



Zachodniopomorski  
Uniwersytet Technologiczny

## BIOCHEMIA

Kierunek: **Technologia Żywności  
i Żywnienie Człowieka**  
semestr III

# Wykład 2 Aminokwasy i białka



**WYDZIAŁ NAUK O ŻYWNOCI I RYBACTWA**  
**CENTRUM BIOIMMOBILIZACJI I INNOWACYJNYCH**  
**MATERIAŁÓW OPAKOWANIOWYCH**



**Białko (proteina)** - termin po raz pierwszy wprowadzony przez Jonsa Berzeliusa w 1883 r w celu podkreślenia znaczenia tej grupy związków, *proteios* (grec.) - pierwszorzędny, o głównym znaczeniu.

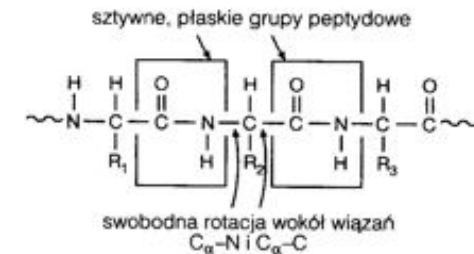
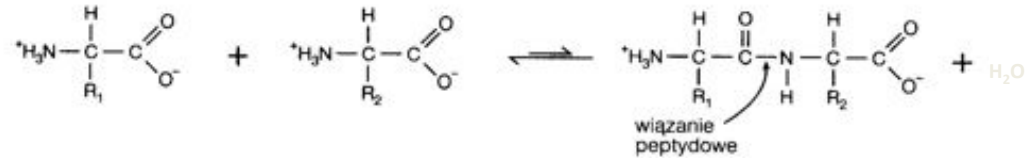
Skład pierwiastkowy większości białek:

C - 50-55%

H - 6,6-7,3%

N - 15-19%

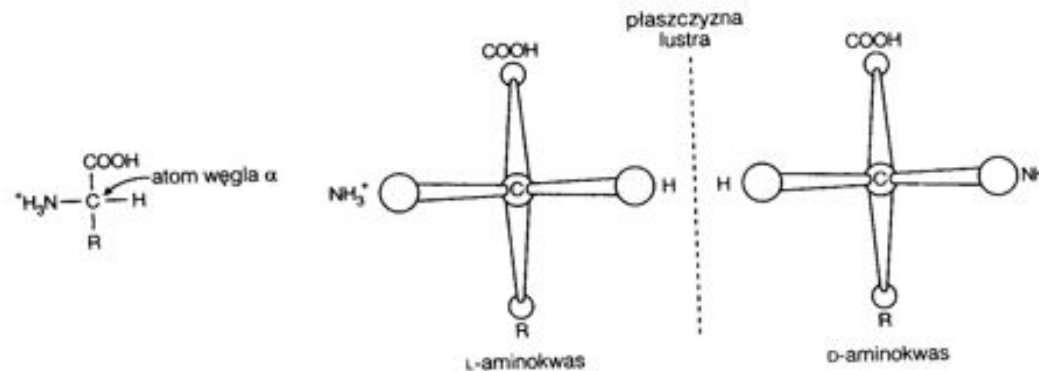
O - 19-21%



Jednostką powtarzalną białek są **aminokwasy**

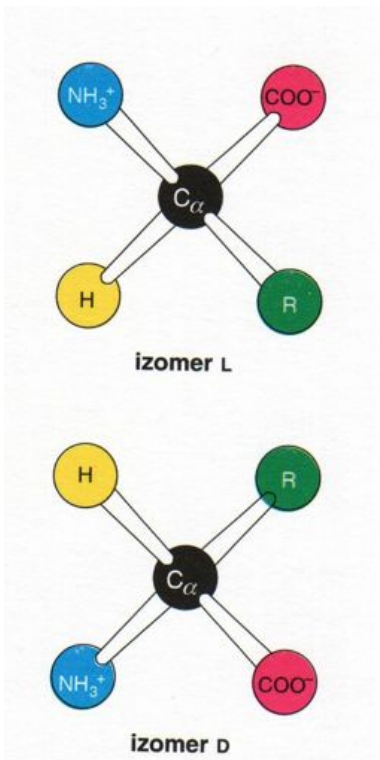
Aminokwasy są związkami optycznie czynnymi (izomery L i D) dzięki atomowi węgla  $\alpha$ .

Wszystkie białka są wyłącznie zbudowane z L-aminokwasów (dlaczego??)



# Izomery aminokwasów

Tetraedryczne ułożenie czterech różnych podstawników wokół węgla  $\alpha$  nadaje aminokwasom charakter związków optycznie czynnych. Antypody optyczne, będące wzajemnymi odbiciami lustrzanymi tego samego związku, nazwano izomerami L i D. *Białka są zbudowane wyłącznie z L-aminokwasów.*



Konfiguracje absolutne izomerów L i D aminokwasów. R — łańcuch boczny. Izomery D i L są lustrzanymi odbiciami. L. Stryer

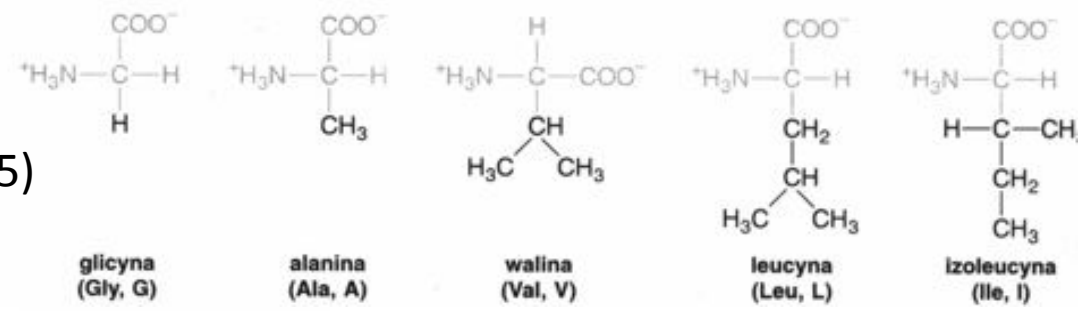
W białkach powszechnie występuje 20 aminokwasów, których łańcuchy boczne różnią się *wielkością, kształtem, ładunkiem elektrycznym, zdolnością do tworzenia wiązań wodorowych oraz reaktywnością chemiczną*. Co więcej, wszystkie białka u wszystkich gatunków, od bakterii do człowieka, zbudowane są z tego samego zestawu 20 aminokwasów

# AMINOKWASY

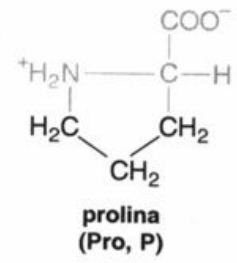
W **białkach** występuje powszechnie 20 różnych aminokwasów których łańcuchy boczne (podstawniki R) różnią się wielkością, kształtem, ładunkiem elektrycznym, zdolnością do tworzenia wiązań wodorowych oraz reaktywnością chemiczną.

Klasyfikacja chemiczna aminokwasów:

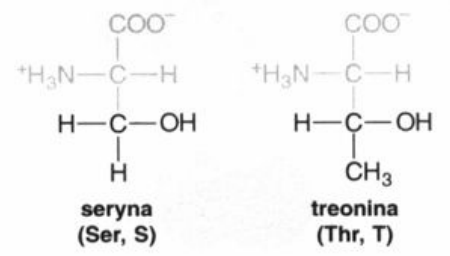
1. Z alifatycznym łańcuchem bocznym (5)



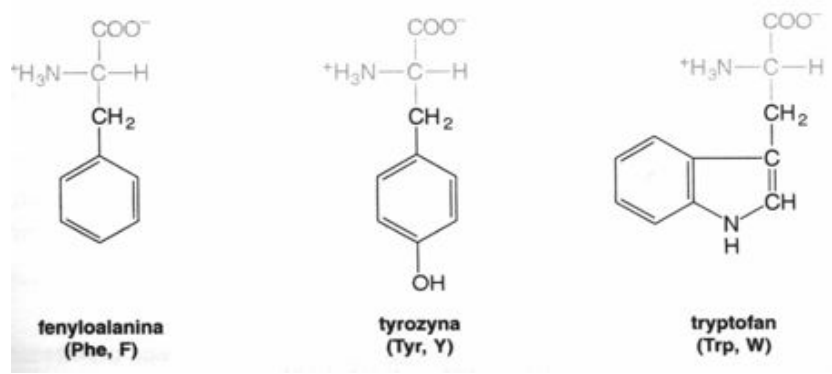
1a. Z drugorzędową grupą aminową (1)



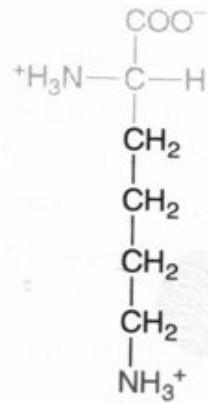
2. Z alifatycznym łańcuchem bocznym z grupą hydroksylową (2)



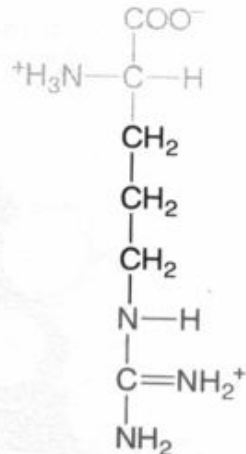
3. Z aromatycznymi łańcuchami bocznymi (3)



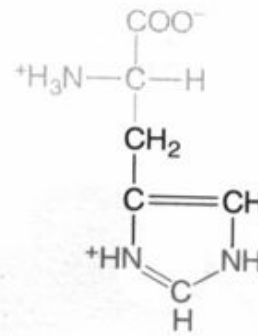
# Klasyfikacja chemiczna **aminokwasów** (c.d):



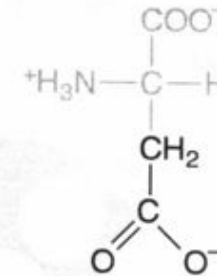
**lizyna**  
(Lys, K)



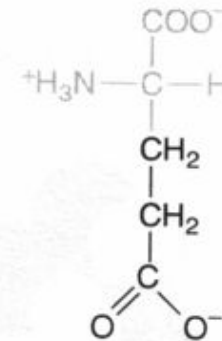
**arginina**  
(Arg, R)



**histydyna**  
(His, H)



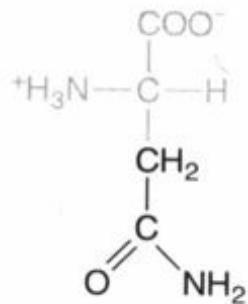
**asparaginian**  
(Asp, D)



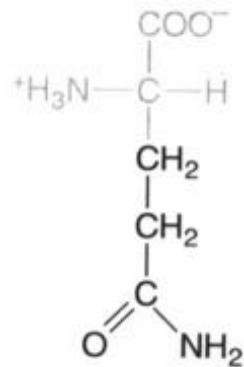
**glutaminian**  
(Glu, E)

3. Z zasadowymi łańcuchami bocznymi (3)

4. Z kwaśnymi łańcuchami bocznymi (2)

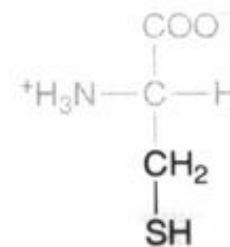


**asparagina**  
(Asn, N)

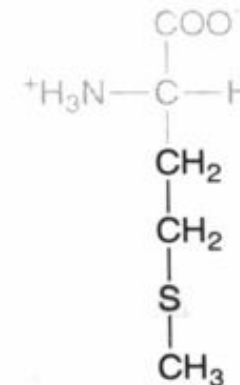


**glutamina**  
(Gln, Q)

5. Z amidowymi łańcuchami bocznymi (2)



**cysteina**  
(Cys, C)



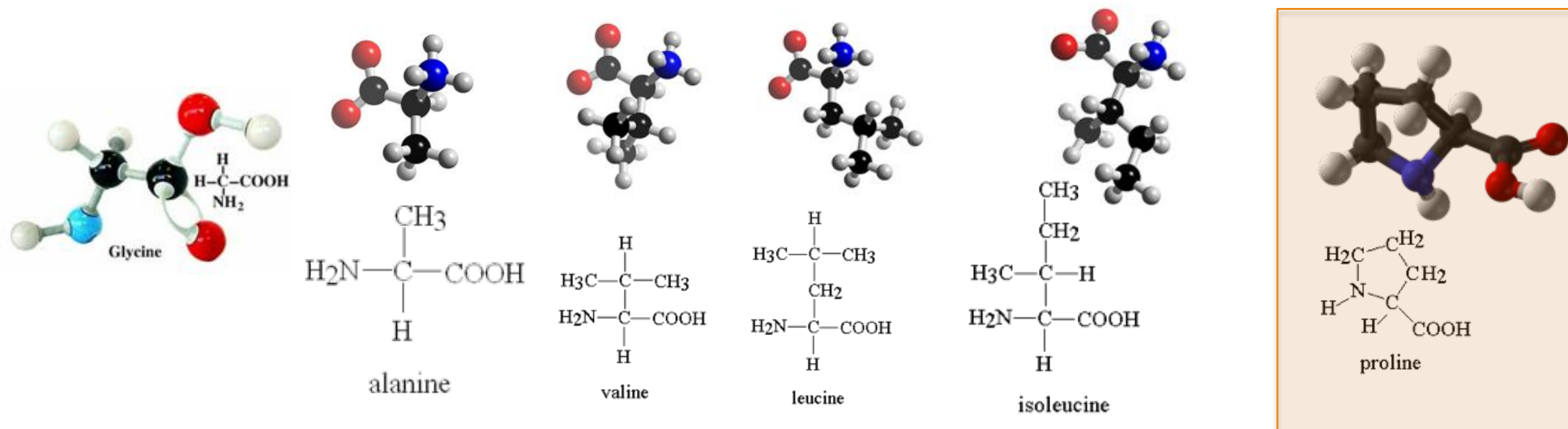
**metionina**  
(Met, M)

6. Z atomami siarki w łańcuchu bocznym (2)

7. Nietypowe aminokwasy (20+.....)

w skład kolagenu wchodzi hydroksypolina (wodorotlenowa pochodna proliny)

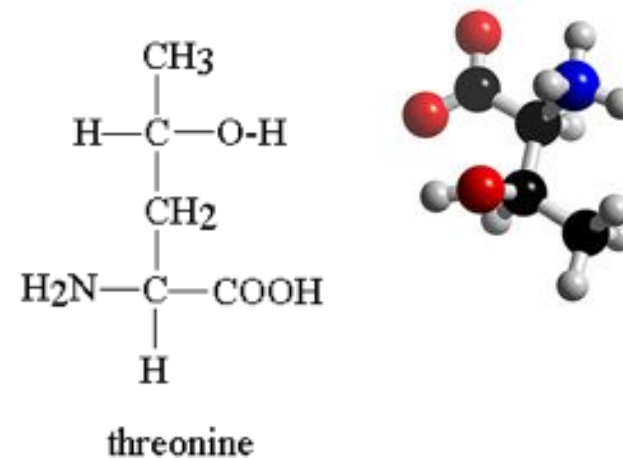
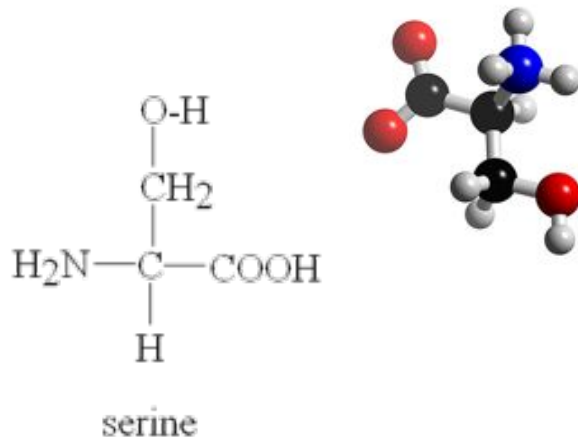
# Aminokwasy hydrofobowe alifatyczne



Łańcuchy boczne tych aminokwasów mają charakter hydrofobowy, co polega na awersji do wody i skłonności do grupowania się. Tendencja hydrofobowych łańcuchów bocznych do unikania kontaktu z wodą jest czynnikiem stabilizującym strukturę przestrzenną białek rozpuszczalnych w wodzie

*Prolina* ma również alifatyczny łańcuch boczny, łańcuch boczny proliny jest związany nie tylko z węglem  $\alpha$ , ale również z grupą aminową. Powstała przez to cykliczna struktura w znacznym stopniu wpływa na architekturę białka. Prolina, znajdująca często w zagięciach pofałdowanego białka, jest hydrofobowa.

# Aminokwasy zawierające grupę hydroksylową

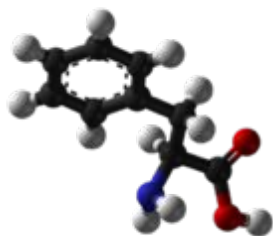


*Seryna* i *treonina* to dwa aminokwasy, które w alifatycznym łańcuchu bocznym zawierają grupy hydroksylowe. Hydroksylowe grupy seryny i treoniny powodują, że aminokwasy te są bardziej *hydrofitowe* i *reaktywne* niż alanina i walina.

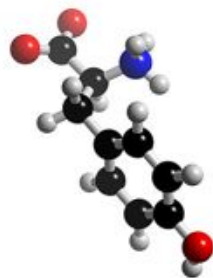
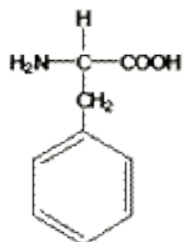
Treonina, podobnie jak izoleucyna, ma dwa węgle asymetryczne. Wszystkie pozostałe aminokwasy spośród dwudziestu podstawowych, z wyjątkiem glicyny, mają jedno centrum asymetrii (atom węgla *a*).

