

15. POLIPEPTYDY I BIAŁKA

Iwona Żak

Białka są zbudowane z pojedynczego lub kilku łańcuchów polipeptydowych. Masy cząsteczkowe białek mieszczą się w szerokich granicach od 10 000 Da (daltonów) do kilku milionów daltonów (1Da = 1/12 masy izotopu węgla ^{12}C ; 1kDa = 1000 Da). Białka proste (proteiny) zbudowane jedynie z aminokwasów stanowią nieliczną grupę, znacznie powszechniejsze są białka złożone (proteidy), które zawierają trwale wbudowany składnik niebiałkowy, np. cukrowy (glikoproteiny), lipidowy (lipoproteiny), ortofosforan (fosfoproteiny), jon metalu (metaloproteiny) lub składnik barwny (chromoproteiny).

Białka wykazują różnorodną aktywność biologiczną, np. enzymatyczną, hormonalną, transportową, czynników transkrypcyjnych, czynników wzrostu i różnicowania komórek, ochrony immunologicznej, „detektorów”, „generatorów” i „przekazników” sygnałów oraz inne.

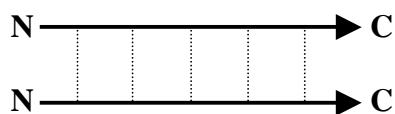
W budowie białek wyróżnia się kilka poziomów organizacji ich struktury, mianowicie: pierwszorzędową, drugorzędową, trzeciorzędową i czwartorzędową.

⇒ **Struktura pierwszorzędowa** to liniowa sekwencja kolejnych aminokwasów połączonych wiązaniami peptydowymi. Struktura pierwszorzędowa białka obejmuje również położenia wszystkich innych wiązań kowalencyjnych, w tym wiązań disiarczkowych, między resztami cysteiny. Wszystkie polipeptydy, z wyjątkiem cyklicznych, mają dwa różne końce, mianowicie N- i C-koniec. Początkiem każdego polipeptydu jest jego N-koniec, czyli ten, na którym znajduje się aminokwas z wolną grupą α -aminową. Rzeczywistym końcem polipeptydu jest C-koniec, na którym znajduje się aminokwas z wolną grupą α -karboksylową. Sekwencję aminokwasów przedstawia się zawsze, poczynając od N-końca polipeptydu. Struktura pierwszorzędowa polipeptydu zdeterminowana jest genetycznie, specyficzną sekwencją nukleotydów w DNA. Sekwencja polipeptydu zawiera informację o złożonej strukturze przestrzennej polipeptydu, tj. o konformacji. Informacja genetyczna, determinująca konformację białka, czyli przestrzenne ułożenie atomów w strukturze (kształt polipeptydu), warunkuje funkcje białka.

peptydowych biegną równolegle do osi helisy. W α -helisie mogą być wyczerpane wszystkie możliwe wiązania wodorowe między atomami różnych wiązań peptydowych, z wyjątkiem miejsc, w których znajdują się aminokwasy destabilizujące i uniemożliwiające wytworzenie wiązań wodorowych. Prolina zmienia kierunek łańcucha polipeptydowego i przerywa strukturę α -helisy, jeśli więc aminokwas ten jest obecny, to tylko na końcu α -helisy.

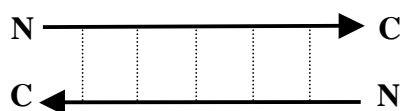
⇒ **Struktura harmonijkowa, czyli struktura- β** , jest rozciągnięta, odległość między dwoma sąsiednimi atomami C_α wynosi 0,35 nm. Dlatego odległości między atomami wiązań peptydowych liniowo sąsiadujących wzdłuż polipeptydu są duże, aby mogły wytworzyć wiązania wodorowe. W strukturze- β wiązania wodorowe mogą powstać tylko między różnymi rejonami tego samego polipeptydu, które równolegle przylegają do siebie, lub między odrębnymi polipeptydami. W pojedynczym polipeptydzie o strukturze- β wiązania wodorowe między atomami wiązań peptydowych mogą być tworzone tylko między odległymi sekwencjami, a nie sąsiadującymi liniowo, co znamienne odróżnia tę strukturę od α -helisy.

