

NBCM010

Bioorganická chemie

Proteiny

Kateřina Hofbauerová

s použitím materiálů z:
D.L.Nelson, M.M.Cox: Lehninger Principles of Biochemistry. 2008 W.H. Freeman & Co.

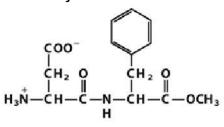


Struktura protein a metody jejich studia

- struktura protein
 - primární
 - sekundární
 - terciární
 - kvartérní
- funkce protein
- rozdělení protein
- vlastnosti protein
- metody studia protein

Složení a velikost biologicky aktivních peptidů a proteinů je nesmírně variabilní...

Průměrná Mr AA v proteinu je 110 (volná 128), jinak průměr MW všech AA je 138, zdá se tedy, že malé AA považují...



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

200x sladší než sacharóza

Unpublished work of the Department of Biochemistry, FAMU, Prague, Czech Republic. © 2008 W.H. Freeman and Company

Amino acid	Number of residues per molecule of protein*	
	Bovine cytochrome c	Bovine chymotrypsinogen
Ala	6	22
Arg	2	4
Asn	5	15
Asp	3	8
Cys	2	10
Gln	3	10
Glu	9	5
Gly	14	23
His	3	2
Ile	6	10
Leu	6	19
Lys	18	14
Met	2	2
Phe	4	6
Pro	4	9
Ser	1	28
Thr	8	23
Trp	1	8
Tyr	4	4
Val	3	23
Total	104	245

*In some common analyses, such as acid hydrolysis, Asx and Asn are not readily distinguished from each other and are together designated Asx (or D). Similarly, when Glu and Gln cannot be distinguished, they are together designated Gdx (or Z). In addition, Trp is destroyed by acid hydrolysis. Additional procedures must be employed to obtain an accurate assessment of complete amino acid content.

Table 3-3
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
© 2008 W.H. Freeman and Company

	Molecular weight	Number of residues	Number of polypeptide chains
Cytochrome c (human)	13,000	104	1
Ribonuclease A (bovine pancreas)	13,700	124	1
Lysozyme (chicken egg white)	13,930	129	1
Myoglobin (equine heart)	16,890	153	1
Chymotrypsin (bovine pancreas)	21,600	241	3
Chymotrypsinogen (bovine)	22,000	245	1
Hemoglobin (human)	64,500	574	4
Serum albumin (human)	68,500	609	1
Hexokinase (yeast)	102,000	972	2
RNA polymerase (<i>E. coli</i>)	450,000	4,158	5
Apolipoprotein B (human)	513,000	4,536	1
Glutamine synthetase (<i>E. coli</i>)	619,000	5,628	12
Titin (human)	2,993,000	26,926	1

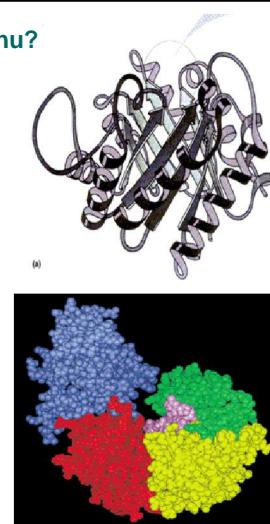
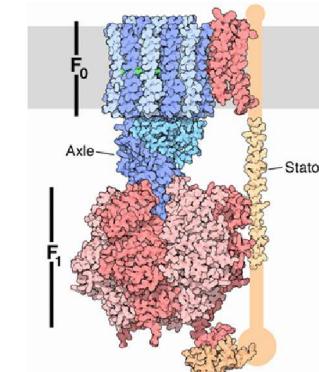
Table 3-2
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
© 2008 W.H. Freeman and Company

TABLE 3-4 Conjugated Proteins		
Class	Prosthetic group	Example
Lipoproteins	Lipids	β_1 -Lipoprotein of blood
Glycoproteins	Carbohydrates	Immunoglobulin G
Phosphoproteins	Phosphate groups	Casein of milk
Hemoproteins	Heme (iron porphyrin)	Hemoglobin
Flavoproteins	Flavin nucleotides	Succinate dehydrogenase
Metalloproteins	Iron	Ferritin
	Zinc	Alcohol dehydrogenase
	Calcium	Calmodulin
	Molybdenum	Dinitrogenase
	Copper	Plastocyanin

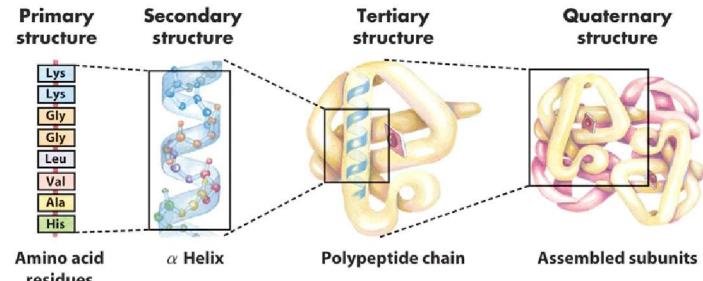
Table 3-4
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
© 2008 W.H. Freeman and Company

Jak popsat 3D strukturu proteinu?

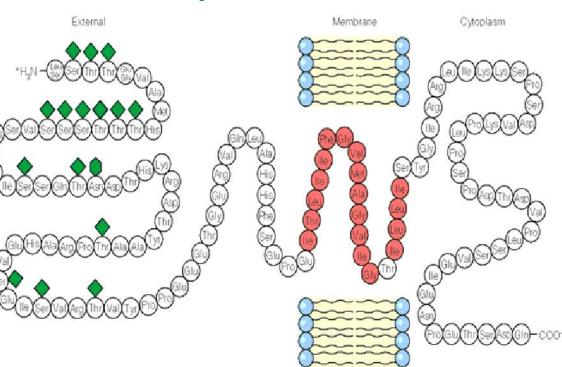
- nepřesné množství struktur
- komplexní struktury



Struktury i úrovní popisu struktury proteinu



Primární struktura proteinu



Protein – řetězec AA vázaných peptidovou vazbou:
N-terminální doména – volná aminoskupina
C-terminální doména – volný karboxyl

Nobelova cena za chemii v roce 1958 za práci na struktu e protein , hlavn insulinu



Frederick Sanger
(1918-2013)

Nobelova cena za chemii v roce 1980 – ¼ podíl za sekvenování nukleových kyselin

Protein insulin

- prase i insulin obsahuje dva peptidové et zce svázané disulfidickými vazbami
- lidský insulin v B- et zci na pozici 30 má Thr



- odbourávání sacharid
- diabetes

Insulin – druhová variabilita

	A et zec	B et zec
	8 9 10	30
Lidský	Thr-Ser-Ile	Thr
Hov zí	Ala-Ser-Val	Ala
Psi	Thr-Ser-Ile	Ala
Ov í	Ala-Gly-Val	Ala

P es nepatrné rozdíly ve struktu e inzulínu zobrazených výše, všechny tyto inzulíny plní stejnou funkci a mohou být dokonce použity u lidí, ale žádný z t chotí však není tak ú inný jako lidský inzulín.

I malé zm ny sekvence AA mohou být zodpov dné za zm nu funkce p íslušných peptid i protein

Nap.:

Hormony – vasopresin a oxytocin

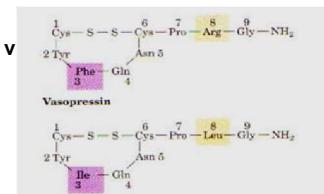
Hemoglobin – srpkovitá anemie (bodová mutace v podjednotce Glu→Val)

vasopresin

– zvyšuje zp tné vst ebávání vody v ledvin a ovliv ujetím krevní tlak

oxytocin

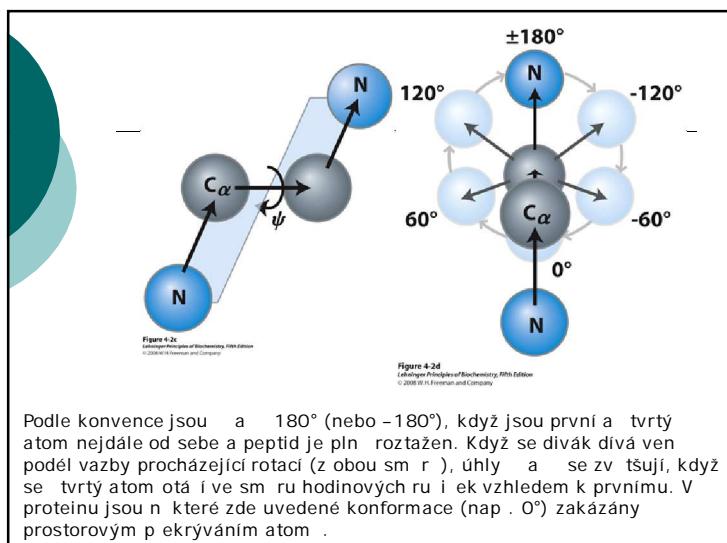
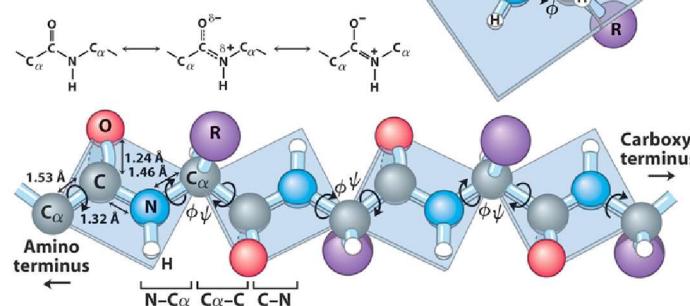
– d ložní stahy b hem porodu



**Primární struktura do zna né
míry ur uje nativní sekundární
a terciární strukturu.**

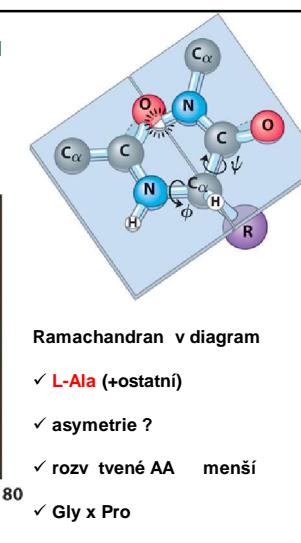
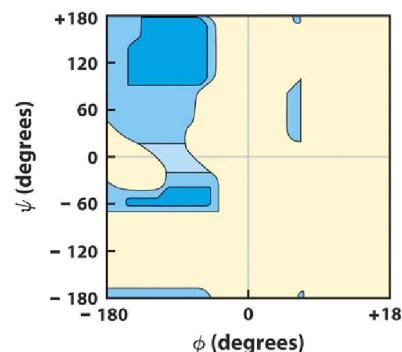
Primární struktura proteinu

Peptidová skupina (vazba) je v polypeptidovém řetězci planární, nebo je stabilizována rezonancí.