Jedynym aminokwasem optycznie nieczynnym jest glicyna

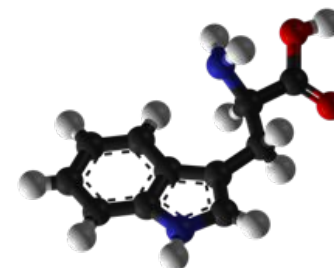
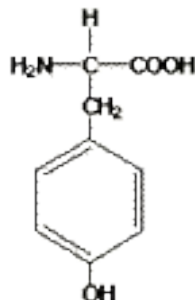
# Aminokwasy aromatyczne



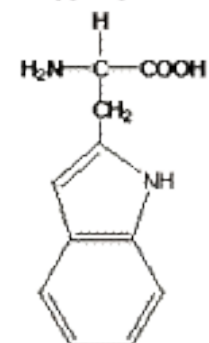
phenylalanine



tyrosine



tryptophan

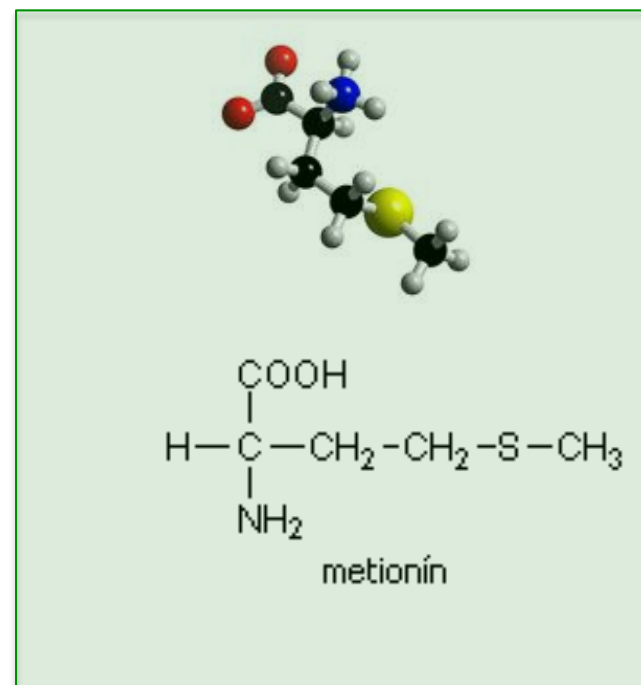
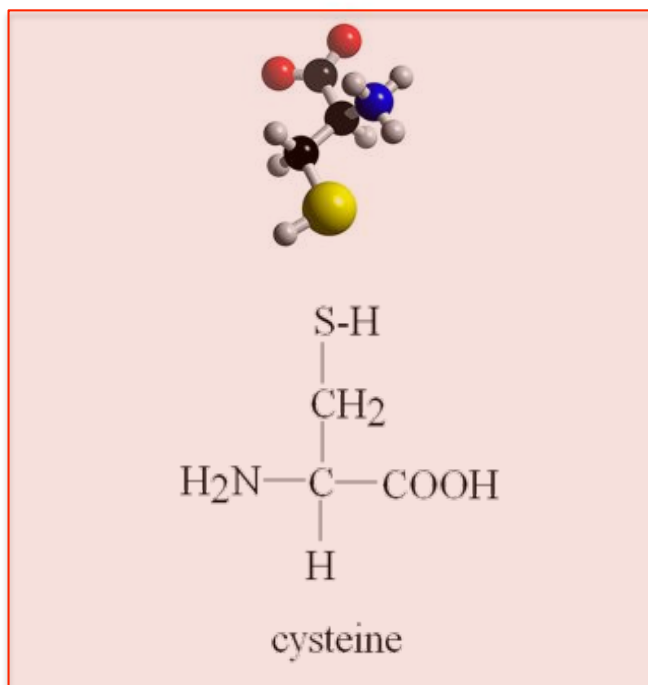


*Fenylalanina*, jak sama nazwa wskazuje, zawiera pierścień fenyłowy, połączony z grupą metylenową ( $-\text{CH}_2-$ ). Pierścień aromatyczny *tyrozyny* zawiera grupę hydroksylową, która sprawia, że tyrozyna jest mniej hydrofobowa od fenylalaniny. Ponadto grupa hydroksylowa jest reaktywna w przeciwieństwie do raczej obojętnych chemicznie łańcuchów bocznych aminokwasów dotąd omówionych.

*Tryptofan* ma pierścień indolowy połączony z grupą metylenową; ten łańcuch boczny zawiera poza atomami węgla i wodoru także atom azotu.



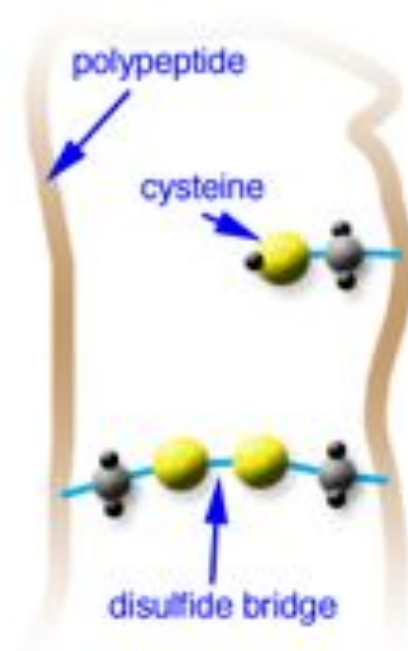
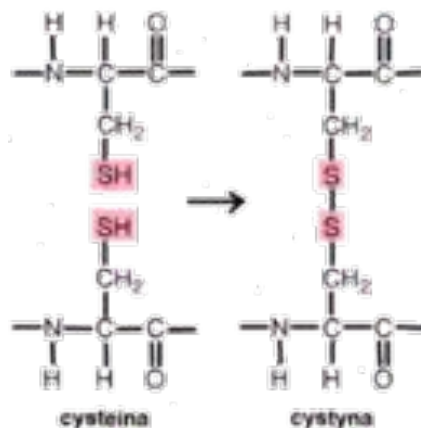
# Aminokwasy zawierające atomy siarki



Atom siarki występuje w łańcuchu bocznym dwóch aminokwasów . *Cysteina* zawiera grupę hydrosulfidową ( $-\text{SH}$ ), a *metionina* ma atom siarki związany tioestrowo ( $-\text{S}-\text{CH}_3$ ). Oba te łańcuchy zawierające siarkę mają charakter hydrofobowy.

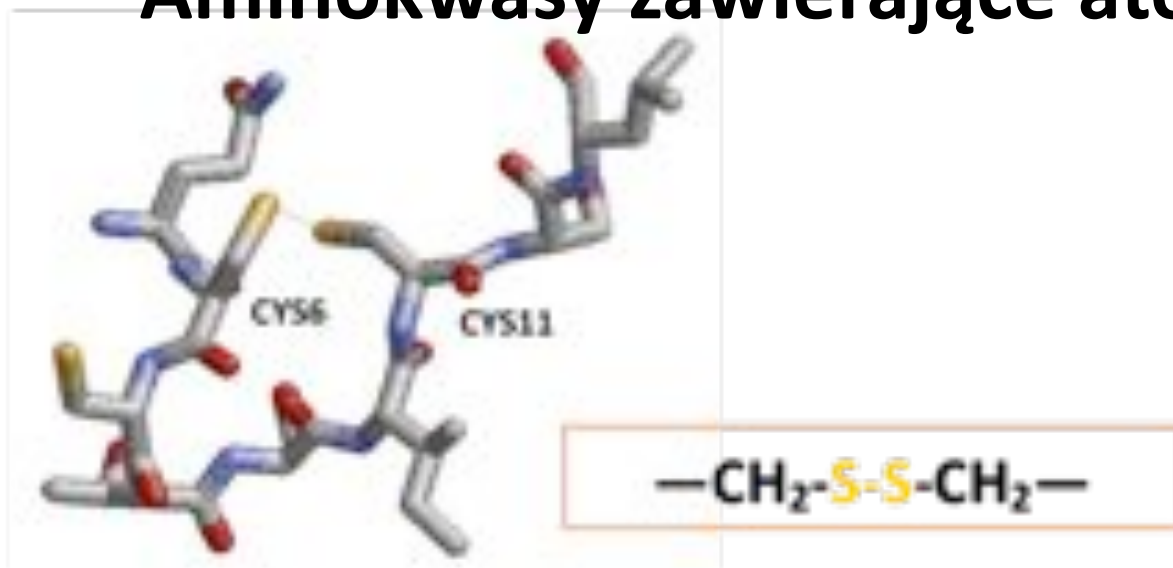
Grupa hydrosulfidową *cysteiny* jest silnie reaktywna. Cysteina odgrywa specjalną rolę w kształtowaniu struktury niektórych białek tworząc mostki disulfidowe (dwusiarczkowe).

# Aminokwasy zawierające atomy siarki



W niektórych białkach występują *wiązania dwusiarczkowe*. Te poprzeczne wiązania między łańcuchami lub odcinkami łańcuchów tworzą się w wyniku reakcji utleniania reszt cysteiny. *Dwusiarczek powstały w wyniku reakcji **dwu cystein** nazwano **cystyną***

# Aminokwasy zawierające atomy siarki



Rysunek. Fragment łańcucha A (5-13) insuliny świńskiej (*sus scrofa*, PDB ID:1ZNI)

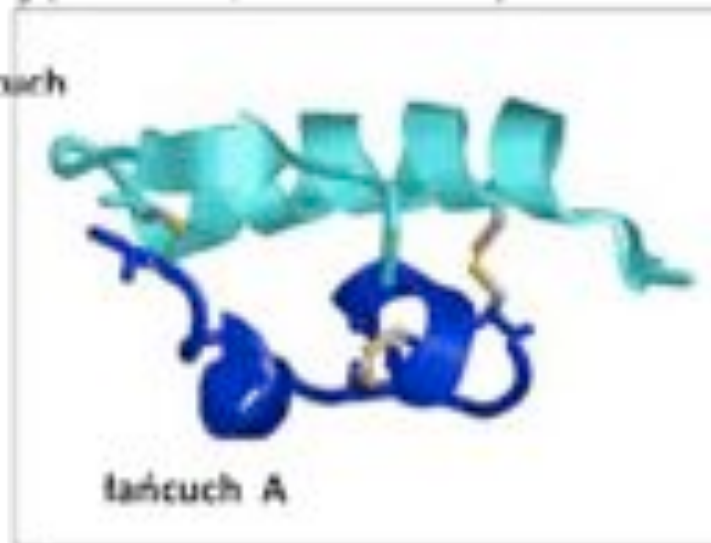
łańcuch A



łańcuch

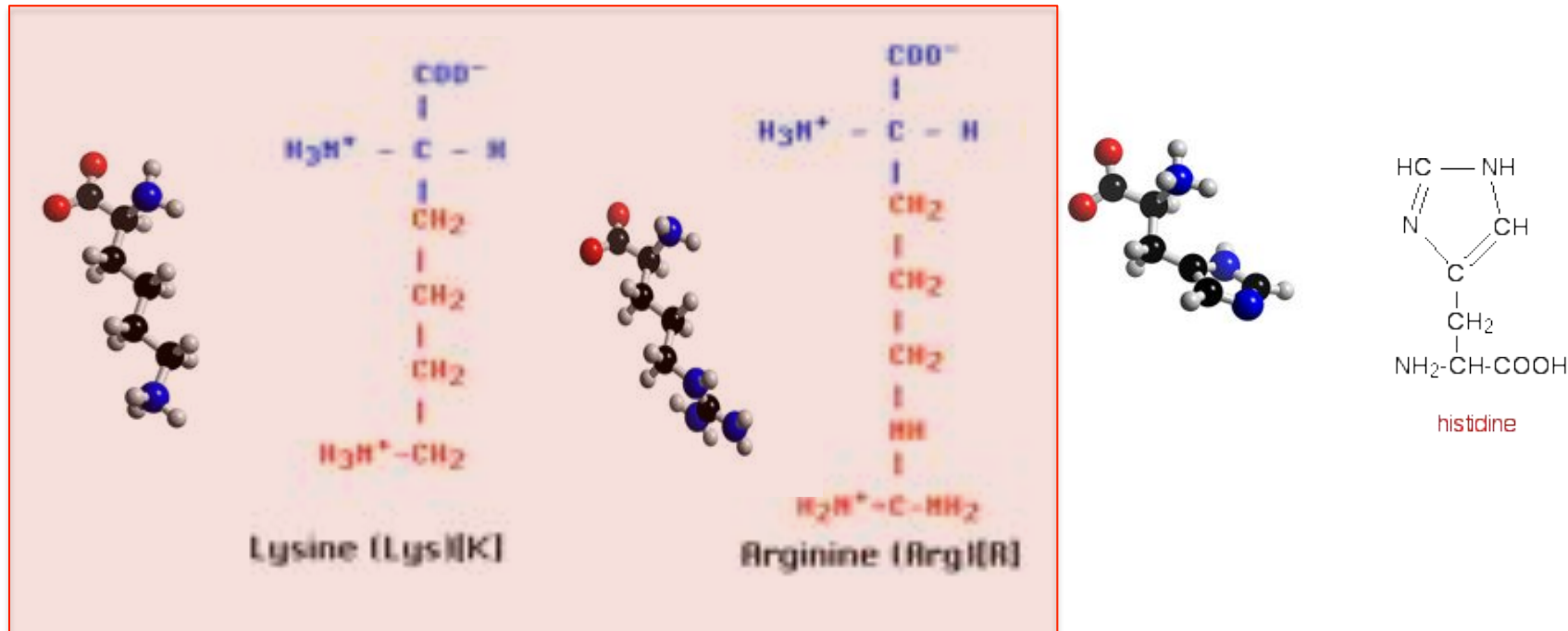


łańcuch



Rysunek. Sekwencja i struktura insuliny świńskiej

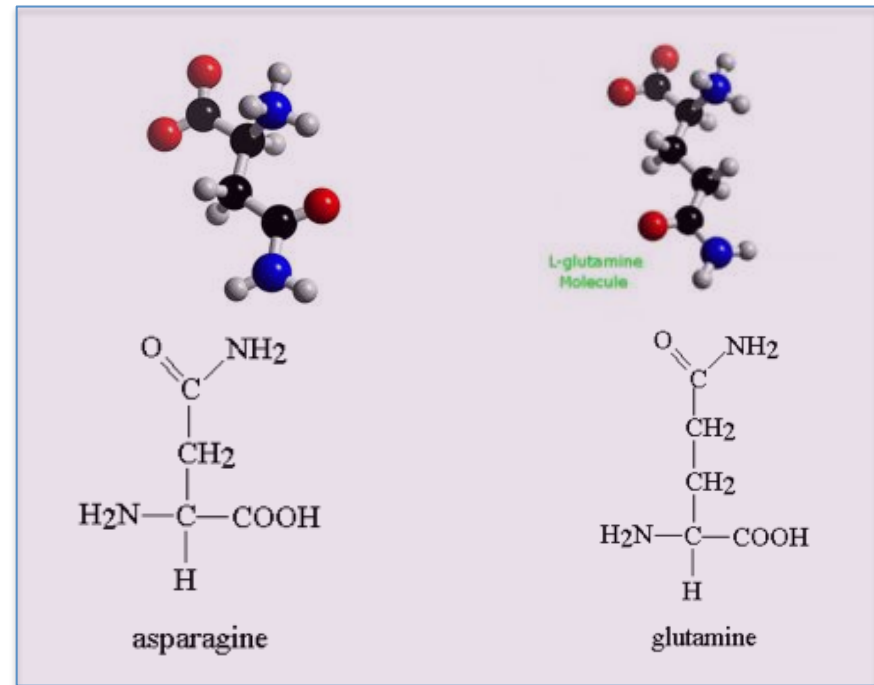
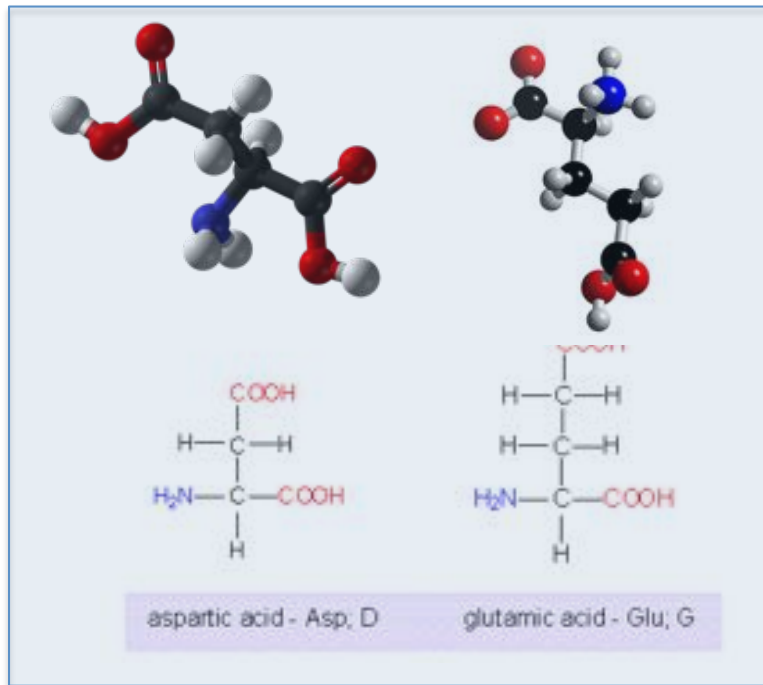
# Aminokwasy z zasadowym łańcuchem bocznym



W pH obojętnym *lizyna i arginina* są naładowane dodatnio.

*Histydyna* natomiast może być obojętna lub mieć ładunek dodatni zależnie od jej lokalnego otoczenia. Faktycznie histydynę często znajdowano w miejscach aktywnych enzymów, gdzie jej imidazolowy pierścień może łatwo przechodzić z jednego z tych stanów do drugiego, katalizując tworzenie wiązań i ich zrywanie. Są to *aminokwasy zasadowe*.

