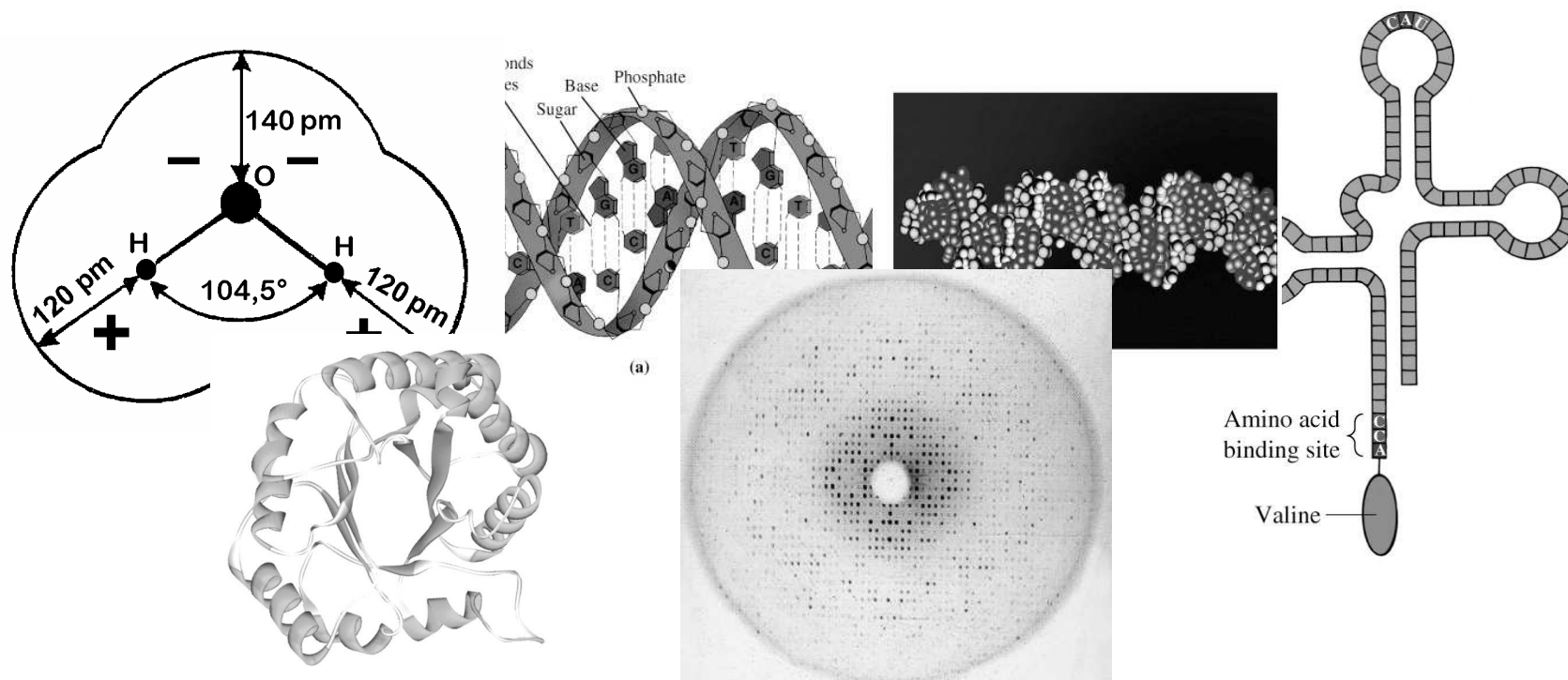


Přednášky z lékařské biofyziky

Masarykova univerzita v Brně - Biofyzikální centrum



Úvod do molekulární biofyziky

Struktura přednášky

Voda

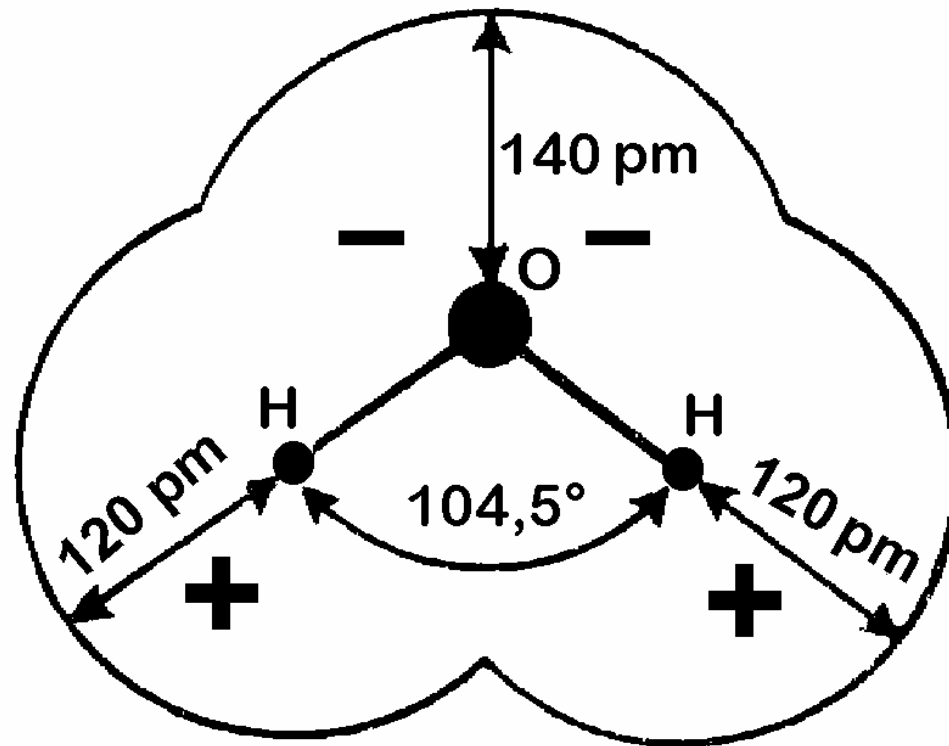
Vlastnosti koloidních roztoků

Struktura bílkovin

Struktura nukleových kyselin

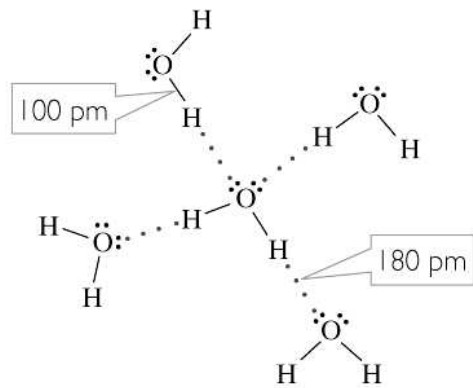
Vybrané metody studia biopolymerů

Voda

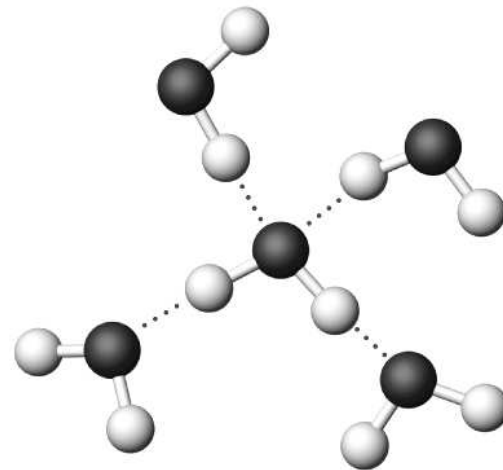


- Molekuly vody jsou silně polární, mezi kyslíkem a vodíkem sousedících molekul vznikají vodíkové můstky spojující molekuly vody do shluků - clusterů

Vodíková vazba mezi molekulami vody



(a)



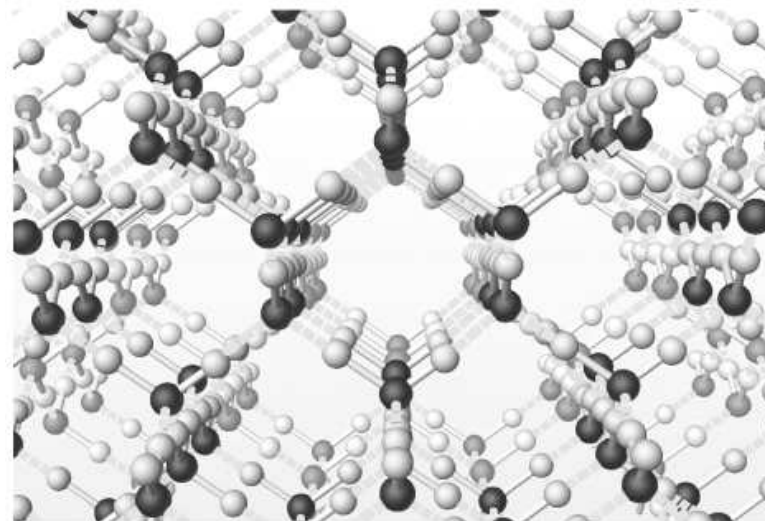
(b)

•Kapalná voda

Obrázky:

http://cwx.prenhall.com/bookbind/pubbooks/hillchem3/media/ib/media_portfolio/11.html

•Led



(a)



(b)

Koloidy a jejich rozdělení

Koloidy – též nepravé roztoky –
dispergované částice o rozměru zhruba 10
– 1000 nm.

Podle převažujících vazebných sil dělíme na:

- Micelární (též asociační, udržované v celku van der Waalsovými vazbami)
- Molekulární (kovalentní vazby)

Další dělení koloidů

Podle afinity k rozpouštědlu

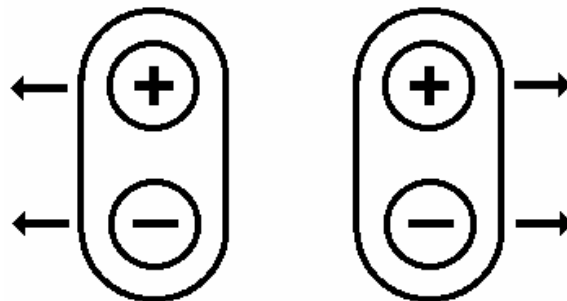
- Lyofilní (hydrofilní) – tvoří stabilní disperze
- Lyofobní (hydrofobní) – tvoří nestabilní disperze

Podle tvaru částic (tvar částic je ovlivňován i rozpouštědlem)

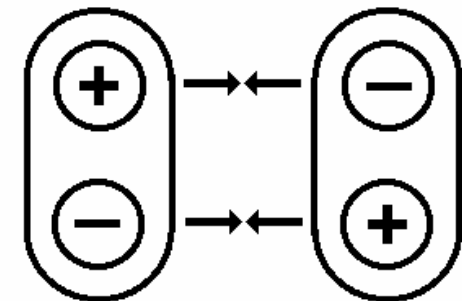
- Lineární (fibrilární – DNA, myosin, syntetické polymery.....též skleroproteiny – většinou nerozpustné ve vodě)
- Sférické (globulární – hemoglobin, glykogen ... též sféroproteiny – většinou rozpustné ve vodě)

Další vazebné síly (vazby) uplatňující se v koloidních částicích

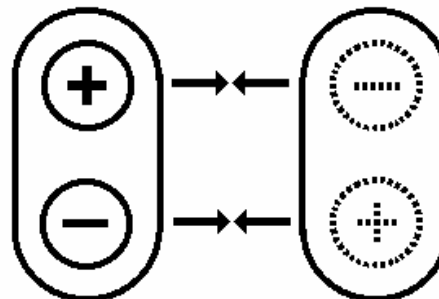
- Vodíkové vazby
- Hydrofobní interakce
- **van der Waalsovy síly**



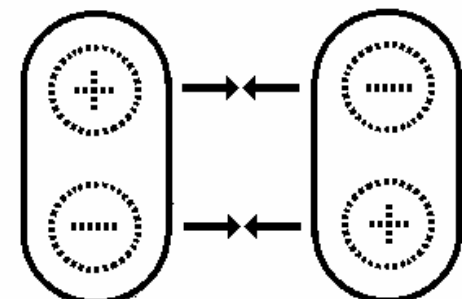
a) dipólové paralelní



b) dipólové antiparalelní



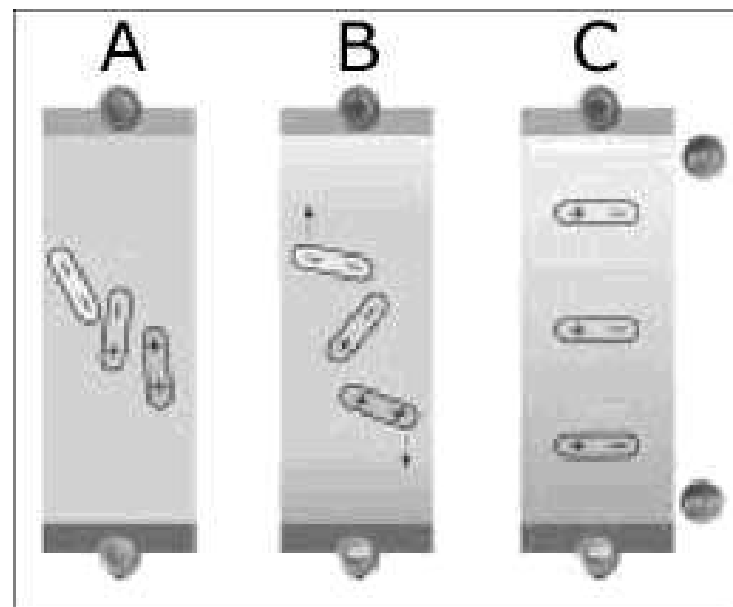
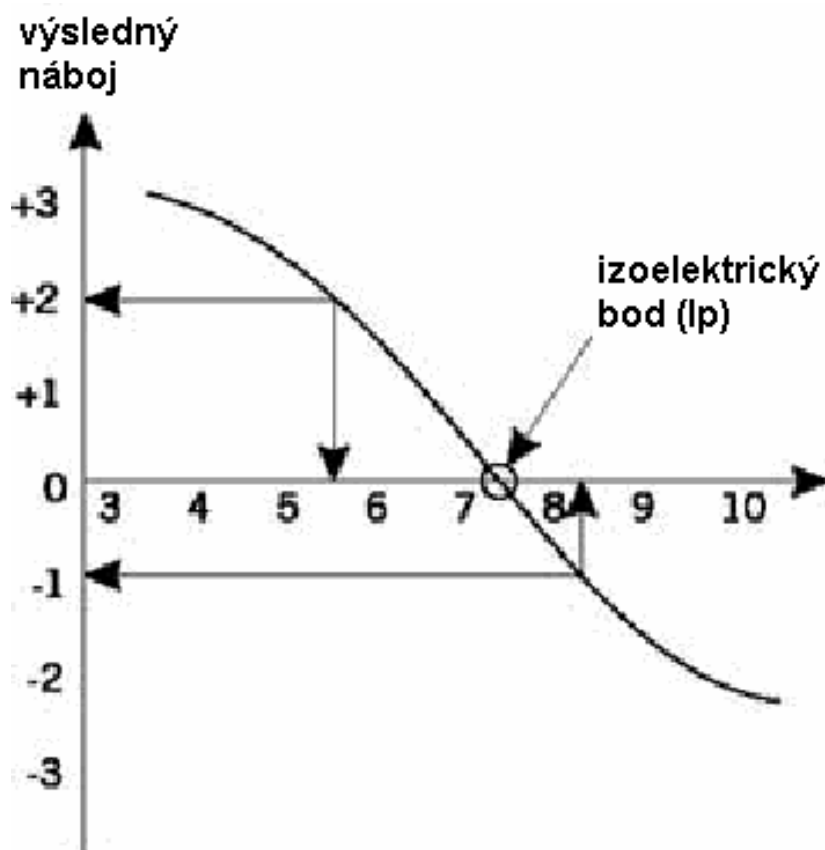
c) indukční



d) disperzní

Elektrochemické vlastnosti koloidů

- Některé molekulární i micelární koloidy jsou polyelektrolyty s amfoterními vlastnostmi (amfolyty)