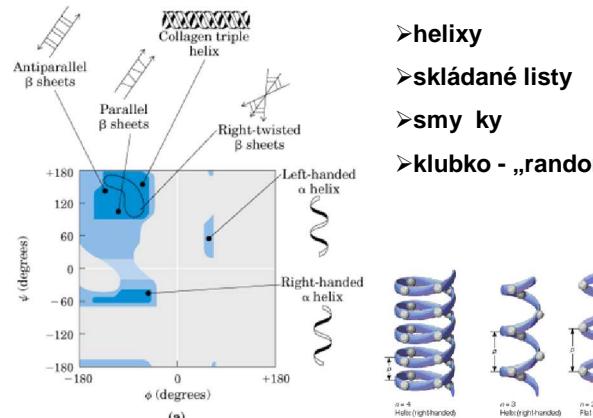


Primární struktura proteinu

Pro torzní úhly ϕ a ψ existují určitá sterická omezení.



Sekundární struktura proteinu

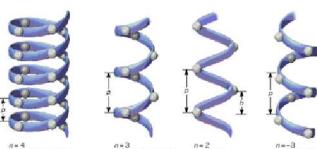


➤ helixy

➤ skládané listy

➤ smyky

➤ klubko - „random coil“



-helix

- úsek n kolika residuji má
= -60° a $= -50^\circ$
- vodíkové vazby mezi C=O rezidua n a NH rezidua $n+4$
- α -helix – vodíková vazba mezi rezidui n a $n+5$
- 3_{10} -helix – vodíková vazba mezi rezidui n a $n+3$ (10 atom mezi donorem a akceptorem vodíkové vazby)
- pravoto ivost versus levoto ivost
- α -helix je zdaleka nej ast jší zp sob, jakým protein prochází membránou

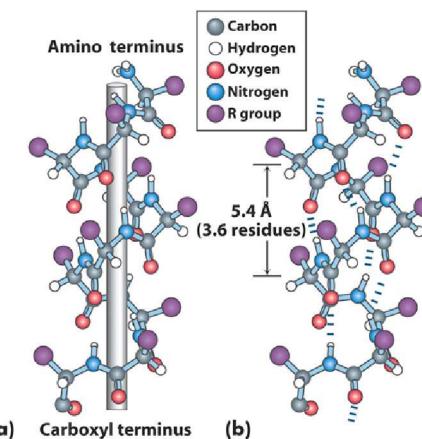
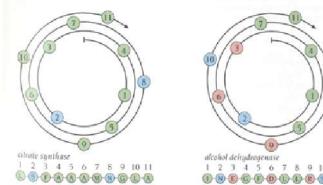


TABLE 4-1 Propensity of Amino Acids to Take Up an α -Helical Conformation

Amino acid	$\Delta\Delta G^\circ$ (kJ/mol) ^a	Amino acid	$\Delta\Delta G^\circ$ (kJ/mol) ^a
Ala	0	Leu	0.79
Arg	0.3	Lys	0.63
Asn	3	Met	0.88
Asp	2.5	Phe	2.0
Cys	3	Pro	>4
Gln	1.3	Ser	2.2
Glu	1.4	Thr	2.4
Gly	4.6	Tyr	2.0
His	2.6	Trp	2.0
Ile	1.4	Val	2.1

Výskyt AA v α -helicech:
ast ji (Ala, Glu, Leu, Met)
z ídká (Pro, Gly, Tyr, Ser)

-helix



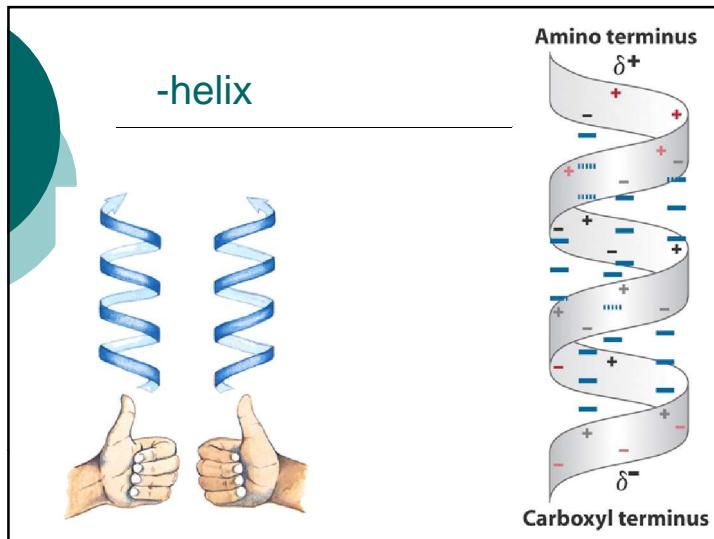
(c)



(d)



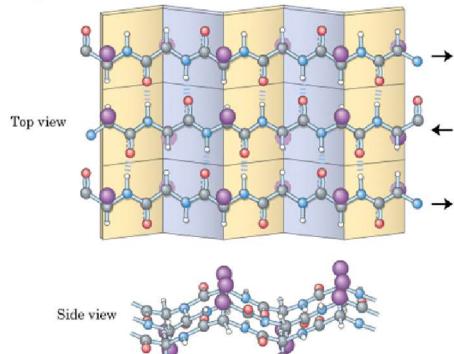
-helix



Antiparalelní β -sheet

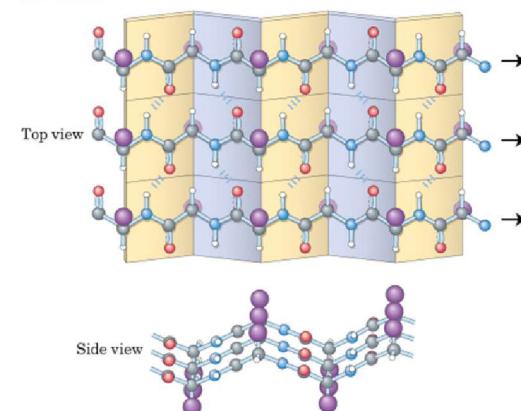
- flexibilní struktura
- Val, Leu, Ile, Trp, Tyr, Thr, Phe

(a) Antiparallel



Paralelní β -sheet

(b) Parallel

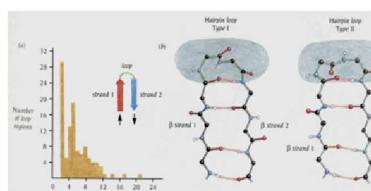
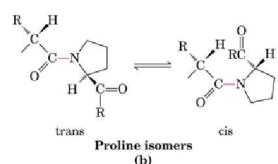


β -kličky a ohyby

- Flexibilní úseky spojující jednotlivé elementy sekundární struktury.

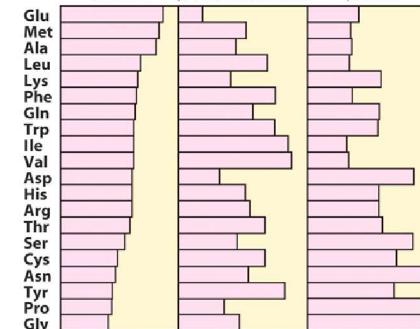
- Kličky exponované do vody obsahují velké množství nabitých a polárních reziduí – dají se dobře odpovídat z primární sekvence (Pro, Gly, Ser, Asp, Asn).

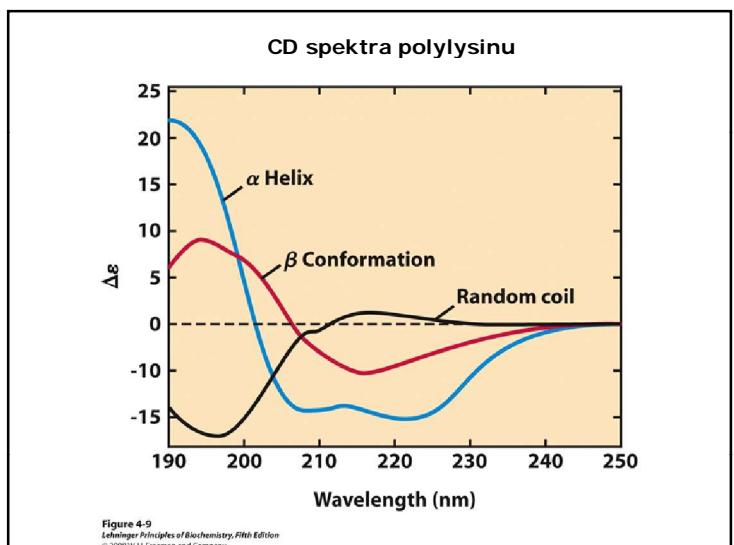
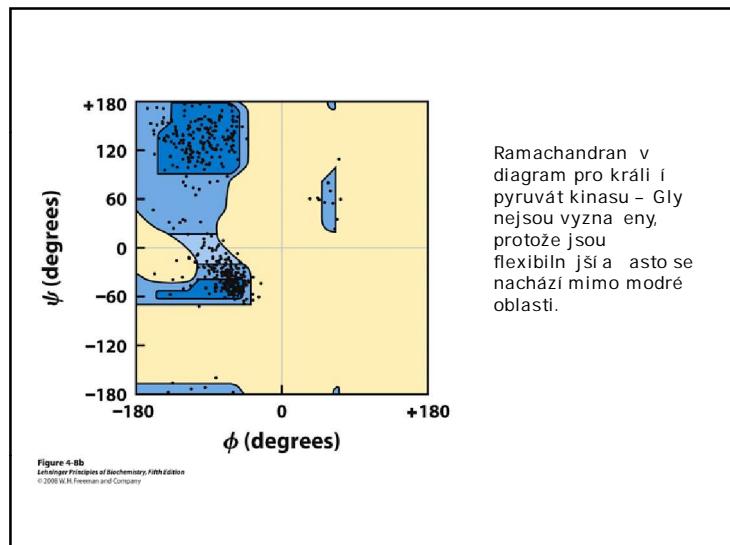
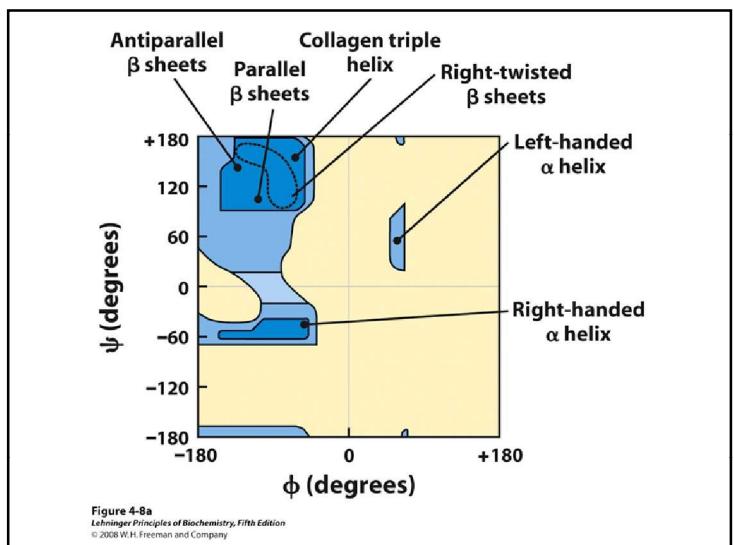
- Mohou zaujmout více konformací – a to se úzce stojí interakce s ligandem.



