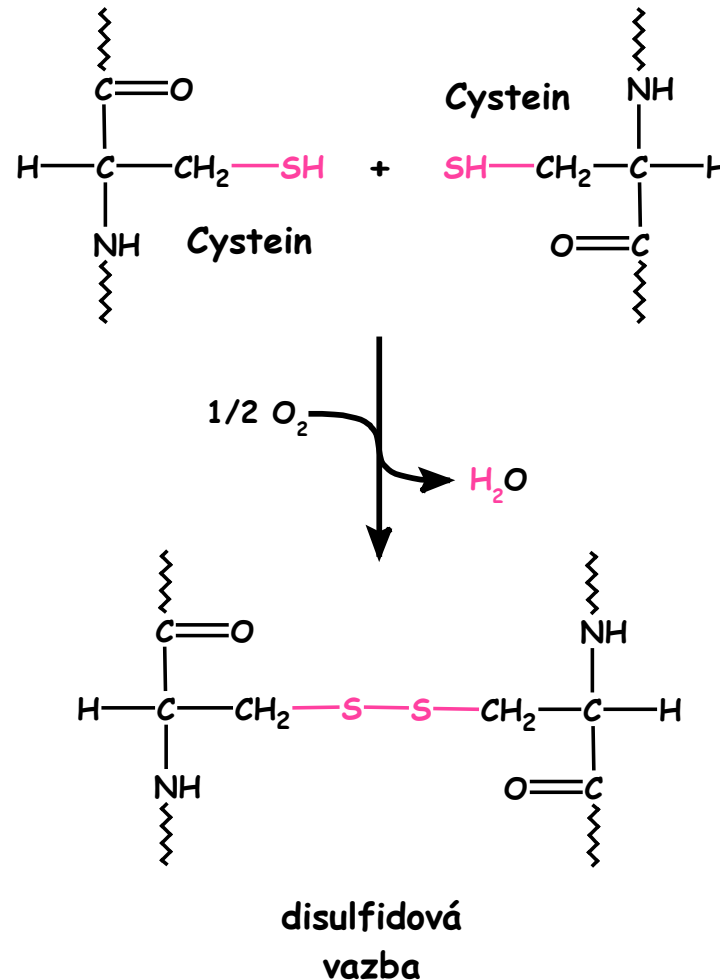
Selenocystein, zkratky **Sec**, U. UGA kodon, normálně **STOP**.
Součástí například: glutathionperoxidas, tetraiodothyronine 5,-deiodinas, thioredoxinreduktas, formátdehydrogenas, glycinreduktas, hydrogenas).

- Sec** má nižší hodnotu pK a vyšší redukční potenciál - součást selenoproteinů - antioxidantů (na rozdíl od Cys).
- Pro zařazení do řetězce peptidu musí UGA kodon předcházet SECIS element - asi 60 nukleotidů.
(*selenocysteine insertion sequence*).

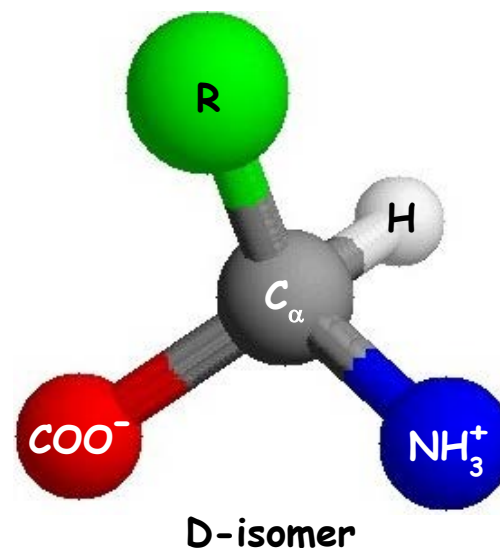
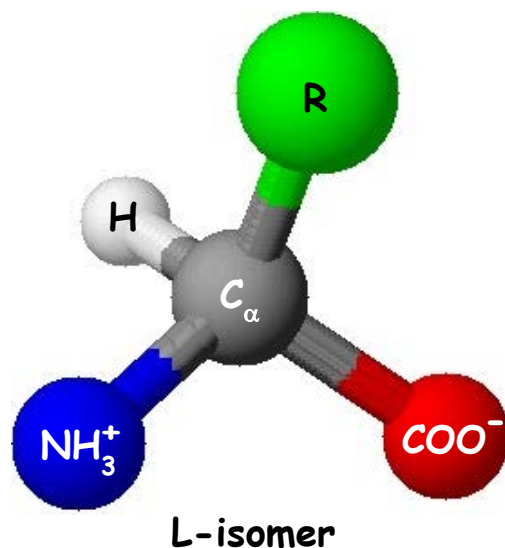


0 1
Sequence conservation

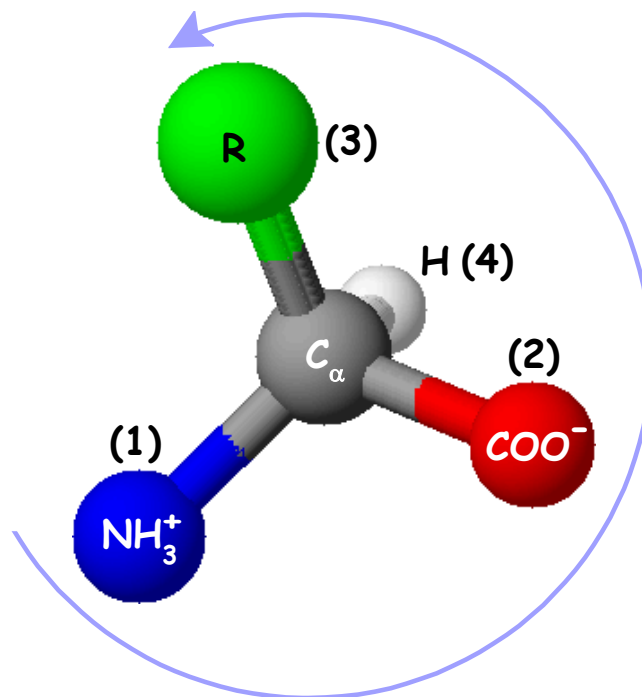
Tvorba disulfidových vazeb oxidací SH skupin vedlejších řetězců Cys.



Třírozměrná struktura aminokyseliny s chirálním α -uhlíkem.
L a D izomer. Předmět a jeho obraz v zrcadle.
Proteinogenní aminokyseliny mají konfiguraci L.



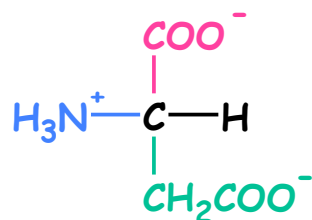
Cahn-Ingold-Prelogův model absolutní konfigurace. Substituenty na α -uhlíku se řadí podle klesající priority. Směr šipky proti směru hodinových ručiček značí *S* konfiguraci (sinister = doleva)



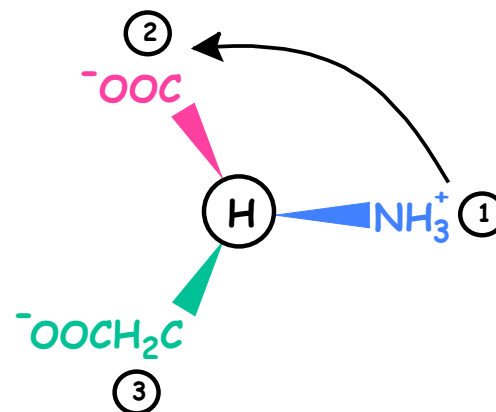
Skupiny dle klesající priority pro Cahn-Ingold-Prelogův model:

- SH, OR, OH, NH-COCH₃, NH₂, COOR
- COOH, CHO, CH₂OH, C₆H₅, CH₃, ³H, →
²H, H

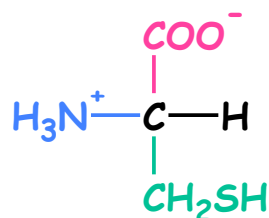
Absolutní konfigurace L-Asp a L-Cys:



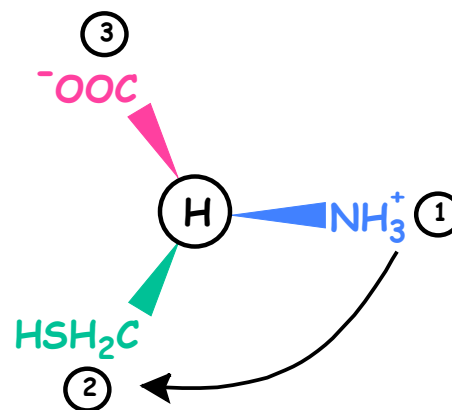
L-Aspartát



(S)-Aspartát



L-Cystein



(R)-Cystein

Absolutní konfigurace proteinogenních L-aminokyselin:

- Gly (G) není chirální
- Cys (C) je v absolutní konfiguraci *R*
- Ile (I) a Thr (T) mají dvě chirální centra.
- L-Ile (2*S*,3*S*) ..., existují dva enantiomery diastereoizomerní k alloisoleucinu (2*R*,3*S*)
- L-Thr (2*S*,3*R*)..., existují dva enantiomery, které jsou diastereoizomerní k allothreoninu (2*R*,3*R*).
- Všechny ostatní L-aminokyseliny jsou *S*!!

Optická otáčivost aminokyselin

Dalším důsledkem chiralit aminokyselin je vlastnost jejich roztoků otáčet rovinu polarizovaného světla (kmitá v jedné rovině).

Otočení -

ve směru hodinových ručiček: Značíme (d nebo +),

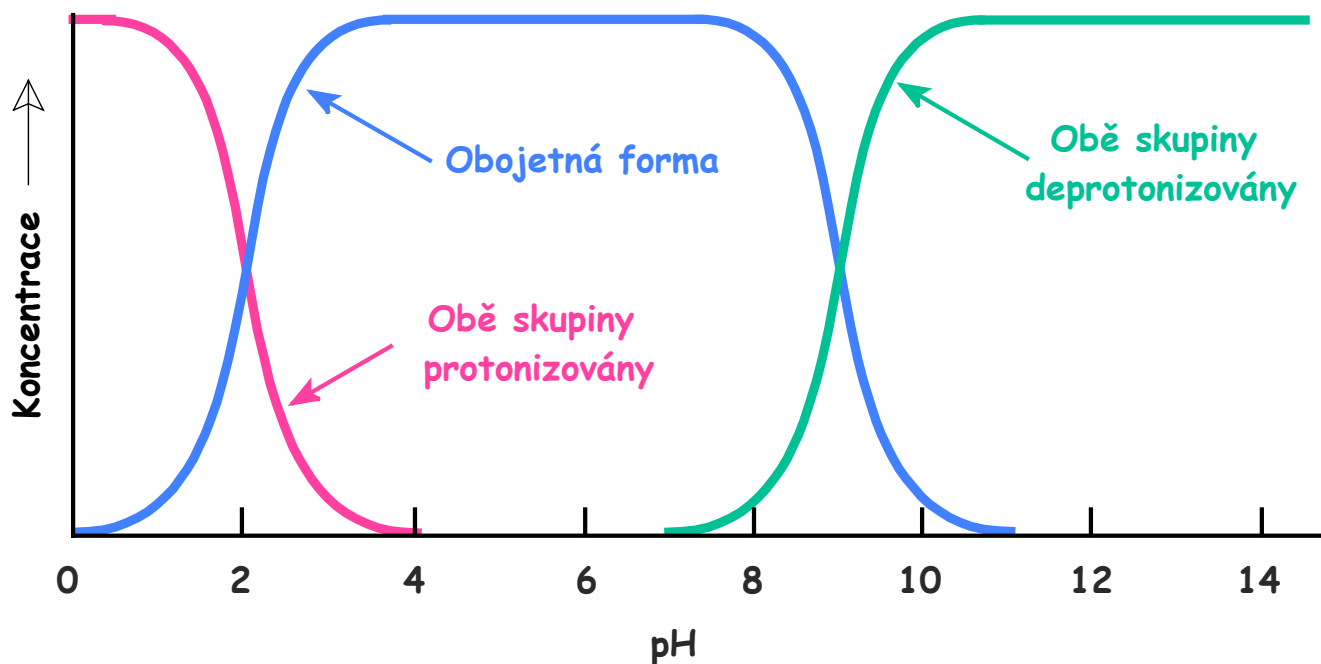
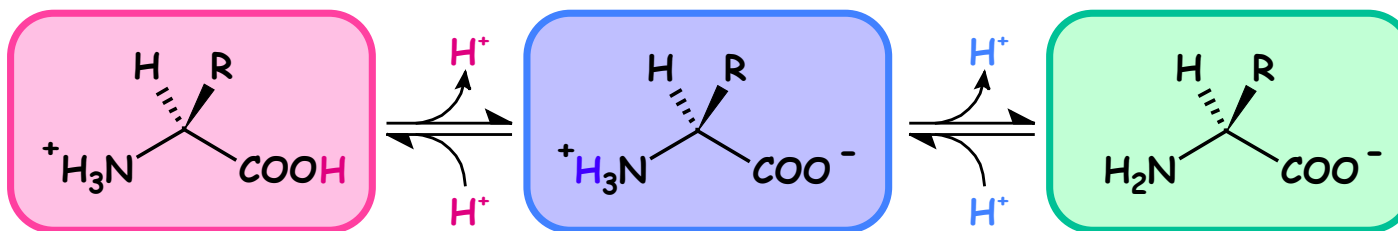
proti směru hodinových ručiček: Značíme (l nebo -)

Nezaměňovat l a L , d a D !!! Některé L-aminokyseliny otáčí doprava (např. L-Leu) !! Měří se polarimetrem.

Úhel otočení závisí na:

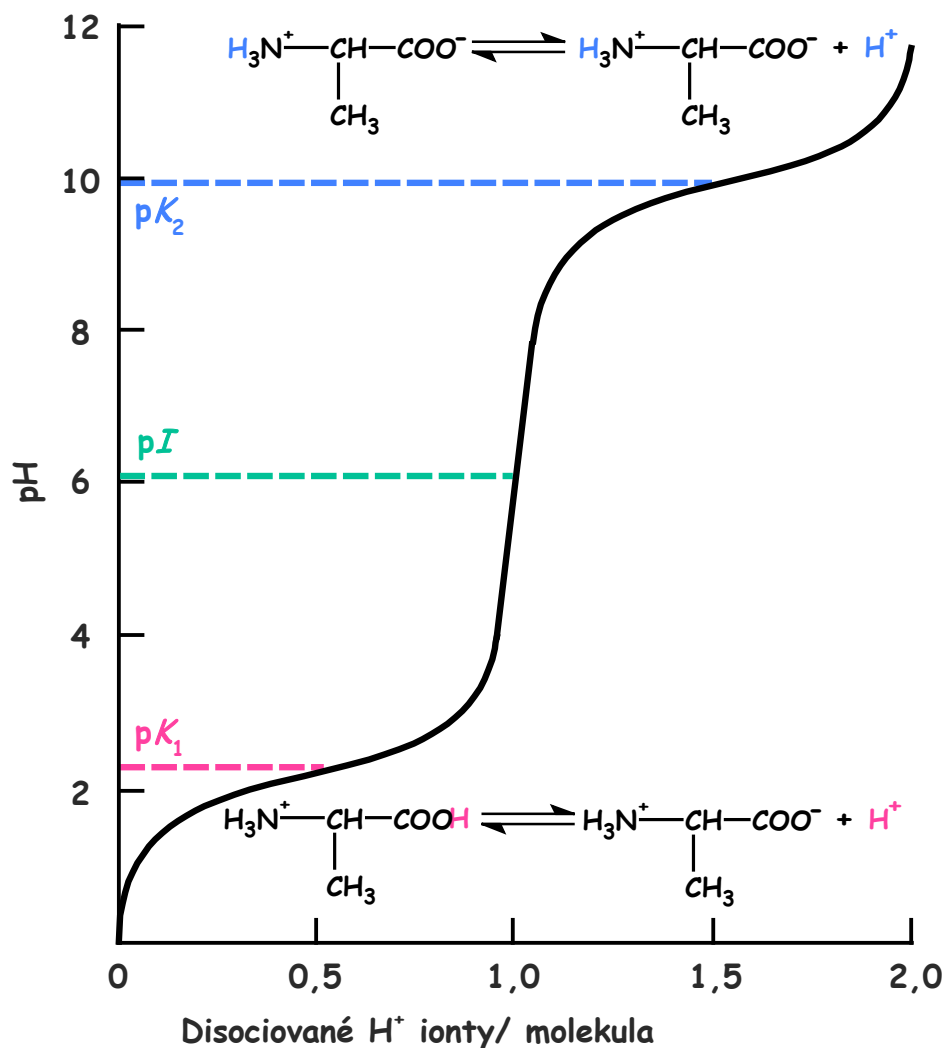
délce optické dráhy (1 dm), vlnové délce polarizovaného světla (žlutá D čára sodíku 589,3 nm), koncentraci roztoku a teplotě.

Ionizační stavy aminokyselin jako funkce pH:

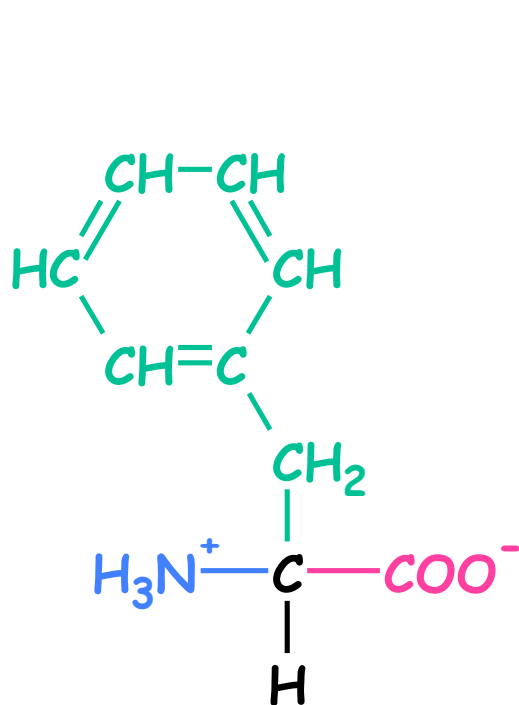


Určení pK_1 , pK_2 a pI alaninu.

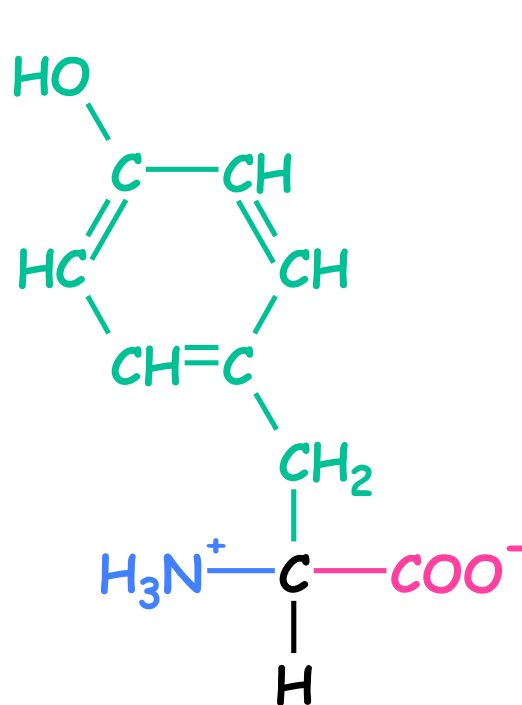
$pI = pK_1 + pK_2 / 2$ (izoelektrický bod, $pI = 6, 11$)



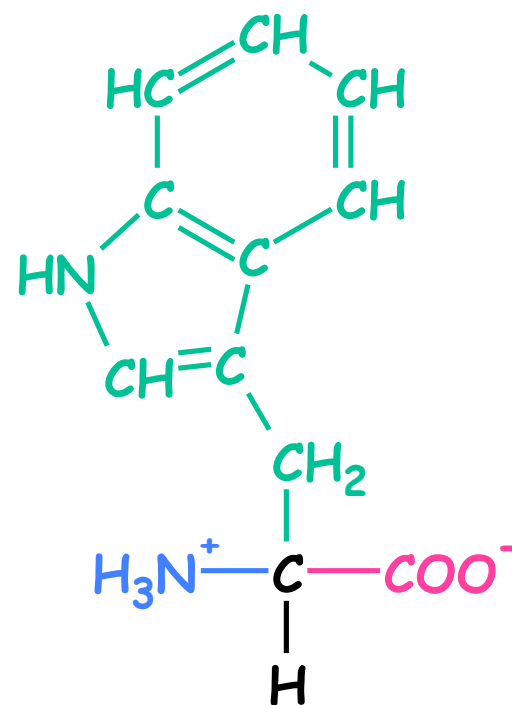
Aromatické aminokyseliny absorbují světlo v UV oblasti:



Fenylalanin
(Phe, F)

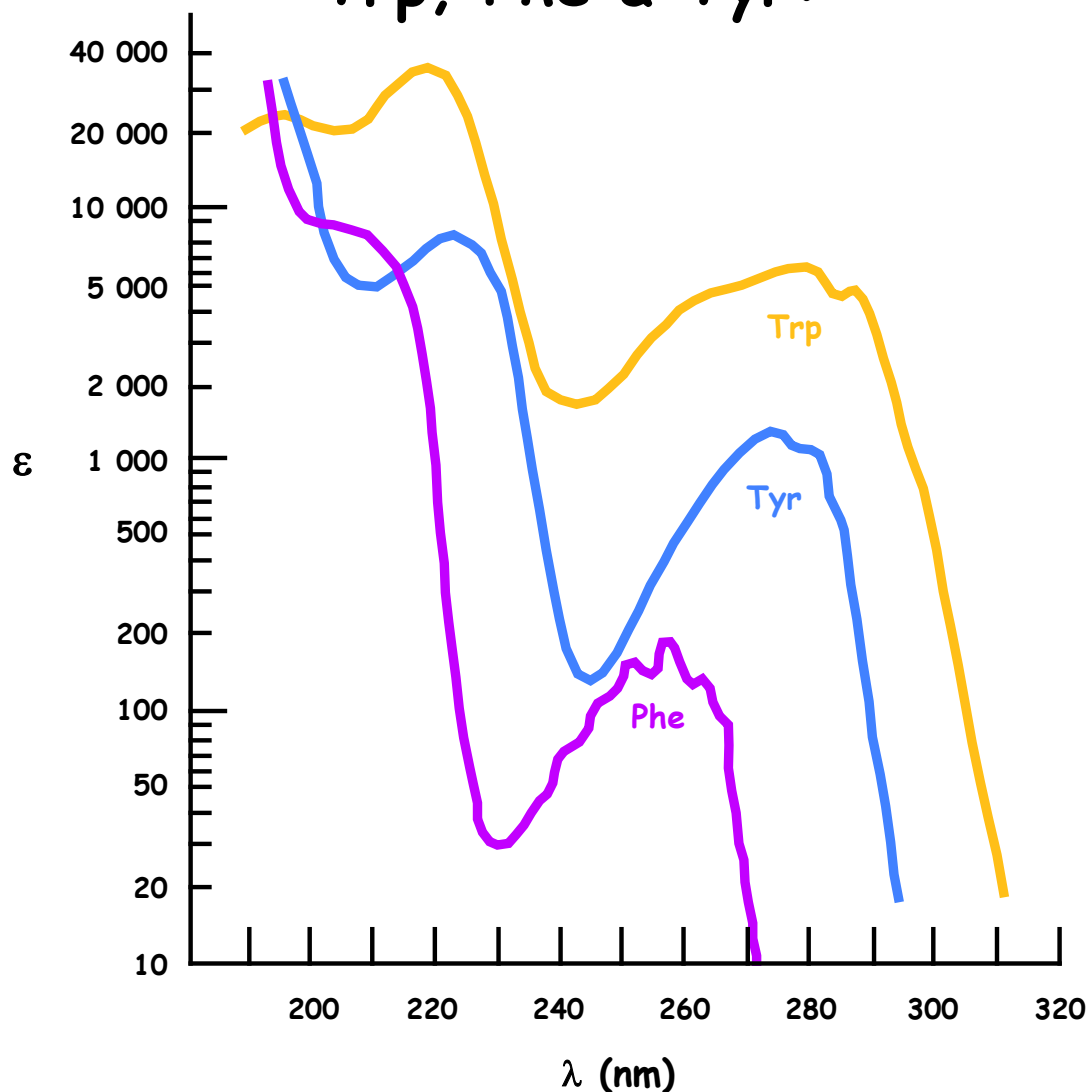


Tyrosin
(Tyr, Y)

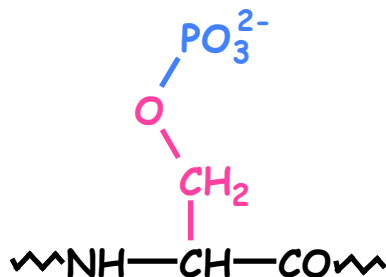


Tryptofan
(Trp, W)

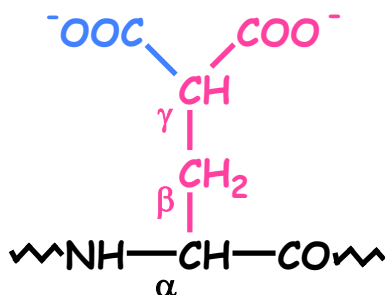
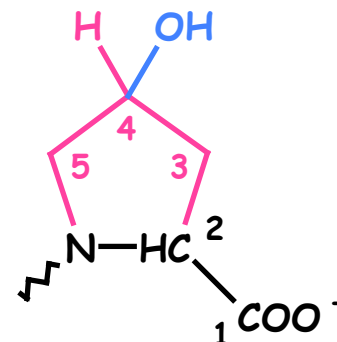
Absorpční spektra a molární absorpční koeficienty Trp, Phe a Tyr:



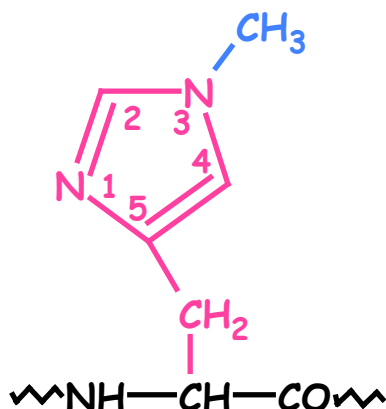
Posttranslačně modifikované aminokyseliny:



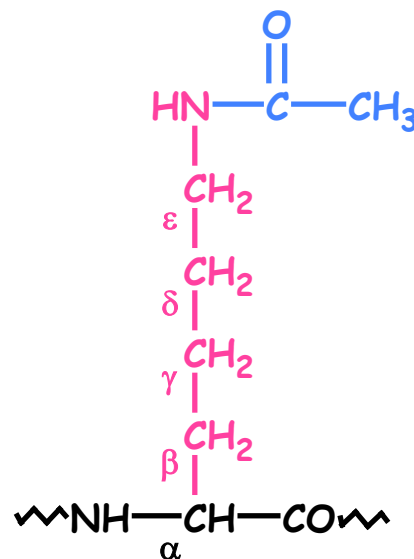
O-Fosfoserin


 γ -Karboxyglutamát


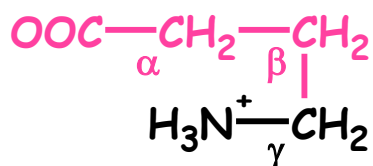
4-Hydroxyprolin



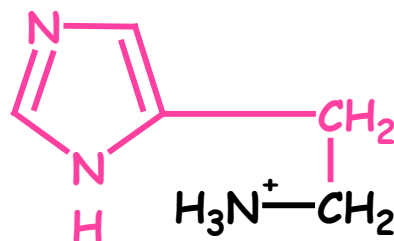
3-Methylhistidin


 ϵ -N-Acetyllysin

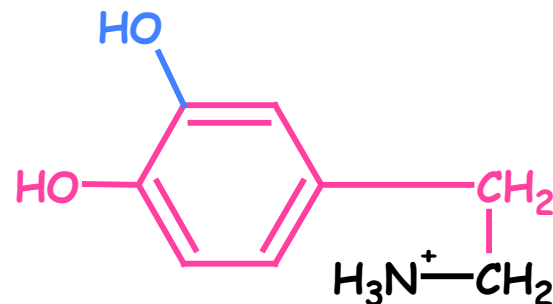
Některé fyziologicky významné sloučeniny odvozené od aminokyselin:



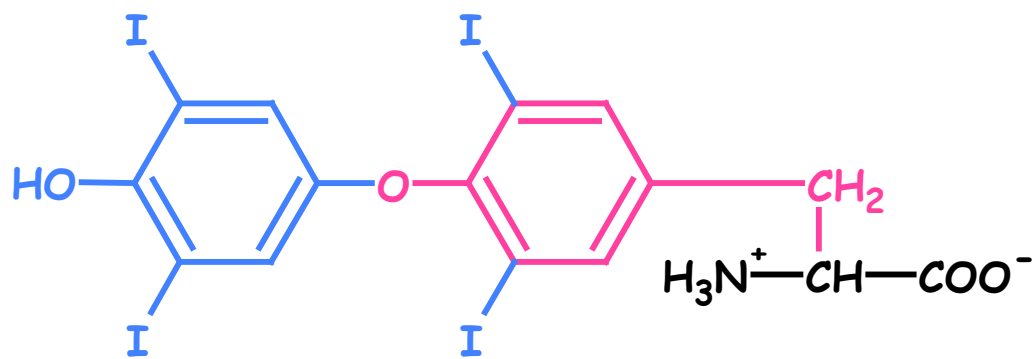
γ -Aminomáselná kyselina
(GABA)



Histamin

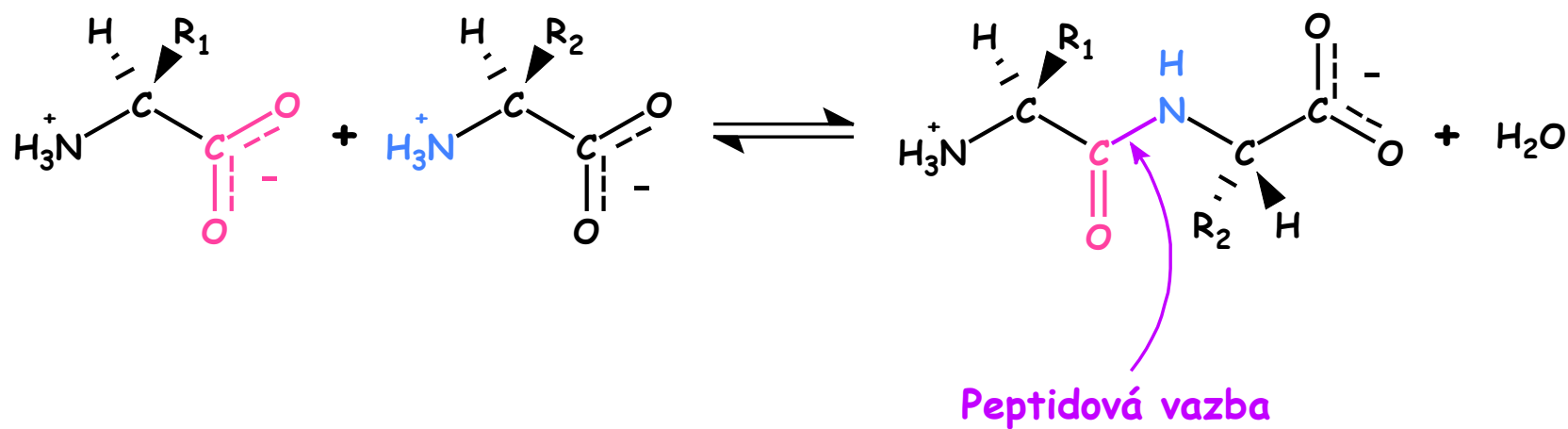


Dopamin



Thyroxin

Peptidy



Peptidová vazba mezi karboxylem jedné aminokyseliny α aminoskupinou další aminokyseliny. Peptidy do $M_r = 5500$, resp. 5, 5 kDa, výše proteiny.

