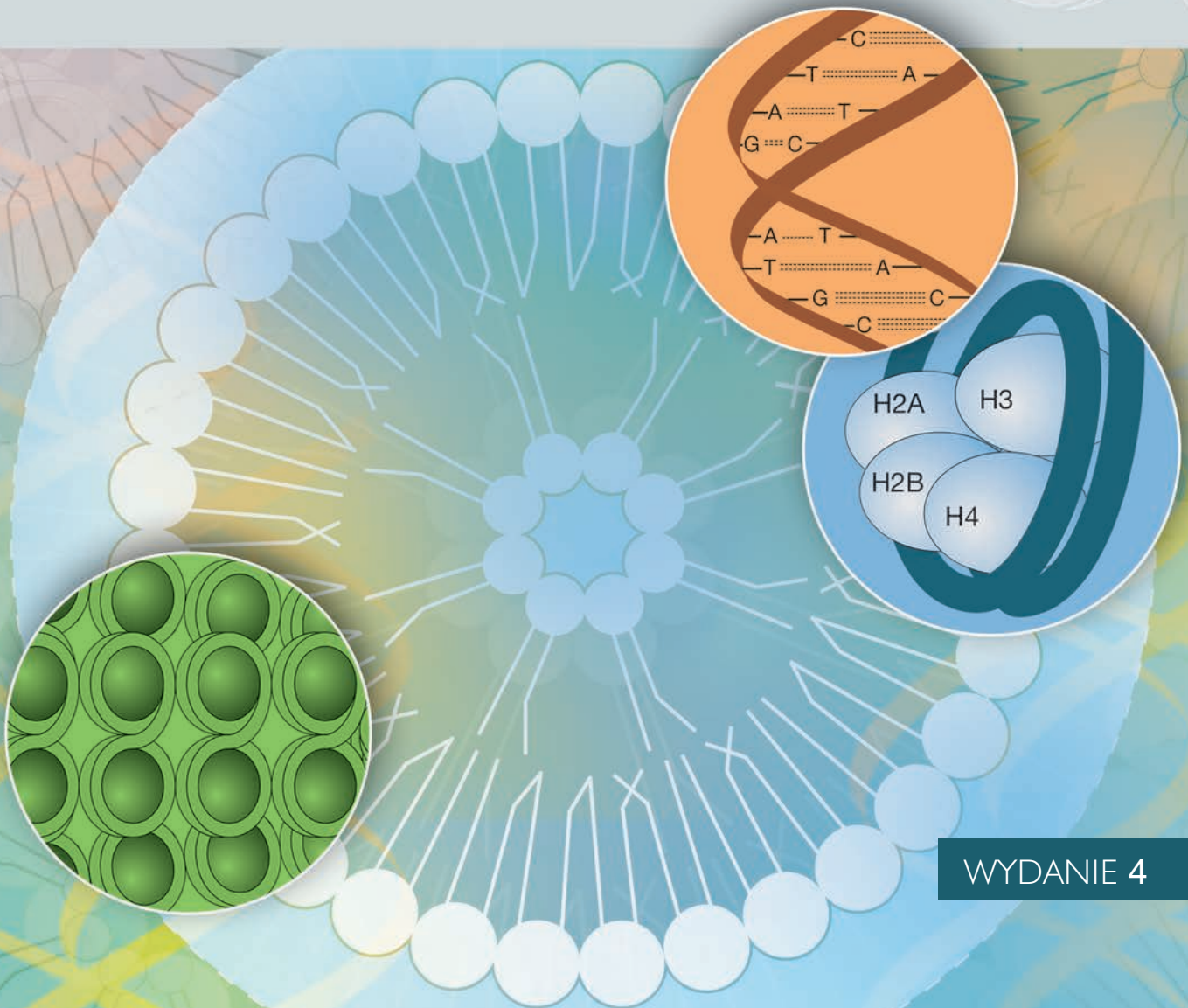


Edward BAŃKOWSKI

BIOCHEMIA



WYDANIE 4

Edward Bańkowski

Biochemia

Podręcznik dla studentów uczelni medycznych

Wydanie czwarte

Wszelkie prawa zastrzeżone, szczególnie prawo do przedruku i tłumaczenia na inne języki. Żadna z części tej książki nie może być w jakiegokolwiek formie publikowana bez uprzedniej pisemnej zgody Wydawnictwa. Dotyczy to również sporządzania fotokopii, mikrofilmów oraz przenoszenia danych do systemów komputerowych.

Ze względu na stały postęp w naukach medycznych lub odmienne nieraz opinie na temat leczenia, jak również możliwość wystąpienia błędu, prosimy, aby w trakcie podejmowania decyzji terapeutycznej uważnie oceniać zamieszczone w książce informacje. Pomoże to zmniejszyć ryzyko wystąpienia błędu lekarskiego.

© Copyright by Edra Urban & Partner, Wrocław 2020

Autor: prof. dr hab. n. med. Edward Bańkowski
Zakład Biochemii Lekarskiej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku

Prezes Zarządu: Giorgio Albonetti
Redaktor naczelny: lek. med. Edyta Błażejewska
Redaktor prowadzący: Renata Wręczycka
Komputerowe wykonanie rycin: Jolanta Mikiciuk
Skorowidz: Dominika Macuta
Projekt okładki: Beata Poźniak

ISBN 978-83-66548-05-3

Edra Urban & Partner
ul. Kościuszki 29, 50-011 Wrocław
tel. 71 7263835
biuro@edraurban.pl

www.edraurban.pl

Łamanie i przygotowanie do druku: Marta Radlak
Druk i oprawa: KDD, Konin

Słowo wstępne do wydania czwartego

Dogłębne poznanie struktury molekularnej organizmu żywego i procesów metabolicznych w nim zachodzących jest fundamentem współczesnej wiedzy medycznej. Tylko na jej podstawie można poznać i zrozumieć współczesną fizjologię, genetykę, farmakologię, mikrobiologię, czy diagnostykę laboratoryjną. Znajomość biochemii jest niezbędna do zrozumienia istoty procesów patologicznych, dogłębnej diagnostyki stanu chorobowego i poznania mechanizmu działania leków. Niniejszy podręcznik jest czwartym wydaniem dzieła o tym samym tytule, różni się jednak wieloma szczegółami od jego pierwotnej wersji. W książce podkreślona została różnorodność i złożoność związków bioorganicznych. Opisano zdolność organizmów żywych do samoodtwarzania się w identycznej formie przez tysiące pokoleń, zwrócono uwagę na bardzo precyzyjne mechanizmy regulacji metabolizmu.

Zwięźle potraktowane zostały rozdziały poświęcone strukturze, właściwościom, metabolizmowi i funkcjonowaniu kwasów nukleinowych, zakładając iż liczne elementy tej wiedzy są przekazywane studentom w trakcie nauczania innych dyscyplin biomedycznych, jak biologia, genetyka, histologia z cytofizjologią, mikrobiologia, onkologia czy medycyna sądowa.

Postęp w zakresie biochemii białek i kwasów nukleinowych otworzył drogę rozwojowi biologii molekularnej oraz wyrastających z jej korzeni inżynierii genetycznej i biotechnologii. Umożliwił dogłębną diagnostykę procesów choro-

bowych na poziomie molekularnym, stworzył warunki do uzyskiwania wielu leków metodami biotechnologicznymi i stworzył szansę rozwoju terapii genowej, polegającej na naprawie aparatu genetycznego komórki. Gruntowna i stale pogłębiania znajomość struktury molekularnej organizmu oraz procesów metabolicznych i ich regulacji w znakomitym stopniu ułatwi przyswajanie coraz to nowych elementów wiedzy biomedycznej.

Akademicki podręcznik biochemii to cenne źródło wiedzy. Z oczywistych względów jego objętość nie nadąza proporcjonalnie do lawinowo rosnącego napływu informacji. Autor staje przed koniecznością wyboru pewnych elementów tej wiedzy kosztem rezygnacji z prezentowania innych.

Moim zamiarem było napisanie zwięzłego podręcznika biochemii, adresowanego przede wszystkim do studentów uczelni medycznych. Specyfika tych studiów nakazuje skoncentrowanie się na tematyce bezpośrednio związanej z budową i funkcjonowaniem organizmu ludzkiego oraz mechanizmem procesu chorobowego, jego diagnostyką i leczeniem.

Wyrażam nadzieję, iż tak zmodyfikowany i unowocześniony podręcznik będzie dobrze służył studentom.

Edward Bańkowski
Białystok, styczeń 2020 r.

Spis treści

Słowo wstępne do wydania czwartego VII

Wykaz skrótów IX

Spis treści XI

1. Właściwości materii żywej 1
2. Aminokwasy 3
3. Peptydy 13
4. Białka 18
5. Enzymy i metabolizm 37
6. Wytwarzanie energii w komórce 65
7. Budowa i właściwości cukrów prostych 85
8. Glikoliza i metabolizm pirogronianu 91
9. Cykl kwasów trikarboksylowych 103
10. Glukoneogeneza 110
11. Metabolizm monosacharydów i disacharydów. Hydroliza skrobi 117
12. Metabolizm glikogenu 133
13. Szlak pentozofosforanowy 142
14. Metabolizm kwasów tłuszczowych i acylogliceroli 149
15. Ketogeneza 171
16. Metabolizm fosfolipidów i sfingolipidów 176
17. Metabolizm steroidów 189
18. Lipoproteiny osocza 197
19. Metabolizm aminokwasów 204
20. Metabolizm etanolu 245
21. Specyfika metabolizmu energetycznego różnych narządów 250
22. Barwniki porfiryne 257
23. Nukleotydy 265
24. Kwasy nukleinowe 285
25. Synteza i posttranslacyjna modyfikacja białka 313
26. Ekspresja genów 330
27. Genom ludzki 337

- 28.** Witaminy 345
- 29.** Składniki mineralne 363
- 30.** Hormony 370
- 31.** Cytokiny 398
- 32.** Eikozanoidy 402
- 33.** Transport przez błony biologiczne 409
- 34.** Metabolizm ksenobiotyków 436
- 35.** Integracja i regulacja metabolizmu 442
- 36.** Macierz pozakomórkowa 453
- 37.** Biochemia krwi – wybrane zagadnienia 468

Indeks 493

Właściwości materii żywej

Organizmy żywe są zbudowane z pierwiastków występujących w ich martwym otoczeniu. Podlegają wszystkim prawom fizyki i chemii odnoszącym się do wszelkich zbiorów materii. Pomimo to odznaczają się właściwościami, jakich nie wykazują żadne zbiory materii nieożywionej.

1. Organizmy żywe wykazują wielką złożoność i wysoki stopień organizacji. W przeciwieństwie do materii nieożywionej, która składa się zazwyczaj z przypadkowych mieszanin prostych związków chemicznych, organizmy żywe wykazują skomplikowaną strukturę wewnętrzną, obejmującą wiele rodzajów bardzo złożonych cząsteczek oraz ogromne zróżnicowanie gatunkowe.
2. Skład pierwiastkowy żywych organizmów jest jakościowo różny od składu ich środowiska fizycznego. Spośród 92 naturalnych pierwiastków występujących w przyrodzie jedynie 16 uczestniczy w budowie wszystkich żywych organizmów. Są to: O, C, N, H, P, S, Na, K, Mg, Ca, Cl, Mn, Fe, Co, Cu i Zn. Oznacza to, iż tylko niektóre z pierwiastków są przydatne w tworzeniu biomaterii.
3. W skorupie ziemskiej najobficiej występującymi pierwiastkami są: O, Si, Al i Na, natomiast w organizmach żywych są to: H, O, C i N. Stanowią one łącznie około 99% masy komórek. Te cztery pierwiastki tworzą niezwykle złożone elementy strukturalne biomaterii. Zawdzięczają tę zdolność łatwości w wytwarzaniu ze sobą wiązań kowalencyjnych, polegających na wspólnym użytkowaniu par elektronów. Spośród pierwiastków zdolnych do wytwarzania takich wiązań wymienione cztery cechują się najniższą masą atomową. Zapewnia to wysoką trwałość wspomnianych wiązań.

Większość składników żywych organizmów stanowią związki organiczne, w których węgiel znajduje się na dość wysokim stopniu zredukowania (uwodorowania). Wiele biomolekuł organicznych zawiera także azot. Te dwa pierwiastki występują w atmosferze i w skorupie ziemskiej jedynie w postaci wolnej lub w postaci prostych związków nieorganicznych, jako O_2 , CO_2 , N_2 , węglany i azotany.

4. Na szczególną uwagę zasługuje to, iż około 65–70% masy organizmów żywych stanowi woda. Jest ona głównym nośnikiem tej ogromnej ilości tlenu i wodoru. Woda jest płynem o szczególnych właściwościach fizykochemicznych. W porównaniu z innymi cieczami cechuje się wysokim ciepłem właściwym, ciepłem parowania, ciepłem topnienia, wysokim napięciem powierzchniowym, wysoką stałą dielektryczną oraz zdolnością do wytwarzania wiązań wodorowych pomiędzy jej poszczególnymi cząsteczkami.
5. W odróżnieniu od materii nieożywionej każdy składnik organizmu żywego pełni określoną funkcję, a niektóre pełnią po kilka różnych funkcji. Na przykład aminokwasy są jednostkami strukturalnymi białek, ale służą także jako substraty do biosyntezy hormonów, barwników, koenzymów, zasad purynowych i pirymidynowych, a ich szkielety węglowodorowe są wykorzystywane jako substraty energetyczne.
6. Zwraca uwagę wielka różnorodność i złożoność związków organicznych. Nawet jednokomórkowe organizmy bakteryjne zawierają po kilka tysięcy różnych biomolekuł. Ich liczba rośnie wraz ze stopniem złożoności organizmów. Liczbę różnych białek w organizmie ocenia się na około 3000 u bakterii do ponad 5 000 000 u człowieka. Większość z nich występuje w ogromnej liczbie cząsteczek.
7. Organizmy każdego gatunku mają własny, charakterystyczny dla siebie zestaw białek i kwasów nukleinowych. Żadna z cząsteczek białkowych czy cząsteczek kwasów nukleinowych jednego gatunku nie jest identyczna z odpowiednimi cząsteczkami innego gatunku, nawet jeżeli niektóre z nich pełnią podobne funkcje. Należy podkreślić, że ta ogromna i zróżnicowana liczba makromolekuł powstaje z prostych elementów składowych, identycznych u wszystkich organizmów żywych. Wszystkie białka, niezależnie od ich pochodzenia gatunkowego, są zbudowane z tych samych 20 podstawowych aminokwasów. Liczba

elementów składowych, budujących kwasy nukleinowe, jest jeszcze mniejsza. Składają się one z 4 rybonukleotydów lub z 4 deoksyrybonukleotydów, identycznych u wszystkich organizmów, niezależnie od ich przynależności gatunkowej.

8. Żywe organizmy pobierają i przekształcają energię z otaczającego je środowiska i wykorzystują ją do budowy własnych skomplikowanych struktur z prostych substratów wyjściowych. Materia nieożywiona także pochłania energię z zewnątrz (np. ciepło lub światło), lecz pociąga to za sobą efekt przeciwny, prowadzi do zmniejszenia stopnia jej uporządkowania.
9. Żywa komórka jest układem izotermicznym. Wszystkie jej części składowe wykazują tę samą temperaturę. Z tego powodu nie jest ona zdolna do wykorzystywania energii cieplnej. Ciepło bowiem może być przetworzone na pracę pod stałym ciśnieniem tylko wówczas, gdy przechodzi ze strefy o wyższej temperaturze do strefy o niższej temperaturze. Organizmy autotroficzne przyswajają energię świetlną, a organizmy heterotroficzne przyswajają energię pochodzącą z utleniania zredukowanych substratów energetycznych. W obydwu przypadkach energia pochodząca ze środowiska jest przetwarzana w energię chemiczną, której podstawowym nośnikiem jest adenozyntrifosforan (ATP). Tylko ta forma energii jest użyteczna w procesach biosyntezy składników komórek i macierzy pozakomórkowej, w transporcie metabolitów przez błony biologiczne, w przekazywaniu sygnałów regulacyjnych lub może być zamieniona na pracę mechaniczną. Procesy bioenergetyczne cechują się wysoką sprawnością. Około 40% energii wytwarzanej w wyniku utleniania różnych

substratów magazynuje się w postaci ATP. Pozostała część rozprasza się w postaci ciepła.

10. W komórce zachodzi jednocześnie, z wysoką wydajnością, ogromna liczba reakcji chemicznych. Szybki ich przebieg i wysoka wydajność, bez produktów ubocznych, jest możliwa dzięki enzymom – biokatalizatorom – wyspecjalizowanym w nadawaniu kierunku i przyspieszaniu przebiegu określonych reakcji. Umożliwiają one powstawanie różnych związków z tych samych substratów. Synteza cząsteczki białka zawierającego od 100 do 1000 aminokwasów trwa zaledwie kilka sekund.
11. Przebieg procesów chemicznych zachodzących w komórce podlega precyzyjnej regulacji. Następuje to na drodze mechanizmów autoregulacyjnych, funkcjonujących w każdej komórce, jak również przez impulsy nerwowe oraz przez cząsteczki regulacyjne pochodzące z innych komórek, jak: neuroprzekazniki, hormony lub cytokiny.
12. Najbardziej zadziwiającą właściwością żywych organizmów jest ich zdolność do precyzyjnego samoodtworzenia się przez setki i tysiące pokoleń. Ogromna ilość informacji genetycznych, przekazywanych z pokolenia na pokolenia, jest zaszyfrowana w znikomej ilości kwasu deoksyrybonukleinowego, w postaci sekwencji nukleotydowej, charakterystycznej dla każdego gatunku. Żadne zbiory materii nieożywionej nie przejawiają jakichkolwiek tendencji do samoodtworzenia się w identycznych formach.

Ta specyfika składu, budowy i funkcjonowania biomaterii jest przedmiotem zainteresowania biochemii. Tym zagadnieniem są poświęcone kolejne rozdziały niniejszego podręcznika.

2

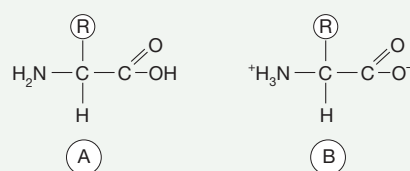
Aminokwasy

- 2.1. Aminokwasy powszechnie występujące w białkach, 4
 - 2.1.1. Aminokwasy z łańcuchami niepolarnymi, 4
 - 2.1.2. Aminokwasy z łańcuchami polarnymi bez ładunku, 4
 - 2.1.3. Aminokwasy z łańcuchami kwasowymi, 5
 - 2.1.4. Aminokwasy z łańcuchami zasadowymi, 6
- 2.2. Inne aminokwasy występujące w białkach, 6
- 2.3. Symbolika aminokwasów, 8
- 2.4. Właściwości optyczne aminokwasów, 8
- 2.5. Właściwości amfoteryczne aminokwasów, 9
 - 2.5.1. Równanie Hendersona-Hasselbalcha, 9
 - 2.5.2. Krzywa miareczkowania alaniny, 10
 - 2.5.3. Krzywa miareczkowania histydyny, 10
- 2.6. Biologiczne znaczenie aminokwasów, 12

Aminokwasy są pochodnymi kwasów organicznych, w których co najmniej jeden z atomów wodoru jest zastąpiony grupą aminową. Należą do najwcześniej i najlepiej poznanych składników organizmów żywych. Występują powszechnie w organizmach żywych, zarówno w postaci wolnej, jak i związanej w peptydach i białkach.

Każdy z aminokwasów występujących w białkach (z wyjątkiem proliny i hydroksyproliny) ma grupę aminową przy węglu α i łańcuch boczny (R) o różnej budowie, połączony z tym samym atomem węgla.

W fizjologicznym pH (około 7,4) większość grup karboksylowych jest zdysocjowana, tworzy anion $-\text{COO}^-$, a większość grup aminowych wiąże H^+ , tworząc kation $-\text{NH}_3^+$. Dominującą formą aminokwasu jest więc jon obojnaczy, będący nośnikiem dwóch przeciwstawnych ładunków elektrycznych. Dlatego do celów dydaktycznych przyjęto, jako regułę, zapisywanie wzorów strukturalnych aminokwasów z grupą aminową w postaci kationowej $[-\text{NH}_3^+]$ i grupą karboksylową w postaci anionowej $[-\text{COO}^-]$ (ryc. 2.1).



Ryc. 2.1. Ogólny wzór aminokwasu. **A.** W postaci wolnej od ładunku elektrycznego. **B.** W postaci jonu obojnaczego. Węgiel α wiąże 4 różne podstawniki: atom H, grupę $\text{NH}_2/\text{NH}_3^+$, grupę COOH/COO^- i łańcuch boczny oznaczony symbolem R.

Opisano ponad 300 różnych aminokwasów, ale jedynie 20 z nich występuje powszechnie w białkach, a 2 dodatkowe (niedawno odkryte) spotyka się tylko w niektórych białkach. Obecność i umiejscowienie tych 22 aminokwasów w strukturze cząsteczek białkowych są zdeterminowane genetycznie. Kilka innych aminokwasów pojawia się w białku w wyniku

postranslacyjnej modyfikacji reszt aminokwasowych wcześniej wbudowanych do łańcucha białkowego. Ich obecność i umiejscowienie w cząsteczce białka nie są zdeterminowane przez aparat genetyczny. Pozostałe aminokwasy występują w postaci wolnej lub w połączeniach niebiałkowych.

2.1. Aminokwasy powszechnie występujące w białkach

Struktura łańcucha bocznego decyduje o roli aminokwasu w białku. Z tego względu użyteczny jest podział aminokwasów powszechnie występujących w białkach na kilka grup, zależnie od charakteru ich łańcuchów bocznych.

2.1.1. Aminokwasy z łańcuchami niepolarnymi

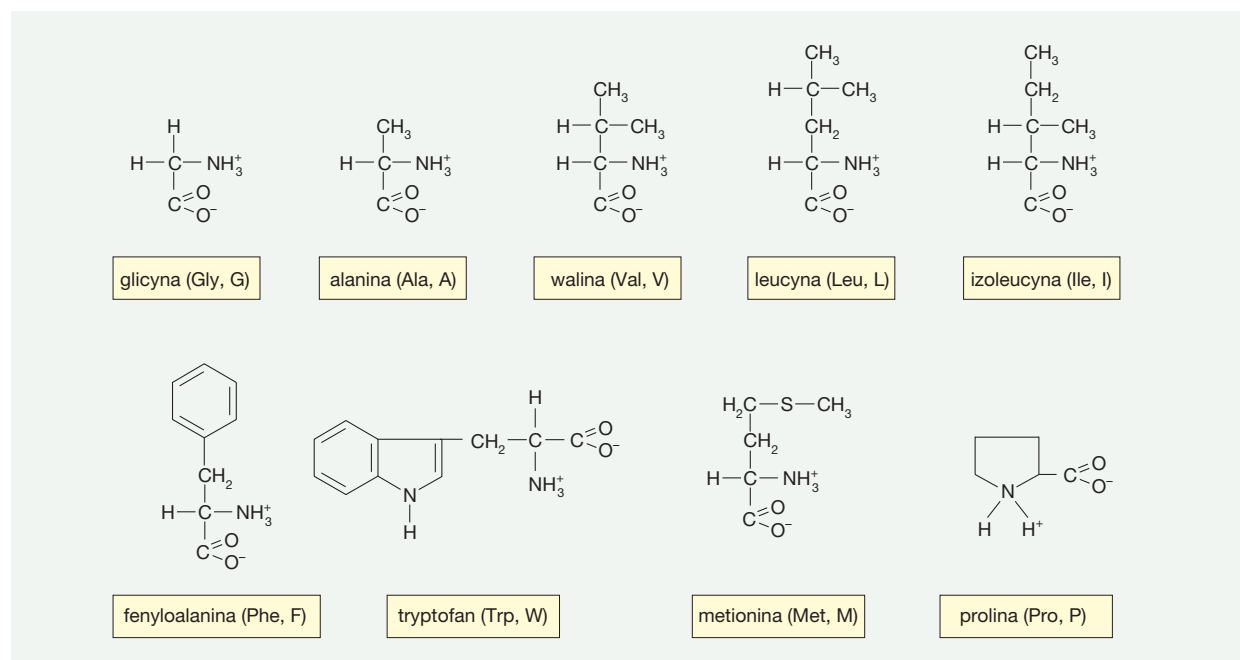
Do tej grupy aminokwasów należą: alanina, walina, leucyna, izoleucyna, fenyloalanina, tryptofan, metionina i prolina – nietypowy aminokwas, który nie posiada grupy α -aminowej, lecz grupę iminową wbudowaną w strukturę pierścienia piroolidynowego. Również glicyna jest zaliczana do tej samej grupy, chociaż aminokwas ten nie ma łańcucha bocznego, a jego miejsce zajmuje atom wodoru (ryc. 2.2).