Sekundární struktura proteinu

α Helix β Conformation β Turn





Sekundární struktury jsou stabilizovány vodíkovými stky mezi karbonylovými – C=O a H-N- skupinami hlavního řetězce.

Jednou ze sil stabilizujících terciární strukturu proteinů jsou rovněž vodíkové stky, ale převážně mezi postrannními skupinami (R-) jednotlivých AA.

Tertiární struktura proteinu

Primary structure: Amino acid residues (Lys, Arg, Cys, Glu, Asp, Leu, Val, Ile, Ala, His). Secondary structure: α -Helix. Tertiary structure: Polypeptide chain. Quaternary structure: Assembled subunits.

„up-down -barrel“ porin

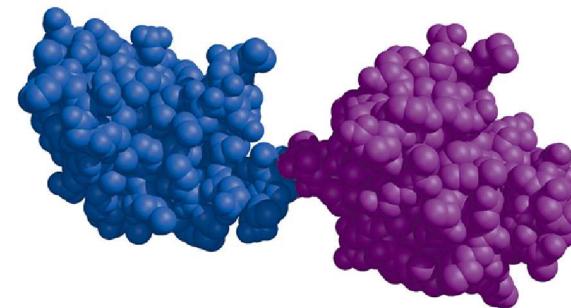
Síly stabilizující tertiární strukturu proteinu :

- elstat. interakce – solné m stky
- vodíkové m stky
- disulfidické vazby
- hydrofobní interakce
- interakce polárních skupin s vodou

Motivy a domény

strukturní motiv (fold) – supersekundární struktura

doména – funk ní stabilní uspo ádání ásti polypeptidového et zce



Dv funk ní domény troponinu C – proteinu vážícího vápník (ve svalech)

Motivy

β - α - β Loop

α - α Corner

Typical connections in an all- β motif

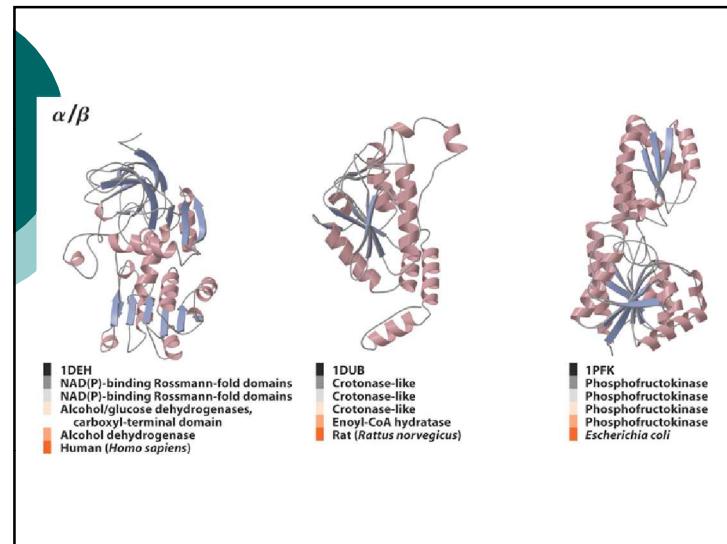
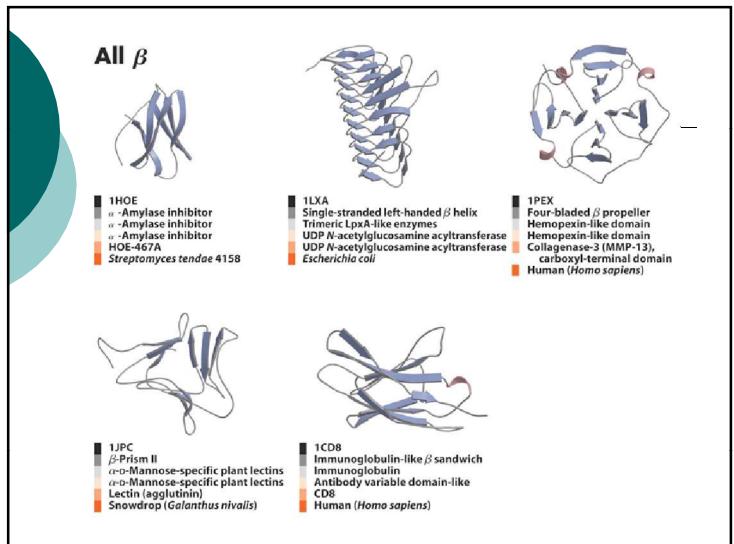
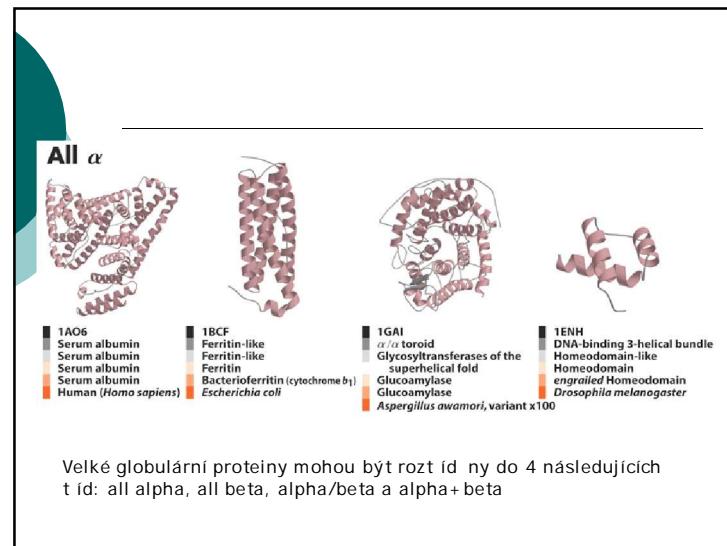
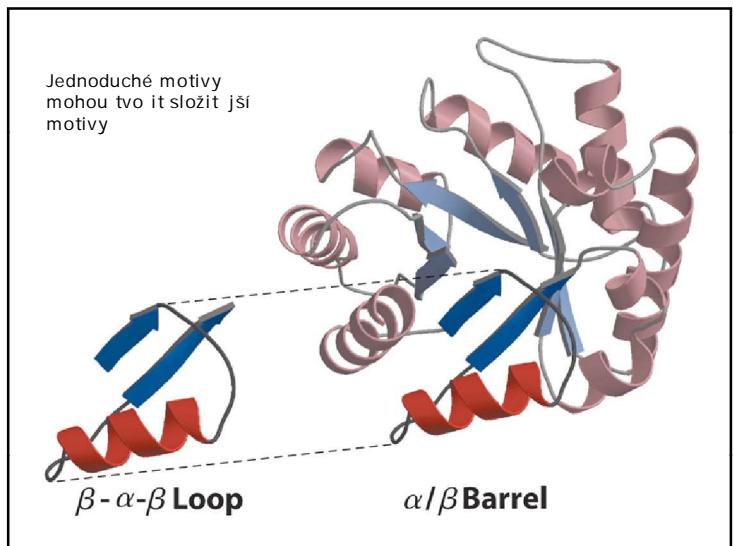
Crossover connection (not observed)

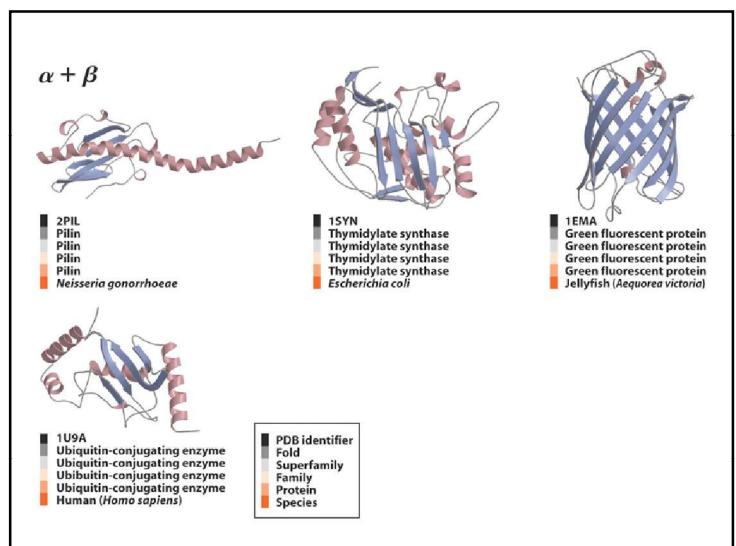
Right-handed connection between β strands

Left-handed connection between β strands (very rare)

β Barrel

Twisted β sheet





Myoglobin (PDB ID: 1MBO), 153 Amk

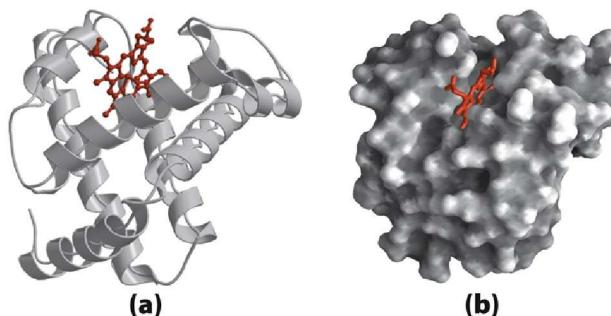


Figure 4-15ab
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
© 2008 W.H. Freeman and Company