V biochemii se obvykle M_r udává v jednotkách označených jako dalton = hmotnosti vodíku, zkratka Da po Johnu Daltonovi

Proteiny 5 500 až 220 000 daltonů, nebo 5, 5 kDa až 220 kDa.

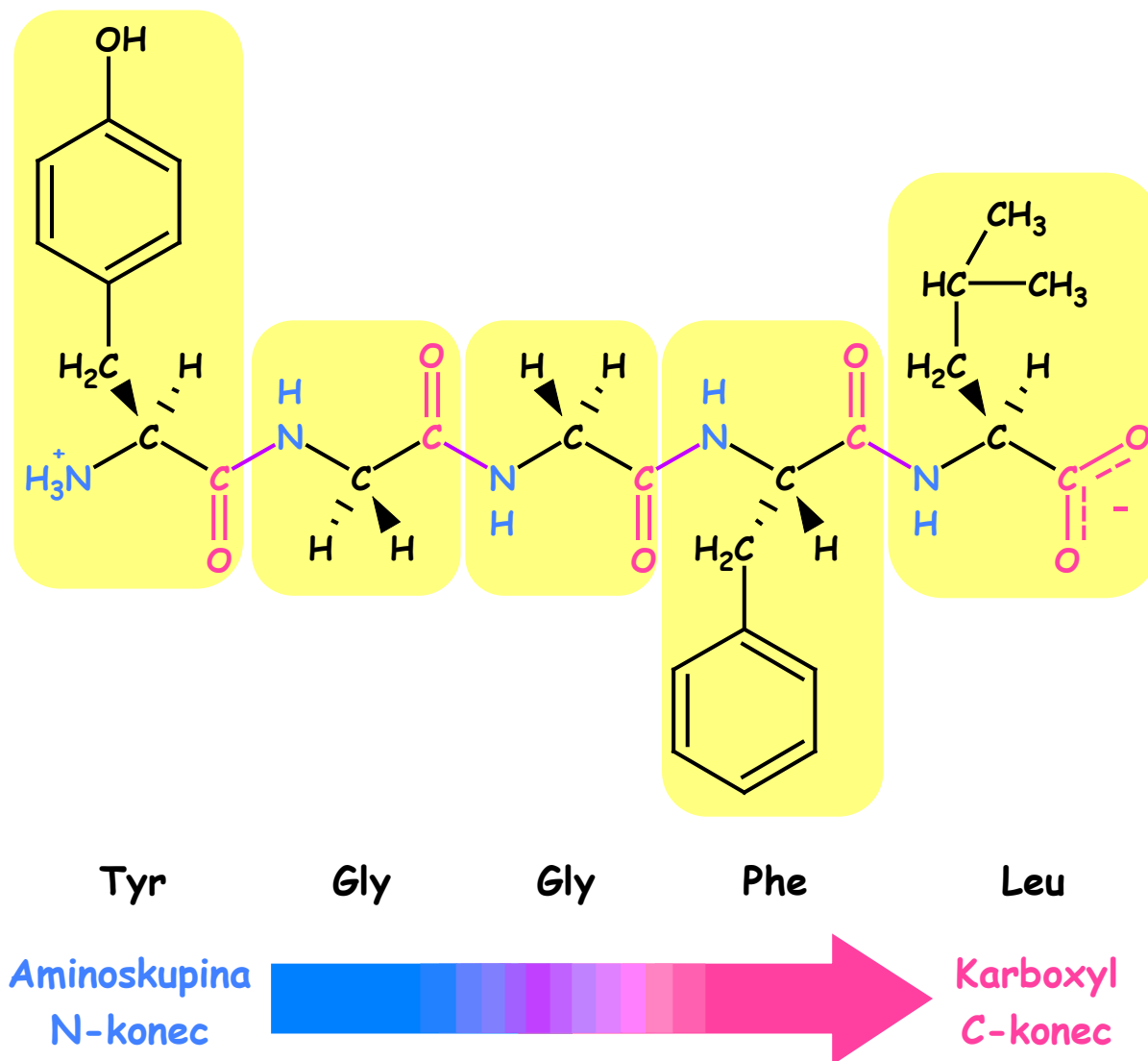
Průměrná molekulová hmotnost aminokyselin 110 Da

- **John Dalton FRS** (Fellow of the Royal Society) (6. September 1766 – 27. July 1844) was an English chemist, meteorologist and physicist. He is best known for his pioneering work in the development of modern atomic theory, and his research into colour blindness (sometimes referred to as Daltonism, in his honour).

Jednotka molekulové hmotnosti v biochemii

- Da, zkratka jména Dalton, jednotka molekulové hmotnosti, jedna dvanáctina atomové hmotnosti uhlíku ^{12}C , $1 \text{ Da} = 1,66 \cdot 10^{-27} \text{ kg}$. Voda tedy má molekulovou hmotnost 18 Da (molární hmotnost 18 g/mol a relativní molekulovou hmotnost 18). Jednotka Da (často se užívají násobky kDa, kilodalton); ač vůbec nezapadá do systému jednotek SI, je běžně používána pro vyjádření molekulové hmotnosti biomakromolekul.

Pentapeptid TyrGlyGlyPheLeu s označením N-konce Tyr a C konce Leu:



Názvosloví peptidů

Dvě aminokyseliny-dipeptid, tři - tripeptid.

1. Acylační - od N konce

AGK = alanylglycyllysin

2. Triviální - např. insulin, glukagon...

V peptidech mohou být i neproteinogenní aminokyseliny a konfiguračně D.

- Peptidy mohou být lineární nebo cyklické (cyklopeptidy).

Leu - enkefalin - opioidní peptid

Sekvence pentapeptidu od N-konce:

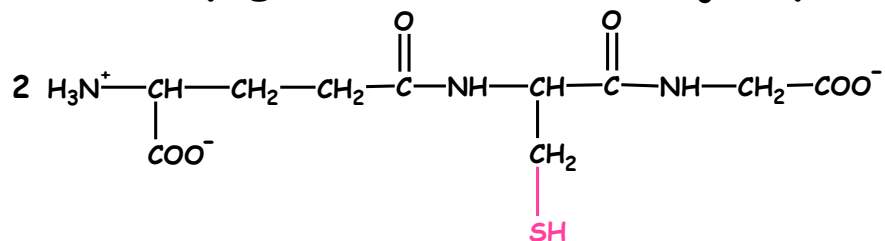
Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu

YGGFL

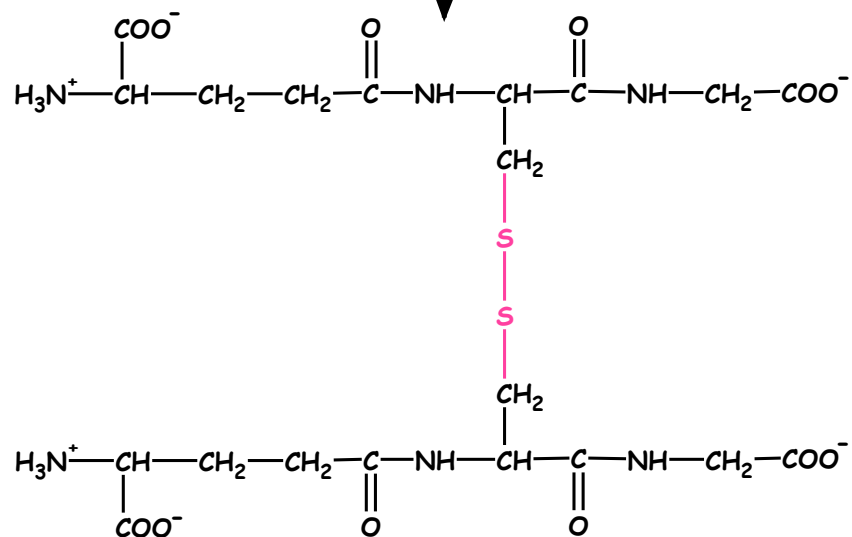
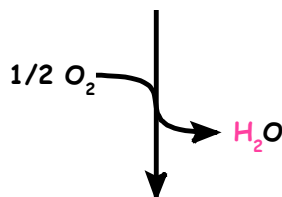
Pentapeptid reverzní:

LFGGY je neaktivní jako opioidní peptid - vnímání bolesti.

Glutathion je tripeptid účastnící se oxidačně redukčních reakcí v metabolismu. Redukovaný glutathion odstraňuje kyslíkaté radikály (ROS)

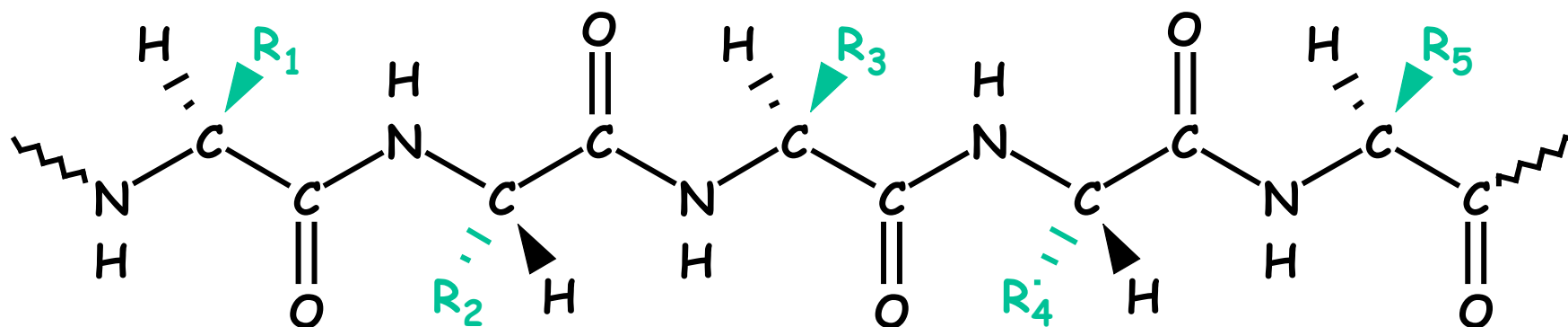


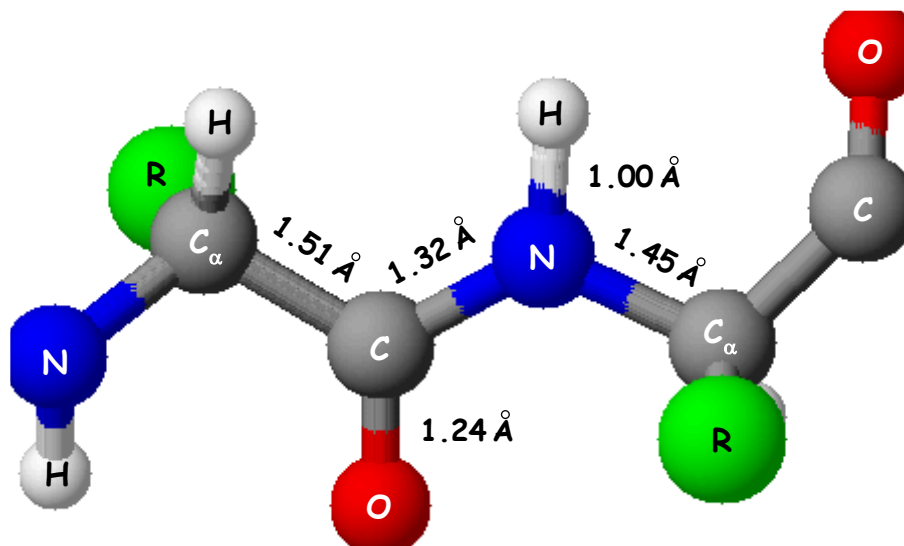
Glutathion (GSH)
(γ-Glutamylcysteinylglycine)



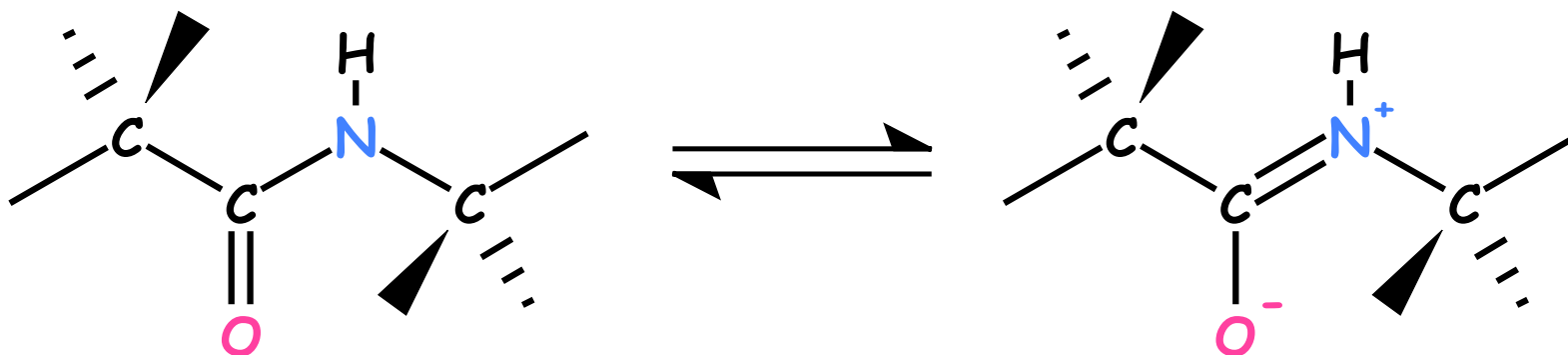
Glutathiondisulfid (GSSG)

Peptidový řetězec s vyznačením umístění vedlejších řetězců aminokyselin



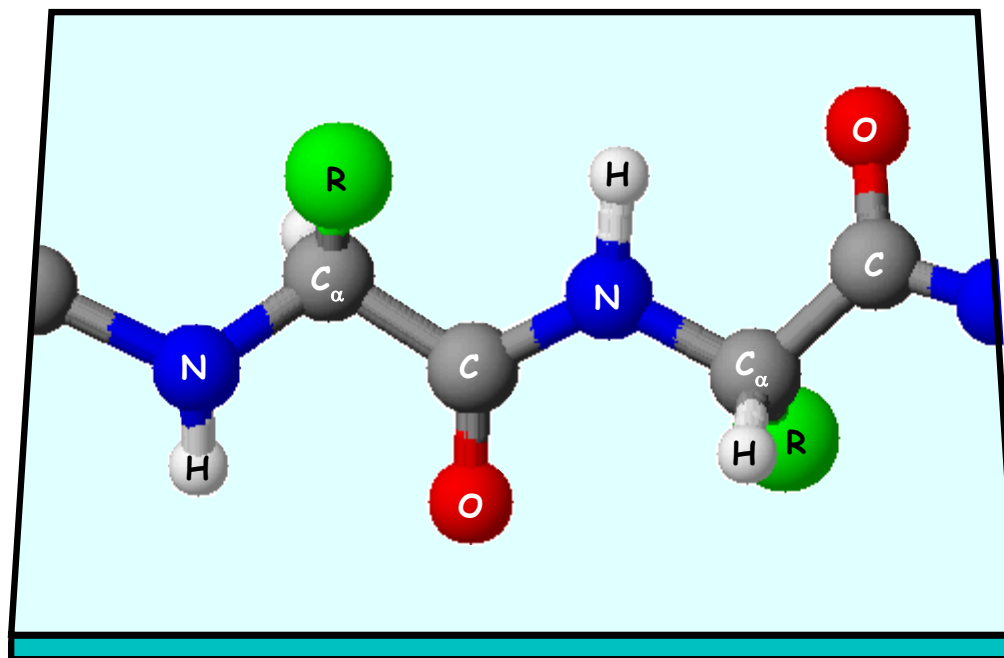


Rezonanční struktury peptidové vazby, které jsou příčnou její planarity.

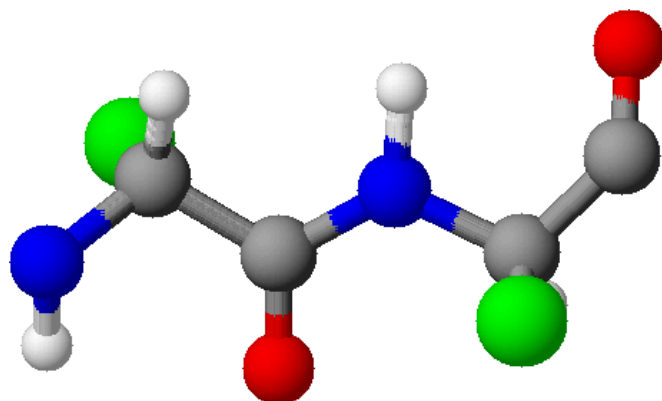


Rezonanční struktury pepetidové vazby

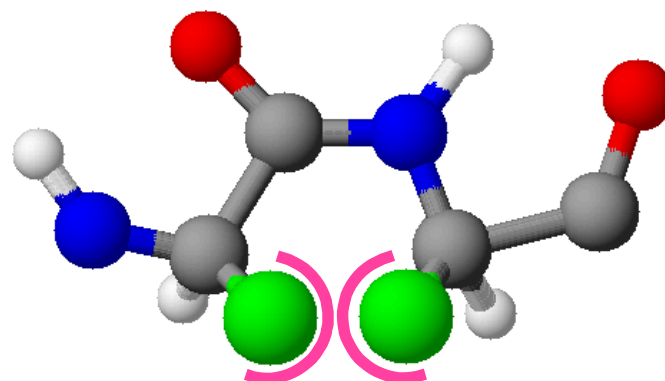
Peptidové vazby leží v rovině. Vedlejší řetězce R (zelené) směřují nad nebo pod roviny peptidových vazeb.



Stereochemie peptidové vazby. Forma trans vysoce převažuje nad cis. Forma cis je stericky nevýhodná.

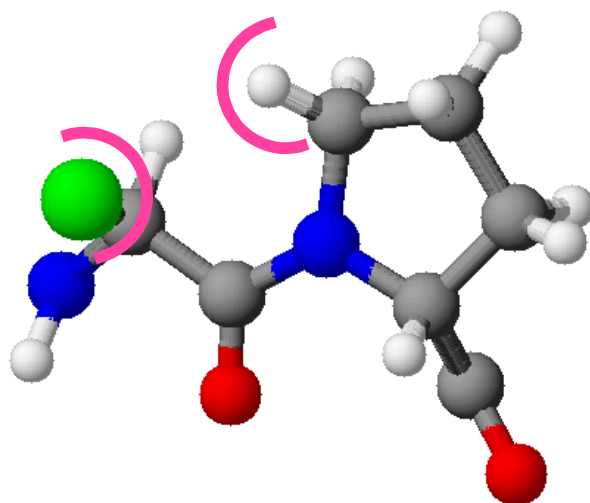


Trans

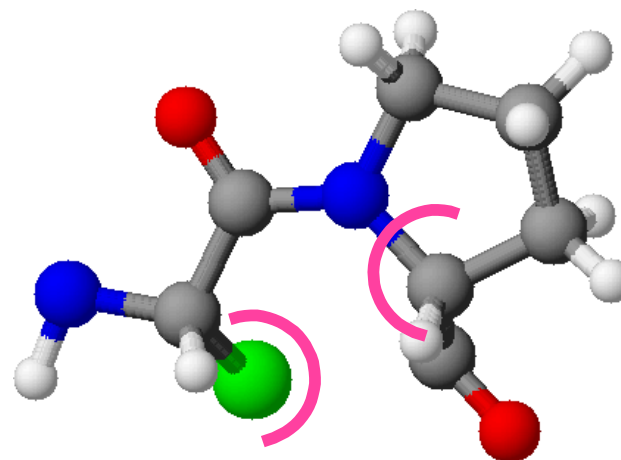


Cis

Prolin v peptidové vazbě může existovat v obou formách
- cis i trans. Obě jsou prostorově shodně nevýhodné.



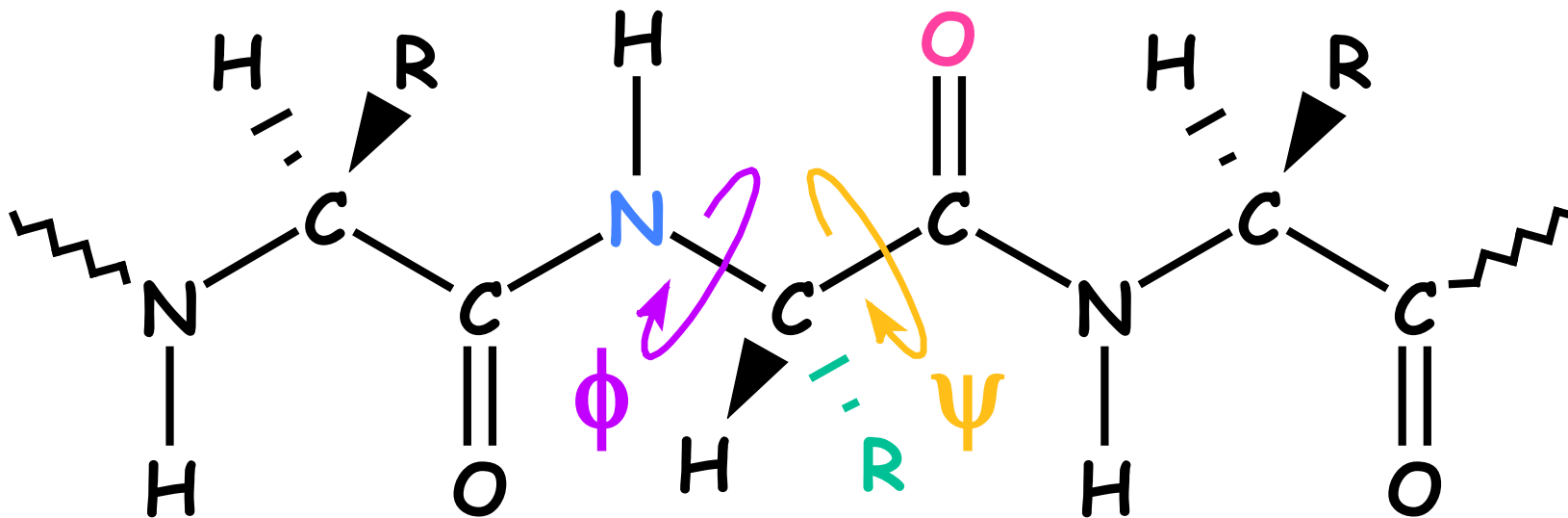
Trans



Cis

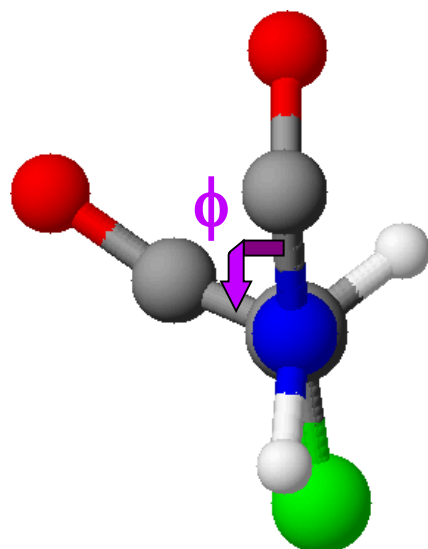
Rotační (torzní, dihedrální = úhly mezi rovinami !!) úhly kolem vazeb v polypeptidu:

ϕ (fí) je torzní úhel kolem vazby mezi dusíkem a α -uhlíkem,
 ψ (psí) je torzní úhel mezi α -uhlíkem a uhlíkem karbonylu

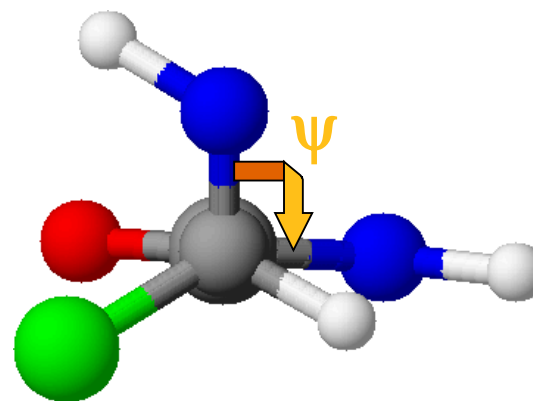


Jak se měří torzní úhly ?

Pohled od dusíku k α -uhlíku (ϕ), pohled od karbonylového uhlíku k α -uhlíku (ψ)

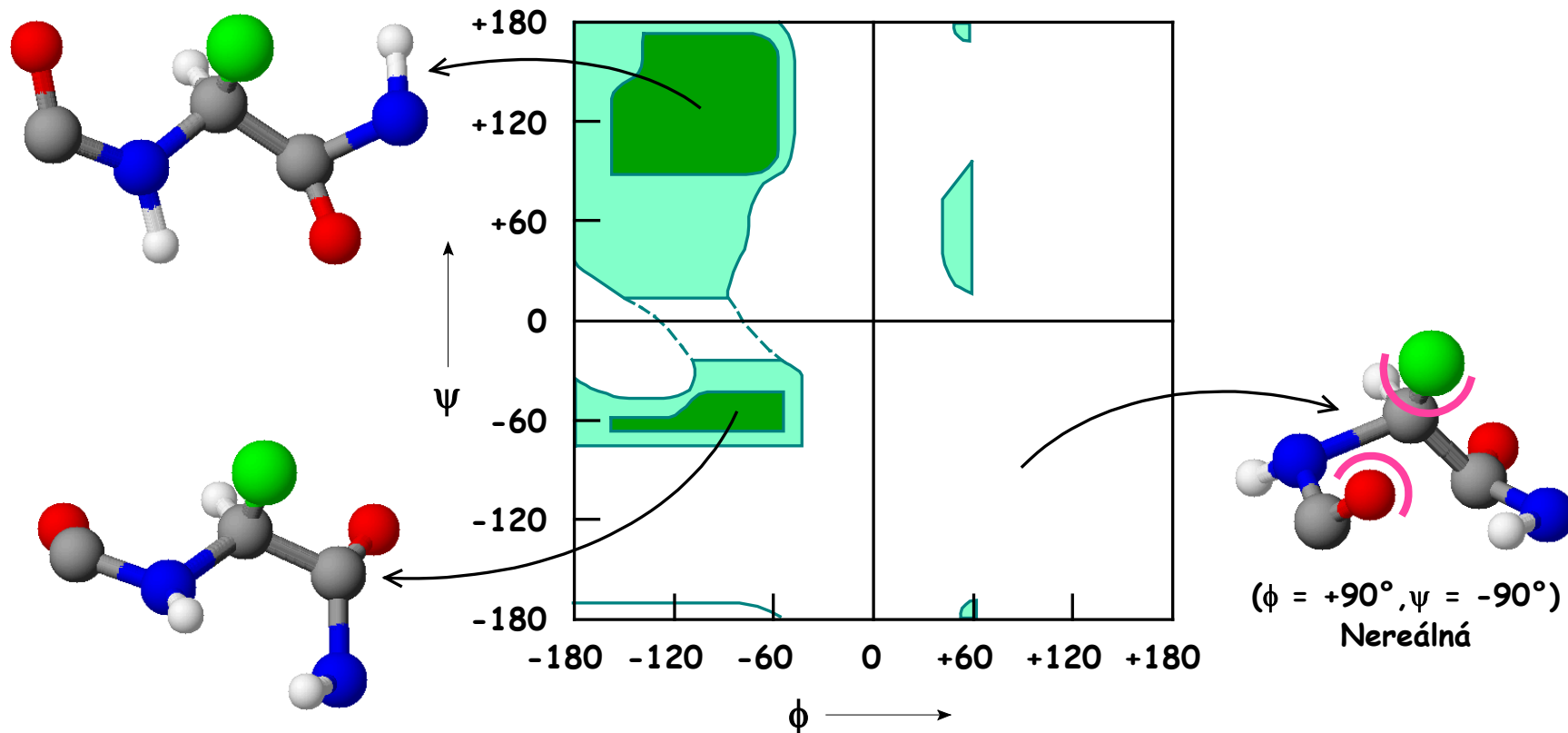


$$\phi = +80^\circ$$



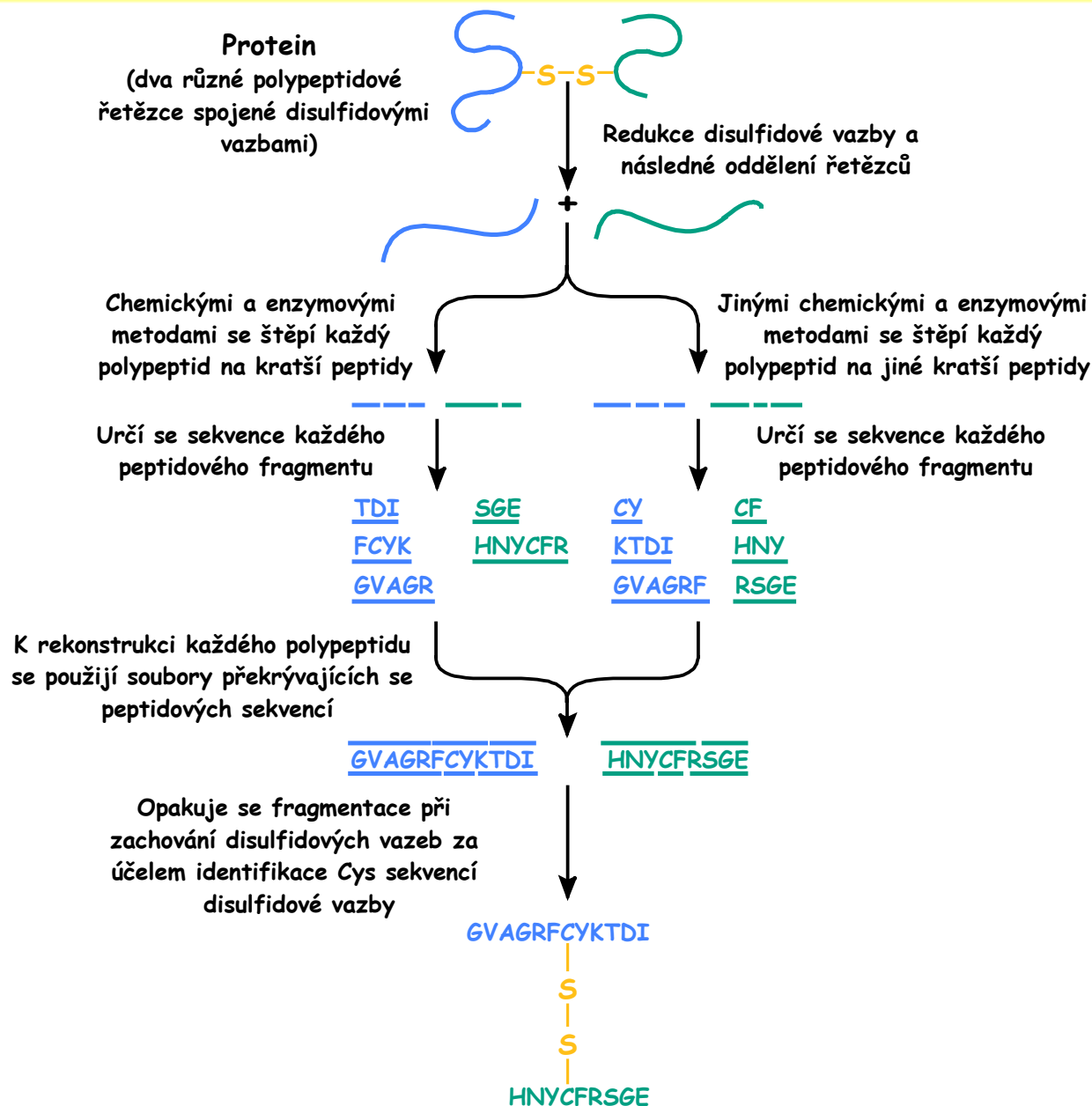
$$\psi = -85^\circ$$

Ramachandranův diagram znázorňující hodnoty torzních úhlů (ϕ) a (ψ). Tmavě zelená pole jsou přípustné konformace. Struktura vpravo dole je nereálná ze sterických důvodů.