Aminokwasy tej grupy zawierają łańcuchy boczne bez grup funkcyjnych. Łańcuchy te nie oddają ani nie przyłączają protonów oraz nie uczestniczą w tworzeniu wiązań jonowych ani wodorowych. Są hydrofobowe; nie wiążą wody.

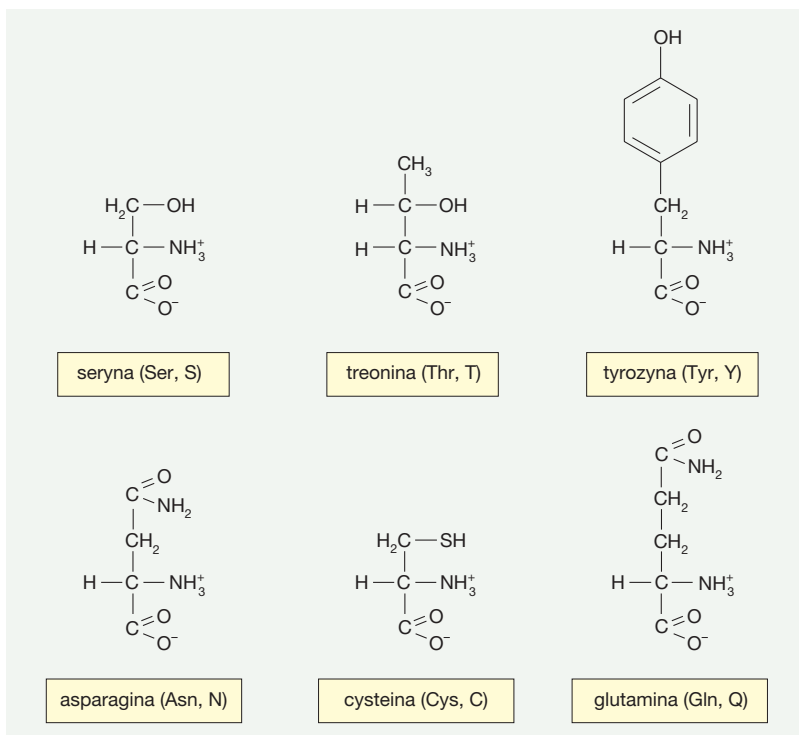
Hydrofobowy charakter łańcuchów bocznych aminokwasów niepolarnych, wbudowanych do białka, ujawnia się w środowisku wodnym. Łańcuchy te unikają kontaktu z wodą, przylegają nawzajem do siebie, kierując się do wnętrza cząsteczki białkowej. W środowisku wodnym zachowują się jak kropelki oleju, które łączą się ze sobą w większe krople, zmniejszając sumaryczną powierzchnię ich kontaktu z wodą. Niepolarne grupy R wypełniają wnętrze sfałdowanej cząsteczki białkowej, tworzą między sobą wiązania hydrofobowe, co pozwala białku na stabilizację jego struktury przestrzennej. Natomiast w środowisku lipidowym, np. w błonach biologicznych, hydrofobowe łańcuchy boczne aminokwasów niepolarnych kierują się na powierzchnię cząsteczki białka, wchodząc w reakcję z hydrofobowymi lipidami.

2.1.2. Aminokwasy z łańcuchami polarnymi bez ładunku

Do tej grupy aminokwasów należą: seryna, treonina, tyrozyna, cysteina, asparagina i glutamina (ryc. 2.3). Grupy $-OH$ i $-SH$ oraz związana amidowo grupa $-NH_2$ cechują się niesymetrycznym (biegunowym, czyli polarnym) rozmieszczeniem ładunków elektrycznych, jednak w fizjologicznym pH nie dysocjują i wykazują zerowy ładunek elektryczny. Grupa



Ryc. 2.2. Aminokwasy z łańcuchami niepolarnymi.



Ryc. 2.3. Aminokwasy z łańcuchami polarnymi bez ładunku.

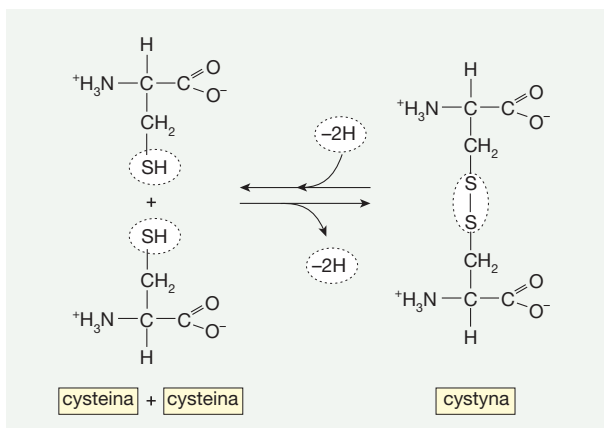
–NH₂, związana amidowo w asparaginie i glutaminie, nie wiąże protonu. W fizjologicznym przedziale pH nie jest więc nośnikiem ładunku elektrycznego.

Grupy –OH reszt seryny, treoniny i tyrozyny (wbudowanych do białka) mogą być miejscem wiązania fosforanu. Mogą także uczestniczyć w tworzeniu wiązań wodorowych.

Grupy –SH zawarte w łańcuchach bocznych cysteiny są ważnym elementem składowym miejsc aktywnych wielu

enzymów. Dwie cząsteczki lub dwie reszty cysteiny mogą reagować ze sobą. Czynniki utleniające odłączają atomy wodoru od dwóch grup –SH, a atomy siarki wytwarzają między sobą wiązanie kowalencyjne, zwane mostkiem disiarczkowym lub disulfidowym. Z dwóch cząsteczek cysteiny powstaje jedna cząsteczka cystyny (ryc. 2.4). Mostki disiarczkowe powstają także pomiędzy resztami cysteiny wbudowanymi do peptydów i białek. Uczestniczą one w stabilizacji struktury przestrzennej białek.

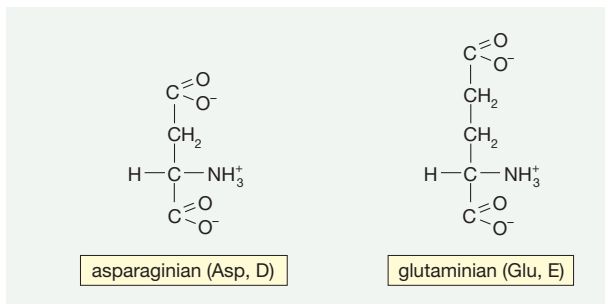
Łańcuch boczny seryny jest ważnym składnikiem miejsc aktywnych wielu enzymów. Grupa amidowa asparaginy oraz grupy hydroksylowe seryny i treoniny mogą być miejscem wiązania składników cukrowych.



Ryc. 2.4. Powstawanie cystyny z dwóch cząsteczek cysteiny poprzez wytworzenie mostka disiarczkowego.

2.1.3. Aminokwasy z łańcuchami kwasowymi

Tylko dwa aminokwasy należą do tej grupy. Są to kwas asparaginowy i kwas glutaminowy (ryc. 2.5). Łańcuchy boczne tych aminokwasów zawierają grupy karboksylowe. W obojętnym pH ulegają one pełnej dysocjacji i stają się nośnikami ładunku ujemnego [–COO⁻]. Z tego powodu zasadne jest używanie nazwy asparaginian – na określenie kwasu asparaginowego i glutaminian – na określenie kwasu glutaminowego. Choć te pierwsze nazwy są poprawne, to na ogół używa się tych drugich, ponieważ wnoszą one istotne informacje o tych amino-



Ryc. 2.5. Aminokwasy z łańcuchami kwasowymi.

kwasach. Wskazują, iż w środowisku o fizjologicznej wartości pH są one anionami: asparaginianowym i glutaminianowym.

2.1.4. Aminokwasy z łańcuchami zasadowymi

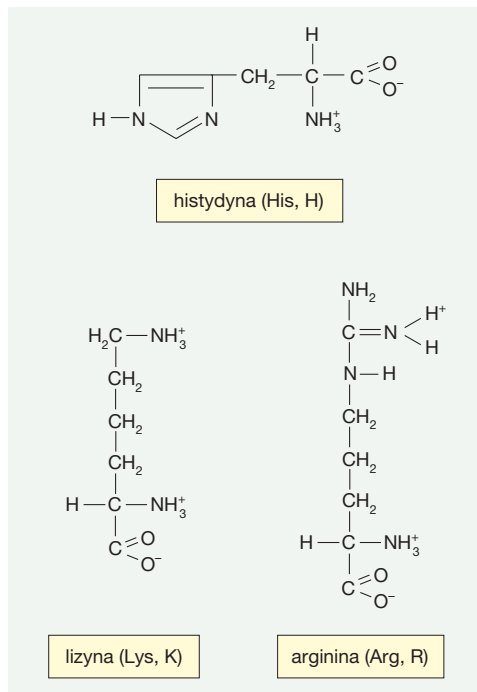
Do tej grupy aminokwasów należą: lizyna, arginina i histydyna (ryc. 2.6). Ich łańcuchy boczne zawierają grupy wiążące protony. Są to: grupa ε-aminowa lizyny, grupa guanidynowa argininy i pierścień imidazolowy histydyny. W fizjologicznych warunkach pH łańcuchy boczne lizyny i argininy są naładowane dodatnio. W przeciwieństwie do nich, łańcuch boczny histydyny ma słabe właściwości zasadowe. W fizjologicznych warunkach pH większość tych łańcuchów nie jest naładowana. Jednak w sytuacji, gdy histydyna wbuduje się do białka, jej pierścień imidazolowy ładuje się dodatnio lub pozostaje elektrycznie obojętny. Zależy to od środowiska jonowego, w którym znajduje się białko.

2.2. Inne aminokwasy występujące w białkach

Selenocysteina i pirololizyna to niedawno odkryte aminokwasy, wbudowywane do białek w trakcie ich syntezy. Występują tylko w nielicznych białkach.

Selenocysteina zawiera selen. Jest podobna do seryny i cysteiny. Zamiast grupy -OH (występującej w serynie) lub grupy -SH (występującej w cysteinie) zawiera grupę -SeH przy węglu β (ryc. 2.7 A).

Pirololizyna jest pochodną lizyny, której grupa ε-amino-wa wytwarza wiązanie amidowe z 2-karboksy-3-metylo-3,4-dihydropirolem (ryc. 2.7 A).



Ryc. 2.6. Aminokwasy z łańcuchami zasadowymi.

Hydroksyprolina, hydroksylizyna i γ-karboksyglutaminian to aminokwasy występujące tylko w niektórych białkach. W odróżnieniu od poprzednich nie są one wbudowywane do białek w trakcie ich syntezy, lecz powstają w procesie posttranslacyjnej modyfikacji reszt: proliny, lizyny i glutaminianu, zawartych w prekursorowych postaciach niżej wymienionych białek.

Hydroksyprolina występuje niemal wyłącznie w kolagenie i elastynie, natomiast hydroksylizyna tylko w kolagenie. Biorąc pod uwagę to, iż kolagen stanowi ponad 30% białek zwierzęcych, zawartość hydroksyproliny i hydroksylizyny w organizmie jest dość wysoka. Trzeci z kolei – γ-karboksyglutaminian – występuje w białkach osoczowych uczestniczących w procesie krzepnięcia krwi (ryc. 2.7 B). Mechanizm powstawania tych aminokwasów opisano w rozdz. 25.3.

W organizmie ludzkim występuje kilka aminokwasów, które nie są składnikami białek, a pełnią bardzo istotne funkcje biologiczne. Należą do nich przede wszystkim: β-alanina (składnik koenzymu A, produkt rozpadu pirymidyn), ornityna i cytrulina (metabolity cyklu mocznikowego), γ-aminomasłan (przekaznik sygnałów w układzie nerwowym) oraz homocysteina (metabolit aminokwasów siarkowych). W komórkach roślinnych występuje homoseryna – prekursor metioniny (ryc. 2.8).

2.3. Symbolika aminokwasów

Każdemu aminokwasowi występującemu w białkach przypisano symbole: trójliterowy i jednoliterowy. Symbole trójliterowe to najczęściej pierwsze trzy litery nazwy anglojęzycznej poszczególnych aminokwasów.

Kod jednoliterowy kieruje się następującymi zasadami.

Symbolem jest pierwsza litera nazwy anglojęzycznej aminokwasu, jeżeli tylko jedna nazwa rozpoczyna się od tej litery:

cysteina	– Cys	– C
histydyna	– His	– H
izoleucyna	– Ile	– I
metionina	– Met	– M
seryna	– Ser	– S
walina	– Val	– V

Jeżeli więcej niż jedna nazwa aminokwasu rozpoczyna się od danej litery, wówczas pierwszą literę nazwy przypisuje się aminokwasowi najczęściej występującemu. Na przykład alanina występuje częściej niż arginina, dlatego przypisano jej symbol A. To samo uczyniono wobec kilku innych aminokwasów: glicyny (G), leucyny (L), proliny (P) i treoniny (T). Wszystkie one noszą symbole jednoliterowe, tożsame z pierwszą literą ich nazwy:

alanina	– Ala	– A
glicyna	– Gly	– G
leucyna	– Leu	– L
prolina	– Pro	– P
treonina	– Thr	– T

Pozostałym aminokwasom przypisano inne symbole literowe, odpowiadające literom lub dźwiękom fonetycznym zawartym w ich nazwach anglojęzycznych. Jedynie lizyna nie ma przyporządkowanego symbolu jednoliterowego wywodzącego się z jej nazwy. Nadano jej symbol K, literę najbliższą L w alfabecie łacińskim:

arginina	– Arg	– R
asparagina	– Asn	– N
asparaginian	– Asp	– D
fenyloalanina	– Phe	– F
glutamina	– Gln	– Q
glutaminian	– Glu	– E
lizyna	– Lys	– K
tryptofan	– Trp	– W
tyrozyna	– Tyr	– Y

Nowo odkrytym aminokwasom także przypisano symbole trójliterowe i jednoliterowe:

selenocysteina	– Sec	– U
pirolizyna	– Pyl	– O

Aminokwasom niewbudowującym się bezpośrednio do peptydów i białek, a powstającym na drodze hydroksylacji peptydowo związanych reszt proliny i lizyny, nie nadano odrębnych symboli jednoliterowych, lecz przypisano im symbole macierzystych aminokwasów ze znakiem: #, odpowiednio P # i K #.

W niektórych przypadkach zawartość kwasu asparaginowego i jego amidu – asparaginy – przedstawia się łącznie. Stosuje się wtedy symbol trójliterowy Asx lub symbol jednoliterowy B. Aminokwas oznaczony tym symbolem jest asparaginianem lub asparaginą, albo mieszaniną obydwu. Podobnie jest z glutaminianem i glutaminą. Symbol trójliterowy Glx lub symbol jednoliterowy Z oznaczają kwas glutaminowy lub glutaminę, albo obydwa aminokwasy łącznie. Czyni się tak zazwyczaj, gdy nie wiadomo, czy dany materiał zawiera wolny asparaginian lub glutaminian, czy też odpowiedni amid – asparaginę lub glutaminę.

asparaginian lub asparagina	– Asx	– B
glutaminian lub glutamina	– Glx	– Z

Symbole trójliterowe i jednoliterowe są powszechnie stosowane do przedstawiania składu i sekwencji aminokwasowej łańcuchów peptydowych i białkowych. Jeżeli w składzie peptydu lub białka występuje aminokwas niezidentyfikowany, jego obecność zaznacza się literą X.

2.4. Właściwości optyczne aminokwasów

Aminokwasy są związkami optycznie czynnymi. Ich roztwory skręcają płaszczyznę światła spolaryzowanego. Węgiel α każdego aminokwasu, oprócz glicyny, jest węglem asymetrycznym. Wiąże cztery różne podstawniki. Glicyna jest wyjątkiem, ponieważ dwie spośród czterech wartościowości węgla α są podstawione atomami wodoru. Nie zawiera węgla asymetrycznego, jest więc optycznie nieczynna. Aminokwasy, z wyjątkiem glicyny, mogą występować w formie dwóch izomerów optycznych: D i L. Niemal wszystkie naturalne aminokwasy

należą do szeregu L. Aminokwasy szeregu D występują sporadycznie. Spotyka się je przede wszystkim w ścianach komórek bakteryjnych i w niektórych antybiotykach.

2.5. Właściwości amfoteryczne aminokwasów

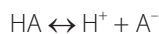
Aminokwasy w środowisku wodnym wykazują właściwości słabych kwasów i słabych zasad. Są więc zaliczane do związków amfoterycznych. Zawierają słabo kwasową grupę α -karboksylową i słabo zasadową grupę α -aminową. Dodatkowo, każdy spośród aminokwasów kwasowych (Glu, Asp) lub zasadowych (Lys, Arg, His) zawiera zjonizowaną grupę w łańcuchu bocznym. Grupa aminowa nadaje aminokwasowi charakter zasadowy, ponieważ wiąże proton, przechodząc w kation $[-NH_3^+]$. Natomiast grupa karboksylowa nadaje aminokwasowi charakter kwasowy, dysocjuje bowiem uwalniając proton i przechodząc w anion $[-COO^-]$.

Środowisko kwaśne sprzyja wiązaniu protonów przez grupy aminowe, a środowisko zasadowe sprzyja uwalnianiu (dysocjacji) protonów z grupy karboksylowej. W środowisku kwaśnym aminokwas jest kationem, w środowisku zasadowym jest anionem. Istnieje pewna pośrednia wartość pH, przy której aminokwas staje się jodem obojnym, a jego wypadkowy ładunek elektrostatyczny równa się 0. Takie pH jest nazywane punktem izoelektrycznym (pI) aminokwasu, a jego wartość jest bardzo zróżnicowana, zależnie od charakteru łańcucha bocznego. Dla aminokwasów niepolarnych wynosi około 6, dla aminokwasów polarnych z łańcuchem kwasowym około 3, dla aminokwasów polarnych z łańcuchem zasadowym (z wyjątkiem His) około 10.

Amfoteryczne cechy aminokwasów sprawiają, iż mają one właściwości buforujące, stabilizują pH. Jeżeli do roztworu aminokwasu zostaną wprowadzone jony H^+ , będą one wiązane przez grupy $-NH_2$. Powstaną dodatnio naładowane grupy $-NH_3^+$. Dodanie zasady (OH^-) powoduje odłączenie protonów z grup $-COOH$. Odłączony H^+ reaguje z OH^- . Powstaje H_2O . Wynika stąd, że aminokwas zobojętnia zarówno jony H^+ , jak i OH^- .

2.5.1. Równanie Hendersona-Hasselbalcha

Słaby kwas (HA) dysocjuje w środowisku wodnym, uwalniając proton (H^+) i anion kwasowy (A^-) według równania:



Stała równowagi takiej reakcji:

$$K = \frac{[H^+][A^-]}{[HA]}$$

Im wyższa wartość K, tym kwas jest mocniejszy, a większość HA występuje w postaci jonów H^+ i A^- . Im wartość K jest niższa, tym kwas jest słabszy, mniej kwasu występuje w postaci jonów H^+ i A^- . Z przekształcenia tego równania wynika, iż

$$[H^+] = K \frac{[HA]}{[A^-]}, \text{ natomiast: } \log [H^+] = \log K + \lg \frac{[HA]}{[A^-]}$$

(Logarytm iloczynu równa się bowiem sumie logarytmów poszczególnych czynników).

Natomiast:

$$-\log [H^+] = -\log K - \log \frac{[HA]}{[A^-]}$$

lub

$$-\log [H^+] = -\log K + \log \frac{[HA]}{[A^-]}$$

(Logarytm ujemny ułamka równa się bowiem logarytmowi dodatniemu odwrotności tego ułamka).

Ujemny logarytm stężenia jonów wodorowych, $-\log [H^+]$, przyjęto nazywać pH, natomiast ujemny logarytm stałej dysocjacji, $-\log K$, przyjęto wyrażać jako pK. Po uwzględnieniu powyższego równanie przybiera następującą postać:

$$pH = pK + \log \frac{[A^-]}{[HA]}$$

Jest to równanie Hendersona-Hasselbalcha.

Bufor jest roztworem opornym na zmiany pH po dodaniu kwasu lub zasady. Może powstać po zmieszaniu słabego kwasu (HA) i jego soli (A^-). Jeżeli stężenia HA i A^- są sobie równe, to wartość ułamka $[A^-]/[HA]$ wynosi 1, a $\log 1 = 0$. Wtedy pH równa się pK. Jeżeli do takiego roztworu dostaje się kwas, A^- wiąże H^+ i powstaje niezdysoncjowany HA. Jeżeli dostaje się zasada, zobojętnia ją HA zgodnie z reakcją:



Mieszanina kwasu i jego anionu tworzy parę buforową, która najefektywniej przeciwdziała zmianom stężenia H^+ w sytuacji, gdy pH buforu równa się pK słabego kwasu. Efek-

tywność ta jest dość wysoka, jeżeli pH waha się nie więcej niż o ± 1 jednostkę w stosunku do pK słabego kwasu. Gdy pH jest niższe od pK , dominuje uprotonowana forma słabego kwasu HA, jeżeli pH roztworu jest wyższe od pK , dominuje anion A^- .

2.5.2. Krzywa miareczkowania alaniny

Alanina zawarta w roztworze kwaśnym jest w pełni uprotonowana. Zawiera dwa protony. Jeden z nich wiąże się z grupą aminową, nadając jej ładunek dodatni ($-NH_3^+$), drugi jest związany w elektrycznie obojętnej grupie karboksylowej ($-COOH$). Grupa $-NH_3^+$ dysocjuje na $-NH_2$ i H^+ , natomiast grupa $-COOH$ dysocjuje na $-COO^-$ i H^+ . Stała dysocjacji grupy $-COOH$ jest oznaczana symbolem K_1 , natomiast stała dysocjacji grupy $-NH_3^+$ symbolem K_2 .

$$K_1 = \frac{[H^+][II]}{[I]}$$

gdzie:

- I oznacza w pełni uprotonowaną postać alaniny,
- II oznacza stężenie alaniny w postaci jonu obojnego.

$$pH = pK_1 + \log \frac{[II]}{[I]}$$

Wartość pK_1 dla grupy karboksylowej alaniny wynosi 2,3. Oznacza to, iż w roztworze alaniny o pH 2,3 występują równe ilości grup $-COO^-$ i grup $-COOH$. W zakresie pH $2,3 \pm 1,0$ występują wysokie zdolności do buforowania.

Grupa $-NH_3^+$ alaniny dysocjuje słabiej. Jej stała dysocjacji K_2 jest niższa niż K_1 grupy $-COOH$, czyli wartość pK_2 jest wysoka i wynosi 9,1. Oznacza to, iż w pH 9,1 występują równe ilości grup $-NH_2$ i $-NH_3^+$. Odłączenie protonu z formy II ala-

niny zamienia ten aminokwas w formę anionową (forma III), wolną od protonów (ryc. 2.9).

Zastosowanie równania Hendersona-Hasselbalcha do każdej spośród grup dysocjujących umożliwia wykreślenie krzywej miareczkowania alaniny (ryc. 2.10). Jak wynika z wykresu, zmiany pH zachodzące podczas dodawania zasady do roztworu w pełni uprotonowanej alaniny (forma I) prowadzą stopniowo poprzez jon obojny (forma II) do powstania formy anionowej, całkowicie wolnej od protonów (forma III).