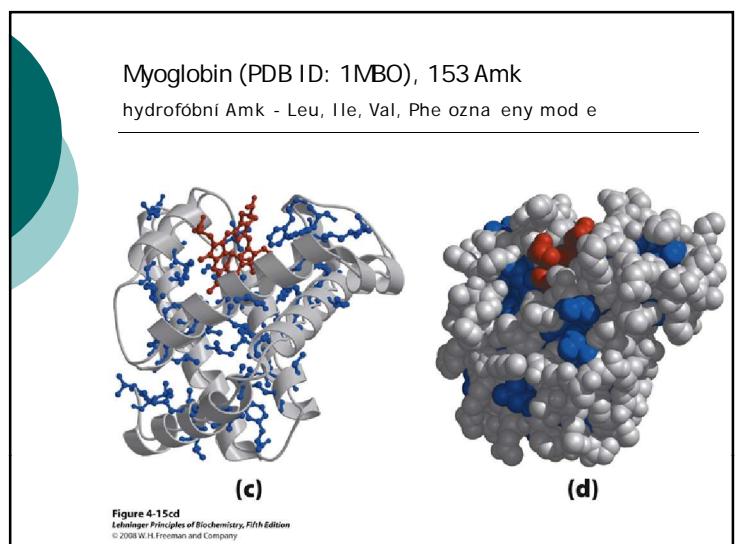


Figure 4-15cd
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
© 2008 W.H. Freeman and Company

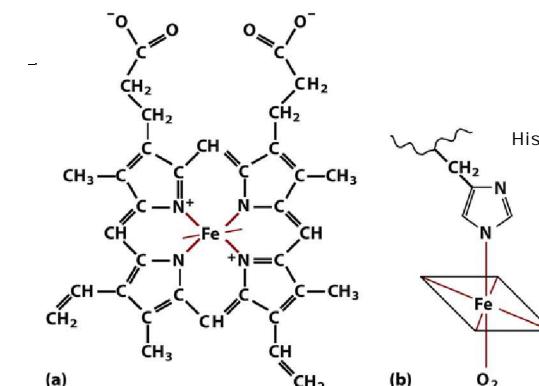


Figure 4-16
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
© 2008 W.H. Freeman and Company

Protoporphyrin + Fe²⁺

TABLE 4-3

Approximate Proportion of α Helix and β Conformation in Some Single-Chain Proteins

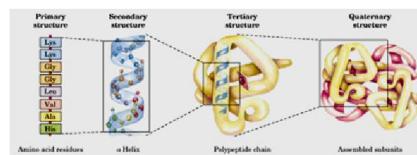
Protein (total residues)	α Helix	β Conformation
Chymotrypsin (247)	14	45
Ribonuclease (124)	26	35
Carboxypeptidase (307)	38	17
Cytochrome c (104)	39	0
Lysozyme (129)	40	12
Myoglobin (153)	78	0

Source: Data from Cantor, C.R. & Schimmel, P.R. (1980) *Biophysical Chemistry, Part I: The Conformation of Biological Macromolecules*, p. 100, W.H. Freeman and Company, New York.

*Portions of the polypeptide chains not accounted for by α helix or β conformation consist of bends and irregularly coiled or extended stretches. Segments of α helix and β conformation sometimes deviate slightly from their normal dimensions and geometry.

Table 4-3
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
© 2008 W.H. Freeman and Company

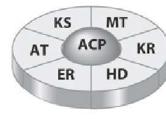
Kvartérní struktura proteinu



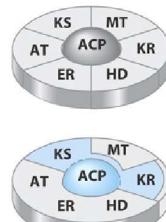
- oligomerizace
- funk ní protein je multimer i oligomer tvo ený více protomery, nap.:
 - Hemoglobin – tetramer (1A3N, 1BBB)
 - MK synthasa (bakterie x eukaryot)
- viz p íkady – PDB (Protein DataBank)
<http://www.rcsb.org/>

MK synthasa

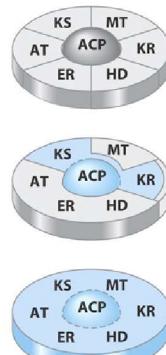
Bacteria, Plants
Seven activities in seven separate polypeptides



Yeast
Seven activities in two separate polypeptides

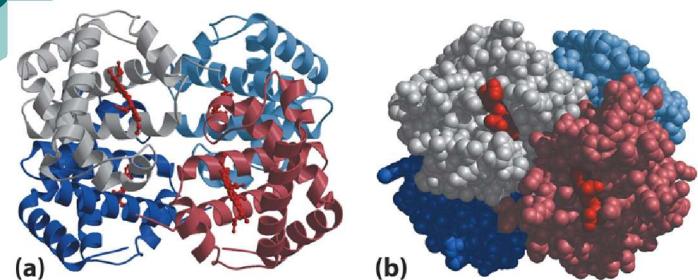


Vertebrates
Seven activities in one large polypeptide



Kvartérní struktura proteinu

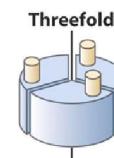
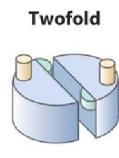
Deoxyhemoglobin – PDB ID: 2HHB



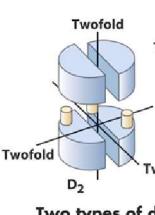
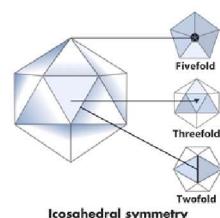
Kvartérní struktura proteinu

Multimery s identickými podjednotkami

- Rotační symetrie
- Helikální symetrie
- Chyba proteinové - cca 1 chyba na 10 000 Amk



Two types of cyclic symmetry



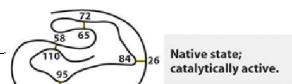
Two types of dihedral symmetry

Denaturace a sbalování proteinu

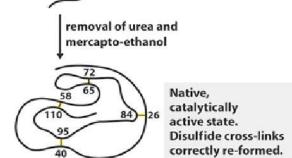
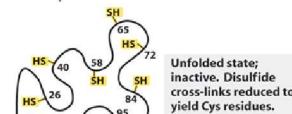
Denaturace x renaturace

Sbalování

- Levinthal v paradox
- – hierarchický model x „molten globule“ (hydrofobní kolaps)
- V běhu sbalování proteinu probíhá velmi rychle 100 Amk za 5sec p i 37°C (*E.coli*)

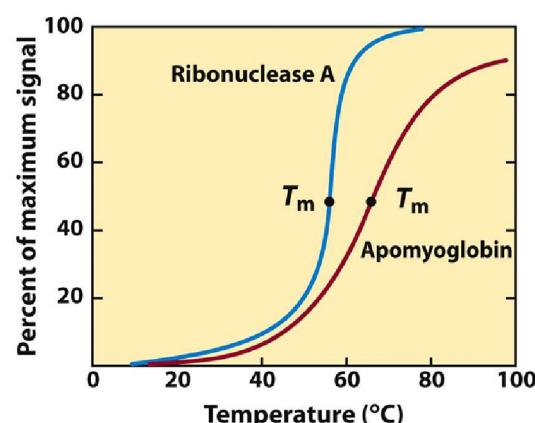


addition of urea and mercapto-ethanol



removal of urea and mercapto-ethanol

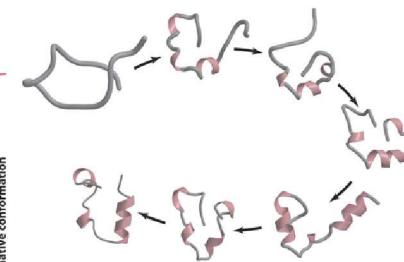
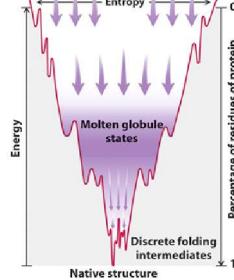
Teplotní denaturace proteinu



Sbalování proteinu

hierarchický model x „molten globule“

Beginning of helix formation and collapse



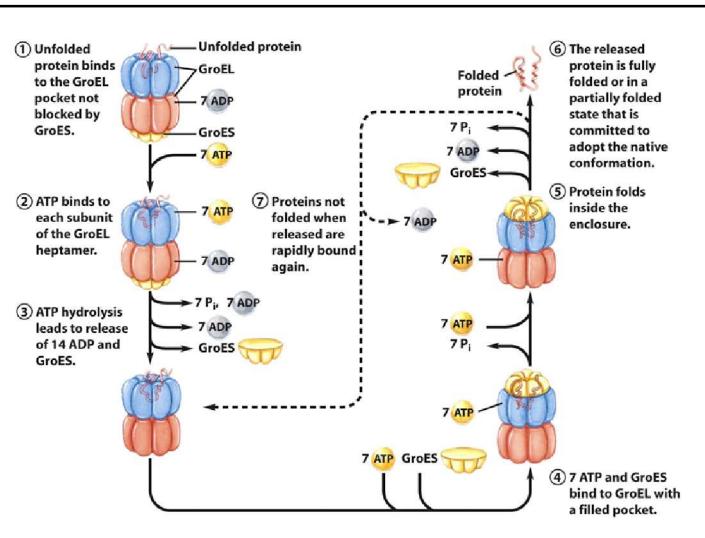
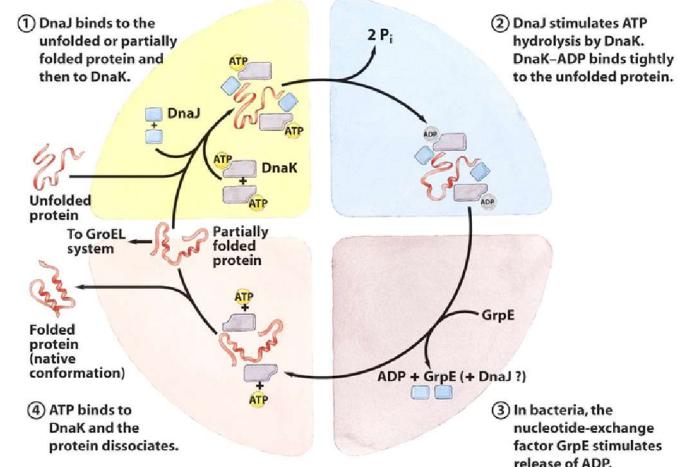
Poruchy sbalení - choroba Nap. u CFTR (chloridový kanál) vede k cystické fibróze