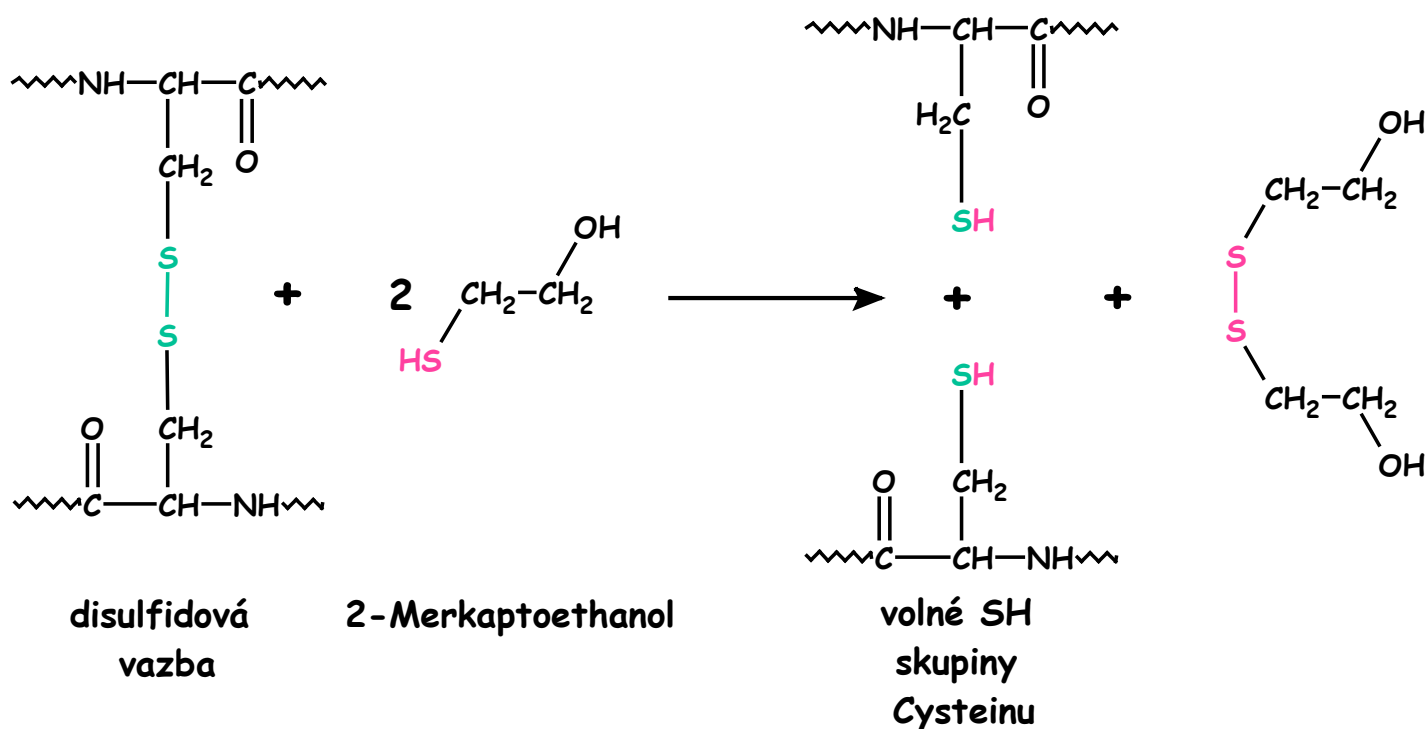


Stanovení primární struktury – sekvence peptidů (sekvencování)

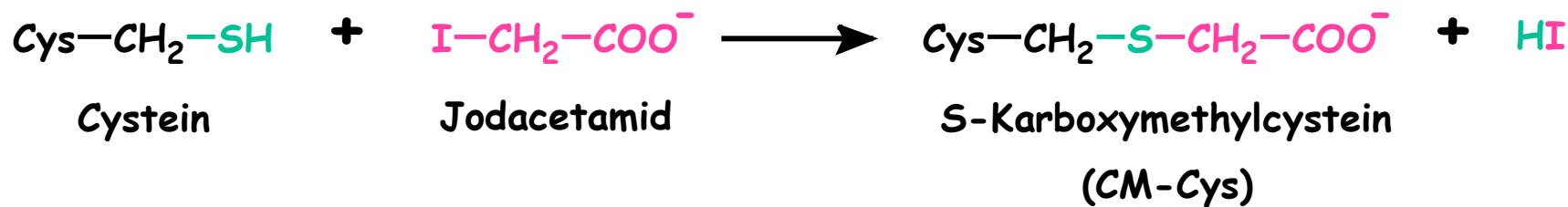
- Primární strukturou peptidů rozumíme pořadí aminokyselin v peptidovém řetězci.
- Čteme od N – konce.
- Taktika sekvencování (lineární peptidy):
 - A) Oddělení řetězců – např. odstranění disulfidových vazeb.
 - B) Štěpení peptidů chemickými a enzymovými metodami na kratší řetězce a jejich rozdělení.
 - C) Vlastní sekvencování.
 - D) Rekonstrukce peptidu z přesahujících fragmentů.



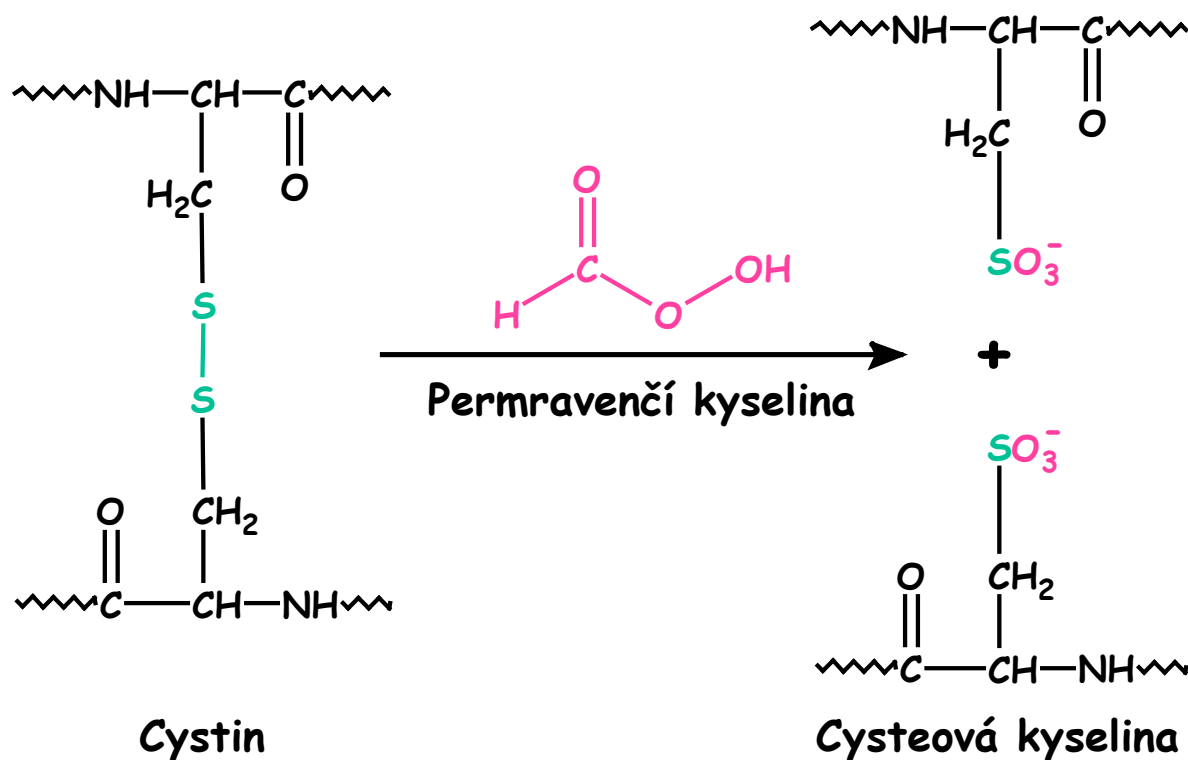
Redukce disulfidové vazby mezi polypeptidovými řetězci nebo uvnitř řetězce 2-merkaptethanolem:



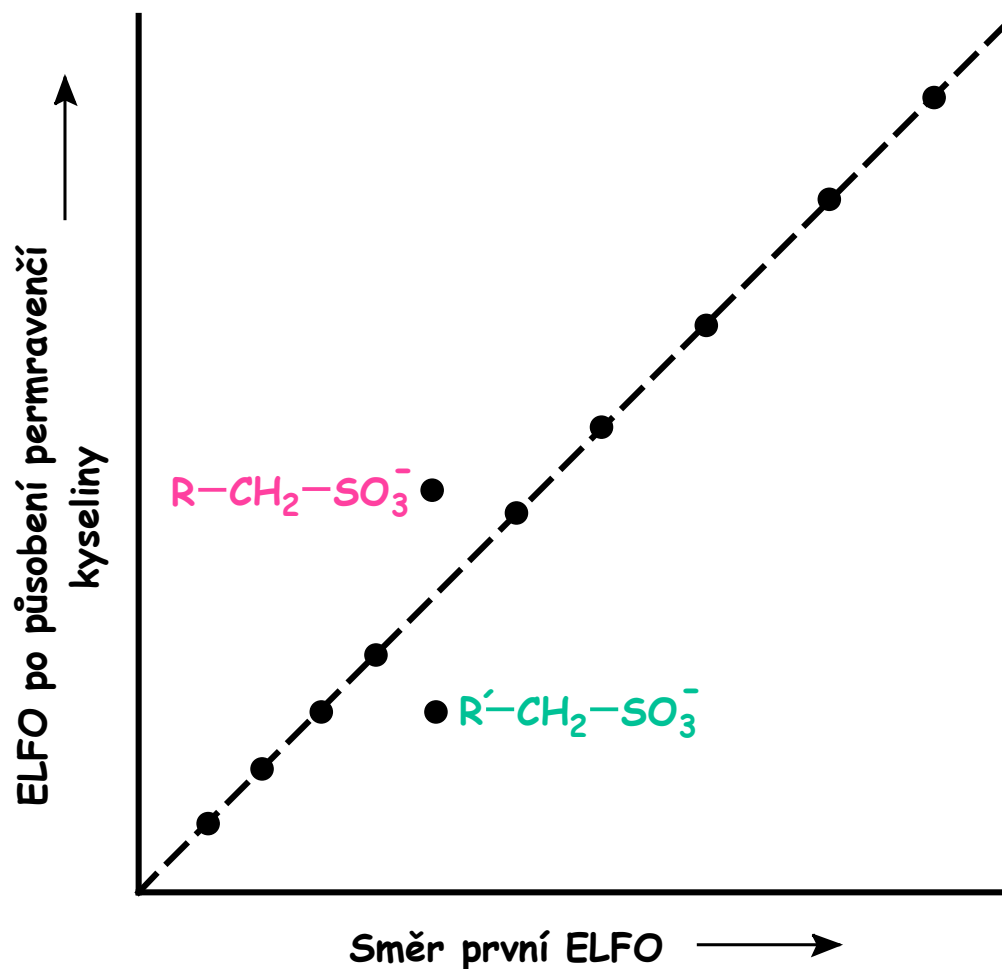
Reakcí jodacetátu s volnou SH skupinou
na polypeptidovém řetězci se zabrání její reoxidaci:



Pro stanovení přesné pozice disulfidové vazby se používá „diagonální elektroforéza“ při které se oxidaže disulfidová vazba permravenčí kyselinou:



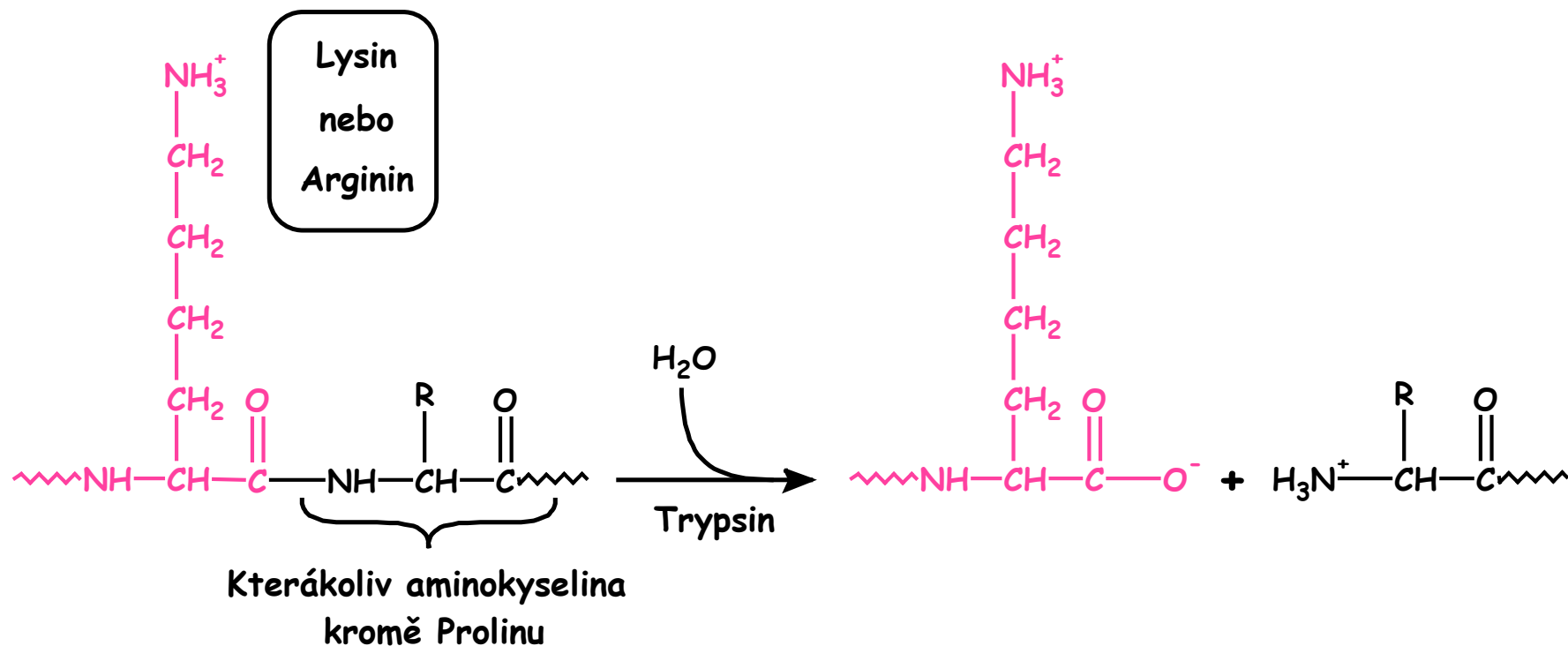
Diagonální elektroforéza (ELFO). Po oxidaci peptidů se v druhém směru elektroforézy původní peptidy zastaví na diagonále, kdežto peptidy obsahující disulfidové vazby (jsou kyselejší) se objeví mimo diagonálu.



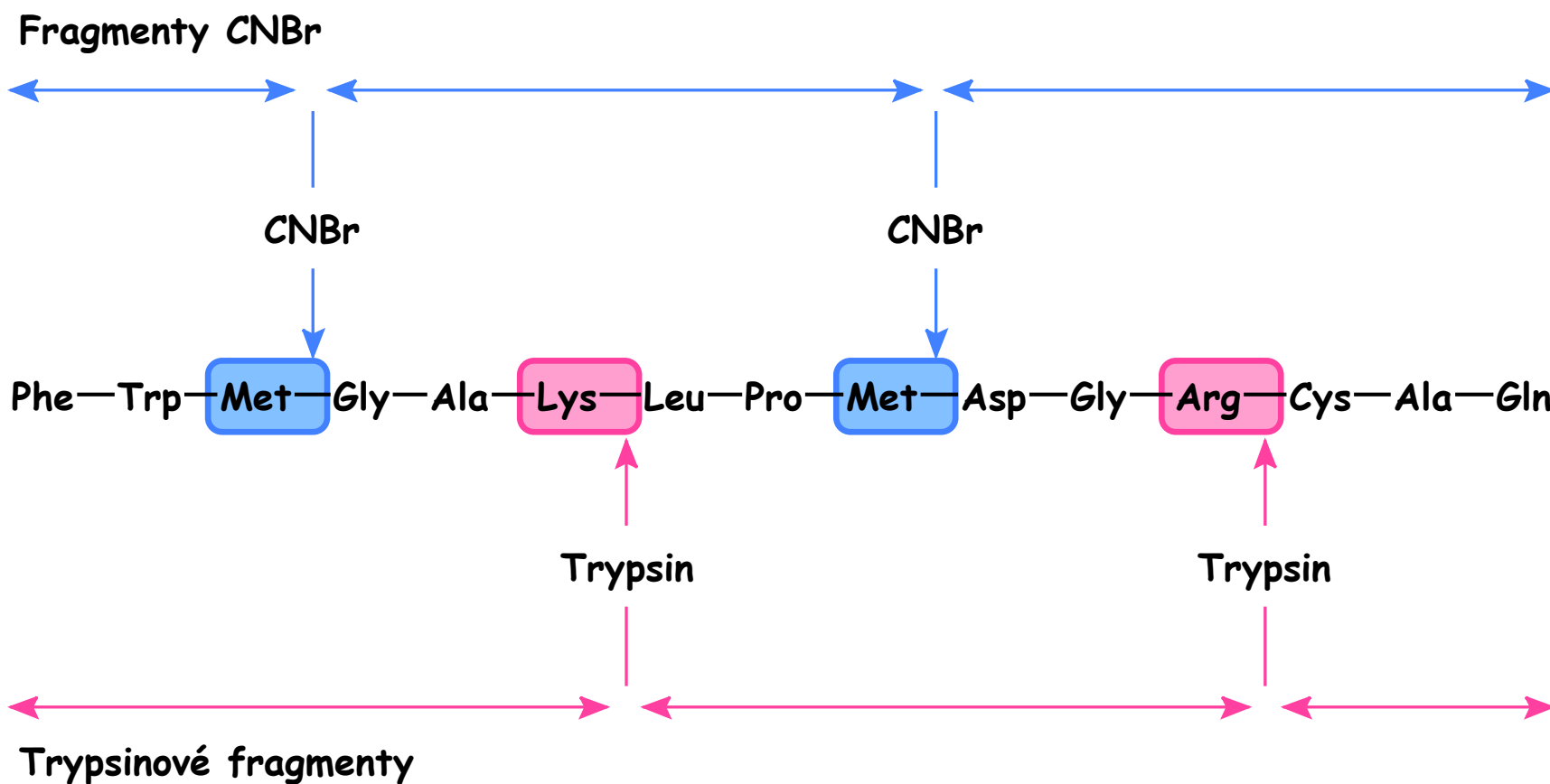
Enzymové štěpení polypeptidů endopeptidasami:

- Endopeptidasy, proteinasy, jsou hydrolytické enzymy štěpící specificky určité peptidové vazby.
- **Trypsin štěpí na místě karboxylu Arg a Lys.**
- **Chymotrypsin štěpí na místě karboxylu hydrofobních aminokyselin Phe, Tyr a Trp.**
- Elastasa štěpí na místě karboxylu malých neutrálních aminokyselin Ala, Gly, Ser a Val.
- **Ve všech případech se vazba neštěpí, pokud je následující aminokyselinou Pro.**
- Všechny předchozí enzymy jsou z hovězího pankreatu.
- Endopeptida V8 ze *S. aureus* je specifická na Glu.
- Štěpením polypeptidu různými enzymy získáme řadu peptidových fragmentů

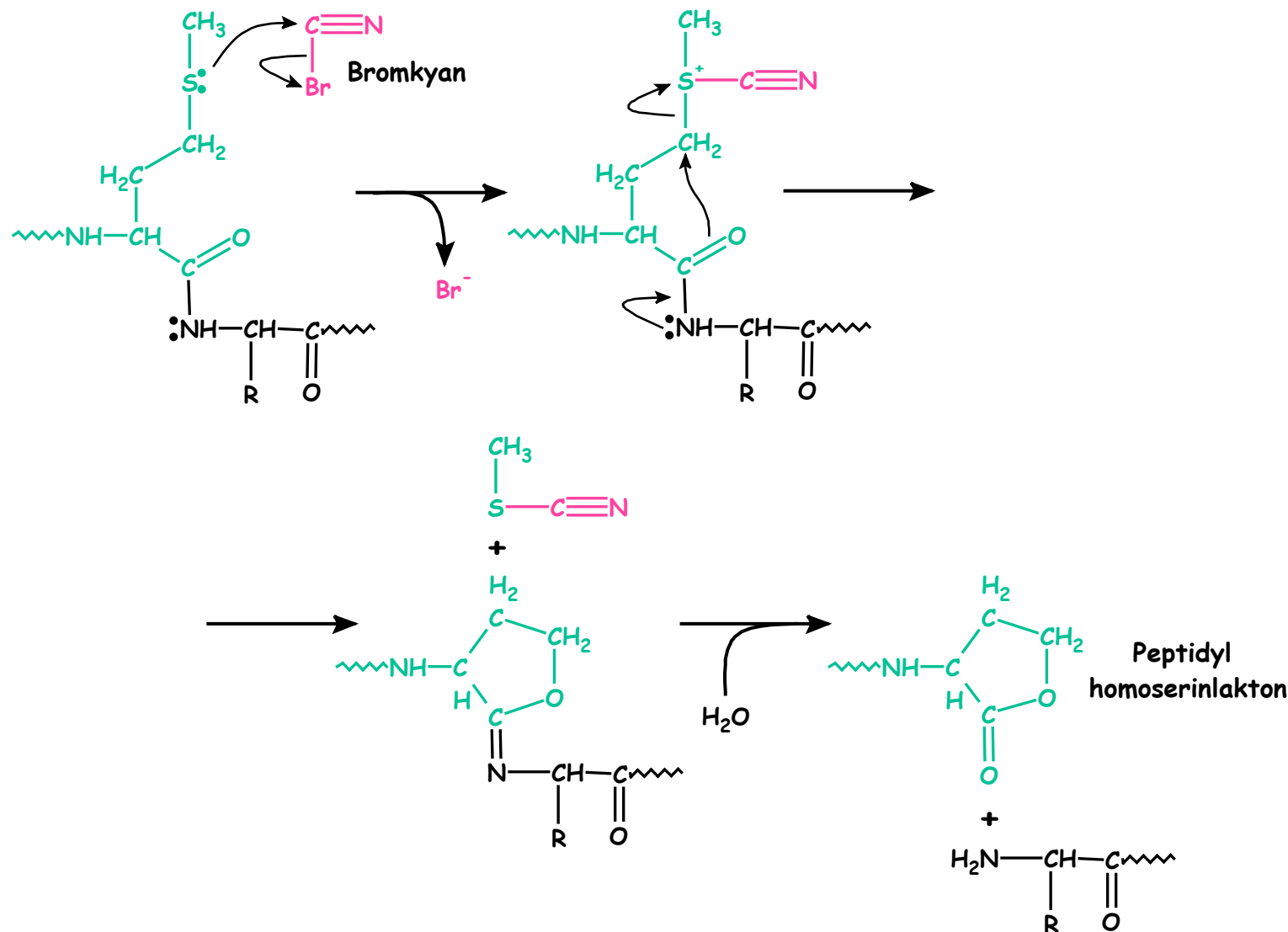
Enzymové štěpení polypeptidového řetězce trypsinem na místě karboxylu Arg nebo Lys:



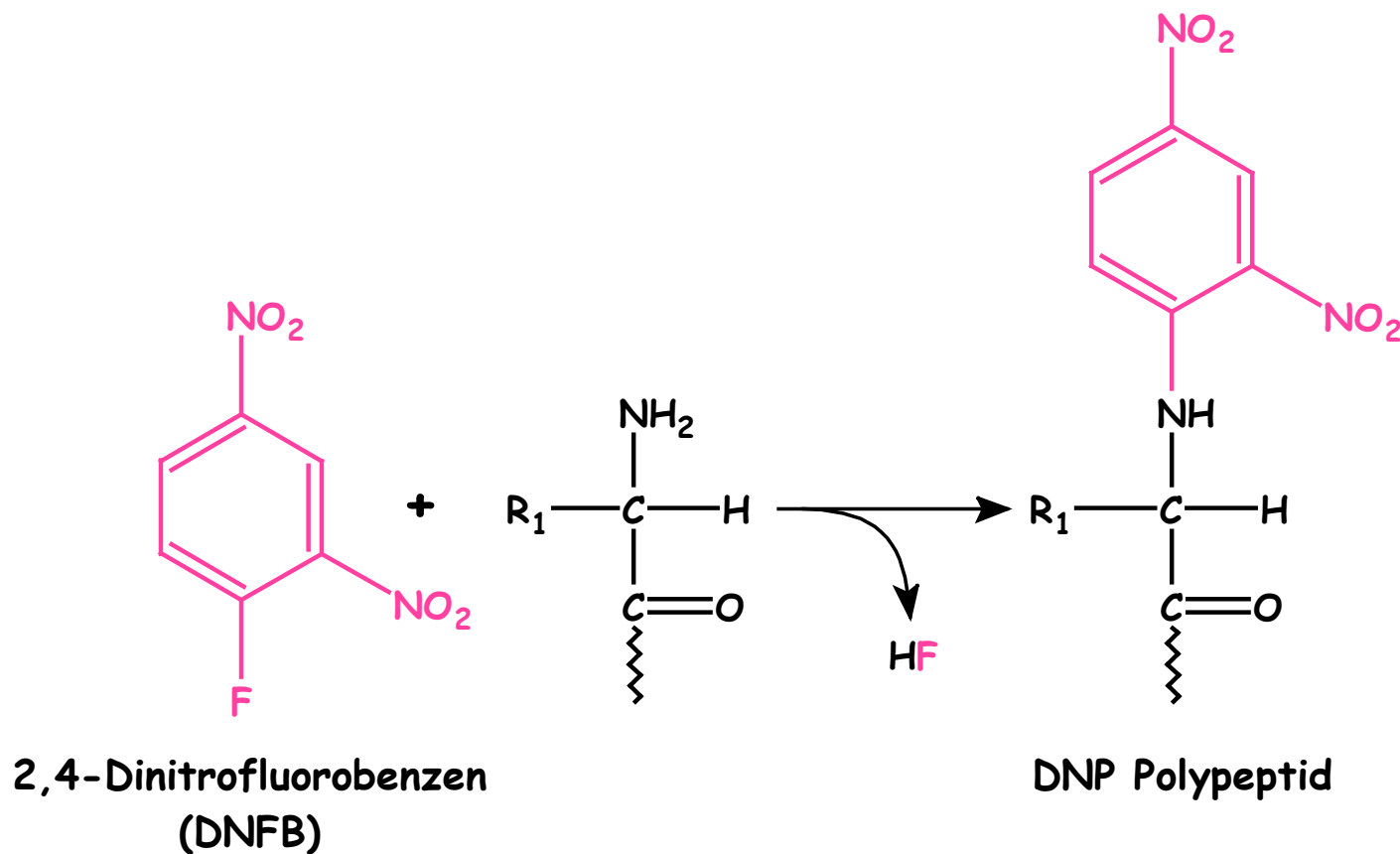
Vznik různých fragmentů z polypeptidu enzymovým a chemickým štěpením peptidových vazeb. V tomto příkladu se získalo šest překrývajících se fragmentů.



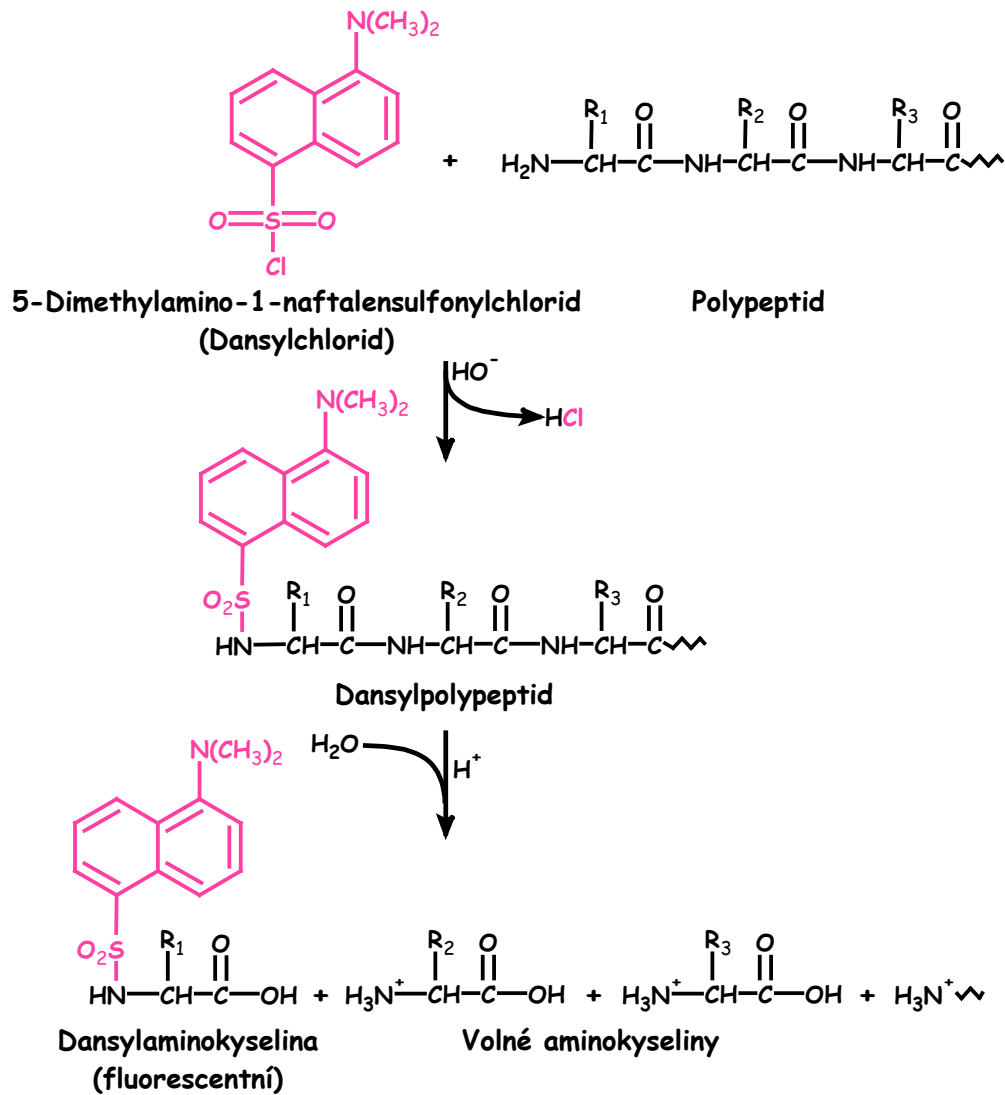
Příklad chemického štěpení peptidové vazby.
Bromkyan štěpí specificky na místě karboxylu Met.



Původní **Sangerova metoda** založená na sekvenaci polypeptidu (insulin) od N-konce 2,4-dinitrofluorbenzenem. Nevýhodou bylo, že se při stanovení jedné aminokyseliny se hydrolyzoval celý peptid.