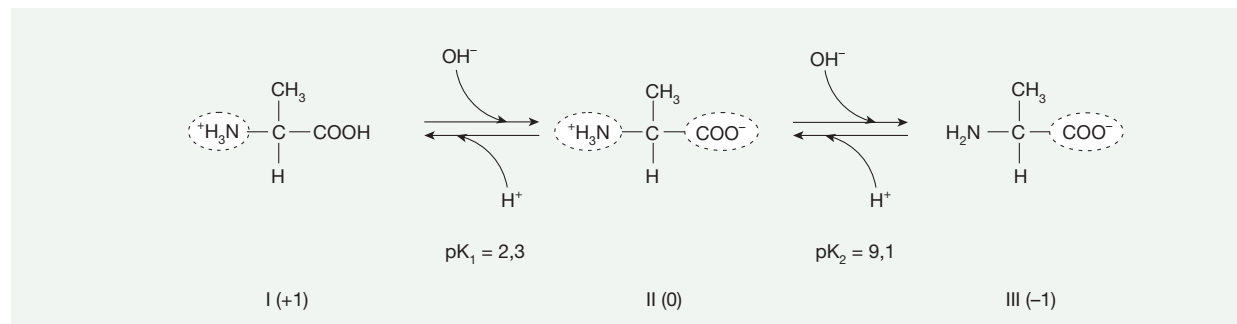
Grupy $-COOH$ i $-COO^-$ tworzą parę buforową w zakresie pH zbliżonym do pK_1 , natomiast grupy $-NH_3^+$ i $-NH_2$ tworzą parę buforową w zakresie pH zbliżonym do pK_2 .

W pH obojętnym dominuje alanina w postaci jonu obojnego (forma II). Obie grupy funkcyjne są zjonizowane, lecz ich ładunek sumaryczny równa się zeru. Punkt izoelektryczny (pI) jest to pH, w którym aminokwas jest elektrycznie obojętny, gdyż suma ładunków dodatniego i ujemnego równa się zeru. W przypadku alaniny, która ma jedną grupę $-COO^-$ i jedną grupę $-NH_3^+$, pI równa się średniej arytmetycznej pK_1 i pK_2 :

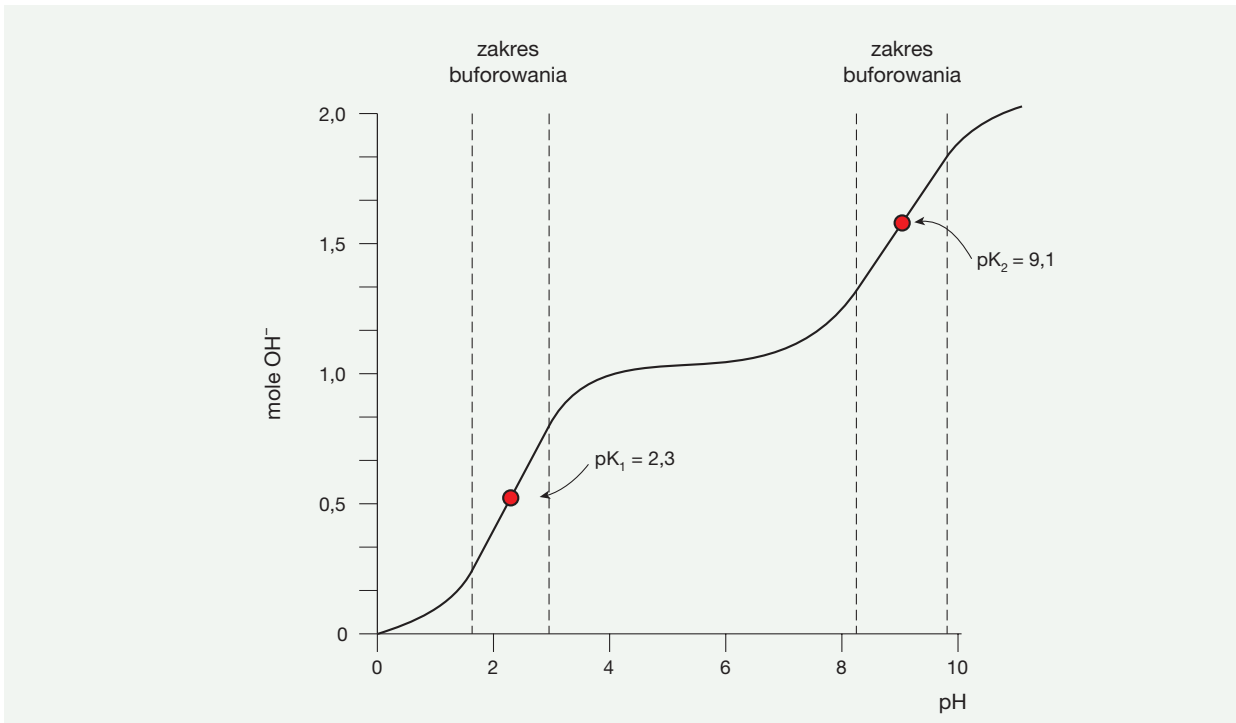
$$pI = (2,3 + 9,1) : 2 = 5,7$$

2.5.3. Krzywa miareczkowania histydyny

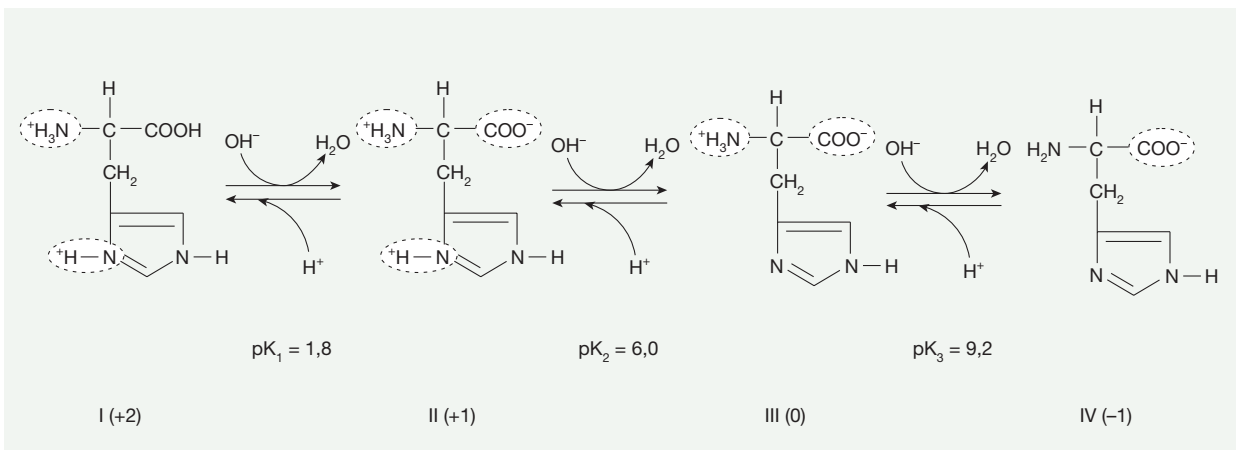
Histydyna jest aminokwasem, który zawiera trzy grupy chemiczne, mogące odwracalnie wiązać lub odłączać proton. Są to: grupa aminowa, grupa imidazolowa w łańcuchu bocznym oraz grupa karboksylowa (ryc. 2.11). Histydyna zawarta w roztworze kwaśnym jest w pełni uprotonowana. Wiąże 3 protony, a jej sumaryczny ładunek elektryczny wynosi +2 (forma I). Stopniowe dodawanie zasady do uprotonowanej histydyny powoduje odłączanie kolejnych protonów. Najpierw dysocjuje proton z grupy karboksylowej ($pK_1 = 1,8$),



Ryc. 2.9. Zmiany ładunku elektrycznego alaniny w różnym pH (w miarę postępującej alkalizacji roztworu).



Ryc. 2.10. Krzywa miareczkowania 1 mola alaniny.

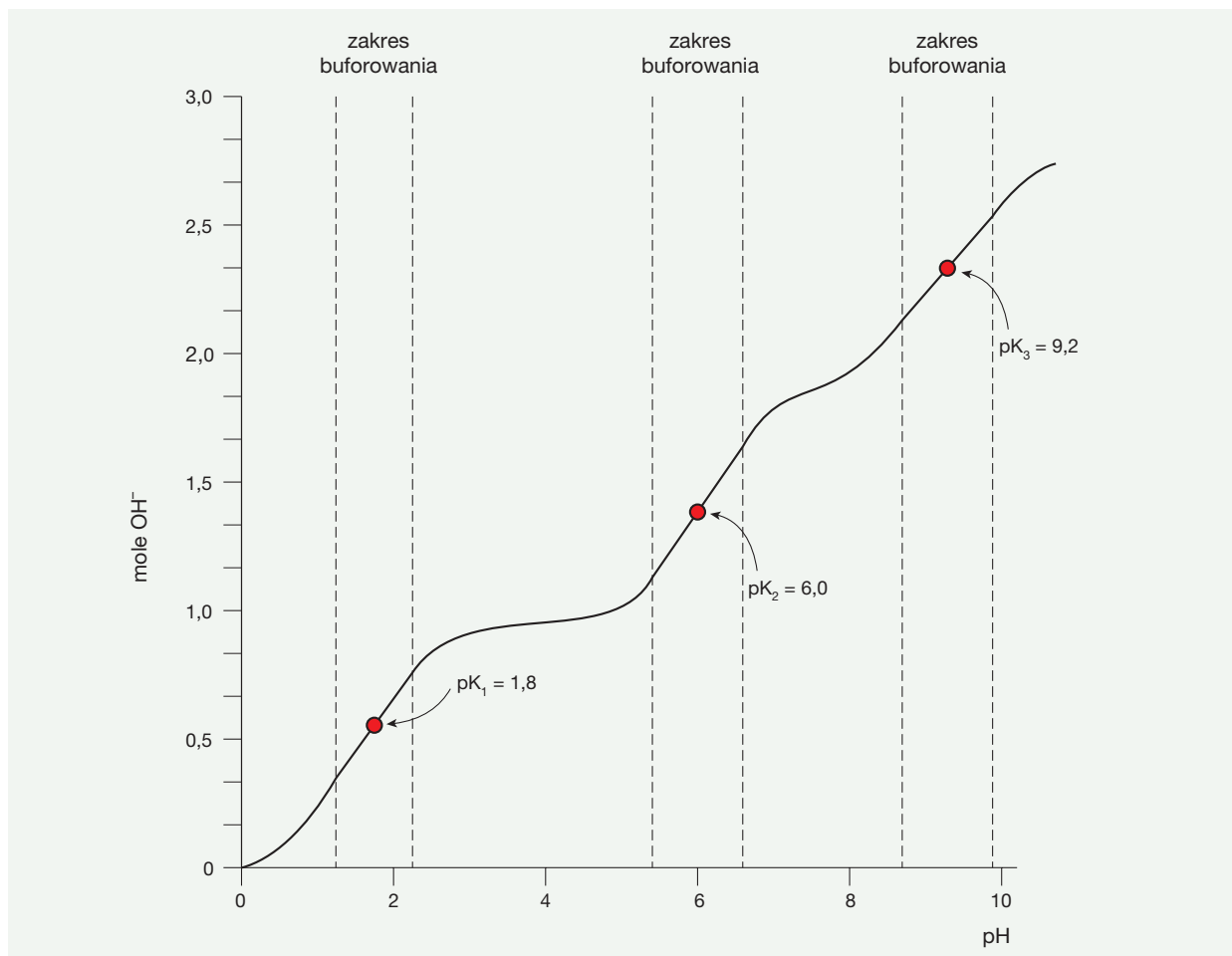


Ryc. 2.11. Zmiany ładunku elektrycznego histydyny w różnym pH (w miarę postępującej alkalizacji roztworu).

powstaje kation o ładunku +1 (forma II). Następnie odłącza się proton z grupy imidazolowej ($pK_2 = 6,0$), powstaje jon obojnaczy o sumarycznym ładunku 0 (forma III) i w ostatniej kolejności odłącza się proton z grupy $-\text{NH}_3^+$ ($pK_3 = 9,2$), powstaje anionowa forma tego aminokwasu o ładunku -1

(forma IV). Krzywą miareczkowania histydyny przedstawiono na ryc. 2.12. Punkt izoelektryczny tego aminokwasu (pI) jest średnią z pK_2 i pK_3 .

$$pI = (6,0 + 9,2) : 2 = 7,6$$



Ryc. 2.12. Krzywa miareczkowania 1 mola histydyny.

2.6. Biologiczne znaczenie aminokwasów

Aminokwasy są przede wszystkim składnikami peptydów i białek. Uczestniczą w budowie miejsc katalitycznych białek enzymatycznych. Są prekursorami hormonów (adrenaliny, noradrenaliny, tyroksyny, trijodotyroniny, histaminy, serotoniny, dopaminy, melatoniny), barwników biologicznych (me-

lanin, hemu) oraz niektórych koenzymów (np. koenzymu A) i neuroprzebieżników (np. acetylocholinę i kwasu γ -aminomasłowego). Pełnią rolę substratów w syntezie puryn i pirymidyn – zasad występujących w nukleotydach. Szkielety węglowodoro-aminokwasów (lub ich fragmenty) są używane do syntezy glukozy, ciał ketonowych lub utleniają się do CO₂ i H₂O, dostarczając energii. Niektóre aminokwasy są źródłem siarki, inne uczestniczą w syntezie fosfolipidów.

3

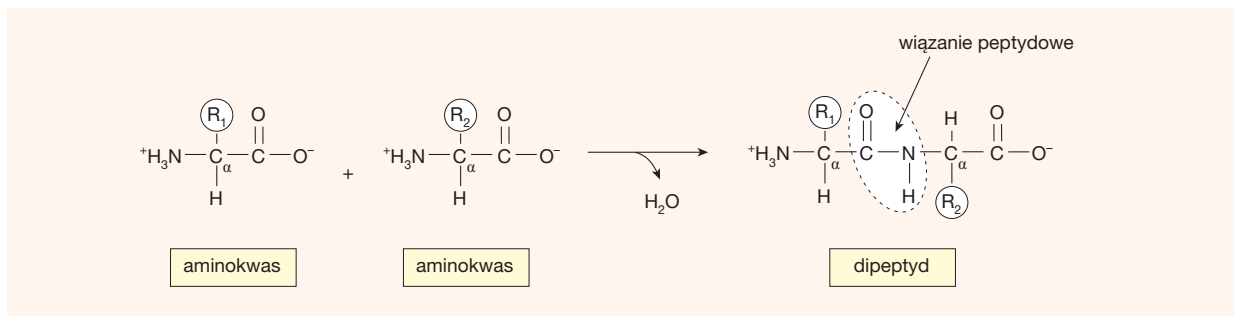
Peptydy

- 3.1. Wiązanie peptydowe, 13
- 3.2. Nazewnictwo peptydów, 15
- 3.3. Peptydy biologicznie aktywne, 16

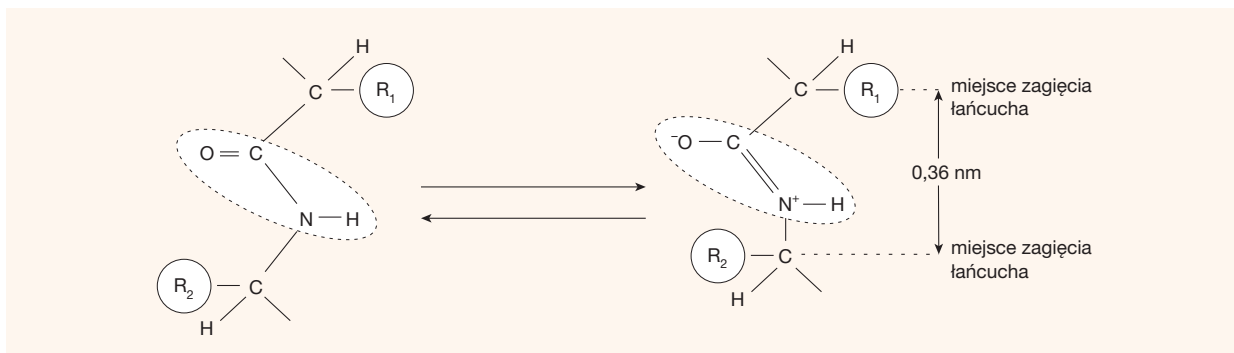
Dwa aminokwasy wiążą się ze sobą w wyniku reakcji grupy α -karboksylowej jednego z nich z grupą α -aminową drugiego. Odłącza się cząsteczka wody, powstaje wiązanie peptydowe. Produkt reakcji dwóch aminokwasów to dipeptyd, zachowujący wolną grupę aminową jednego z aminokwasów i wolną grupę karboksylową drugiego z nich (ryc. 3.1). Grupa karboksylowa dipeptydu może reagować z grupą aminową trzeciego aminokwasu, tworząc następne wiązanie peptydowe. Tą drogą dipeptyd przekształca się w tripeptyd, tetrapeptyd itd. Peptydy złożone z kilku – kilkunastu aminokwasów to oligopeptydy (gr. *oligo* – kilka). Dłuższe peptydy, zawierające po kilkadziesiąt reszt aminokwasowych, noszą nazwę polipeptydów. Nie ustalono powszechnie obowiązującej granicy pomiędzy oligopeptydami i polipeptydami.

3.1. Wiązanie peptydowe

Węgiel grupy α -karboksylowej wiąże się z azotem grupy α -aminowej pojedynczym wiązaniem, określanym jako wiązanie peptydowe. Teoretycznie więc fragment cząsteczki tworzący płaszczyznę $C_{\alpha}-C=O$ jednej reszty aminokwasowej powinien być zdolny do rotacji wobec płaszczyzny tworzonej przez fragment $H-N-C_{\alpha}$, należący do drugiej reszty aminokwasowej, współtworzącej to wiązanie. Tak jednak nie jest. Przypuszcza się, że wiązanie to występuje w postaci dwóch „rezonujących” struktur (ryc. 3.2), pozostających we wzajemnej równowadze; wiązanie $C-N$ przechodzi w $C=N$ i odwrotnie. Nie ma możliwości rotacji względem osi $C=N$. Wiązanie peptydowe jest więc sztywne, ma cechy wiązania podwójnego



Ryc. 3.1. Powstawanie wiązania peptydowego. Zaznaczono grupy funkcyjne uczestniczące w powstawaniu tego wiązania.



Ryc. 3.2. Budowa wiązania peptydowego i jego izomeryczne postaci.

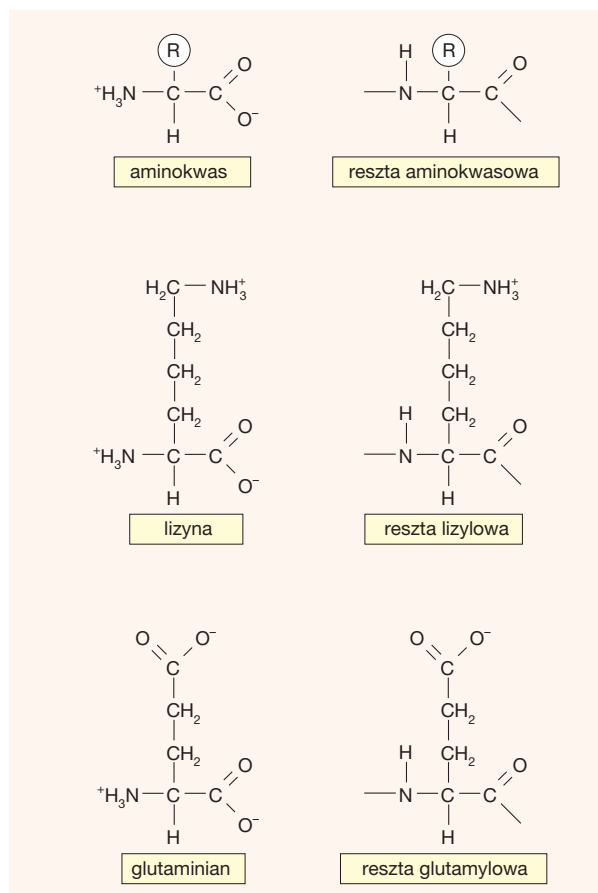
o konfiguracji *trans*. Tlen grupy C=O i wodór grupy N-H są skierowane w przeciwne strony. Atomy C i O grupy C=O oraz atomy N i H grupy N-H wraz z sąsiednimi atomami C_α leżą w jednej płaszczyźnie. Wiązania pomiędzy atomami wskazanymi na ryc. 3.2 dzielą kąt pełny na trzy prawie równe części.

Wiązanie peptydowe powstałe z udziałem grupy iminowej proliny lub hydroksyproliny i grupy karboksylowej innego aminokwasu wykazuje odmienną strukturę. Azot grupy iminowej jest trwale wbudowany w strukturę pierścienia piperolidynowego. Nie zawiera podstawnika wodorowego, nie ma możliwości rotacji względem wiązań powstałych z udziałem tego azotu.

Aminokwasy uczestniczące w tworzeniu wiązania peptydowego tracą fragmenty cząsteczek: -OH z grupy karboksylowej i -H z grupy aminowej, które odłączają się w postaci wody. Dlatego aminokwasy zawarte w peptydach i białkach noszą nazwę reszt aminokwasowych (ryc. 3.3). Nazwy poszczególnych reszt aminokwasowych nie są jednobrzmiące z nazwami aminokwasów, chociaż zachowują rdzenie tych nazw. Można używać zamiennie określeń, np.: reszta proliny lub reszta prolilowa, reszta lizyny lub reszta lizylova, reszta histydyliny lub reszta histydylova (ryc. 3.3). Niepoprawne natomiast są nazwy: reszta prolinowa, reszta lizynowa, czy reszta histydynowa.

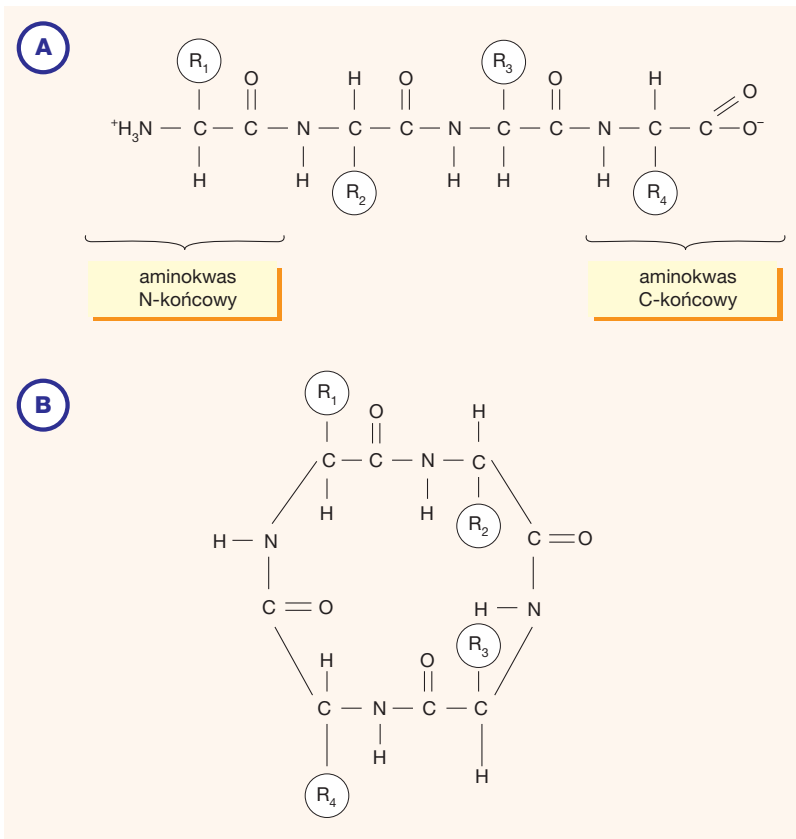
Peptydy są strukturami nierozgałęzionymi. Posiadają dwa charakterystyczne końce. Na jednym z nich występuje aminokwas z wolną grupą α-aminową. Nosi on nazwę końca aminowego lub końca N, a aminokwas będący nośnikiem tej grupy nazywa się aminokwasem N-końcowym. Na drugim końcu występuje aminokwas z wolną grupą α-karboksylową. Nosi on nazwę końca karboksylowego lub końca C, a aminokwas będący nośnikiem tej grupy nosi nazwę aminokwasu C-końcowego (ryc. 3.4).