Sbalování proteinu

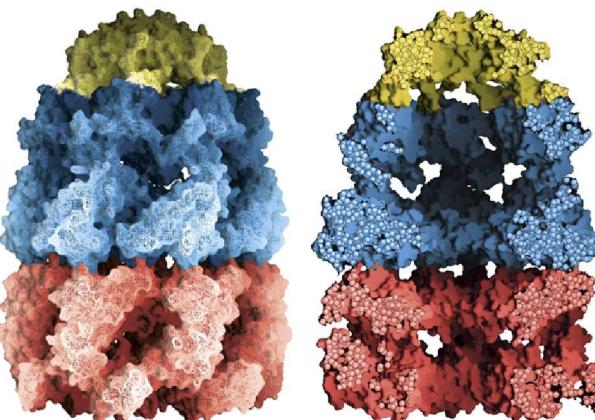
asistované sbalení (folding) – chaperony:

- Hsp70 - Heat Shock Proteins MW cca 70 000, váží se na regiony hydrofobní nesbaleného proteinu, aby zabránily nevhodnému foldu
- chaperoniny

E. coli chaperonové proteiny DnaK a DnaJ



GroEL/GroES komplex (PDB ID 1AON)



Funkce protein

- Enzymy – katalytická aktivita
- Zásobní proteiny – ovalbumin, casein, ferritin
- Transportní proteiny – hemoglobin, lipoproteiny, membránové transportéry (nap. lactose permease, MnTH, transport AAs, Glc. p. es biol. membrány)
- Kontraktilní proteiny – dynein, aktin-myosin
- Strukturní proteiny – kolagen, elastin, keratin, fibrin
- Obranné proteiny – imunoglobuliny, fibrinogen, trombin, bakteriální toxiny, aj.
- Regulační proteiny (peptidy) – hormony, nap. insulin
- Proteiny s jinou funkcí – nap. „nemrzoucí proteiny“

➤ MW pr. m. rné AA – 138
➤ proteiny – MW na AA - cca 128 (v proteinu 110)
➤ velikost 50-8500 AAs

Rozdlení protein

Klasifikace dle rozpustnosti ve vodě (klinická biochemie):

- albuminy – rozpustné
- globuliny – rozpustné pouze se solí, nap. 0.005-0.1 M NaCl.

Rozdlení protein

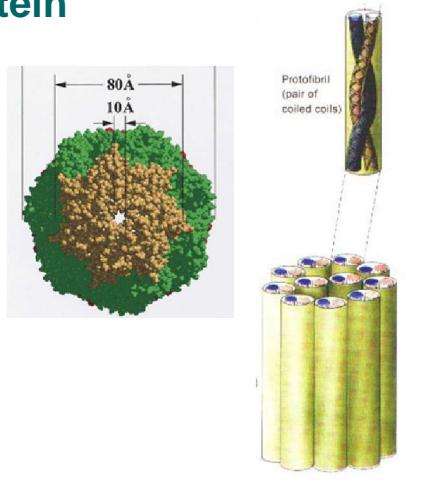
➤ globulární

➤ fibrilární

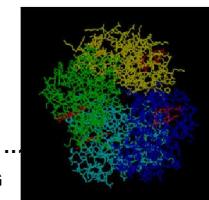
➤ membránové

➤ jednoduché

➤ konjugované



Konjugované proteiny – prostetické skupiny



- Lipoproteiny – lipidy – beta-lipoprotein, HDL, ...
- Glycoproteiny – sacharidy – imunoglobulin G
- Fosfoproteiny – Pi – casein
- Hemoproteiny – hem (Fe-porphyrin) – hemoglobin
- Flavoproteiny – flavinové nukleotidy – sukcinát dehydrogenasa
- Metaloproteiny
 - ✓ Fe – ferritin
 - ✓ Zn – alkohol dehydrogenasa
 - ✓ Ca – calmodulin
 - ✓ Mb – dinitrogenasa
 - ✓ Cu – plastocyanin

Globulární proteiny

Poloha postranních skupin v trojdimensionální struktuře globulárních protein obvykle závisí na polaritě

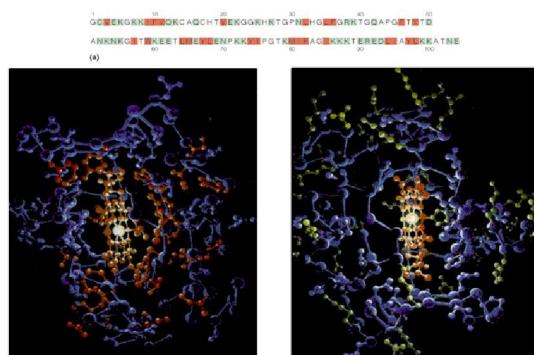
- Myoglobin
- Hemoglobin
- Immunoglobuliny
- Cytokiny
- Albuminy
- Transferrin
- Ceruloplasmin
- Peptidové hormony

Nepolární residua: Val, Leu, Ileu, Met, Phe
 – téměř vždy uvnitř proteinu, mimo kontakt s rozpouštěllem

Nabité polární AA: Arg, His, Lys, Asp, and Glu
 – prakticky vždy na povrchu proteinu v kontaktu s vodou

Nenabité polární AA: Ser, Thr, Asn, Gln, Tyr
 – obvykle na povrchu proteinu
 – až i uvnitř, ale potom jsou vázány téměř vždy vodíkovými vazkami

Typické rozložení hydrofobních a hydrofilních AA v globulárních proteinech:



Fibrilární proteiny

- strukturní role
- k ženám
- vlákná (vlasy, hedvábí)
- pojivové tkáně, aj.

Amino Acid	α -Keratin (Wool)	Fibroin (Silk)	Collagen (Bovine Tendon)	Elastin (Pig Aorta)
Gly	8.1	44.6	32.7	32.3
Ala	5.0	29.4	12.0	23.0
Ser	10.2	12.2	3.4	1.3
Glu + Gln	12.1	1.0	7.7	2.1
Cys	11.2	0	0	— ^c
Pro	7.5	0.3	22.1 ^a	10.7 ^c
Arg	7.2	0.5	5.0	0.6
Leu	6.9	0.5	2.1	5.1
Thr	6.5	0.9	1.6	1.6
Asp + Asn	6.0	1.3	4.5	0.9
Val	5.1	2.2	1.8	12.1
Tyr	4.2	5.2	0.4	1.7
Ile	2.8	0.7	0.9	1.9
Phe	2.5	0.5	1.2	3.2
Lys	2.3	0.3	3.7 ^b	3.6 ^d
Trp	1.2	0.2	0	— ^e
His	0.7	0.2	0.3	— ^e
Met	0.5	0	0.7	— ^e

Note: The three most abundant amino acids in each protein are indicated in red. Values given are in mole percent.

^aAbout 39% of this is hydroxyproline.

^bAbout 14% of this is hydroxylysine.

^cAbout 13% of this is hydroxyproline.

^d(Most about 80%) is involved in cross-links.

^eEssentially absent.

složené zejména z nepolárních AA

Struktura vlasu – keratin

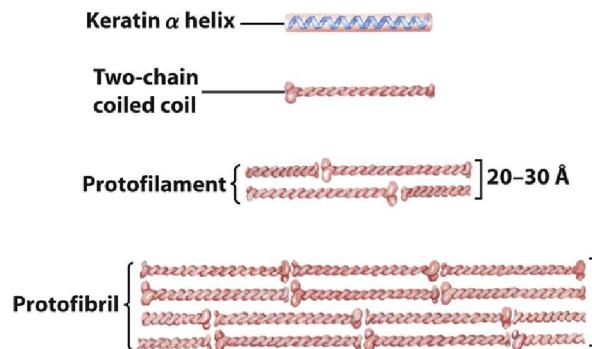


Figure 4-10a
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
© 2008 W.H. Freeman and Company

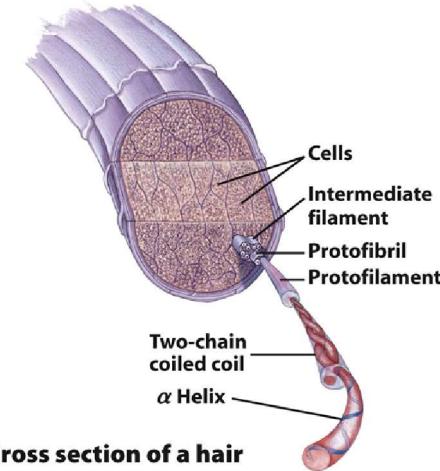
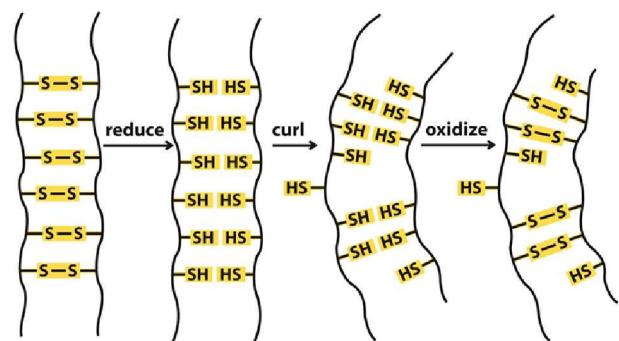


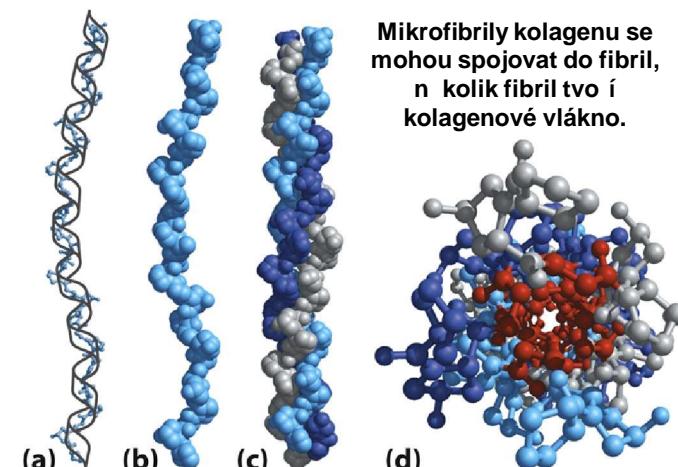
Figure 4-10b
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
© 2008 W.H. Freeman and Company

Trvalá ondulace...