# Aminokwasy z kwaśnym łańcuchem bocznym

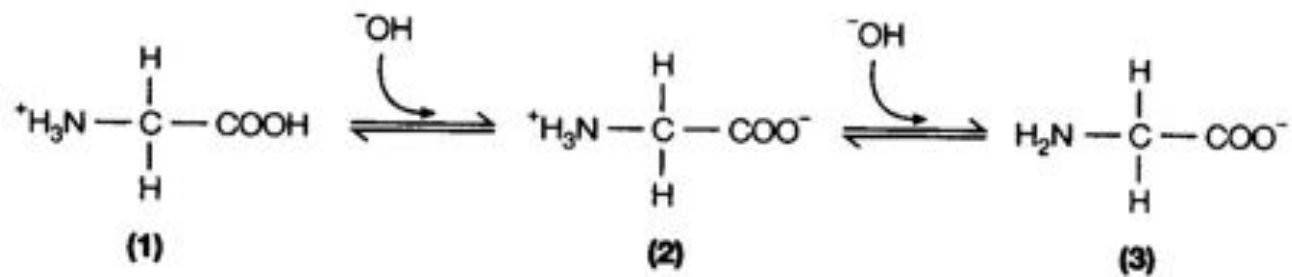
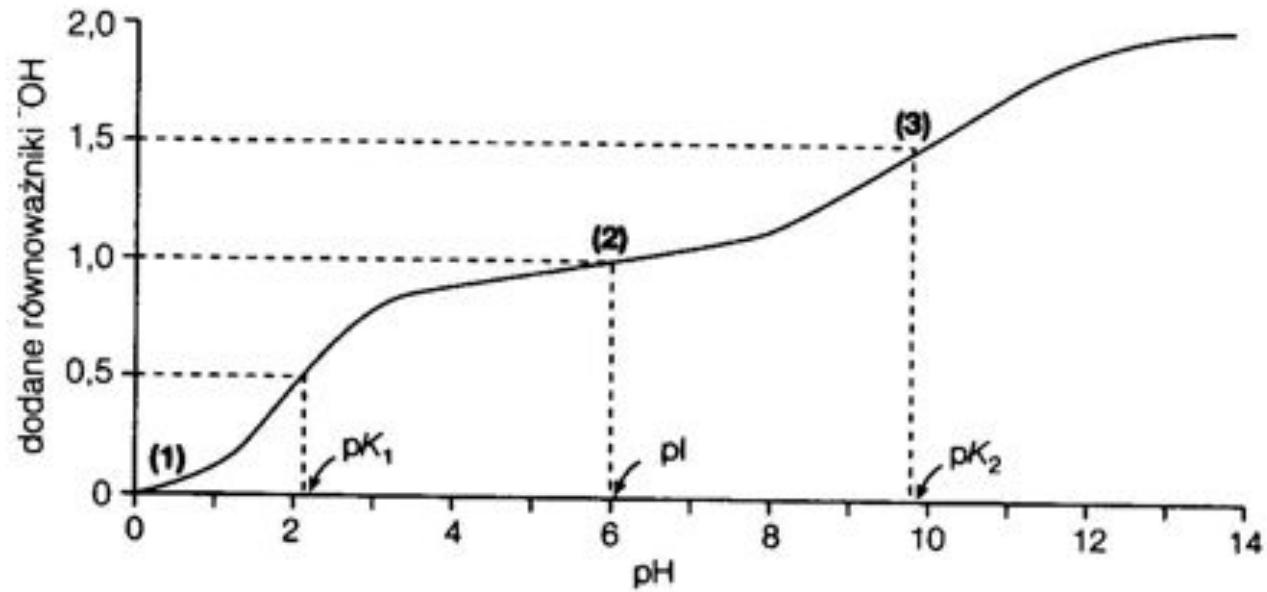


W zestawie tych aminokwasów znajdują się również dwa z kwasowymi łańcuchami bocznymi, są to **kwas asparaginowy i kwas glutaminowy**. Aminokwasy te zwykle określa się jako *asparaginian* i *glutaminian*, aby zaznaczyć, że ich boczne łańcuchy w pH fizjologicznym są niemal zawsze ujemnie naładowane.

**Glutamina i asparagina** — to pochodne glutaminianu i asparaginianu, które nie mają ładunku w łańcuchu bocznym na skutek pojawienia się grupy amidowej.

Nazwa aminokwasu	Symbol trzyliterowy	Symbol jednoliterowy	Wzór aminokwasu
Glicyna	Gly	G	$\begin{array}{c} \text{CH}_2\text{COOH} \\   \\ \text{NH}_2 \end{array}$
Alanina	Ala	A	$\begin{array}{c} \text{CH}(\text{CH}_3)\text{COOH} \\   \\ \text{NH}_2 \end{array}$
Walina	Val	V	$\begin{array}{c} (\text{CH}_3)_2\text{CHCHCOOH} \\   \\ \text{NH}_2 \end{array}$
Leucyna	Leu	L	$\begin{array}{c} (\text{CH}_3)_2\text{CHCH}_2\text{CHCOOH} \\   \\ \text{NH}_2 \end{array}$
Izoleucyna	Ile	I	$\begin{array}{c} \text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CHCOOH} \\   \quad   \\ \text{H} \quad \text{NH}_2 \end{array}$
Prolina	Pro	P	
Seryna	Ser	S	$\begin{array}{c} \text{CH}(\text{CH}_2\text{OH})\text{COOH} \\   \\ \text{NH}_2 \end{array}$
Treonina	Thr	T	$\begin{array}{c} \text{CH}(\text{CH}(\text{CH}_3)\text{OH})\text{COOH} \\   \\ \text{NH}_2 \end{array}$
Cysteina	Cys	C	$\begin{array}{c} \text{CH}(\text{CH}_2\text{SH})\text{COOH} \\   \\ \text{NH}_2 \end{array}$
Metionina	Met	M	$\begin{array}{c} \text{CH}_3\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{CHCOOH} \\   \\ \text{NH}_2 \end{array}$
Fenylalanina	Phe	F	
Tyrozyna	Tyr	Y	
Tryptofan	Trp	W	
kw. Asparaginowy	Asp	D	$\begin{array}{c} \text{HOOCCH}_2\text{CHCOOH} \\   \\ \text{NH}_2 \end{array}$
Asparagina	Asn	N	$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{NOCCH}_2\text{CHCOOH} \\   \\ \text{NH}_2 \end{array}$
kw. Glutaminowy	Glu	E	$\begin{array}{c} \text{HOOCCH}_2\text{CH}_2\text{CHCOOH} \\   \\ \text{NH}_2 \end{array}$
Glutamina	Gln	Q	$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{NOCCH}_2\text{CH}_2\text{CHCOOH} \\   \\ \text{NH}_2 \end{array}$
Lizyna	Lys	K	$\begin{array}{c} \text{CH}_2(\text{CH}_2)_4\text{CHCOOH} \\   \quad   \\ \text{NH}_2 \quad \text{NH}_2 \end{array}$
Arginina	Arg	R	$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{NCONH}(\text{CH}_2)_3\text{CHCOOH} \\   \quad   \\ \text{NH} \quad \text{NH}_2 \end{array}$
Histydyna	His	H	

## Jonizacja aminokwasów



forma kationowa

forma anionowa

Wartości pK grup ulegających jonizacji, występujących w białkach

Grupa	Kwas $\rightleftharpoons$ zasada + H <sup>+</sup>	Typowe pK
Końcowa grupa karboksylowa	$-\text{COOH} \rightleftharpoons -\text{COO}^- + \text{H}^+$	3,1
Kwas asparaginowy i glutaminowy	$-\text{COOH} \rightleftharpoons -\text{COO}^- + \text{H}^+$	4,4
Histydyna	$-\text{CH}_2-\begin{array}{c} \diagup \quad \diagdown \\ \text{HN}^+ \quad \text{NH} \\ \diagdown \quad \diagup \\ \text{N} \quad \text{NH} \end{array} \rightleftharpoons -\text{CH}_2-\begin{array}{c} \diagup \quad \diagdown \\ \text{N} \quad \text{NH} \\ \diagdown \quad \diagup \\ \text{N} \quad \text{NH} \end{array} + \text{H}^+$	6,5
Końcowa grupa aminowa	$-\text{NH}_3^+ \rightleftharpoons -\text{NH}_2 + \text{H}^+$	8,0
Cysteina	$-\text{SH} \rightleftharpoons -\text{S}^- + \text{H}^+$	8,5
Tyrozyna	$\text{—} \begin{array}{c} \text{OH} \\   \\ \text{C}_6\text{H}_4 \end{array} \rightleftharpoons \text{—} \begin{array}{c} \text{O}^- \\   \\ \text{C}_6\text{H}_4 \end{array} + \text{H}^+$	10,0
Lizyna	$-\text{NH}_3^+ \rightleftharpoons -\text{NH}_2 + \text{H}^+$	10,0
Arginina	$\text{—N—C} \begin{array}{l} \diagup \text{NH}_2^+ \\ \diagdown \text{NH}_2 \end{array} \rightleftharpoons \text{—N—C} \begin{array}{l} \diagup \text{NH} \\ \diagdown \text{NH}_2 \end{array} + \text{H}^+$	12,0

Wartości pK zależą od temperatury, siły jonowej i mikrośrodowiska grup ulegających jonizacji.



## Najistotniejsze **wiązania niekowelencyjne** występujące w **układach biologicznych**

### Wiązanie elektrostatyczne

przyciąganie przeciwnie naładowanych grup występujących w makrocząsteczkach

### Wiązania wodorowe

gdzie występuje aktywny atom wodoru który może się stać wspólny dla dwóch innych atomów (w układach żywych najistotniejsze są atomy O i N jako donory i akceptory wodoru) wiązanie wodorowe ma ściśle ukierunkowany charakter i jest najsilniejsze gdy wszystkie atomy leżą w jednej linii

### Najważniejsze przykłady:

- w białkach struktura  $\alpha$  stabilizowana wiązaniami wodorowymi między gr. amidowymi (-NH) i karbonylowymi (-CO)
- dwuniciowa helisa DNA stabilizowana oddziaływaniem między zasadami łańcuchów naprzeciwko siebie

### Wiązania van der Waalsa

niespecyficzna siła przyciągania pojawiająca się kiedy dwa atomy zbliżą się na odległość od 0,3 do 0,4 nm dokładnie związane jest ze zmianami rozkładu ładunków elektronowych wokół danego atomu (ma ono szczególne znaczenie w przypadku gdy kształty cząsteczek są do siebie dopasowane - działanie enzymów)

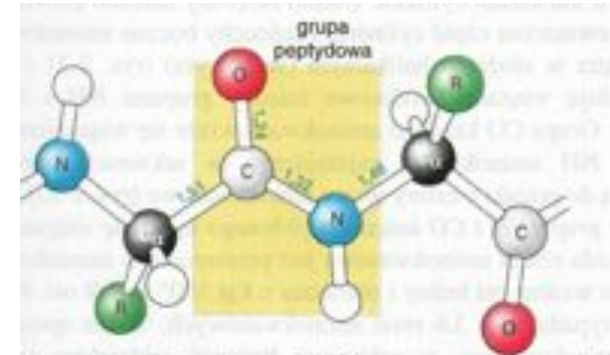
### Siła wiązań

elektrostatyczne > wodorowe > van der Waalsa

## Grupa peptydowa jest sztywnym i płaskim elementem strukturalnym

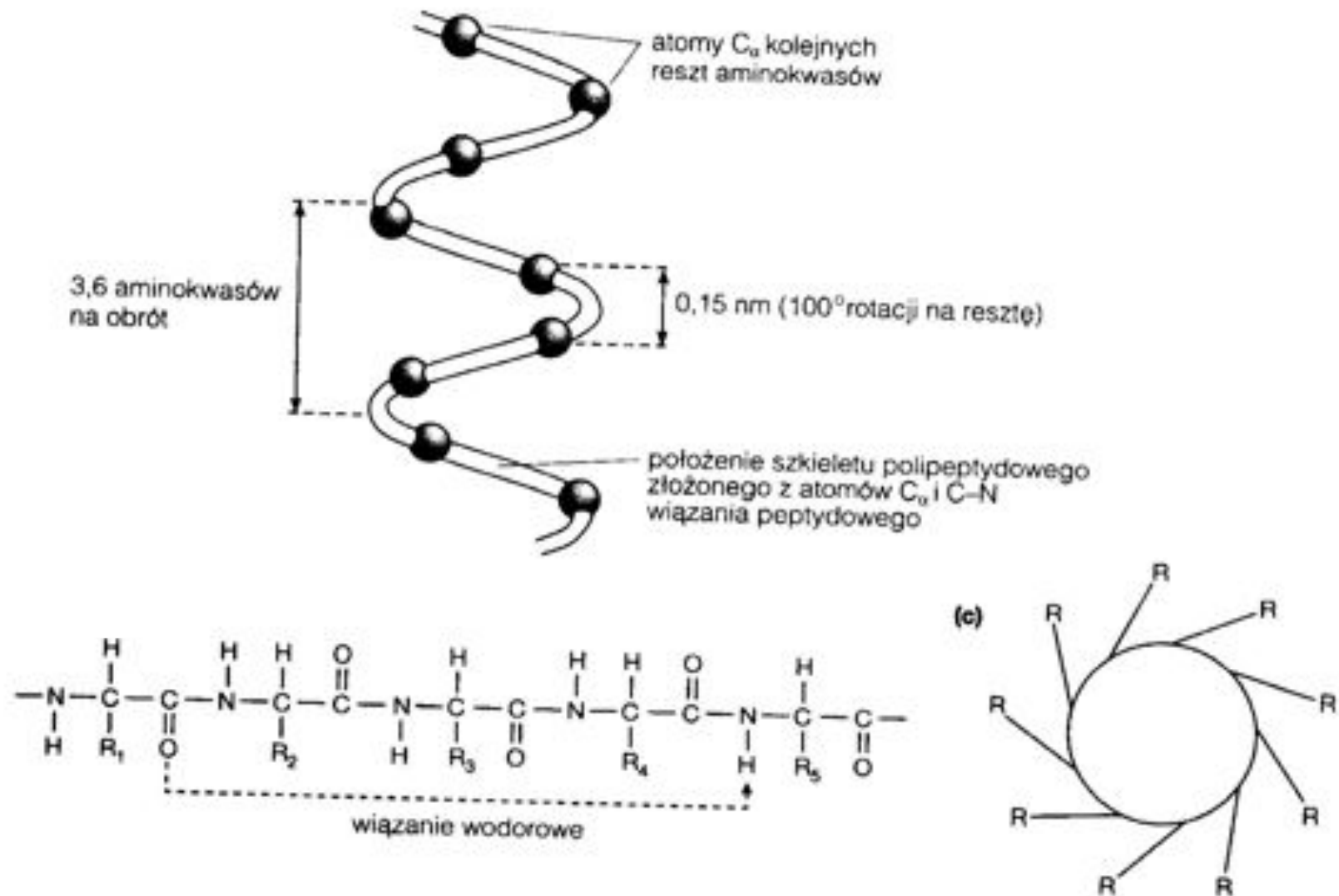
Rozciągnięty lub ułożony przypadkowo łańcuch polipeptydowy jest pozbawiony aktywności biologicznej.

Aktywność ta pojawia się wraz z odpowiednią *konformacją*, a więc właściwym, przestrzennym ułożeniem atomów polipeptydu. Sens informacyjny sekwencji aminokwasowej polega zatem na określeniu konformacji cząsteczki białkowej.



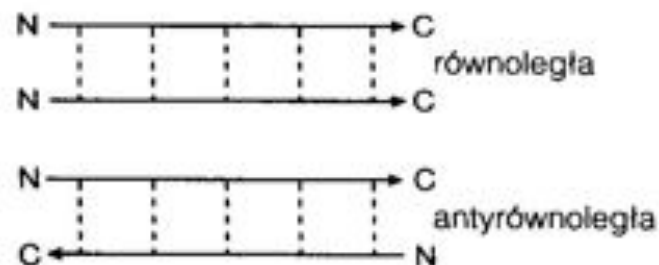
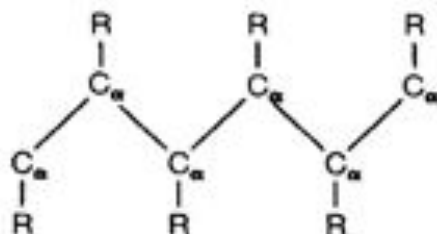
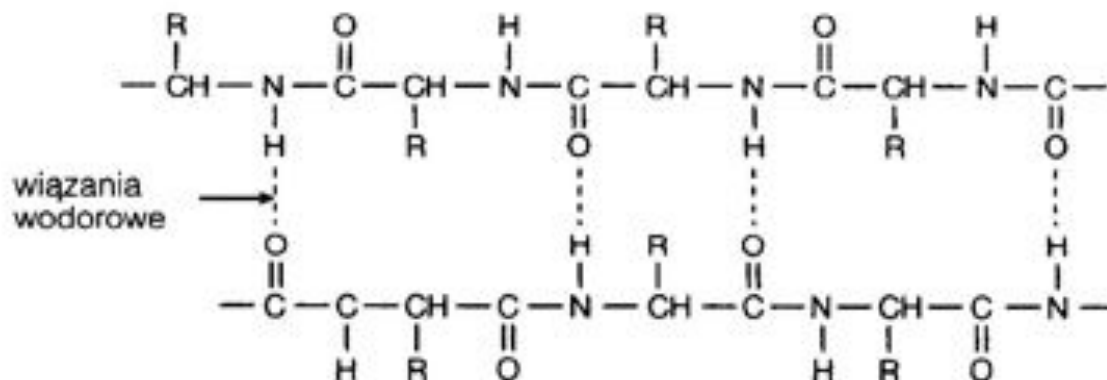
Atom wodoru grupy —NH— znajduje się prawie zawsze w pozycji trans w stosunku do atomu tlenu grupy karbonylowej. Wokół wiązania między karbonylowym atomem węgla i atomem azotu nie ma swobody obrotu, ponieważ, wiązanie to wykazuje częściowo charakter wiązania podwójnego. Natomiast wiązanie między atomem węgla  $\alpha$  i karbonylowym atomem węgla jest typowym wiązaniem pojedynczym. To samo dotyczy wiązania między atomem węgla  $\alpha$  i atomem azotu. *Istnieją zatem duże możliwości swobodnej rotacji wokół obu tych wiązań, po obu stronach sztywnego układu grupy peptydowej*. Usztywnienie wiązania peptydowego umożliwia białkom tworzenie ściśle zdefiniowanych struktur przestrzennych.