Grupa karboksylowa aminokwasu C-końcowego może wejść w reakcję z grupą aminową aminokwasu N-końcowego. Tą drogą peptyd liniowy przekształca się w peptyd cykliczny, nieposiadający końca aminowego, ani końca karboksylowego (ryc. 3.4).



Ryc. 3.3. Aminokwasy i reszty aminokwasowe – wzór ogólny i wybrane przykłady.

Wiązania peptydowe są dość trwałe. Rozpadają się dopiero pod działaniem mocnych kwasów i zasad w podwyższonej temperaturze (np. w 6M HCl o temp. 110°C przez 24 godziny), uwalniając aminokwasy.

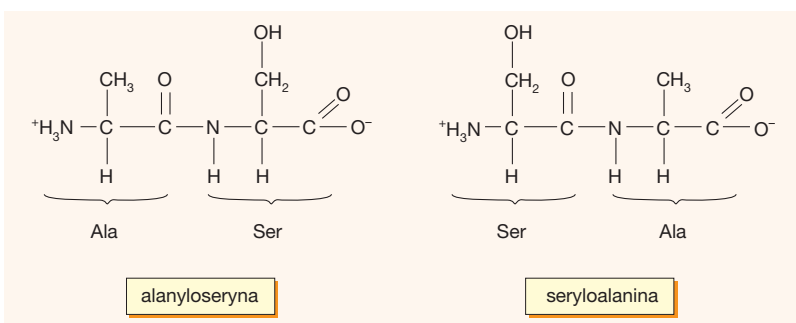


Ryc. 3.4. Peptyd liniowy (A) i peptyd cykliczny (B) złożony z 4 reszt aminokwasowych.

3.2. Nazewnictwo peptydów

Nazwę peptydu rozpoczyna się od nazwy reszty aminokwasu N-końcowego, wymienia się nazwy kolejnych reszt aminokwasowych, a kończy nazwą aminokwasu C-końcowego w jej oryginalnym brzmieniu. Na przykład dipeptyd złożony z alaniny z wolną grupą $-\text{NH}_2$ ($-\text{NH}_3^+$) i seryny z wolną grupą $-\text{COOH}$ ($-\text{COO}^-$) to alanyloseryna. Natomiast dipeptyd złożony z tych samych aminokwasów, lecz połączonych

w odwrotnej kolejności, to seryloalanina (ryc. 3.5). Kolejność (sekwencje) aminokwasów w peptydach zapisuje się za pomocą symboli trójliterowych lub jednoliterowych, opisanych w rozdz. 2.1.6. Na przykład tetrapeptyd o sekwencji aminokwasowej: Arg-Lys-Val-Leu (RKVL) to arginyloizywalilo-leucyna. Tetrapeptyd o sekwencji: Leu-Val-Lys-Arg (LVKR) to leucylowalilolizyloarginina. Peptydom biologicznie ważnym przypisano odpowiednie nazwy zwyczajowe, wymienione w dalszej części tego rozdziału.



Ryc. 3.5. Alanyloseryna i seryloalanina – różne peptydy powstałe z tych samych aminokwasów: alaniny i seryny.

3.3. Peptydy biologicznie aktywne

Glutation jest tripeptydem o nietypowej strukturze. Składa się z trzech reszt aminokwasowych: glutaminianu, cysteiny i glicyny. Aminokwasem N-końcowym jest glutaminian, ale sposób połączenia glutaminianu z cysteiną jest nietypowy dla peptydów i białek. W wiązaniu tym nie uczestniczy bowiem grupa α -karboksylowa glutaminianu, lecz jego grupa γ -karboksylowa. Glutation jest więc γ -glutamylcysteinylglicyną. Występuje w formie zredukowanej i utlenionej. Glutation zredukowany posiada wolną grupę sulfhydrylową ($-SH$). Glutation utleniony powstaje przez odłączenie pary atomów wodoru od grup $-SH$ dwóch cząsteczek glutationu zredukowanego. Atomy siarki pozabawione wodoru wiążą się ze sobą, tworząc mostek disiarczkowy, zwany także mostkiem disulfidowym (ryc. 3.6). Zdolność glutationu do przechodzenia na przemian w stan utleniony i zredukowany jest niezwykle ważna w procesach oksydacyjno-redukcyjnych, omówionych w następnych rozdziałach.

Kininy. Kalidyna i bradykinina są odpowiednio: deka-peptydem i nanopetydem. Różnią się tylko jednym aminokwasem (Lys), który występuje w kalidynie, a nie ma go w bradykininie. Ich skład i sekwencję aminokwasową przedstawiają poniższe schematy:

kalidyna –

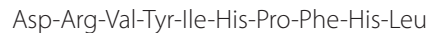


bradykinina –



Kininy rozszerzają naczynia krwionośne, kurczą mięśnie gładkie przewodu pokarmowego.

Angiotensyna I jest deka-peptydem o następującej sekwencji aminokwasowej:



Odłączenie dwóch ostatnich reszt aminokwasowych, w postaci dipeptydu His-Leu, przekształca angiotensynę I w bardzo aktywny oktapeptyd, zwany **angiotensyną II**:



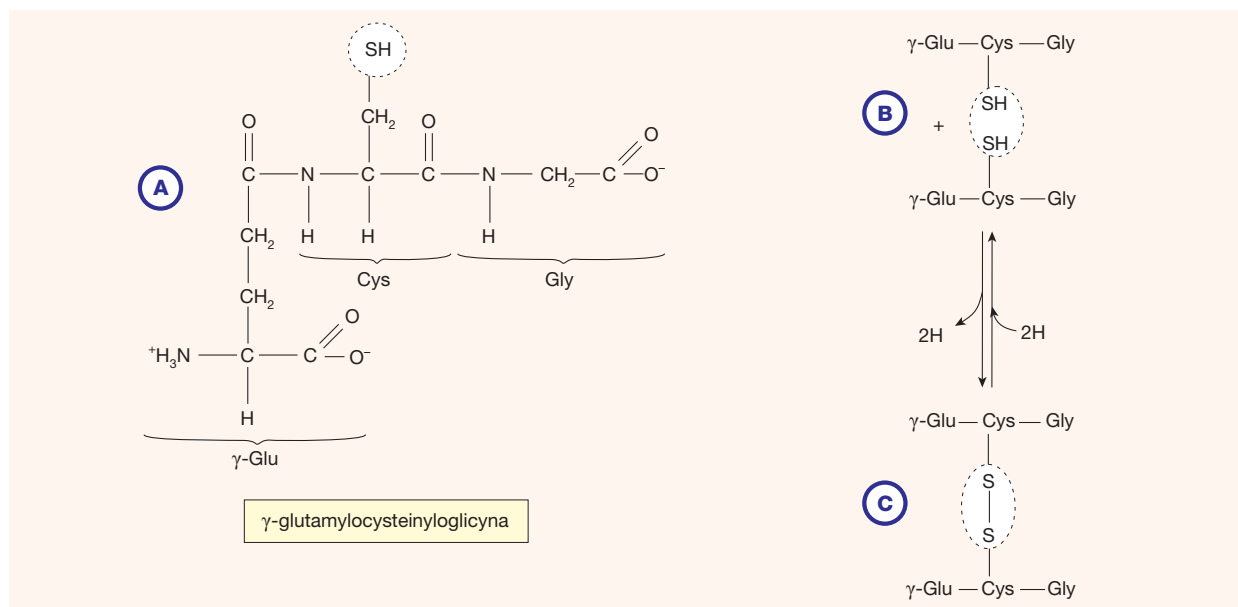
Peptyd ten kurczy mięśnie gładkie drobnych naczyń krwionośnych, podnosi ciśnienie tętnicze, zwiększa siłę skurczu mięśnia sercowego, nasila aktywność układu nerwowego współczulnego, reguluje syntezę i wydzielanie niektórych hormonów, uczestniczy w regulacji równowagi wodno-elektrolitowej.

Enkefaliny są pentapeptydami występującymi w mózgu. Wykazują silne działanie przeciwbólowe. Są to Met-enkefalina i Leu-enkefalina. Różnią się jedynie aminokwasem C-końcowym. Jest nim, odpowiednio, metionina lub leucyna.

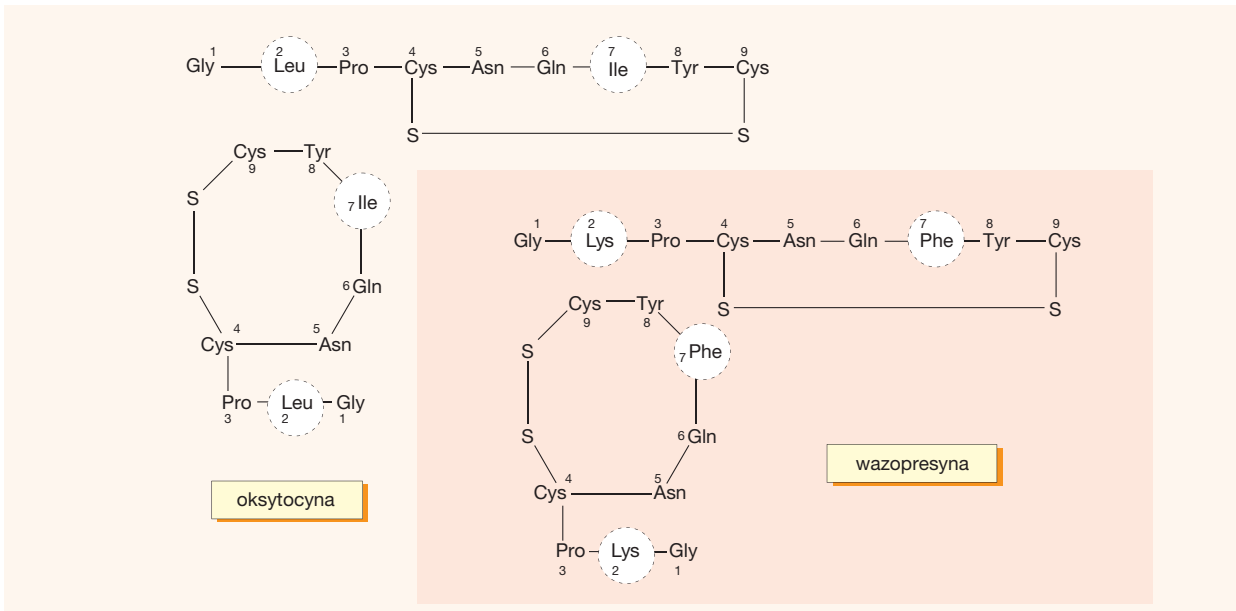
Met-enkefalina



Leu-enkefalina



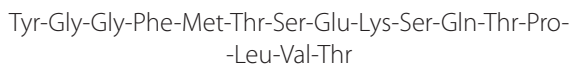
Ryc. 3.6. A. Glutation: γ -glutamylcysteinylglicyna, B. Glutation zredukowany, C. Glutation utleniony.



Ryc. 3.7. Oksytocyna i wazopresyna. Obecność mostka disiarczkowego pomiędzy resztami cysteiny w pozycji 4 i 9 sprawia, że fragment cząsteczki peptydu złożony z 6 reszt aminokwasowych wytwarza strukturę pierścieniową (cykliczną).

Endorfiny są peptydami występującymi w przysadce mózgowej. Podobnie jak enkefaliny wykazują działanie przeciwbólowe.

Endorfina α zawiera 16 reszt aminokwasowych o sekwencji:



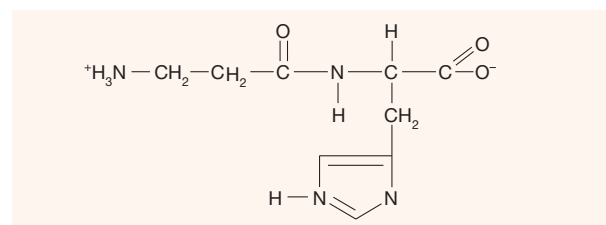
Endorfina β składa się z 31 reszt aminokwasowych. Fragment tego peptydu, obejmujący 16 reszt aminokwasowych począwszy od końca aminowego, jest identyczny z endorfiną α .

Endorfina γ zawiera 27 reszt aminokwasowych o sekwencji odpowiadającej endorfinie β , pozbawionej czterech reszt aminokwasowych od strony końca karboksylowego.

Wszystkie endorfiny powstają ze wspólnego prekursora. Jest nim polipeptyd zwany lipotropiną β , zawierający 91 reszt aminokwasowych. Przez jego rozkład powstają endorfiny.

Oksytocyna i wazopresyna są nanopeptydami wytwarzanymi przez neurony podwzgórza, magazynowanymi i uwalnianymi przez tylny płat przysadki mózgowej. Różnią się jedynie dwoma aminokwasami. Cysteina występująca w pozycji 4 i 9 wytwarza wewnątrzcząsteczkowy mostek disiarczkowy (ryc. 3.7). Oksytocyna jest hormonem pobudzającym czynność skurczową macicy w okresie porodu, wazopresyna (adiuretyna) pobudza resorpcję wody w kanalikach nerkowych, a w dawkach farmakologicznych kurczy naczynia krwionośne i podnosi ciśnienie tętnicze.

Inne peptydy. Peptydowy charakter mają także inne substancje aktywne biologicznie. W mięśniach występuje karnozyna – dipeptyd złożony z β -alaniny i histydyny (β -alanylohistydyna) oraz jej metylowa pochodna – anseryna (β -alanylo-N-metylohistydyna), w której atom azotu, zawarty w pierścieniu imidazolowym histydyny, jest nośnikiem grupy metylowej (ryc. 3.8). Przyjmując założenie, iż peptyd/polipeptyd zawiera do 100 reszt aminokwasowych, do peptydów należy zaliczyć także niektóre hormony, takie jak: parathormon, kalcytonina, glukagon, insulina, hormon adrenokortykotropowy, gastryna, sekretyna czy cholecystokinina, opisane w rozdz. 30. W tkankach i w płynach ustrojowych występuje wiele peptydów będących produktami rozpadu białek. Są one metabolitami pośrednimi, powstającymi w procesie degradacji białek do wolnych aminokwasów. Niektóre z nich nie ulegają doszczętej degradacji, są wydalane drogą nerkową.



Ryc. 3.8. Karnozyna (β -alanylohistydyna). Metylacja azotu w pierścieniu imidazolowym histydyny zmienia karnozynę w anserynę (β -alanylo-N-metylohistydynę).

4

Białka

- 4.1. **Struktura pierwszorzędowa białek, 19**
 - 4.1.1. Oznaczanie składu aminokwasowego białek, 20
 - 4.1.2. Ustalanie sekwencji aminokwasowej, 21
 - 4.2. **Struktura drugorzędowa białek, 23**
 - 4.2.1. Helisa α , 23
 - 4.2.2. Struktura β , 25
 - 4.2.3. Struktury niepowtarzalne, 26
 - 4.3. **Struktura trzeciorzędowa białek, 26**
 - 4.3.1. Wiązania stabilizujące strukturę trzeciorzędową, 26
 - 4.3.2. Przykłady struktur trzeciorzędowych, 27
 - 4.4. **Struktura czwartorzędowa białek, 29**
 - 4.4.1. Przykłady struktur czwartorzędowych, 29
 - 4.5. **Struktura kolagenowa, 30**
 - 4.6. **Denaturacja białek, 31**
 - 4.7. **Właściwości białek w roztworach, 31**
 - 4.8. **Izolacja białek z materiału biologicznego, 32**
 - 4.8.1. Ekstrakcja i wytrącanie białek z roztworu, 32
 - 4.8.2. Dializa i ultrafiltracja, 33
 - 4.8.3. Filtracja żelowa, 33
 - 4.8.4. Chromatografia jonowymienna, 33
 - 4.8.5. Chromatografia powinowactwa, 34
 - 4.8.6. Chromatografia wysokociśnieniowa (HPLC), 34
 - 4.8.7. Elektroforeza, 34
 - 4.8.8. Ogniskowanie izoelektryczne, 35
 - 4.9. **Funkcje biologiczne białek, 35**
-

Białka są wielkocząsteczkowymi produktami powstałymi w wyniku interakcji grup α -karboksylowych aminokwasów z ich grupami α -aminowymi z powstaniem wiązań peptydowych, opisanych w rozdz. 3.1. Nie ustalono powszechnie akceptowanej granicy pomiędzy peptydami i białkami. Na ogół przyjmuje się, że produkt zawierający ponad 100 reszt aminokwasowych i wykazujący masę cząsteczkową powyżej

10 kDa jest białkiem. W skład jednego łańcucha białkowego wchodzi od 100 do 1000 (niekiedy więcej) reszt aminokwasowych. Masa cząsteczkowa większości białek waha się od 10 do kilkuset kDa. Nieliczne białka osiągają masę cząsteczkową około 1000 kDa. Niektóre z nich zawierają po dwa do kilku łańcuchów białkowych. W większości białek występuje 20 aminokwasów (rozdz. 2.1). Dwa dodatkowe (selenocysteina

i pirololizyna) występują tylko w nielicznych białkach (rozd. 2.2). Obecność tych 22 aminokwasów w białkach jest zdeterminowana genetycznie.

Niektóre białka zawierają dodatkowo: hydroksyprolinę (kolagen i elastyna), hydroksylizynę (kolagen) lub γ -karboksylglutaminian (niektóre białka osocza krwi). Obecność tych 3 aminokwasów w białkach nie jest zdeterminowana genetycznie. Powstają one w wyniku hydroksylacji reszt proliny i lizyny lub karboksylacji reszt glutaminianu wbudowanych do prekursorowych postaci tych białek (rozd. 25.3).

Strukturę białek można rozpatrywać na czterech „poziomach”. Są to struktury: pierwszorzędowa, drugorzędowa, trzeciorzędowa i czwartorzędowa. Trzy ostatnie są określane wspólną nazwą: konformacja białka. Pewne fragmenty wspomnianych struktur są powtarzalne w różnych białkach, co sugeruje, że istnieją pewne zasady tworzenia i fałdowania łańcuchów białkowych. Istnieją także białka bądź fragmenty cząsteczek białkowych o strukturach niepowtarzalnych, spotykanych tylko w jednym bądź jedynie w nielicznych białkach.

4.1. Struktura pierwszorzędowa białek

Sekwencja, czyli kolejność aminokwasów w łańcuchu białkowym, nosi nazwę struktury pierwszorzędowej białka. Poszczególne aminokwasy wchodzące w skład białka są połączone kowalencyjnie poprzez wiązania peptydowe. Schemat struktury pierwszorzędowej przedstawiono na ryc. 4.1.

W większości białek występuje 20 aminokwasów w różnych kombinacjach. Przy długości łańcucha odpowiadającej 100 resztom aminokwasowym liczba możliwych kombinacji wynosi 20^{100} . Jest to liczba niewyobrażalnie wysoka, dlatego w białkach występują tylko niektóre teoretycznie możliwe sekwencje aminokwasowe. Rozmieszczenie reszt aminokwasowych wzdłuż łańcucha polipeptydowego nie podlega żadnym okresowościom. Można jedynie stwierdzić, że aminokwasy zawierające łańcuchy boczne o charakterze kwasowym lub zasadowym oraz aminokwasy zawierające pierścienie aro-

matyczne często występują w skupieniach. Zdarza się, że kilka reszt tego samego aminokwasu występuje obok siebie. Sekwencja aminokwasowa jest zdeterminowana genetycznie.

Niektóre białka wykazują duże podobieństwo (homologię) sekwencji aminokwasowej. Białka o homologicznej sekwencji aminokwasowej zwykle pełnią podobne funkcje. Na przykład *trypsyna* i *chymotrypsyna*, cechujące się takim podobieństwem, są enzymami proteolitycznymi (trawiącymi białka). Natomiast homologiczne względem siebie łańcuchy α i β hemoglobiny oraz w mniejszym stopniu mioglobiny wiążą tlen cząsteczkowy.

Na przykładzie hemoglobiny widać najlepiej, jak ważna jest struktura pierwszorzędowa dla pełnienia przez białko jego funkcji fizjologicznej. Stwierdzono, iż zastąpienie choćby jednego aminokwasu innym aminokwasem powoduje powstanie hemoglobiny patologicznej. Opisano ponad 400 takich hemoglobin. Poniżej przedstawiono porównanie sekwencji aminokwasowej fragmentów N-końcowych łańcucha β prawidłowej hemoglobiny ludzkiej; hemoglobiny A (Hb.A) i dwóch hemoglobin patologicznych: hemoglobiny S (Hb.S) i hemoglobiny C (Hb.C):

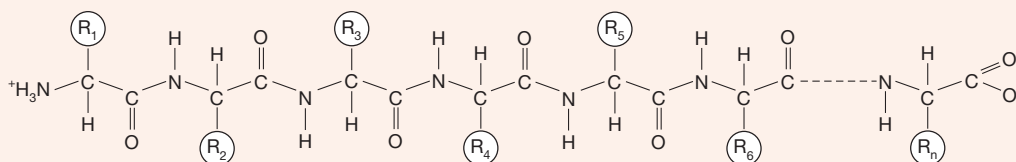
Hb.A. Val-His-Leu-Thr-Pro-**Glu**-Glu-Lys...

Hb.S Val-His-Leu-Thr-Pro-**Val**-Glu-Lys...

Hb.C Val-His-Leu-Thr-Pro-**Lys**-Glu-Lys...

W pozycji szóstej Hb.A występuje glutaminian (Glu). Pozostałe hemoglobiny: Hb.S i Hb.C różnią się od Hb.A jednym aminokwasem. W pozycji szóstej zamiast glutaminianu występuje inny aminokwas, odpowiednio walina (Val) lub lizyna (Lys). Ta pozornie niewielka zmiana jest przyczyną poważnych następstw biologicznych. Krwinki czerwone, obciążone tak zmienioną hemoglobina, mają nietypowy kształt, żyją krócej, są bardzo podatne na hemolizę. Stan ten prowadzi do obniżenia liczby erytrocytów we krwi. Produkty ich rozpadu są wychwytywane przez wątrobę i śledzionę, prowadząc do powiększenia tych narządów. We krwi rośnie stężenie bilirubiny, która jest produktem rozpadu hemu zawartego w hemoglobinie (rozd. 22.3). Rozwija się stan chorobowy określany mianem niedokrwistości (anemii) hemolitycznej.

Kolejnym przykładem są poważne skutki minimalnych zmian w sekwencji aminokwasowej w kolagenie tkanki kostnej.



Ryc. 4.1. Struktura pierwszorzędowa białka. Symbolem R oznaczono łańcuchy boczne kolejnych aminokwasów.