U bílkovin jde o změny v počtu disociovaných skupin $-\text{NH}_3^+$ a $-\text{COO}^-$

Vznik elektrické dvojvrstvy na povrchu koloidní částice

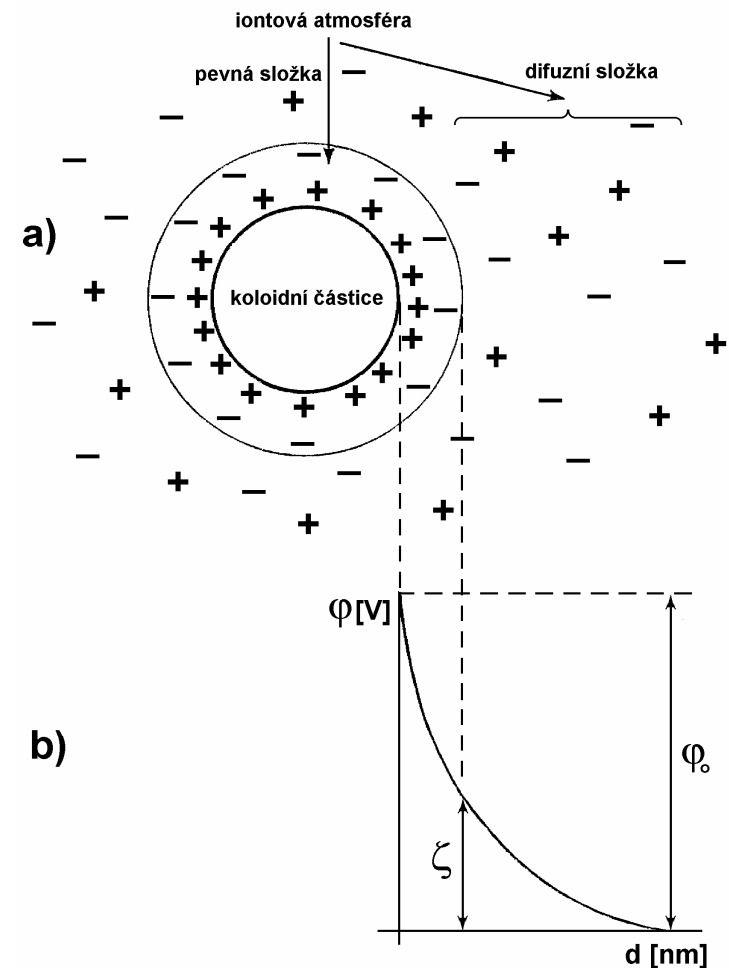
Dva mechanismy:

- Iontová adsorpce (i u lyofobních koloidů)
- Elektrolytická disociace (u lyofilních koloidů)

Dvojvrstva na povrchu koloidní částice se liší u koncentrovaných a zředěných elektrolytů

Ve zředěných elektrolytech lze rozlišit stálou, difuzní a elektroneutrální oblast.

Elektrokinetický potenciál – ζ -potenciál

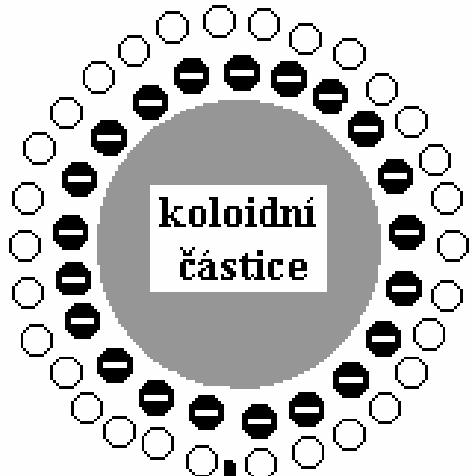


hydrofilní
hydratovaná
elektricky nabitá = stabilní koloid

hydrofobní
nabitá

● elektrické náboje iontů

○ vázané molekuly vody - solvatační obal



dehydratace



vybití

vybití



hydrofilní
vybitá

dehydratace



hydrofobní
vybitý = nestabilní koloid

flokulace



Další vlastnosti koloidů

- Mechanické: pevnost, pružnost, viskozita –
důsledky chemických vazeb a slabých
chemických interakcí

Tyto vlastnosti závisí na formě koloidu:

Sol nebo gel. Tvorba gelu = želatinizace

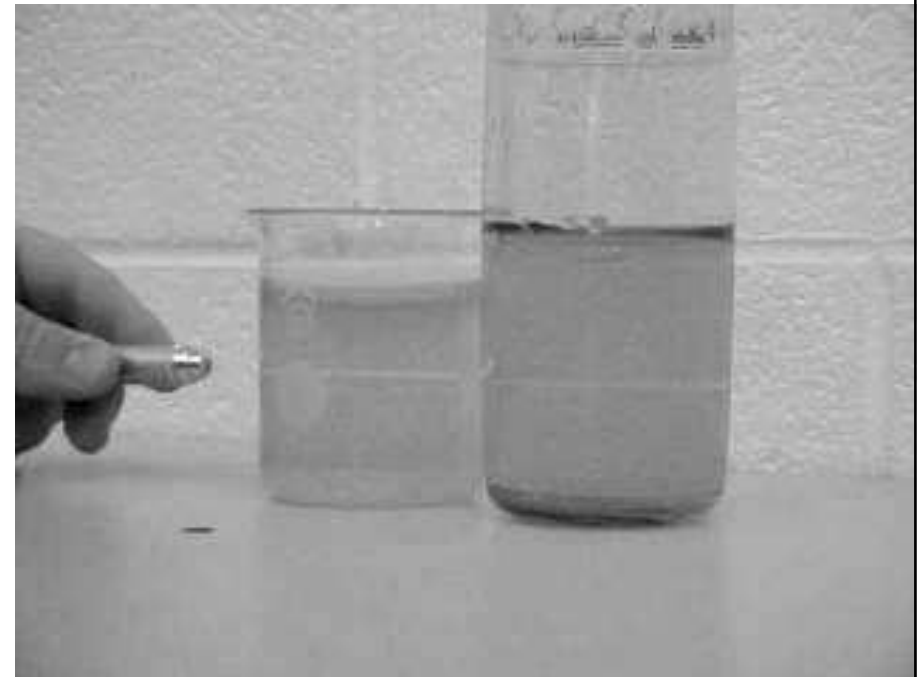
- Optické: Tyndallův jev (opalescence) -
ultramikroskopie

Tyndallův jev v micelárním a molekulárním koloidu



- v roztoku koloidního zlata

<http://mrsec.wisc.edu/edetc/cineplex/gold/>

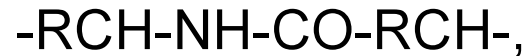


- v roztoku želatiny

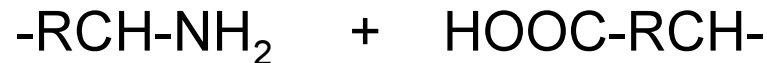
<http://link.springer-ny.com/link/service/journals/00897/papers/0006002/620095mb.htm>

Struktura bílkovin

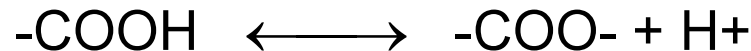
- Strukturními jednotkami bílkovin jsou aminokyseliny (AK), spojené **peptidovou vazbou**:



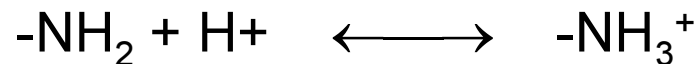
která může hydrolyzovat:



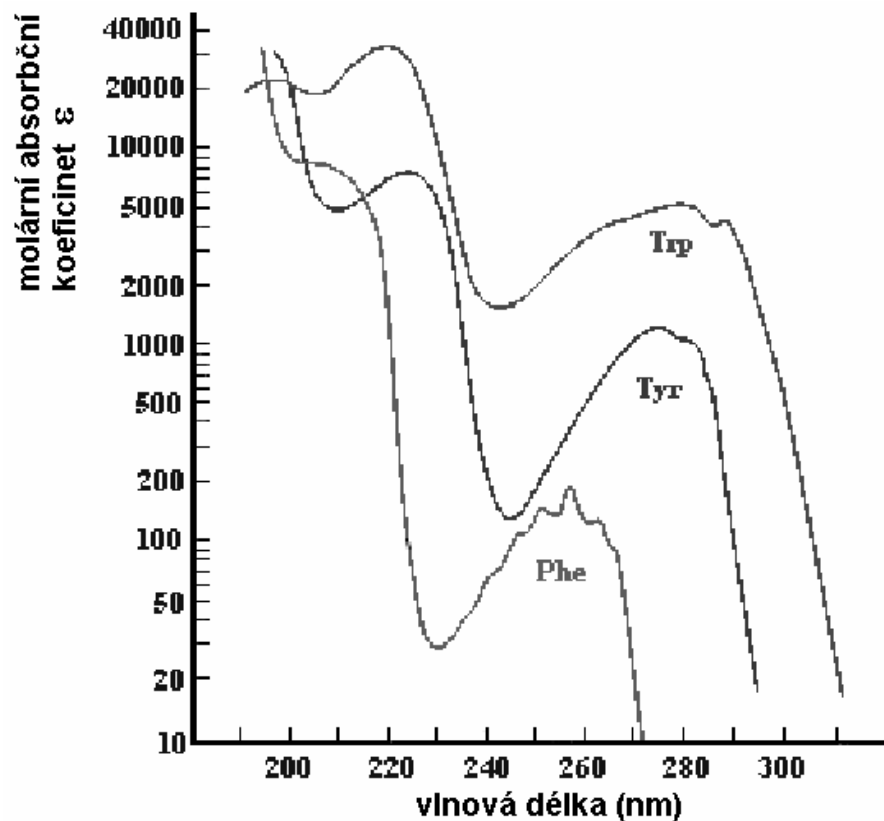
- Karboxylové a aminové skupiny mohou disociovat. Např. kyselina glutamová a asparagová mají volnou karboxylovou skupinu:



- AK lysin a arginin mají volnou aminoskupinu, která “disociuje” (ionizuje):



- V bílkovinách se běžně vyskytuje 20 AK, které členíme na AK s polárním a nepolárním postranním řetězcem.
- AK s aromatickým jádrem nebo heterocyklem (fenylalanin, tyrosin, tryptofan) silně absorbují UV světlo kolem 280 nm.
- Cystein obsahuje sulfhydrylovou skupinu (-SH), která dehydrogenací oxiduje a spojuje se sulfhydrylovými skupinami jiných cysteinových zbytků kovalentními **disulfidickými můstky** (-S-S-).

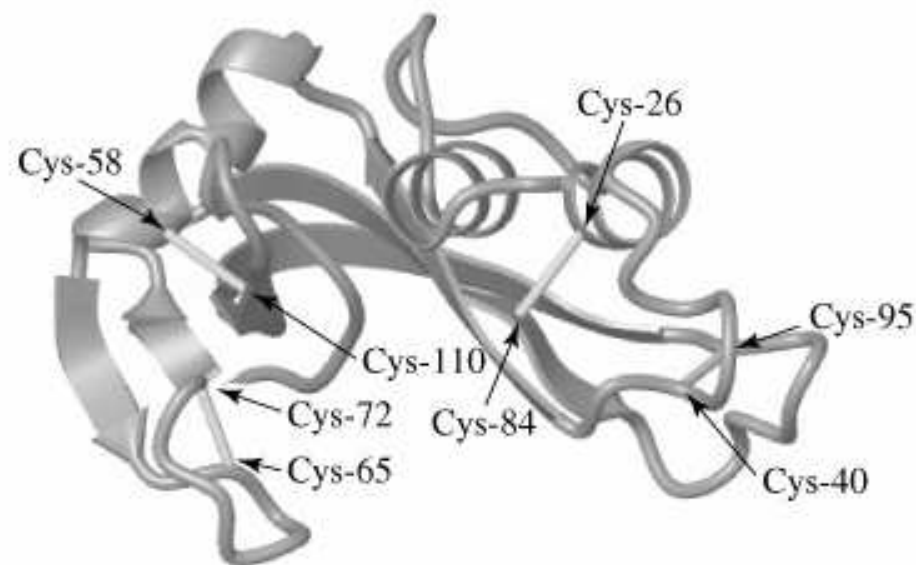


• Absorpce aromatických AK v UV oblasti

• Podle: <http://www.fst.rdg.ac.uk/courses/fs460/lecture6/lecture6.htm>

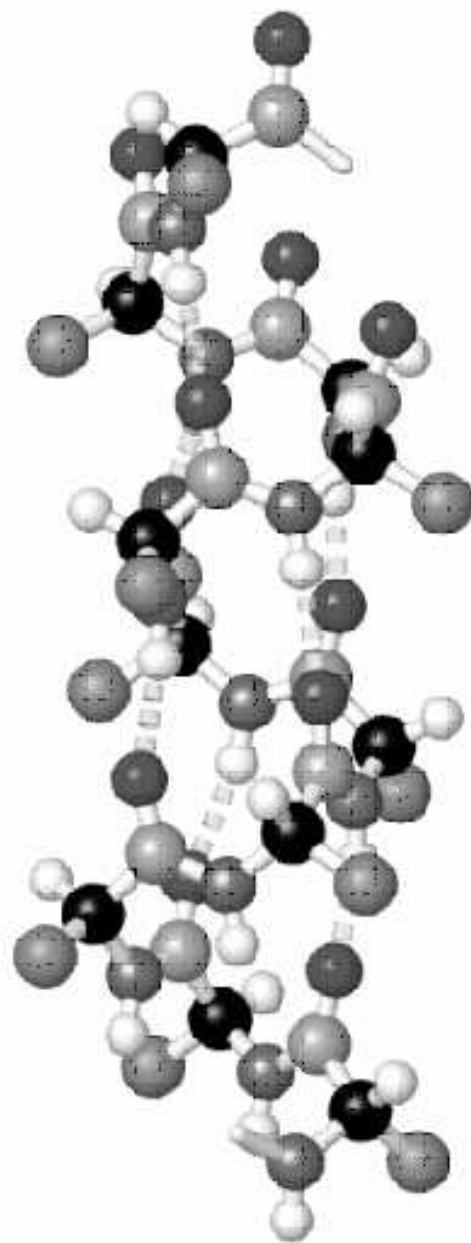
• Disulfidické můstky zpevňují strukturu hovězí ribonukleázy A