# Konformacja białek - heliksa $\alpha$



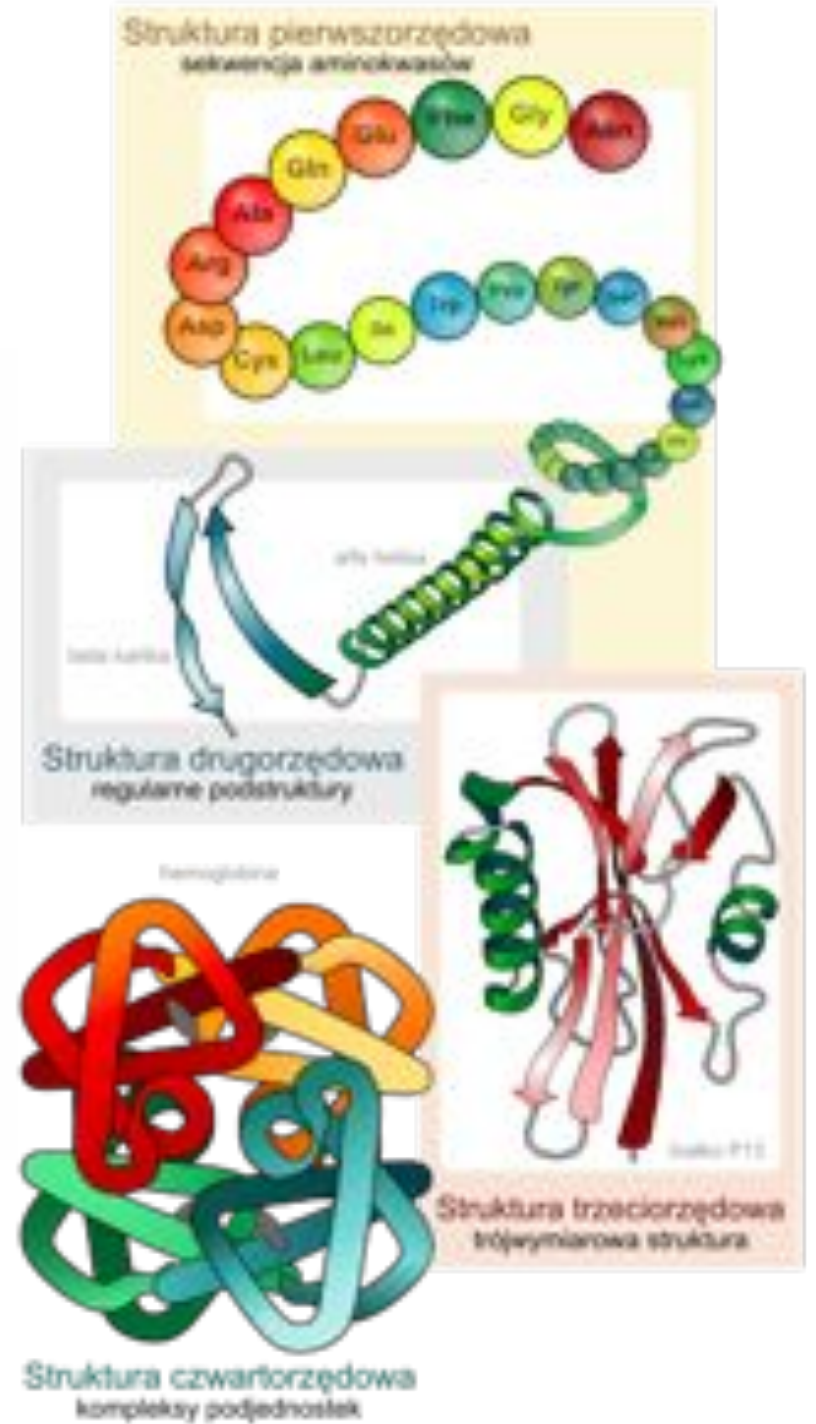
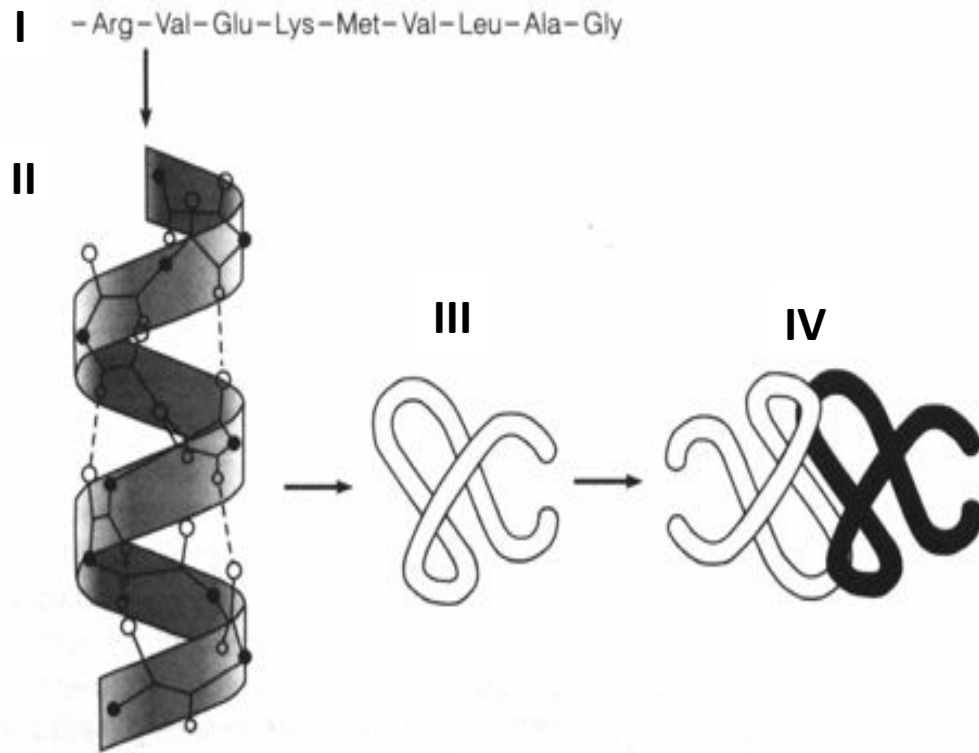
Zawartość struktury  $\alpha$  w białkach jest bardzo różna i waha się od prawie zerowej do 100%. Na przykład enzym trawienny **chymotrypsyna** jest w zasadzie pozbawiony struktury helisy  $\alpha$ . Natomiast w **mioglobinie** i **hemoglobinie** stanowi ona około **75%**.

# Konformacja białek - harmonijka $\beta$



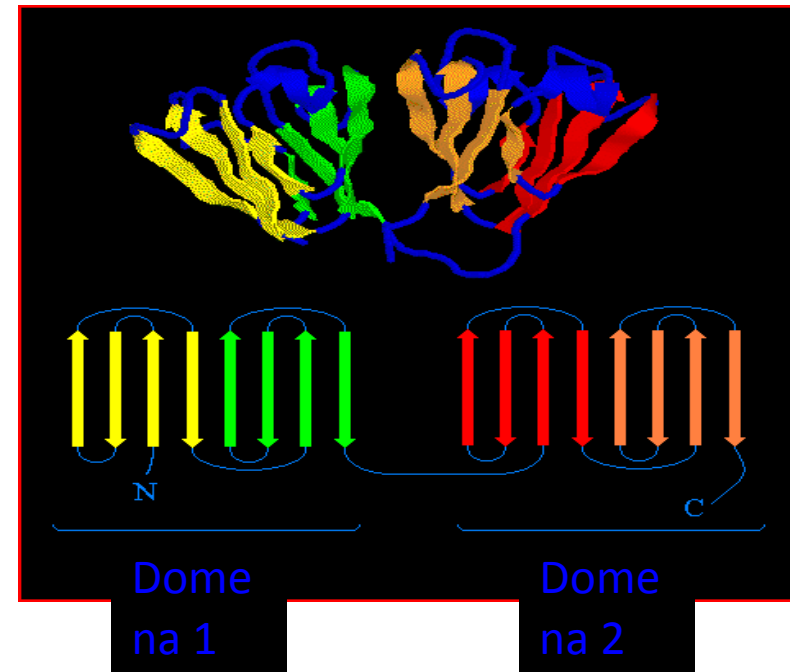
W strukturze harmonijki  $\beta$  łańcuch polipeptydowy, zwany również *nicią*  $\beta$ , jest prawie całkowicie rozciągnięty, w odróżnieniu od ciasno upakowanego w helisie  $\alpha$ . Odległość sąsiednich aminokwasów wzdłuż osi długiej cząsteczki  $\beta$  wynosi 0,35 nm, podczas gdy w helisie  $\alpha$  — 0,15 nm.

# Poziomy struktury białka



**Domeny** – następny poziom w organizacji przestrzennej

Stanowią podstawowe jednostki struktury II rzędowej



Pojedyncza domena – 50 – 150 aa  
średnica  $\approx$  2,5 nm

$\gamma$ -kryształina

Białka mogą składać się z pojedynczej domeny lub tworzyć wiele domen

# Typy struktur III rzędowych

1. typ  $\alpha$  – białka zbudowane gł. z  $\alpha$ -helisy

2.  $\alpha/\beta$              $> 30\% \alpha$   
                              $> 20\% \beta$

3.  $\beta$                      $< 5\% \alpha$   
                              $> 45\% \beta$

4.  $\alpha + \beta$              $> 30\% \alpha$   
                              $> 20\% \beta$

struktury  $\alpha$  i  $\beta$  zlokalizowane są w  
odizolowanych obszarach



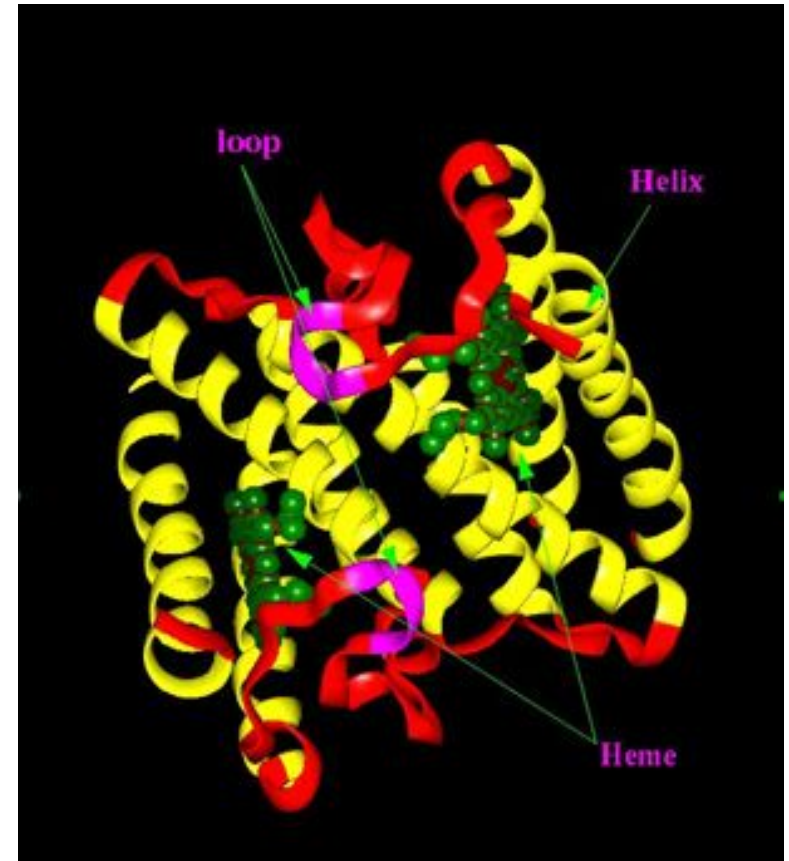
**miohemoerytryna**

### Typ $\alpha$ I

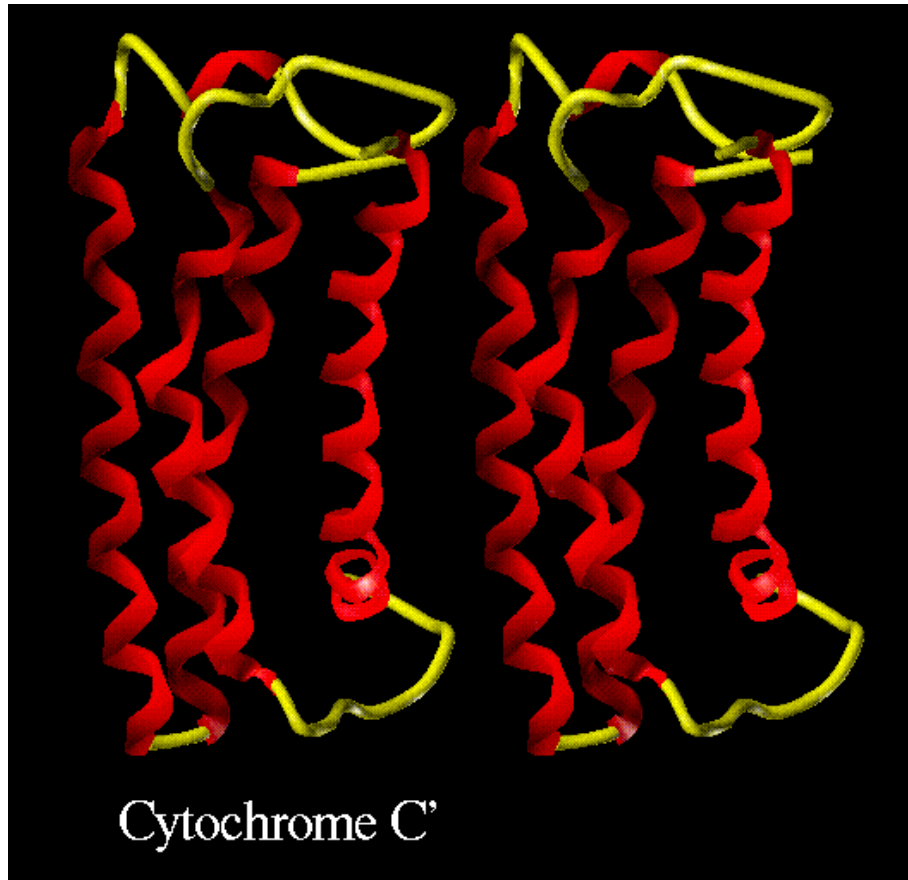
wiązki antyrównoległe ułożonych  $\alpha$ -helis  
połączonymi krótkimi obszarami pętli na  
powierzchni białka

Struktura cylindryczna **hemoglobiny**

- hydrofilowe łańcuchy boczne „ukrywają”  
hydrofobowe wnętrze

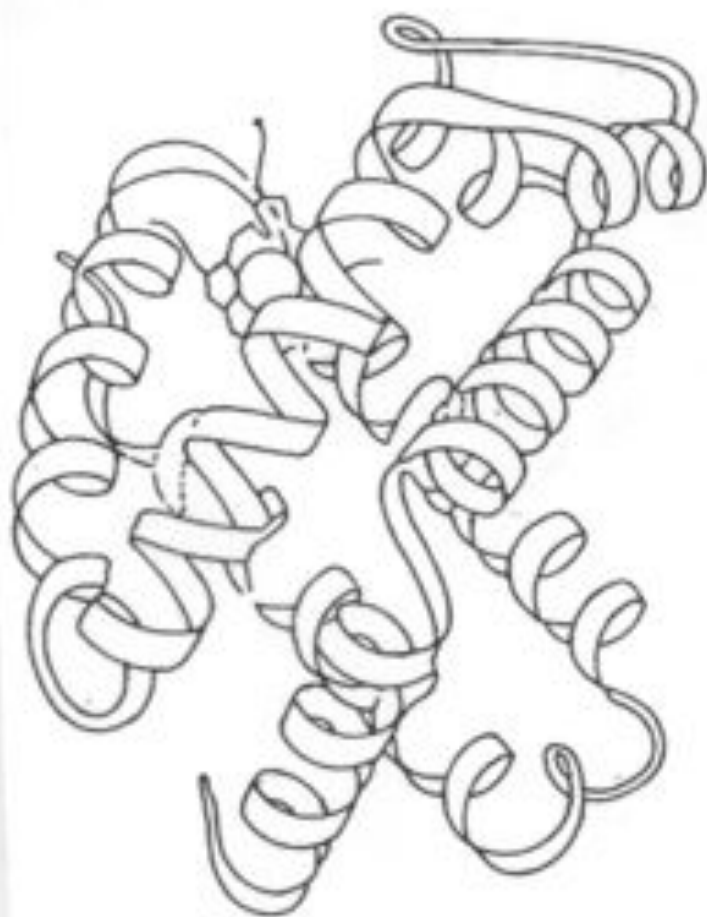




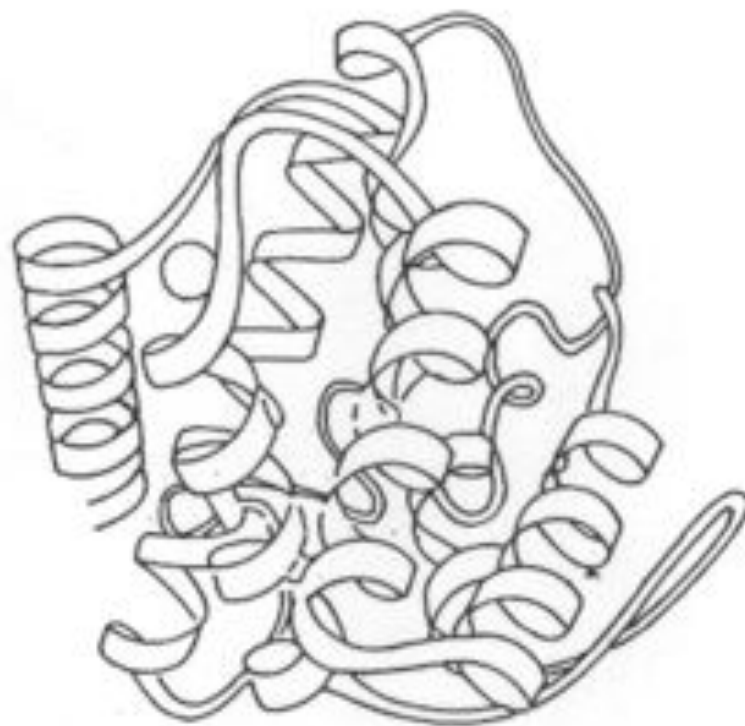


### Typ $\alpha$ II

kolejne sąsiadujące pary helis połączone prostopadle przy ich sekwencyjnie przylegających końcach – motyw klucza greckiego min. pięcioelementowy



podjednostka  $\beta$ -hemoglobiny



termolizyna-domena 2

Schematyczne diagramy białek reprezentujących typ struktury złożonej z wiązki helis tworzących motyw „klucza greckiego” (wg Richardson, *Adv. Prot. Chem.* 34, 262, 1981)

# Białka przez modyfikacje uzyskują nowe możliwości

## Modyfikacja potranslacyjna aminokwasów:

- koniec aminowy wielu białek jest *acetylowany*, co powoduje, że są one odporniejsze na rozkład,
- w kolagenie wiele reszt prolinowych ulega hydroksylacji, przekształcającej je w *hydroksyprolinę*. Powstałe grupy hydroksylowe stabilizują włókna kolagenowe - (szkorbut, choroba wywołana osłabieniem procesu hydroksylacji kolagenu z powodu braku witaminy C)
- *karboksylglutaminian* (wskutek niedoboru witaminy K zachodzi niedostateczna karboksylacja glutaminianu w protrombinie, białku będącym czynnikiem krzepnięcia krwi, co może prowadzić do krwotoku),
- przeciwciała, zawiera *grupy węglowodanowe* na specyficznych resztach asparaginowych.
- dodatkowe reszty cukrowe nadają białkom charakter bardziej hydrofilowy;
- przyłączenie reszt *kwasów tłuszczowych* do grupy α-aminowej lub hydrosulfidowej w cysteinie — zwiększa hydrofobowy charakter białka.