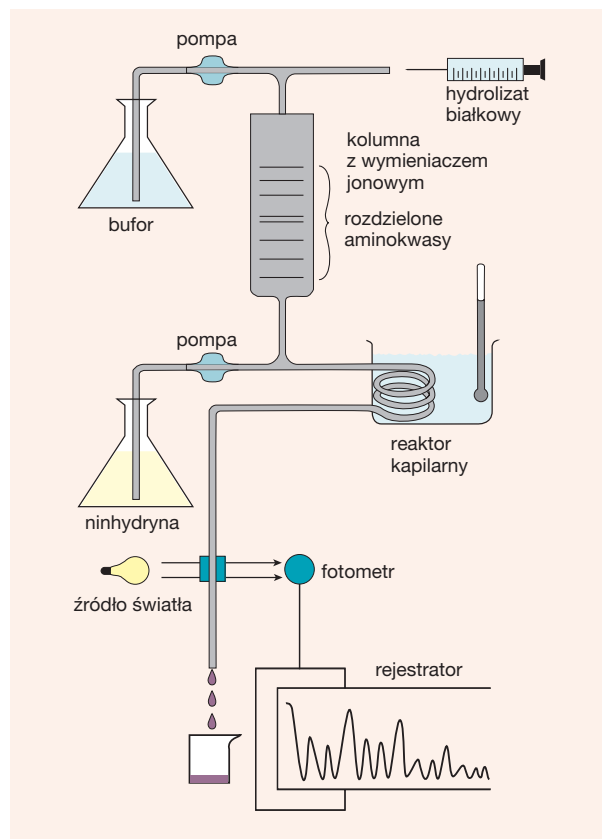
Zastąpienie pojedynczych reszt glicyny przez inny aminokwas: argininę, cysteinę, serynę czy alaninę zaburza tworzenie struktury przestrzennej kolagenu, a w konsekwencji wprowadza ogromne deformacje szkieletowe. Rozwija się zespół chorobowy zwany wrodzoną łamliwością kości (*osteogenesis imperfecta*), cechujący się drastycznym obniżeniem odporności mechanicznej tkanki kostnej, skłonnością do złamań i utrudnionym gojeniem się ran kostnych.

Niektóre grupy hydroksylowe seryny i hydroksylizyny oraz azot grupy amidowej asparaginy są miejscem wiązania składników cukrowych, zarówno cukrów prostych, jak i krótkich oligosacharydów lub długich łańcuchów polisacharydowych. Tak zmodyfikowane białka noszą nazwę glikoprotein. Grupy hydroksylowe reszt seryny, tyrozyny i treoniny mogą być estryfikowane kwasem ortofosforowym. Niektóre grupy ε-aminowe lizyny mogą wiązać grupy metylowe (metylacja).

4.1.1. Oznaczanie składu aminokwasowego białek

Pierwszym etapem w poznawaniu struktury pierwszorzędowej białka jest wydzielenie go z materiału biologicznego w stanie wysoko oczyszczonym i poddanie hydrolizie w środowisku kwaśnym (zwykle w 6M HCl), w temperaturze 110°C, przez 24 godziny. W tych warunkach następuje hydrolityczny rozkład wiązań peptydowych. Białko rozpada się na wolne aminokwasy. Niektóre aminokwasy ulegają częściowej degradacji podczas hydrolizy kwasowej. Dochodzi do rozpadu wiązań amidowych w glutaminie i asparaginie z uwolnieniem amoniaku. Wspomniane aminokwasy przekształcają się (odpowiednio) do glutaminianu i asparaginianu. Ponadto hydroliza kwasowa prowadzi do rozpadu większości tryptofanu.

Aminokwasy zawarte w hydrolizacie białkowym mogą być rozdzielone metodą chromatografii jonowymiennej. Odparowany hydrolizat (wolny od HCl) rozpuszcza się w buforze o niskim pH, nadającym wszystkim aminokwasom ładunek dodatni (kationowy). Próbkę hydrolizatu nanosi się na kolumnę wypełnioną żywicą jonowymienną, będącą nośnikiem ładunków ujemnych, związanych z fazą stałą. Żywica taka nosi nazwę kationitu, ponieważ wiąże kationy. Ujemnie naładowane grupy kationitu wiążą dodatnio naładowane aminokwasy. Poszczególne z nich, zależnie od posiadanego ładunku elektrycznego, wiążą się z różną siłą i mogą być wypłukiwane z kolumny roztworami o rosnącej sile jonowej i rosnącym pH. W miarę wzrostu pH aminokwasy tracą protony najpierw z grup α-karboksylowych, następnie z łańcuchów bocznych i na końcu z uprotonowanych grup α-aminowych ($-NH_3^+$). Stopniowo zmienia się ich sumaryczny ładunek elektryczny. Kation aminokwasowy przekształca się w jon obojnaczy, a ten po odłączeniu kolejnego protonu uzyskuje ładunek ujemny. W miarę przechodzenia aminokwasu z formy kationowej, poprzez jon obojnaczy, w postać anionową stopniowo maleją



Ryc. 4.2. Budowa i funkcjonowanie analizatora aminokwasowego.

i zanikają siły przyciągania elektrostatycznego pomiędzy kationem a aminokwasem. Następuje uwolnienie aminokwasu z żywicy. Każdy aminokwas wiąże się z określoną siłą i wypłukuje z żywicy roztworem o określonym pH i odpowiedniej sile jonowej.

Rozdzielone aminokwasy, wypłukiwane z kolumny, przepływają przez reaktor kapilarny, do którego dopływa roztwór ninhydryny. Związek ten tworzy intensywnie niebieski produkt z większością aminokwasów oraz żółty produkt z iminokwasami (proliną i hydroksyproliną). Ilość każdego aminokwasu jest oznaczana kolorymetrycznie drogą pomiaru absorpcji światła przez produkty interakcji aminokwasów z ninhydriną. Wartość absorpcji jest rejestrowana graficznie lub bezpośrednio zapisywana w pamięci komputera. Każdy szczyt absorpcji, zarejestrowany na ruchomej taśmie, odpowiada jednemu aminokwasowi. Powierzchnia każdego szczytu jest proporcjonalna do zawartości określonego aminokwasu w hydrolizacie.

Jeżeli znany jest ciężar cząsteczkowy białka, można wyrazić jego skład aminokwasowy w liczbach poszczególnych aminokwasów w jednej cząsteczce białka lub w molach poszczególnych aminokwasów w jednym molu białka. Jeżeli ciężar

zar cząsteczkowy nie jest znany, można jedynie przedstawić wzajemne relacje ilościowe pomiędzy poszczególnymi aminokwasami. Zazwyczaj podaje się liczbę reszt poszczególnych aminokwasów w przeliczeniu na 1000 reszt aminokwasowych. Pomiaru składu aminokwasowego hydrolizatów białkowych dokonuje analizator aminokwasowy, którego schemat przedstawiono na ryc. 4.2.

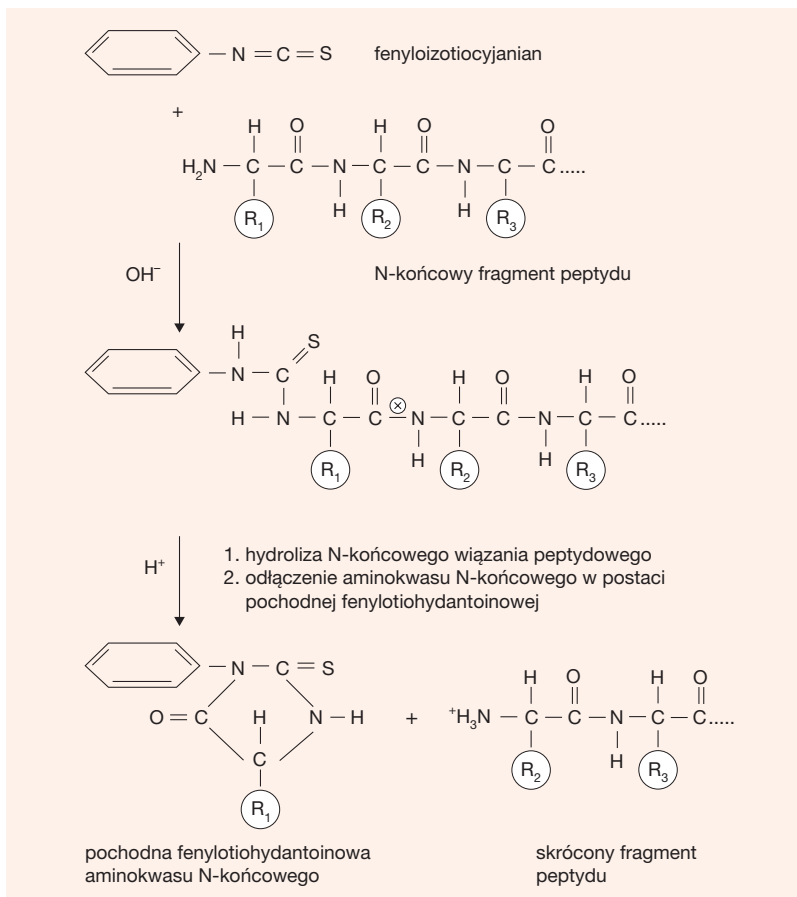
4.1.2. Ustalanie sekwencji aminokwasowej

Sekwencję aminokwasową ustala się metodą Edmana z użyciem automatycznego analizatora (sekwenatora). Czynność tę nazywa się sekwencjonowaniem białka. Fenyloizotiocyanian (ryc. 4.3), zwany odczynnikiem Edmana, wiąże się z grupą aminową aminokwasu N-końcowego w lekko alkalicznym środowisku. Powstająca pochodna fenyloizotiocyanianowa powoduje destabilizację N-końcowego wiązania peptydowego, które może być poddane wybiórczej hydrolizie kwasowej w warunkach, w których nie rozpadają się inne wiązania peptydowe. Następuje skrócenie łańcucha peptydowego o jedną resztę aminokwasową. Odłączenie aminokwasu N-końcowego

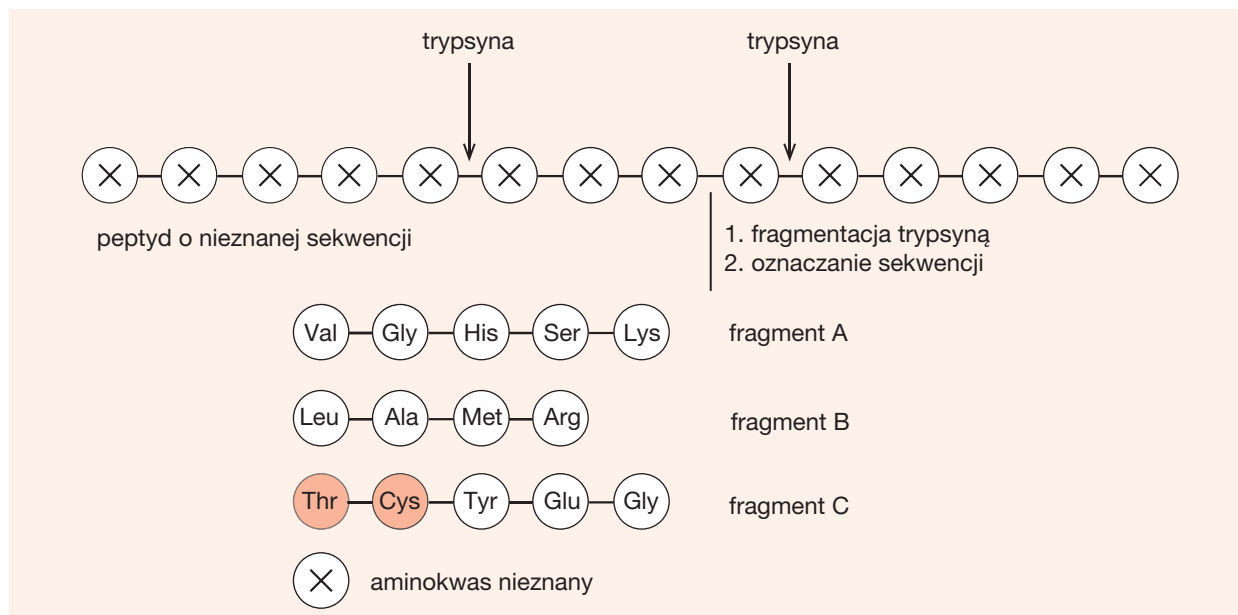
udostępnia kolejną resztę aminokwasową do reakcji z odczynnikiem Edmana i prowadzi do destabilizacji następnego wiązania peptydowego, które staje się podatnym na hydrolizę itd. Poprzez kolejne cykle reakcji można odłączać i identyfikować następne reszty aminokwasowe. Proces ten jest zautomatyzowany, wielokrotnie powtarzany. W każdym cyklu odłącza się jeden aminokwas w formie pochodnej fenyloiohydantoinowej (ryc. 4.3). W ten sposób można ustalić sekwencję łańcucha polipeptydowego zawierającego do 100 reszt aminokwasowych.

Jednak większość łańcuchów białkowych składa się z ponad 100 aminokwasów. Tak długie łańcuchy nie mogą być sekwencjonowane w sposób bezpośredni. Muszą być najpierw poddane fragmentacji na krótsze odcinki poprzez wybiórczy rozkład niektórych wiązań peptydowych. Rozdziela się powstałe peptydy i oznacza sekwencję aminokwasową każdego z nich. Następną czynnością jest ustalenie kolejności, w jakiej te peptydy występują w łańcuchu białkowym poddanym fragmentacji.

Fragmentacja enzymatyczna. *Trypsyna* (enzym proteolityczny soku trzustkowego) w sposób wybiórczy trawi wiązania peptydowe powstałe z udziałem grup karboksylowych.



Ryc. 4.3. Oznaczanie sekwencji aminokwasowej metodą Edmana. Wskazano wiązanie peptydowe, które stało się niestabilne w wyniku przyłączenia fenyloizotiocyanianu.



Ryc. 4.4. Fragmentacja peptydu trypsyną w celu uzyskania krótkich odcinków nadających się do sekwencjonowania.

wych lizyny i argininy. Efektem działania *trypsyny* jest fragmentacja łańcucha białkowego na krótsze odcinki. Łańcuch białkowy rozpada się na $n+1$ peptydów, gdzie n oznacza liczbę wiązań peptydowych, podatnych na działanie *trypsyny*. Każdy z powstałych peptydów może być wydzielony z mieszaniny i poddany odrębnemu sekwencjonowaniu.

Zasadę tej procedury najłatwiej jest wyjaśnić na przykładzie niewielkiego peptydu. Ryc. 4.4 ilustruje fragmentację peptydu X złożonego z 14 nieznanymi reszt aminokwasowych i sekwencjonowanie powstałych produktów. *Trypsyna* rozkłada dwa wiązania peptydowe, prowadząc do rozpadu peptydu X na trzy krótsze peptydy: A, B i C. Każdy z nich poddano sekwencjonowaniu metodą Edmana. Stwierdzono, że peptyd A ma sekwencję: Val-Gly-His-Ser-Lys, peptyd B: Leu-Ala-Met-Arg, a peptyd C: Thr-Cys-Tyr-Glu-Gly. Jednak poznanie sekwencji tych krótkich peptydów nie pozwala na stwierdzenie, w jakiej kolejności są one rozmieszczone w wyjściowym peptydzie X. Fragmenty te mogą bowiem występować w sześciu różnych kombinacjach: ABC, ACB, BAC, BCA, CAB lub CBA. Do rozstrzygnięcia tego problemu konieczne jest przeprowadzenie fragmentacji peptydu X inną metodą i poznanie sekwencji aminokwasowej powstałych produktów.

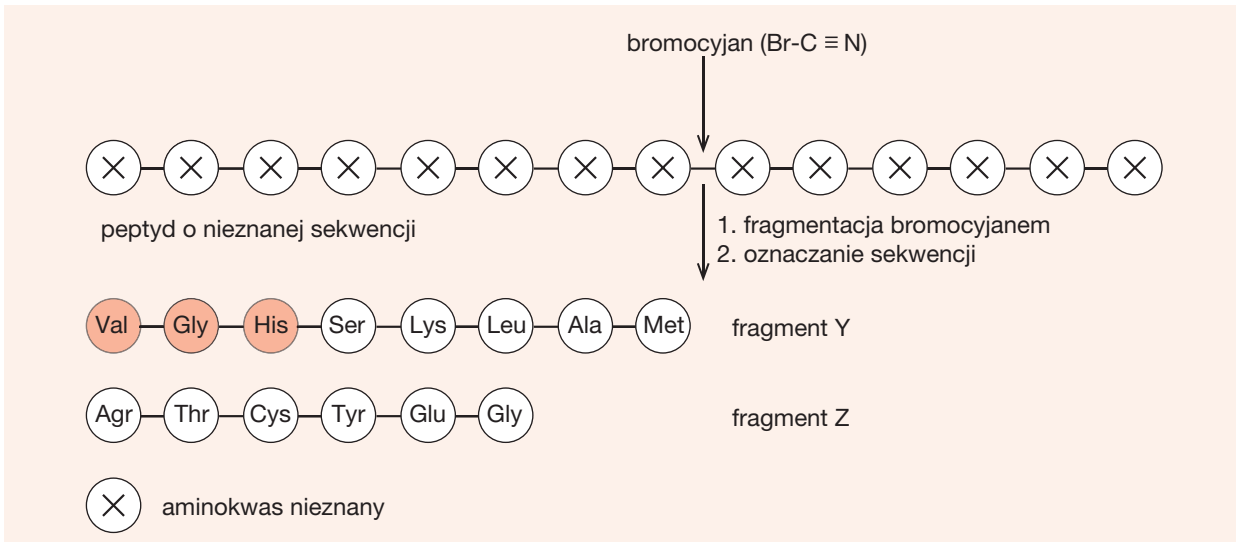
Fragmentacja chemiczna. Bromocyjan rozkłada wiązania peptydowe powstałe z udziałem grup karboksylowych metioniny. Prowadzi do rozkładu łańcucha białkowego na $n+1$ fragmentów, gdzie n oznacza liczbę reszt metioniny występujących w łańcuchu białkowym.

Na ryc. 4.5 przedstawiono uproszczony schemat fragmentacji wyżej wspomnianego peptydu X, złożonego z 14 reszt aminokwasowych i sekwencjonowania powstałych produk-

tów. Bromocyjan rozkłada jedno wiązanie peptydowe, prowadząc do rozpadu peptydu X na dwa peptydy Y i Z. Oznacza to, iż peptyd X zawiera tylko jedną resztę metionylową. Każdy z powstałych peptydów został wydzielony z mieszaniny i poddany odrębnemu sekwencjonowaniu metodą Edmana. Stwierdzono, że peptyd Y ma sekwencję: Val-Gly-His-Ser-Lys-Leu-Ala-Met, a peptyd Z sekwencję: Arg-Thr-Cys-Tyr-Glu-Gly. Nie pozwala to jednak na stwierdzenie, w jakiej kolejności fragmenty te są rozmieszczone w wyjściowym peptydzie X. Mogą one bowiem występować w dwóch różnych kombinacjach: YZ lub ZY.

Jak wynika z powyższych rozważań, metoda Edmana umożliwia poznanie sekwencji aminokwasowej fragmentów łańcucha białkowego, lecz nie pozwala na ustalenie, w jakiej kolejności fragmenty te są ułożone w cząsteczce białka. Poznanie tej kolejności wymaga zastosowania co najmniej dwóch różnych technik fragmentacji, oznaczenia sekwencji aminokwasowej każdego z powstałych peptydów i przeprowadzenia następującej analizy myślowej.

Łańcuch X pod działaniem bromocyjanu rozpada się na peptyd Y i Z. Sekwencja aminokwasowa peptydu Y, powstałego pod działaniem bromocyjanu, pokrywa się z sekwencją peptydu A, powstałego pod działaniem trypsyny, a dodatkowo peptyd Y jest przedłużony od strony końca karboksylowego o sekwencję Leu-Ala-Met, która występuje w peptydzie B od strony jej końca aminowego. Oznacza to, iż peptyd B występuje po peptydzie A. Peptyd B od strony końca karboksylowego jest zakończony Arg, która jest aminokwasem N-końcowym w peptydzie Z. W łańcuchu Z, po N-końcowej Arg, występują kolejno Thr-Cys... itd. – aminokwasy występujące w peptydzie C.



Ryc. 4.5. Fragmentacja peptydu bromocyjanem w celu uzyskania krótkich odcinków nadających się do sekwencjonowania.

Z powyższych rozważań wynika, iż fragmenty łańcucha X, powstałe przez degradację trypsyną, są ułożone w kolejności: A, B, C, a peptydy powstałe pod działaniem bromocyjanu – w kolejności Y, Z. Oznacza to, iż łańcuch X cechuje się następującą sekwencją aminokwasową:

Val-Gly-His-Ser-Lys-Leu-Ala-Met-Arg-Thr-Cys-Tyr-Glu-Gly

Opisane techniki pozwalają na sekwencjonowanie łańcuchów białkowych zawierających nawet ponad 1000 reszt aminokwasowych.

4.2. Struktura drugorzędowa białek

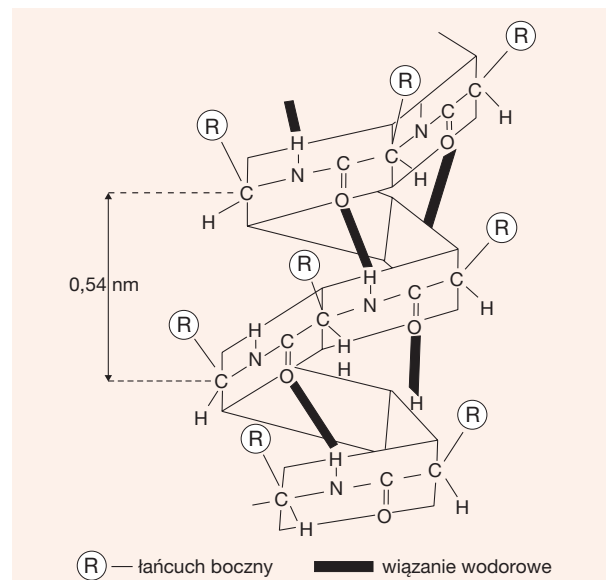
Struktura drugorzędowa białka jest to sposób przestrzennego rozmieszczenia łańcucha polipeptydowego. Może być badana metodami dyfrakcji promieni X. Promienie te ulegają rozproszeniu lub ugięciu przez elektrony otaczające każdy atom. Najsilniej uginają promienie X atomy o dużej gęstości elektronicznej, natomiast najsłabiej – atomy o małej gęstości elektronicznej, np. atomy wodoru.

Jak opisano w rozdz. 3.1, wiązanie peptydowe ma pewne cechy wiązania podwójnego. Nie ma możliwości rotacji łańcucha względem osi C–N ze względu na tendencję tego wiązania do przechodzenia w postać C=N. Atomy C i O grupy C=O oraz atomy N i H grupy N–H (uczestniczące w tworzeniu wiązania peptydowego) wraz z sąsiednimi atomami C_{α} tworzą jedną płaszczyznę. Tlen grupy C=O i wodór grupy N–H znajdują się względem siebie w pozycji *trans*. Z tych względów szkie-

let łańcucha białkowego może być przedstawiony jako szereg sztywnych płaszczyzn oddzielonych od siebie grupami CH–R (ryc. 4.6).

4.2.1. Helisa α

Najczęściej spotykaną postacią struktury drugorzędowej białka jest helisa α (ryc. 4.6). Jest to specyficzna forma spirali. Na jeden skręt helisy α przypada 3,6 reszt aminokwasowych.



Ryc. 4.6. Struktura helisy α

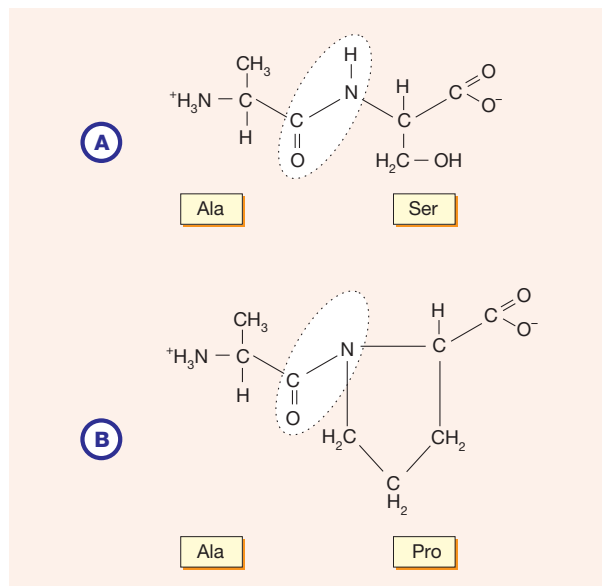
Na zewnątrz „sterczą” łańcuchy boczne aminokwasów, oznaczone na ryc. 4.6 symbolem R. Światło wewnętrzne spirali jest znikomo małe. Skok spirali wynosi 0,54 nm, a odległość osiowa dwóch reszt aminokwasowych – 0,15 nm. Taki układ wyróżnia się od innych struktur spiralnych tym, że pozwala na tworzenie wewnątrzłańcuchowych, międzyzwojowych wiązań wodorowych. W helisie α wiązanie wodorowe powstaje pomiędzy atomem wodoru, zawartym w grupie N–H jednego wiązania peptydowego, a tlenem grupy C=O, należącej do czwartego z kolei aminokwasu, według zasady $n + 4$, gdzie n oznacza numer kolejny reszty aminokwasowej, licząc od końca aminowego. Atom wodoru związany kowalencyjnie z atomem azotu w grupie N–H jest równocześnie przyciągany przez elektroujemny atom tlenu zawarty w grupie C=O. Taki układ przestrzenny stwarza możliwość oddziaływań elektrostatycznych, zapewniających maksymalną siłę wiązań wodorowych. Każde wiązanie peptydowe łańcucha białkowego objętego strukturą helisy α uczestniczy w tworzeniu wiązań wodorowych. Nie dotyczy to wiązań powstałych z udziałem grup iminowych proliny.