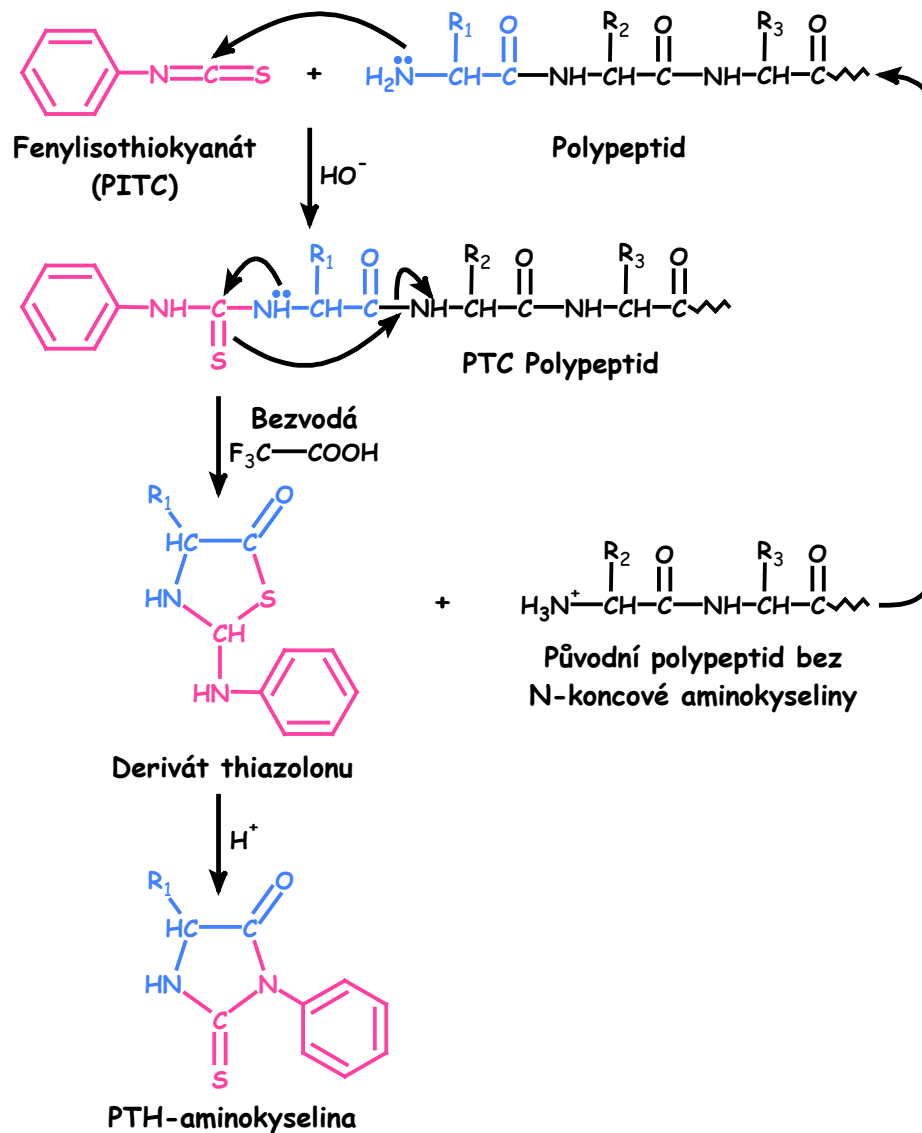


Při použití **dansyl chloridu** (fluorescence) došlo k výraznému zvýšení citlivosti **Sangerovy metody**. Stanovuje se 1 nM.L^{-1} aminokyseliny.

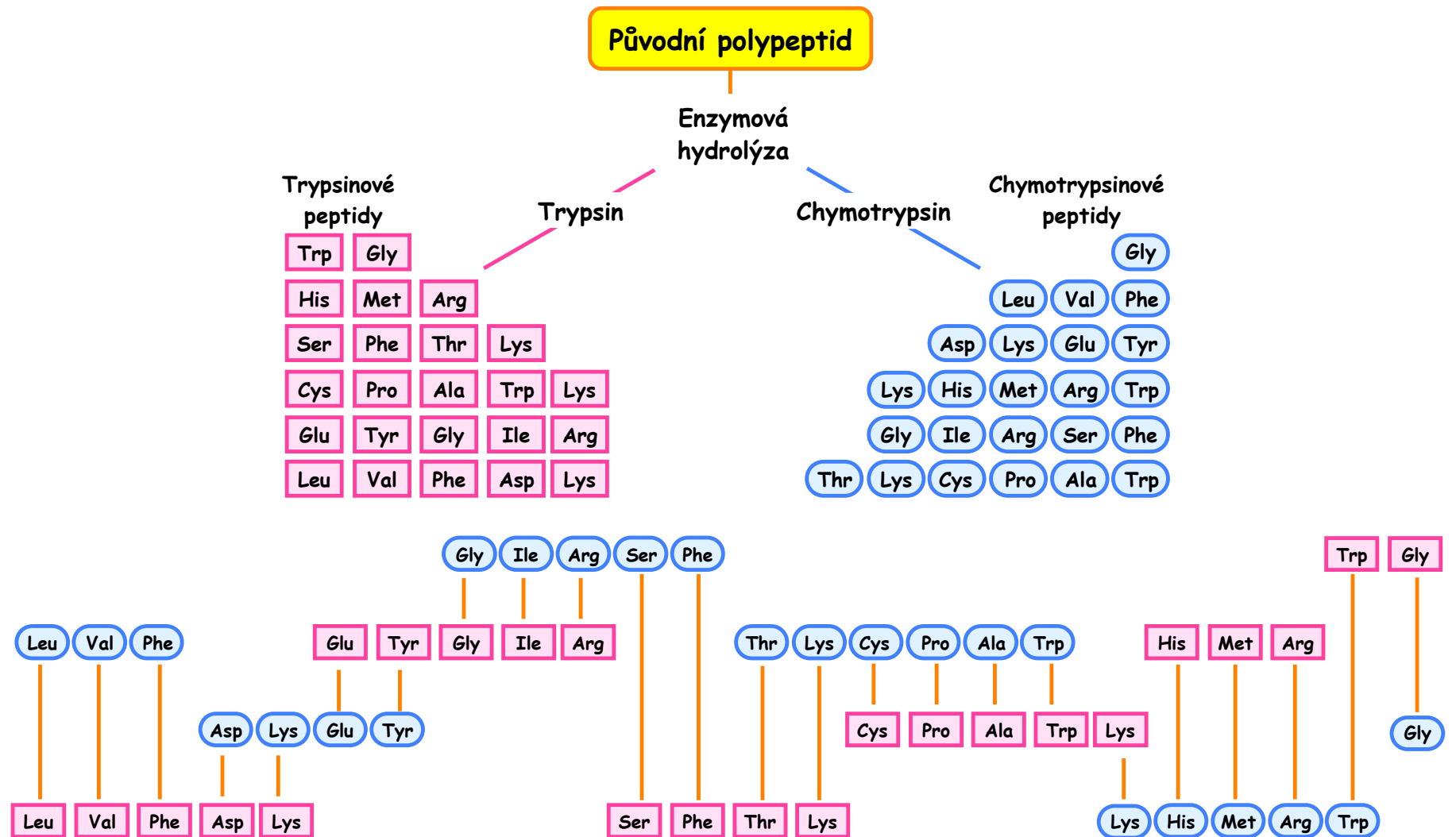


Edmanova metoda sekvenace peptidu od N-konce:

Polypeptid je navázán C-koncem na polymerní nosič. Postupně se oddělují fenylthiohydantoinové (PTH) deriváty aminokyselin. Činidlem je fenylisothiokyanát (PITC).



Sestavení původního polypeptidu z fragmentů získaných enzymovou hydrolýzou:



N-Leu-Val-Phe-Asp-Lys-Glu-Tyr-Gly-Ile-Arg-Ser-Phe-Thr-Lys-Cys-Pro-Ala-Trp-Lys-His-Met-Arg-Trp-Gly-C

Proč sekvencujeme peptidy a proteiny ?

- 1. Sekvence se porovnává se známými sekvencemi. Z analogie je možné usoudit např. na katalytický mechanismus enzymu nebo příslušnost nově získaného peptidu do určité rodiny peptidů.
- 2. Srovnávají se sekvence stejného polypeptidu z různých zdrojů a sleduje se evoluční mapa.
- 3. Sekvenční data se využívají jako podklad k syntéze protilátek a peptidů nebo proteinů s významným účinkem.
- 4. Aminokyselinová sekvence je podstatná pro tvorbu DNA sond specifických pro geny kódující odpovídající proteiny.
- 5. Mnohé proteiny obsahují signální aminokyselinové sekvence sloužící k kontrole určitého procesu. Sekvence mohou např. obsahovat signál pro umístění proteinu v membráně.

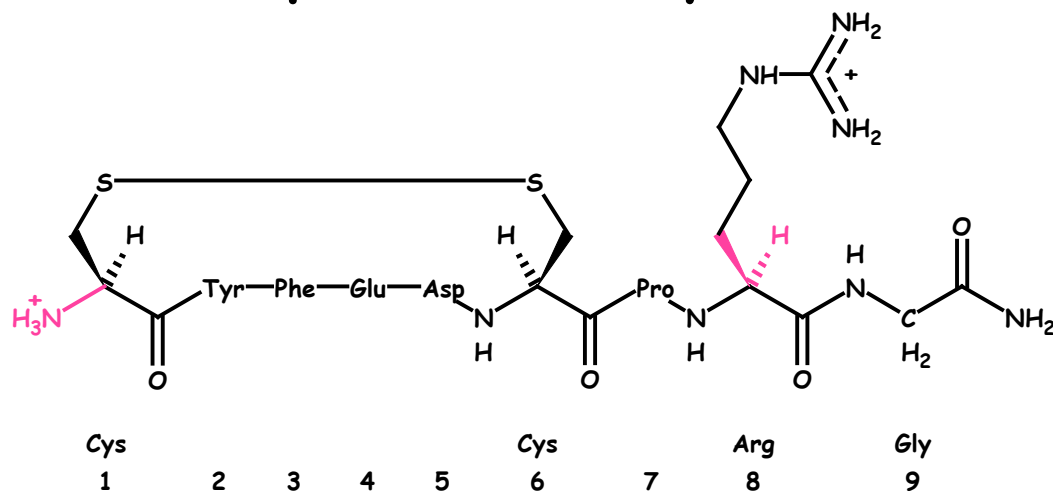
Využití technologie rekombinantní DNA k sekvenaci velkých proteinů. Řetězce DNA jsou klonovány a poté sekvencovány. Sekvence nukleotidů udávají sekvenci aminokyselin v proteinu. Nevýhodou je, že nepostihuje posttranslační úpravy polypeptidů.

Sekvence DNA	GGG	TTC	TTG	GGA	GCA	GCA	GGA	AGC	ACT	ATG	GGC	GCA
Sekvence aminokyselin	Gly	Phe	Leu	Gly	Ala	Ala	Gly	Ser	Thr	Met	Gly	Ala

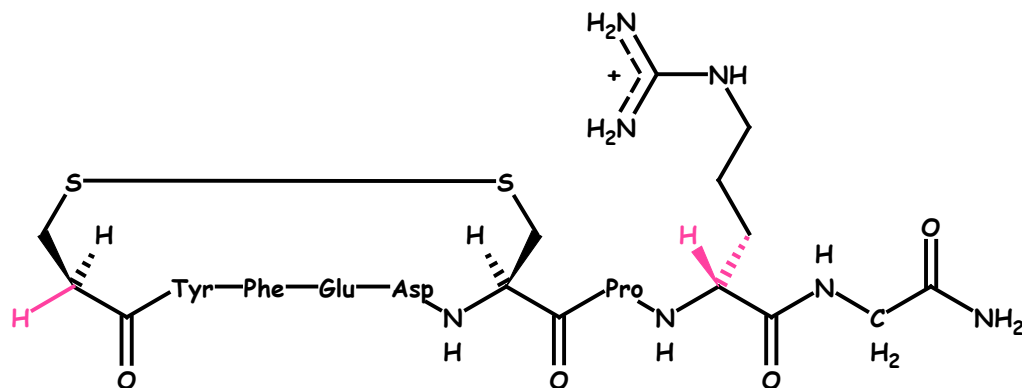
Proč syntetizovat peptidy ?

- 1. Syntetické peptidy slouží jako antigeny stimulující tvorbu specifických protilátek.
- 2. Syntetické peptidy mohou být využity k izolaci receptorů hormonů a jiných signálních molekul. Také jako afinanty při afinitní chromatografii.
- 3. Syntetické peptidy mohou být využity jako léky. Např. analog vasopresinu, hormonu stimulujícím reabsorpci vody, 1-desamino-8-D-argininvasopresin se odbourává pomaleji a slouží jako náhrada vasopresinu.
- 4. Peptidy mohou sloužit jako pomocná strukturu při studiu složitějších proteinů (třírozměrná struktura).

Porovnání struktur přírodního a syntetického vasopresinu:



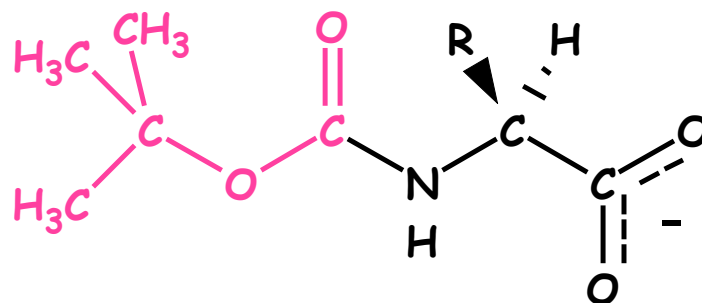
8-Argininvasopresin
(antidiuretický hormon, ADH)



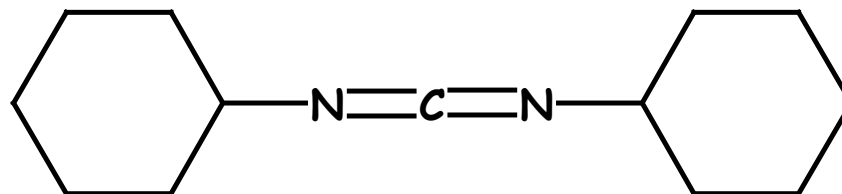
1-Desamino-8-D-argininvasopresin
(syntetický ADH)

Taktika peptidových syntéz:

- 1. Aktivace karboxylu
- 2. Chránění skupin, které nevstupují do peptidové vazby
- Syntézy peptidů jsou zautomatizovány. První chráněná skupina se naváže C -koncem na makromolekulární pryskyřici a postupně se přidávají na N- konec další chráněné aminokyseliny. Reakcí karboxylu a aminoskupiny s N, N' - dicyklohexylkarbodiimidem (DCC) za odštěpení vody a uvolnění N, N' - dicyklohexylmočoviny, se tvoří peptidová vazba.
- Skupiny, které nemají vstoupit do peptidové vazby se chrání činidly jako např. t - butyloxykarbonyl, t -Boc nebo benzyloxakarbonyl (dříve karbobenzoxy nebo karbobenzyloxy) - symbol Z nebo Cbz. Obě skupiny se po skončení syntézy lehce odštěpují.

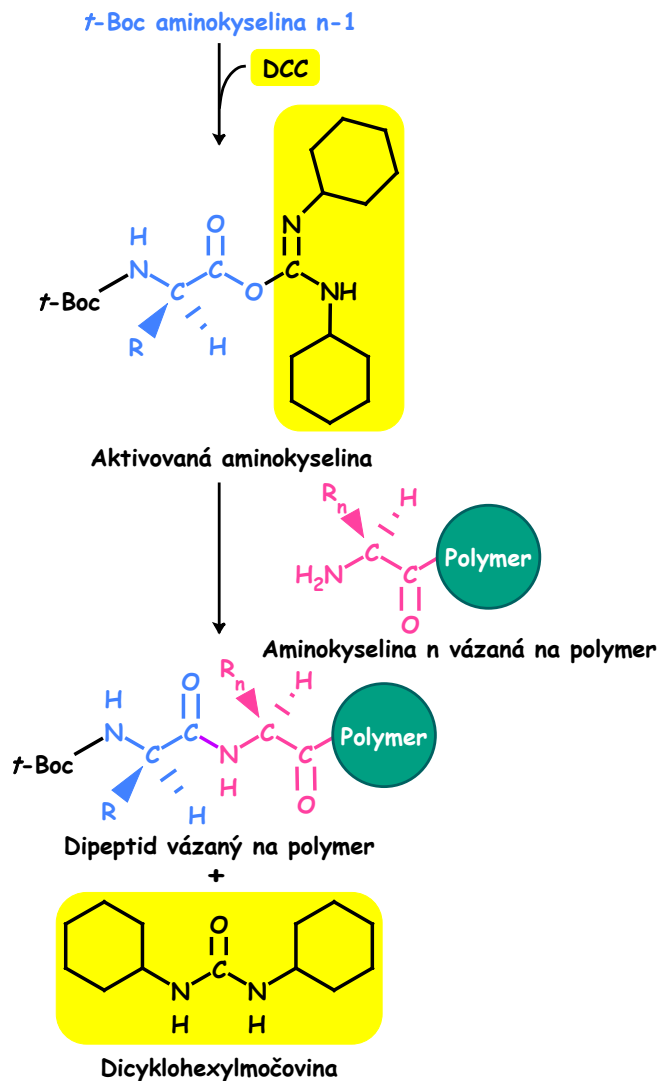


t-Butyloxykarbonylaminokyselina
(t-Boc aminokyselina)

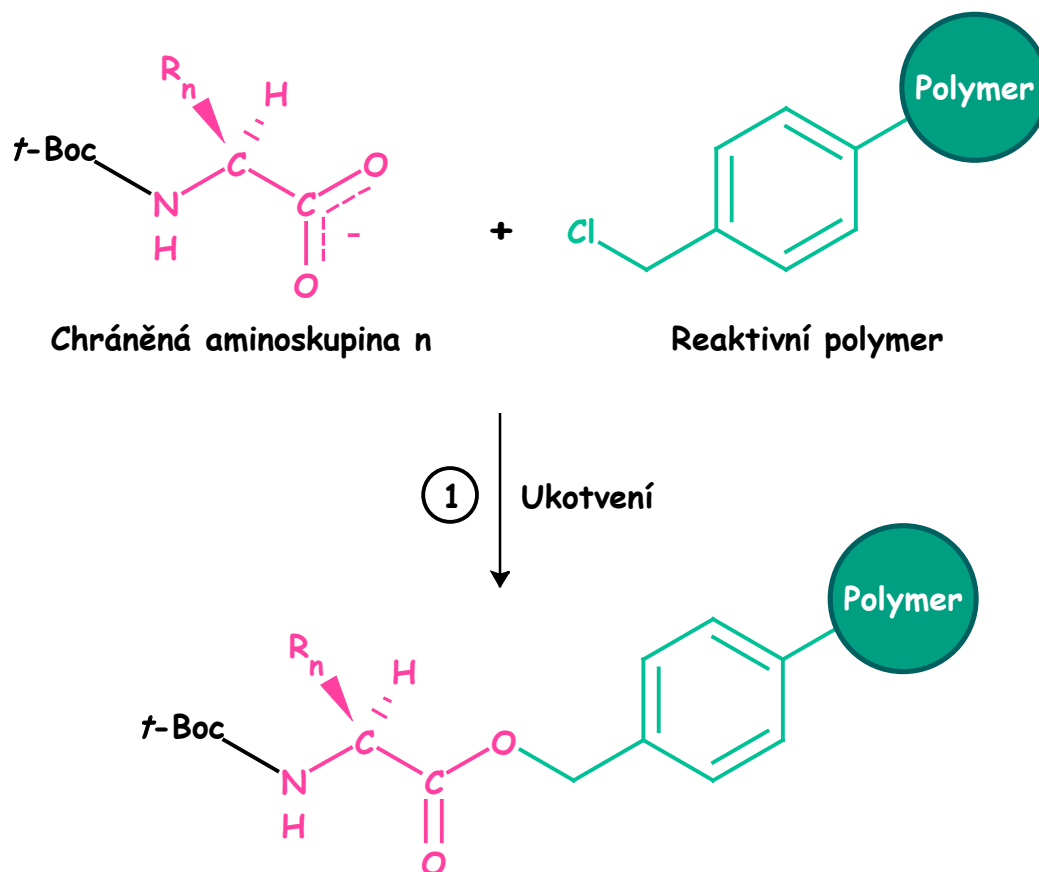


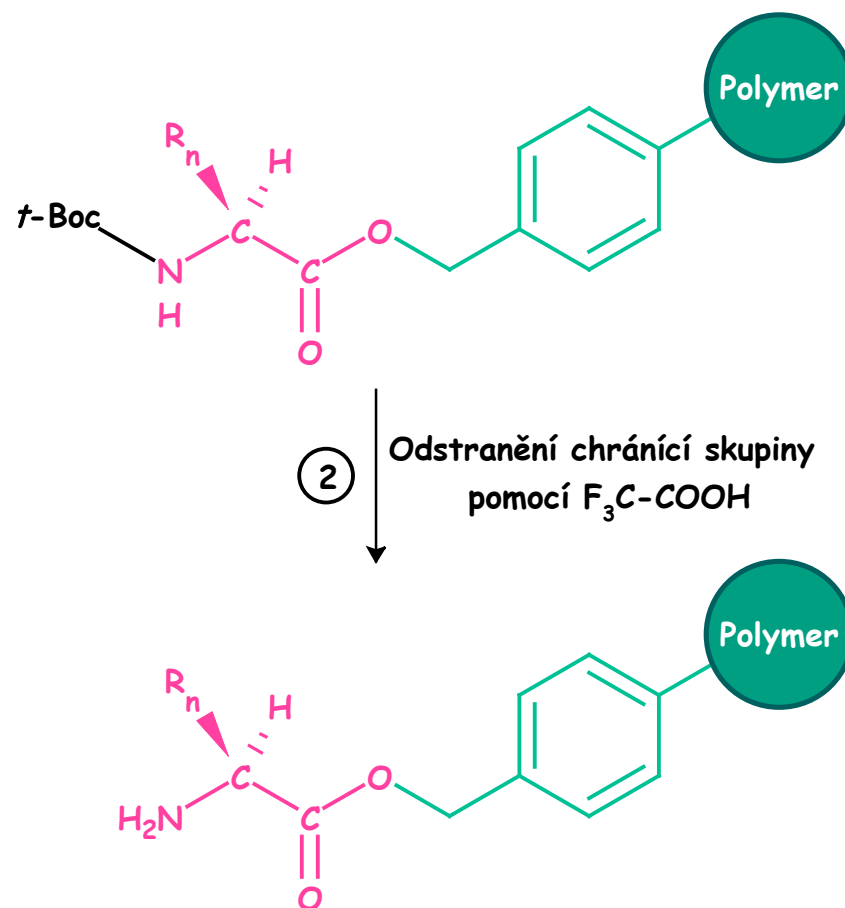
Dicyklohexylkarbodiimid
(DCC)

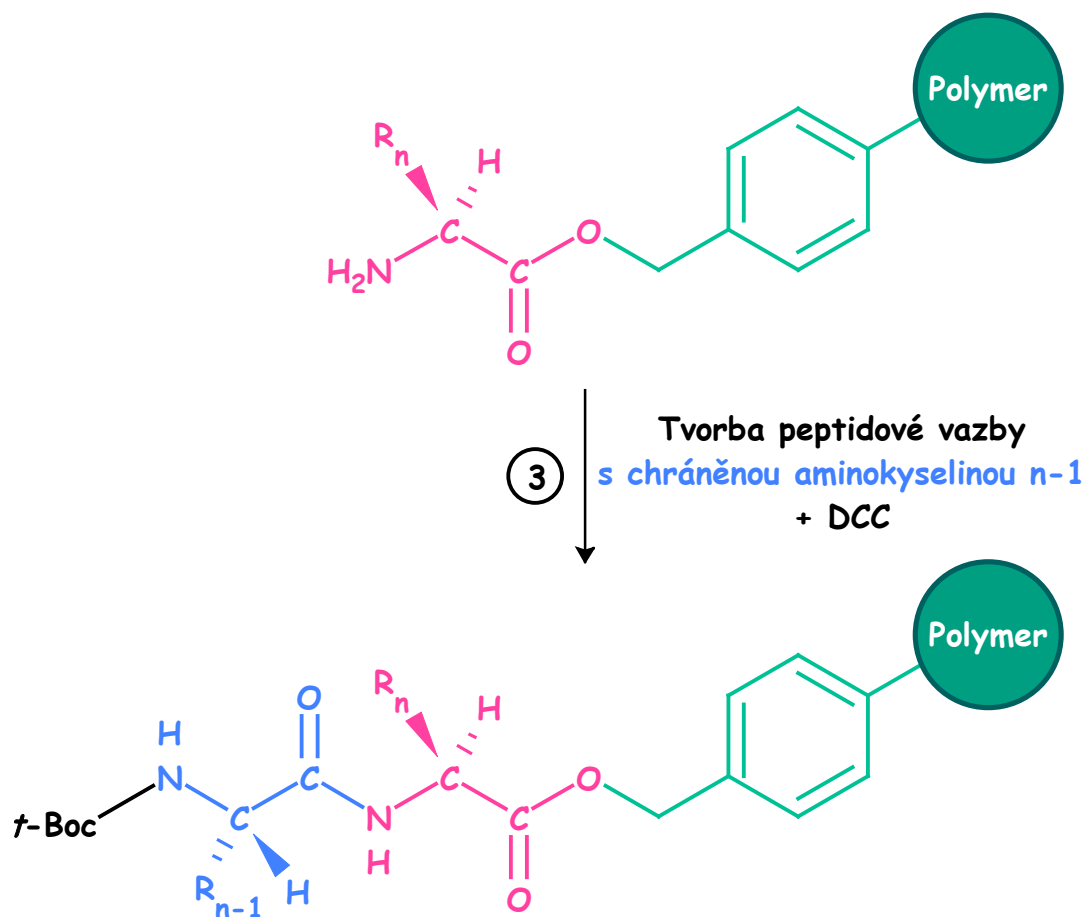
Vstup chráněné aminokyseliny (t-Boc) do peptidové vazby za účasti DCC:

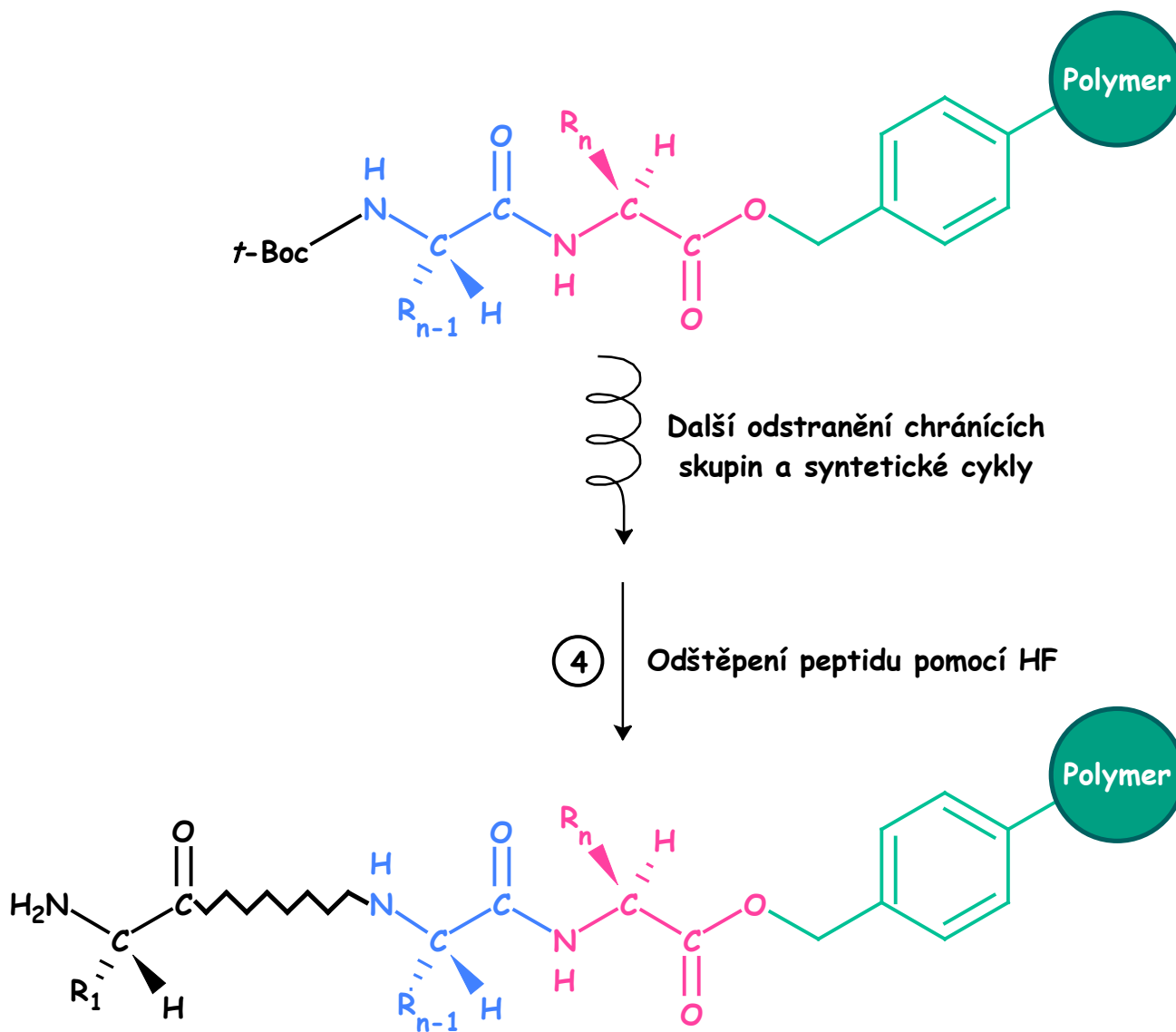


Celkový postup syntézy peptidu na polymerním nosiči. Syntéza peptidů v pevné fázi - Merrifieldova metoda (SPPS).



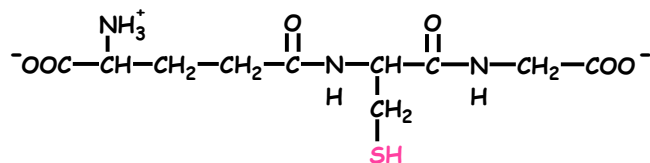




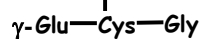
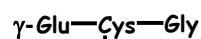


Přírodní peptidy

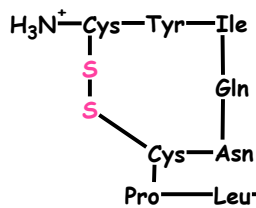
- **Zvláštnosti struktury přírodních peptidů:**
 - obsahují i neproteinogenní aminokyseliny
 - obsahují i D-aminokyseliny
 - isopetidové vazby (např. γ -karboxyl Glu)
 - cyklické struktury (laktamy, disulfidové vazby)
 - větvené struktury
 - blokování koncových aminokyselin (pyroglutamát, glycínamid)
- **Skupiny přírodních peptidů**
 - di- a tripeptidy (glutathion, sladidlo aspartam...)
 - peptidové hormony (oxytocin, vasopresin, přechod k proteohormonům, insulin)
 - neuromodulátory (endorfiny, 15 až 32 aminokyselin, enkefaliny, pentapeptidy)
 - peptidové zoo- a fytotoxiny (hadi, štíři, včely - apamin; falloidiny a amanitiny - *Amanitia phalloides*)
 - protaminy - krátké lineární peptidy, mlíčí ryb
 - polyaminokyseliny (buněčné stěny bakterií, poly γ -L-Glu a poly γ -D-Glu)



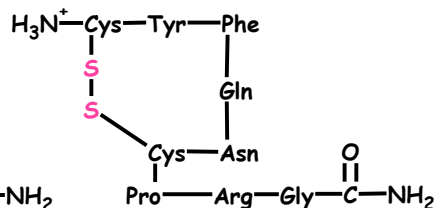
Glutathion (GSH)
(redukovaný)



Glutathion (GSSG)
(oxidovaný)



Oxytocin



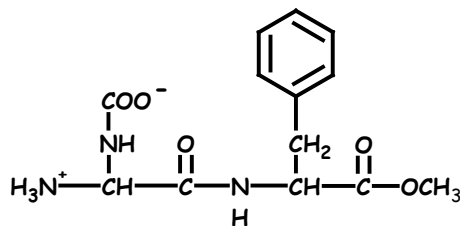
Vasopresin



Leucinenkefalin

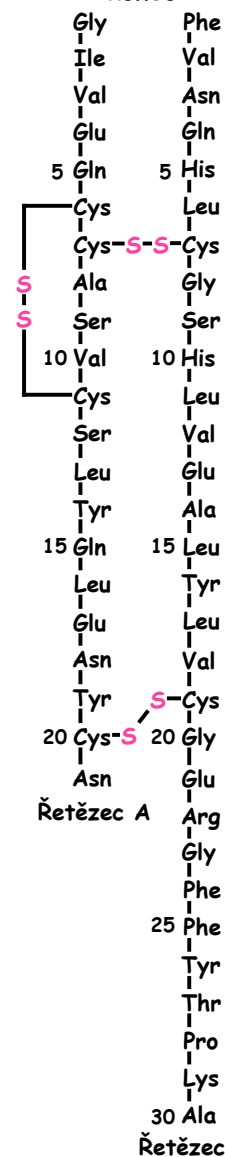


Methioninenkefalin



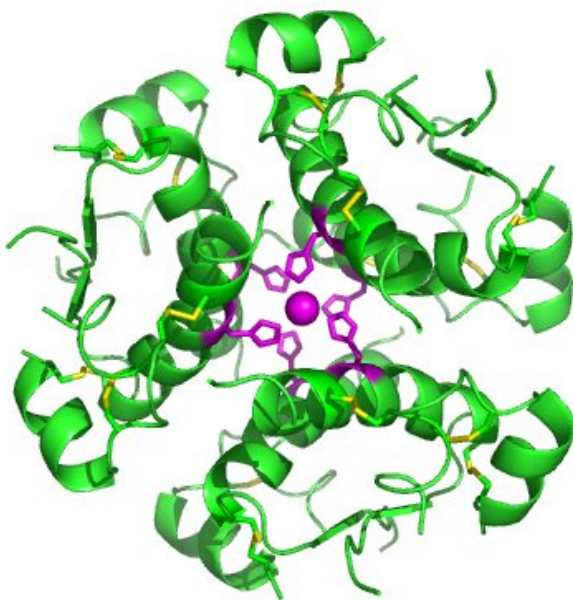
Methylester L-aspartyl-L-fenylalaninu
(Aspartám)

N-terminální
konec



Insulin

Insulin je skladován v těle jako hexamer. Jen monomer je funkční.
Monomery spojují atomy Zn^{2+} přes His.
Insulin Lispro má nízkou tendenci tvořit dimery a hexamery.