Równoległa struktura- β to taka, w której przylegające do siebie rejony polipeptydu lub odrębne polipeptydy ułożone są w tym samym kierunku, to znaczy, że z tej samej strony mają swe N-końce, a z drugiej strony C-końce.



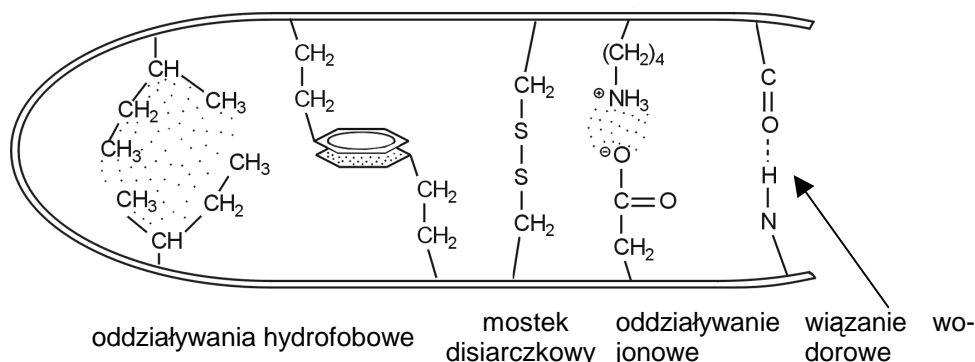
Antyrównoległa struktura- β to taka, w której przylegające do siebie rejony polipeptydu lub odrębne polipeptydy ułożone są w przeciwnych kierunkach, to znaczy, że z tej samej strony jeden ma N-koniec, a drugi C-koniec. Kierunek prze-

□



biegu łańcucha polipeptydowego odwracają **zwroty- β** , w których tlen karbonylowy jednego wiązania peptydowego jest połączony wiązaniem wodorowym z wodorem grupy aminowej czwartego z kolei wiązania peptydowego. Zwroty- β często łączą końce antyrównoległych struktur- β w obrębie pojedynczego polipeptydu. Następnym występowaniem wielokrotnych, wielowarstwowych struktur- β jest duża wytrzymałość i sztywność białek, w których występują. Rejony polipeptydu, nie przyjmujące jednej z omówionych regularnych struktur drugorzędowych, pozostają w **konformacji zwoju** lub **pętli**.

⇒ Struktura trzeciorzędowa to przestrzenne ułożenie całego polipeptydu, czyli jego kształt, który jest stabilizowany wzajemnymi oddziaływaniami bocznych reszt aminokwasowych. Przestrzenna konformacja polipeptydu utrzymuje się dzięki różnym oddziaływaniom i wiązaniom, przedstawionym na poniższym rysunku:

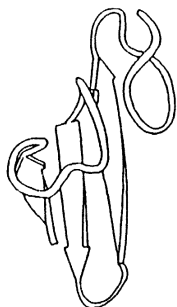


Oddziaływania te sprawiają, że liniowe rejonu szkieletu polipeptydowego (o konformacji helikalnej lub harmonijkowej) zginają się i fałdują w przestrzeni tak, że zbliżają do siebie odległe liniowo sekwencje. Rozpuszczalne polipeptydy zazwyczaj przybierają kształt globularny. Środowisko sprzyja fałdowaniu łańcucha polipeptydowego. Utrzymywanie na powierzchni sekwencji hydrofobowych, zwróconych do środowiska hydrofilnego jest niekorzystne energetycznie. Woda wypycha ze swego otoczenia niepolarne łańcuchy boczne aminokwasów, dzięki temu sekwencje zawierające te aminokwasy chowają się w hydrofobowym wnętrzu makrocząsteczki, natomiast większość polarnych sekwencji z łańcuchami bocznymi obdarzonymi ładunkami pozostaje na powierzchni struktury trzeciorzędowej. Zupełnie odmienna sytuacja może mieć miejsce w obrębie struktury trzeciorzędowej integralnego białka błonowego. Zwykle powierzchnia zwrócona do dwuwarstwy lipidowej takiego białka jest hydrofobowa, a jego wnętrze hydrofilne.