Polipeptydy otrzymane drogą syntezy przyjmują samoistnie strukturę helisy α . We wszystkich białkach zbudowanych z L-aminokwasów helisa α jest prawoskrętna. Polipeptydy otrzymane drogą syntezy z D-aminokwasów także tworzą strukturę helisy α , natomiast polipeptydy otrzymane z racematów aminokwasowych nie mają tej zdolności.

Zagęszczenie aminokwasów, których łańcuchy boczne są nośnikami ładunków elektrycznych (Glu, Asp, His, Lys lub Arg), destabilizuje helisę α ze względu na oddziaływania elektrostatyczne pomiędzy grupami obdarzonymi ładunkiem. Ponadto aminokwasy z dużym (np. tryptofan) lub rozgałęzionym (np. walina czy izoleucyna) łańcuchem bocznym także destabilizują tę strukturę. Obecność proliny w łańcuchu białkowym powoduje zniekształcenie helisy α , gdyż azot wbudowany do pierścienia pirolidynowego zaburza geometrię wiązania peptydowego. Ponadto reszta prolilowa wbudowana do białka w pozycji n nie ma grupy N–H, a tym samym nie uczestniczy w tworzeniu wiązania wodorowego z grupą C=O reszty aminokwasowej występującej w pozycji $n+4$ (ryc. 4.7). W tym miejscu następuje zagięcie łańcucha białkowego.

Z badań nad syntetycznymi polipeptydami wynika, że polimery niektórych aminokwasów nie mogą w ogóle wytwarzać helisy α . Dotyczy to aminokwasów o łańcuchach polarnych obdarzonych ładunkiem elektrycznym, aminokwasów o łańcuchach rozgałęzionych oraz iminokwasów: proliny i hydroksyproliny.

Polilizyna w roztworze obojętnym zamiast helisy α wytwarza strukturę o przypadkowym układzie przestrzennym, zwaną „kłębką statycznym”. Dzieje się tak dlatego, iż w pH 7 wszystkie łańcuchy boczne lizyny są naładowane dodatnio. Nośnikami tego ładunku są uprotonowane grupy ϵ -aminowe ($-\text{NH}_3^+$) tego aminokwasu. Między nimi działają siły odpychania elektrostatycznego, uniemożliwiające powstanie między-



Ryc. 4.7. Porównanie wiązań peptydowych powstałych z udziałem dwóch α -aminokwasów: Ala i Ser (A) oraz α -aminokwasu Ala i iminokwasu Pro (B). Zwraca uwagę brak H przy atomie N – wbudowanym w strukturę pierścienia pirolidynowego proliny.

zwojowych wiązań wodorowych. Jednak w pH 12 grupy $-\text{NH}_3^+$ odłączają protony, przechodząc w elektrycznie obojętne grupy $-\text{NH}_2$. Zanikają siły odpychania elektrostatycznego pomiędzy łańcuchami bocznymi i polilizyna przyjmuje postać helisy α .

Poliglutaminian zachowuje się podobnie do polilizyny. W roztworze obojętnym tworzy kłębek statyczny, a w pH 2 – helisę α . Dzieje się tak dlatego, ponieważ w pH 7 wszystkie łańcuchy boczne glutaminianu są naładowane ujemnie. Nośnikami tego ładunku są zdysocjowane grupy γ -karboksylowe ($-\text{COO}^-$) tego aminokwasu. Między nimi działają siły odpychania elektrostatycznego, uniemożliwiające powstanie międzyzwojowych wiązań wodorowych. Jednak w pH 2 grupy $-\text{COO}^-$ wiążą protony, przechodząc w elektrycznie obojętne grupy $-\text{COOH}$. Zanikają siły odpychania elektrostatycznego pomiędzy łańcuchami bocznymi i poliglutaminian przyjmuje postać helisy α .

Polizoleucyna nie tworzy helisy α , gdyż rozgałęziony łańcuch boczny stwarza przeszkodę przestrzenną w zbliżeniu się grup C=O i N–H na odległość umożliwiającą powstanie międzyzwojowych wiązań wodorowych. Przeszkoda taka nie zachodzi w przypadku polileucyny, gdyż miejsce rozgałęzienia łańcucha bocznego leucyny jest dalej położone w stosunku do węgla α .

Poliseryna także nie tworzy struktury helisy α , gdyż grupy $-\text{OH}$, zawarte w łańcuchach bocznych reszt serylowych, uczestniczą w tworzeniu innych (konkurencyjnych) wiązań wodorowych.

Obecność aminokwasów destabilizujących i zniekształcających sprawia, iż struktura helisy α nie jest ciągła. Na przykład α -keratyna (białko występujące we włosach, paznokciach i w powierzchniowej warstwie naskórka) jest niemal całkowicie objęta strukturą helisy α , natomiast hemoglobina tylko w 80%, a lizozym (enzym trawiący ściany polisacharydowe komórek bakteryjnych) jedynie w 25%. Kolagen i elastyna (białka obfitujące w prolinę i hydroksyprolinę) nie są w ogóle zdolne do wytwarzania helisy α .

4.2.2. Struktura β

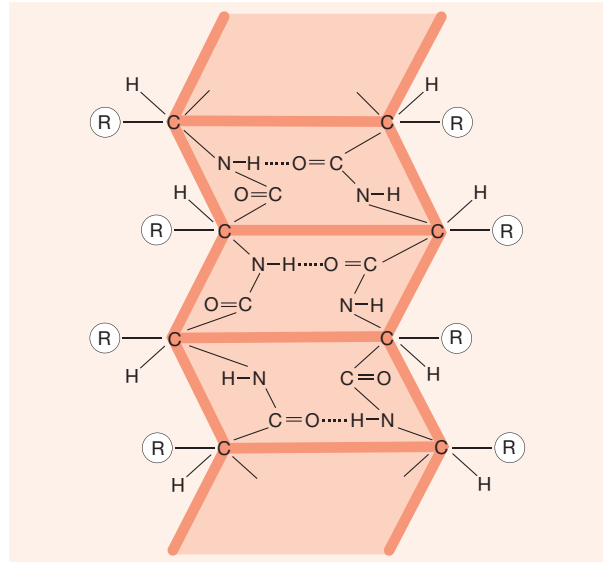
Struktura β zwana jest także strukturą pofałdowanej kartki lub strukturą harmonijki β . Łańcuch białkowy o strukturze β jest bardziej rozciągnięty w kierunku osiowym niż łańcuch o strukturze helisy α . Odległość dwóch sąsiednich reszt aminokwasowych jest ponad dwukrotnie większa niż w łańcuchu o strukturze helisy α i wynosi około 0,35 nm. W białkach o strukturze β nie występują wewnątrzłańcuchowe wiązania wodorowe pomiędzy grupami C=O (aminokwasu n) i grupami N-H (aminokwasu n + 4). Wiązania takie powstają natomiast pomiędzy grupami C=O i N-H sąsiednich łańcuchów i są usytuowane poprzecznie do ich długiej osi (ryc. 4.8).

Wiązanie peptydowe jest tak skonstruowane, iż atomy grup C=O i N-H oraz dwa sąsiednie atomy węgla tworzą jedną płaszczyznę. Węgiel α każdej reszty aminokwasowej jest miejscem styku tych płaszczyzn. Z tych względów białko o strukturze β może być traktowane jako układ sztywnych płaszczyzn ustawionych względem siebie pod pewnym kątem. Dlatego zasadne jest nazywanie tej formy przestrzennej białka strukturą pofałdowanej kartki lub strukturą harmonijki β (ryc. 4.8).

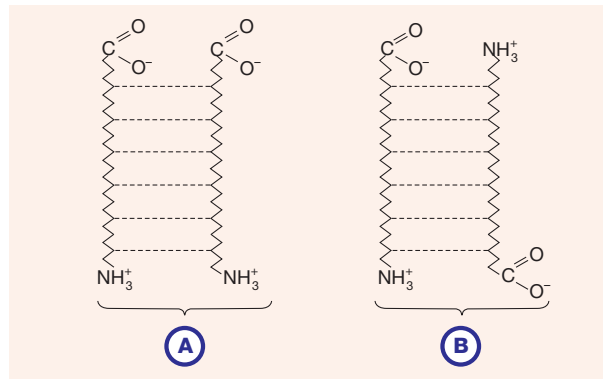
Strukturę β wykazują np. fibryna jedwabiu lub β -keratyna, powstająca przez rozciągnięcie łańcuchów α -keratyny pod działaniem rozgrzanej pary wodnej. Rozciągnięcie włókien (włosów, wełny) jest skutkiem rozerwania wewnątrzłańcuchowych wiązań wodorowych, występujących w α -keratynie i zastąpienie ich międzyłańcuchowymi wiązaniami wodorowymi występującymi w β -keratynie.

W tworzeniu struktury β uczestniczą zazwyczaj dwa lub więcej łańcuchów białkowych. Ich przebieg może być równoległy (równoległy), gdy końce aminowe i karboksylowe każdego z łańcuchów są skierowane w tę samą stronę, lub antyparalelny (przeciwrównoległy), gdy wspomniane końce poszczególnych łańcuchów są skierowane w przeciwną stronę (ryc. 4.9).

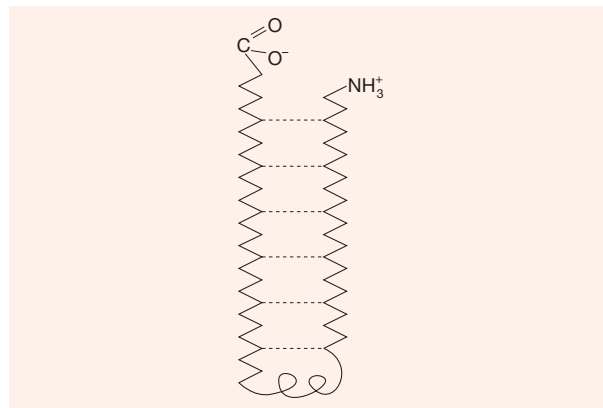
Łańcuchy białkowe o strukturze β często tworzą zagięcia, które zmieniają kierunek przebiegu długiej osi cząsteczki na przeciwny. Dzięki temu struktura β może powstawać także w obrębie jednego łańcucha, gdy poszczególne jego odcinki przebiegają równoległe względem siebie i wytwarzają między sobą wiązania wodorowe (ryc. 4.10). Wspomniane zagięcia umożliwiają upakowanie łańcucha białkowego w zwartą postać



Ryc. 4.8. Struktura β . Liniami kropkowymi zaznaczono międzyłańcuchowe wiązania wodorowe. Symbole R oznaczają łańcuchy boczne reszt aminokwasowych. Przedstawiono układ wzajemny sąsiadujących płaszczyzn.



Ryc. 4.9. Paralelny (A) i antyparalelny (B) układ łańcuchów białkowych objętych strukturą β , zespolonych wiązaniami wodorowymi.



Ryc. 4.10. Struktura β wytworzona w obrębie jednego łańcucha białkowego.

globularną (o kształcie zbliżonym do kuli). W miejscach zagięcia łańcuchów o strukturze β często występują: prolina, glicyna oraz aminokwasy z łańcuchami bocznymi obdarzonymi ładunkiem elektrycznym. Zagięcia te lokalizują się z reguły na powierzchni cząsteczek białkowych.

4.2.3. Struktury niepowtarzalne

W przybliżeniu połowa białek globularnych jest skonstruowana w ten sposób, iż całe cząsteczki bądź ich fragmenty są objęte strukturą helisy α lub strukturą β , bądź obie struktury występują naprzemiennie w różnych fragmentach tej samej cząsteczki. Są to struktury powtarzalne, występujące w różnych białkach.

Pozostałe białka lub fragmenty ich cząsteczek mają strukturę drugorzędową mniej uporządkowaną, niepowtarzalną, specyficzną dla pojedynczych bądź jedynie nielicznych białek. Nie oznacza to jednak, że struktura ta jest zupełnie chaotyczna. Jest po prostu mniej regularna. Łańcuchy białkowe tworzą różne, niepowtarzalne układy przestrzenne, swoiste dla określonych białek (pętle, kłębki i inne). Niekiedy struktury niepowtarzalne występują na przemian z helisą α i strukturą β w obrębie tej samej cząsteczki białkowej.

4.3. Struktura trzeciorzędowa białek

Struktura trzeciorzędowa określa sposób wtórnego, trójwymiarowego pofałdowania cząsteczki białka z zachowaniem wyżej opisanych elementów struktury drugorzędowej. Sposób przestrzennego upakowania cząsteczki białka jest zdeterminowany przez jego strukturę pierwszorzędową (a pośrednio także przez drugorzędową). Struktura trzeciorzędowa jest stabilizowana poprzez interakcje łańcuchów bocznych reszt aminokwasowych, zarówno poprzez wiązania kowalencyjne (mostki disiarczkowe), jak i wiązania niekowalencyjne o niskiej energii (wiązania wodorowe).

Struktura białek globularnych w roztworach wodnych jest zwarta. Hydrofobowe łańcuchy boczne reszt aminokwasowych są ukryte we wnętrzu cząsteczki, podczas gdy grupy hydrofilowe są zwykle usytuowane na jej powierzchni. Wszystkie grupy polarne (także te ukryte wewnątrz cząsteczek) wraz z elementami składowymi wiązań peptydowych uczestniczą w tworzeniu wiązań wodorowych i oddziaływań elektrostatycznych. Struktura helisy α i struktura β wytwarzają maksymalną liczbę wiązań wodorowych, przez co zmniejszają możliwość dostania się wody do hydrofobowego wnętrza cząsteczki białka.

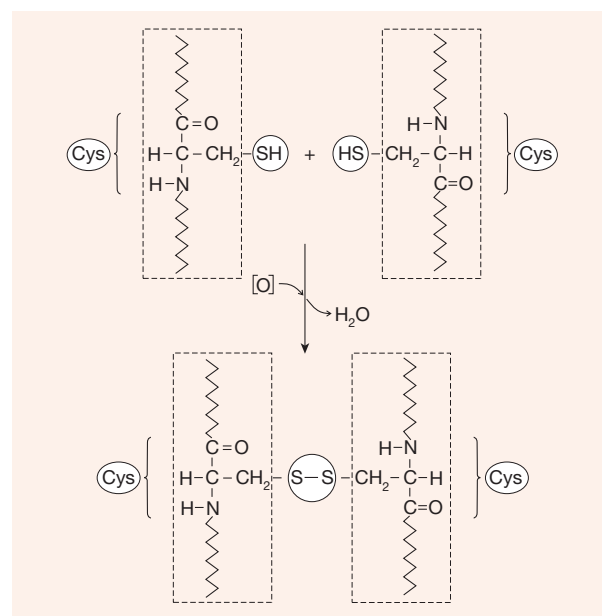
Istnienie struktury trzeciorzędowej jest możliwe dzięki istnieniu wiązań, które zespalają odległe od siebie liniowo

reszty aminokwasowe. Dzięki zagięciom łańcucha białkowego jego fragmenty odległe od siebie o kilkanaście, kilkadziesiąt (lub więcej) reszt aminokwasowych stają się bliskie przestrzennie. Mogą reagować ze sobą, tworząc poprzez niżej opisane wiązania stabilizujące strukturę trzeciorzędową.

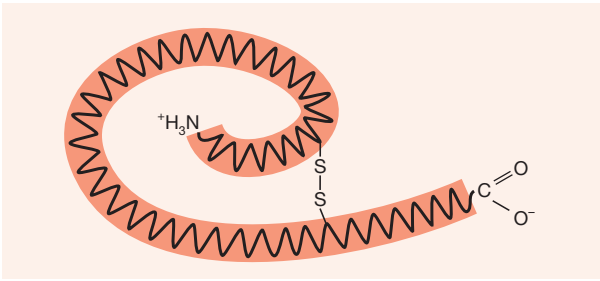
4.3.1. Wiązania stabilizujące strukturę trzeciorzędową

Mostki disiarczkowe są wiązaniami kowalencyjnymi, wytworzonymi przez grupy sulfhydrylowe ($-SH$) dwóch reszt cysteiny. Odłączenie pary atomów wodoru od dwóch grup $-SH$ prowadzi do wytworzenia mostka disiarczkowego ($-S-S-$), który tworzy „klamrę” zespalającą dwie odległe reszty cysteiny. W ten sposób dwie reszty cysteiny przekształcają się w jedną resztę cystyny (ryc. 4.11). Reszty cysteiny, uczestniczące w tworzeniu mostka disiarczkowego, są zazwyczaj bardzo oddalone od siebie i oddzielone wieloma resztami innych aminokwasów. Pofałdowanie (zagięcia) łańcucha polipeptydowego sprawia, że reszty te zbliżają się na odległość pozwalającą na interakcję grup $-SH$ i wytworzenie wiązania kowalencyjnego pomiędzy atomami siarki (ryc. 4.12). Mechanizm ten utrzuca strukturę trzeciorzędową. Mostki disiarczkowe występują szczególnie licznie w białkach wydzielanych poza komórkę. Prawdopodobnie chronią białko przed denaturacją w środowisku pozakomórkowym.

Wiązania hydrofobowe. W środowisku wodnym reszty aminokwasowe z niepolarnymi łańcuchami bocznymi mają



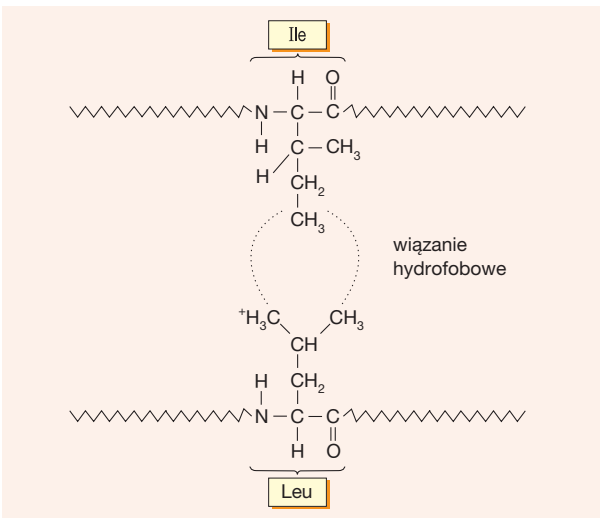
Ryc. 4.11. Powstawanie mostka disiarczkowego pomiędzy dwiema resztami cysteiny.



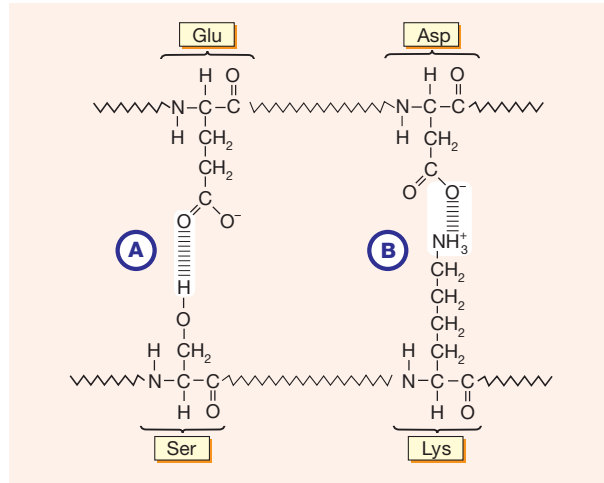
Ryc. 4.12. Mostek disiarczkowy łączący odległe od siebie reszty cysteiny, stabilizujący strukturę trzeciorzędową.

tendencję do lokalizacji w głębi cząsteczki białkowej i do asocjacji z innymi aminokwasami niepolarnymi (ryc. 4.13), natomiast reszty aminokwasowe z łańcuchami polarnymi zajmują miejsce na powierzchni cząsteczki. W środowisku lipidowym (niepolarnym), jakie stwarzają błony biologiczne, występuje zjawisko odwrotne. Hydrofobowe łańcuchy boczne aminokwasów lokują się na powierzchni cząsteczki białkowej, wchodząc w kontakt z hydrofobowymi lipidami, podczas gdy łańcuchy hydrofilne kierują się do wnętrza cząsteczki, unikając kontaktu z lipidami.

Wiązania wodorowe. Łańcuchy boczne aminokwasów zawierające wodór związany z tlenem lub z azotem, jak grupa $-OH$ seryny i treoniny lub grupa $-NH_2$ lizyny czy argininy, mogą tworzyć wiązania wodorowe z tlenem grup karbonylowych wiązań peptydowych lub z tlenem grup karboksylowych (ryc. 4.14). Te same grupy mogą tworzyć wiązania wodorowe z wodą, dzięki czemu cząsteczka białka pokrywa się płaszczem wodnym. Zjawisko to nosi nazwę hydratacji białek. Nadaje to białku rozpuszczalność w środowisku wodnym.



Ryc. 4.13. Wiązanie hydrofobowe pomiędzy łańcuchami bocznymi leucyny i izoleucyny.



Ryc. 4.14. Wiązanie wodorowe (A) i wiązanie jonowe (B) pomiędzy łańcuchami bocznymi reszt aminokwasowych.

Wiązania jonowe. Ujemnie naładowane grupy karboksylowe ($-COO^-$) w łańcuchach bocznych asparagianu i glutaminianu mogą reagować z dodatnio naładowaną grupą aminową ($-NH_3^+$) zawartą w łańcuchu bocznym lizyny lub z dodatnio naładowaną grupą guanidynową (ryc. 4.14) zawartą w łańcuchu bocznym argininy.

Domeny białkowe. Ze strukturą trzeciorzędową białek wiąże się pojęcie domen białkowych. Domena jest wydzielonym, zwartym fragmentem struktury trzeciorzędowej, pełniącym w białku określoną funkcję. Polipeptydy zawierające ponad 200 reszt aminokwasowych na ogół tworzą co najmniej dwie bądź więcej domen. Istnieją białka enzymatyczne zawierające po kilka domen, z których każda pełni inną funkcję katalityczną.

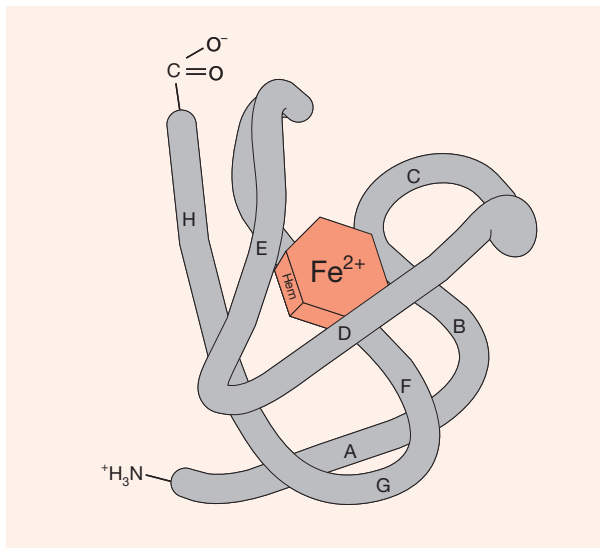
4.3.2. Przykłady struktur trzeciorzędowych

Mioglobina jest białkiem jednołańcuchowym, o masie cząsteczkowej 17 kDa i bardzo dobrze poznanej strukturze. Składa się ze 153 reszt aminokwasowych i trwale związanej cząsteczki hemu. Około 75% reszt aminokwasowych jest objętych strukturą α -helisy. Wyróżnia się 8 fragmentów o strukturze helisy α , zawierających od 7 do 23 reszt aminokwasowych. Fragmenty α -helikalne są rozdzielone odcinkami niehelikalnymi. Poszczególne fragmenty α -helikalne zostały oznaczone literami alfabetu łacińskiego od A do H, poczynając od końca aminowego. Poznano szczegółowo sekwencję aminokwasową tych fragmentów, a każdej reszcie aminokwasowej w nich zawartej przypisano odpowiedni symbol. Uwzględnia on nazwę literową fragmentu α -helikalnego i numer kolejny aminokwasu w obrębie tego fragmentu. Na przykład reszta histydylowa wiążąca hem zajmuje pozycję 93, licząc od końca aminowego

mioglobiny, a jest określana symbolem His F 8, ponieważ zajmuje pozycję 8 we fragmencie F.