• http://cwx.prenhall.com/horton/medialib/media_portfolio/text_images/FG04_28a-b.JPG

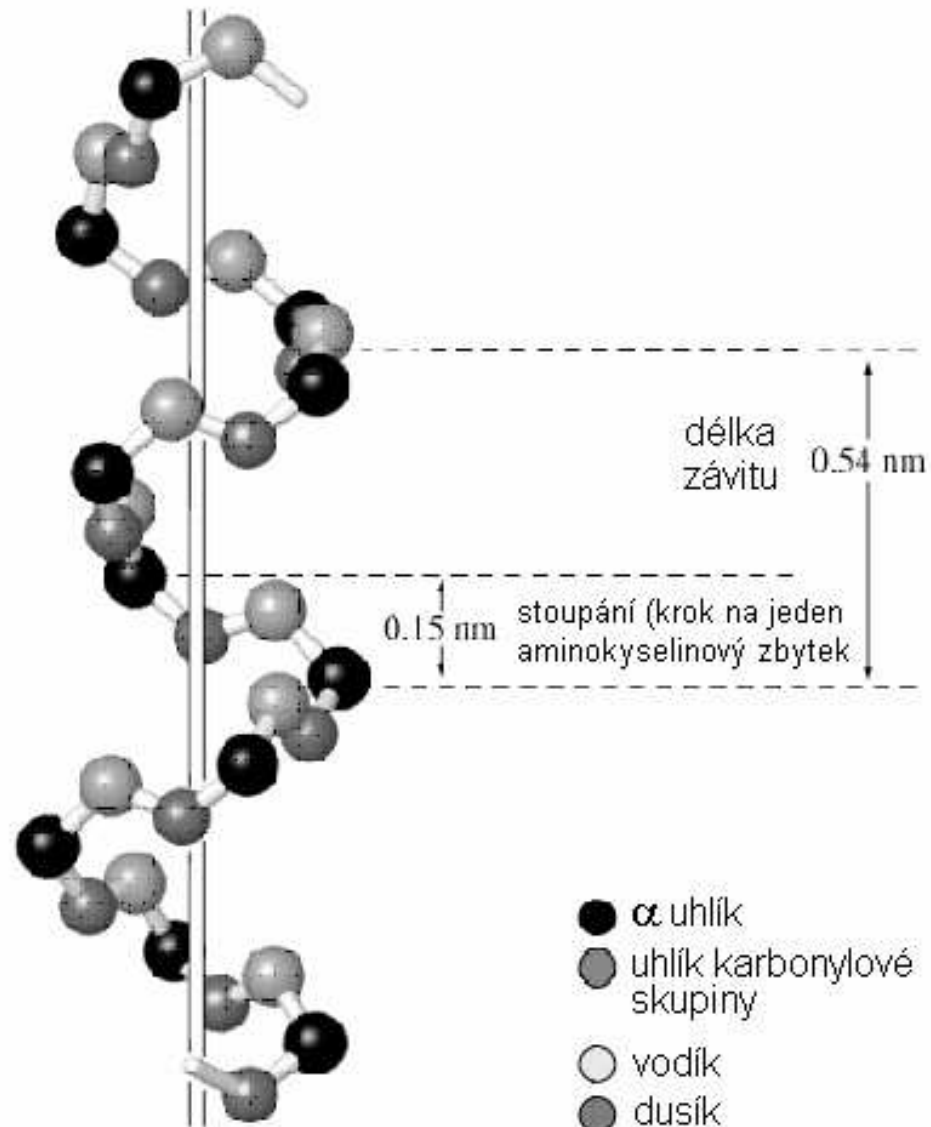


Struktura bílkovin

- **Primární** (sled kovalentně vázaných AK zbytků)
- **Sekundární** (vzájemné prostorové uspořádání sousedních článků polypeptidového řetězce – dáno především vodíkovými vazbami)
 - α -helix
 - β -struktura (skládání list)
 - jiné
- **Terciární** (prostorové uspořádání řetězce jako celku – dáno hydrofobními a vodíkovými vazbami, zpevněno -S-S- můstky)
- **Kvartérní** (způsob spojení jednotlivých polypeptidových řetězců ve vyšší celky – nekovalentně)
 - Homogenní – všechny protomery stejné
 - Heterogenní – protomery dvou i více typů



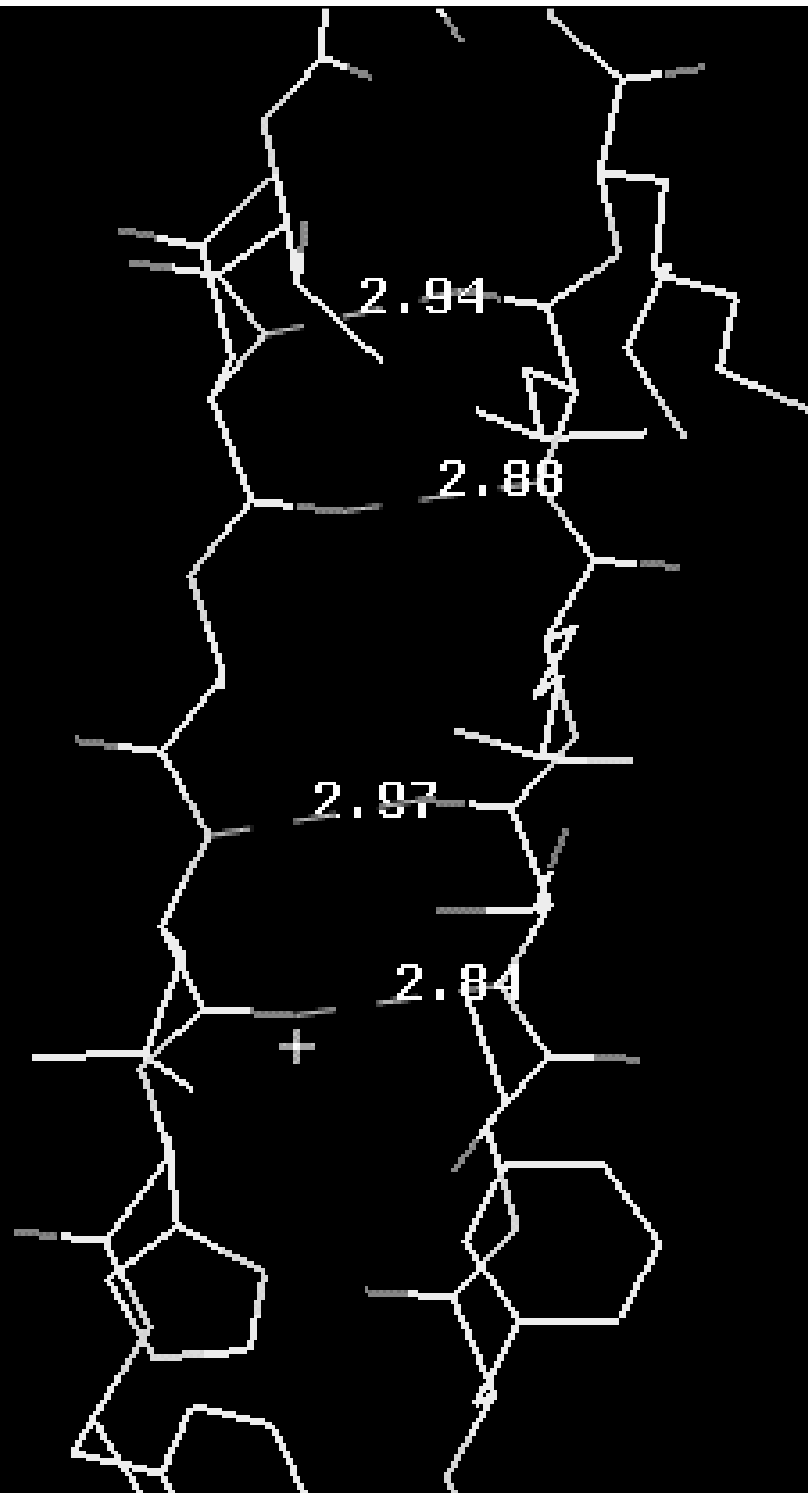
pravotočivá α šroubovice



osa

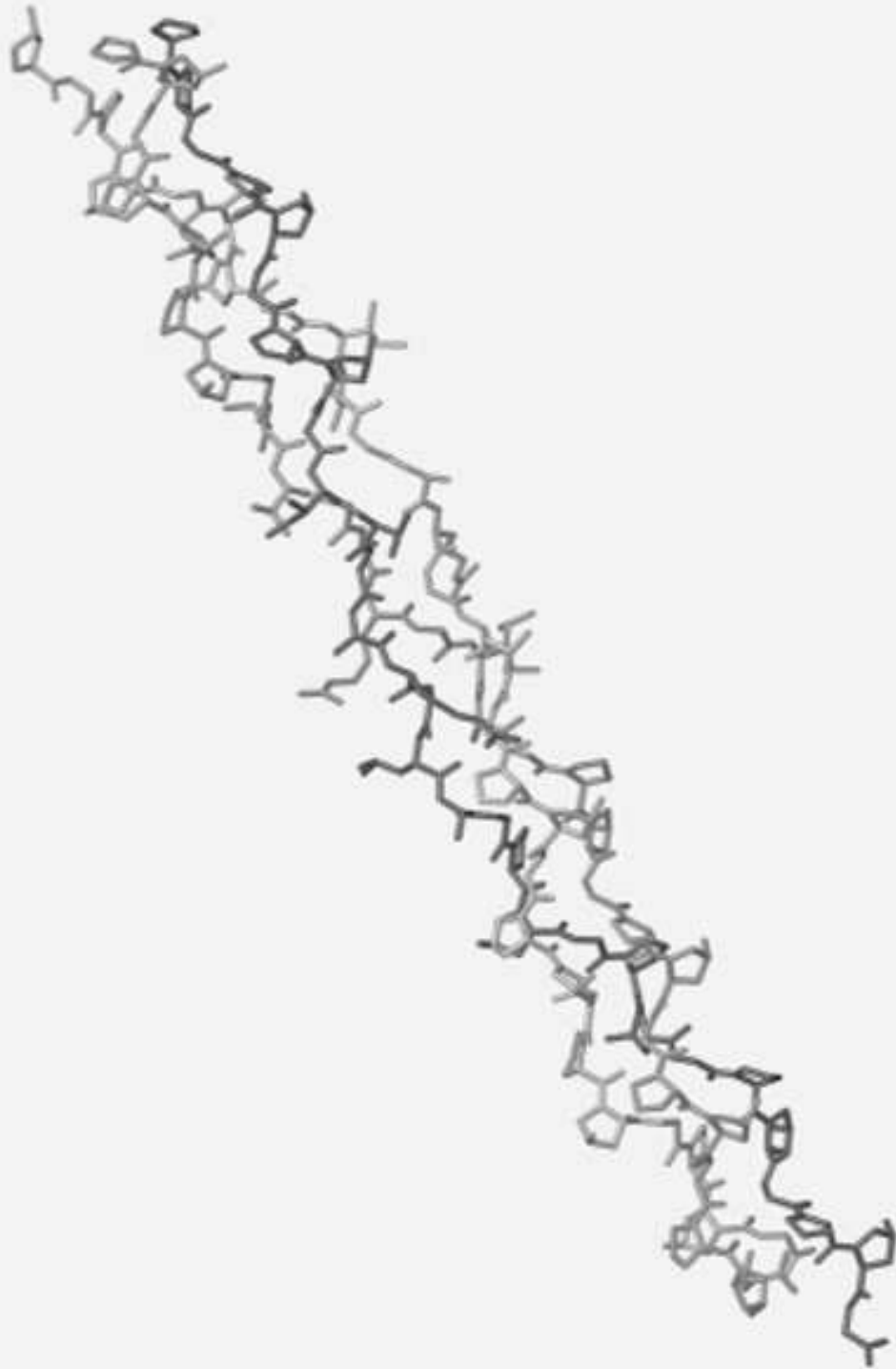
- α uhlík
- uhlík karbonylové skupiny
- vodík
- dusík
- kyslík
- vedlejší řetězec

•Podle: http://cwx.prenhall.com/horton/medialib/media_portfolio/text_images/FG04_10.JPG



β -struktura
(skládáný list –
antiparalelní
model)

[http://www-
structure.llnl.gov/Xray/tut
orial/protein_structure.ht
m](http://www-structure.llnl.gov/Xray/tutorial/protein_structure.htm)



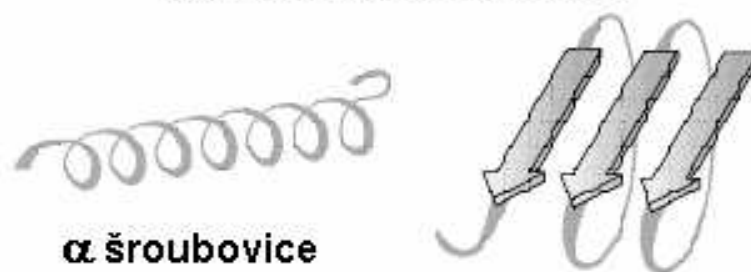
Trojité šroubovice kolagenu

[http://cwx.prenhall.com/horton/
medialib/media_portfolio/text_im
ages/FG04_34.JPG](http://cwx.prenhall.com/horton/medialib/media_portfolio/text_images/FG04_34.JPG)