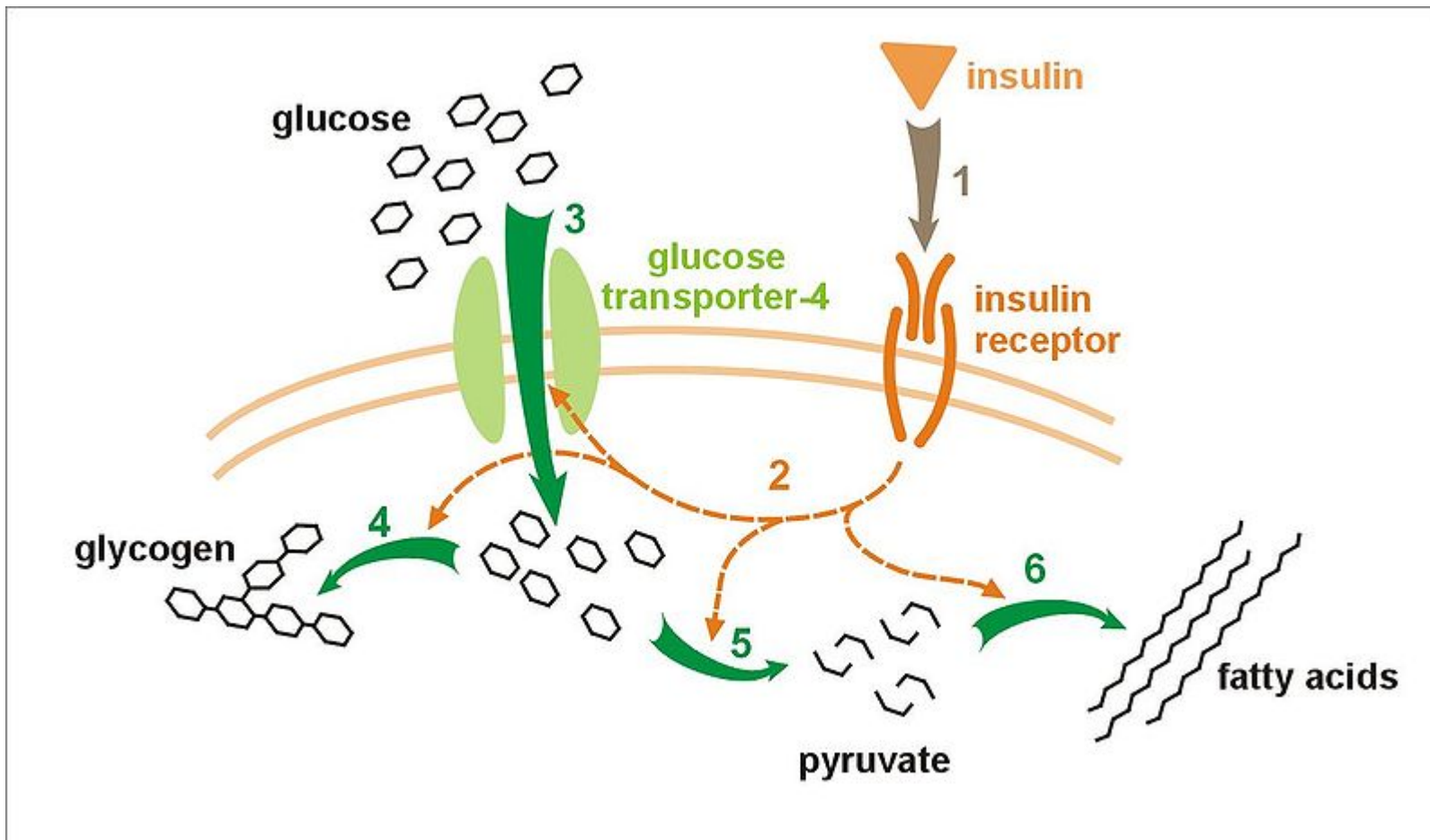
Human
Insulin

Insulin
Lispro

(C-terminus of B chain)



Metabolická funkce insulínu



PROTEINY - BÍLKOVINY

- Proteiny z řeckého proteos (prvotní, nejpodstatnější), bílkoviny z německého eiweisse - vaječný bílek.
- Proteiny jsou univerzální makromolekuly živých systémů mající klíčové funkce v téměř všech biologických procesech.
- **Klíčové vlastnosti proteinů:**
 - Proteiny jsou lineární polymery sestavené z monomerních jednotek - aminokyselin.
 - Proteiny obsahují řadu funkčních skupin.
 - Proteiny mohou reagovat spolu vzájemně nebo s jinými biologickými makromolekulami za tvorby vyšších komplexních celků.
 - Některé proteiny jsou silně rigidní, zatímco jiné vykazují omezenou flexibilitu.

Klasifikace a rozdělení proteinů

- Klasifikace proteinů podle funkce (specifické a obecné), chemického složení a tvaru.
- **Obecné funkce proteinů:** Zdroj energie a dusíku, účinné ústoje (krev, cytosol), významný příspěvek k udržení osmotického tlaku vně i uvnitř buněk.
- **Specifické funkce proteinů (zvláštní tabulka).**
- **Chemické složení:**
 - A) Jednoduché - pouze polypeptidový řetězec
 - B) Složené (polypeptidová část + neproteinová část)
 - Metaloproteiny - obsahující kovový iont.
 - Fosfoproteiny - obsahující fosfáty.
 - Glykoproteiny - obsahující sacharidovou složku
 - Lipoproteiny - obsahující lipidovou složku
 - Nukleoproteiny - obsahující nukleové kyseliny

Specifické funkce proteinů

• Typ proteinu	Příklad	Výskyt a funkce
• Katalytické (enzymy)	Trypsin	Hydrolýza peptidové vazby
• Regulační (hormony)	Insulin	Stimulace metab. glukosy
• Ochranné	Protilátky	Vazba na cizorodé látky
• Skladovací	Kasein	Mléčný protein
• Transportní	Hemoglobin	Transport O ₂ krví
• Strukturní	Kolagen	Vláknité pojivové tkáně
• Kontraktilní	Myosin, aktin	Svalová vlákna
• Genetické funkční	Histony	Asociace s DNA (chromosomy)
• Toxické	Ricin	Toxický protein z Ricinus communis (skočec obecný)

Pokračování – rozdělení proteinů

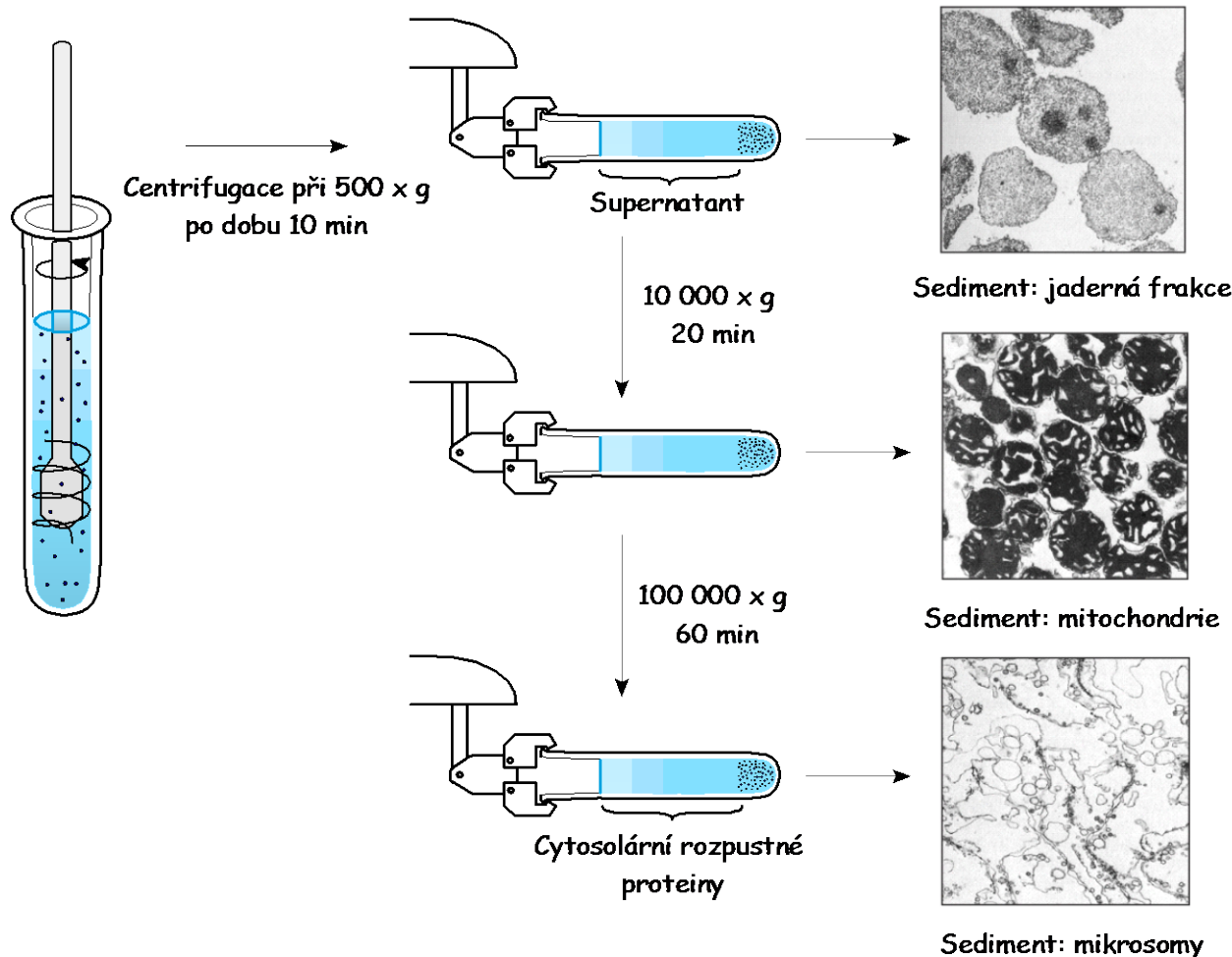
- Rozdělení proteinů podle tvaru molekul:
 - Globulární - tvar koule, obvykle ve vodě rozpustné
 - Fibrilární - ve tvaru vláken, ve vodě nerozpustné
 - Membránové - součást biologických membrán
- Další možnosti dělení proteinů podle lokalizace nebo dějů, ve kterých působí:
 - Krevní proteiny
 - Membránové receptory
 - Elektrontransportní systémy (vnitřní membrána mitochondrií)

Purifikace proteinů

- Pro všechny studie proteinů musí být k dispozici čistý protein.
- Proto, abychom ho získali, musíme mít zdroj, kde je proteinu dostatečné množství a metodu pro jeho sledování během purifikace (čištění).
- Metody sledování purifikovaného proteinu jsou různé. Uvádím metodu, kdy má protein katalytickou funkci (enzym) a jeho koenzymem je nikotinamidadenindinukleotid (NAD^+), který po redukci na NADH přechází na produkt identifikovatelný ve spektru UV vlnové délky 340nm. Dle rostoucí hodnoty absorbance posuzujeme aktivitu enzymu. Dalším důležitým údajem je obsah proteinů, který se během purifikace mění. Rozhodující pro úspěšný průběh purifikace je rostoucí hodnota specifické aktivity (aktivita enzymu / obsah proteinů).
- Abychom získali proteiny z buněk v roztoku musíme biologický materiál homogenizovat - rozdrtit buněčné membrány. Po homogenizaci obvykle následuje oddělení různých frakcí diferenciální centrifugací.
- Získáme sediment (u dna) a nad sedimentem supernatant.

Diferenční centrifugace po homogenizaci.

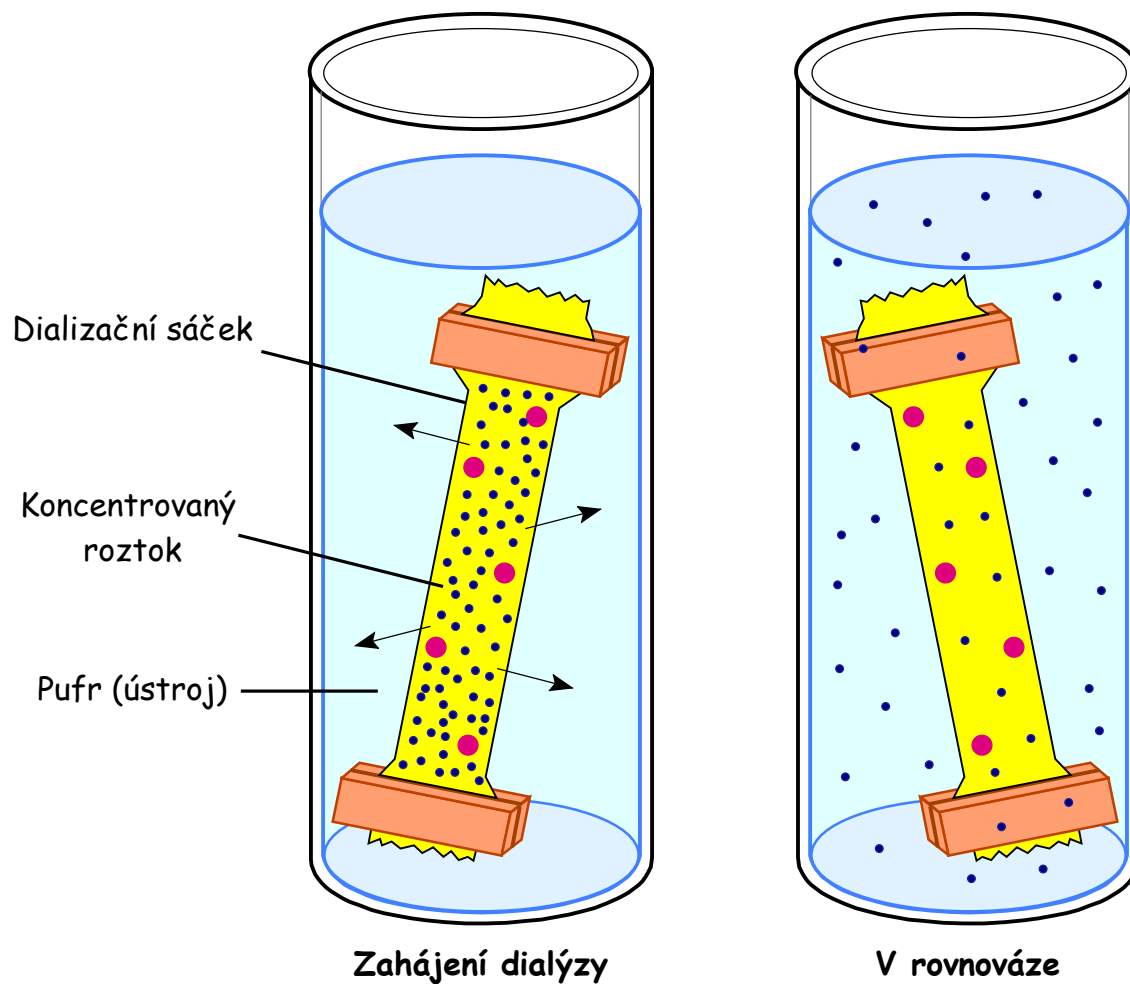
Zvyšující se centrifugační síla (násobky g) umožňuje oddělení těžšího materiálu od lehčího, případně se oddělí pevné částice od rozpuštěných v roztoku.



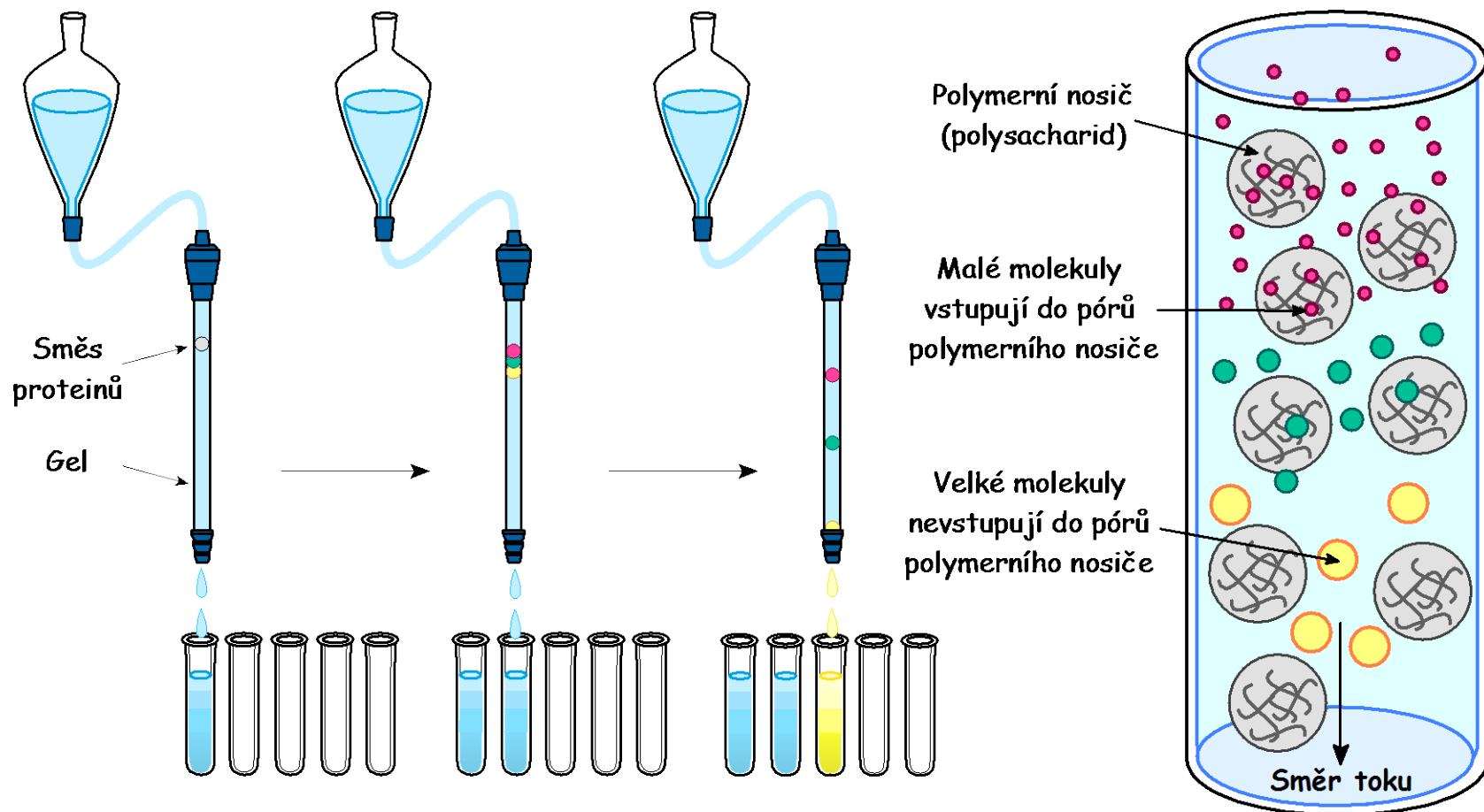
Další metody purifikace proteinů

- **Vysolování a dialýza.** Mnohé proteiny jsou méně rozpustné v roztocích s vyšší koncentrací solí. Vysolování lze provádět frakčně např. síranem amonným různé koncentrace. Dialýza je proces při kterém se oddělují velké molekuly proteinů od malých molekul (např. solí) přes semipermeabilní membránu.
- **Gelová chromatografie.** Metoda slouží k oddělování velkých molekul od malých. Používají se kolony obsahující porézní kuličky o rozměrech 100 μm (0,1 mm). Obvykle nerozpustné, ale vysoce hydratované polysacharidy dextran, agarosa nebo polyakrylamid. Např. Sephadex, Sepharosa nebo Biogel. Malé molekuly vnikají do hydratovaných gelů a tím se zpožďují, kdežto velké molekuly prochází rychleji (nezpožďují se). Pořadí eluce molekul z gelu je : první velké, poté střední a nakonec malé molekuly. Používá se také k odsolování.
- **Chromatografie na iontoměničích.** Proteiny se oddělují na základě náboje na jejich povrchu. Když má protein na povrchu kladný náboj při pH 7, váže se na kolonu polymeru obsahujícího karboxylátové skupiny, zatímco protein s negativním nábojem se neváže. Navázaný protein s kladným nábojem se uvolní přidáním chloridu sodného do ústoje, protože sodný iont kompetuje s kladným nábojem proteinu. Proteiny s kladným nábojem se váží na negativní náboj kolony (např. karboxymethylcelulosa). Naopak proteiny se záporným nábojem se váží na pozitivní náboj např. diethylaminoethylcelulosu DEAE.

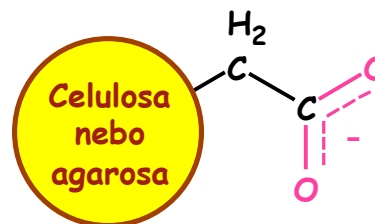
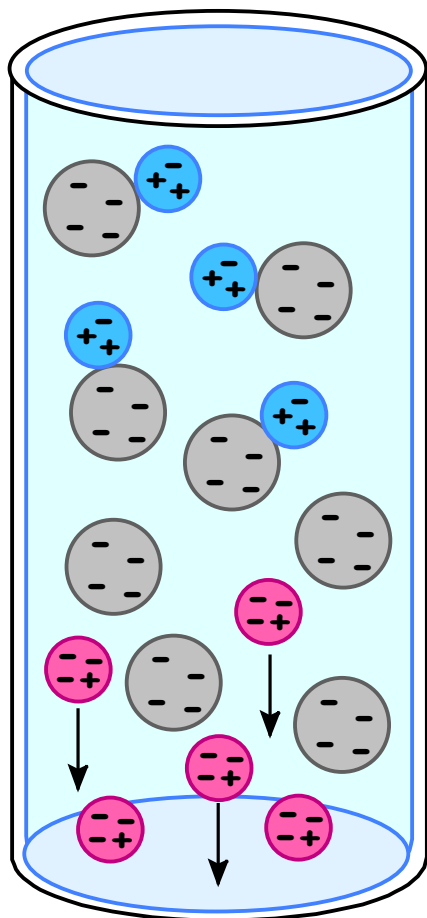
Dialýza



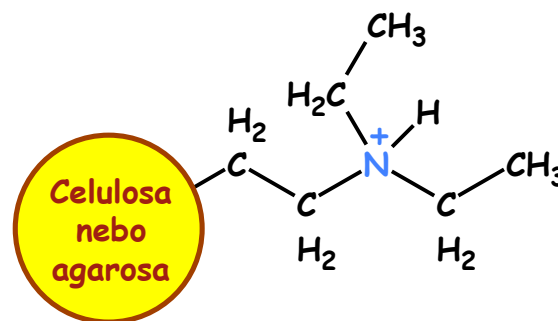
Gelová chromatografie na Sephadexu (polysacharid)



Chromatografie na iontoměničích – katex – karboxymethylcelulosa



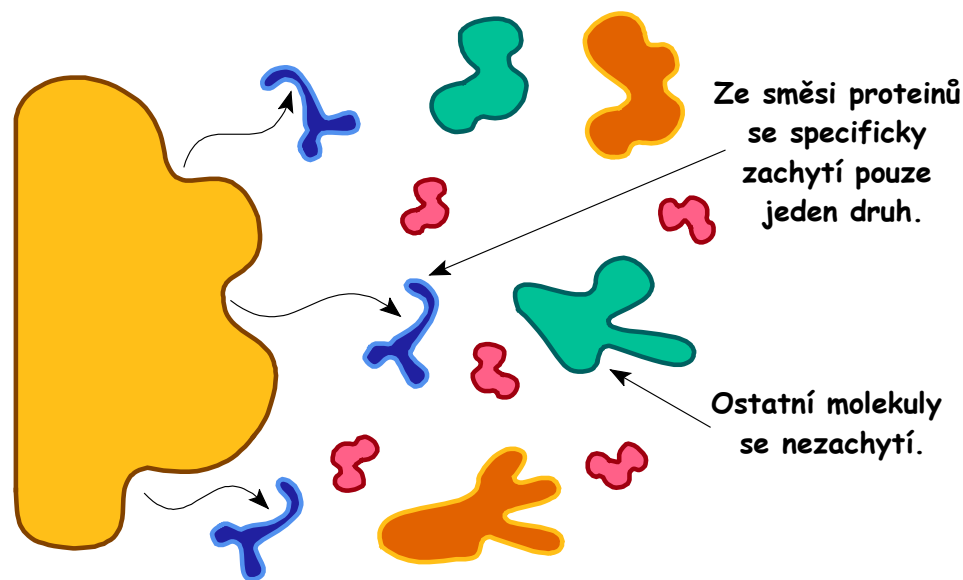
Karboxymethylová (CM) skupina
(ionizovaná forma)



Diethylaminoethylová (DEAE) skupina
(protonovaná forma)

Afinitní chromatografie

- **Afinitní chromatografie** spočívá ve vazbě proteinů na specifické chemické skupiny (afinanty).
- Např. enzym se může vázat na afinitní kolonu s navázaným kompetitivním inhibitorem.
- Směs proteinů se nanese na kolonu.
- Hledaný enzym se naváže pevně na inhibitor.
- Všechny ostatní proteiny se vymyjí.
- Enzym se uvolní přidáním substrátu.



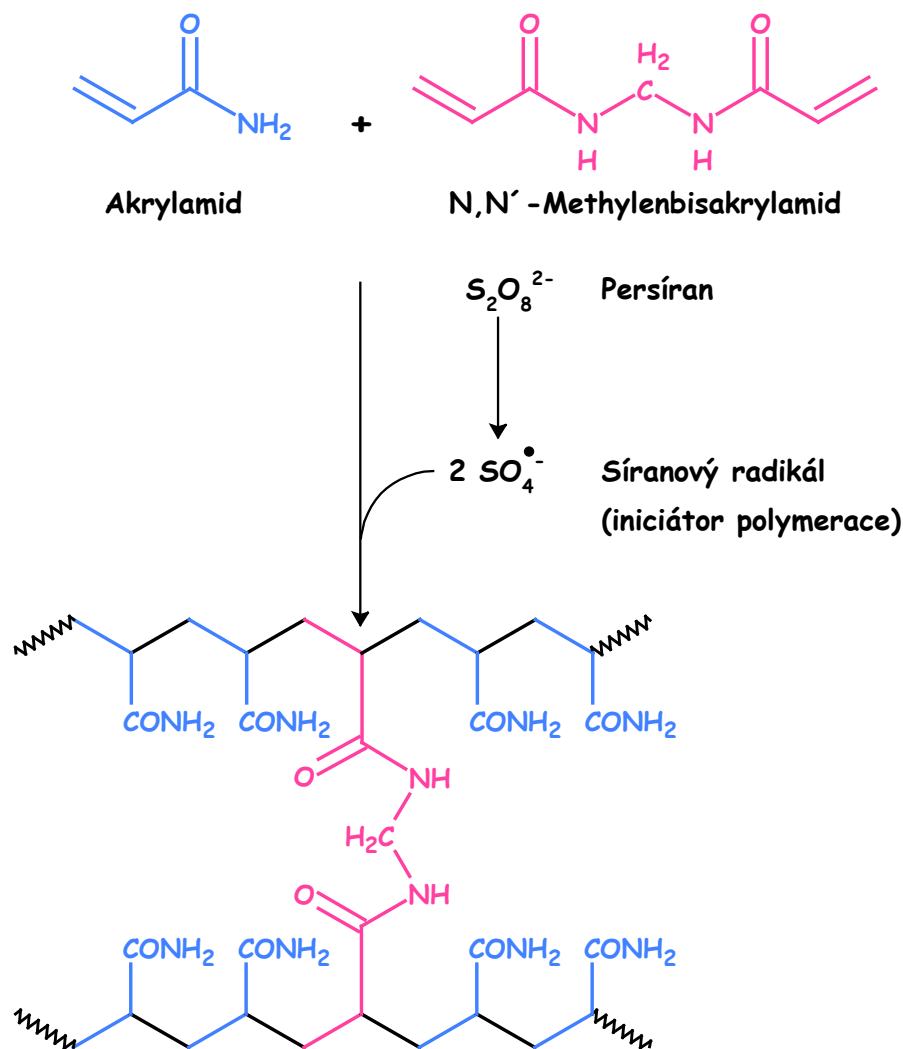
Ověření úspěšnosti purifikace. Elektroforéza. Gelová elektroforéza.