Fragmenty α -helikalne mają charakter amfipatyczny. Łańcuchy boczne aminokwasów hydrofobowych, niepolarnych są skierowane do wnętrza cząsteczki, a wiązania hydrofobowe pomiędzy tymi łańcuchami mają zasadnicze znaczenie dla utrzymania struktury trzeciorzędowej tego białka. Powierzchnię cząsteczki tworzą łańcuchy boczne aminokwasów hydrofilnych (polarnych), wiążące wodę i zapewniające rozpuszczalność temu białku.

Cząsteczka hemu jest zakotwiczona pomiędzy helisami E i F. Hydrofobowy fragment cząsteczki jest „zatopiony” pomiędzy wymienionymi helisami i utrzymywany w tej pozycji



Ryc. 4.15. Struktura trzeciorzędowa mioglobiny.

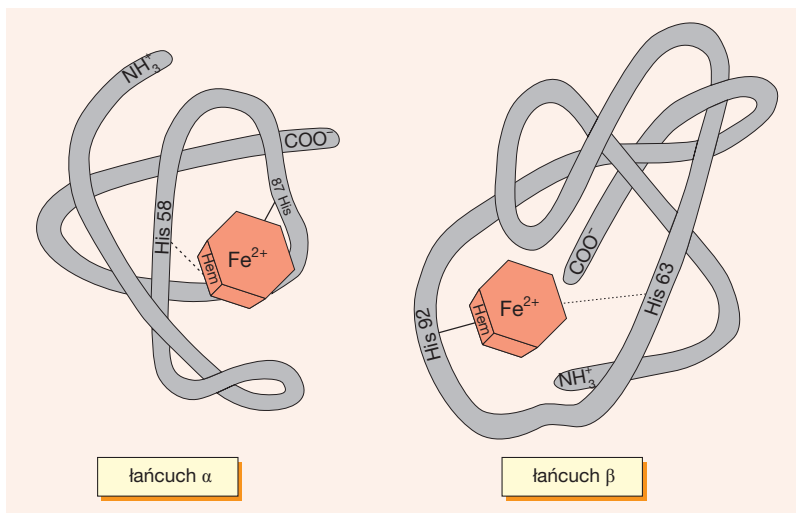
dzięki oddziaływaniom hydrofobowym z łańcuchami bocznymi aminokwasów niepolarnych (ryc. 4.15). Fragment polarny cząsteczki hemu, zawierający dwie zjonizowane grupy karboksylowe kwasu propionowego, jest skierowany w stronę środowiska wodnego.

Podobnie jak większość białek wewnątrzkomórkowych mioglobina nie zawiera mostków disiarczkowych, a jej struktura przestrzenna jest utrzymywana przez wiązania niekowalencyjne. Przy obniżeniu pH do 3,5 i wprowadzeniu mocznika do roztworu mioglobiny następuje dysocjacja hemu od części białkowej i utrata struktury α -helikalnej. Po usunięciu mocznika (poprzez dializę) i przywróceniu fizjologicznej wartości pH mioglobina ulega renaturacji, odzyskuje pierwotną strukturę przestrzenną, a hem powraca na swoje miejsce. Spostrzeżenie to sugeruje, iż naturalna (natywna) struktura przestrzenna mioglobiny jest termodynamicznie najbardziej korzystna, a struktura pierwszorzędowa mioglobiny (niewrażliwa na działanie czynnika denaturującego) zawiera w sobie informację niezbędną do wytworzenia charakterystycznych dla tego białka struktur wyższego rzędu.

Hemoglobina, a ściślej jej łańcuchy α i β , mają bardzo do siebie podobną strukturę trzeciorzędową i obydwa są podobne w tym względzie do mioglobiny (ryc. 4.16). Wpływa stąd wniosek, że podobna funkcja biologiczna tych białek, a mianowicie zdolność do odwracalnego wiązania tlenu, wynika z podobieństwa ich budowy przestrzennej.

Lizozym składa się ze 129 reszt aminokwasowych. Tylko 25% z nich jest objętych strukturą helisy α . Struktura trzeciorzędowa tego białka jest stabilizowana przez 4 mostki disiarczkowe. Występuje więcej zagięć łańcucha niż w przypadku mioglobiny.

Podobieństwo struktury przestrzennej białek wynika z obecności w określonych miejscach ich łańcuchów tych samych reszt aminokwasowych. Niektóre z nich powodują



Ryc. 4.16. Struktura trzeciorzędowa łańcuchów α i β hemoglobiny.

zagięcia łańcuchów w określonych miejscach, stwarzają możliwość wytworzenia mostków disiarczkowych o podobnej lokalizacji, a w białkach enzymatycznych uczestniczą w tworzeniu podobnych miejsc katalitycznych.

4.4. Struktura czwartorzędowa białek

Białka o wysokiej masie cząsteczkowej są zazwyczaj oligomerami składającymi się z dwóch lub większej liczby łańcuchów polipeptydowych (monomerów), zwanych podjednostkami. Bywają one jednakowe lub różne. Mogą funkcjonować niezależnie od siebie lub współdziałać ze sobą. Skład podjednostkowy i wzajemny układ przestrzenny podjednostek w obrębie jednej cząsteczki białkowej jest nazywany strukturą czwartorzędową białka. W odróżnieniu od struktur wyżej opisanych ta ostatnia występuje tylko w niektórych białkach.

Na ogół podjednostki białkowe uczestniczące w tworzeniu struktury czwartorzędowej są zespolone ze sobą wiązaniami niekowalencyjnymi o niskiej energii, jak: wiązania hydrofobowe, jonowe lub wodorowe. W niektórych białkach struktura ta jest stabilizowana poprzez mostki disiarczkowe pomiędzy resztami cysteiny należącymi do różnych podjednostek. Jedynie w kolagenie i elastynie występują bardzo stabilne wiązania kowalencyjne pomiędzy podjednostkami (rozdz. 36).

Badanie sekwencji aminokwasowej białek o strukturze czwartorzędowej wymaga postępowania wstępnego, polegającego na oddzieleniu poszczególnych podjednostek od siebie. Wiele białek oligomerycznych dysocjuje na podjednostki przy zmianach pH, pod działaniem roztworów mocznika, chlorowodoru guanidyny, β -merkaptetanolu, ditiotreitolu, wersejanu lub siarczany dodecylosodowego (SDS).

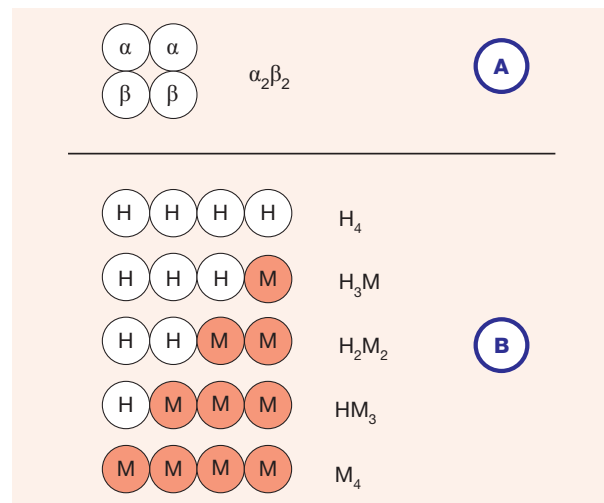
Zmiany pH wiążą się z modyfikacją ładunków elektrycznych na powierzchni cząsteczek białkowych, co w wielu przypadkach powoduje zanik oddziaływań elektrostatycznych pomiędzy podjednostkami. Stężone (4–6-molowe) roztwory mocznika lub chlorowodoru guanidyny rozrywają wiązania wodorowe zespalające podjednostki białkowe. β -merkaptetanol i ditiotreitol redukują mostki disiarczkowe. Tą drogą odtwarzają grupy $-SH$ reszt cysteinyłowych i uwalniają podjednostki zespolone tymi mostkami. Wersenian wiąże jony metali dwuwartościowych (np. Ca^{2+} , Mg^{2+}), tworząc z nimi niedysocjujące kompleksy. Powoduje to zanik międzyłańcuchowych wiązań jonowych, powstałych z udziałem tych metali. Siarczan dodecylosodowy (SDS) jest detergentem jonowym, który wiąże się z białkami, nadając ich cząsteczkom silny ładunek ujemny. Pojawiają się siły odpychania elektrostatycznego pomiędzy podjednostkami, powodujące rozpad białka o strukturze czwartorzędowej na elementy składowe.

W wielu przypadkach struktura czwartorzędowa białek, a pośrednio ich właściwości biologiczne, są modyfikowane przez substancje drobnocząsteczkowe, zwane efektorami allosterycznymi. Bardzo dobrze poznano strukturę czwartorzędową hemoglobiny oraz wielu białek enzymatycznych, a wśród nich przede wszystkim *dehydrogenazy mleczanowej*.

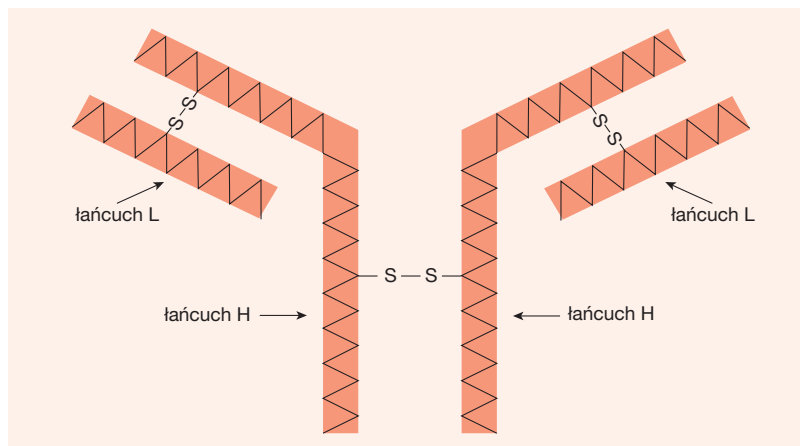
4.4.1. Przykłady struktur czwartorzędowych

Hemoglobina jest białkiem wiążącym i przenoszącym tlen. Występuje w krwinkach czerwonych. Jest zbudowana z czterech, parami jednakowych podjednostek (ryc. 4.17). Składa się z dwóch łańcuchów α (141 aminokwasów) i dwóch łańcuchów β (146 aminokwasów). Są one zespolone wiązaniami niekowalencyjnymi. Każda z podjednostek zawiera cząsteczkę hemu, a ten zawiera jon Fe^{2+} , który odwracalnie wiąże cząsteczkę tlenu. Wiązanie tlenu przez hemoglobinę nie zmienia stopnia utlenienia Fe^{2+} , dlatego proces ten nazwano utlenowaniem (a nie utlenianiem) hemoglobiny. Wykryto różnice w strukturze czwartorzędowej hemoglobiny utlenowanej i nieutlenowanej. Na skutek związania tlenu przez jedną z podjednostek zwiększa się odstęp między podjednostkami, co w konsekwencji zwiększa ich powinowactwo do tlenu. Ta modyfikacja struktury czwartorzędowej hemoglobiny przez tlen, a w konsekwencji zmiana jej zdolności do wiązania kolejnych cząsteczek tlenu, jest przykładem zjawiska określanego jako efekt allosteryczny. Tlen jest przykładem efektora allosterycznego dodatniego w stosunku do hemoglobiny.

Dehydrogenaza mleczanowa jest enzymem katalizującym odwracalną reakcję utleniania mleczanu do pirogrog-



Ryc. 4.17. Struktura czwartorzędowa hemoglobiny (A) i pięciu izoenzymów *dehydrogenazy mleczanowej* (B). Poszczególne podjednostki są zespolone wyłącznie wiązaniami niekowalencyjnymi.



Ryc. 4.18. Struktura czwartorzędowa immunoglobuliny G. W zespalaniu podjednostek L i H oraz H i H uczestniczą mostki disiarczkowe.

nianu lub redukcji pirogronianu do mleczanu (rozdz. 8.2). Występuje w postaci 5 izoenzymów różniących się składem podjednostkowym. Każdy z nich jest zbudowany z 4 łańcuchów: jednakowych (H lub M) bądź różnych (H + M), zespolonych wiązaniami niekowalencyjnymi. W mięśniu sercowym i w mózgu dominuje izoenzym o składzie H_4 , a w mięśniach szkieletowych – izoenzym o składzie M_4 . Trzy pozostałe, występujące w różnych tkankach, są kombinacjami podjednostek, a mianowicie: H_3M , H_2M_2 oraz HM_3 (ryc. 4.17).

Immunoglobulina G jest białkiem osoczym zbudowanym z 4 podjednostek. Są wśród nich dwa łańcuchy ciężkie (H) o masie cząsteczkowej 53 kDa i dwa łańcuchy lekkie (L) o masie cząsteczkowej 23 kDa (ryc. 4.18).

Fibronektyna jest składnikiem osocza i macierzy pozakomórkowej różnych tkanek. Składa się z dwóch podjednostek o masie cząsteczkowej około 220 kDa. W odróżnieniu od hemoglobiny i *dehydrogenazy mleczanowej*, których podjednostki są zespolone jedynie wiązaniami niekowalencyjnymi, struktura czwartorzędowa zarówno immunoglobuliny G, jak i fibronektyny jest stabilizowana międzyłańcuchowymi mostkami disiarczkowymi.

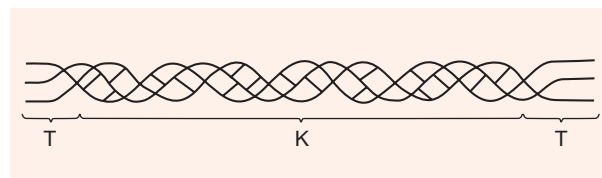
4.5. Struktura kolagenowa

Istnieje grupa białek, zwanych kolagenami, których struktura znacząco odbiega od wyżej opisanych. Kolageny cechują się nietypowym składem aminokwasowym, którego następstwem są struktury przestrzenne, niespotykane w innych białkach. Ponad 30% reszt aminokwasowych kolagenu stanowi glicyna, a około 12–15% stanowią reszty proliny. Na szczególną uwagę zasługuje obecność hydroksyproliny i hydroksylizyny, aminokwasów niezmiernie rzadko spotykanych w innych białkach

zwierzęcych oraz niska zawartość aminokwasów siarkowych i aromatycznych. Obecność dużej liczby reszt prolinowych i hydroksyprolinowych sprawia, iż łańcuchy kolagenów nie tworzą struktury α -helisy. Układają się w specyficzną dla tego białka strukturę przestrzenną, zwaną potrójną helisą kolagenową.

Podstawową jednostką strukturalną kolagenu jest **tropokolagen** (ryc. 4.19), cząsteczka złożona z trzech łańcuchów polipeptydowych, zwanych podjednostkami α . Mogą one być jednakowe $(\alpha_1)_3$, bądź różne: $(\alpha_1)_2\alpha_2$ lub $(\alpha_1\alpha_2\alpha_3)$, zależnie od typu kolagenu. Końcowe fragmenty łańcuchów α , zwane telopeptydami, mają odmienny skład aminokwasowy. Nie są one objęte strukturą potrójnej helisy.

Łańcuchy kolagenowe są bardziej rozciągnięte w kierunku osiowym niż łańcuchy białek o strukturze helisy α , ale mniej niż łańcuchy białek o strukturze β . Odległość osiowa dwóch sąsiadujących ze sobą reszt aminokwasowych w łańcuchu kolagenowym wynosi 0,29 nm (w α -helisie 0,15 nm, w strukturze β 0,35 nm). Z tego powodu kolagen nie wytwarza wiązań wodorowych pomiędzy zwojami tego samego łańcucha, natomiast wiązania takie powstają pomiędzy poszczególnymi łańcuchami potrójnej helisy. Struktura kolagenowa jest bardzo nietrwała. Kolagen ulega denaturacji już w temperaturze



Ryc. 4.19. Cząsteczka tropokolagenu. Zaznaczono międzyłańcuchowe wiązania wodorowe pomiędzy podjednostkami α . K – trzon cząsteczki objęty potrójną helisą kolagenową. T – telopeptydy nieobjęte strukturą potrójnej helisy.

40°C, podczas gdy większość białek denaturuje się dopiero w 58–60°C.

Szczególną właściwością kolagenu jest występowanie kowalencyjnych wiązań poprzecznych pomiędzy poszczególnymi łańcuchami α . Głównymi z nich są połączenia wytwarzane przez pochodne lizyny. Niektóre reszty lizylowe zawarte w telopeptydach zostają przekształcone w peptydowo związany aldehyd (allizynę). Aldehyd ten może reagować na drodze kondensacji aldolowej z cząsteczką allizyny sąsiedniego łańcucha lub tworzyć połączenie typu zasady Schiffa z grupą ϵ -aminową lizyny lub hydroksylizyny zawartej w sąsiednim łańcuchu. Wiązania te są trwałe. Nie rozpadają się pod działaniem czynników denaturujących. Opis tych wiązań przedstawiono w rozdz. 36.

4.6. Denaturacja białek

Denaturacja białka polega na zniszczeniu jego struktur przestrzennych z zachowaniem struktury pierwszorzędowej. Ciągłość łańcucha polipeptydowego pozostaje nienaruszona. Istotą denaturacji jest rozpad wiązań o niskiej energii, które stabilizują strukturę przestrzenną białka. Czynnikiem denaturującym są przede wszystkim: podwyższona temperatura (na ogół powyżej 58–60°C), rozpuszczalniki organiczne, kwasy, zasady, jony metali ciężkich (np. Hg^{2+} , Pb^{2+}), stężone roztwory mocznika lub chlorowodoru guanidyny.

Podwyższona temperatura, stężone roztwory mocznika lub chlorowodoru guanidyny rozrywają wiązania o niskiej energii, przede wszystkim wiązania wodorowe. Rozpuszczalniki organiczne wprowadzają nowe oddziaływania hydrofobowe pomiędzy fragmentami cząsteczki białka i cząsteczkami niepolarnego rozpuszczalnika. Metale ciężkie reagują z siarką grup sulfhydrylowych, uniemożliwiając tworzenie mostków disiarczkowych. Wpływ kwasów i zasad oraz SDS na strukturę czwartorzędową został już opisany. Pod wpływem tych czynników białko traci także strukturę czwarto-, trzecio- i drugorzędową.

Denaturacja białka na ogół zmienia jego rozpuszczalność. Białko rozpuszczalne traci rozpuszczalność, białko nierozpuszczalne staje się rozpuszczalne. Zdenaturowane białko traci aktywność biologiczną, np. enzym traci swoje właściwości katalityczne, przeciwciało zdolność wiązania antygeny, kolagen zdolność do tworzenia włókien, a hemoglobina zdolność do wiązania tlenu.

Denaturacja może być odwracalna, gdy czynnik denaturujący był łagodny i działał krótko. Usunięcie go sprawia, iż białko odzyskuje swą naturalną strukturę przestrzenną. Zjawisko to nosi nazwę renaturacji białka. Na ogół jednak denaturacja jest procesem nieodwracalnym.

4.7. Właściwości białek w roztworach

Rozpuszczalność białek jest bardzo zróżnicowana. Niektóre są całkowicie nierozpuszczalne (np. keratyna, elastyna), inne rozpuszczają się bardzo dobrze (albuminy), jeszcze inne wykazują znikomą rozpuszczalność (kolagen). Rozpuszczalnikami dla białek są: woda lub roztwory wodne soli, kwasów i zasad, mocznika lub detergentów. Rozpuszczalność w środowisku wodnym zależy przede wszystkim od obecności aminokwasów polarnych w cząsteczce białka. Białka o dużej zawartości tych aminokwasów cechują się dobrą rozpuszczalnością (np. albumina, hemoglobina). Grupy polarne łańcuchów bocznych aminokwasów wytwarzają wiązania wodorowe z cząsteczkami wody. Cząsteczki białka otaczają się płaszczem wodnym. Białka, w których dominują aminokwasy niepolarne, nie mają możliwości wiązania wody. Są nierozpuszczalne (np. keratyna, elastyna).

Roztwory białek są na ogół roztworami rzeczywistymi, o monomolekularnym stopniu dyspersji. Niekiedy jednak cząsteczki białek asocjują, tworząc agregaty złożone z dwóch do kilku cząsteczek. Roztwór białka przybiera wtedy cechy roztworu koloidalnego.

Białko w roztworze wodnym jest obdarzone ładunkami elektrycznymi, których nośnikami są zdysocjowane grupy karboksylowe, zawarte w łańcuchach bocznych asparagianu i glutaminianu oraz uprotonowane grupy ϵ -aminowe reszt lizylowych i uprotonowane grupy guanidynowe reszt arginylowych. Udział grup aminowych aminokwasów N-końcowych i grup karboksylowych aminokwasów C-końcowych w kształtowaniu ładunku elektrycznego cząsteczki białka jest niewielki. Grupy C=O i N-H wiązań peptydowych nie są nośnikami ładunków elektrycznych. W przedziale pH od 2 do 12 nie wiążą, ani nie oddają protonów. Sumaryczny ładunek elektryczny cząsteczki białka zależy więc od liczby i relacji ilościowych pomiędzy aminokwasami polarnymi. Niektóre łańcuchy boczne aminokwasów polarnych są ukryte we wnętrzu cząsteczki i nie uczestniczą w kształtowaniu jej ładunku elektrycznego.

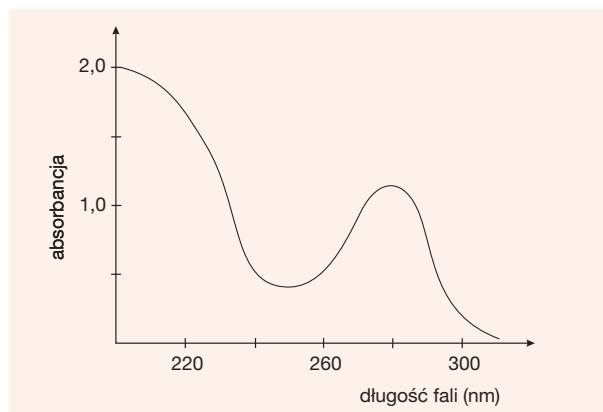
Środowisko kwaśne sprzyja wiązaniu protonów przez grupy aminowe, co nadaje białku ładunek dodatni. Nośnikami tego ładunku są grupy $-\text{NH}_3^+$. Środowisko zasadowe sprzyja dysocjacji grup karboksylowych i grup $-\text{NH}_3^+$. Pojawiają się ujemnie naładowane grupy $-\text{COO}^-$ i elektrycznie obojętne grupy $-\text{NH}_2$. Cząsteczka białka uzyskuje ładunek ujemny. W zależności od pH roztworu sumaryczny ładunek elektryczny tej samej cząsteczki białka może być dodatni bądź ujemny. Istnieje zatem pewna pośrednia wartość pH, różna dla poszczególnych białek, przy której liczby ładunków dodatnich i ujemnych równoważą się nawzajem, a sumaryczny ładunek elektryczny cząsteczki białka równa się zeru. Ta wartość pH nosi nazwę **punktu izoelektrycznego** (pI) białka.