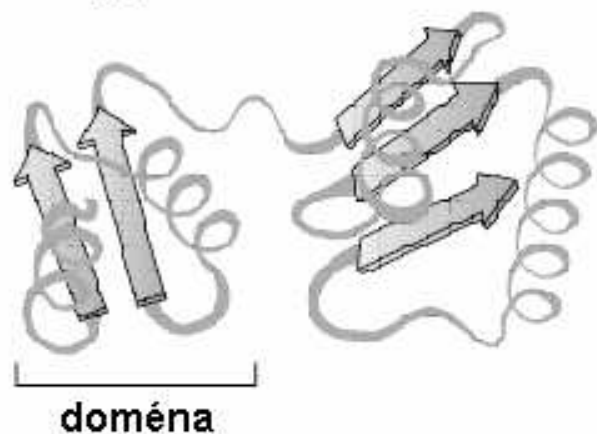
(a) primární struktura

–Ala–Glu–Val–Thr–Asp–Pro–Gly–

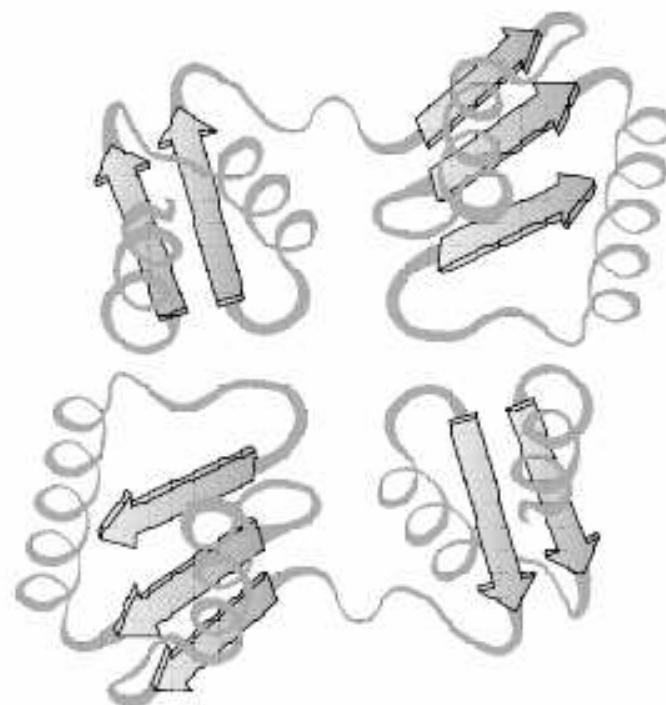
(b) sekundární struktura



(c) terciární struktura

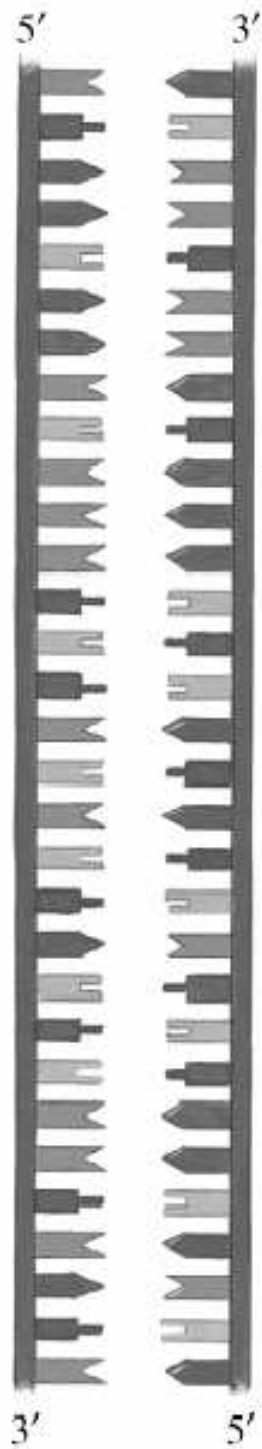


(d) kvartérní struktura



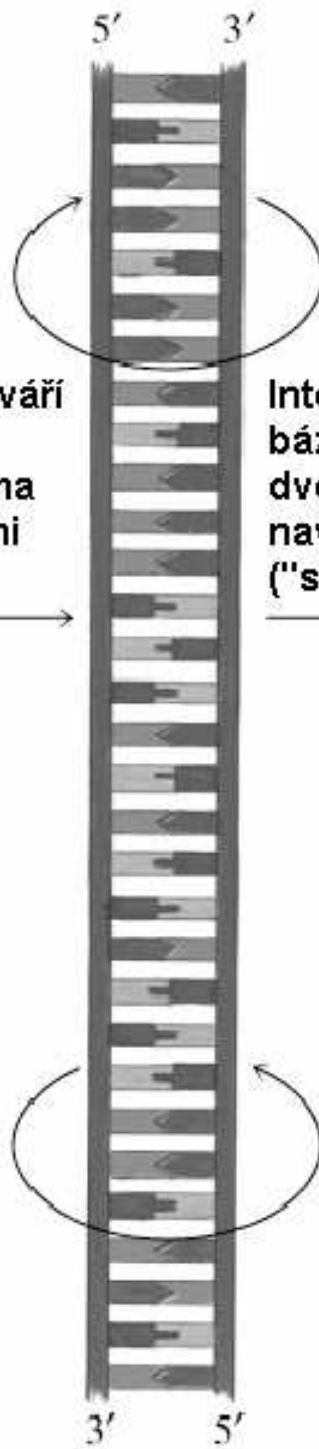
Struktura nukleových kyselin

- Mononukleotidy tvoří:
 - Dusíkaté báze pyrimidinové (C, U, T) a purinové (A, G)
 - Cukr (ribóza, deoxyribóza)
 - Zbytek kyseliny fosforečné
- DNA: až statisíce podjednotek. M.h. $10^7 - 10^{12}$
- RNA:
 - Informační (mediátorová, messenger)
 - Přenosová (transferová)
 - Ribosomální



Párování bází vytváří pravidelnou strukturu se dvěma komplementárními řetězci

A
T
G
C



Interakce mezi páry bází vede k vytvoření dvoušroubovice s navrstvenými páry bází ("stacking")

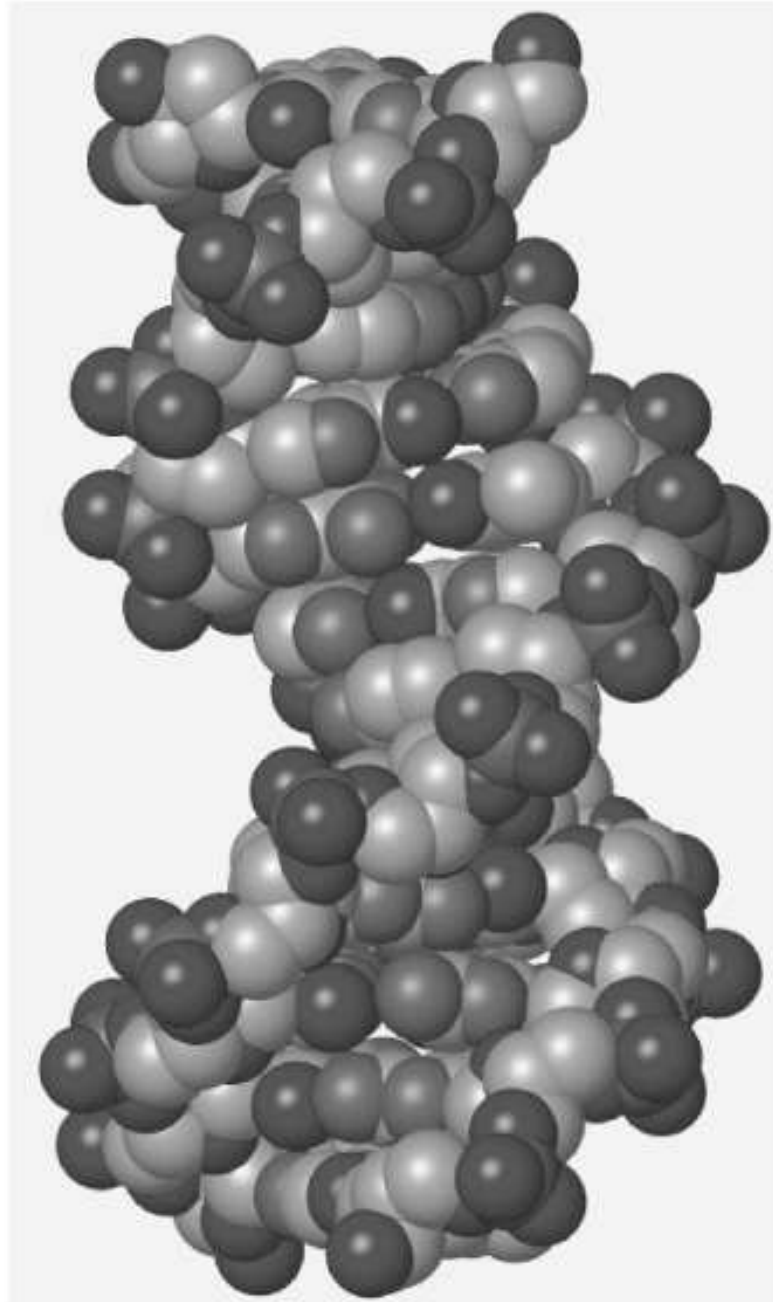


•http://cwx.prenhall.com/horton/media_portfolio/text_images/FG19_13_90035.JPG

(a)



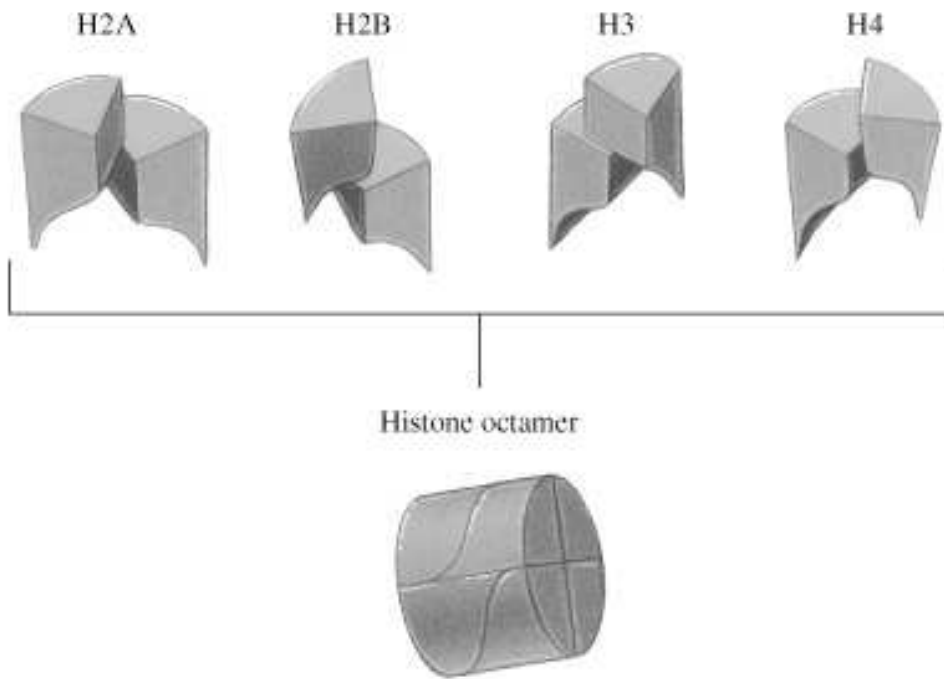
(b)



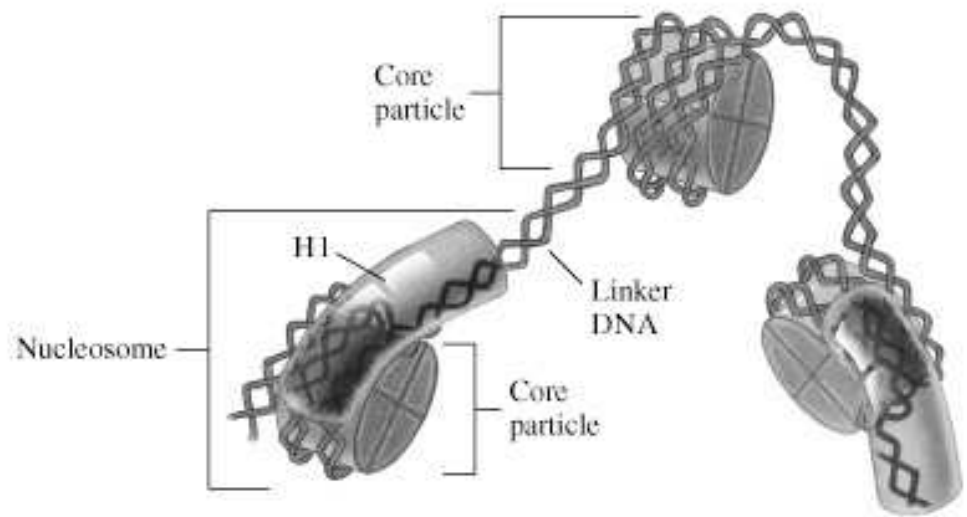
B-DNA

http://cwx.prenhall.com/horton/medialib/media_portfolio/text_images/FG19_15aC.JPG
G

(a)



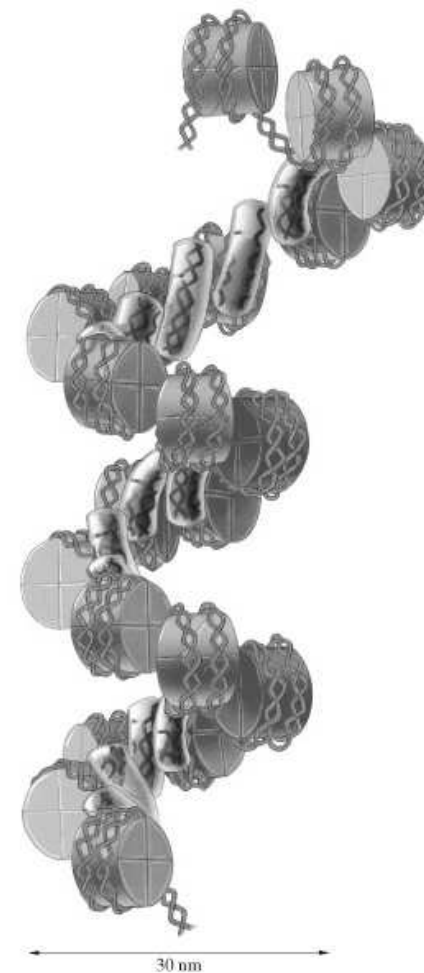
(b)