Ostateczny kształt polipeptydu może być dwojaki, globularny lub fibrylarny. Globularne polipeptydy mają kształt zbliżony do kulistego, natomiast fibrylarnie polipeptydy mają kształt wydłużony, prosty. Niektóre polipeptydy posiadają regiony o sekwencji 40–100 reszt aminokwasowych, zdolne do tworzenia odrębnej trójwymiarowej struktury niezależnej od struktury pozostałej części makrocząsteczki, zarówno pod względem strukturalnym jak i funkcjonalnym.

Regiony te zwane są modułami peptydowymi (*ryc. 1*), a białka zawierające zestaw kilku różnych modułów – białkami mozaikowymi.

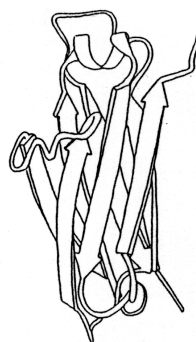
Struktura modułu ma stabilny globularny kształt, odmienny od reszty cząsteczki, który pozostaje zachowany po wyizolowaniu jednostek z natywnego biał-



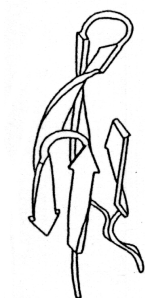
moduł EGF-podobny
(G)



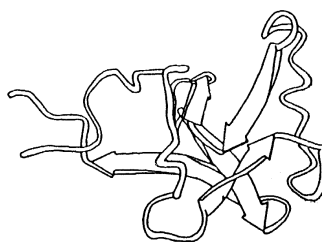
moduł CCP
(C)



moduł Ig (I)
immunoglobulinowy



moduł fibronektynowy
typ I (F1)



moduł tzw. Kringle
(K)

Ryc. 1. Konformacje przestrzenne niektórych modułów białkowych (wg. 27, zmodyfikowane). Rejony o strukturze β przedstawiono w postaci płaskich strzałek.

ka. Niekiedy do utrzymania ich dominującej struktury trzeciorzędowej wymagane mogą być dodatkowe czynniki stabilizujące, w rodzaju kowalencyjnych wiązań disiarczkowych lub jonów metali. Zwykle moduły odpowiadają pojedynczym eksynom, mającym tę samą fazę na granicy intron-ekson. Liczba znanych modułów pod względem sekwencji aminokwasowej przekracza wartość 40, z czego około 15 scharakteryzowano pod względem struktury trzeciorzędowej. Wśród nich znajdują się moduły uczestniczące w interakcjach typu białko-białko, takie jak immunoglobulinowe (Ig), epidermalnego czynnika wzrostowego (EGF), białek dopełniacza (CCP), fibronektynowe typ I (F1), kringle (K), lub uczestniczące w interakcjach typu białko-DNA, takie jak motywy: palca cynkowego, zamka leucynowego, heliks-skret-heliks. Znaczna część struktury drugorzędowej modułów uczestniczących w interakcjach białko-białko występuje w uporządkowanej konformacji z dominacją fragmentów o strukturze- β , które poprzedzielane są nieregularnymi luźnymi pętlami. Struktury- β o układzie antyrównoległym, rzadziej równoległym, tworzą upakowany, stabilny rdzeń modułu, natomiast rejony luźnych pętli znajdują się na powierzchni modułu (ryc. 1).

Dla modułów uczestniczących w oddziaływaniach typu białko-DNA bardziej charakterystyczna jest przewaga rejonów o strukturze α -helisy. Charakterystyczną cechą modułów stanowi ich szczególna sprawność w rozpoznawaniu i wiązaniu innych białek lub DNA. Specyficzność oddziaływania nadaje moduł, który bezpośrednio uczestniczy w kontakcie. Miejscami oddziaływań mogą być np. krótkie sekwencje aminokwasowe rozpoznania adhezyjnego, które są eksponowane powierzchniowo na module.