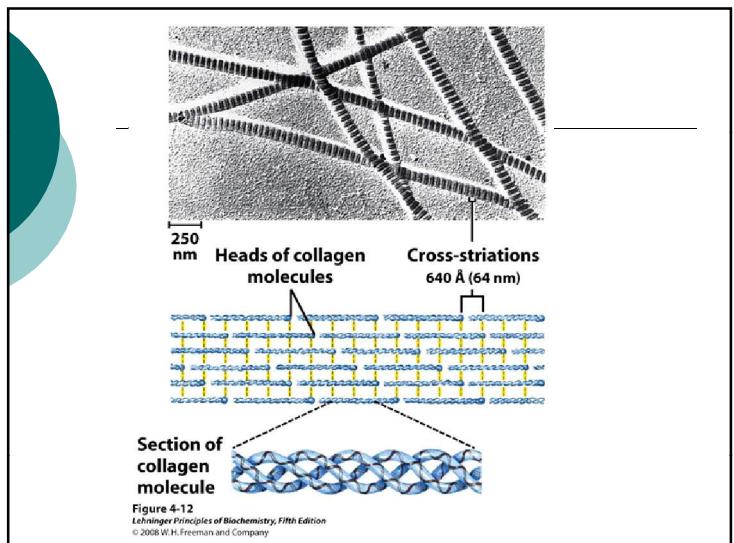


Box 4-2
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
© 2008 W.H. Freeman and Company

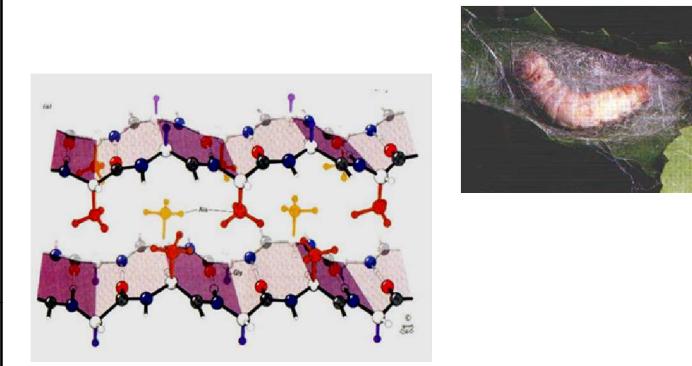
Mikrofibrilly kolagenu se mohou spojovat do fibril, n kolik fibril tvoří kolagenové vlákno.



Glycin, prolin, hydroxyprolin a hydroxylysin.

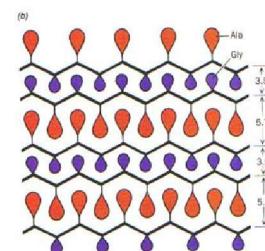


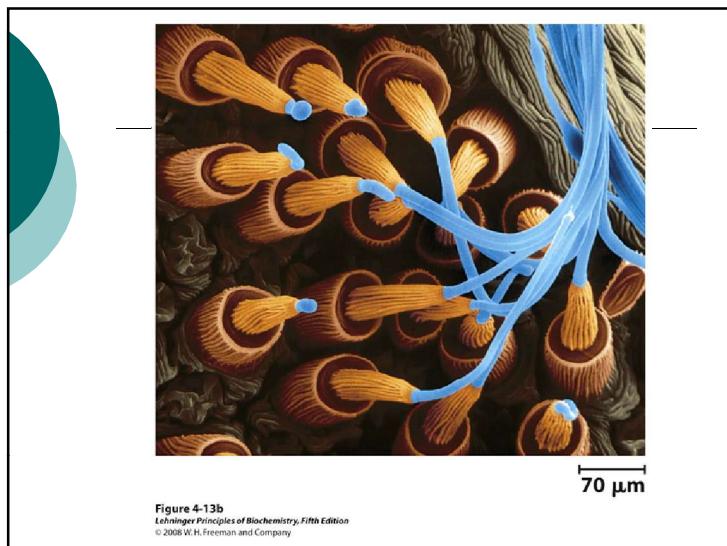
Fibroin je fibrilární protein, jehož vlákna jsou tvoena polypeptidovými vlákny v konformaci -skládaného listu



Polypeptidový et zec fibroinu je tvo en té výhradn repetitivní sekvencí:
Gly-Ala-Gly-Ser-Gly-Ala-Ala-Gly-Ser

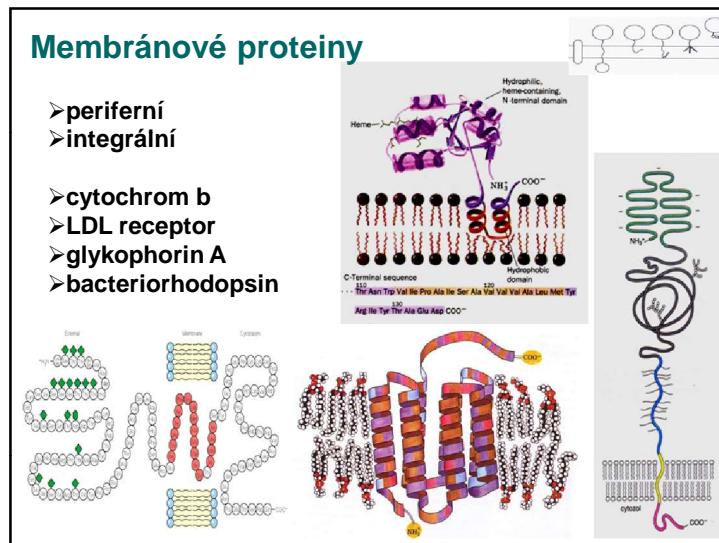
To umož uje jednotlivým list m, aby do sebe zapadly, ímž je vytvo eno silné vlákno s relativn malou roztažností.





Membránové proteiny

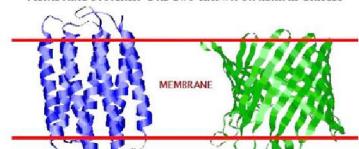
- periferní
- integrální
- cytochrom b
- LDL receptor
- glykophorin A
- bacteriorhodopsin



Membránové proteiny

TC-DB - Transport Classification DataBase
<http://www.tcdb.org>

Membrane Proteins: The Two Known Structural Classes

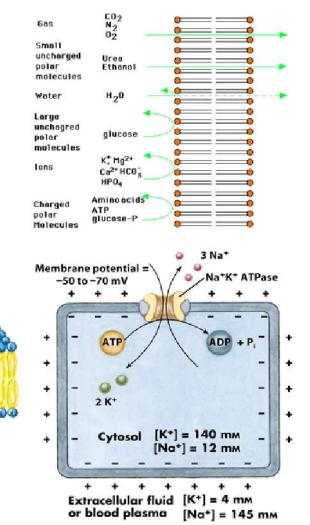
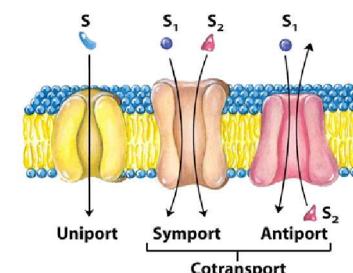


Amino acid	A	B	Amino acid	A	B
Ala	-1.75	1.56	Leu	-7.00	2.93
Arg	1.96	0.45	Lys	1.06	0.15
Asn	2.97	0.27	Met	-5.99	2.96
Asp	-2.49	0.27	Pho	-0.80	0.10
Cys	2.11	0.23	Phe	-0.24	0.76
Gln	2.49	0.51	Ser	2.79	0.81
Gly	0.09	0.62	Thr	0.69	0.91
His	1.80	0.29	Trp	-6.31	1.08
Ile	-6.68	1.67	Tyr	-5.57	0.68
			Val	-4.77	1.14

A - energie - p ochod voda - n-oktanol
B - pravd. podobnost výskytu v membrán

Membránové transportní proteiny

- pasivní transport
- aktivní transport
 - ✓ primární aktivní
 - ✓ sekundární aktivní



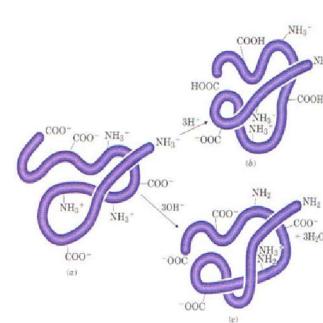
Membránové transportní proteiny

- pasivní transport
- aktivní transport
 - ✓ primární aktivní
 - ✓ sekundární aktivní

Vlastnosti protein

Podobně jako AA i proteiny mají vlastnosti amfiont

- pK_i
- pl
- pufry (nap. v krvi)
- @pl – redukce rozpustnosti



Píklady hodnot pl:

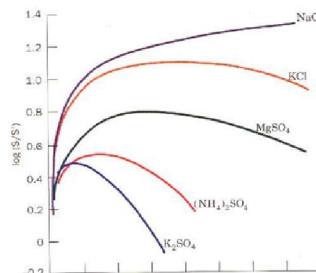
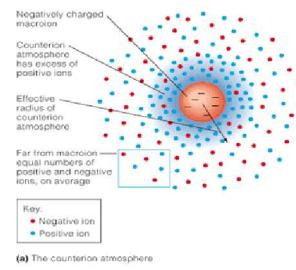
Pepsin	< 1.0
Serový albumin	4.6
Insulin	5.4
Kolagen	6.6
Myoglobin	7.0
Hemoglobin	7.1
Histon	10.8
Lysozym	11.0

Rozpustnost protein

Rozpustnost proteinu jakožto polyamfiontu je závislá na:

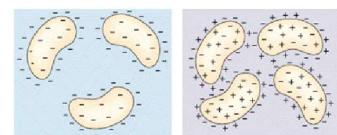
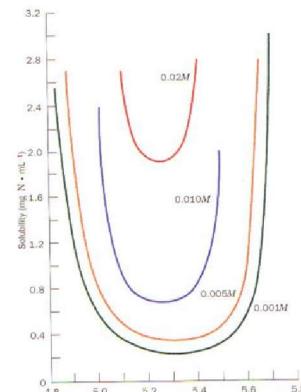
- rozpušt ných solích
- polarit rozpoušt dla
- pH
- teplot

Rozpustnost protein – vliv solí

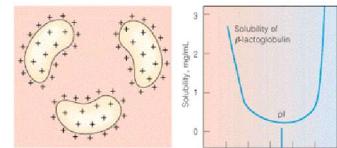


Rozpustnost proteinu se mění v závislosti na iontové síle i typu rozpuštěné soli

Rozpustnost protein – vliv pH



(a) High pH: protein soluble (deprotonated) (b) isoelectric point: protein aggregates

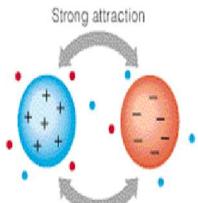


(c) Low pH: protein soluble (protonated) (d) Solubility of β -lactoglobulin

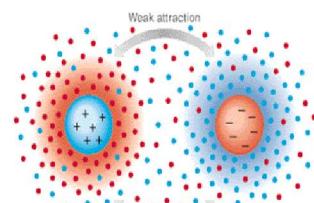
Rozpustnost laktoglobulinu jako funkce pH při různých koncentracích NaCl

Interakce protein s ionty

Salting-in vs. salting-out (vysolování – jedna z metod purifikace proteinů).