Wartość pI waha się w szerokim zakresie pH. Białka o dużej zawartości aminokwasów zasadowych, np. chymotrypsynogen, rybonukleaza, cytochrom C, lizozym, mają pI w zakre-

się pH od 9 do 11. *Pepsyna*, bogata w aminokwasy kwaśne, ma $pI < 1$. Punkt izoelektryczny większości białek globularnych mieści się w przedziale pH od 4,5 do 6,5. Odpychanie elektrostyczne pomiędzy jednoimiennymi ładunkami powierzchniowymi cząsteczek białka jest (obok hydratacji) głównym czynnikiem utrzymującym białko w roztworze. W $pH = pI$ sumaryczny ładunek elektryczny cząsteczki białka równa się zeru, zanikają siły odpychania elektrostycznego. W punkcie izoelektrycznym rozpuszczalność białka jest najmniejsza.

Ładunek elektryczny cząsteczek białka sprawia, iż poruszają się one w polu elektrycznym. Kierunek ruchu i szybkość przemieszczania są zróżnicowane i zależą od ładunku elektrycznego białka i pH roztworu. Im wyższy ładunek elektryczny, tym szybciej białko przemieszcza się w kierunku odpowiedniego bieguna. W $pH < pI$ białko jest kationem i wędruje do katody, w $pH > pI$ jest anionem i wędruje do anody, natomiast w $pH = pI$ jest elektrycznie obojętne, nie porusza się w polu elektrycznym. Zróżnicowana ruchliwość elektroforetyczna pozwala na rozdział mieszaniny białek w polu elektrycznym. Technika ta nosi nazwę **elektroforezy**. Jest przydatna do izolacji, identyfikacji i charakterystyki białek.

Roztwory białek absorbują światło ultrafioletowe. Bardzo intensywnie pochłaniają światło o długości fali 190–230 nm, jednak absorpcja w tym zakresie długości fal świetlnych nie jest swoista dla białka. Różne substancje absorbują światło o tej długości fali. Charakterystyczny dla białka szczyt absorpcji przypada na 278–280 nm (ryc. 4.20). Zdolność ta wynika z obecności aminokwasów zawierających pierścień aromatyczny. Są to przede wszystkim tryptofan, w mniejszym stopniu tyrozyna, a w najmniejszym fenyloalanina. Właściwość ta została wykorzystana do wykrywania białka w roztworze oraz do oznaczania jego stężenia. Białka o niskiej zawartości aminokwasów aromatycznych, np. kolagen, nie wykazują charakterystycznego dla większości białek szczytu absorpcji światła o długości 278–280 nm, ale podobnie jak inne białka intensywnie absorbują światło o długości 190–230 nm.



Ryc. 4.20. Absorbancja światła ultrafioletowego o różnej długości fali przez roztwór białka.

4.8. Izolacja białek z materiału biologicznego

Poznanie budowy i właściwości białka staje się możliwe dopiero po jego izolacji z materiału biologicznego i doprowadzeniu go do stanu wolnego od zanieczyszczeń innymi składnikami tkanek. Bezwzględnym warunkiem wstępnym izolacji i oczyszczania białka jest przeprowadzenie go w postaci rozpuszczalną. Osiąga się to poprzez homogenizację tkanek w różnych płynach ekstrahujących, jak woda, sól fizjologiczna, bufony o różnym stężeniu i różnym pH. Urządzenia służące do rozbijania struktury tkanek noszą nazwę homogenizatorów. W trakcie homogenizacji tkanka przechodzi w dość jednorodną zawiesinę. W zależności od warunków homogenizacji można osiągnąć rozpad struktury narządu, rozpad komórek, a nawet struktur subkomórkowych. Podczas wirowania homogenatu jego nierozpuszczalne elementy osadzają się na dnie próbówki, a składniki rozpuszczalne pozostają w płynie nadosadowym, zwanym supernatantem.

Warunki ekstrakcji, a przede wszystkim skład płynu ekstrahującego, dobiera się w ten sposób, aby poszukiwanemu białku zapewnić optymalne warunki rozpuszczalności, a białkom zanieczyszczającym w maksymalnym stopniu utrudnić przechodzenie do roztworu. Nie w każdym przypadku jest to możliwe. Niektóre białka są bowiem zupełnie nierozpuszczalne, a próby ich rozpuszczenia z zastosowaniem drastycznych warunków ekstrakcji (wysoka temperatura, wysokie bądź niskie pH, stężony mocznik, detergenty) prowadzą do denaturacji białka, a nawet do naruszenia jego struktury pierwszorzędowej.

Możliwości oddzielenia poszczególnych składników tkanek od siebie, w tym także izolacji jednego białka z mieszaniny wielu białek, wynikają ze zróżnicowania ich właściwości fizykochemicznych, takich jak: rozpuszczalność, masa cząsteczkowa, ładunek elektryczny, punkt izoelektryczny, powinowactwo jednych cząsteczek do innych. Niezwykle rzadko udaje się uzyskać w pełni oczyszczone białko w wyniku zastosowania jednej z niżej opisanych technik izolacyjnych. Zwykle doprowadzenie białka do stanu jednorodności wymaga szeregu kolejno po sobie następujących procedur. Na każdym etapie uzyskuje się coraz to wyższy stopień oczyszczenia.

4.8.1. Ekstrakcja i wytrącanie białek z roztworu

Różnice w rozpuszczalności białek są podstawową właściwością wykorzystywaną do ich izolacji i oczyszczania. Jedne białka rozpuszczają się w wodzie, drugie w roztworach soli o różnym stężeniu, inne w roztworach kwaśnych lub alkalicz-

nych. Ekstrakcja tkanek różnymi rozpuszczalnikami umożliwia przeprowadzenie jednych białek w stan rozpuszczalny, podczas gdy inne pozostają w nierozpuszczalnym osadzie. Można je oddzielić przez wirowanie lub sączenie. Białka, które przeszły do roztworu, można dalej frakcjonować, np. poprzez dodawanie wzrastających ilości soli, najczęściej siarczanu amonowego, który jest substancją silnie hydrofilową, konkurującą z białkiem o wodę. Pozbawia on cząsteczki białka płaszcza wodnego (dehydratacja), a w konsekwencji prowadzi do jego precypitacji (wypadania z roztworu). Różne białka są w różnym stopniu podatne na dehydratacyjne działanie siarczanu amonowego. Przy stopniowym zwiększaniu stężenia tej soli kolejne białka wypadają z roztworu (można je oddzielić poprzez wirowanie), podczas gdy inne w nim pozostają. Dalszy wzrost stężenia siarczanu amonowego (aż do osiągnięcia stanu nasycenia roztworu) skutkuje wytrąceniem wszystkich białek.

Białko wytrącone siarczanem amonu można ponownie rozpuścić i poddać dalszemu frakcjonowaniu, opartemu na innych zasadach. Na przykład zmieniając pH roztworu można doprowadzić do precypitacji białka, które znalazło się w punkcie izoelektrycznym, podczas gdy inne białka pozostają nadal w roztworze.

4.8.2. Dializa i ultrafiltracja

Dializa jest prostą techniką laboratoryjną umożliwiającą oddzielenie białka od rozpuszczalnych substancji drobnocząsteczkowych. Istnieją tworzywa o właściwościach błon półprzepuszczalnych, które mają wystarczająco duże pory, aby przepuszczać wodę i małe cząsteczki w niej rozpuszczone, lecz stanowią barierę dla dużych cząsteczek. Dializa jest rutynowo stosowana do oczyszczania roztworów białka z drobnocząsteczkowych zanieczyszczeń. Roztwór białka, zawarty w zamkniętym worku dializacyjnym, umieszcza się w dużej objętości wody lub odpowiedniego buforu. W ciągu wielu godzin substancje drobnocząsteczkowe przechodzą na zewnątrz worka, aż do wyrównania stężeń po obydwu stronach błony półprzepuszczalnej. Mieszanie płynu dializacyjnego przyspiesza proces dializy. Tą metodą można też wymienić rozpuszczalnik, w którym pierwotnie rozpuszczono białko, np. sól fizjologiczna może być wymieniona na bufor fosforanowy bądź odwrotnie.

Zmodyfikowana dializa z zastosowaniem zwiększonego ciśnienia z zewnątrz wymusza przyspieszone przenikanie wody i substancji drobnocząsteczkowych na zewnątrz błony półprzepuszczalnej (ultrafiltracja), podczas gdy białko pozostaje w roztworze. Technikę ultrafiltracji stosuje się do zagęszczania roztworów białka. Jeżeli objętość roztworu zmaleje w razie, stężenie białka w tym roztworze wzrośnie w razie. W ten sposób osiąga się zmniejszenie objętości roztworu i zwiększenie stężenia białka.

4.8.3. Filtracja żelowa

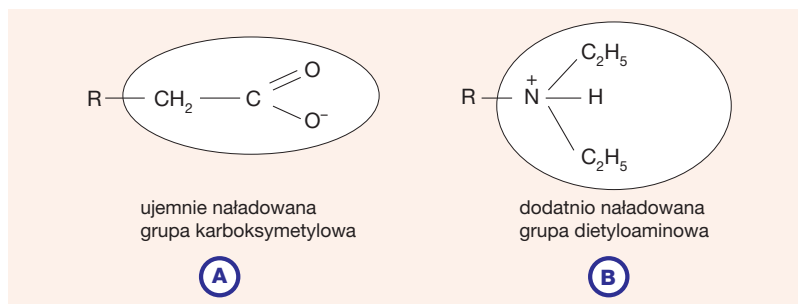
Filtracja żelowa jest procedurą polegającą na rozdzieleniu mieszaniny substancji rozpuszczalnych o różnej masie cząsteczkowej z użyciem „sit molekularnych”. Jest bardzo przydatna do oddzielania białek od substancji o niższej masie cząsteczkowej. Sitami molekularnymi są porowate żele otrzymane przez modyfikację chemiczną naturalnych polisacharydów (dekstranu, agarozy) lub uzyskane syntetycznie żele poliakrylamidowe. Są one znane pod handlowymi nazwami: Sephadex, Bio-gel, Sepharose itd. Mieszaninę białek rozpuszczonych w odpowiednim buforze nanosi się na szczyt kolumny wypełnionej jednym z wymienionych żeli i wypłukuje z kolumny tym samym buforem. Porowatość żelu jest tak dobrana, że większe cząsteczki białkowe omijają ziarna żelu i wypłukują się w pierwszej kolejności, podczas gdy mniejsze wnikają do ich wnętrza i wypłukują się z opóźnieniem. Pierwsze frakcje płynu wyciekającego z kolumny zawierają białka o najwyższej, a następne i dalsze, o coraz niższej masie cząsteczkowej.

Istnieją sita molekularne o różnym zakresie zdolności rozdzielczej. Sączenie molekularne jest przydatne także do oznaczania masy cząsteczkowej białek. Posługując się białkami o znanej masie cząsteczkowej, można wykreślić krzywą zależności pomiędzy logarytmem dziesiętnym masy cząsteczkowej a objętością elucyjną (objętość płynu potrzebna do wypłukania białka z kolumny). Mierząc objętość elucyjną białka można wyznaczyć jego masę cząsteczkową. Ta metoda pomiaru jest mało dokładna, ale bardzo prosta w wykonaniu.

4.8.4. Chromatografia jonowymienna

Chromatografia polega na rozdzieleniu mieszaniny substancji na elementy składowe w czasie jej przechodzenia przez kolumnę ze stałą, nierozpuszczalną substancją adsorbującą, zwaną żywicą jonowymienną. W czasie przechodzenia roztworu (faza ruchoma) przez kolumnę z żywicą (faza stała) zachodzi selektywne wiązanie pewnych białek na powierzchni fazy stałej, podczas gdy inne białka przechodzą swobodnie z fazą ruchomą przez kolumnę.

Chromatografia jonowymienna jest stosowana do rozdzielania białek różniących się ładunkami elektrycznymi. Używana do tego celu żywica jonowymienna jest polikationem lub polianionem. Aby rozdzielić mieszaninę białek, należy przepuścić tę mieszaninę przez kolumnę z żywicą będącą nośnikiem ładunku elektrycznego związanego z fazą stałą. Żywicą taką jest np. karboksymetyloceluloza (CM-celuloza), będąca nośnikiem grup $-\text{COO}^-$ (ryc. 4.21). Wiąże ona białka o ładunku dodatnim, dlatego jest nazywana kationitem. Ujemnie naładowane cząsteczki zawarte w mieszaninie przechodzą swobodnie przez kolumnę. Nie są wiązane, lecz odpychane przez ujemnie naładowane grupy związane z fazą stałą i wypłukują się z kolumny w pierwszej kolejności. Biał-



Ryc. 4.21. Nośniki ładunków elektrycznych CM-celulozy (A) i DEAE-celulozy (B).

ka naładowane dodatnio wiążą się z żywicą. Białka o słabym ładunku dodatnim wiążą się słabo, białka o wysokim ładunku dodatnim wiążą się mocno. Zwiększając stopniowo stężenie soli w roztworze przepływającym przez kolumnę, doprowadza się do rozpadu wiązań pomiędzy białkiem a żywicą. W miarę wzrostu stężenia soli, np. NaCl, jony Na⁺ coraz skuteczniej konkurują z białkiem kationowym o ujemne ładunki żywicy. Białko słabiej związane wypłukuje się w pierwszej kolejności, przy niższym stężeniu soli; białko mocniej związane wypłukuje się później, przy wyższym stężeniu soli.

W przypadku żywicy, będącej nośnikiem ładunku dodatniego, występuje sytuacja odwrotna. Wiąże ona białka o ładunku ujemnym (aniony), stąd nazwa anionit. Żywicą taką jest np. dietyloaminoetyloceluloza (DEAE-celuloza), posiadająca dodatnio naładowane grupy $-NH^+$ (ryc. 4.21). Dodatnio naładowane cząsteczki zawarte w mieszaninie przechodzą swobodnie przez kolumnę. Nie są wiązane, lecz odpychane przez dodatnio naładowane grupy związane z fazą stałą i wypłukują się z kolumny w pierwszej kolejności. Białka naładowane ujemnie wiążą się z żywicą. Te o słabym ładunku ujemnym wiążą się słabo, a te o wysokim mocno. Zwiększając stopniowo stężenie soli w roztworze przepływającym przez kolumnę, doprowadza się do rozpadu wiązań pomiędzy białkiem a żywicą. W miarę wzrostu stężenia soli, np. NaCl, jony Cl⁻ coraz skuteczniej konkurują z białkiem anionowym o dodatnie ładunki żywicy. Białko słabiej związane wypłukuje się wcześniej, przy niższym stężeniu soli; białko mocniej związane wypłukuje się później, przy wyższym stężeniu soli.

4.8.5. Chromatografia powinowactwa

Chromatografia powinowactwa polega na wybiórczym wiązaniu się niektórych białek z innymi substancjami, np. enzym wykazuje powinowactwo do swojego koenzymu lub do substratu. Koenzym lub substrat (rozd. 5) można związać ze stałym, nierozpuszczalnym nośnikiem, niewchodzącym w interakcję z białkami. Na kolumnę z tak przygotowanym nośnikiem wprowadza się mieszaninę białek. Jedynie enzym

zostaje związany przez koenzym lub substrat unieruchomiony na kolumnie. Pozostałe białka zawarte w roztworze przepłyną swobodnie przez kolumnę. Związane białko enzymatyczne można uwolnić z kolumny, przepłukując ją roztworem powodującym dysocjację powstałego kompleksu. Koenzym lub substrat pozostaje unieruchomiony na kolumnie, natomiast białko enzymatyczne zostaje wypłukane z kolumny. Tą metodą w wielu przypadkach uzyskuje się bardzo wysoki stopień oczyszczenia białka.

4.8.6. Chromatografia wysokociśnieniowa (HPLC)

Tradycyjne metody chromatograficzne mają pewne wady. Są to procedury długotrwałe (wielogodzinne), prowadzą do rozcieńczenia białka w płynie wypłukującym białko z kolumny. Im dłużej trwa procedura rozdzielania, tym większa jest skłonność białka do rozcieńczenia się w roztworze. Długotrwałość procedury chromatograficznej sprzyja uszkodzeniom białka w trakcie jego oczyszczania. Istotnym postępowaniem w tej dziedzinie było wprowadzenie chromatografii wysokociśnieniowej, zwanej także chromatografią wysokosprawną, określaną skrótem HPLC (*high-performance liquid chromatography*). W technice tej stosuje się wymuszony, szybki przepływ roztworów przez kolumnę z żywicą pod wysokim ciśnieniem. Dzięki temu proces trwający wiele godzin może być przeprowadzony w ciągu kilku – kilkudziesięciu minut.

4.8.7. Elektroforeza

Większość białek jest obdarzona ładunkiem elektrycznym, dlatego przemieszcza się w polu elektrycznym do bieguna dodatniego lub ujemnego. Wartość tego ładunku można modyfikować poprzez zmianę pH roztworu. Prędkość migracji białka w kierunku jednej z elektrod zależy od wielkości ładunku elektrycznego. Białko o wysokim ładunku przemieszcza się szybko, białko o niskim ładunku porusza się wolno. Białko

elektrycznie obojętne (będące w punkcie izoelektrycznym) nie przemieszcza się w kierunku elektrod.

Technika rozdzielania białek, oparta na zróżnicowaniu ich ruchliwości w polu elektrycznym, nosi nazwę elektroforezy. Na ogół elektroforezę wykonuje się na stałych nośnikach, np. na żelu poliakrylamidowym lub agarozowym. Po zakończeniu rozdzielania dokonuje się fragmentacji żelu i wypłukuje białka z różnych jego fragmentów.

4.8.8. Ogniskowanie izoelektryczne

Ogniskowanie izoelektryczne jest techniką elektroforetyczną wykorzystującą to, iż białko znajdujące się w punkcie izoelektrycznym traci ruchliwość w polu elektrycznym. Mieszanie białek wprowadza się do kolumny wypełnionej amfolitem (mieszaniną substancji rozpuszczalnych o charakterze poli-amino-polikarboksylowym). Składniki mieszaniny, będące nośnikami ładunku ujemnego, wędrują do bieguna dodatniego. Składniki, będące nośnikami ładunku dodatniego, wędrują do bieguna ujemnego. W polu elektrycznym wytwarza się gradient pH. Przy jednym z biegunów pH jest niskie, przy drugim wysokie. Pomiędzy biegunami wytwarza się pH pośrednie, stopniowo rośnie lub maleje.

Białko, zależnie od swego ładunku, wędruje w kierunku katody lub anody, napotykając po drodze miejsce, w którym $pH = pI$ danego białka. W tym miejscu białko staje się jodem obojętnym, traci swoją ruchliwość elektroforetyczną. Każde spośród białek zawartych w mieszaninie zatrzymuje się w miejscu odpowiadającym jego punktowi izoelektrycznemu. Po odłączeniu źródła prądu i otwarciu zaworu w dnie kolumny zbiera się kolejne frakcje amfolitu. Białka różniące się wartością pI znajdują się w różnych frakcjach. Jest to bardzo skuteczna metoda rozdzielania. Pozwala na oddzielenie białek różniących się minimalnie wartością pI .

4.9. Funkcje biologiczne białek

Białka pełnią w organizmie szereg ważnych funkcji. Będą one szczegółowo omawiane w kolejnych rozdziałach. Oto główne z nich.

Funkcje strukturalne. Białka są podstawowym elementem składowym komórek i macierzy pozakomórkowej. Wraz z lipidami tworzą błony plazmatyczne oddzielające komórki od ich środowiska. Złożony system błon dzieli wnętrze komórki na szereg przedziałów. Niektóre białka pozakomórkowe (np. kolagen, elastyna, integryny) pełnią funkcje podporowe, integrują ze sobą różne elementy składowe tkanek i nadają im wytrzymałość mechaniczną. Kolagen jest głównym składni-

kiem białkowym kości, chrząstki, ścięgien, skóry oraz tkanki łącznej stanowiącej zrąb narządów mięsnych. Elastyna wchodzi w skład więzadeł, skóry i ścian naczyń krwionośnych (głównie tętnic). Zapewnia tym tkankom sprężystość. Integryny zakotwiczone w błonach komórkowych zespalają komórki ze sobą oraz ze składnikami macierzy pozakomórkowej.

Funkcje katalityczne. Większość reakcji biochemicznych wymaga udziału katalizatorów biologicznych, zwanych enzymami. Prawie wszystkie z nich są białkami. Przyspieszają one (co najmniej milion razy) przebieg reakcji i nadają im odpowiedni kierunek.

Funkcje transportowe. Komórka wymienia różne składniki z otaczającym ją środowiskiem. Wspecjalizowane białka pełnią funkcję przenośników transbłonowych, przemieszczają różne składniki pobrane ze środowiska zewnętrznego do komórki lub z komórki do przestrzeni pozakomórkowej. Niektóre z nich przemieszczają składniki komórki pomiędzy jej poszczególnymi przedziałami (np. cytozolem i mitochondrium albo cytoplazmą i jądrem komórkowym). Przenośniki te umożliwiają transport transbłonowy przede wszystkim: cukrów prostych, aminokwasów i jonów nieorganicznych. Dość liczna grupa białek uczestniczy w transporcie między narządowym. Nierozpuszczalne tłuszcze, wchłonięte z przewodu pokarmowego lub powstałe w wątrobie, wchłaniają się do krwi. Tworzą z białkami osoczymi rozpuszczalne kompleksy lipoproteinowe. W tej formie mogą być transportowane do odległych narządów. Ponadto białka osocze transportują metale (np. Fe, Cu), niektóre hormony, witaminy i leki.

Wiązanie wody. Hydrofilny charakter większości białek sprawia, iż są one podstawowym czynnikiem wiążącym wodę w organizmie. Regulują rozmieszczenie wody pomiędzy osoczem krwi krążącej i przestrzenią pozanacyniową oraz wnętrzem komórek i przestrzenią pozakomórkową.

Stabilizacja pH. Białka uczestniczą w utrzymywaniu równowagi kwasowo-zasadowej w komórkach, w macierzy pozakomórkowej i w płynach ustrojowych. Amfoteryczny charakter białek sprawia, iż mogą one zarówno wiązać, jak i uwalniać protony. Wiązanie H^+ przez grupy $-NH_2$ i $-COO^-$ zapobiega zakwaszeniu, a uwalnianie H^+ przez grupy $-COOH$ i $-NH_3^+$ zapobiega alkalizacji.

Funkcje hemostatyczne. Białka uczestniczą w procesie krzepnięcia krwi. Przerwanie ciągłości ściany naczyniowej sprawia, iż krew wydostaje się poza naczynia. W wyniku szeregu reakcji enzymatycznych fibrynogen – rozpuszczalne białko osocza – zostaje przekształcony w nierozpuszczalną fibrynę wypełniającą ubytek w ścianie naczynia i zapobiegającą nadmiernej utracie krwi.

Kurczliwość mięśni. Białka (przede wszystkim aktyna i miozyna) są głównymi składnikami mięśni. Wzajemna przesuwalność włókien aktyny i miozyny względem siebie umożliwia skurcz i rozkurcz mięśnia.

Funkcje hormonalne. Liczne hormony, produkowane przede wszystkim przez przedni płat przysadki mózgowej i trzustkę, są białkami lub polipeptydami o wysokiej masie cząsteczkowej.

Funkcje receptorowe. Niektóre białka, zlokalizowane w błonach plazmatycznych lub w cytoplazmie, posiadają zdolność wiązania odpowiednich hormonów. Są one nazywane receptorami tych hormonów. Także inne substancje (niebędące hormonami) mają swoje receptory.

Funkcje odpornościowe. Białka zwane immunoglobulinami lub przeciwciałami uczestniczą w inaktywacji bakterii, wirusów i innych czynników obcego pochodzenia. Chronią organizm przed infekcjami.

Źródło aminokwasów. Rozpad białek pokarmowych i białek tkankowych jest głównym źródłem wolnych aminokwasów.