**CHEMIE HOOFDSTUK 1: Aminozuren, peptiden en eiwitten**

**Aminozuren**

1. AZ hebben gemeenschappelijke structuureigenschappen

* Aminozuren
  + Eiwitten/proteïnen opgebouwd uit covalent gekoppelde AZ
    - Proteïnen = polymeren van AZ
    - Met elk AZ residu covalent gebonden aan een buur
      * Residu => reflecteert het verlies van H20 bij koppeling AZ
    - Kunnen gebroken (hydrolyse) worden in AZ
  + Voorkomen
    - 20 basis AZ voor eiwitten
      * Worden door de genen gecodeerd (voor de translatie)
    - Talrijke andere AZ in de natuur
      * Door post-translationele veranderingen/modificaties van eiwitten => andere eiwitten of AZ verkrijgen (er zijn er dus meer dan de 20 AZ)
  + Bouw
    - Carboxylgroep + aminogroep + R restgroep aan α C
    - Α-koolstof chiraal (= asymmetrisch) -> zorgt voor stereoenantiomeren
      * Uitz: Glycine niet chiraal
    - D/L configuratie gebaseerd op glyceraldehyde => L-AZ: aminogroep links
  + AZ in eiwitten zijn enkel L-stereoisomeren (in de natuur)
    - RNA & enzymen op ribosoom
      * Enzymen maken covalente peptidebindingen => eiwitten maken
      * Het enzyme heeft 1 bepaalde vorm waar enkel een L-AZ in past
      * Dus door de asymmetrische actieve plaats vh enzyme => specificiteit

2. AZ kunnen worden ingedeeld op basis van R-groepen

* R groepen
  + Belangrijkste eigenschappen: polariteit, ionisatiegraad, grootte R groep
  + Indeling in 5 groepen: apolair, aromatisch, polair ongeladen, polair pos geladen, polair neg geladen
  + Nomenclatuur: 3-en 1-lettercode

2.0 Tabel uitleg (Zie PPT)

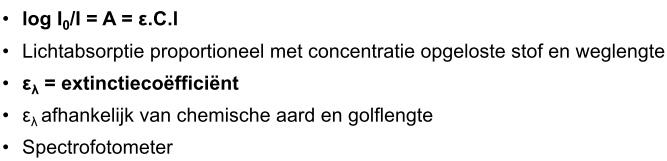
* Polariteit
  + Polair = wateroplosbaar = hydrofiel ; apolair ≠ wateroplosbaar = hydrofoob
* Pk1 & Pk2
  + = pKa waarden vd zuurgroep en vd aminogroep
* PkR
  + = pKa waarde vd R groep
  + Bepaalt welke lading op AZ in R groep zit
* PI
  + = iso-elektrisch punt
  + = pH waarde waarbij netto lading = 0
  + = omslagpunt in een titratiecurve
* Hydropathie index
  + = oplosbaarheid in polair/ apolair milieu => wateroplosbaarheid van AZ
  + = maat voor de vrije EN v/d AZ bij overgang van hydroob solvent naar water
  + Tekens
    - + = hydrofoob = niet oplosbaar in polair milieu/water
    - - = hydrofiel = oposbaar in polair milieu/ water (vb: lipiden)
* Occurence
  + = gemiddeld procentueel voorkomen vd AZ
  + Vb: methionine = AZ dat weinig voorkomt

2.1 Apolair/ Alifatisch/ nonpolair (ZIE PPT)

* Gly(G), Ala(A), Pro(P), Val(V), Leu(L), Iso(I), Met(M)
* R groepen kunnen clusteren met proteïnen door hydrofobe interacties => stabiliteit
* Specifiek
  + Met: apolaie thioether groep
  + Pro: cyclisch => rigiditeit
    - Door 2° amino groep gehouden in rigide conformatie (cyclisch) -> minder flexibel polypeptide

2.2 Aromatische zijgroepen (ZIE PPT)

* Phe (F), Tyr(T), Trp (W)
* R groepen redelijk apolair -> hydrofobe interacties
* Specifiek
  + Tyr -> OH-groep -> waterstofbruggen
    - belangrijk in veel enzymen
  + Tyr, Trp -> meer polair dan Phe door OH en N groepen
  + Trp, Tyr -> absorberen UV licht
    - Absorptiespectrum = absorptie van UV door een molecule in fie vd golflengte
    - Enkel deze 3AZ absorberen dit spectrum door de alternerende dubbele & enkele bindingen
      * Altern bindingen absorberen EM golven in zichtbaar spectrum
      * Excitatie EN kan goed verdeeld worden over de altern. Bindingen
    - Maximale absorptie licht door eiwitten bij golflengte van 280 nm
    - Trp absorbeer het meeste, phenylalanine minste
* Lambert-Beer wet
  + Meting van lichtabsorptie door moleculen door een **spectrofotometer**
    - Zo concentraties vd moleculen in oplossing bepalen
  + Formule