- Molekuly nesoucí náboj putují stejnosměrným elektrickým polem. Proces se nazývá elektroforéza. V biochemie můžeme takto dělit peptidy, proteiny i nukleové kyseliny.
- Rychlost pohybu molekul v elektrickém poli závisí na síle el. pole (E), celkovém náboji molekuly (z) a frikčním koeficientu (f):

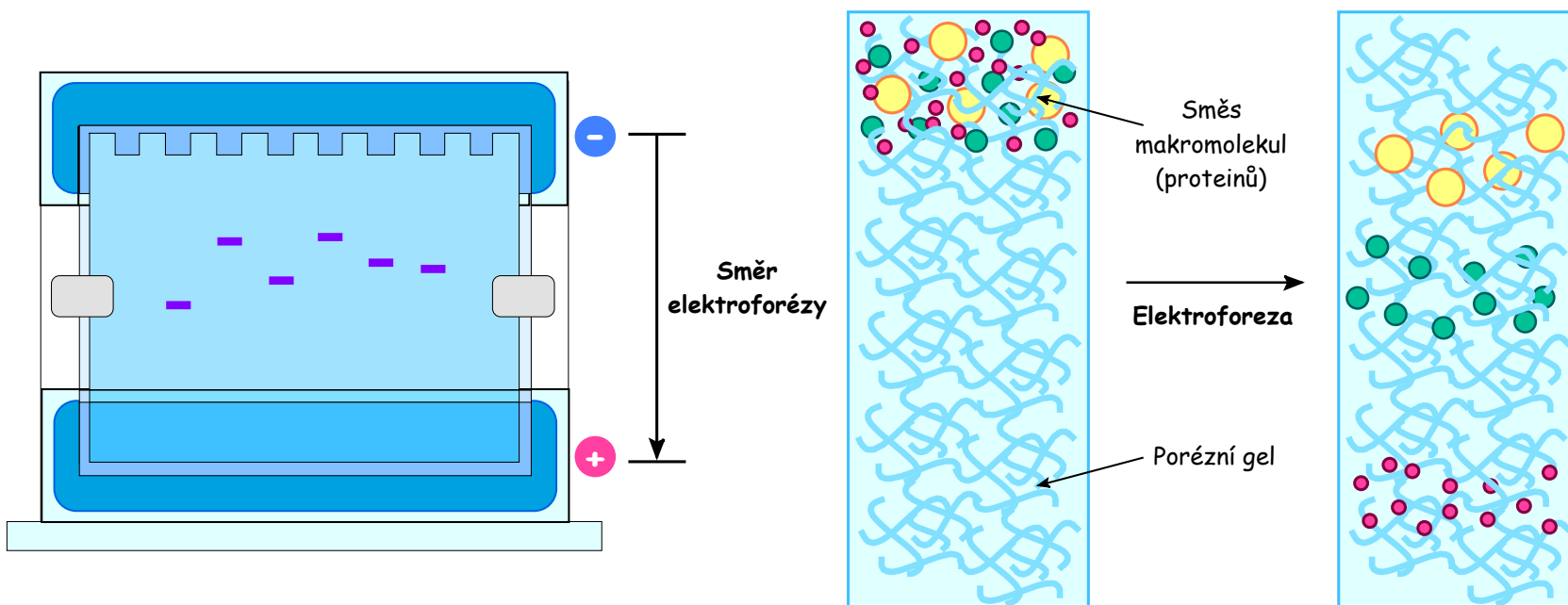
$$v = E \cdot z / f$$

- Proti elektrické síle $E \cdot z$ nesoucí molekulu s nábojem proti elektrodě s opačným nábojem působí viskozita jako projev interakce mezi putující molekulou a prostředím.
- Frikční koeficient f závisí na hmotnosti a tvaru molekuly a viskozitě prostředí (η).
- Pro molekulu ve tvaru koule o poloměru r , platí: $f = 6 \pi \cdot \eta \cdot r$
- Elektroforéza se provádí na nosiči o konzistenci gelu nebo na papíře. Gel slouží současně jako molekulové síto.

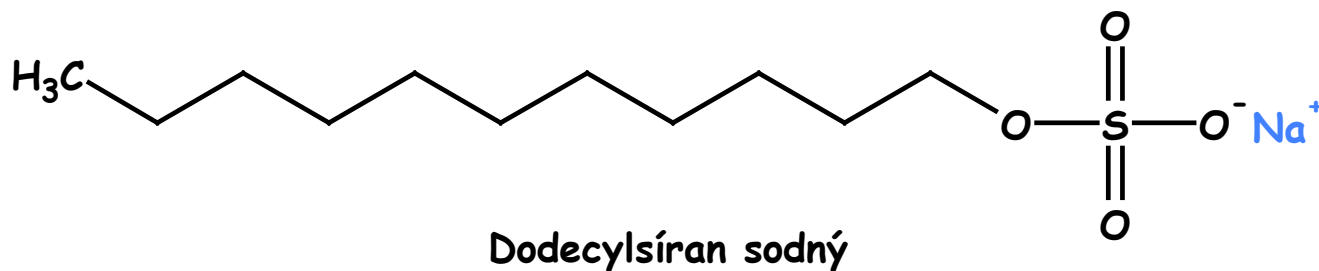
Polyakrylamidová gelová elektroforéza (PAGE). Zesíťování akrylamidu (toxický).



Provedení PAGE. Vertikální (shora dolů), molekuly se pohybují směrem k anodě (+). Velké molekuly se zpožďují, malé putují v čele.



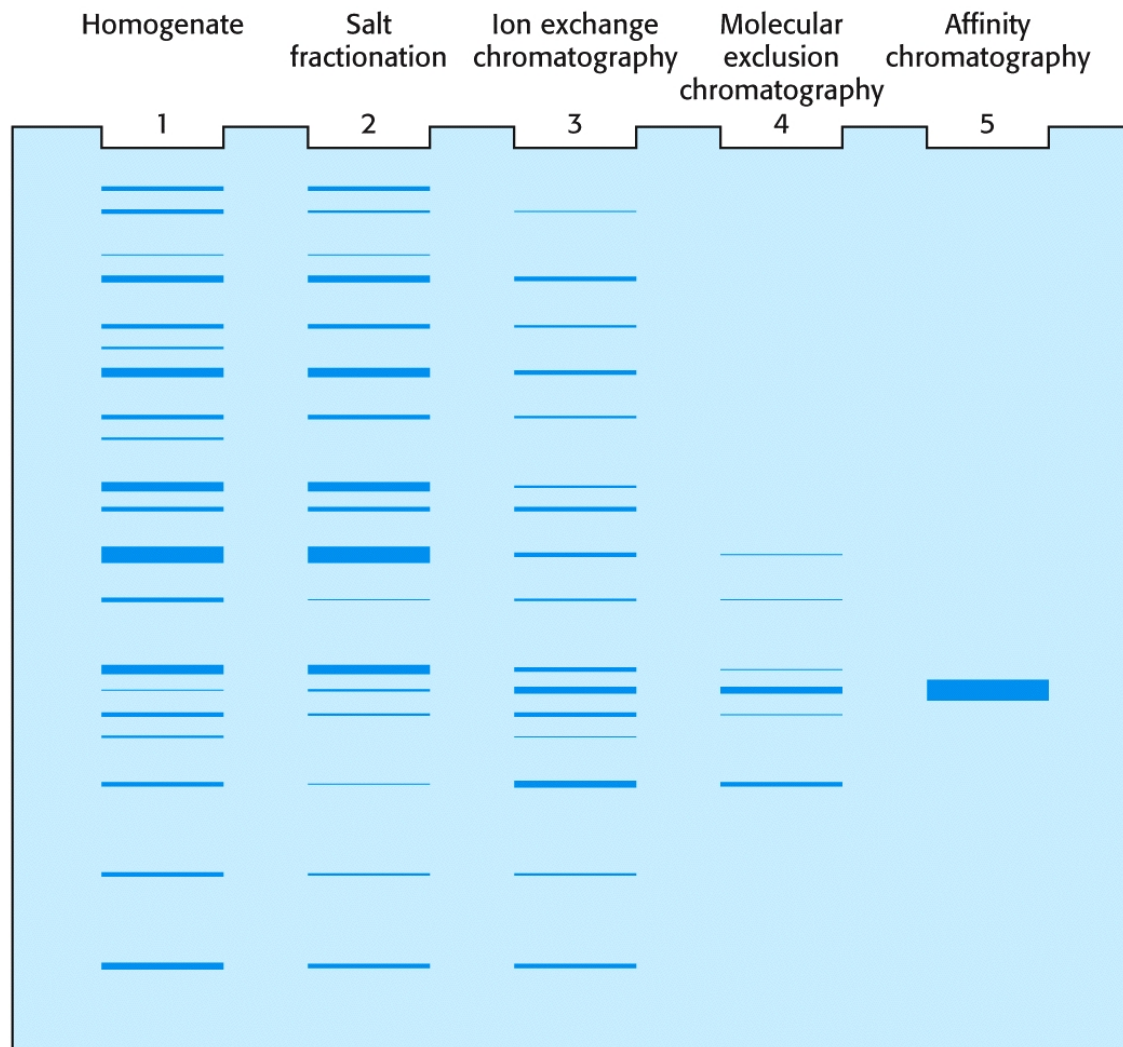
- Modifikací je elektroforéza za podmínek denaturace - **SDS-PAGE**.
- Denaturačním činidlem je obvykle dodecylsíran sodný (SDS) - aniontový detergent. SDS štěpí téměř všechny nekovalentní vazby v proteinech. Aniont SDS se váže na hlavní řetězec polypeptidu (jedna molekula SDS na dvě aminokyseliny). Komplex denaturovaného proteinu s SDS získá záporný náboj, který je úměrný molekulové hmotnosti proteinu.
- Kromě SDS se přidává merkaptoethanol nebo dithiothreitol k redukci disulfidových vazeb.
- Po proběhnutí elektroforézy se proteinové pásy vizualizují. Nejčastěji se používá trifenylmethanové barvivo Coomasie blue nebo barvení stříbrem.
- Pohyblivost většiny polypeptidů je za těchto podmínek je přímo úměrná logaritmu jejich molekulové hmotnosti.



Kvantifikace purifikačního protokolu – fiktivní protein

Stupeň purifikace	Celkové (mg)	Celková proteiny (jednotky)	Specifická aktivita (jednotky/mg)	Výtěžek aktivita (%)	Stupeň
Homogenizace	20 000	200 000	10	100	1
Vysolování	5 000	150 000	30	75	3
Chromatografie na iontoměniči	1 000	120 000	120	60	12
Gelová filtrace	100	80 000	800	40	80
Afinitní chrom.	2	60 000	30 000	30	3 000

Idealizovaná PAGE purifikace fiktivního proteinu



Stanovení relativní molekulové hmotnosti proteinů

- 1. Pomocí SDS-PAGE elektroforézy (objasněno)
- 2. Ultracentrifugace
- 3. Hmotnostní spektrometrie

Ultracentrifugace

- Centrifugace se používá k oddělení hrubých směsí buněčných komponent.
- Při kvantifikaci rychlosti pohybu molekul v roztoku v centrifugačním poli používáme **sedimentační koeficient (s)** dle rovnice:
$$s = m(1 - v\rho)/f$$
kde m je hmotnost částice, v je parciální specifický objem (reciproká hodnota hustoty částice), ρ je hustota média, f frikční koeficient (závisí na tvaru molekuly)
- $(1 - v\rho)$ vyjadřuje schopnost prostředí nadnášet částice
- Sedimentační koeficient se obvykle vyjadřuje v jednotkách: Svedberg (S); $S = 10^{-13}$ s.
- Čím je hodnota S nižší, tím pomaleji částice sedimentuje.
- Na tomto principu je založena **gradientová** nebo jinak **zonální centrifugace** vedoucí k oddělení částic na základě hodnoty jejich sedimentačních koeficientů.

- Hmotnost proteinů může být stanovena přímo z tzv. sedimentační rovnováhy při které se částice centrifugují nízkou rychlostí, tak, že sedimentace je v rovnováze s difúzí.
- Metoda je poměrně přesná a na rozdíl od SDS-PAGE nedenační při zachování kvartérní struktury.

Hodnoty S (Svedberg = 10^{-13} s) a molekulové hmotnosti některých proteinů

Protein	Hodnota S	Molekulová hmotnost
Cytochrom c	1, 83	12 310
Myoglobin	1, 97	17 800
Trypsin	2, 50	23 200
Malátdehydrogenasa	5, 76	74 900
Laktátdehydrogenasa	7, 54	146 200

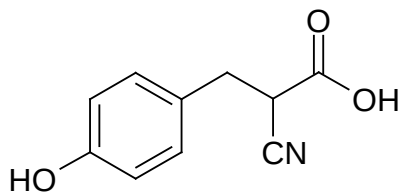
MALDI-TOF MS

(Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Time-of Flight-Mass Spectrometry)

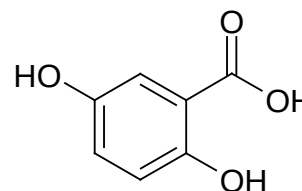
Princip metody:

- Proteinový vzorek je smíchán s matricí - tvorba krystalů
- Krystaly vystaveny laserovému paprsku - vznik nabitých iontů proteinu
- Ionty analyzovány v analyzátoru doby letu ($t \sim (m/z)^{1/2}$)

MATRICE PRO MALDI - organické látky zajišťující ionizaci látek



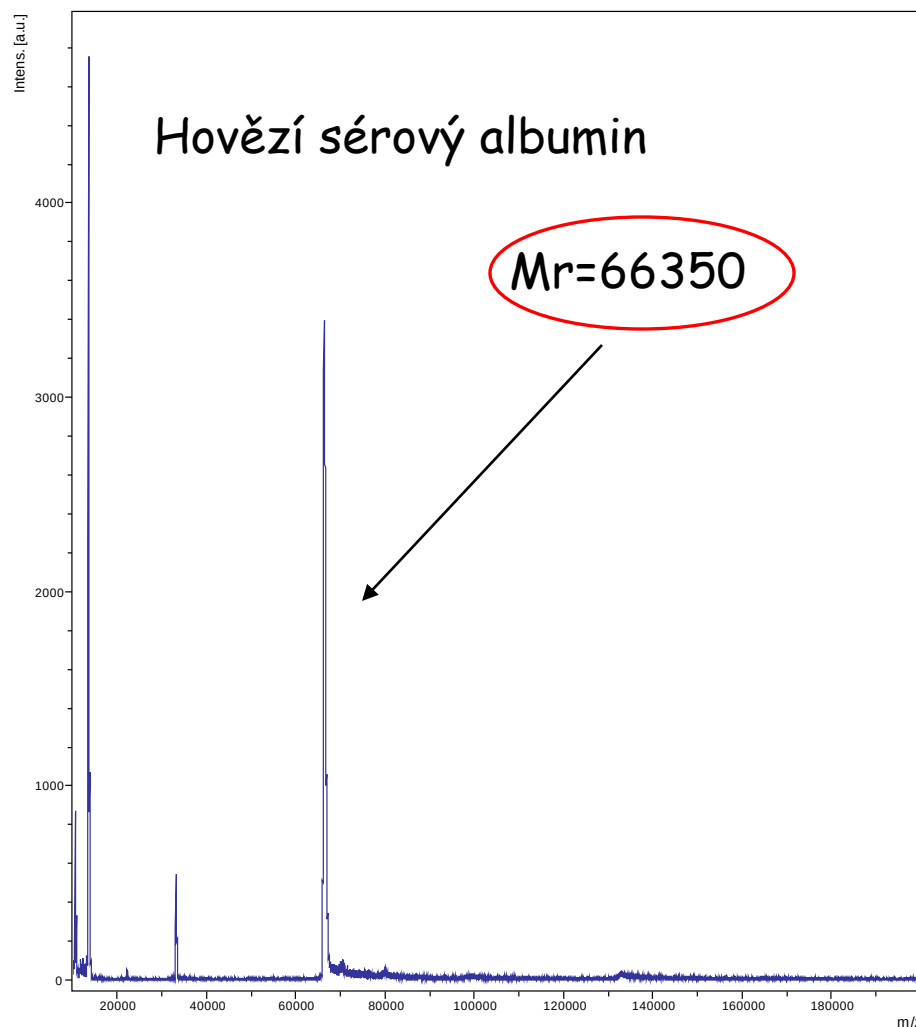
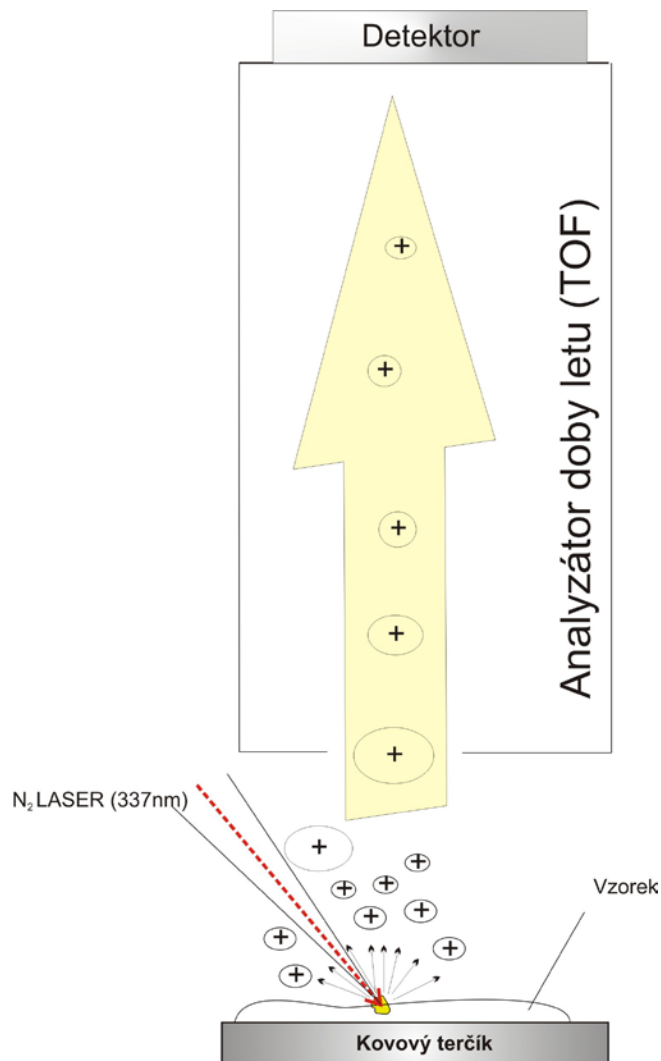
α -kyano-4-hydroxyskořicová kyselina



2,5-dihydroxybenzoová kyselina

MALDI-TOF MS

(Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Time-of Flight-Mass Spectrometry)



Strukturní typy proteinů

- 1. Primární struktura = sekvence aminokyselin (shodné s peptidy).
- 2. Periodické sekundární struktury: α -helix a beta skládaný list, otočky a smyčky.
- 3. Terciární struktura.
- 4. Kvartérní struktura.

- Ad 2.
- Pauling Linus a Corey Robert postulovali v roce 1951 dvě periodické struktury α -helix a beta skládaný list. Později byly objeveny další, sice neperiodické, ale všeobecně se vyskytující beta otočka a omega smyčka.

Charakteristika α -helixu

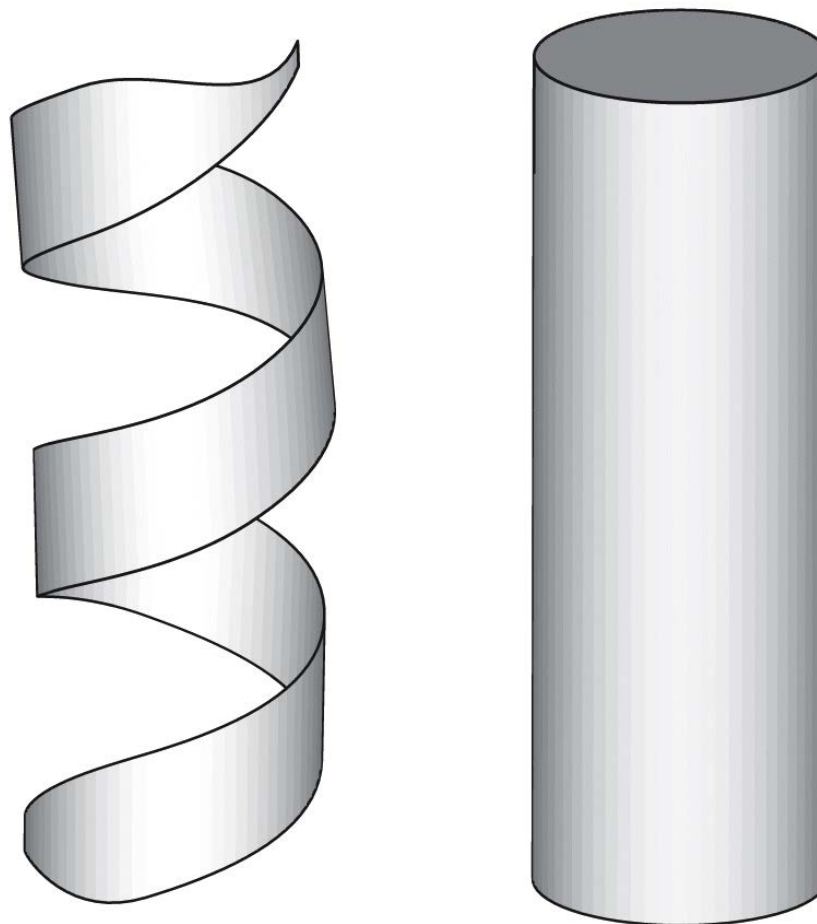
- Helikální struktura - šroubovice udržovaná vodíkovými vazbami.
 - Jeden závit tvoří 3,6 aminokyselinových zbytků a obsahuje 13 atomů, počínaje kyslíkem po vodík vodíkové vazby.
 - Proto označení: $3,6_{13}$ helix.
 - Každý aminokyselinový zbytek reprezentuje 0,15 nm. Celková délka závitu je $0,15 \times 3,6 = 0,54$ nm.
 - Vedlejší skupiny aminokyselin (R) směřují ven ze šroubovice.
 - Každý peptidový karbonyl je vázán vodíkovou vazbou na vzdálenou NH skupinu řetězce ($i + 4$).
 - Všechny vodíkové vazby jsou paralelní s osou šroubovice.
- α -helix takto definovaná má:

$$\phi = -60^\circ$$

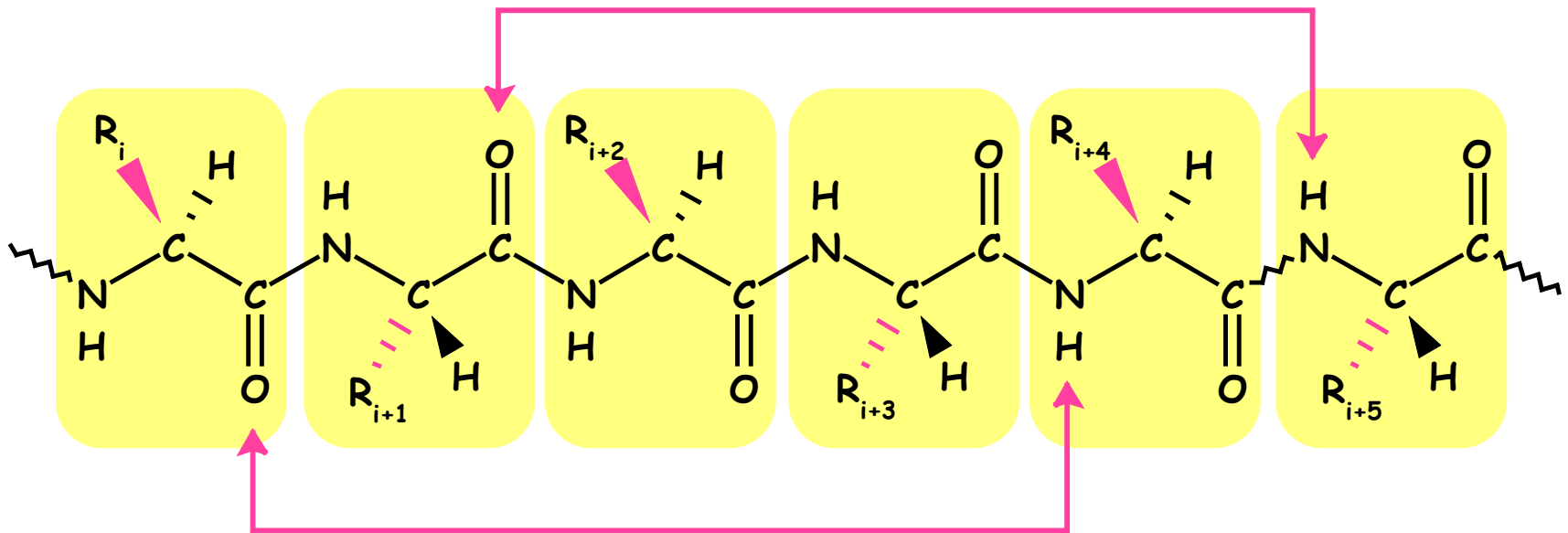
$$\psi \text{ v rozmezí } -45^\circ \text{ až } -50^\circ$$

- Peptidová vazba je vzhledem k polarizaci skupin NH a CO dipól. Dipólem je také celý peptid s pozitivním nábojem na N konci a negativním na C konci.
- Při pohledu shora na šroubovici je směr vinutí shodný se směrem chodu hodinových ručiček - α -helix pravotočivá.

Schematické znázornění α -helixu

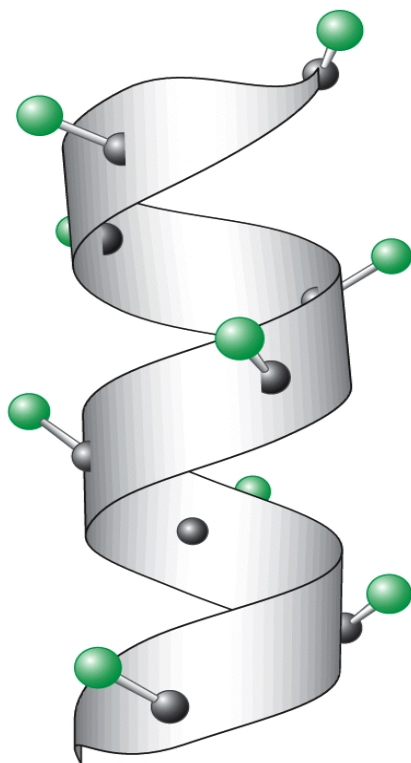


Vodíkové vazby v α -helixu. Skupina CO n-té aminokyseliny tvoří vodíkovou vazbu s NH skupinou aminokyseliny $n + 4$.

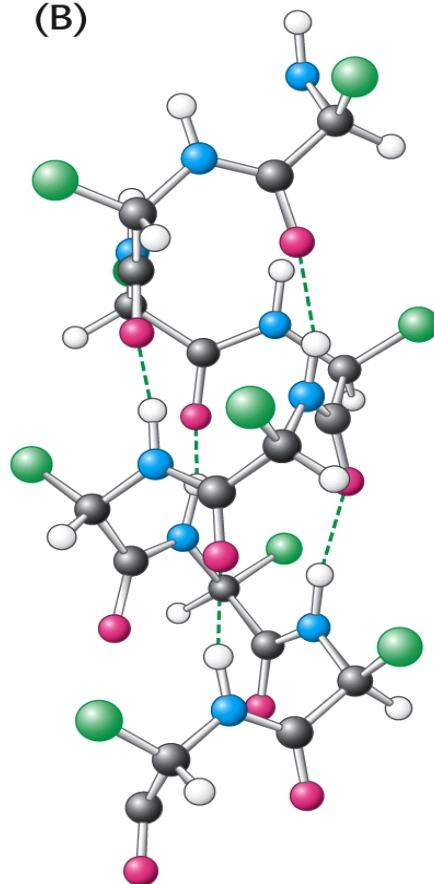


- A) Stuhké znázornění s α -uhlíky a vedlejšími skupinami aminokyselin.
 B) Boční kuličkový model znázorňuje vodíkové vazby. C) Pohled shora.
 D) Kalotový model.

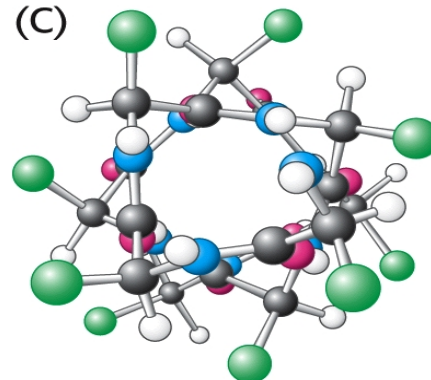
(A)



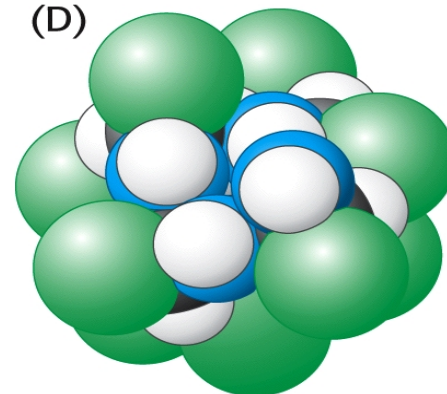
(B)



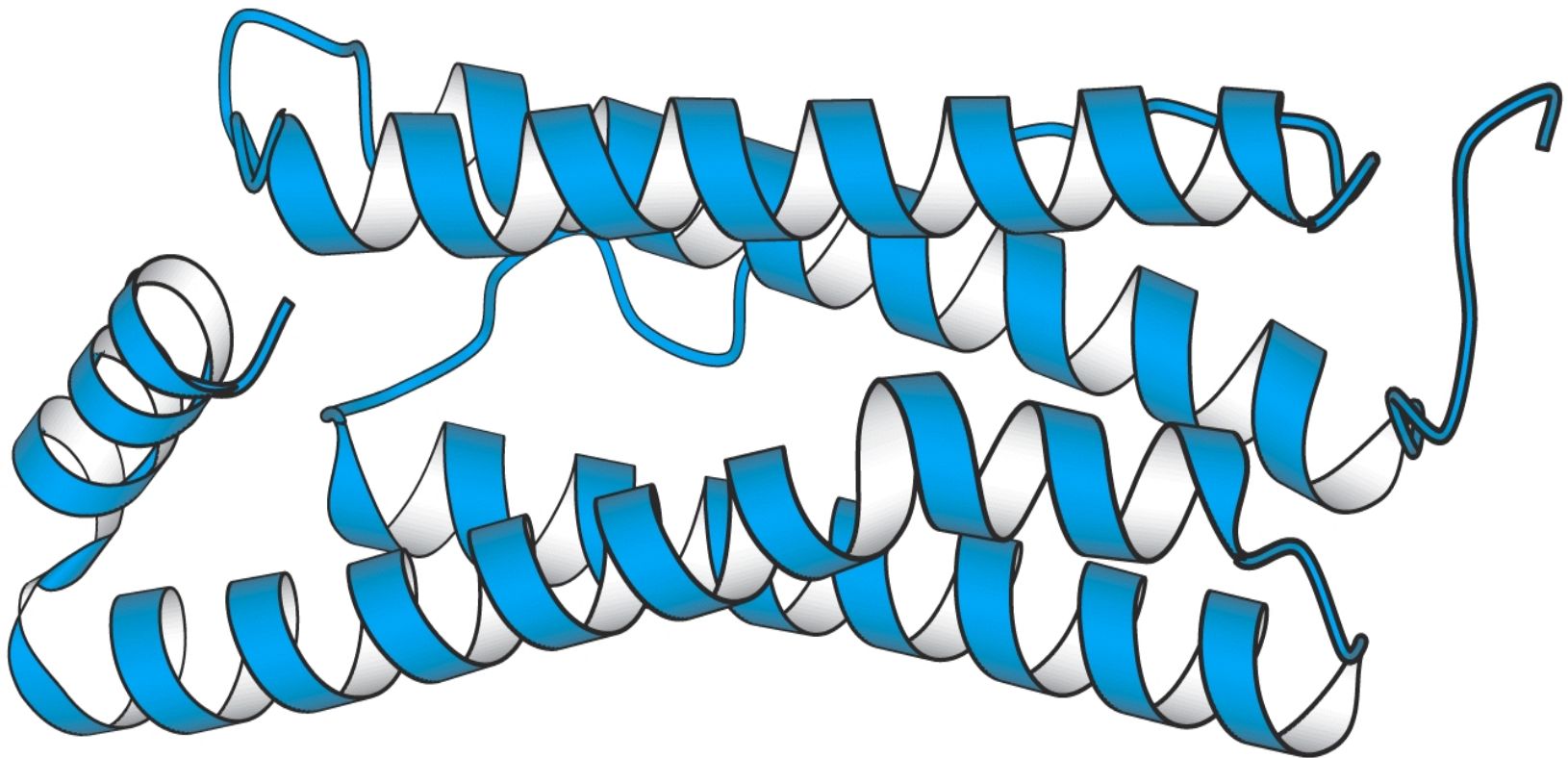
(C)



(D)



Znázornění α -helikální struktury.
Konkrétní protein je tvořen svazkem α -helixů.