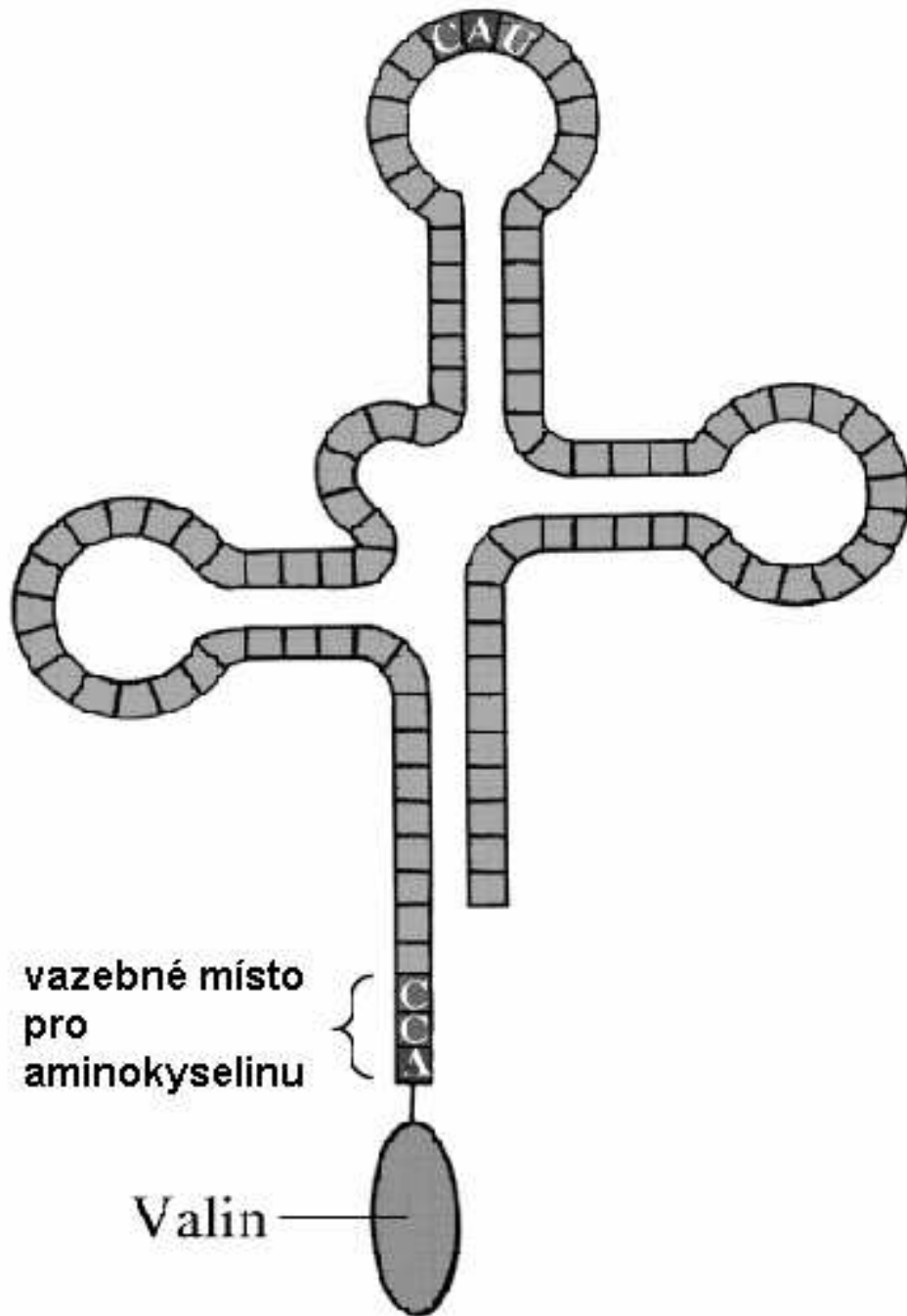


Struktura chromatinu

http://cwx.prenhall.com/horton/medialib/media_portfolio/text_images/FG19_23_00742.JPG,

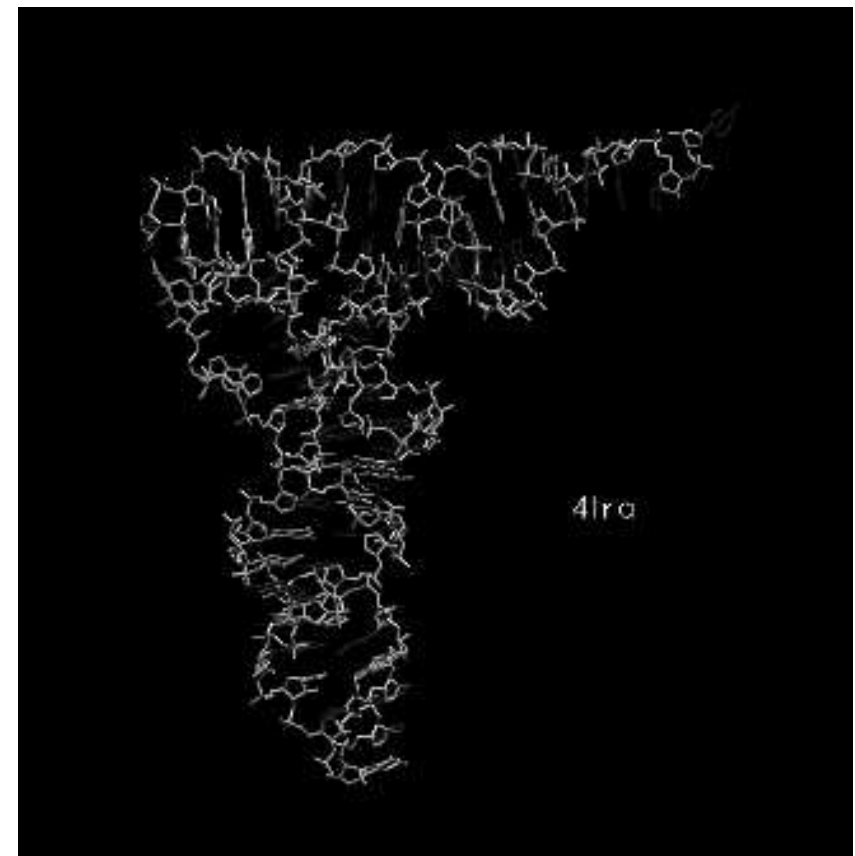
http://cwx.prenhall.com/horton/medialib/media_portfolio/text_images/FG19_25_00744.JPG

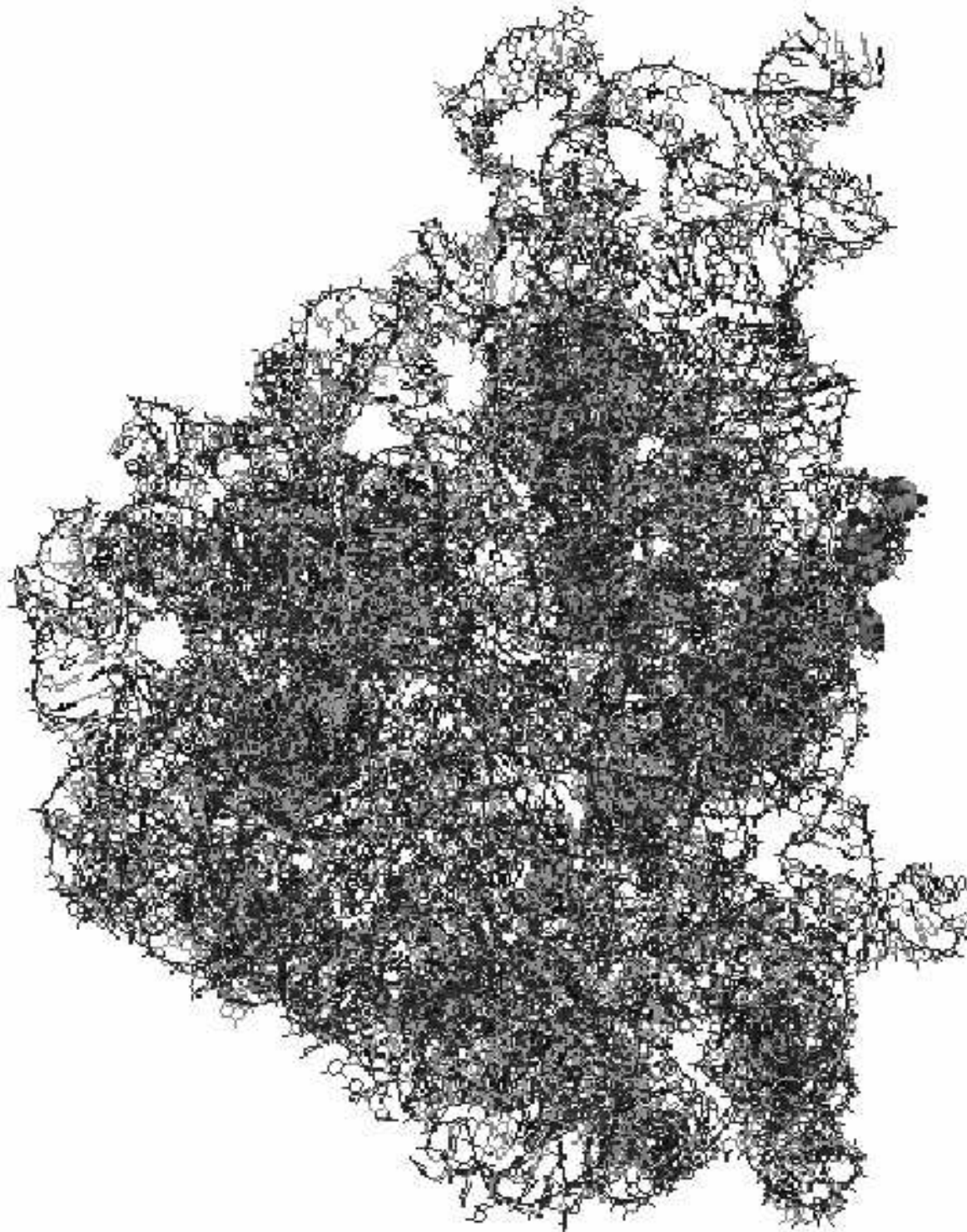




- Transferová RNA – schematický model a t-RNA z kvasnic

- http://cwx.prenhall.com/bookbind/pubbooks/hilchem3/medialib/media_portfolio/text_images/CH23/FG23_14.JPG, <http://www.imb-jena.de/cgi-bin/ImgLib.pl?CODE=4tra>





Ribosomální RNA

<http://www.imb-jena.de/cgi-bin/htmlit.pl?color=ffffff&id=GI&src=1c2w.gif&name=Image%20Library%20Thumb%20Nail%201C2W>

Konformační změny a denaturace biopolymerů

- Změny sekundární, terciární, resp. kvartérní struktury biopolymerů se označují jako změny konformační.
- Mohou být reverzibilní i ireverzibilní.
- Funkční stav biopolymeru = **nativní stav**
- Nefunkční stav biopolymeru = **denaturovaný stav**

Denaturační faktory

- Chemické:
 - Změny pH
 - Změny koncentrace elektrolytů
 - Těžké kovy
 - Denaturační činidla narušující vodíkové vazby – močovina
- Fyzikální:
 - Zvýšená teplota
 - Ionizující záření
 - Ultrazvuk

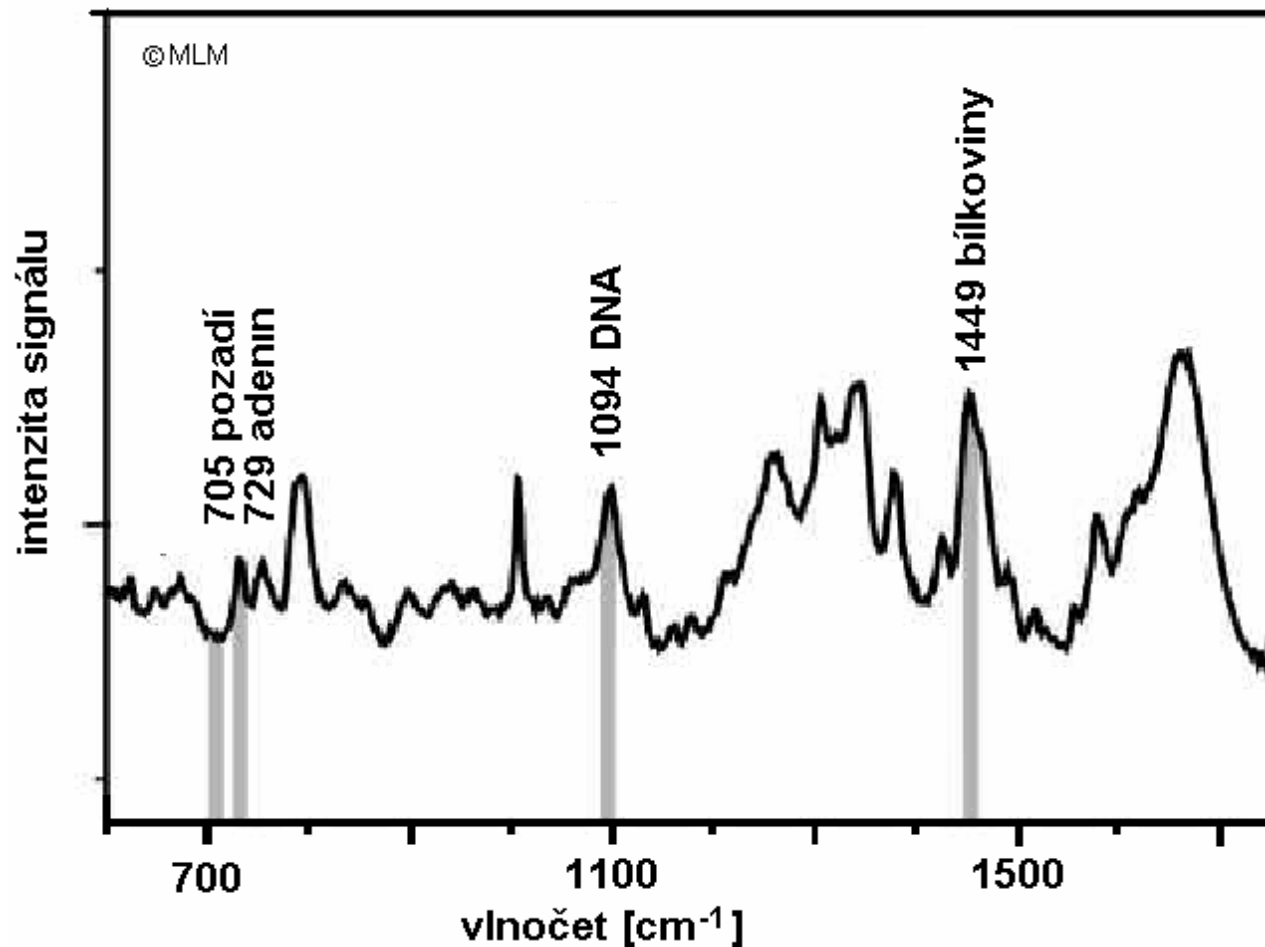
Studium struktury biopolymerů

- Studium struktury biopolymerů a jejich komplexů např. umožňuje pochopit:
 - Specifičnost enzymatických a imunologických reakcí
 - Účinky některých léčiv (cytostatik) na molekulární úrovni.
 - Mechanismy transportních procesů
 - Buněčný pohyb
 -

Metody založené na měření interakce s elektromagnetickým zářením

- Měření (Rayleighova) **rozptylu světla**. Interakce fotonů s dipóly molekul. Intenzita rozptýleného světla závisí na mol. hmotnosti a na úhlu rozptylu, čehož lze využít i pro odhady tvaru makromolekul.
- **Ramanova spektrometrie**. Při rozptylu světla dochází k malé změně vlnové délky rozptýleného světla, způsobené malým pohlcením či zvýšením energie rozptylovaných fotonů při přechodech mezi vibračními a rotačními stavy molekul. Ty se mění při změnách struktury molekul - změny Ramanových spekter proto odrážejí změny struktury molekul.