* + - I0= intensiteit vh invallende licht ; I= intensiteit vh uitgezonden licht; C= concentratie vh absorberend species; L= weglengte vd cuvette; A= absorbance
    - E= exctinctiecoeff (afhankelijk vd ch aard en golflengte)
  + Werkwijze
    - Lichtbron => zend licht uit => door monochromator => selecteert en zend licht uit van 1 specifieke golflengte => door sample in cuvette => sample absorbeert een deel vh licht => uitgezonden licht gemeten door detector
      * Lichtabsortie vh sample ~ concentratie opgeloste stof & weglengte

2.3 Polair, ongeladen

* Ser (S), Thr (T), Cys©, Asn(N), Gln (Q)
* Meer wateroplosbaar door waterstofbruggen
* Cys: sulhydrylgroep
  + Door covalente biding van 2 cysteine => tot dimeer AZ = cystine
    - Vorming S-S brug
    - Kan gebeuren in eiwitten!!!
    - Sterk hydrofoob
* Asn, Gln: amides Asp en Glu

2.4 Geladen zijgroepen

* Positief geladen zijgroepen
  + Lys(K), His(H), Arg®
  + Lys -> primair amine
  + His -> guanidino groep
  + Arg -> imidazole groep (heterocyclisch); H+ donor
* Negatief geladen zijgroepen
  + Asp (D), Glu (E)
  + Secundaire carboxylgroepen

3. AZ kunnen ingedeeld worden op basis van de R groep

* Overlappende chemische eigenschappen: sommige AZ geladen én hydrofoob
  + Vb: methionine: hydrofoob, maar wel een polaire S
  + => alternatieve indelingen => dus indeling is arbitrair!

4. Ook weinig voorkomende AZ hebben belangrijke functies

* ~300 AZ niet in eiwitten
* Sommige als residu’s in eiwitten -> door postsynthetische modificaties
  + 4-hydroxyproline: afgeleid v. Pro, in planten celwand prot. , gevonden in collageen
  + Selenocysteine(Sec, U) en pyrrolysine: afgeleid van serine
  + Ornithine, citruline: intermediairen in arginine synthese en ureumcyclus

5. AZ reageert als zuur of base

* Aminogroep, carboxylgroep en ioniseerbare R groep (sommige) -> zwakke zuren en basen
  + Opgelost in water -> dissocieert -> bipolair ion = zwitterion
    - Dus kan als zuur of base werken = Amfoteer of amfolyten

6. AZ hebben een karakteristieke titratiecurve

* Dissociatie(pKa) amino en carboxylgroepen beïnvloed door intramoleculaire interacties (lezen)
* Titratiecurve voorspellen de netto-lading van AZ
  + Op basis van pKa => netto lading AZ bepalen
  + Iso-elektrisch punt P
    - = pH waarde waarbij netto lading = 0
    - = omslagpunt in een titratiecurve
    - = Gemiddelde van de twee pKa waarden
      * pH oven pI -> negatieve lading, pH onder pI positieve lading
      * Hoe verder van iso-elektrisch punt, hoe groter de netto lading

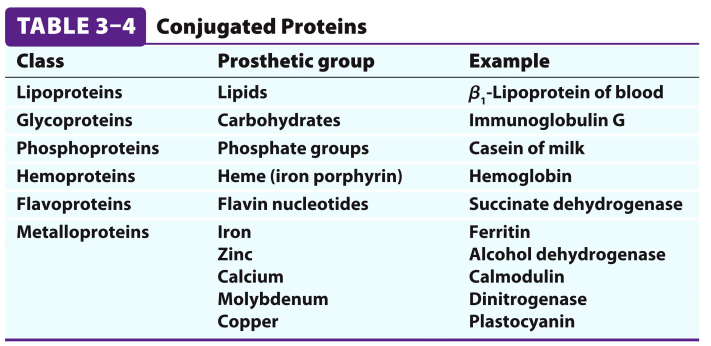
**Peptiden en eiwitten**

2.1 Peptiden zijn ketens van AZ

* Peptiden en proteïnen = polymeren van AZ
* Peptidebinding
  + = condensatiereactie
    - = Afsplitsen van H20
    - = Dehydratatie a-Carboxyl ene AZ en a-aminogroep andere AZ
  + = amidebinding tussen AZ
  + = covalente binding tussen C en N
  + Reactie niet spontaan -> activatie carboxylgroep want slechte LG
  + Conventie: AZ sequentie van N -> C
    - N-terminus (vrije aminogroep) C-terminus (vrije carboxylgroep)
  + Verbreking peptidebinding is exotherm
* Naamgeving
  + 2, 3, 4 AZ = dipeptide, tripeptide, tetrapeptide, ...
  + Oligopeptide = enkele AZ aan elkaar gebonden
  + Polypeptide = vele AZ aan elkaar gebonden
    - Moleculair gewicht < 10.000 Da
    - 1 Da = 1/12 massa 12C
  + Eiwit
    - Wnnr moleculair gewicht > 10.000 Da