⇒ **Struktura czwartorzędowa** jest najwyższym poziomem organizacji białek, zbudowanych z dwóch lub więcej polipeptydów, dotyczy zatem jedynie białek oligomerycznych. Struktura czwartorzędowa określa wzajemne położenia i oddziaływania poszczególnych polipeptydowych podjednostek składających się na kształt białka oligomerycznego. Oddziaływaniami tymi mogą być zarówno wiązania kowalencyjne, mianowicie wiązania disiarczkowe, lub oddziaływania niekowalencyjne, tj. wiązania wodorowe, oddziaływania hydrofobowe i jonowe. Białka oligomeryczne, zależnie od ilości budujących je podjednostek, mogą być dimerami, trimerami, tetramerami itd. Jeśli podjednostki mają identyczną sekwencję, to tworzą homomery, np. homodimer, natomiast jeśli podjednostki mają różną sekwencję, to tworzą heteromery, np. heterodimer. Istnieje ścisły związek między strukturą (kształtem) białka, a jego funkcją. Zmiana kształtu białka moduluje jego funkcję, czego przykładem są białka allosteryczne, np. hemoglobina.

Struktura, którą białka posiadają w organizmie i dzięki której zdolne są pełnić swe funkcje biologiczne, nazywana jest natywną konformacją białka. Natywna konformacja białka stanowi formę najbardziej stabilną termodynamicznie w śro-

dowisku naturalnym organizmu (układ *in vivo*) lub w środowisku, które odpowiada warunkom naturalnym, ale poza organizmem (układ *in vitro*).

WŁASNOŚCI FIZYKOCHEMICZNE BIAŁEK

Wielkość białek waha się w granicach 5–100 nm, ich roztwory mają charakter koloidowy. Trwałość ciekłych roztworów koloidowych, czyli zoli, zależy m.in. od ładunku rozproszonych cząstek białkowych, stopnia uwodnienia i temperatury. Zmiany tych czynników mogą prowadzić do łączenia się cząstek w większe skupienia, czego konsekwencją może być spadek rozpuszczalności i wypadanie ich z roztworów (koagulacja). Zol może przechodzić odwracalnie w żel, czyli w formę elastycznego ciała stałego, proces ten nazywa się żelatynowaniem. W żelu cząstki białkowe wiążą się ze sobą, tworząc układy przestrzenne. Cechą białek jest powolna dyfuzja i niezdolność do dializy, czyli do przenikania przez błony półprzepuszczalne. Dzięki temu można oczyszczać roztwory białek ze związków drobnocząsteczkowych przez dializę.

Większość białek dobrze rozpuszcza się w wodzie lub rozcieńczonych roztworach soli, kwasów lub zasad. O rozpuszczalności decyduje przede wszystkim ich zdolność do hydratacji, budowa chemiczna, obecność soli w środowisku i pH roztworu. Hydratacja białka polega na wiązaniu dipoli wody z grupami polarnymi łańcuchów bocznych aminokwasów oraz z atomami N i O wiązań peptydowych, w konsekwencji cząstka białkowa otoczona jest płaszczem wodnym. Ilość wody hydratacyjnej związanej z białkiem może być rzędu 0,3–0,4 g na 1 g białka. Woda hydratacyjna stanowi nieodłączną i zmienną część cząstki białkowej, która wpływa na właściwości strukturalne oraz funkcjonalne białka. Uwodnienie i pęcznienie jest wspólną cechą białek rozpuszczalnych, a także nierozpuszczalnych.

Białka wykazują różną wrażliwość na działanie czynników chemicznych i fizycznych, w tym na zmiany pH oraz temperatury. Bardzo wrażliwe na te warunki są zazwyczaj białka globularne. Choć większość białek jest termolabilna, są również termostabilne, np. kazeina.

Jeden z czynników określających właściwości fizykochemiczne poszczególnych białek to ładunek elektryczny cząsteczki, który wynika z obecności zjonizowanych grup funkcyjnych w łańcuchach bocznych aminokwasów białka. Określony ładunek elektryczny poszczególnych białek zależy od ilości i rodzaju grup zdolnych do jonizacji oraz od stężenia jonów H^+ w roztworze białka. Wartość pH, w którym cząsteczka białka zawiera tę samą liczbę zjonizowanych grup dodatnich i ujemnych, odpowiada punktowi izoelektrycznemu (pI) białka, wówczas jego sumaryczny ładunek równy jest zero. W tych warunkach (w pI) nie wędruje ono w polu elektrycznym, ma najniższą rozpuszczalność i najmniejszą lepkość. W pH niższym od pI białko wykazuje ładunek dodatni, zachowuje się jak kation. W pH