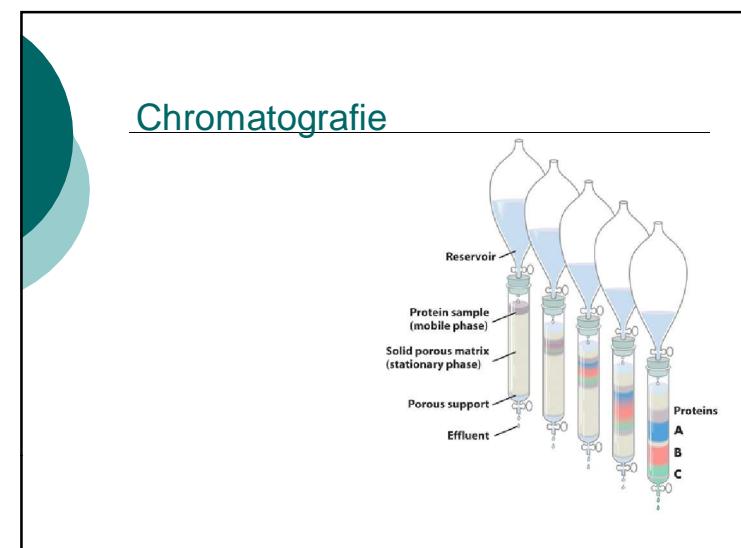
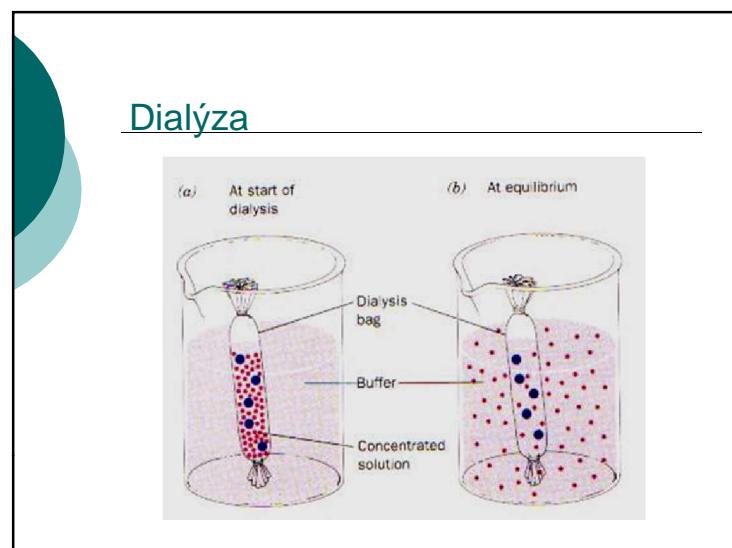
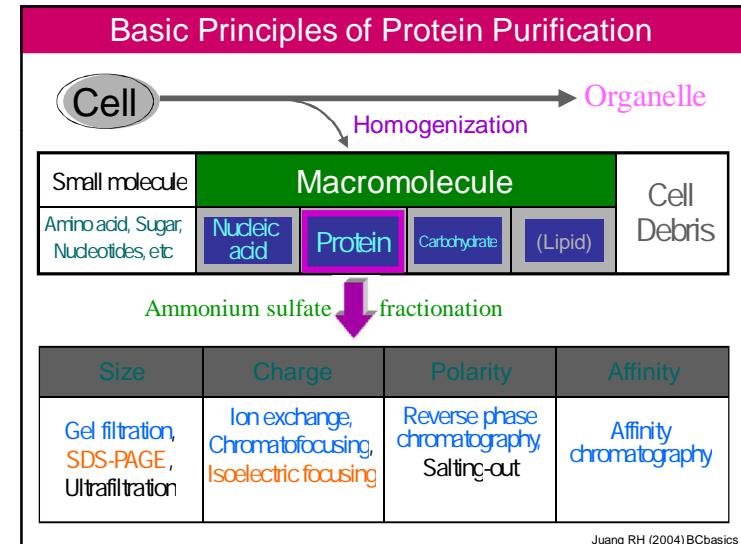
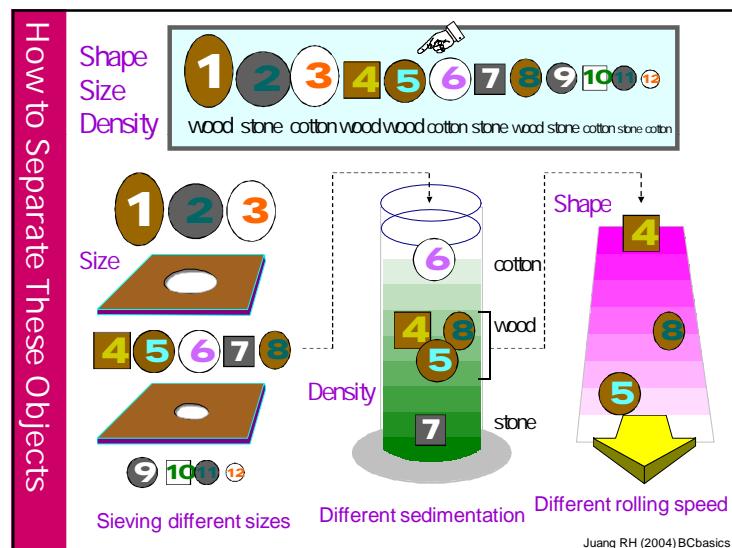
Macroions in low-ionic strength salt solution

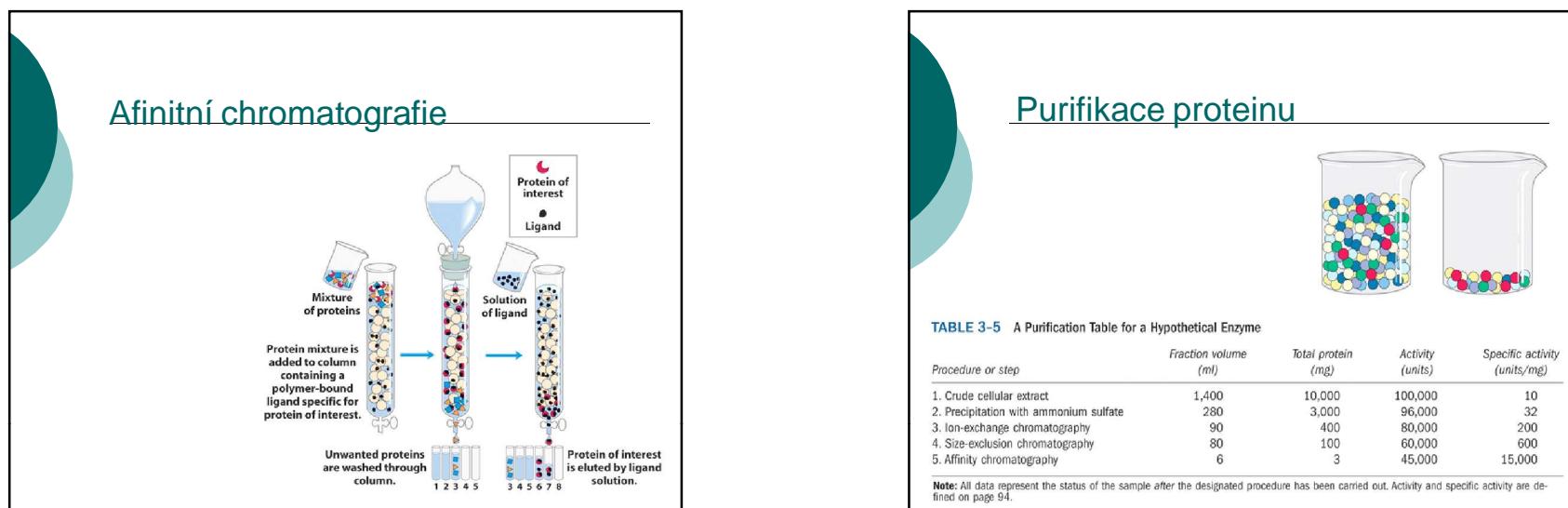
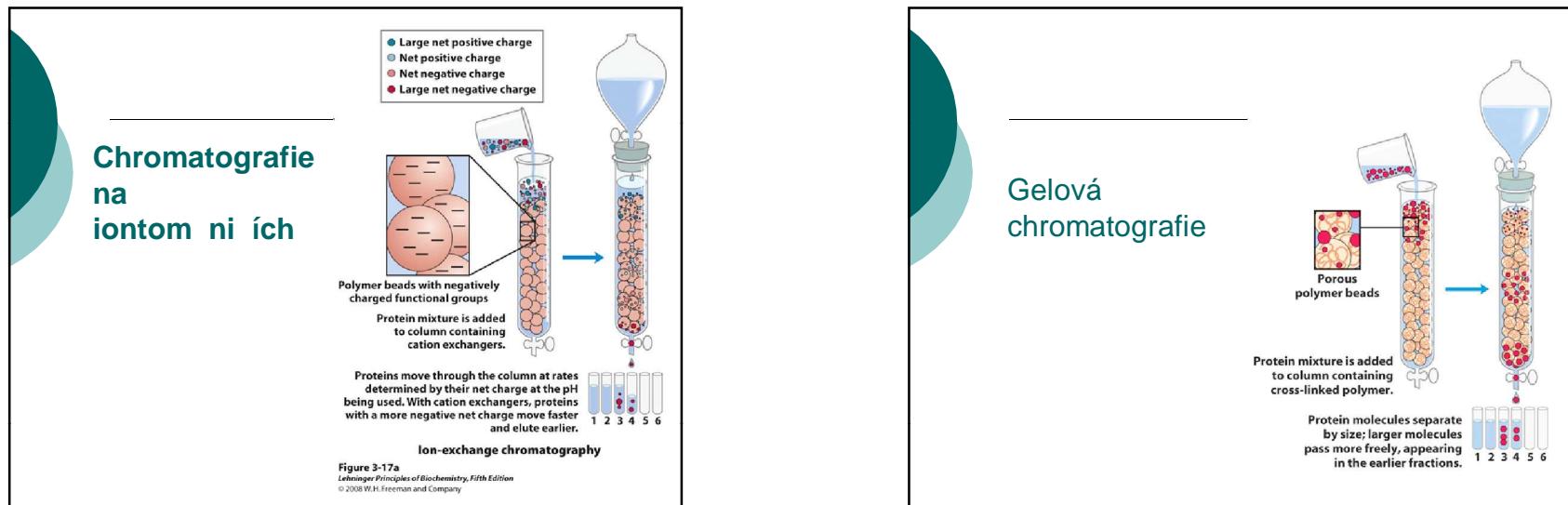


Macroions in high-ionic strength salt solution

Metody studia proteinů

- Izolace a purifikace
- Specifická aktivita enzymu
- Charakterizace – velikost a náboj
- Sekvenování – primární struktura proteinu
- Sekundární, terciární a kvartérní struktura proteinu
- Funkční charakterizace, homologie
- Kvantifikace a lokalizace v buňce, aj.