2.2 Sommige eiwitten bevatten andere chemische groepen dan AZ

* Geconjugeerde eiwitten: bevatten buiten AZ ook andere niet-AZ groepen
  + Niet-AZ groep = prosthetische groep
    - Bepaalt mee de functie vh eiwit!
    - Vb: fosfoproteinen: (de)fosfolyering eiwitten = covalent fosfaatgroep koppelen -> bepaalt eigenschappen/functie eiwit
  + Covalent of niet-covalent geassocieerd met polypeptide

enkele vb KE

**3. Werken met eiwitten**

3.1 . Eiwitten kunnen worden gescheiden en gezuiverd

* Bestuderen structuur en activiteit/functie => moeten hiervoor eiwitten isoleren en zuiveren
  + Gebruik specifieke eigenschappen: massa, lading, binding
* Stap 1: Extractie/ Extract maken
  + = homogeniseren/mixen/breken van weefsels/cellen
    - => eiwitten vrijstellen in een oplossing/ het extract
  + Omstandigheden maken die eiwitten beschermen
    - Vb: buffers ipv zuiver water gebruiken
    - Vb: buffer met bep. proteasen (=enzyme die eiwitten afbreekt)
* stap 2: Differentiële centrifugatie **(zuiveren)**
  + = scheiding naar densiteit
  + = extract/ homogenaat centrifugeren
  + Werkwijze
    - In de oplossing: partikels niet opgelost
    - => oplossing aan hoge g waarden onderheven => sedimentatie versnellen
    - => door sequentieel grotere centrifugatiekrachten => sequentieel pellet
      * = partieel zuiveren
  + Resultaat
    - Wat niet boven de 150 000 g neerslaat = oplosbare eiwitten = supernatans
    - Onderaan = pellet
* Stap 3: Kolomchromatografie **(scheiden)**
  + = manier om moleculen van elkaar te scheiden in verschillende fracties op basis van eigenschappen zoals massa/grootte, lading, affiniteit om te binden,…
  + Uitleg ppt is via pigmenten/kleuren
  + Kenmerken
    - Vaste/Stationaire fase = poreuze solide matrix
      * **= chemisch inert, reageert niet met eiwit**
    - Mobiele fase = vloeistof, beweegt door de matrix
      * = Gebufferde oplossing die door kolom migreert
    - Proteïne = in de top van de kolom toevoegen
      * = opgelost in dezelfde buffer als mobiele fase (zie stap 1 en 2)
  + Werkwijze
    - Mobiele fase migreert doorheen de matrix door Fz
    - De proteïnenoplossing gaat mee met de mobiele fase doorheen de kolom
    - Bewegingssnelheid vd proteïnen is afhankelijk vd eigenschappen
      * Proteïnen bewegen sneller of trager door de kolom
        + ~ eigenschappen => interacties met matrix = vertragen
      * Resultaat: scheiding eiwitmengsel in fracties = **fractioneren**
    - Detector detecteert a.d.h.v. licht/ absorptiespectrum
      * Bij 280 nm maximaal eruit gehaald (?)
    - Buisjes vangen steeds 1 fractie op en dan doorschuiven
  + Probleem: bandverbreding
    - Band A is breder geworden na een tijd
    - Alle moleculen van A zijn niet zo goed bij elkaar gebleven
      * Want vertragen vd moleculen gaat niet even snel => sommige interageren wel/minder/niet met matrix
    - Gevolg: verdunning conc A => evenveel moleculen, maar groter V
  + Nu: **matrixeigenschappen aanpassen** => verschillende methoden
* **1) Ion-exchange chromatografie**
  + = scheiding op basis van verschil in netto lading van proteïnen bij gegeven pH
  + Kenmerken
    - Matrix = synthetisch polymeer van geladen groepen/beads
    - Kationen uitwisseling: matrix met anionen (opp. lading vd beads)
    - Anionen uitwisseling: matrix met kationen (opp. lading vd beads)
  + Werkwijze
    - Interacties geladen eiwitten met matrix
    - Vb: bij kationenuitwisseling: netto positief geladen eiwitten interageren met de matrix (anionen) => vertragen sterkt en vaakst => bovenaan kolom
      * Netto negatief geladen eiwitten => bewegen er sneller door => gaan **eerst eluteren**
      * Resultaat: ladinggradiënt => scheiding
  + Scheiding afhankelijk van pH van oplossing
    - Bij pI nettolading 0 => pH schuiven => nettolading schuift
    - pH veranderen rond pI om lading te wijzigen
* **2) Size exclusion chromatography**
  + = gel filtratie
  + = moleculaire zeef chromatografie
  + = scheiding op basis van grootte, interactie met matrix
  + Grote proteïnen elueren sneller
  + Kenmerken
    - Vaste fase bevat cross linked polumeer beads met poriën of caviteiten van een bepaalde grootte
  + Werkwijze
    - Grote proteïnen passen niet in poriën => nemen kortere & snellere route rond de beads
    - Kleine proteïnen passen in poriën => vertraagd door labyrintisch path
* **3) Affiniteit-chromatografie**
  + = scheiden op basis van bindingsaffiniteit
  + Kenmerken
    - Beads in kolom => covalent gebonden aan matrix = **ligand = gebonden**
      * Ligand = groep of molecule dat bind met macromoleculen vb: proteïnen
      * Eiwitten hebben specifieke plaatsen om te binden => sterke affiniteit voor bepaalde molecule/ligand
  + Werkwijze
    - 1) Proteïnenmengsel toevoegen aan kolom => elk proteïne met affiniteit voor dit ligand/substraat bind aan beads => w vetraagd door ligandbinding
      * Als interactie sterk genoeg
      * Als inteactie specifiek genoeg => vb ligand enkel met eiwit X binden
    - 2) Proteïnen die niet binden => uit kolom verwijderen
    - 3) Daarna elutie vh gebonden proteïnen:
      * Door toevoeging vrij ligand (competitie)
        + vrij ligand competitie met gebonden ligand => eiwit vrijstellen vd matrix (dwingen)
        + eiwit kan gebonden aan vrij ligand elueren uit kolom
      * Of door hoge zoutconcentratie
        + Zout => veel ionen => verstoort de zwakke binding proteïne-gebonden ligand => eiwit vrijstellen
  + Toepassing: immuno-affiniteitschromatografie (DON test)
    - Antilichaam
      * = eiwit dat specifiek op epito (=plek op eiwit) v/e eiwit bindt
      * => specifiek!!!
    - Kenmerken
      * Vaste fase bevat anticichamen aan beads
    - Werkwijze
      * 1) Eiwitmengsel toevoegen
        + => antilichamen binden **specifiek & sterk** met de epito’s vd eiwitten
        + => zo 1 eiwit uitvissen/scheiden
      * 2) interactie verbreken met hoge zoutconcentratie
    - Probleem
      * Er zijn maar voor heel weinig eiwitten de juiste antilichamen gekend
      * Niet veel antilichamen