# Białka mają ściśle określone sekwencje aminokwasowe, zgodne z zapisem genetycznym

Sekwencja nukleotydów w DNA, cząsteczce dziedziczności, określa komplementarną sekwencję nukleotydów w RNA, która z kolei determinuje sekwencję aminokwasów w białku. Każdy z 20 podstawowych aminokwasów jest kodowany przez jedną lub więcej sekwencji trzech nukleotydów. Mechanizm syntezy białek z aminokwasów, wchodzących w ich skład, jest wspólny dla wszystkich organizmów.

- znajomość sekwencji białka jest istotna i bardzo pomocna w wyjaśnianiu mechanizmu jego działania (mechanizm katalityczny enzymu).
- analiza zależności między sekwencją aminokwasów i strukturą przestrzenną białka pozwala ustalić reguły rządzące fałdowaniem się łańcuchów polipeptydowych.
- oznaczanie sekwencji jest niezbędne w patologii molekularnej - zmiany sekwencji aminokwasów mogą być przyczyną nienormalnego funkcjonowania lub choroby organizmu (Na przykład niektóre ciężkie choroby, jak anemia sierpowata czy mukowiscydoza, są spowodowane zmianą tylko jednego aminokwasu w pojedynczym białku)



Sekwencja aminokwasowa

# Białka (proteiny)

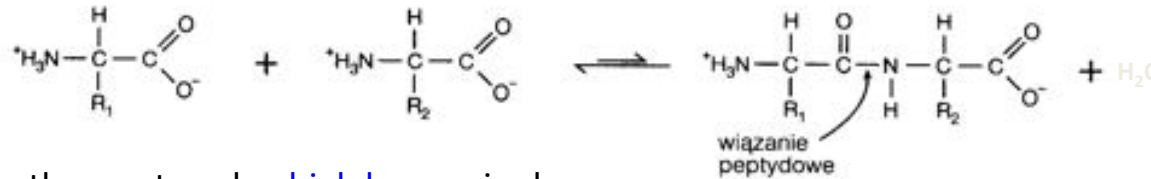
## Skład pierwiastkowy:

C - 50-55%

H - 6,6-7,3%

N - 15-19%

O - 19-21%



Jednostką powtarzalną białek są aminokwasy

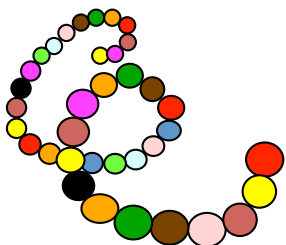
## Różnorodność budowy białek

### 1. Budowa chemiczna aminokwasów

W białkach występuje ponad 20 różnych aminokwasów o podstawnikach R

- o różnym stopniu hydrofowobości
- kwasowe i zasadowe
- alifatyczne i aromatyczne
- posiadających różne grupy funkcyjne

### 2. Ciężar cząsteczkowy i sekwencja aminokwasów



Dla białka zbudowanego z 400 aminokwasów:

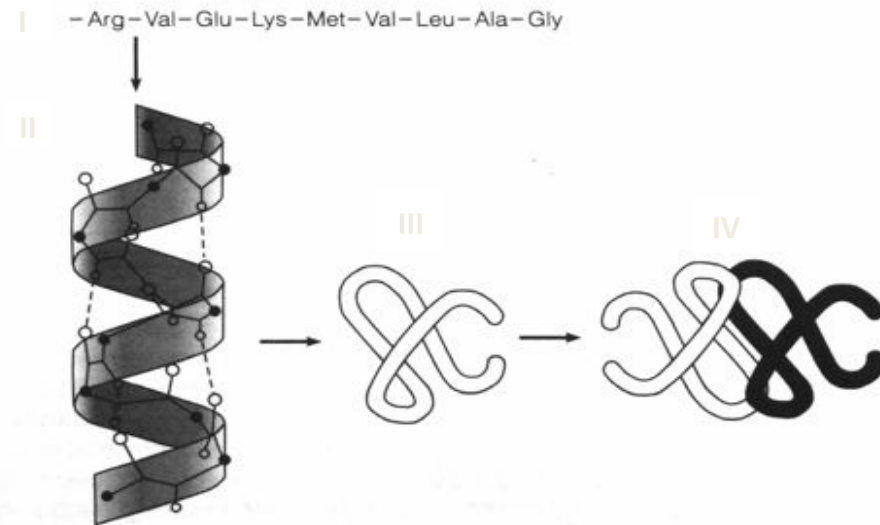
$20^{400} \approx 10^{540}$  kombinacji

Wrzechświat:

$10^{19}$  sekund,  $10^{80}$  atomów



### 3. Poziomy struktury białka



### Oddziaływania decydujące o strukturze białek:

kowalencyjne > elektrostatyczne > wodorowe > van der Waalsa

Każde białko ma specyficzną (ściśle określoną) budowę chemiczną

# Cechy wspólne wszystkich białek

- 1) mają charakter wielkocząsteczkowy (ciężar cząsteczkowy od 10.000 do wielokrotności miliona)
- 2) wywierają ciśnienie koloido-osmotyczne
- 3) mają zdolność wiązania jonów
- 4) wędrują w polu elektrycznym dzięki ładunkowi elektrycznemu cząsteczek
- 5) ulegają wysalaniu pod wpływem soli (silnych elektrolitów)
- 6) są wrażliwe na podwyższoną temperaturę oraz inne czynniki denaturujące
- 7) skręcają płaszczyznę światła spolaryzowanego w lewo, ponieważ są zbudowane z aminokwasów,  
które z wyjątkiem glicyny są optycznie czynne
- 8) roztwory białek cechuje duży współczynnik załamania światła (refraktometryczne oznaczenie stężenia)
- 9) z powodu obecności tyrozyny i tryptofanu, białka pochłaniają światło nadfioletowe, z maksimum przy 280 nm

**Jak cechy te rzutują na właściwości funkcjonalne białek?**

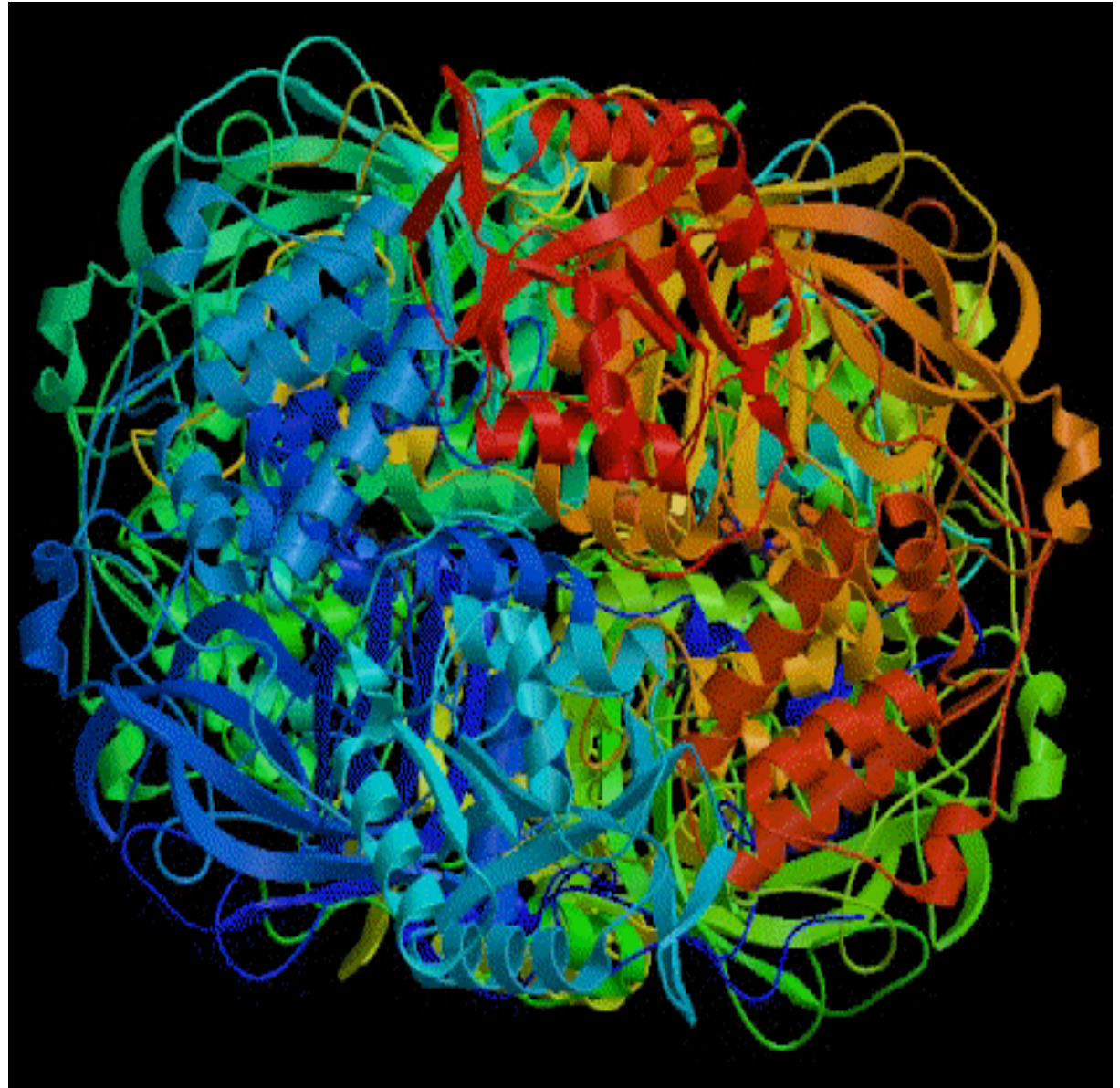


# Białka (podział wg budowy)

- **proste**
- złożone

## **Białka proste:**

- histony
- protaminy
- albuminy
- globuliny



## Białka (podział wg budowy)

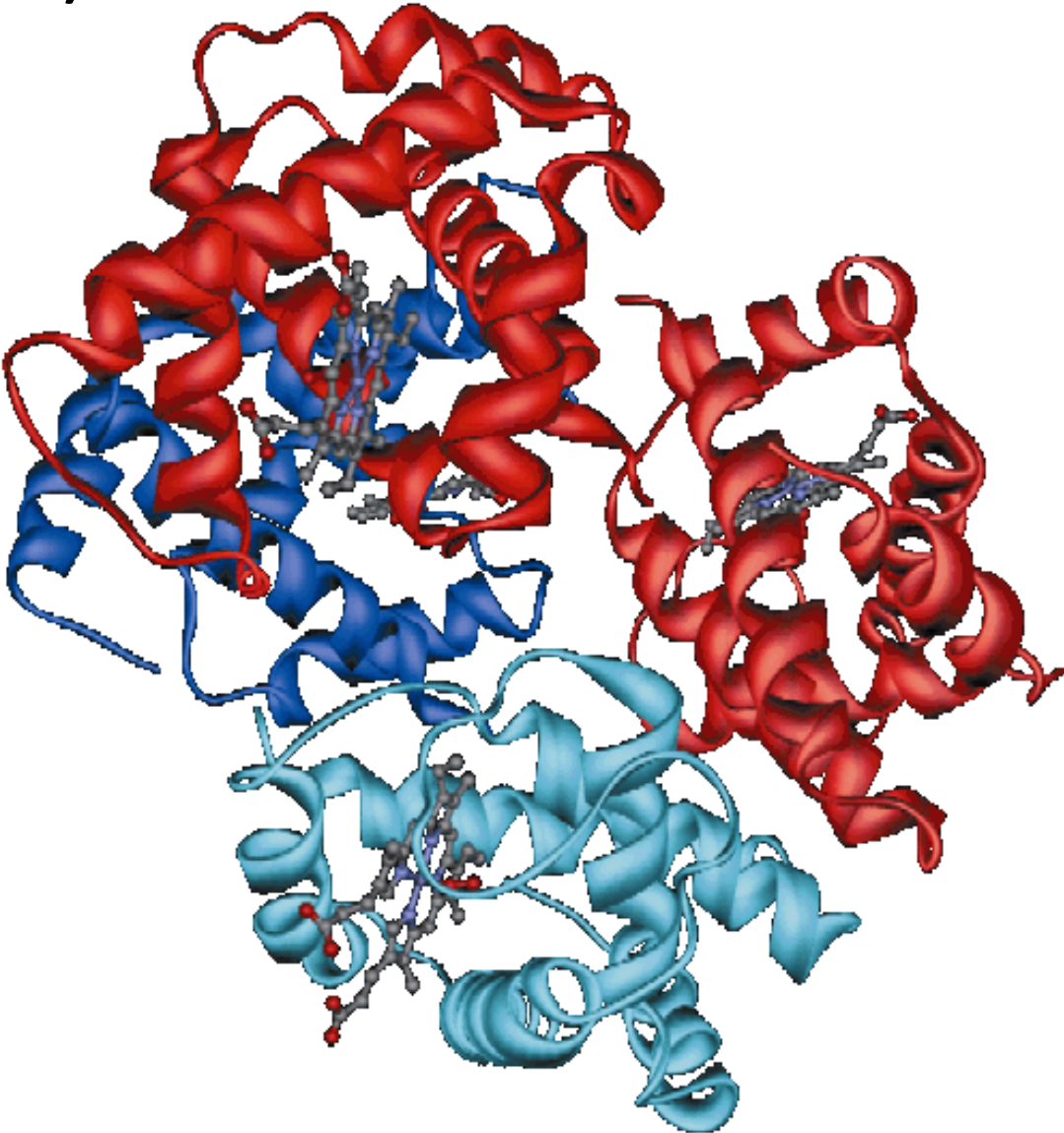
- proste
- **złożone**

- **fosfo-**
- **metalo-**
- **lipo-**
- **gliko-**
- **nukleo-**
- **chromo-**

**proteiny**

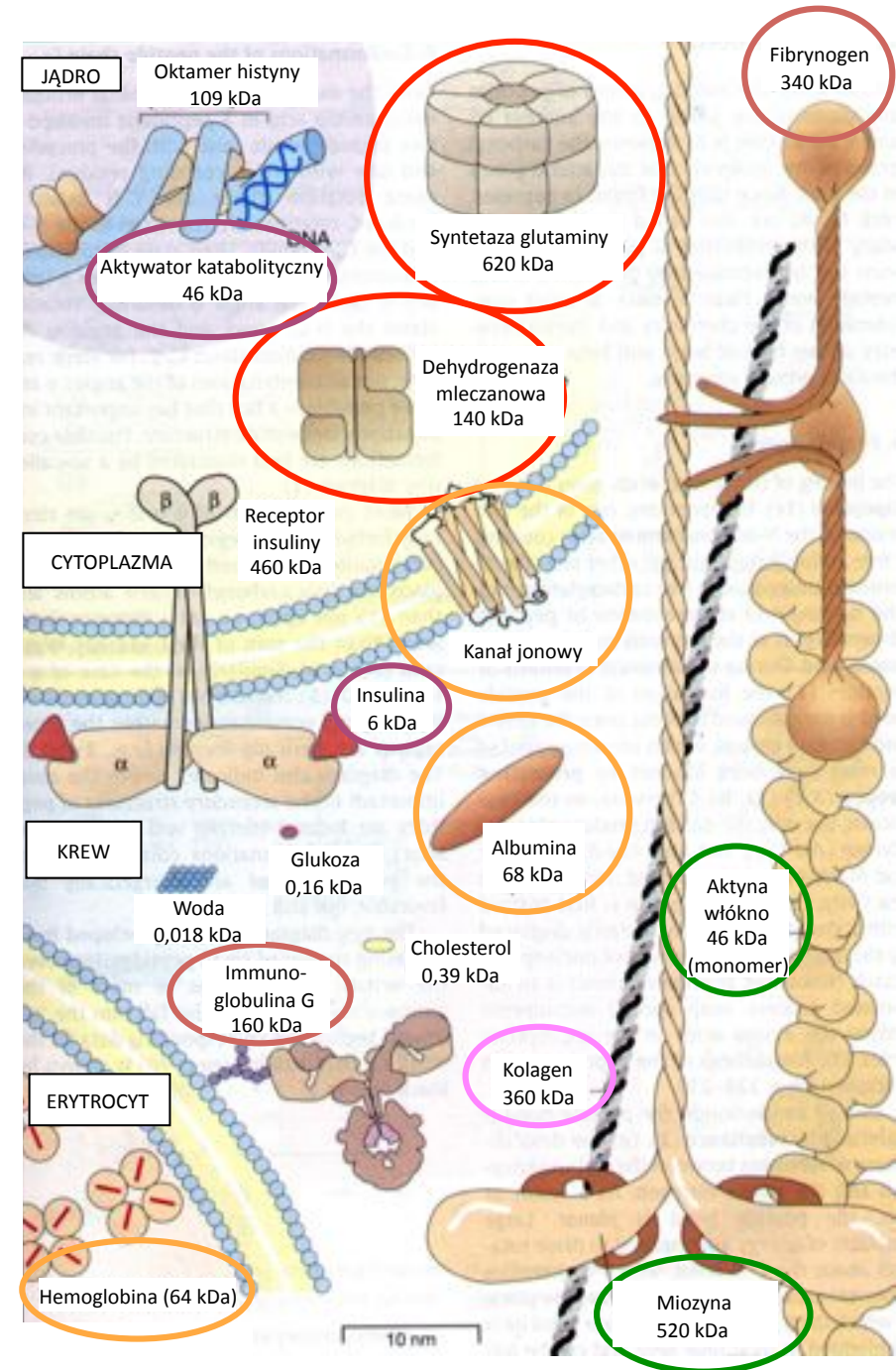


**Chromoproteina – (hemoglobina)**

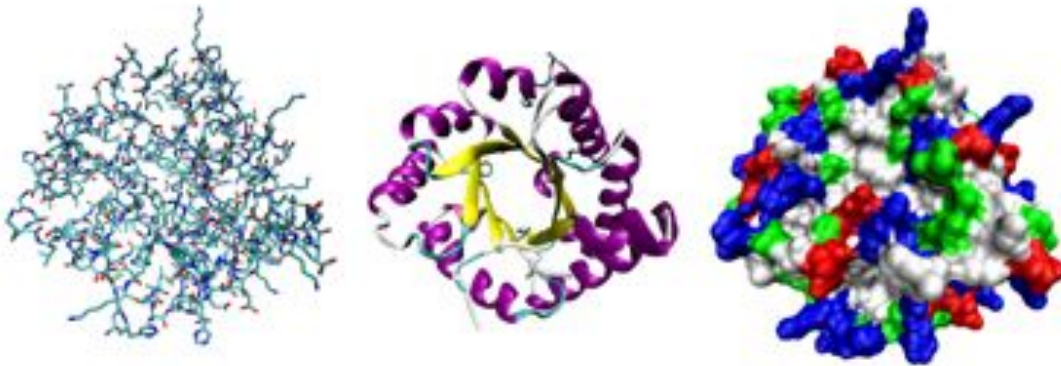


# Funkcje białek w żywych organizmach

1. **Kataliza enzymatyczna**  
nadawanie kierunku przemianom chemicznym w układach biologicznych i zwiększają szybkość  $\sim 10^6$
2. **Transport i magazynowanie**  
transport wielu małych cząsteczek i jonów zachodzi przy udziale białek
3. **Ruch uporządkowany**  
główny składnik mięśni
4. **Funkcja mechaniczno-strukturalna**  
nadaje elastyczność mięśniom oraz tkance kostnej
5. **Ochrona immunologiczna**  
przeciwciała łączące się z obcymi dla ustroju substancjami
6. **Wytwarzanie i przekazywanie impulsów nerwowych**  
białka receptorowe na synapsach nerwowych
7. **Kontrola wzrostu i różnicowania**  
kontrola odpowiedniej kolejności ekspresji genetycznej



**Kataliza enzymatyczna.** Prawie wszystkie reakcje enzymatyczne zachodzące w układach żywych są katalizowane przez swoiste makrocząsteczki, enzymy. Enzymy są bardzo silnymi katalizatorami, na ogół zwiększają szybkość reakcji chemicznej przynajmniej milion razy. Jeśli brak enzymów, przemiany chemiczne *in vivo* bardzo rzadko zachodzą z zauważalną szybkością. Dotychczas w pełni scharakteryzowano kilka tysięcy enzymów i wiele z nich uzyskano w formie krystalicznej.