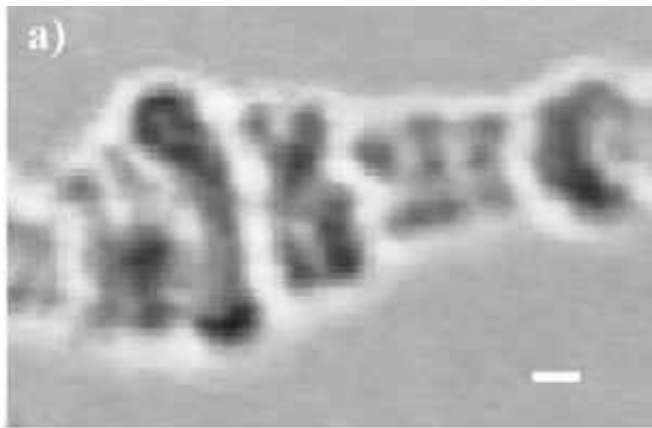
Ramanova spektrometrie



Ramanovo spektrum polytenního chromosomu rodu *Chironomus*.

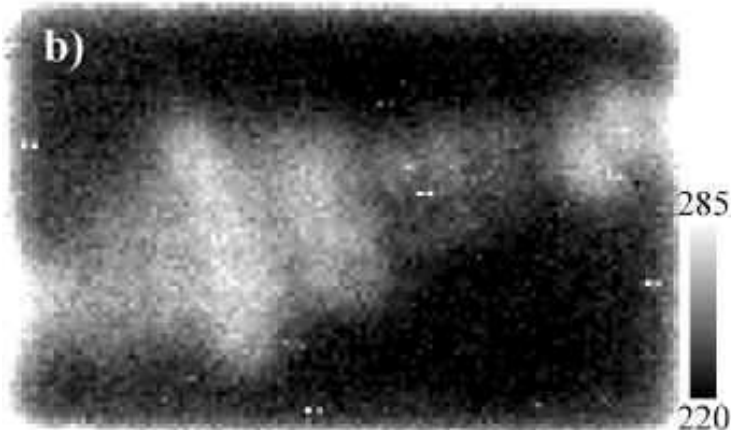
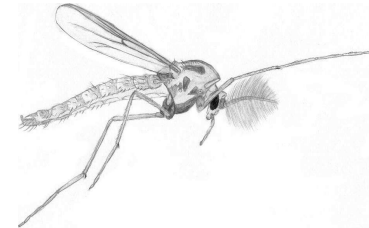
Při vybraných vlnočtech lze s výhodou realizovat Ramanovu mikroskopii. Vybuzeño laserovým světlem o vlnové délce 647.1 nm

•Podle:
<http://www.ijvs.com/volume2/edition3/section4.htm>

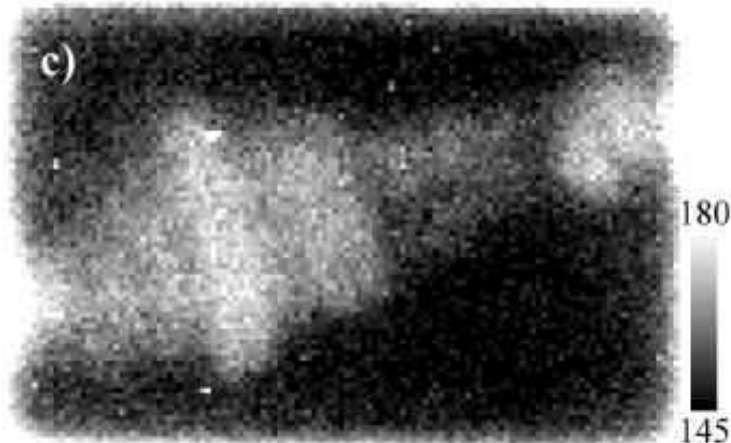


- Mikroskopický snímek v normálním bílém světle

- (chromosom *Chironomus Thummi* Thummi)

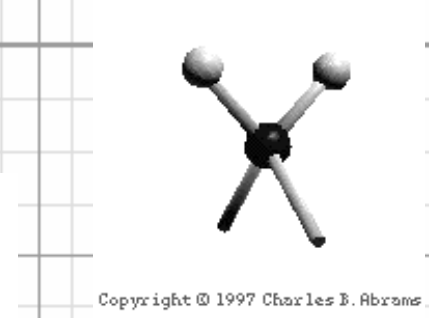
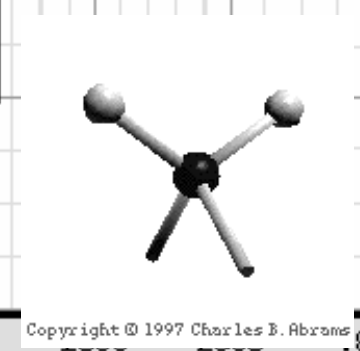
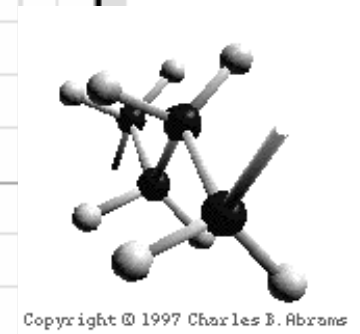
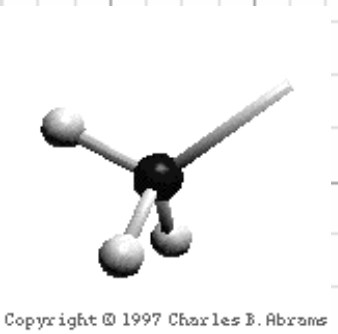
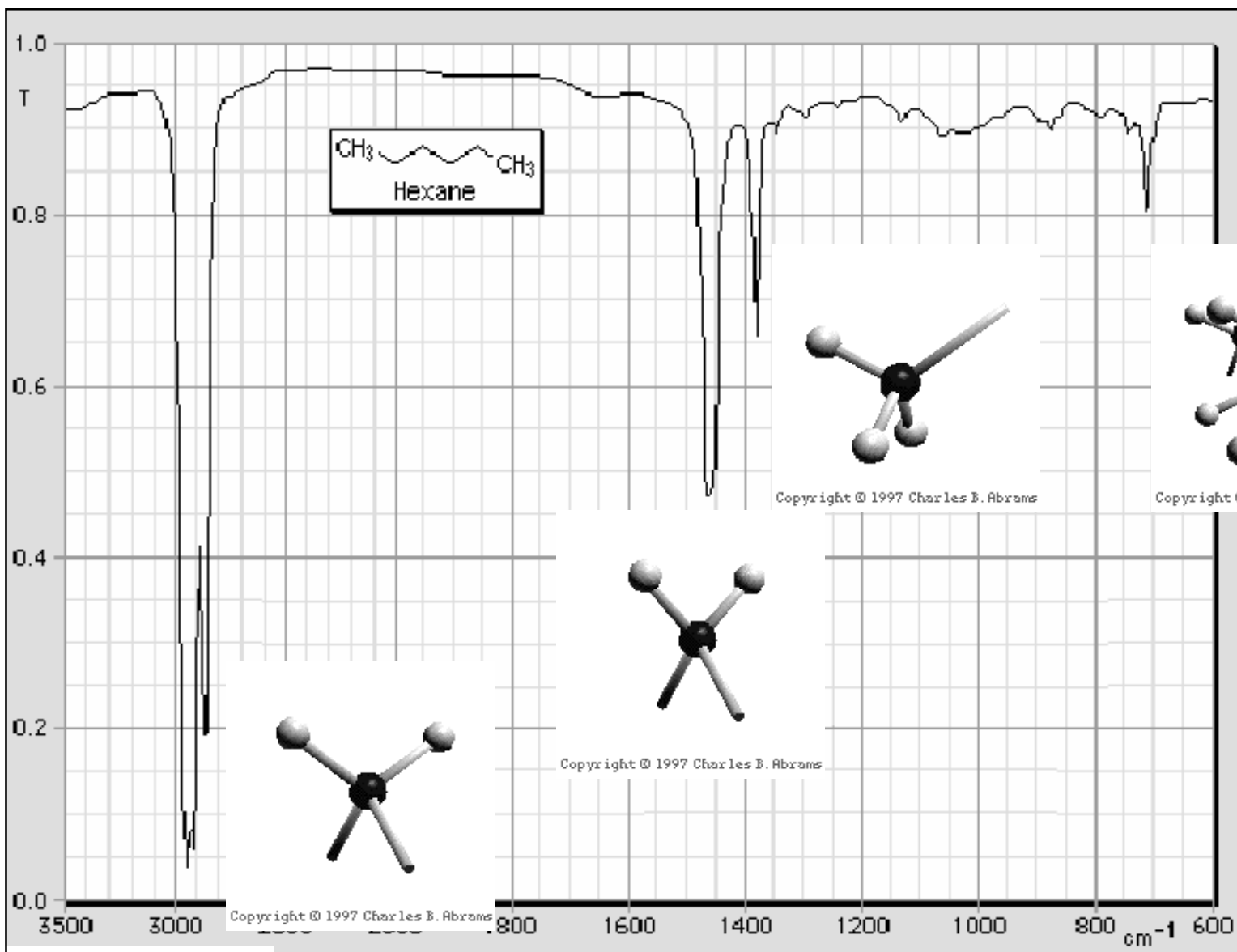


Konfokální ramanovský snímek zobrazující páteř DNA (vibrace při 1094 cm⁻¹)



- Konfokální ramanovský snímek zobrazující přítomnost alifatických řetězců v bílkovinách chromosomu při 1449 cm⁻¹

- Zdroj jako předchozí



Infračervené vibrační spektrum hexanu

<http://www.columbia.edu/cu/chemistry/edison/IRTutor.html>

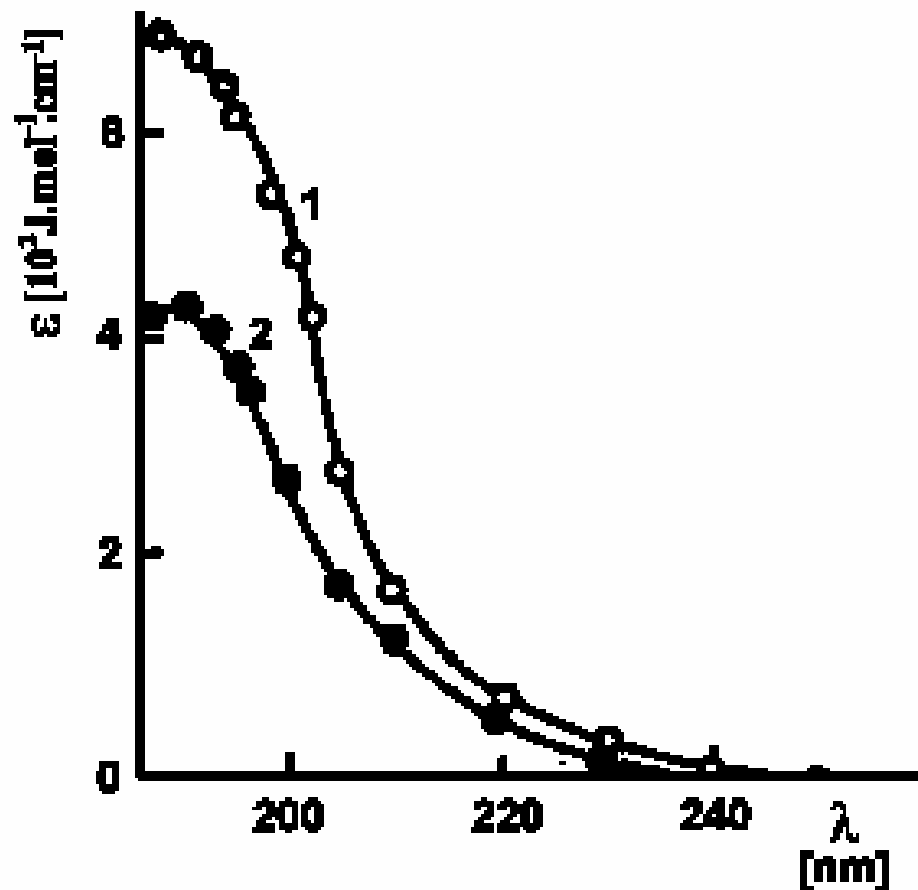


Další optické metody

- **Absorpční spektrofotometrie v UV oblasti.**
 - Tryptofan a tyrosin mají absorpční maximum kolem 280 nm. Fenylalanin při 255 nm.
 - Nukleotidy (dusíkaté báze) - absorpční maxima při 260 - 270 nm.
 - Chromofory - jejich absorpční vlastnosti se mění v závislosti na chemickém okolí.

Hypochromní efekt (HE).

- Absorpce světla ovlivňována dipólovým momentem vazeb, se kterými interaguje. Jsou-li dipóly paralelní, vzájemně se ovlivňují a snižuje se poněkud jejich schopnost absorbovat energii fotonů. U bílkovin se HE projevuje u peptidových vazeb, které mají absorpční maximum v UV kolem 190 nm. Jsou-li dipólové momenty těchto vazeb náhodně uspořádané (denaturovaná bílkovina), absorbují světlo lépe než ve stavu s pravidelnými strukturami.
- **Helicita** - poměrné zastoupení uspořádaných částí makromolekuly. Dvoušroubovice DNA absorbuje UV méně než neuspořádaná (denaturovaná) molekula.