2. Eiwitten kunnen worden gescheiden en gekarakteriseerd door elektroforese

* Migratie gel = zuiveringstechniek !!!
* **(Gel)-Elektroforese (1 richting)**
  + = scheiding van eiwitten in elektrisch veld
  + = gebaseerd op de migratie van geladen(door SDS) proteïnen in elektrisch veld
  + Analytische (niet-preparatieve) methode
    - Voordeel: protëinen kunnen w gevisualiseerd + gescheiden
  + Kenmerken/bouw:
    - 2 glazen platen
      * Tussen glazen platen matrix/gel
    - Matrix/gel
      * = cross linked polymeer e.g. polyacrylamide
      * ~ moleculaire zeef => scheiden naar massa & vorm
        + Vertraagt de migratie van proteïnen obv massa & vorm
        + PAGE = polyacrylamide gel electroforese
    - Elektrisch veld
      * Aan voet: + elektrode
      * Aan top: - elektrode
    - Kuiltjes boven de SDS polyacrylamide gel
  + Werkwijze
    - 1) In kuiltjes bovenaan: eiwitstaal inbrengen
    - 2) Toevoegen van blauw broomfenol aan eiwitstaal
      * => hierdoor ziet eiwitstaal blauw
    - 3) Toevoegen SDS aan eiwitstaal
      * = sodium dodecyl sulfate
      * = detergent want hydrofoob deel & sterk polair deel
      * => SDS bindt 1SDS/2AZ => grote negatieve lading op eiwit
        + Hierdoor elk proteïne gelijkaardige lading
      * => SDS zorgt voor denaturatie eiwit => ontvouwen eiwit
        + Hierdoor eiwitten verlies 3D structuur
        + Hierdoor eiwitten globulaire vorm
      * Conclusie: snelheid migratie/ scheiding enkel op basis van **massa**
        + Want lading overal idem & vorm weg
    - 4) Elektrisch veld => neg. geladen eiwitten migreren naar de + elektrode
      * = naar beneden
      * Snelheid migratie ~ massa
        + Kleine eiwitten = snelst (14,000)
        + Grote eiwitten = traagst
      * Blauw broomfenol
        + = klein
        + = snelst migreren
        + = migreert samen met de gellijn/frontlijn = dye front