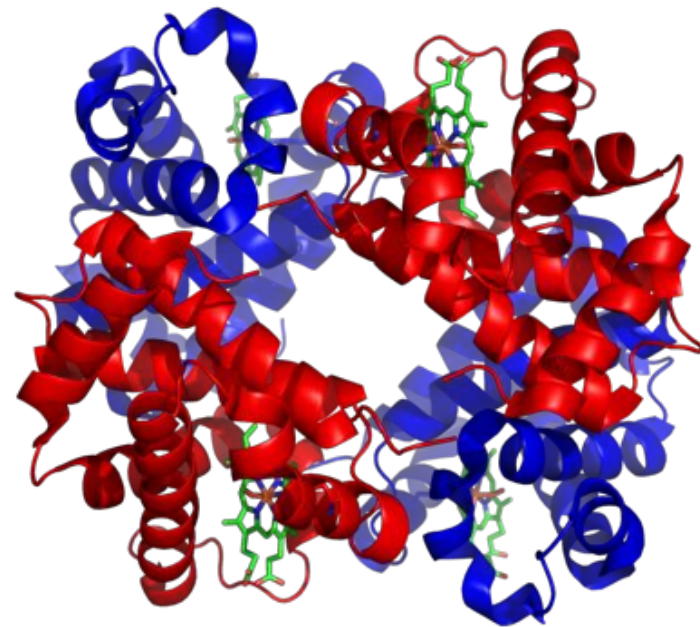


Trójwymiarowa struktura białka (enzymu) - **izomerazy triozofosforanowej**. Po lewej prezentacja poszczególnych atomów, rozróżnionych kolorami. W środku struktura drugorzędowa białka. Po prawej prezentacja powierzchni białka

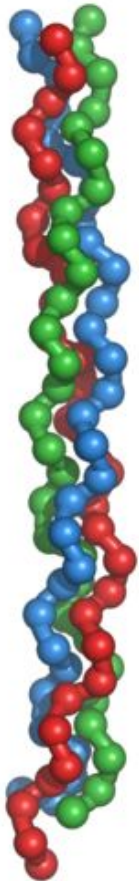
***Transport i magazynowanie.*** Transport wielu małych cząsteczek i jonów zachodzi z udziałem swoistych białek. Przykładem jest **hemoglobina**, przenosząca tlen w krwinkach czerwonych oraz mioglobina, pokrewne białko, odpowiedzialne za transport tlenu w mięśniach. Żelazo jest przenoszone w osoczu krwi przez transferynę, a przechowywane w wątrobie, w kompleksie z innym białkiem — ferrytyną.

**Struktura hemoglobiny.**

The protein's  $\alpha$  and  $\beta$  subunits are in **red** and **blue**, and the **iron-containing heme groups in green**. From PDB (Protein Data Bank) - 1GZX



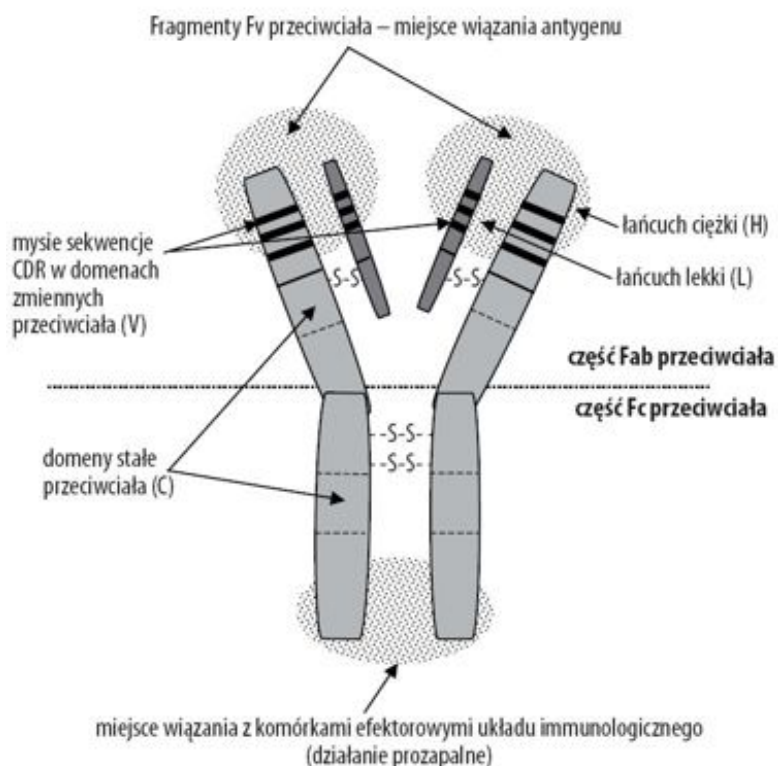
***Ruch uporządkowany.*** Białka są głównym składnikiem mięśni. Przesunięcie się dwu rodzajów włókien białkowych względem siebie prowadzi do skurczu mięśnia. W skali mikroskopowej ruchy uporządkowane, takie jak przemieszczanie się chromosomów podczas mitozy lub poruszanie się plemników za pomocą wici, są także rezultatem działania białkowych układów kurczliwych.



*Funkcje mechaniczno-strukturalne.* Dużą elastyczność mięśni oraz tkanki kostnej zapewnia obecność **kolagenu**, białka fibrylarnego

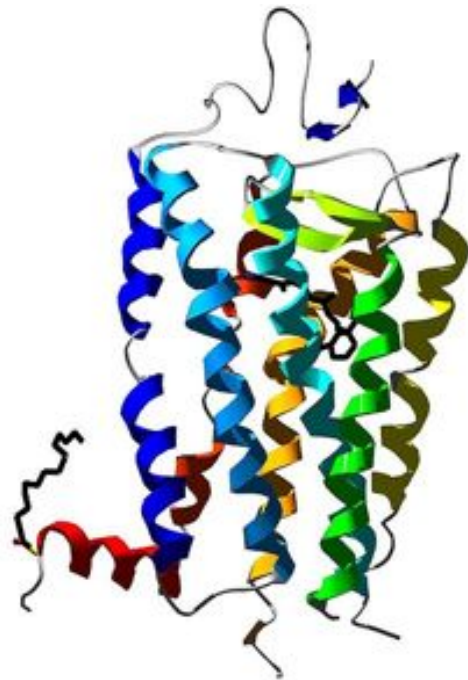
Struktura jednostki **tropokolagenu** –  
tzw. potrójna helisa, złożona z 3  
łańcuchów polipeptydowych

**Ochrona immunologiczna.** Białka o dużej swoistości, które rozpoznają substancje obce dla ustroju i łączą się z nimi, to przeciwciała. Obcymi dla ustroju mogą być wirusy, bakterie lub komórki innych organizmów. Białka odgrywają zatem istotną rolę w rozróżnianiu między tym, co własne i obce dla danego organizmu.



Schemat budowy przeciwciała humanizowanego. „Bewacizumab – postęp w leczeniu nowotworów z przerzutami i nadzieja pacjentów z retinopatią proliferacyjną”

***Wytwarzanie i przekazywanie impulsów nerwowych.*** Reakcja komórek nerwowych na specyficzne bodźce przebiega z udziałem białek receptorowych. Przykładem jest **rodopsyna**, białko fotoreceptorowe, występujące w komórkach pręcikowych siatkówki. Cząsteczki receptorów, podatne na pobudzenie przez małe swoiste cząsteczki, na przykład acetylocholinę, są odpowiedzialne za przenoszenie impulsów w synapsach, czyli połączeniach między komórkami nerwowymi.



Model struktury przestrzennej rodopsyny

**Kontrola wzrostu i różnicowania** Tylko mała część informacji zawartej w genomie ujawnia się w określonym przedziale życia komórki. U bakterii istotnym elementem kontroli są białka represorowe, „wyciszające” określone fragmenty DNA komórki. W organizmach wyższych wzrost i różnicowanie kontrolują białkowe czynniki wzrostu. Na przykład czynnik wzrostu nerwu kieruje tworzeniem sieci nerwowej. Aktywność różnych komórek w organizmach wielokomórkowych koordynują **hormony**. Wiele z nich, jak insulina czy hormon tyreotropowy, są białkami. W istocie, białka funkcjonują w komórkach jako czujniki kontrolujące przepływ energii i materii.



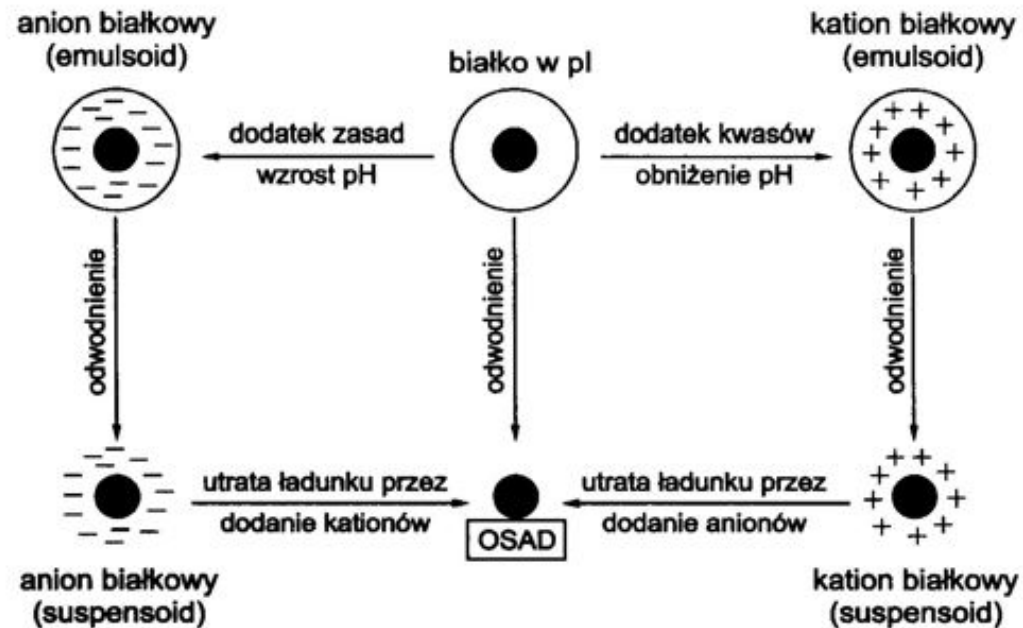
**Mikrofotografia zwoju nerwowego, pokazująca rozwój nerwów po dodaniu kompleksu białkowego — czynnika wzrostu nerwu. [Dr. Eric Shooter)**



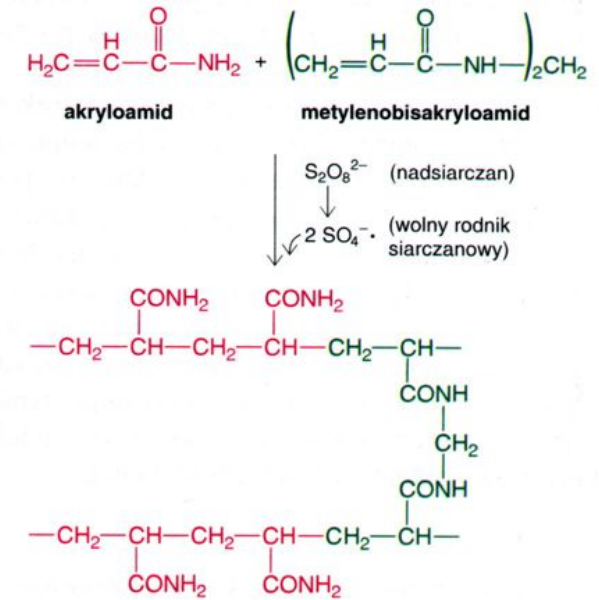
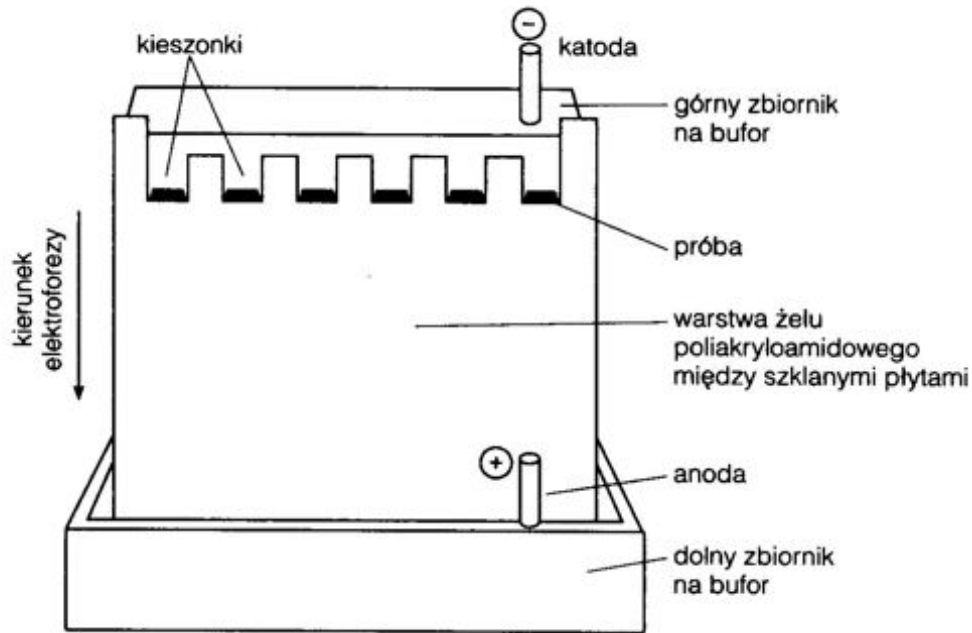
# Oczyszczanie białek

- wytrącanie
- filtracja
- dializa, ultrafiltracja (procesy membranowe)
- chromatografie cieczowe (żelowa, jonowymienna, powinowactwa)
- elektroforeza
- ultrawierowanie

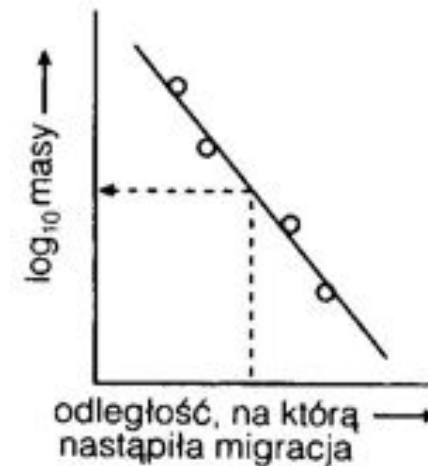
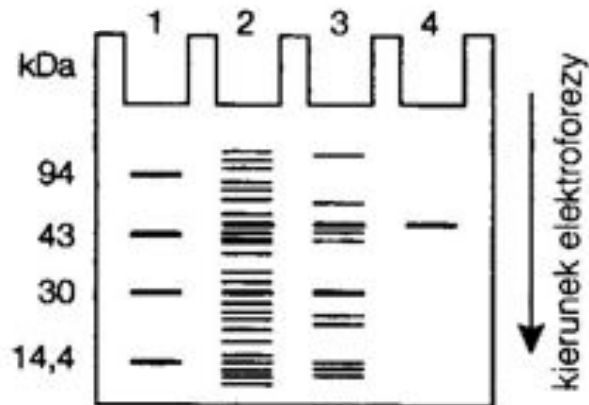
## Wytrącanie



# Elektroforeza białek



W **SDS-PAGE** białka są denaturowane i otoczone ładunkiem ujemnym (co jest wynikiem ich wiązania z cząsteczkami dodecylsiarczanu sodu) wskutek czego ich rozdział oparty jest na różnicy w ciężarze cząst.