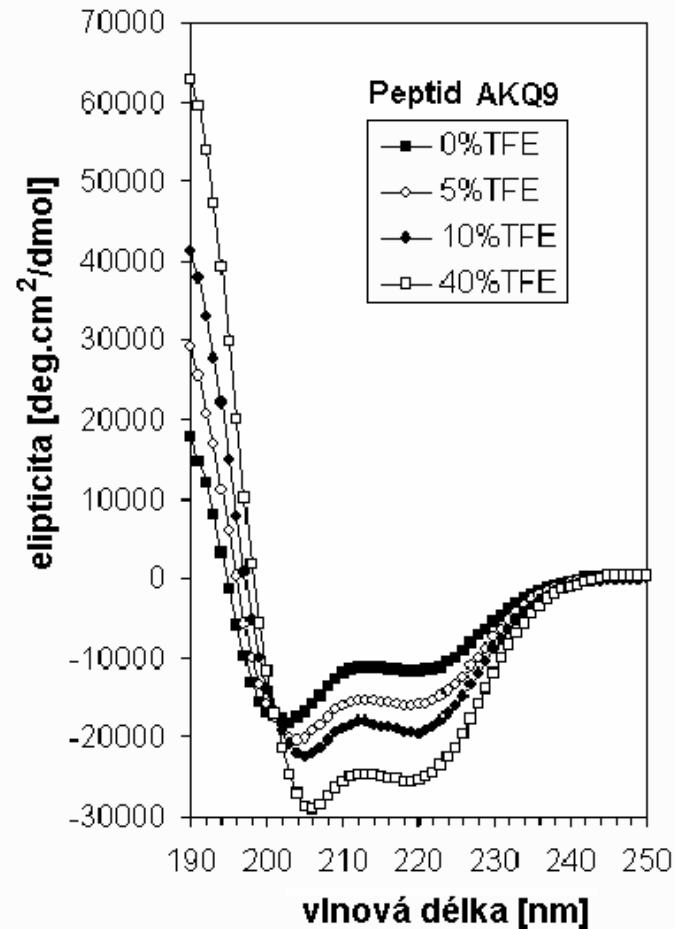
Hypochromní efekt u kyseliny polyglutamové. Při pH 7 vytváří statistické klubko (1), při pH 4 má šroubovicovou strukturu (2). Absorpční maximum peptidových vazeb je pak sníženo vlivem jejich prostorového uspořádání. ϵ je molární absorpční koeficient a λ je vlnová délka UV záření. Dle Kalouse a Pavlíčka, (1980).

Cirkulární dichroismus

Obdobné informace: metoda cirkulárního dichroismu (CD) - porovnávána absorbance levotočivě a pravotočivě cirkulárně polarizovaného světla v oblasti absorpčního maxima

Podobné využití mají tyto metody i při studiu struktury NK.

- Obrázek ukazuje změny elipticity syntetického polypeptidu s dlouhými úseky poly-glu po různém přidavku trifluoroetanolu (TFE), který zvyšuje zastoupení α -helixu.
<http://www-structure.llnl.gov/cd/polyq.htm>

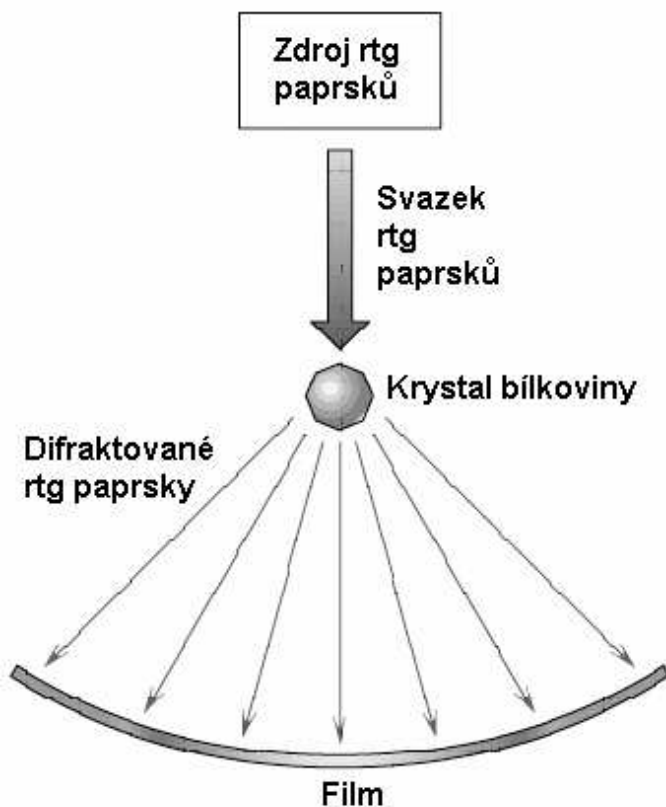


$$\theta_r = \frac{2.303}{4} \cdot (A_L - A_R) \cdot [\text{rad}]$$

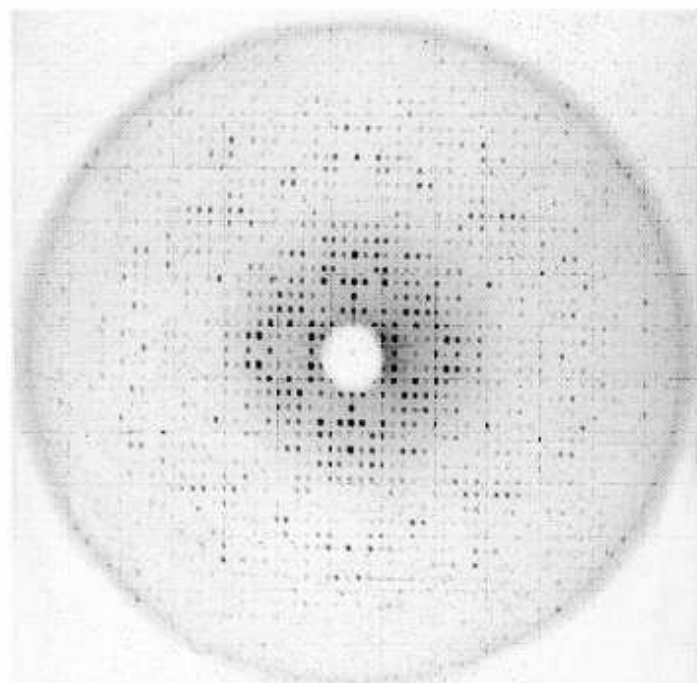
Rentgenstrukturní analýza

- Krystalová mřížka působí na rtg záření jako optická mřížka. Dochází k ohybovým jevům a vzniku interferenčních obrazců. Tyto obrazce lze matematicky analyzovat a získat tak informaci o rozložení elektronů v molekulách tvořících krystal.

(a)

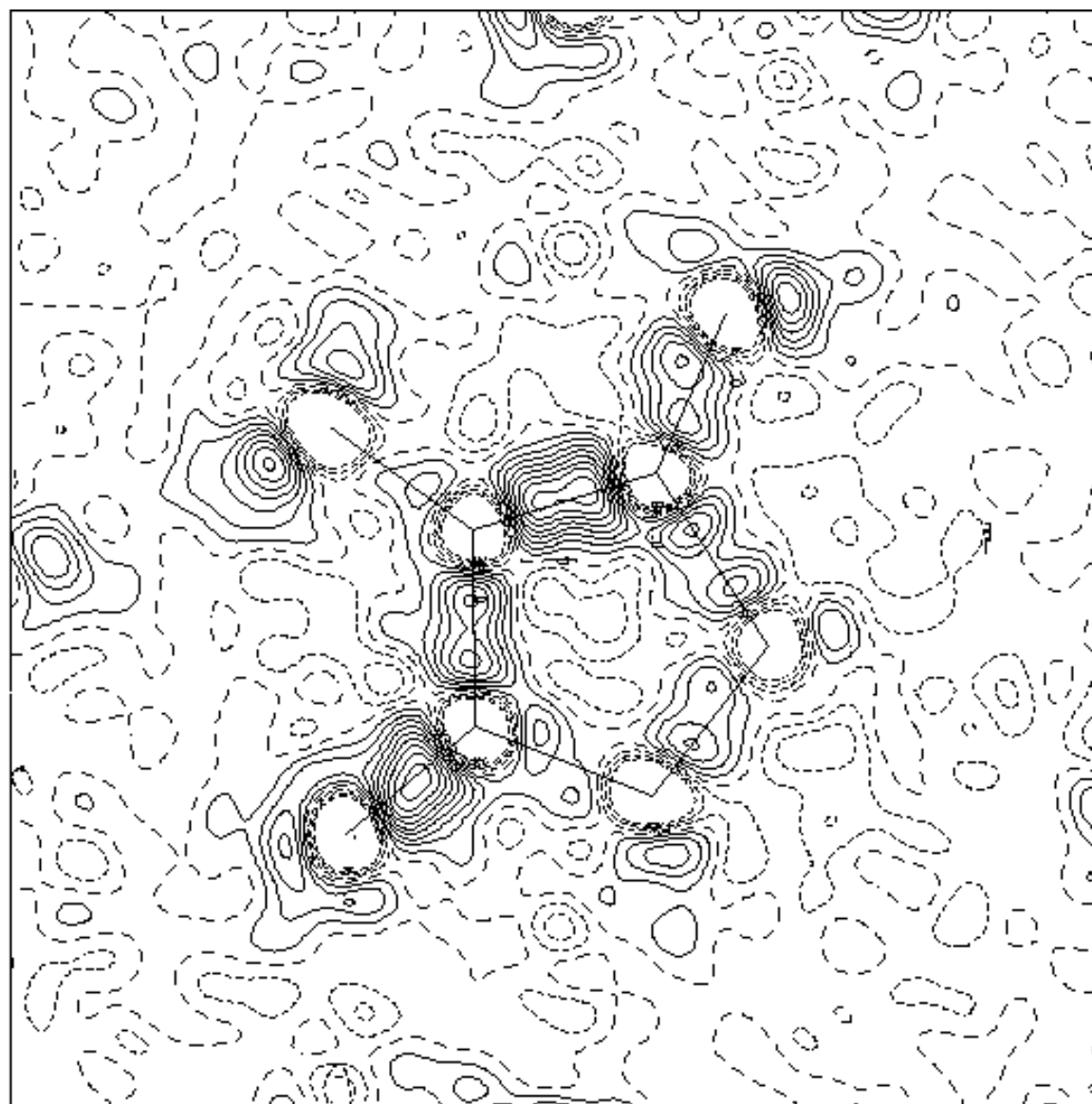


(b)

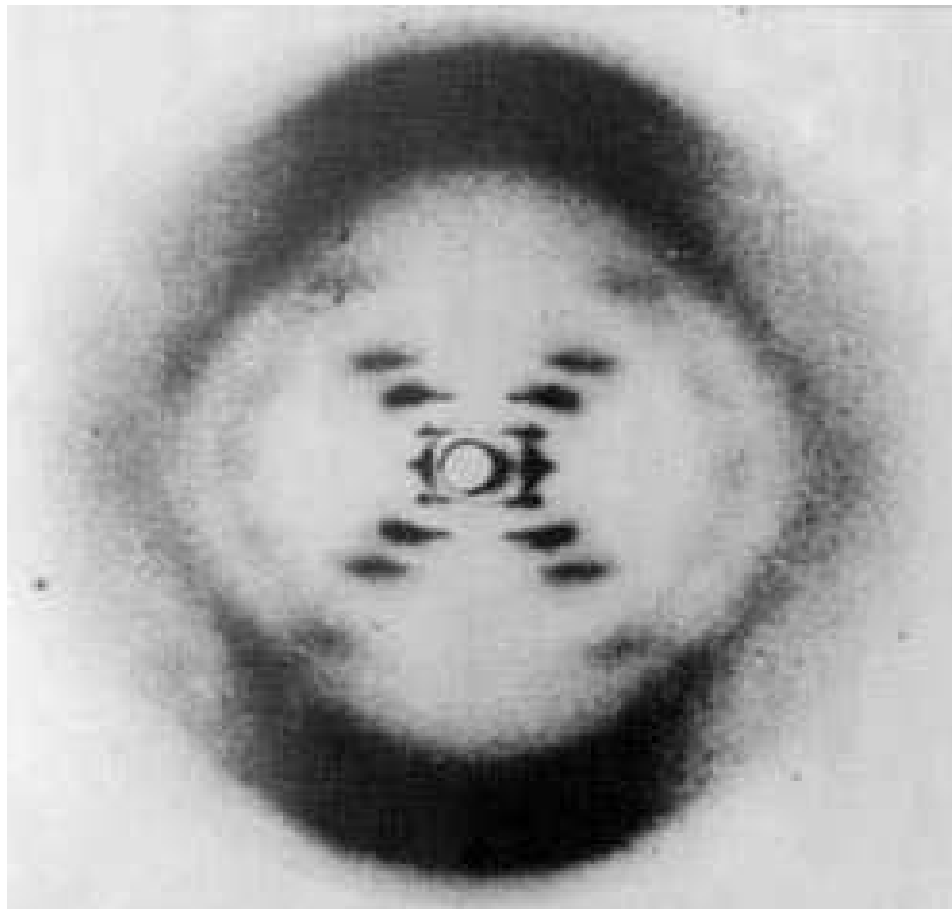


• http://cwx.prenhall.com/horton/media/lib/media_portfolio/text_images/FG04_02aC.JPG

Mapa elektronové hustoty získaná z rentgenového krystalogramu



Krystalogram B-DNA získaný v r. 1952
Rosalindou E. Franklinovou, na základě
kterého předložili Watson a Crick model
dvoušroubovicové struktury DNA