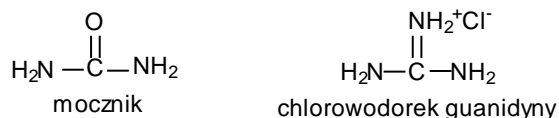
wyższym od pI białko wykazuje ładunek ujemny, zachowując się jak anion. Białka kwaśne mają niską wartość pI, która np. dla pepsyny wynosi 1, a 4,8 dla albuminy, głównego białka surowicy. Białka zasadowe mają wysoką wartość pI, która przykładowo dla cytochromu c wynosi 10,6, a dla histonów 10–11.

Denaturacja białek

Denaturacja polega na zniszczeniu (w różnym stopniu) struktury drugo-, trzecio- lub czwartorzędowej białka, czyli natywnej konformacji, czego konsekwencją jest utrata specyficznych biologicznych aktywności białek.

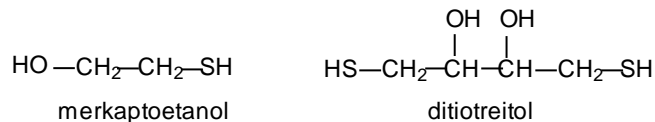
Denaturacja białek zachodzi pod wpływem różnych czynników, zarówno chemicznych jak i fizycznych. Zjawisko to obserwujemy pod wpływem wysokiej temperatury, mocnych kwasów lub zasad nieorganicznych, niektórych kwasów organicznych, rozpuszczalników organicznych, takich jak: alkohol lub aceton w temperaturze pokojowej, oraz kationów metali ciężkich. W zależności od intensywności działania tych czynników (w tym czasu oddziaływania), wielkość zmian denaturacyjnych może być różna, od minimalnych do całkowitego zniszczenia oddziaływań stabilizujących konformację białka. Z drugiej strony, jedne białka są bardziej wrażliwe na czynniki denaturujące (np. lipoproteiny), inne są stosunkowo stabilne (np. albuminy).

Czynnikami denaturującymi, często wykorzystywanymi w badaniach doświadczalnych są roztwory: 8M mocznika lub 6M chlorowodoru guanidyny, które zrywają w białku wiązania niekowalencyjne.



Ważnym czynnikiem denaturującym jest anionowy detergent siarczan dodecylu sodu (SDS), który niszczy niemal wszystkie oddziaływania niekowalencyjne w natywnych białkach. Aniony SDS wiążą się w stosunku jeden anion na dwie reszty aminokwasowe, nadając powstałemu kompleksowi SDS ze zdenaturowanym białkiem duży ujemny ładunek, który jest znacznie wyższy niż natywnego białka i w przybliżeniu jest proporcjonalny do masy cząsteczkowej białka.

Czynniki redukujące białka: β-merkaptoetanol i ditiotretiol, mogą całkowicie redukować mostki disiarczkowe w białku do grup –SH i wraz z mocznikiem sprawiać, że łańcuch polipeptydowy przybiera konformację kłęбка statycznego.



Zdenaturowane białka, poza utratą aktywności biologicznej, charakteryzują się zmienionymi własnościami fizykochemicznymi. Mianowicie mają zmniejszoną rozpuszczalność w punkcie izoelektrycznym i często ulegają wytrąceniu (koagulacji) z roztworu, zwłaszcza w pH bliskim pI danego białka. W zdenaturowanych białkach zwiększa się aktywność grup chemicznych, ukrytych wewnątrz cząsteczki, zwłaszcza dotyczy to grup fenolowych tyrozyny, -SH cysteiny i -S-S- cystyny. Zdenaturowane białka charakteryzują się wzrostem asymetrii cząsteczek, wzrostem kąta skręcenia płaszczyzny światła spolaryzowanego oraz zwiększoną podatnością na hydrolizę enzymatyczną. Denaturacja białek oligomerycznych oraz zmodyfikowanych posttranslacyjnie jest praktycznie nieodwracalna. Proces ten może być odwracalny dla białek niezmodyfikowanych, stosunkowo prostych (zbudowanych z pojedynczego polipeptydu), takich jak rybonukleaza, która może ulegać renaturacji, po usunięciu czynnika denaturującego, włącznie z odzyskaniem aktywności biologicznej.