# Elektroforeza białek

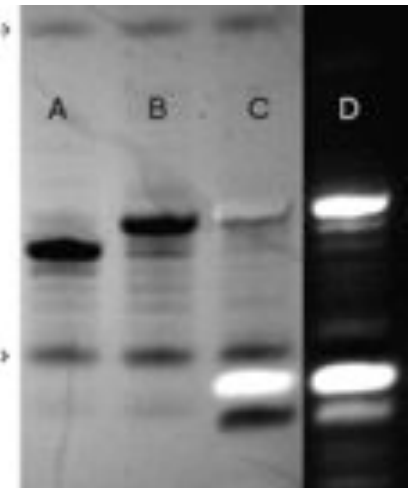


Fragment żelu poliakrylamidowego z oligonukleotydami analizowanymi w świetle UV. Elektroforeza przebiegała od góry ku dołowi. Poszczególne ścieżki obrazują proces przyłączania barwnika fluorescencyjnego, co zmieniało mobilność oligomerów i ich właściwości spektroskopowe.

BP, XC - markery długości.

Ścieżki A - C: absorpcja przy 254 nm;

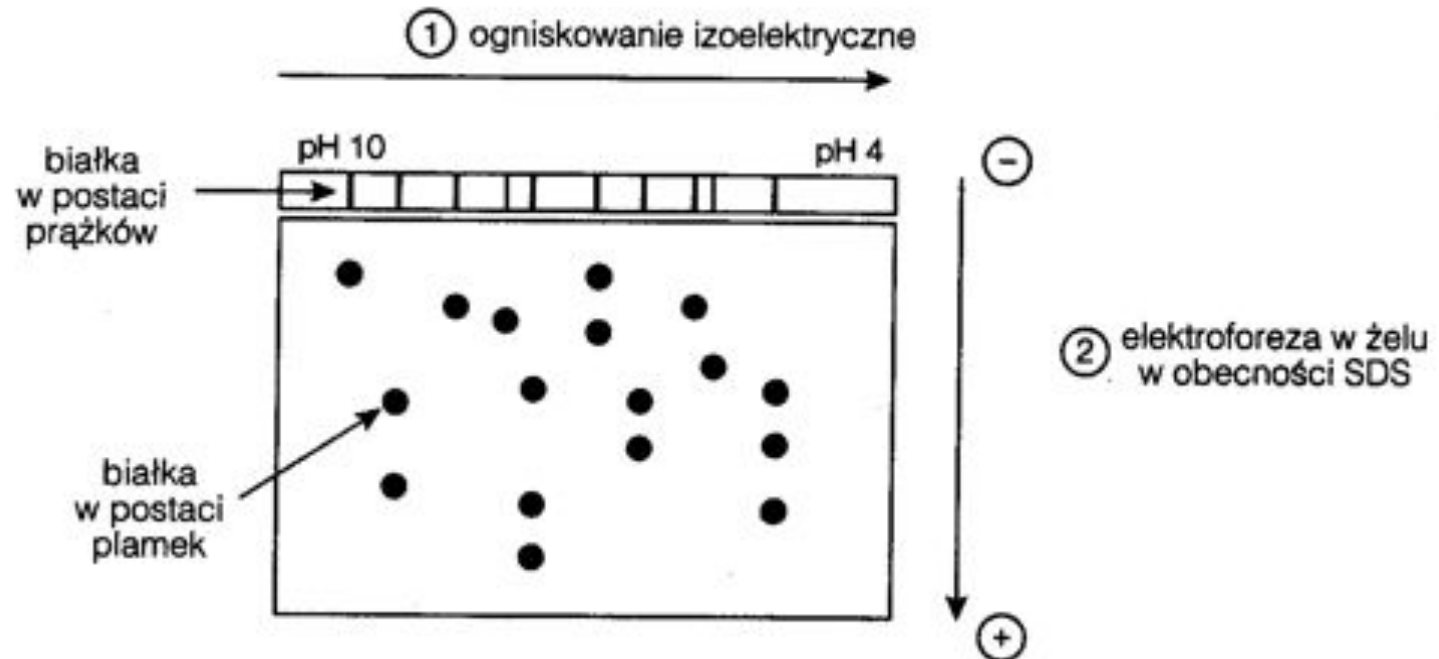
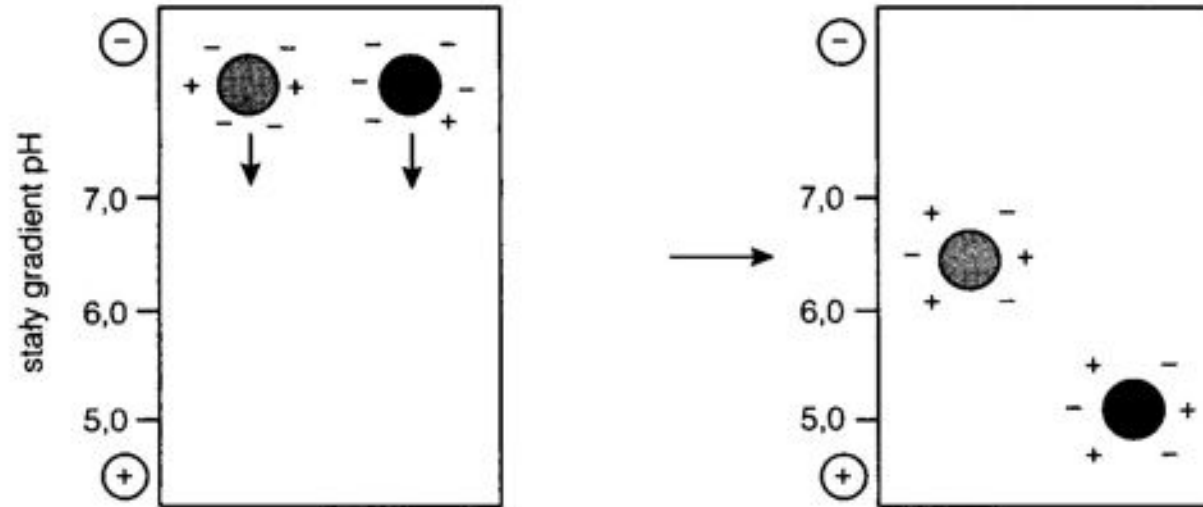
D: fluorescencja przy 366 nm



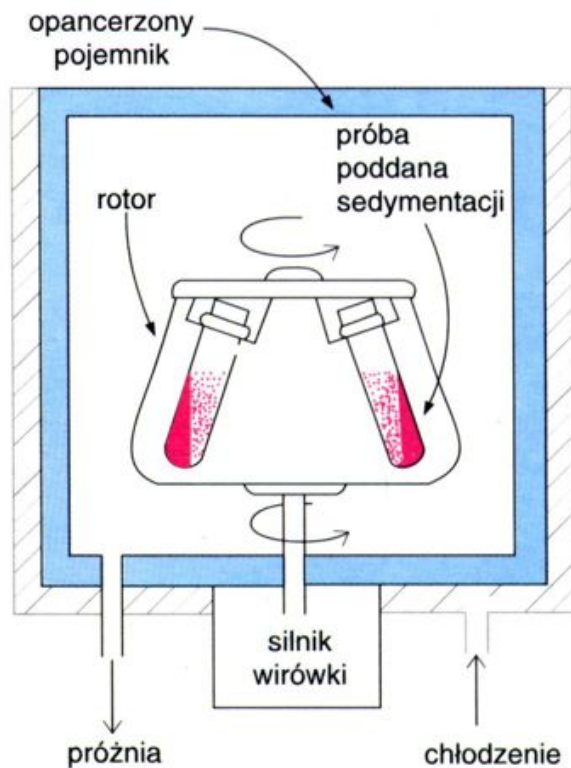
Aparat do pionowej elektroforezy żelowej

# Dwukierunkowa elektroforeza w żelu

(ogniskowanie izoelektryczne)



# Ultrawirowanie - metoda izolacji i oznaczania ciężaru cząsteczkowego biopolimerów

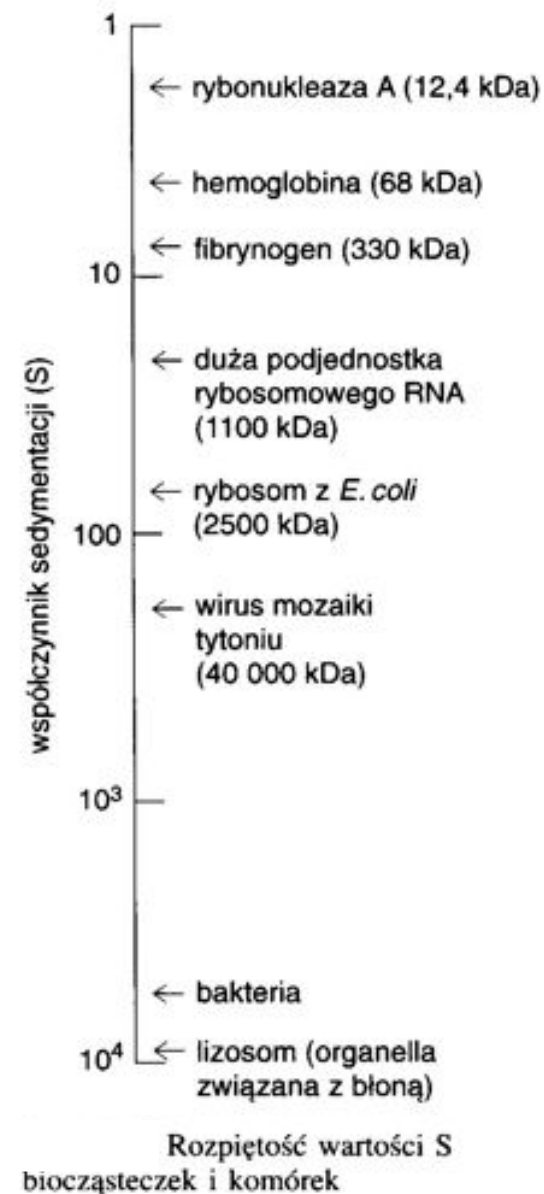


$$s = \frac{v}{\omega^2 r} = \frac{m(1 - \bar{v}\rho)}{f}$$

prędkość →  $v$   
masa cząstkowa →  $m$   
objętość →  $\bar{v}$   
gęstość →  $\rho$   
przyspieszenie odśrodkowe →  $\omega^2 r$   
współczynnik tarcia cząstki →  $f$

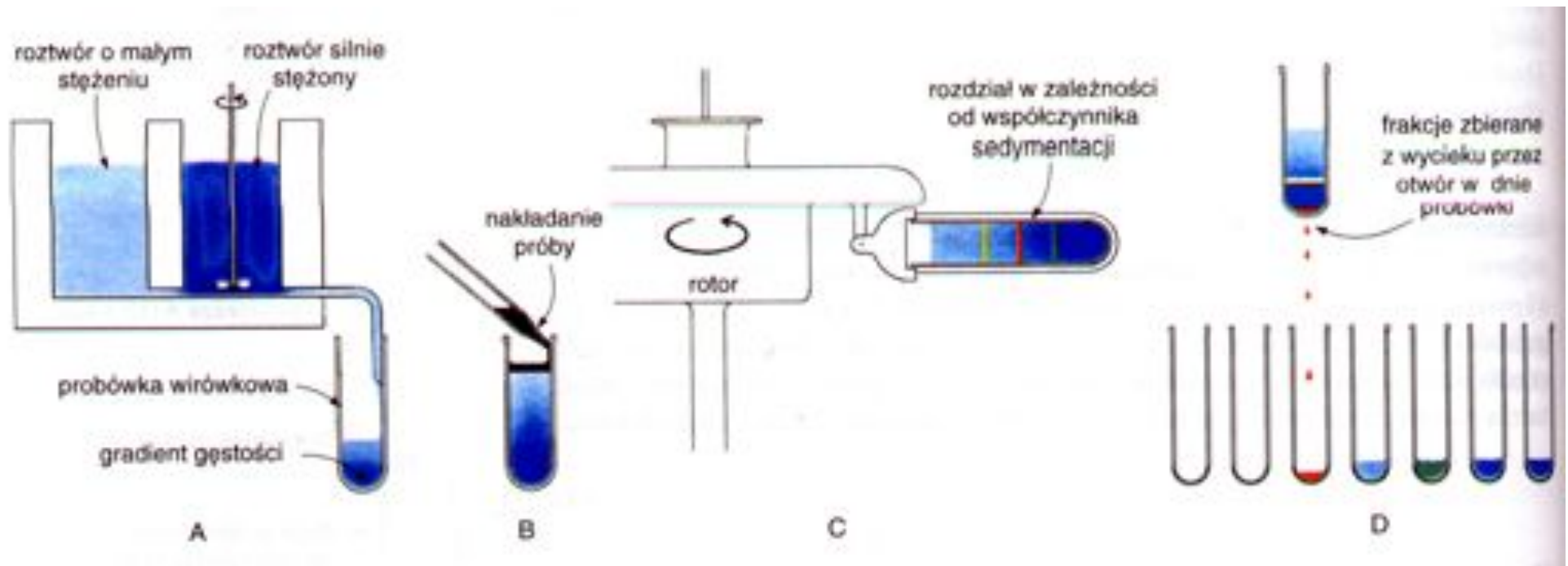
Prędkość sedymentacji zależy od:

- ciężaru makrocząsteczki
- kształtu makrocząsteczki
- gęstości makrocząsteczki
- gęstości roztworu



# Rozdzielanie białek o różnym współczynniku sedymentacji

## Wirowanie warstwowe (zonalne) - wirowanie w gradiencie gęstości



Ciężar cząsteczkowy makrocząsteczki można wyznaczyć bezpośrednio stosując technikę sedymentacji równowagowej

# Reakcje charakterystyczne białek

Odczyny barwne na aminokwasy i białka (analiza jakościowa)

## 1. Reakcja biuretowa Piotrowskiego

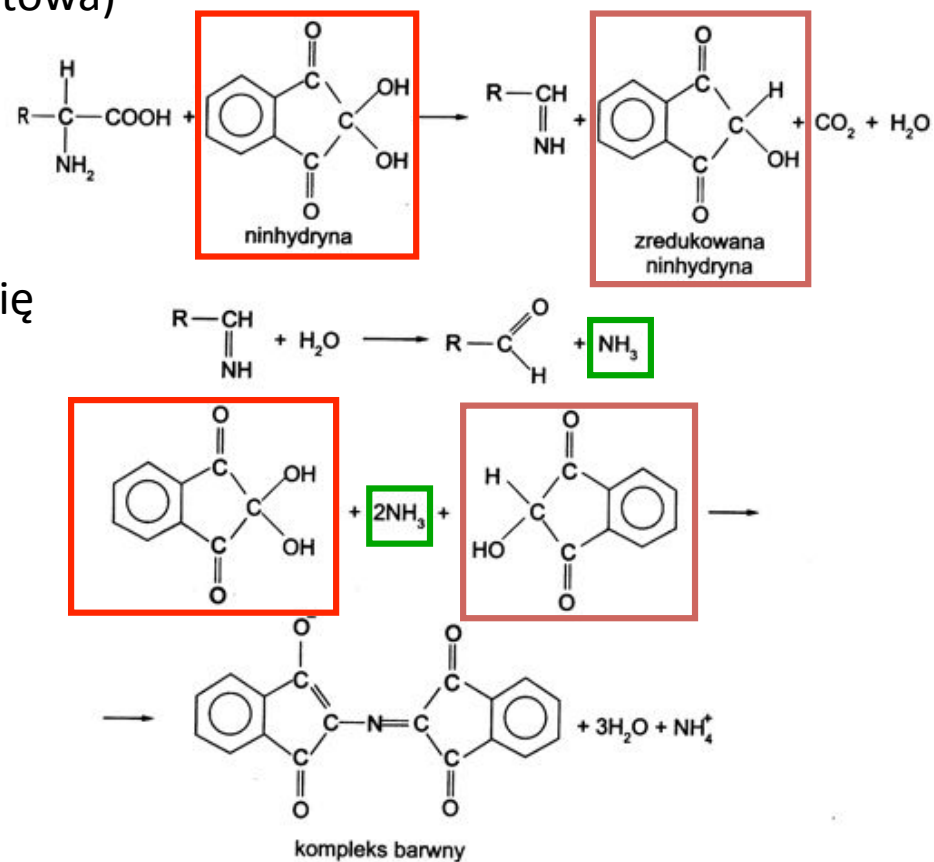
$\text{CuSO}_4 + \text{NaOH} + \text{białko}$       kompleks Cu z dwoma przyległymi wiązaniami peptydowymi (barwa fioletowa)

## 2. Reakcja ninhydrynowa

w wyniku reakcji z ninhydryną pojawia się fioletowoniebieskie zabarwienie

## 3. Reakcja z kwasem azotowym(III)

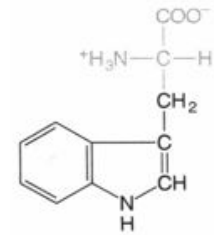
wydziela się azot cząsteczkowy pod wpływem  $\text{HNO}_3$



# Odczyny barwne na aminokwasy i białka (**analiza jakościowa**) reakcje charakterystyczne

## 4. Reakcja aldehydowa Adamkiewicza i Hopkinsa (tryptofan)

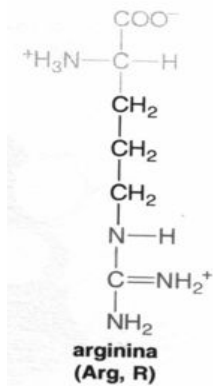
w środowisku kwaśnym pierścienie indolowe dwóch cząsteczek tryptofanu kondensują z aldehydem, dając barwne produkty



tryptofan  
(Trp, W)

## 5. Reakcja Sakaguchi na argininę

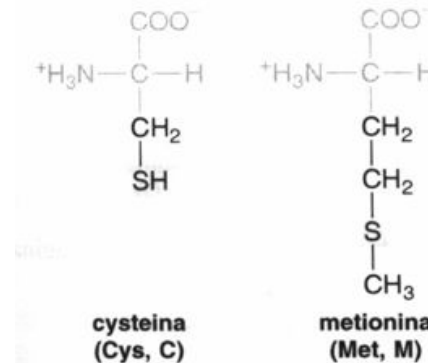
grupa guanidynowa argininy w zasadowym roztworze z  $\alpha$ -naftolem i NaBrO daje czerwony kompleks



arginina  
(Arg, R)