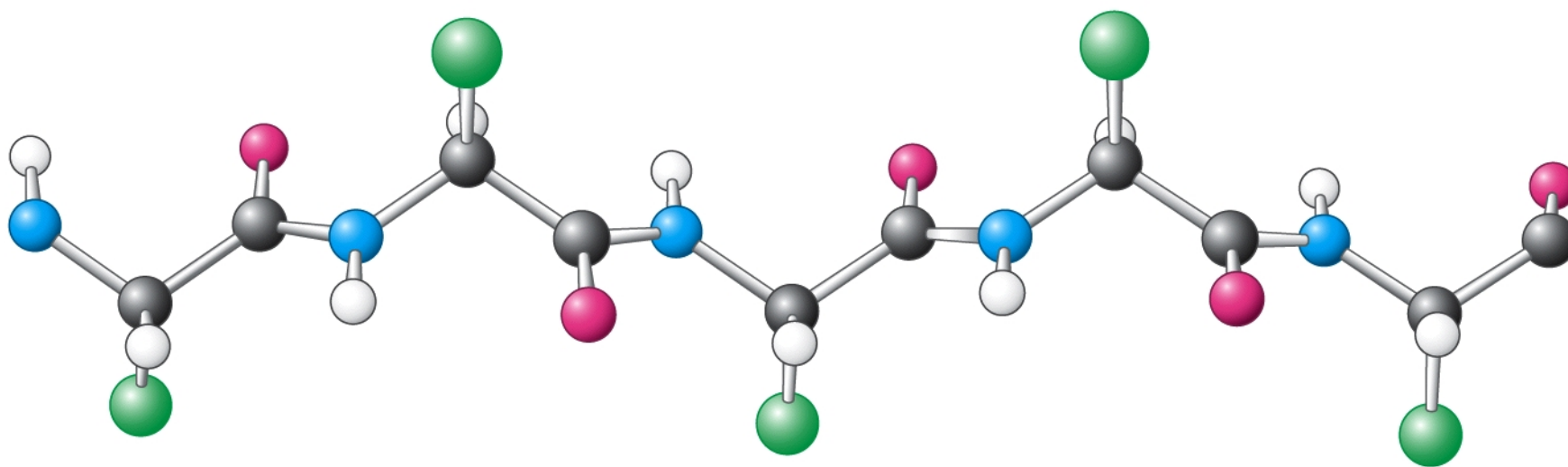


Charakteristika β -skládaného listu

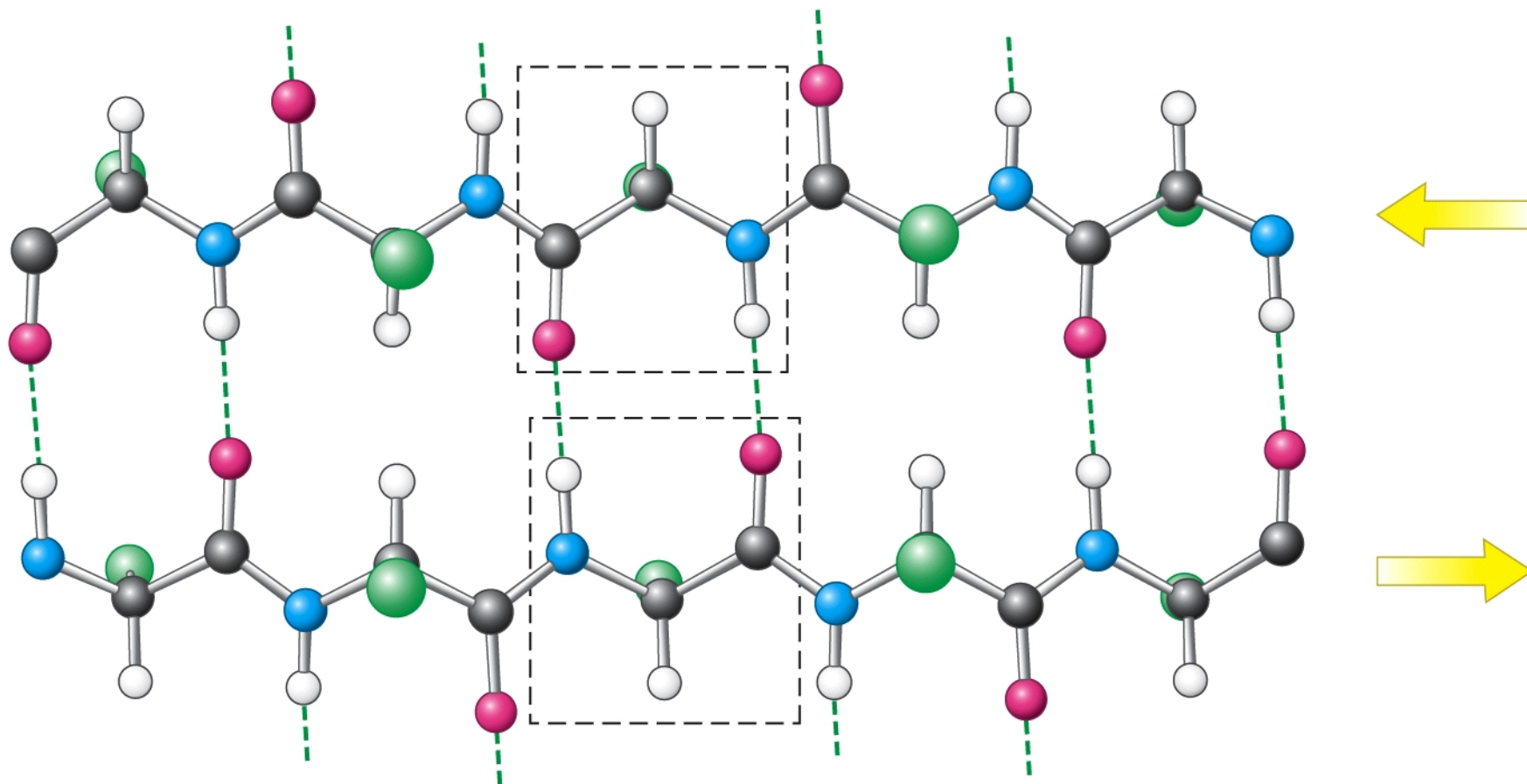
- Struktura dostala název podle pořadí ve kterém byla popsána.
- Stéricky jsou obě formy beta listu daleko volnější. Vzdálenost mezi sousedními aminokyselinami je 3,5 Å, zatímco u helixu jen 1,5Å.
- Vedlejší řetězce sousedních aminokyselin směřují na opačné strany.
- Beta list je tvořen spojením dvou nebo více beta řetězců vodíkovými vazbami. Sousední řetězce mohou jít proti sobě - **antiparalelní**, nebo souběžně - **paralelní**.
- V případě **antiparalelního beta listu** jsou NH a CO skupiny každé aminokyseliny spojeny vodíkovou vazbou s CO a NH skupinami partnerského řetězce přímo.
- V **paralelní struktuře** je vazba NH skupiny aminokyseliny jednoho řetězce na CO skupinu aminokyseliny sousedního řetězce posunuta.

Struktura beta listu.

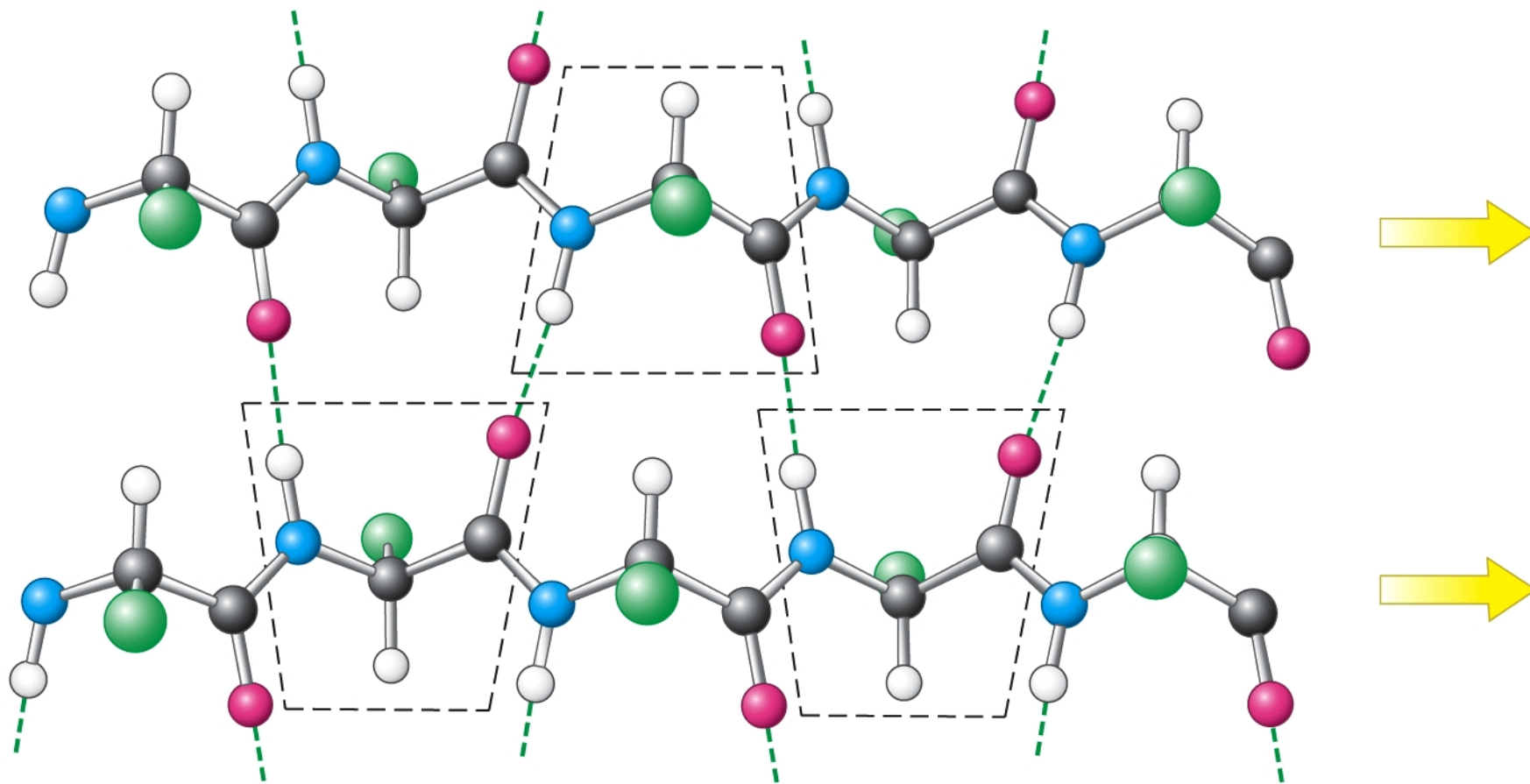
Vedlejší skupiny (zelené) sousedních aminokyselin směřují na opačnou stranu.



Antiparalelní beta list

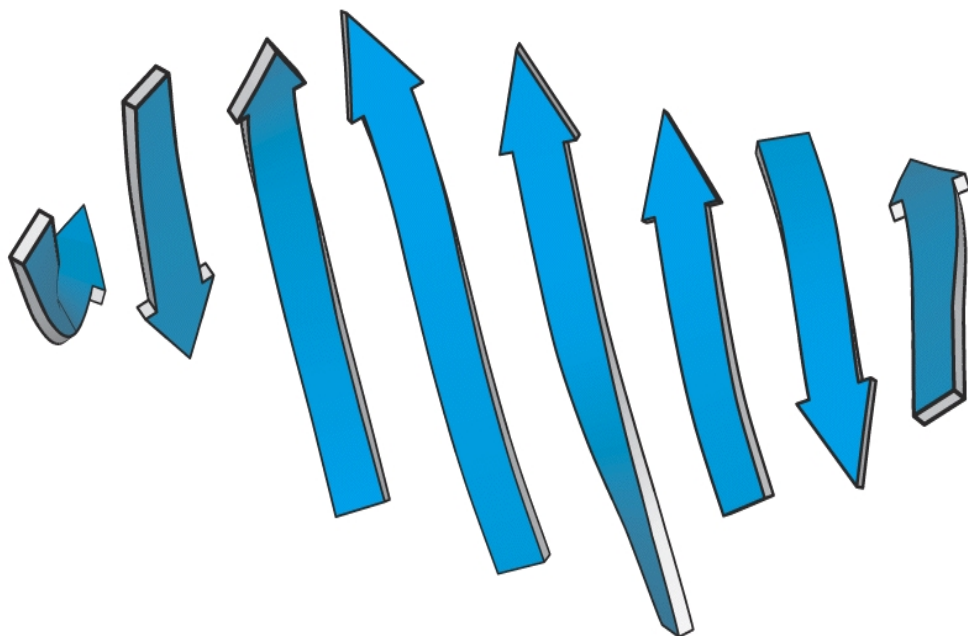


Paralelní beta list

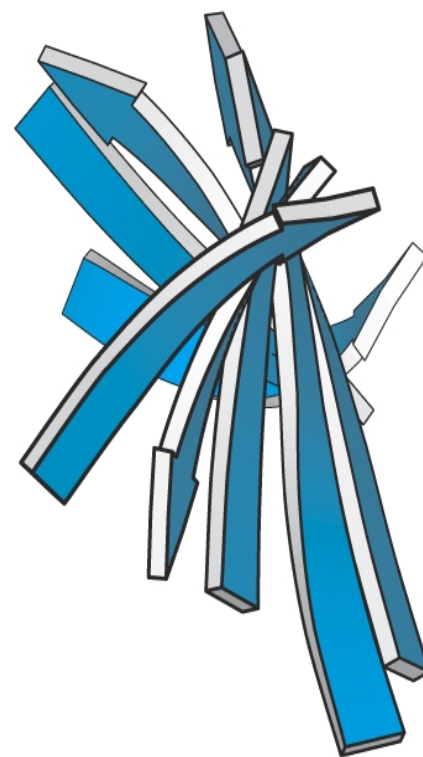


Schematický model beta listu

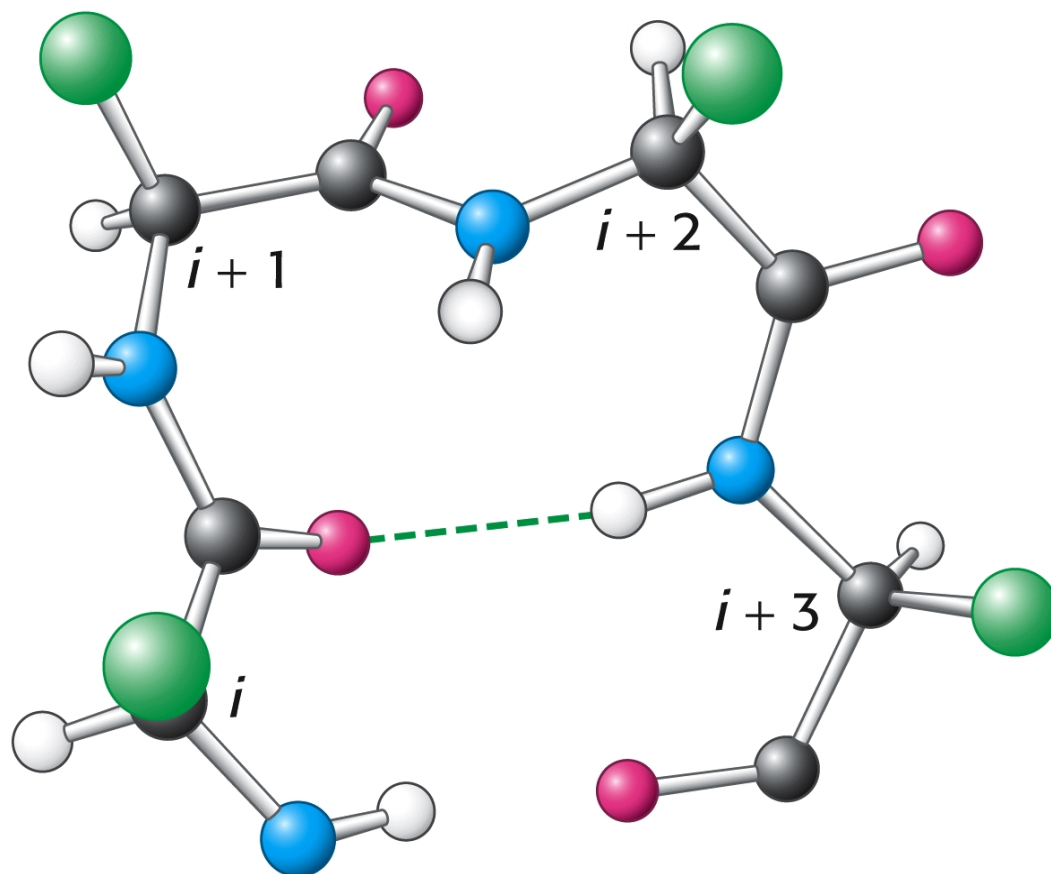
(B)



(C)

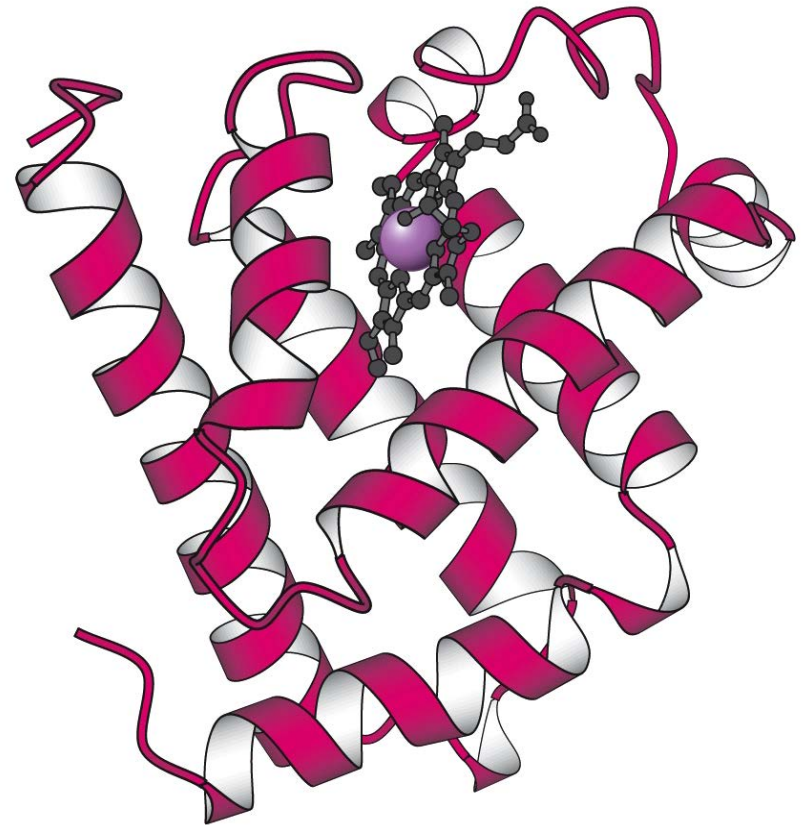


Proteiny obsahují zpětné klíčky (beta klíčky nebo vlásenkové ohyby). Obvykle je CO skupina i -té aminokyseliny vázána vodíkovou vazbou s aminokyselinou $i + 3$. Nazývají se také omega smyčka.



Terciární struktura

- Třírozměrná struktura, obvykle funkčního proteinu. Složena z domén - α -helikální, beta listu a smyček.
- Např. myoglobin - obsahuje neproteinovou složku hem (prosthetická skupina).
- Více než 70 % hlavního řetězce myoglobinu je složeno z 8 α -helixů a zbytek tvoří smyčky mezi helixy.

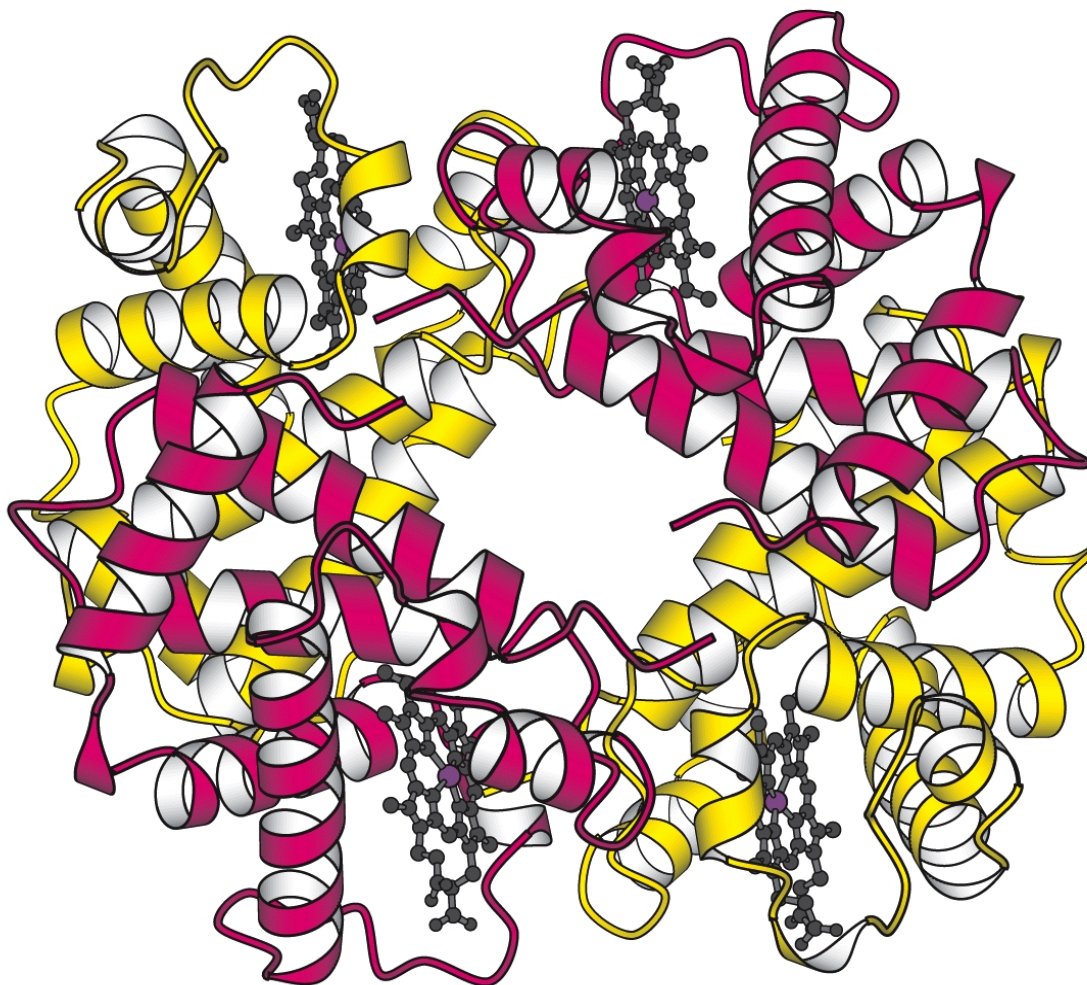


Kvarterní struktura

- Kvarterní struktura vzniká sdružením polypeptidových řetězců (obvykle kvarterních struktur) do multipodjednotkové struktury.
- Mohou tak vznikat dimery, tetramery atd. Podjednotky mohou být shodné - homomery nebo různé heteromery.
- Příkladem je hemoglobin, který má kvarterní strukturu složenou ze čtyř podjednotek. Dvou α a dvou β . Hemoglobin existuje jako $\alpha_2\beta_2$ teramer.
- Tvorba kvarterní struktury hemoglobinu má význam a funkci při přenosu kyslíku z plic do tkání. Později porovnáme rozdíl mezi přenosovou schopností svalového myoglobinu a krevního hemoglobinu.

Tetramer $\alpha_2\beta_2$ lidského hemoglobinu.

Dvě identické podjednotky α (červeně) a dvě identické podjednotky β (žlutě). Molekula obsahu čtyři skupiny hemu.

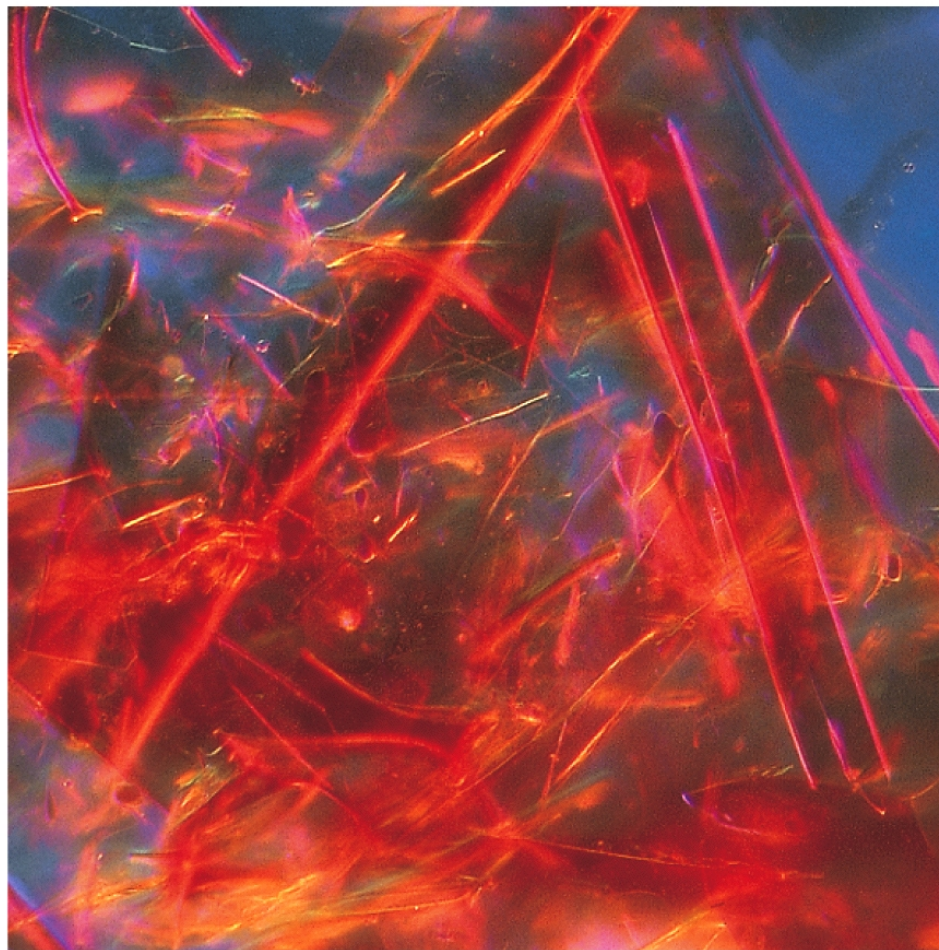


Principy určení třírozměrné struktury proteinů pomocí NMR spektroskopie a rentgenové krystalografie.

- **Nukleární magnetická rezonanční spektroskopie** určuje strukturu proteinů v roztoku. Nutné jsou koncentrované roztoky proteinů (např. 1 mM, nebo $15 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ pro 15 kD protein).
- Princip: Technika je založena na skutečnosti, že jádra určitých atomů vykazují magnetické vlastnosti, spin. Obvykle se měří protonová spektra nebo spektra ^{13}C . Spiny těchto atomových jader jsou ovlivňovány okolím. Provedení a interpretace výsledků je velmi složité a přístrojově náročné. ($1 \text{ Å} = 10^{-8} \text{ m}$)
- **Rentgenostrukturní analýza (krystalografie)** vyžaduje protein v podobě monokrystalu, zdroj rentgenových paprsků a detektor.
- A) Krystalovat proteiny je velmi náročná a složitá záležitost. Např. myoglobin krystaluje z roztoku 3 M síranu amonného.
- B) Zdroj rentgenového paprsku o vlnové délce $1,54 \text{ Å}$ se získá působením rychlých elektronů na měděnou destičku.
- C) Paprsek procházející rotujícím krystalem vytváří difrakční obrazec, který se zachytí detektorem.
- Z hustoty a intenzity difrakčních stop se sestavuje obrazec třírozměrné struktury proteinu.
- Do současnosti je známa struktura více jak 10 000 proteinů. Koordináty struktur se shromažďují v Protein Data Bank (www.rcsb.org/pdb).

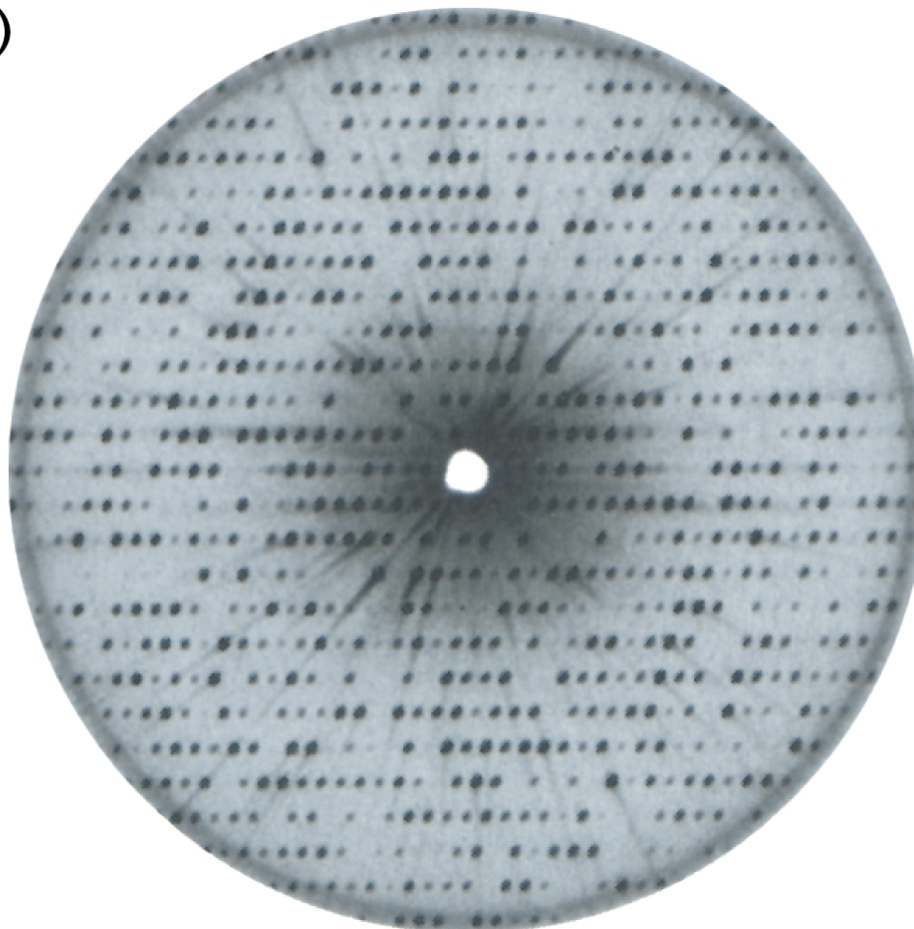
Krystaly myoglobinu

(A)

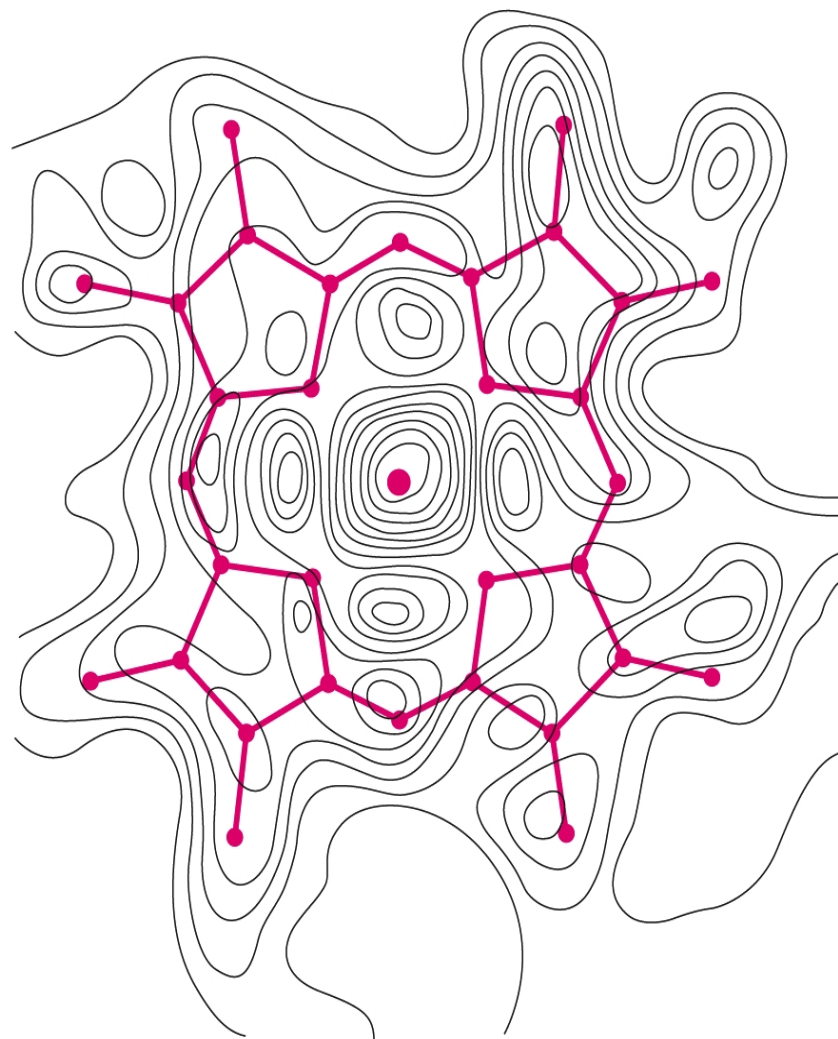


Rentgenový difrakční snímek myoglobinu

(B)

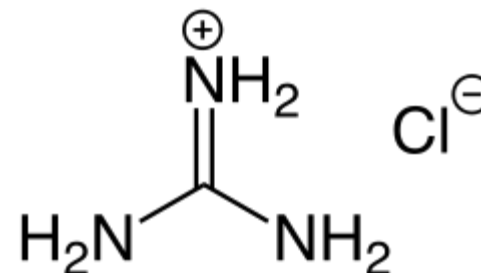


Část mapy elektronové hustoty myoglobinu – hem



Chaotropní látky - chaotropy.