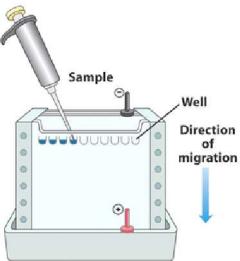




Elektroforéza

SDS PAGE – elektroforéza denaturovaného proteinu

- > Rychlosť pohybu v elektrickom poli je pri chodу porézním polyakrylamidovým gelom závisí na MW a náboji.
- > Dodecylsulfát sodný (SDS) je záporný nabitý detergent, ktorý denaturuje protein tím, že „obalí“ jeho peptidický ňet zec.
- > Pom r (w/w) SDS:protein = 1,4:1 platí s veľmi malými odchylkami pre všetky proteiny. I náboj je úmerný MW.
- > Nutnosť denaturovať S-S m ňtky – 2-merkaptetoetanol alebo dithiothreitol (DTT)
- > Rozlišenie: dráha ~ log MW
- > Barvenie: Coomassie Blue, CuCl₂, stibro
- > Detektív ní limit ~ 0,1 µg



Elektroforéza

SDS PAGE – elektroforéza denaturovaného proteinu

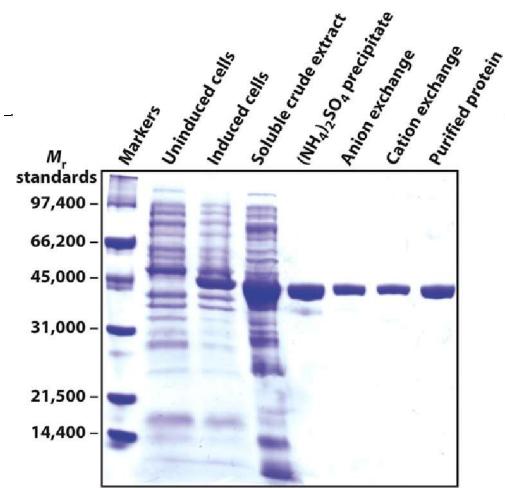
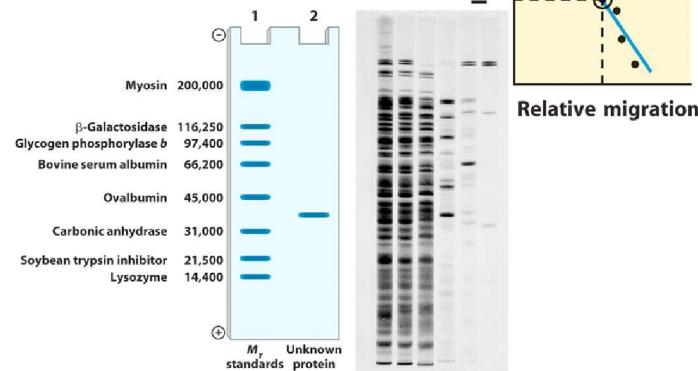


Figure 3-18b
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
© 2008 W.H. Freeman and Company

Elektroforéza

- > nativní elektroforéza – rozlišenie rôznych molekul stejnej hmotnosti
- > isoelectric focusing – elektroforéza v gelu s gradientom pH, stanovení pl
- > 2D elektroforéza – rozdelení podľa pl a hmotnosti (IEF a SDS-PAGE)

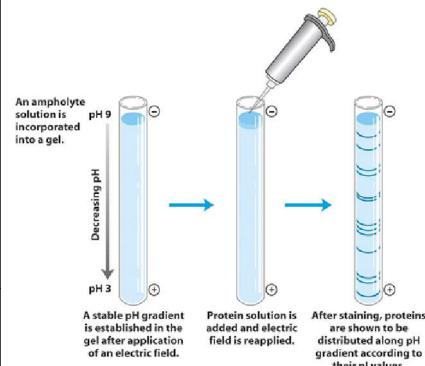
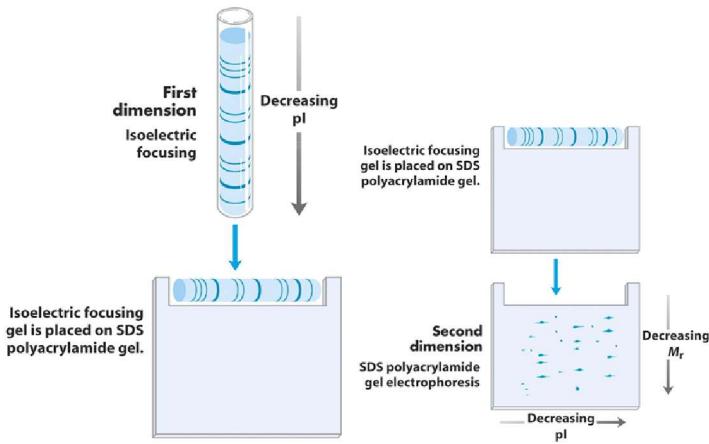


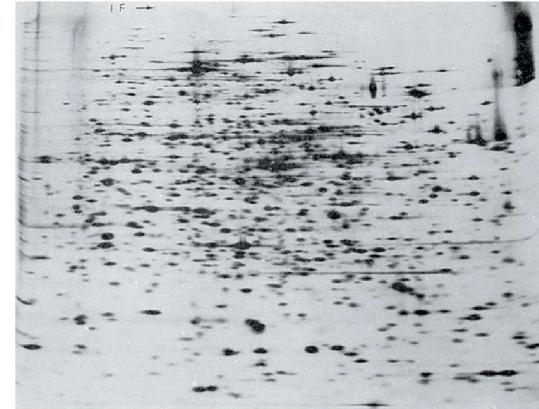
TABLE 3-6 The Isoelectric Points of Some Proteins

Protein	pI
Pepsin	<1.0
Egg albumin	4.6
Serum albumin	4.9
Urease	5.0
β-Lactoglobulin	5.2
Hemoglobin	6.8
Myoglobin	7.0
Chymotrypsinogen	9.5
Cytochrome c	10.7
Lysozyme	11.0

2D - elektroforéza



2D - elektroforéza

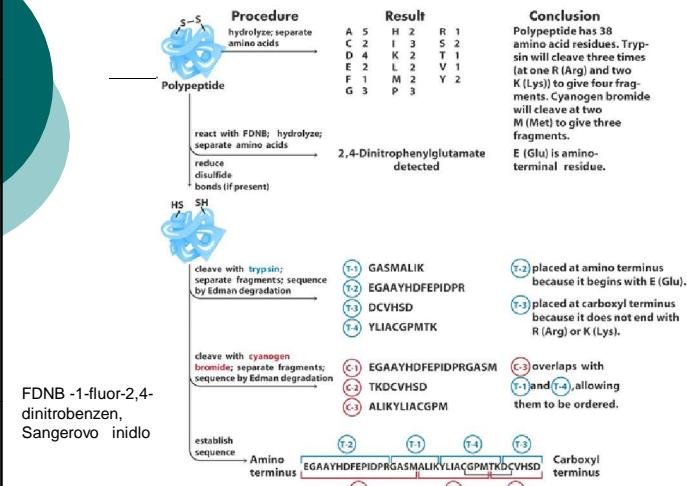


Primární struktura

- > Sekvenace genu (tj. DNA) – intron-exon, genetický kód
- > Sekvenace proteinu (F.Sanger) – degradace jednotlivých AA z N- i C-konce
 - > AA složení – volné AA – HPLC
 - > Fragmentace na malé segmenty (cca 50AAs) pomocí specifických enzymů – p ekryv
 - > Sekvenace segmentů – Edmanova degradacní procedura
- > Hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF

Amino acid sequence (protein) Gln – Tyr – Pro – Thr – Ile – Trp
 DNA sequence (gene) CAGTATCCTACGATTTCG

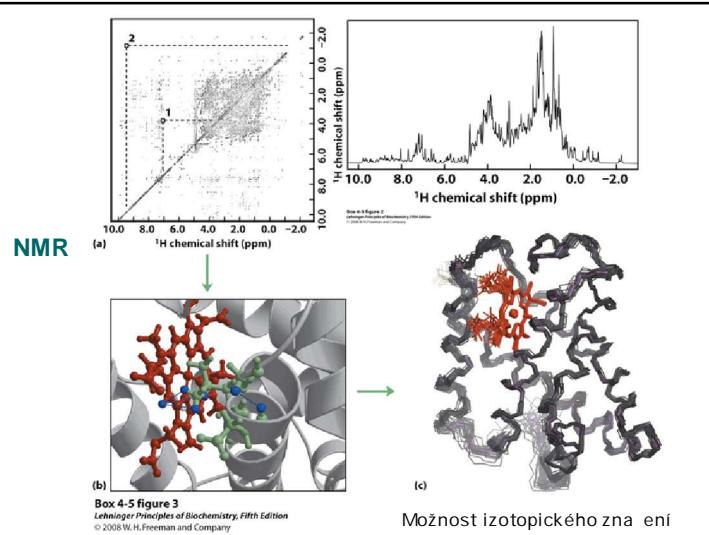
Sekvenování – určení primární struktury



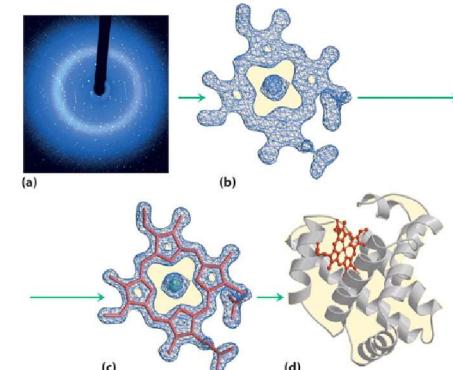
Alternativn ...

Amino acid sequence (protein) Gln – Tyr – Pro – Thr – Ile – Trp
 DNA sequence (gene) CAGTATCCTACGATTG

Figure 3-28
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
 © 2008 W. H. Freeman and Company



RTG – strukturní analýza



Kryoelektronová mikroskopie