## 6. Reakcja cystynowa

Zawarta w cystynie i cysteinie siarka podczas hydrolizy ulega uwolnieniu w postaci jonów siarczkowych, które z kationami Pb<sup>2+</sup> dają czarny osad PbS.



cysteina  
(Cys, C)

metionina  
(Met, M)

## 7. Reakcja Libermann (glikoproteinowa)

pochodne furfuralowe powstające podczas hydrolizy kwasowej, w obecności fenoli uwalnianych w reakcji hydrolizy dają fioletowe zabarwienia



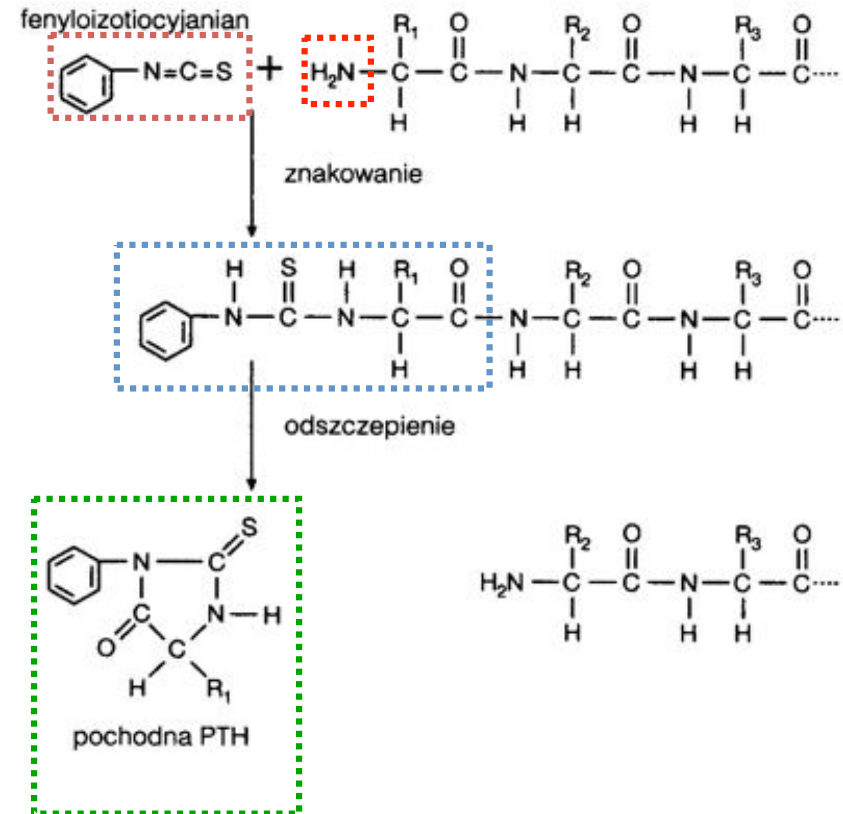
# Oznaczanie sekwencji aminokwasów w białkach

## Technika zautomatyzowanej degradacji Edmana

Polega na kolejnym odszczepianiu reszt aminokwasowych od końca aminowego peptydu.

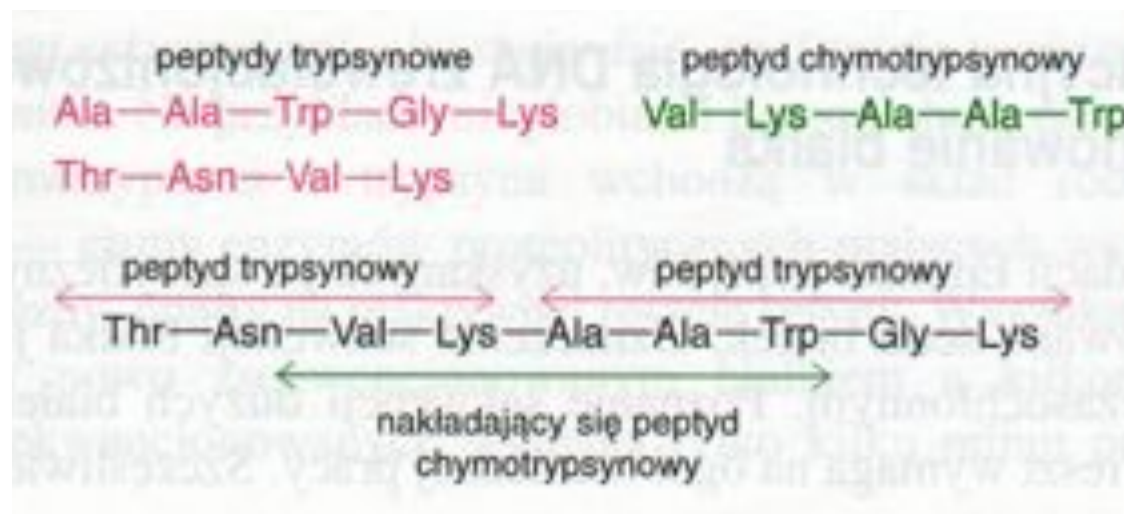
**Fenylizotiocyanian** reaguje z wolną **grupą aminową** peptydu tworząc pochodną **fenyltiokarbamoilową**, gdzie w środowisku lekko kwaśnym uwalnia się **odpowiednia cykliczna pochodna**.

**Sekwentery** - umożliwiają automatyczne oznaczanie kolejności aminokwasów, jeden cykl degradacji trwa mniej niż 2 godz., tą metodą można określić sekwencję aminokwasową białka złożonego z około 50 reszt.

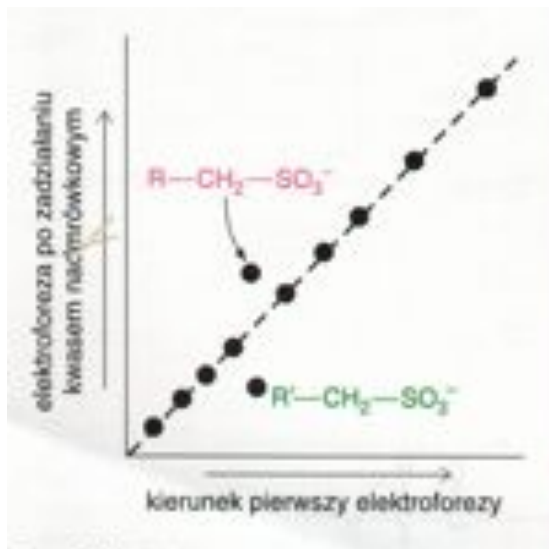
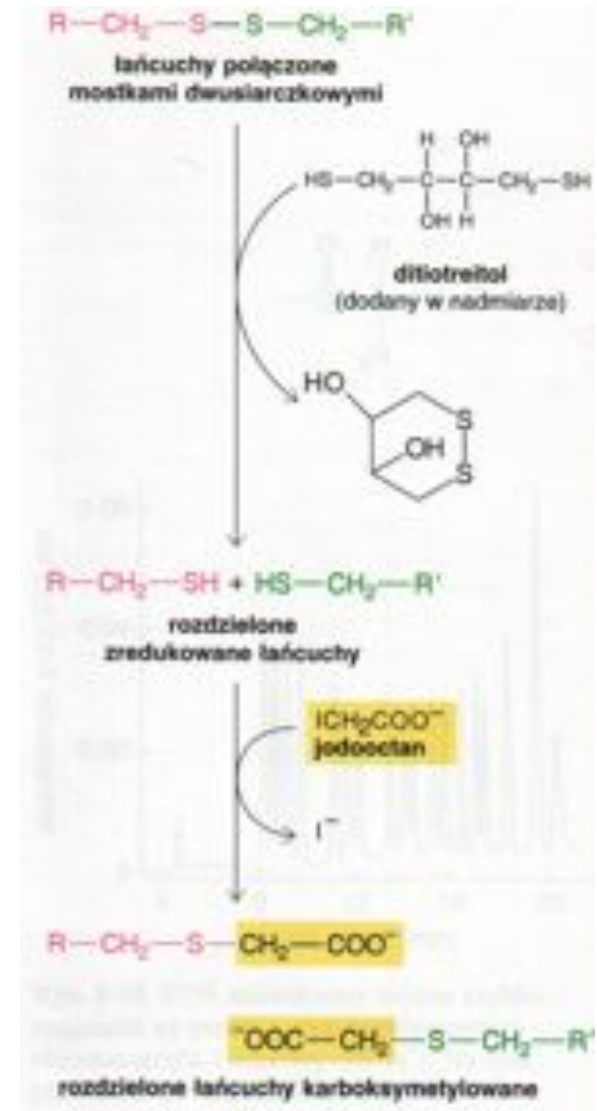


# Białka można specyficznie rozcinać na małe peptydy w celu ułatwienia sekwencjonowania

Peptydy otrzymane w wyniku specyficznego trawienia chemicznego lub enzymatycznego rozdziela się metodami chromatograficznymi. Następnie metodą Edmana oznacza się sekwencję każdego z oczyszczonych peptydów. Na tym etapie pracy poznajemy sekwencje aminokwasowe uzyskanych fragmentów białka, brakuje natomiast informacji o kolejności ułożenia tych fragmentów w całym łańcuchu polipeptydowym. Tę niezbędną dodatkową informację uzyskuje się na podstawie tak zwanych *nakładających się peptydów*.



W przypadku **białka złożonego** z dwu lub więcej łańcuchów, połączonych wiązaniami o charakterze niekowalencyjnym, stosuje się **czynniki denaturujące**, takie jak mocznik lub chlorowodorek guanidyny, które powodują dysocjację łańcuchów. Przed podjęciem właściwych prac sekwencyjnych rozdysocjowane łańcuchy należy oczywiście rozdzielić. Łańcuchy polipeptydowe, które są związane kowalencyjnie mostkami dwusiarczkowymi, trzeba najpierw rozdzielić przez **redukcję związkami tiolowymi**, takimi jak  $\beta$ -merkaptoetanol lub ditiotreitol.



**Polipeptydy połączone mostkami dwusiarczkowymi można rozdzielić przez następujące po sobie reakcje redukcji z ditiotreiolem i alkilacji**

# Rekombinacyjna technologia DNA zrewolucjonizowała sekwencjonowanie białka

Sekwencja czterech rodzajów zasad DNA: adeniny (A), tyminy (T), guaniny (G) i cytozyny (C) wyznacza bezpośrednio sekwencję aminokwasową białka kodowanego przez gen lub sekwencję odpowiedniej cząste-czki informacyjnego RNA.

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

Całkowita sekwencja nukleotydów HIV-1 (ludzkiego wirusa niedoboru odporności), powodującego AIDS, została oznaczona w rok po wyizolowaniu wirusa. Na rysunku przedstawiono fragment sekwencji DNA określonej przez genom RNA wirusa z odpowiadającą jej sekwencją aminokwasów

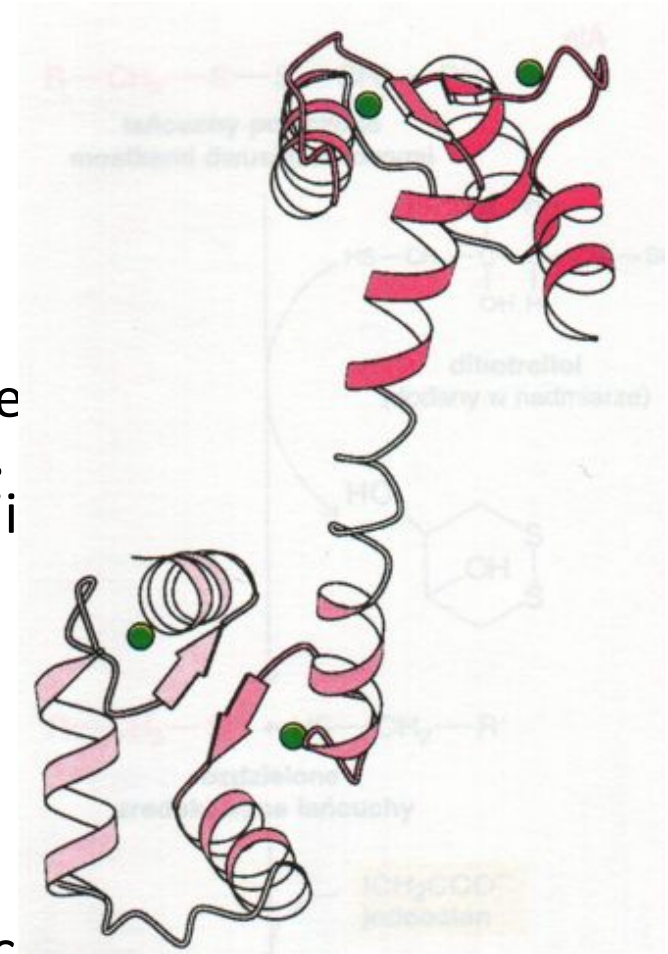
Sekwencja aminokwasowa określona na podstawie odczytu sekwencji DNA jest sekwencją białka *in statu nascendi*, bezpośredniego produktu maszyny translacyjnej rybosomów, która łączy aminokwasy w sekwencji określonej przez matrycę informacyjnego RNA. Jak już wcześniej wspomniano, wiele białek po zsyntetyzowaniu ulega modyfikacji.

Sekwencje aminokwasowe oznaczone na podstawie sekwencji DNA wnoszą dużo informacji, **ale nie ujawniają modyfikacji potranskrypcyjnych.**

***A zatem sekwencjonowanie DNA i chemiczna analiza białka są komplementarnymi technikami stosowanymi do badań strukturalnych podstaw funkcji białka.***

# Sekwencje aminokwasowe dostarczają różnego rodzaju informacji

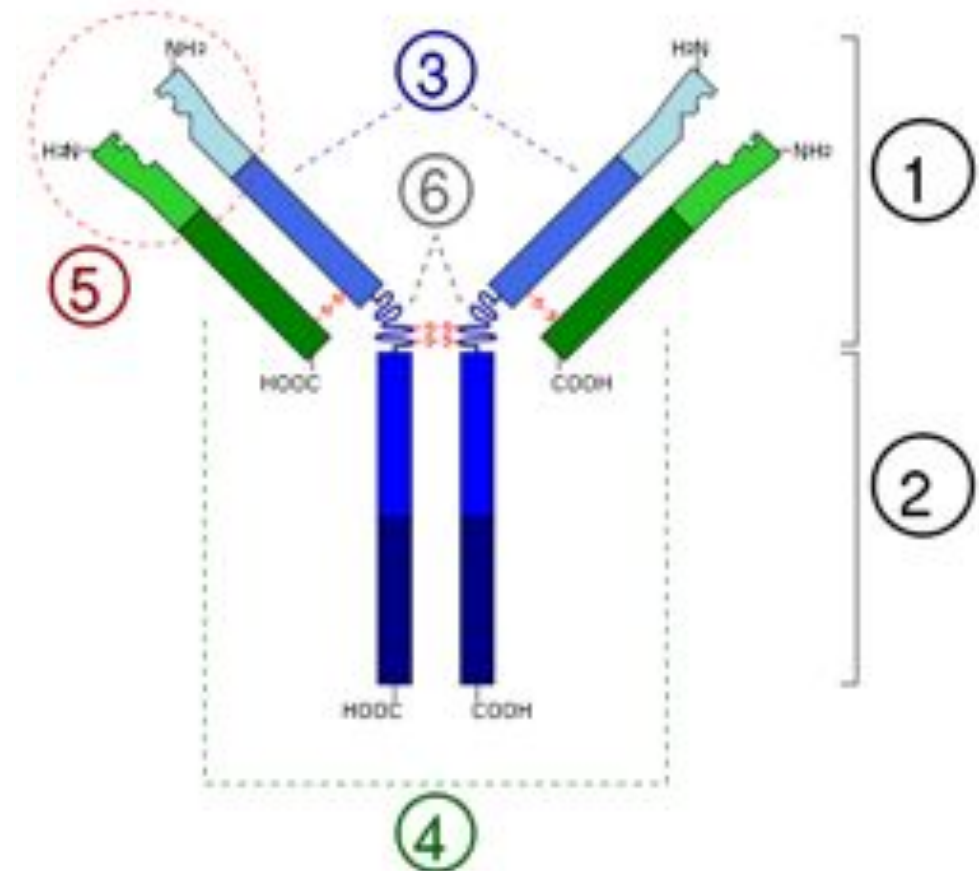
- *Sekwencje interesującego nas białka można porównać z wszystkimi innymi znanymi sekwencjami, aby stwierdzić, czy istnieją znamienne podobieństwa między nimi.* - Na przykład białko wirusowe, które wywołuje raka u gospodarza wirusa, okazało się niemal identyczne z normalnym komór-kowym czynnikiem wzrostu. To zaskakujące odkrycie wniosło wiele informacji zarówno na temat wirusów onkogennych, jak i normalnego cyklu komórkowego.
- *Porównanie sekwencji tych samych białek z różnych gatunków wnosi wiele informacji o szlakach ewolucyjnych*
- *W łańcuchach polipeptydowych można poszukiwać sekwencji wewnętrznie powtórzonych.*
- Na przykład kalmodulina, powszechny sensor wapnia u *Eukaryota*, zawiera cztery podobne moduły wiążące wapń, które powstały' wskutek duplikacji genu



Kalmodulina, sensor wapnia, zawiera podobne jednostki w jednym łańcuchu polipeptydowym. Te motywy wiążące wapń zaznaczono kolorem czerwonym, a związane jony wapnia — zielonym.

# Białka można lokalizować i oznaczać stosując wysoko swoiste przeciwciała

Oczyszczenie białka i oznaczenie jego sekwencji umożliwia zastosowanie metod immunologicznych. Przeciwciała (zwane również *immunoglobulinami*) mają swoiste powinowactwo do antygenów, które wywołują ich syntezę. Białka, poli-sacharydy i kwasy nukleinowe są efektywnymi antygenami. Produkcja przeciwciał może być również indukowana przez małe cząsteczki, takie jak syntetyczne peptydy, jeżeli są one przyłączone do makromolekularnych nośników.



Schemat budowy przeciwciał:

1. Fragment Fab
  2. Fragment Fc
  3. Łańcuch ciężki (zawiera VH, CH1, zawias, regiony CH2 i CH3: licząc od N-końca)
  4. Łańcuch lekki (zawiera regiony VL i CL: licząc od N-końca)
  5. Miejsce wiązania antygenu
  6. Regiony zawiasowe
- (\*) -S-S- oznacza mostki disiarczkowe

# WYKŁAD 3. Kataliza enzymatyczna