- **Chaotropní látky** ruší třírozměrnou (3D) strukturu proteinů a nukleových kyselin.
- Destabilizací a rušením vodíkových vazeb dochází k denaturaci makromolekul.
- Močovina v koncentraci od 6 - 8 Mol/L
- Thiomočovina 2 Mol/L
- Chloristan lithný 4,5 Mol/L
- Guanidinium chlorid (GndCl) 6 Mol/L

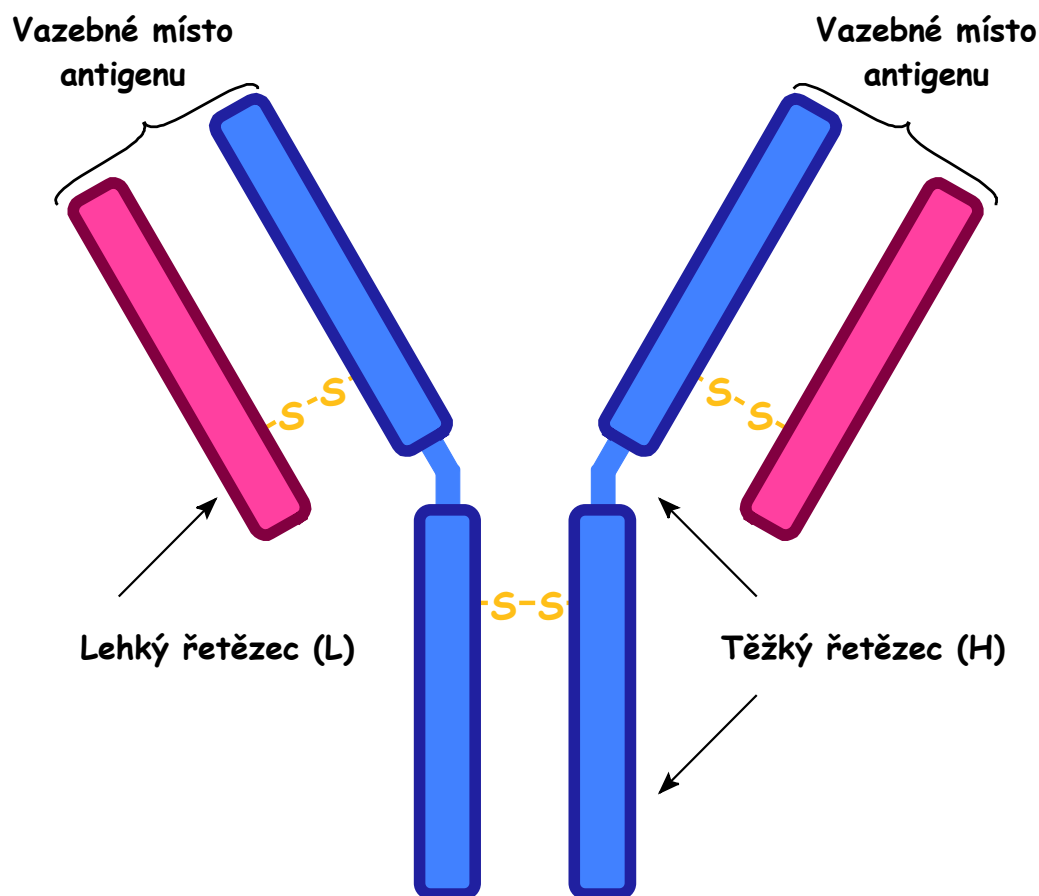


Základní pojmy imunologie

- Imunologické metody slouží k purifikaci proteinů, jejich lokalizaci v buňce a kvantifikaci.
- Imunologie je založena na tvorbě protilátky proti specifickému proteinu.
- **Protilátka** (také imunoglobulin, Ig) je protein syntetizovaný živočichy jako odezva na přítomnost cizí látky zvané **antigen**.
- Tento proces slouží jako obrana živočichů před infekcí.
- Protilátky vyvolávají tvorbu specifických antigenů.
- Antigeny mohou být proteiny, polysacharidy a nukleové kyseliny.
- Protilátka rozpoznává specifické skupiny aminokyselin na velké molekule antigenu. Toto místo se nazývá **antigenní determinant** nebo **epitop**.
- Malé cizí molekuly jako syntetické peptidy mohou také vyvolávat tvorbu protilátek. Nazývají se **hapteny**.

Struktura protilátky

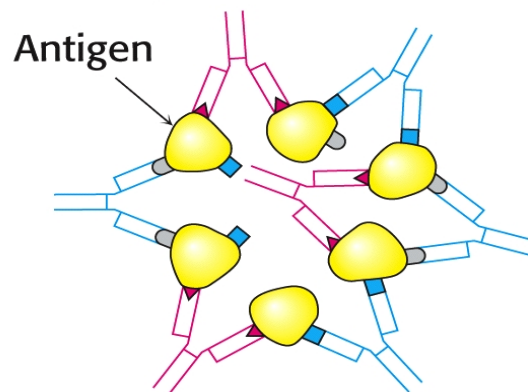
IgG se skládá ze čtyř řetězců. Dvou těžkých (heavy, H) a dvou lehkých (light, L) spojených disulfidovými vazbami. Těžké a lehké řetězce tvoří doménu, která má na koncích vazebná místa pro antigen.



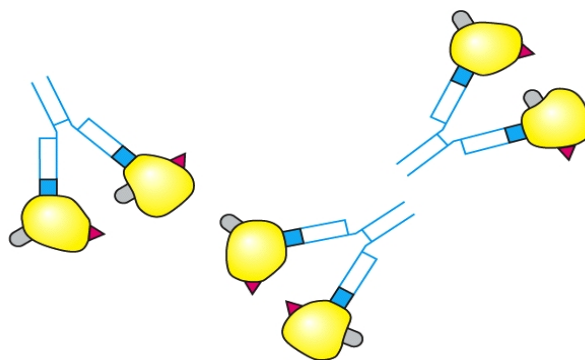
Polyklonální a monoklonální protilátky.

Většina antigenů má více epitopů. Polyklonální protilátky jsou proto heterogenní směsí protilátek, kde je každá specifická na různé epitopy antigenu. Monoklonální protilátky jsou všechny identické produkované klony jednotných protilátky produkujících buněk. Rozpoznávají jeden epitop.

Polyclonal Antibodies



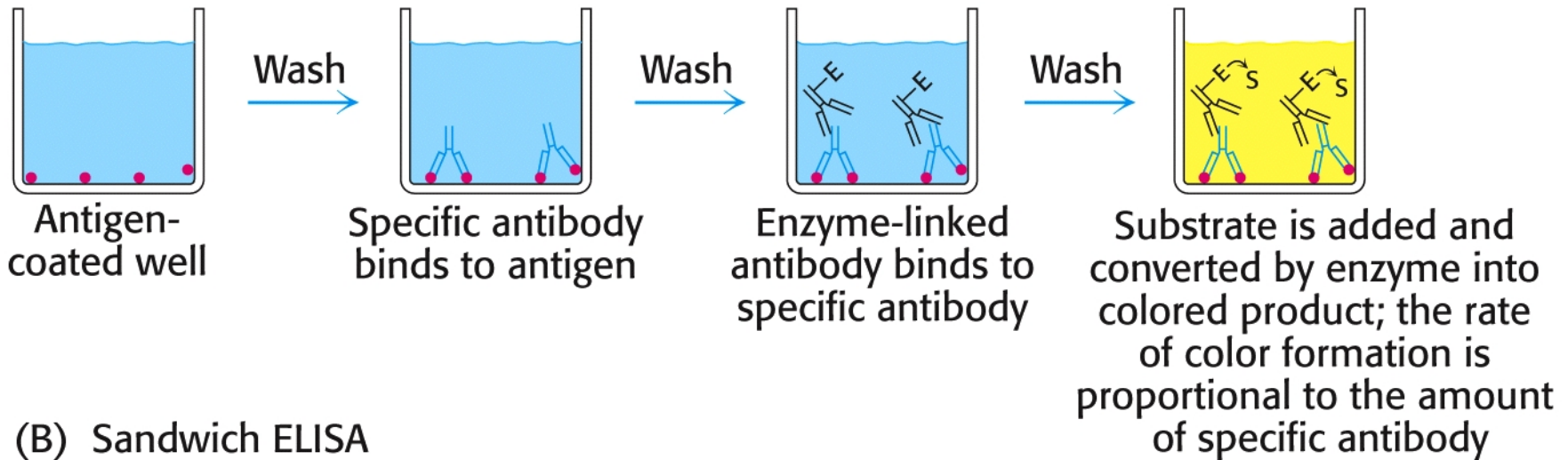
Monoclonal Antibodies



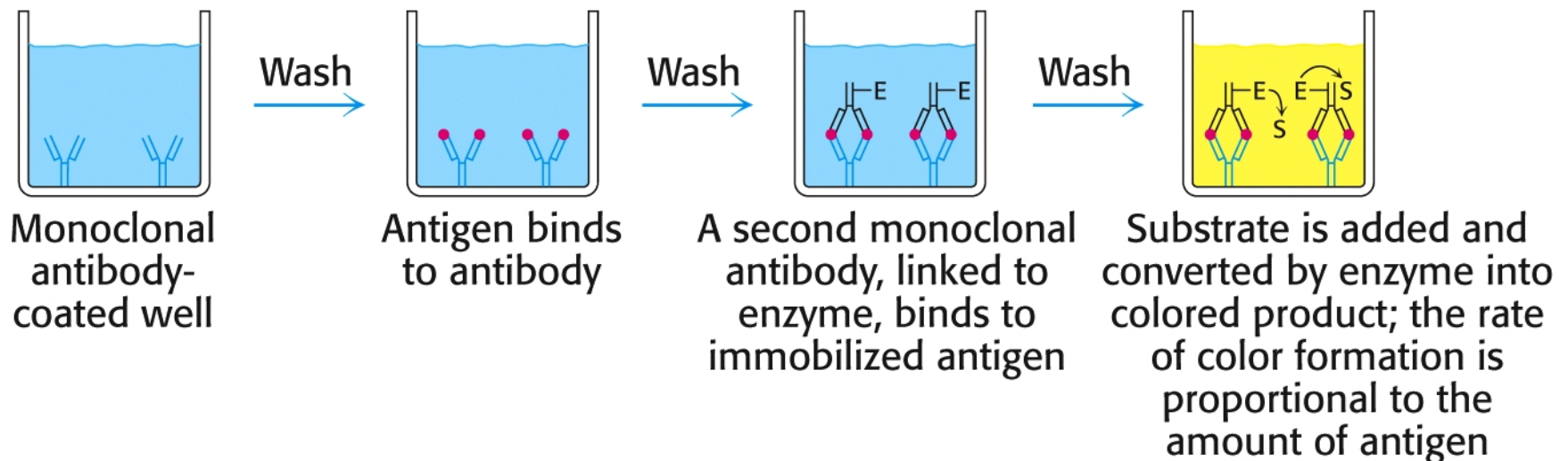
Využití tvorby protilátek ke kvantifikaci proteinů na bázi testů ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)

- A) **Nepřímá ELISA** se využívá k detekci přítomnosti protilátek (např. k detekci infekce HIV).
- Princip: Antigen (virový protein) se naváže na stěny zkumavky. Pacientovo sérum obsahující protilátky se nechá navázat na antigen. Přidají se specifické protilátky (živočišné) proti lidským protilátkám obsahující navázaný enzym (křenová peroxidasa). Nakonec se přidá substrát enzymu a vyvolá se barevná reakce.
- B) **Sendvičová ELISA** umožňuje jak detekci, tak kvantifikaci antigenu.
- Princip: Na stěny zkumavky se naváže protilátka. Po přidavku krevního séra obsahujícího antigen. Antigen se naváže na protilátku. Přidáme druhou protilátku proti antigenu na které je navázán enzym (obvykle křenová peroxidasa). Po přidavku substrátu se objeví zbarvení úměrné množství přítomného antigenu.

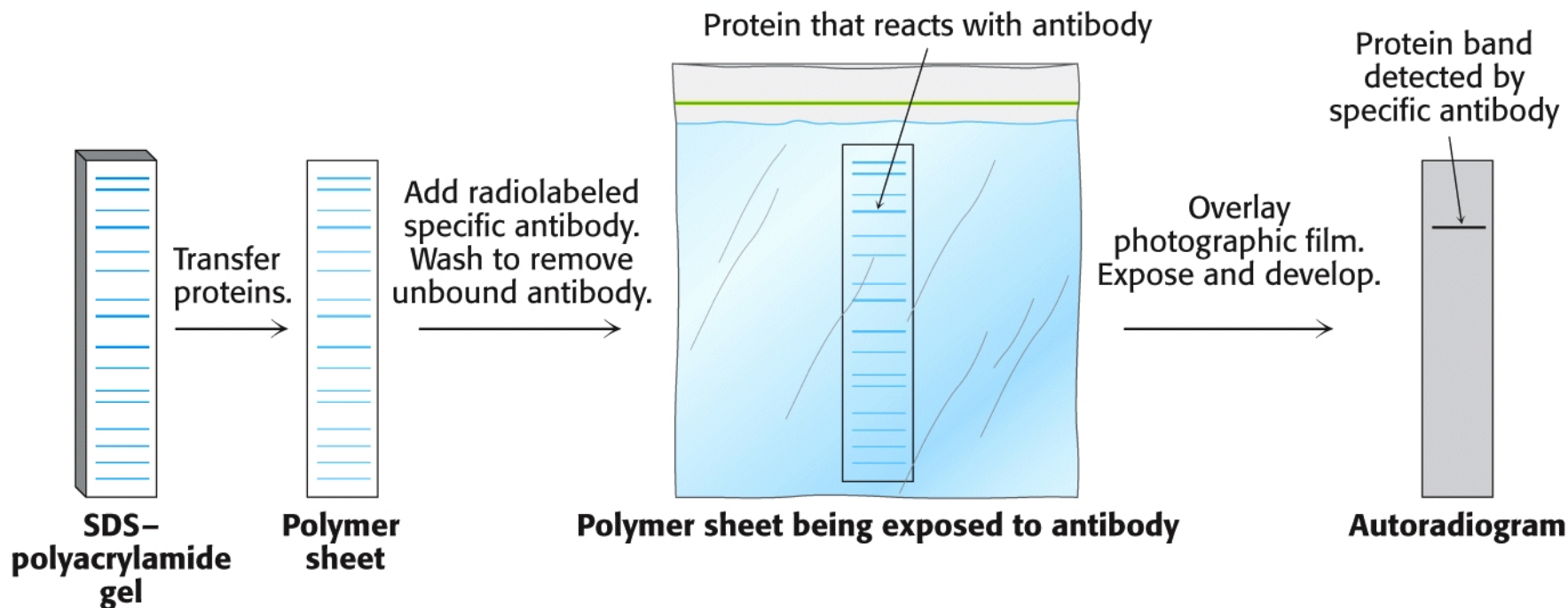
(A) Indirect ELISA



(B) Sandwich ELISA



Metoda Western blotting umožňuje detekovat malá množství proteinů gelovou elektroforézou. Po elektroforéze se zkopírují proteiny na list polymeru, kde reagují s radioaktivní protilátkou. Pás odpovídající proteinu na který se navázala protilátka se objeví na autoradiogramu.



Předmět a obor biochemie

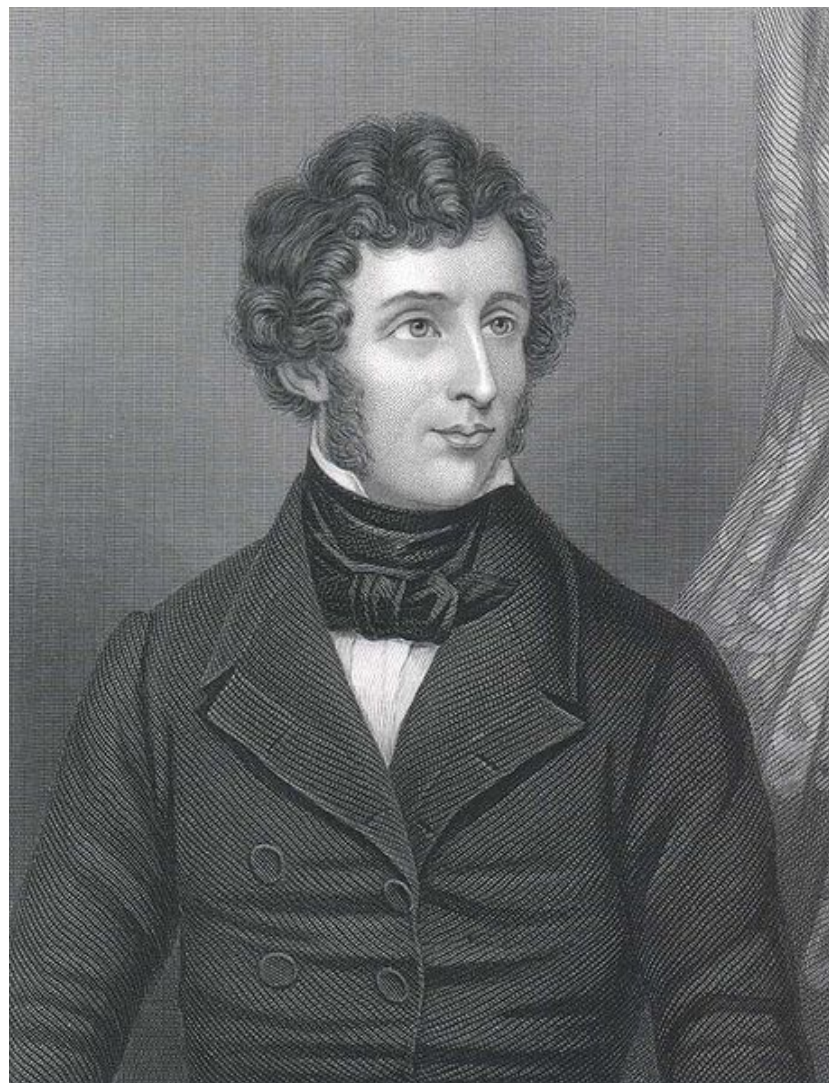
- Definice:
- Biochemie studuje biologické objekty chemickými metodami. Molekulární úroveň.
- Etapy vývoje biochemie:
- A) Biochemie statická - řešení struktur biologických objektů (proteiny, sacharidy, lipidy,.....)
- B) Biochemie dynamická - metabolismus (intermediární metabolismus). Studium reakcí a vzájemných vztahů sloučenin v rámci buňky a celého organismu (bazální metabolismus). Převratná role enzymů.
- C) Přenos informace, regulace metabolických pochodů. Odštěpení „Molekulární biochemie, molekulární genetiky“.

- Vztah a souvislost biochemie s ostatními chemickými, biologickými a medicínskými obory.
- **Chemie**
- Anorganická chemie (Bioanorganická chemie)
- Organická chemie
- Fyzikální chemie
- Analytická chemie
- **Biologie**
- Biologie buňky
- Fyziologie (bakteriální, savčí, rostlinná, obecně živočišná, atd.)
- Genetika
- Biochemie podle předmětu zkoumání: Lékařská, klinická, potravinářská, atd.

Kořeny biochemie

- F. Wöhler - 1828 - syntéza močoviny z anorganických látek
- Bratři Eduard a Hans Buchnerové - 1897 - bezbuněčný extrakt z kvasinek katalyzuje fermentaci (reakce „in vitro“).
- J. B. Sumner - 1926 - krystaluje enzym ureasu, protein z luštěniny *Canavalia ensiformis*
- Současný rozvoj biologie buňky
- Historický pohled na úlohu deoxyribonukleové kyseliny (DNA) v buňce
- Objev 1869 F. Miescher; 1953 - James Watson a Francis Crick - struktura DNA - start molekulární biologie.

Friedrich Wöhler (31. červenec 1800 Eschersheim u Frankfurtu - 23. září 1882 Göttingen)



Friedrich Wöhler

- **Friedrich Wöhler** (31. červenec 1800 Eschersheim u Frankfurtu - 23. září 1882 Göttingen) byl významný německý chemik, známý hlavně svou syntézou močoviny.
- V roce 1823 dokončil svá studia medicíny v Heildebergu a díky Leopoldu Gmelinovi (tamním profesor chemie, biologie a objevitel kyanoželezitanu draselného) potom působil pod Jönsem Jacobem Berzeliem (švédský anorganický chemik, představitel vitalistické teorie) ve Stockholmu. Následně pracoval a vyučoval chemii na polytechnice v Berlíně (konkrétně od 1825 do 1831). Potom byl až do roku 1836 umístěn na vyšší polytechnickou školu v Casselu a později se stal profesorem chemie na Univerzitě v Göttingenu (Georgia Augusta University of Göttingen), kde pracoval až do své smrti.
- Největší význam má Wöhlerova práce v oblasti organické chemie, roku 1828 se mu podařilo syntetizovat zahříváním kyanatanu amonného močovinu, látku pomocí níž vylučují savci ze svého těla nepotřebný dušík, což je dnes považováno za milník konce vitalistických představ. V tehdejší době převládal názor označovaný jako vitalismus, který tvrdil, že ke vzniku organických látek je třeba jakási vitální síla (lat. vis vitalis, fran. Élan vital) a nelze je z tohoto důvodu uměle připravit v laboratoři. Mezi zastánce této teorie patřili Jöns Jacob Berzelius a francouzský chemik Gerhardt. Berzelius tento názor vyslovil ve svém díle z roku 1807 a jako první se pokusil shrnout tehdejší poznatky a vysvětlit odlišnosti látek izolovaných z živé přírody. Vitalistická teorie byla v souladu s tehdejším převládajícím názorem, v němž dominovala církevní ideologie a lidskému poznání nedostupné síly. Ale již v roce 1783 se Scheelemu podařilo připravit kyanovodík a Gay-lussacovi dikyan, z něhož pak Wöhler připravil roku 1824 kyselinu šťavelovou - v podstatě lze říct, že

- syntetizovat organické látky bylo možné již před Wöhlerovou syntézou močoviny, a tak se vitalisté museli bránit proti každému experimentu, který prokazoval nesprávnost jejich teorie. Po Wöhlerově úspěchu se dokonce uchýlili k tvrzení, že močovinu nelze považovat za „pravou organickou“ sloučeninu, jelikož jde jen o odpadní produkt živého organismu. Nicméně ani sám Wöhler, který sice připisoval syntéze močoviny značný význam, ale spíš díky skutečnosti, že šlo o syntézu organické sloučeniny z anorganické látky, ji nepovažoval za dostatečný argument vyvracející platnost vitalistické teorie. Ke konečnému odmítnutí vitalistické teorie tak došlo později v důsledku syntéz dalších organických sloučenin jako byla např. syntéza kyseliny octové provedená Kolbem roku 1845 nebo Berthelotovy syntézy methanu, kyseliny mravenčí, ethynu a benzenu během let 1855 až 1867.
- Zjištěním, že kyanatan amonný se může přeměnit na močovinu vnitřní změnou struktury atomů bez změny hmotnosti, Wöhler prokázal jeden z prvních a nejlepších příkladů izomerie. Dva roky po syntéze močoviny, v roce 1830, Wöhler publikuje společně s Justem von Liebigem výsledky výzkumu o kyselině kyanurové, kyanaté a močovině. Berzelius ji ve své zprávě pro Královskou švédskou akademii věd shledal nejvýznamnějším výzkumem toho roku. Výsledky byly na tehdejší dobu trochu nečekané a podaly další důkazy ve prospěch izomerie.
- Wöhler spolu s Liebigem zkoumal také benzoylové sloučeniny. Jejich práce objasnily teorii radikálů a substituce v chemických sloučeninách.
- Wöhler byl také spoluobjevitelem beryllia, křemíku, karbidu vápníku a mnoha dalších prvků. Za zmínku stojí jeho objev hliníku. Wöhler ho získal z oxidu hlinitého, přestože se před ním o to samé bez úspěchu pokoušeli Davy, Oerstedt a Berzelius. Dále se mu podařilo izolovat yttrium, beryllium a zjistil, že křemík může být získán ve formě krystalů. V dalších letech přispěl svými pokusy k objevu titanu, vanadu, niobu, tantalu i uranu. Dále uspěl při pokusu získat čistý nikl a se dvěma svými přáteli založil v Casselu továrnu na jeho výrobu. Studoval také chinony, alkaloidy i acetylen.
- Wöhler se navíc zabýval výzkumem meteoritů. Provedl analýzu mnoha z nich a zjistil, že několik z nich obsahuje organické látky. Vlastnil velmi rozsáhlou soukromou sbírku meteoritů a mnoho let psal o meteoritech pro Jahresbericht der Chemie.

Friedrich Wöhler

- Během stáže u Berzelia ve Stockholmu se Wöhlerovi podařilo připravit sloučeninu kyanatan stříbrný. V téže době jeho krajan a později nejlepší přítel Liebig připravil během stáže v Paříži třaskavou sloučeninu, kterou příhodně nazval fulminan stříbrný (fulminare je latinsky blýskati se). Analýzou pak zjistil, že jeho molekula obsahuje stejný počet stejných atomů jako Wöhlerův kyanatan!
Dnes víme, že kyanatan a fulminan (izokyanatan) jsou chemické izomery, tedy sloučeniny ze stejného množství a druhu atomů, ale jinak uspořádaných (první má vzorec **AgOCN**, druhý **AgNCO**). Tehdy to byla záhada.

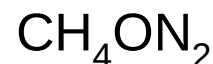
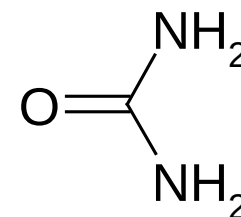
Friedrich Wöhler

- Wöhler, v tu dobu již učitel berlínské průmyslové školy, se tedy pouští do dalšího výzkumu svých kyanatanů stříbrných a snaží se z nich všelijak vyrobit Liebigův třaskavý izomer. Když se počátkem roku 1828 pokouší z kyanatanu stříbrného a chloridu amonného získat kyanatan amonný, získává zcela mu nepodobné třpytivě bílé krystalky, ve kterých identifikuje svou starou známou z dob studií - močovinu... Vida, ze sloučeniny anorganické vznikla látka organická !

Kyanatan amonný



močovina



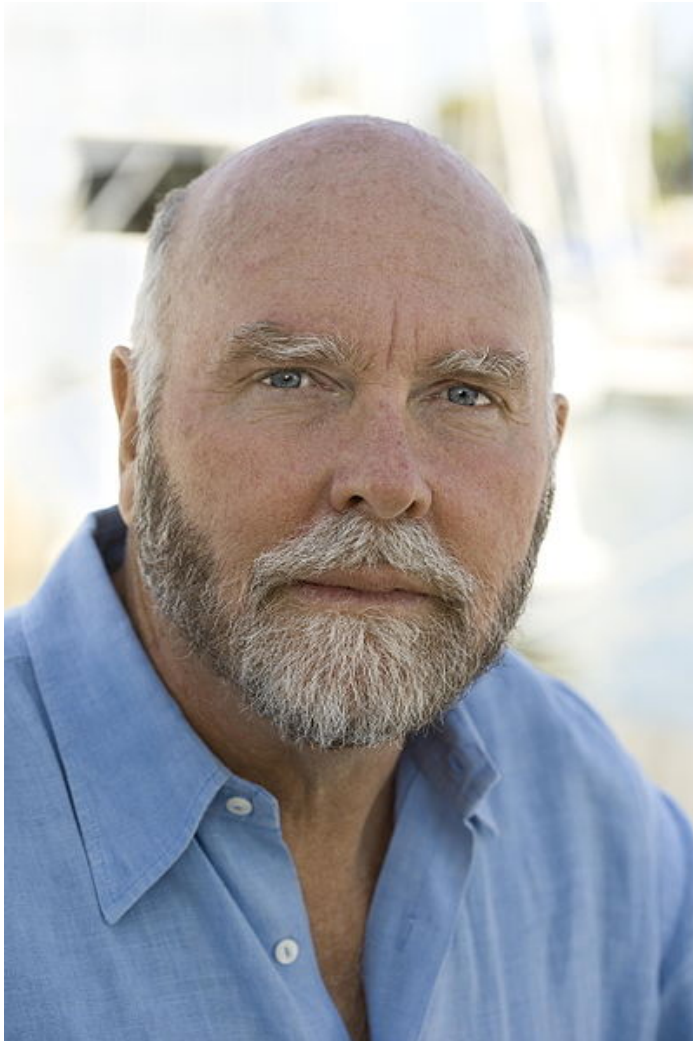
Současnost a budoucnost

- Konstrukce první knihy života.
- V únoru 2008 americký biochemik Craig Venter oznámil, že se jeho týmu (pěti stovkám špičkových odborníků) podařilo syntetizovat genom, tedy kompletní dědičnou informaci bakterie *Mycoplasma genitalium*. Genom tohoto jednoduchého organismu obsahuje asi 580 000 písmen genetického kódu, každé z těchto písmen (nukleotidů) sestává ze šesti molekul (čtyř organických a dvou anorganických).

Jak to venterovci dokázali? Samo sebou napřed ten genom důkladně přečetli. Pak syntetizovali z jednotlivých nukleotidů články dlouhé asi 6 000 písmen. Ty potom spojovali ve stále delší řetězce, až dostali čtyři už dlouhé úseky DNA. Ty vnesli do těla kvasinky, která je zkompletovala v úplný, ale umělý genom mykoplazmy.

Dalším Venterovým cílem - prozatím - zřejmě bude vytvořit v přírodě se nevyskytující mikroorganismy. S člověku užitečnými vlastnostmi - tyto umělé bakterie budou třeba rozkládat vodu na vodík a kyslík nebo zkvašovat biologický odpad na butylalkohol k pohonu spalovacích motorů.

J. Craig Venter (born **John Craig Venter** October 14, 1946, Salt Lake City, Utah)



- Venter is currently the president of the J. Craig Venter Institute, which conducts research in synthetic biology. In June 2005, he co-founded Synthetic Genomics, a firm dedicated to using modified microorganisms to produce clean fuels and biochemicals. In July 2009, ExxonMobil announced a \$600 million collaboration with Synthetic Genomics to research and develop next-generation biofuels. Venter used his sloop (člun Čaroděj II), *Sorcerer II*, in the Global Ocean Sampling Expedition to help assess genetic diversity in marine microbial communities.