•F



•C

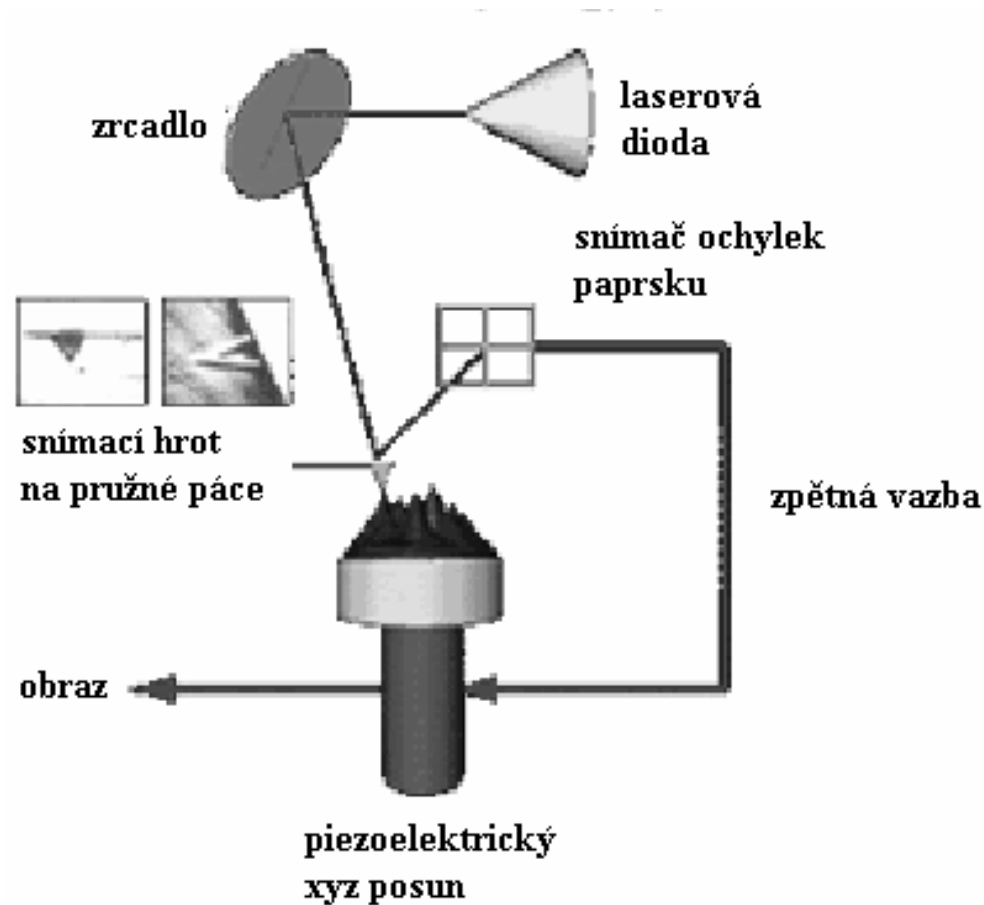


•W

Nové mikroskopické techniky – příklady: AFM a STM

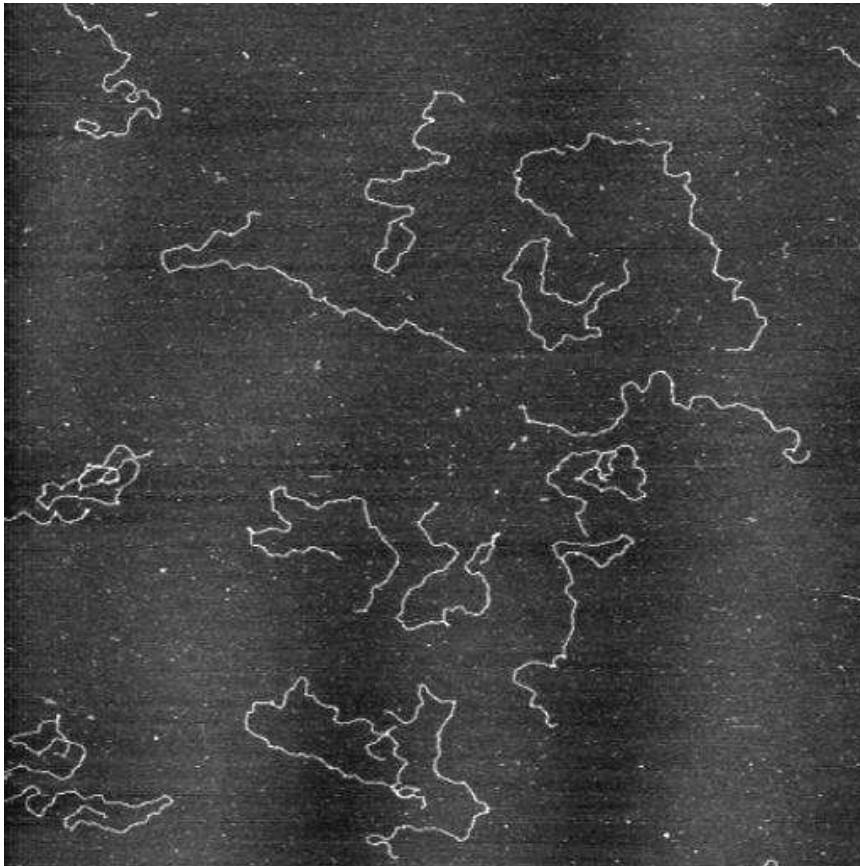
- AFM – Atomic force microscopy – jemný hrot sleduje nerovnosti povrchu

- <http://physchem.ox.ac.uk/~rgc/research/afm/afm1.htm>



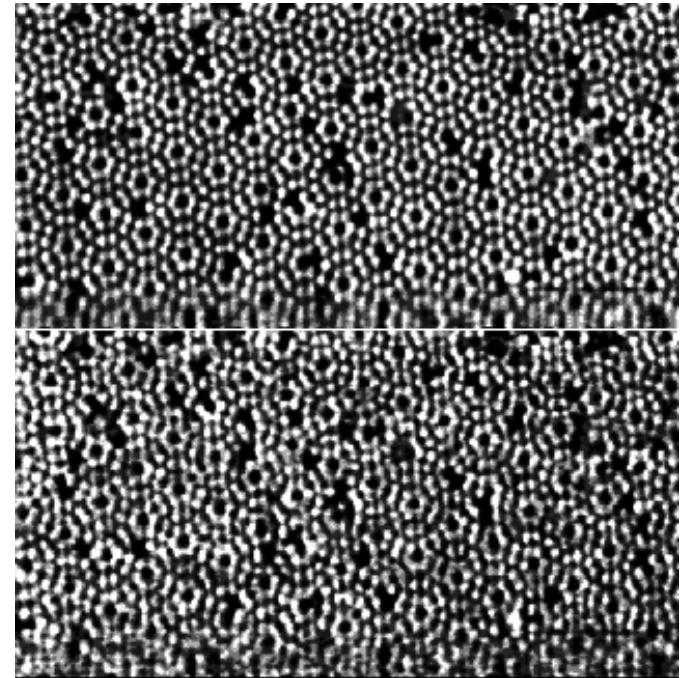
Nové mikroskopické techniky

AFM – Atomic force microscopy



DNA zobrazená pomocí AFM

<http://spm.phy.bris.ac.uk/research/DNA/images/dna2.jpg>



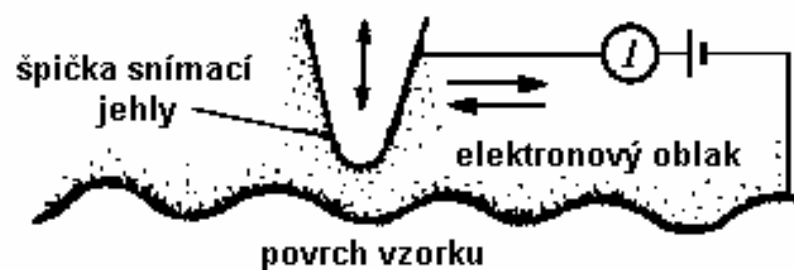
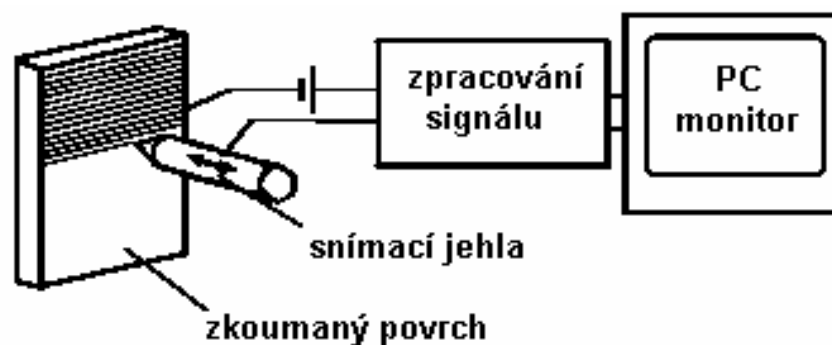
Krystalická struktura křemíku –
atomové rozlišení

•http://www.omicron-instruments.com/products/afm_stm/r_afmst6.html

Nové mikroskopické techniky

- skanovací tunelová elektronová mikroskopie (*scanning tunnelling electron microscopy, STM*).

Zjednodušené schéma elektronového skanovacího tunelového mikroskopu (STM). Nahoře celkové schéma přístroje, dole detail snímací kovové jehly, která svým pohybem kopíruje povrch vzorku. Jehla je nabitá kladně. Zpracováno podle Rontó a Tarjána (1994).



Metody separace koloidů a hrubých disperzí

- **Sedimentace**
- K jejímu urychlení se používají centrifugy (**ultracentrifugy**, až několika set tisíc ot./min, až miliony g).
- Sedimentační rychlost závisí na rozdílu hustot částic a prostředí, na jejich velikosti a tvaru. Hlavně se uplatňují tři síly:
 - **1) Vztlaková**
 - **2) Odstředivá**
 - **3) Odporu proti pohybu**

Sedimentaci částic charakterizujeme pomocí **sedimentačního koeficientu s [s]**:

$$s = \frac{v}{\omega^2 \cdot r}$$

Po úpravách tohoto vztahu lze dospět k rovnici:

$$\ln r = s \cdot \omega^2 \cdot t + \text{konst.}$$

s je obsaženo ve směrnici závislosti $\ln r$ na čase. Tento graf lze získat proměřováním polohy částice r během sedimentace.

- Sedimentační koeficient menších molekul bílkovin - 10^{-13} s.
Jednotka sedimentačního koeficientu:

svedberg S (= $1 \cdot 10^{-13}$ s).

Zviditelnění sedimentujících látek: měřením absorpce UV záření nebo indexu lomu.

- Sedimentační koeficient s závisí na molekulové hmotnosti M dle Svedbergova vzorce:

$$s = \frac{M \cdot \left(1 - \frac{\rho}{\rho_b}\right)}{f \cdot N_A}$$

kde ρ je hustota prostředí, ρ_b hustota molekul, N_A Avogadrova konstanta a f tzv. frikční neboli hydrodynamický koeficient.

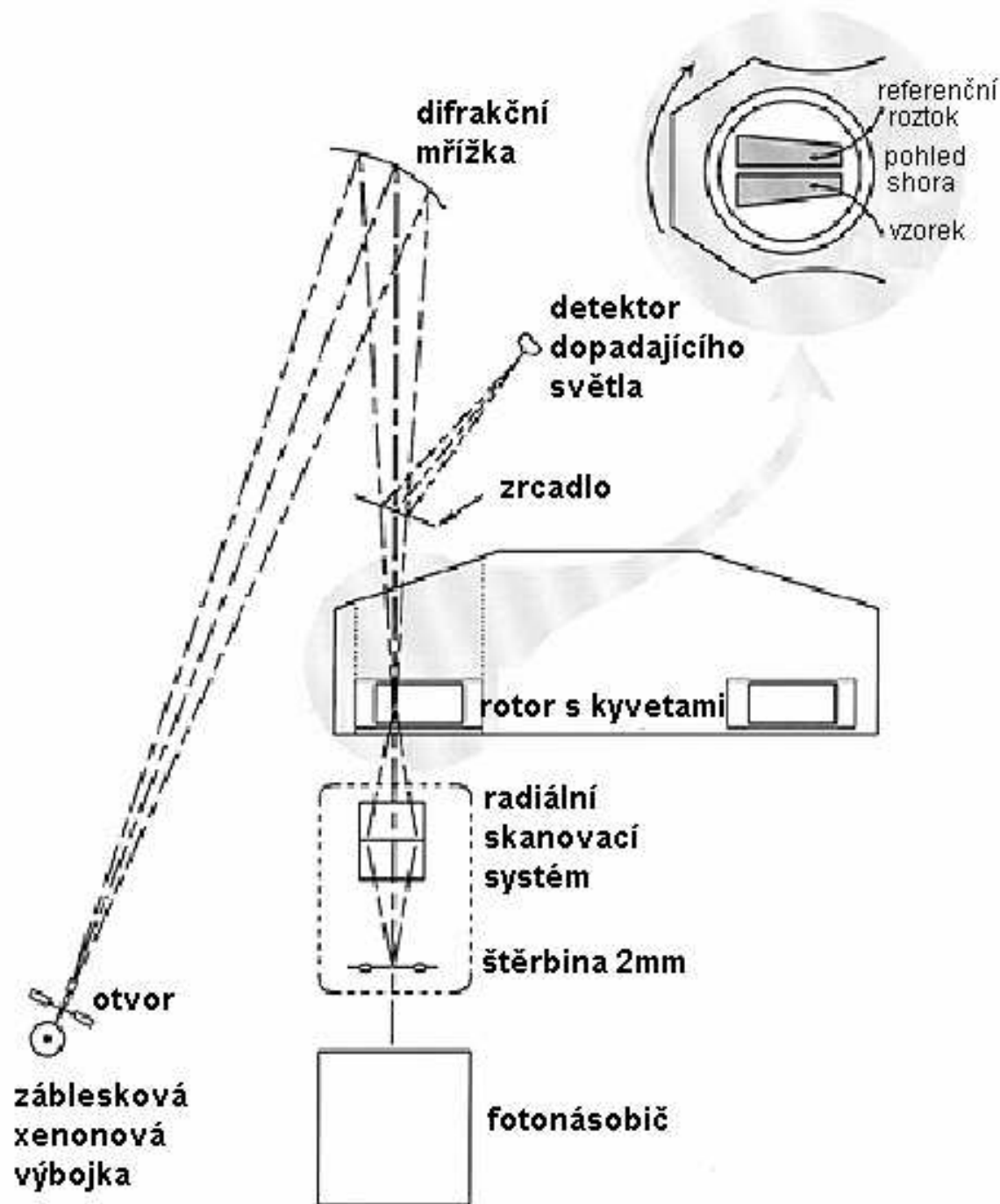
Hustota makromolekul se měří pyknometricky, hydrodynamický koeficient ($f = 6\pi r\eta$) měřením difuze.

Sedimentační analýza

- K rozdělení polydisperzního koloidu dochází vlivem různě rychlého odstředivého pohybu jednotlivých složek (frakcí). Dvě možnosti:
- 1) Analyzovaným koloidem se převrství čisté rozpouštědlo. Po určité době odstředování se zjišťuje poloha jednotlivých složek koloidu v rozpouštědle - **zónová sedimentace**.
- **2) Sedimentace v hustotním gradientu** - v kyvetě se intenzívním odstředováním připraví hustotní gradient vhodné látky (např. CsCl). Pohyb sedimentující složky se zastaví tam, kde vztlaková síla bude stejná jako síla odstředivá.

Analytická ultra-centrifuga

schéma podle: http://www.embl-heidelberg.de/ExternalInfo/geerlof/draft_frames/flowchart/Characterization/AUC/auc.html#WhyAnalyticalUltracentrifugation



Elektroforéza

- Elektroforéza – pohyb iontů v elektrickém poli. Při rovnoměrném přímočarém pohybu **kulových** částic o poloměru r je elektrostatická síla působící na částici v rovnováze se silou odporu prostředí. Síla odporu je dána **Stokesovým vzorcem**:

$$F = 6 \cdot \pi \cdot r \cdot \eta \cdot v$$

- Kde v je rychlost částice a η dynamická viskozita prostředí. Elektrické pole působí na částici silou:

$$F = z \cdot e \cdot E$$

- kde z je počet elementárních nábojů částice, e je elementární náboj ($1,602 \cdot 10^{-19}$ C) a E je intenzita elektrického pole v daném místě. Pro rychlost pohybu částice pak platí:

$$v = \frac{z \cdot e \cdot E}{6\pi \cdot r \cdot \eta}$$

Elektroforetická pohyblivost

- Lépe reprodukovatelnou veličinou je **elektroforetická pohyblivost u** , definovaná jako podíl rychlosti pohybu částice a intenzity elektrického pole. Platí:

$$u = \frac{v}{E} = \frac{z \cdot e}{6\pi \cdot r \cdot \eta}$$

Shokugasumu!