Maar niet idem blauw als lijnen erboven => comassie

Toont de STOP aan

* + - * ⬄ size exclusion chromatografie (omgekeerd)
    - 5) Kleuring gel met eiwitspecifieke kleurstof e.g Coomassie blue
      * = bindt aan het eiwit, maar niet aan de gel => eiwitten visualiseren
      * = de verschillende blauwe banden boven dye front
        + Elke band = verschillend proteïne of subunit
  + **Toepassing: Hoeveelheid + zuiverheid bepalen + moleculair gewicht bepalen**
    - Hoeveelheid: hoeveel eiwitten ~ de sterkte vd kleur van Coomassie
    - Moleculair gewicht: positie onbekend proteïne vergelijken met posities vd gekende proteines (standaarden) met gekende moleculaire gewichten
      * p24: 1ste lane = standaarden/ markers = gekende eiwitten met gekend moleculair gewicht = indicatorset moleculair gewicht
      * p25: relatieve migratie ~ log Mr (standaarden) = lineair verband
        + op grafiek moleculair gewicht onbekend proteïne aflezen
    - Zuiverheid: het aantal zichtbare proteïnen banden op de gel vermindert na elke nieuwe fractionatie stap
      * p24 => rechts zuiveringsstappen
* **Isoelectric focusing**
  + = evenwichtselektroforese
  + = scheiding in elektrisch veld + pH gradiënt
  + = gebaseerd op de migratie van de **natuurlijk** geladen eiwitten in elektrisch veld & dat eiwitten verschillende pI waarden hebben (= 2 eigenschappen)
  + Werkwijze
    - 1) Eiwitmengsel toevoegen aan gelstrip dat pH gradiënt bevat
      * Oorzaak: Gel met amfolyten
        + pH gradiënt in gel door amfolyten

= zwak organische zuren & basen die gaan scheiden/ verdelen in de matrix/gel zodat pH gradiënt ontstaat

* + - 2) Toevoegen elektrisch veld
      * Eiwitten bewegen doorheen de pH gradiënt richting polen
      * Pos. geladen eiwitten => migreren naar neg. pool elektrisch veld
      * Op bepaald moment => pI=pH => stopt met migreren
        + => netto-lading = 0
      * => Proteïnen met versch pI’s zullen versch verdeeld zijn over gel
    - 3) Kleuring doen
  + **Toepassing: bepalen van het pI**
  + Conclusie
    - = pI gebaseerd
    - = natuurlijke lading gebaseerd
    - ≠ denaturerend
* **1ste extensie elektroforese: Twee-dimensionale elektroforese (2 richtingen)**
  + = PAGE + isoelectric focusing
  + = combinatie SDS electroforese en isolektrische focusing
  + = scheidt proteïnen met gelijk moleculair gewicht die verschillen in pI of proteïnen met zelfde pI en verschillende mol. Gewicht
  + Werkwijze
    - 1) Proteïnen scheiden dmv isoelectric focusing in een dunne strip gel = ISO
    - 2) Gel/ gescheiden proteïnen horizontaal leggen op SDS polyacrylamide gel
      * Worden gescheiden door SDS polyacrylamide gel = PAGE
    - 3) Kleuring = zwart = zilverchloride
  + Resultaat p27 grafiek: 2D
    - Horizontale scheiding door verschil in pI = ISO
    - Verticale scheiding door verschil in moleculaire massa = PAGE
  + Probleem
    - 1 vlek kan 100 eiwitten zijn => 1 vlek met spot pitcher uit gel halen => eiwit identificeren met mass spectrometry
* **2de extensie elektroforese: Immunoblot = Western blot (examen)**
  + = detectie van 1 **specifiek** eiwit in gel
  + = gebaseerd op antilichamen
    - = herkennen 3D configuratie v/e eiwit heel specifiek
  + Voorwaarden
    - Antilichaam moet binden
    - Antlichaam moet zichtbaar zijn
    - Antilichaam nodig!
  + Werkwijze 3 stappen
    - 1) Alle eiwitten in polyacrylamide matrix
      * Overbrengen op nitrocellulose membraan
    - 2) Nitrocellulosemembraan blokkeren
      * Het membraan volzetten met een ander eiwit op de plaatsen waar geen interessant eiwit (stap 1) voorkomt
      * Reden: membraan bindt eiwitten en antilichaam is een eiwit => de antilichamen zouden overal op membraan plakken ≠ onderscheidbaar
    - 3) Antilichamen toevoegen + kleuring doen
      * Kleuring gebeurt dus op het nitrocellulosemembraan en niet op de gel => stabieler!!!
  + Figuur uitleg
    - 1) Alle eiwitten in polyacrylamide gel
    - 2) Transfer eiwitten naar nitrocellulose membraan (=blotting)
      * 1) Gel op nitrocellulosemembraan
      * 2) Elektrisch veld aanleggen over gel + membraan
      * 3) Eiwit is neg. geladen door SDS => migreert naar pos. pool = membraan => eiwit transfer naar membraan = BLOTTEN
    - 3) Blocking agent: blokkeren onspecifieke eiwitbinding
      * Membraan ziet geel door blocking agent
      * 1) nitrocelulose in vloeistif met veel eiwit gebracht vb melk
        + => eiwit zal overal binden waar geen interessante eiwitten zitten => op deze plaatsen ku geen antlichamen binden
    - 4) Binding 1° antilichaam
      * 1) 1° antlichaam herkent + bindt aan epitope vd interessante eiwitten
    - 5) Binding 2° antilichaam (immunoglobuline G)
      * 1) G herkent epitope vh 1° antilichaam
    - 6) Detectie met chromogeen substraat & fluorescentie (kleuring)
      * 2) Aan 2° antilichaam => hangt enzyme
        + Indien we dit chromogeen substraat aangeven => zorgt enzyme dat eiwit zichtbaar wordtt
        + Voordeel: enzyme blijft werken zolang er substraat is
  + Vraag: waarom 2 antilichamen & niet 1ste gewoon markeren/fluoresceren?
    - Voor elk 1° antilichaam kan men hetzelfde 2° antilichaam gebruiken = ecologisch

3. Niet gescheiden proteïnen kunnen worden gekwantificeerd

* Kwantificatie eiwitten
  + Noodzakelijk bij zuivering en activiteitbepaling
    - Beoordelen of zuivering werkt via spec act en activiteit
  + = eiwitconcentratie bepalen
  + = hoeveelheid eiwit meten
  + Totale poel eiwitten karakteristeren
    - 1) Via absorptie 280nm (met ε280 in M-1.cm-1)
      * Poel eiwitten divers genoeg => tryptophan komt zeker voor
        + Dan maat tryptophan = maat voor de oplossing
    - 2) Via Colorimetrie/kleurreactie (e.g. met Coomassie) + standaard curve
      * Concentratie ~ absorptie (Lambert Beer wet)
        + Redelijk lineaire grafiek
        + Absorptie meten => concentratie aflezen
      * Standaardcurve opstellen
        + Coomassie molecule bindt => eiwit ziet blauw
        + Absorptie blauw licht meten + gekende concentratie
        + => standaardcurve opstellen
      * Standaardcurve kenmerken
        + X-as: concentratie
        + Y-as net absorptie => zelf kijken naar spectrum => rood = kleurreagens toegevoegd dan zien we de absorptie want eiwit = ongekleurd (??)
    - => parameter gemeten => uitdrukken in activiteiten
    - => telkens TOTALE eiwitgehalte meten! Niet van 1 eiwit
  + Enzymen karakteriseren
    - Voor proteïnen dat enzymen zijn
      * Hoeveelheid in de oplossing meten in termen vh catalytisch effect dat het enzyme produceert
        + = Hoeveelheid bepalen adhv de verhoging van de snelheid waarmee het substraat wordt omgezet in reactieproducten wanneer het enzym aanwezig is
    - Nodige info: omstandigheden (pH), cofactoren nodig, kinetiek
  + Activiteiten en eenheden
    - 1 Enzymeenheid (unit) = hoeveelheid enzym die 1 µmol substraat omzet naar product, per minuut bij 25°C
    - Enzymactiviteit = hoeveelheid substraat omgezet, per tijdseenheid, per vol-eenheid (hoeveel is er)
    - Specifieke enzymactiviteit
      * = totale activiteit per totale massa eiwit (mg) (relatief tov de poel)
    - Correlatie: hoe meer units/enzymen => hoe meer activiteit/hoe meer subsstraat omgezet
  + Tabel 3-5 (examen getallen uitrekenen + uitleggen => ! kan ook act verliezen!)
    - Doel: beoordelen hoe goed manier van zuiveren is
    - 1-5 verschillende chromatografiën: stel we onderzoeken enzyme
      * 1) crude = extract maken
      * 2) Techniek om eiwitten in extract gedeeltelijk te zuiveren
        + Ammonium sulfaat toevoegen => eiwit laten neerslaan
        + Daling naar 280ml

Reden: Aantal eiwitten slaan neer => ≠ in extract

=> volume + deel eiwitten kwijt

* + - * + 10,000 -> 3,000

=> Veel eiwit kwijt = goed, maar zien of enzyme kwijt is of niet => kijken naar activiteit

=> Activiteit: 96,000 ~ 100,000 = niet veel achteruitgegaan => dus nog veel enzymen erin!!

* + - * + Spec activiteit stijgt

=> Wil zeggen dat we niet de enzymen zijn kwijtgespeeld, maar andere eiwitten

* + - * 3) ion: 280ml gaat elueren uit kolom => in elke fractie kijken hoeveel enzymactiviteit => buisjes met meer acti. = daar zit enzyme in
        + Daling volume

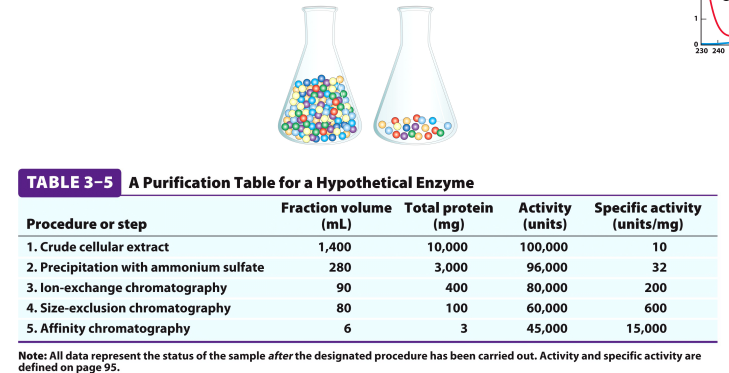
Reden: Enkel deze buisjes onderzoeken => minder volume + minder eiwit in

* + - * + Activiteit niet achteruit & spec activiteit grote winst
      * 4) size exclusion: buisjes met enzyme eruit halen (again)
      * 5) affinity: super specifiek
        + Daling volume is sterk

Reden: binden eiwit aan matrix => specifiek

=> veel eiwit kwijt dat niet boeit

* + - * Volume daalt pas bij 5) want 4) en 3) niet volume specifiek
    - Spec enzymactiviteit
      * = maat voor de enzymzuiverheid
      * = units/**totaal** mg
      * Stijgt met elke zuiveringsstap => w maximaal en constant wnnr enzyme zuiver is
      * Na elke zuiveringsstap: activiteit meten + totale hoeveelheid proteïne bepalen individueel => ratio van deze 2 = spec enzymact.
    - Activiteit
      * Daalt na elke zuiveringsstap door verlies proteïne door inactivatie of niet ideale interacties met chromatografische materialen of andere moleculen in de oplossing
    - Totaal proteïn gewicht
      * Vb: 1 ml uit extract halen => bepalen hoeveel eiwitten erin => zo weten hoeveel in totaal volume zitten
      * Daalt na elke zuiverinsstap want doel is om zoveel mogelijk niet nodig of onspecifiek proteïne te verwijderen
      * Succesvolle stap: verlies onspecifiek proteïne > verlies activiteit
        + Hierdoor spec enzymact stijgt ook al daalt totale activiteit
    - Proteïne = puur/zuiver
      * Als verdere zuiveringsstappen falen om de spec act te verhogen & wnnr 1 enkel proteïne w gedeteceerd
    - Na stap 5
      * enzyme is gezuiverd bij factor 1,5000 => zie je aan de verhoging vd spec activiteit relative tot hat in the crude extract
      * yield = 45% => zie je aan het herstel vd totale activiteit
  + Flessen: idem aantal rode ballen, maar versch. aantal andere kleuren
    - Beide flessen hebben dezelfde activiteit vh proteïne kijkend naar rood
    - 2de fles hogere spec. ctiviteit want rode ballen hogere fractie vh totaal



**4. De structuur van eiwitten: primaire structuur**

4.1 Structuur proteïnes

* Structuur proteïnes => 4 niveaus complexiteit (hiërarchie)
* Primaire structuur
  + = de beschrijving van alle covalente bindingen (peptide en disulfide bindingen) die aminozuurresidus linken in een polypeptideketen
  + = AZ sequentie van N naar C termines (meest belangrijke element 1° structuur)
* Secundaire structuur = terugkerende structurele patronen (α-helices; β-sheets)
* Tertiaire structuur = 3D plooiing van eiwit/polypeptide (inclusief prosthetische groep)
* Quaternaire structuur = opbouw uit meerdere subeenheden (subunits van polypeptiden)

4.2 Proteïnesequenties helpen met ontcijferen geschiedenis leven op aarde

* Bioinformatica
  + Nieuwe methoden om data te halen uit proteïnensequenties
  + 1° structuur belangrijk voor bioinformatica
    - Functie eiwitten bepaald door 3D struct. & 3D struct. bepaald door 1° struct.
  + Doel: functies identificeren + AZ sequentie identificeren + structuur van nieuwe proteïnen vgl met proteïnen al in database
* Principe
  + gensequenties en eiwitsequenties in verwante organismen gelijkend
    - sequenties vertellen iets over EVOLUTIE
    - 2 organismen verwant => gen & eiwitsequenties gelijkand
    - Sequenties verschillen ~ Toenemende evolutionaire afstand tssn 2 org.
  + Beschikbare sequentie data stijgt enorm => gescheidenis/ evolutie traceren =>
    - Maar hoe lezen sequenties?
* Evolutie GE registreren
  + 2 complexiteiten evolutie
    - 1) Verschillende evolutiesnelheden
      * => Sommige AZ spelen meer belangrijke functionele rol
      * => deze AZ blijven bewaard gedurende evolutie , minder belangrijke vaak veranderd v(b door substitutie)
        + Via deze variabele residu’s => evolutie registreren
      * => sommige proteïnen meer variabele residu’s dan andere
        + Dus verschillende evolutiesnelheden
    - 2) Laterale gentransfer
      * = de transfer v/e gen of groep genen vh ene org. Naar het andere
      * Vb: snelle antibiotica resistentie genen verpreiding in bacteriële populaties na transfer=> de eiwitten afgeleid van deze transfergenen => niet bestudeerbaar voor bacteriële evolutie
        + Hebben een te beperkte gem. geschiedenis met hun ‘host’
  + Focus op eiwitfamilies (verwant)
    - Leden van eiwitfamilie = homologe eiwitten = homologs
    - Paraloog = als 2 homologen aanwezig zijn binnen idem soort
    - Ortholoog = homologen van andere soorten (tussen soorten)
    - Evolutie nagaan door eerst homologe groepen te identificeren en dan verdere verwantschappen te zoeken
  + Methode: Aligneren eiwitsequenties (e.g. Hsp70) (= multiple alignment)
    - Computer vergelijkt twee of meer sequenties tussen proteïnen rechtstreeks (1) of kan in databases verwantschap zoeken met de onderzochte AZ seq. (2)
      * Principe (2): samenleggen sequenties (aligneren) => identieke AZ sequenties (stukken goed geconserveerd) zoeken = essentiële AZ
    - Complexiteit
      * Gelijkenis in vb 2 segmenten, maar verschillen ertussen & andere lengte => niet aligneerbaar
        + ‘gaps’ introduceren in 1 vd sequenties => wel match
        + Indien te veel gaps matcht elke sequentie => correctiefactor
    - Ppt vb: sequentie alignment van stuk Hsp70 proteïnen (proteine folding chaperones) van 2 bacteriën: E coli en Bacilius subtilis => gap =>betere match
  + Methode: analyse dat de chemische eigenschappen gesubstitueerde AZ beschouwd
    - Reden: methode aligneren => vinden identieke AZ is vaak nog onvoldoende om verwante eiwitten & hoe verwant te identificeren
    - Veel AZ gesubstitueerd door AZ met gelijkaardige ch eigenschappen
  + Methode: Signatuursequenties
    - = karakteristieke sequentie voor taxonomische groep (niet in andere!)
    - Vb: een insertie van 12 AZ in archaea en eukaryoten, maar niet in bacteriën
      * => evolutionaire verwantschap archeae en euk beschrijven
* Hele sequentie v/e proteïne => informatie gebruiken om evolutionaire bomen op te stellen
  + Bomen verbeteren als we meerdere groepen proteïnen vergelijken -> streven naar levensboom alle leven op aarde

4.3 Consensusssequenties en sequentielogo’s

* 2 manieren om in termen van AZ herkenbare sequenties neer te schrijven
  + 1) Consensussequentie
    - = beschrijving van conservering van 1° sequentie
    - (a) = ATP binding stuctuur = P loop; (b) = Ca2+ binding structuur = EF hand
    - - = posities scheiden;
    - x = alle AZ mogen die positie ;
    - []= de toegelaten AZ op 1 positie; x( ) = herhaling; {} = AZ die niet mogen
  + 2) Sequentielogo = stacking volgens niveau van conservering en bijdrage AZ
    - Zie vb: positie 1: G of A => allebei hydrofoob => lijken goed op elkaar dus OK
    - Hoogte vd stack = impliceert de graad v. conservering van seq. op die positie
    - Hoogte van 1 symbool = impliceert de rel. frequentie van dat AZ
    - Kleuren = de karakteristieken: polair (groen), basisch (blauw), zuur (rood), hydrofoob (zwat)