ANALIZA SKŁADU I SEKWENCJI BIAŁEK

Iwona Żak, Anna Balcerzyk

Skład aminokwasowy białka wyznacza się zwykle po jego hydrolizie kwasowej, np. w 6M HCl w temperaturze 110°C przez 24 godz. W tych warunkach tryptofan ulega prawie całkowitemu rozłożeniu, a częściowemu cystyna i metionina.

W celu uwolnienia tryptofanu z łańcucha polipeptydowego praktycznie bez strat stosuje się hydrolizę zasadową roztworem Ba(OH)₂, gotując hydrolizat przez 24 godziny.

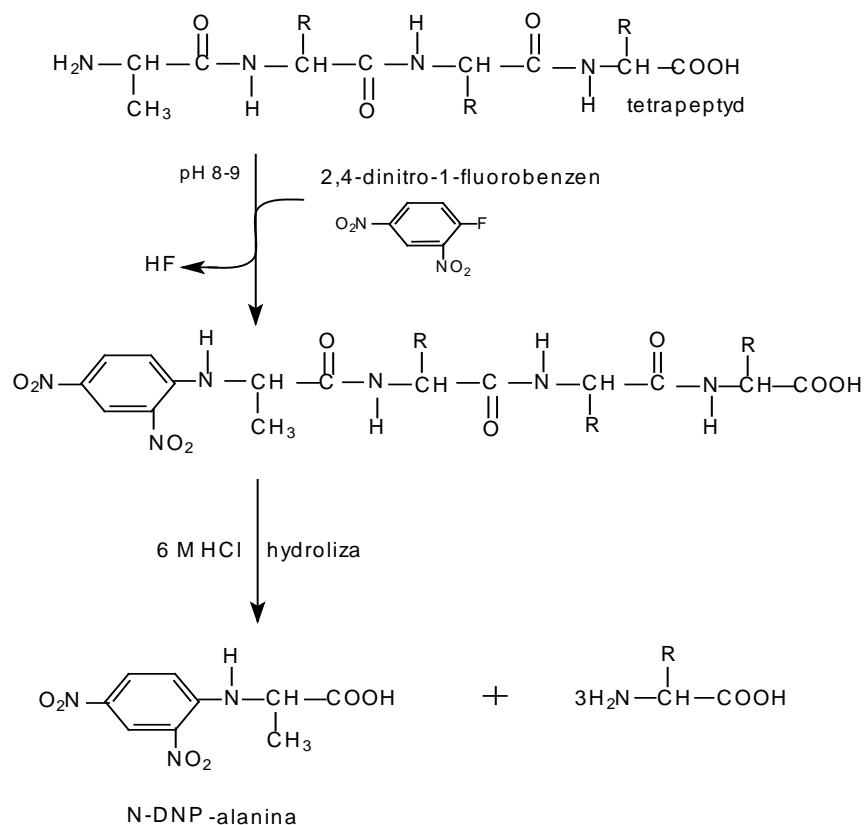
W celu oznaczenia w białku cystyny i metioniny bez strat, przed kwaśną hydrolizą poddaje się białko reakcji utleniania, w wyniku której z cystyny powstaje kwas cysteinowy, a z metioniny sulfon metioniny, produkty te są odporne na długotrwałe gotowanie z kwasem solnym.

Otrzymane hydrolizaty poddaje się rozdzielaniu, na poszczególne aminokwasy metodą chromatografii, np. cienkowarstwowej lub jonowymiennej. Aminokwasy wykrywa się, stosując reakcję barwną, np. z ninhydriną. Ilość każdego amino-

kwasu można ustalić przez porównanie uzyskanej absorpcji ze znaną ilością danego aminokwasu w próbie wzorcowej.

Analiza składu aminokwasowego pozwala określić, w jakich stosunkach molarowych występują poszczególne aminokwasy w polipeptydzie, ale nie dostarcza informacji o ich kolejności.

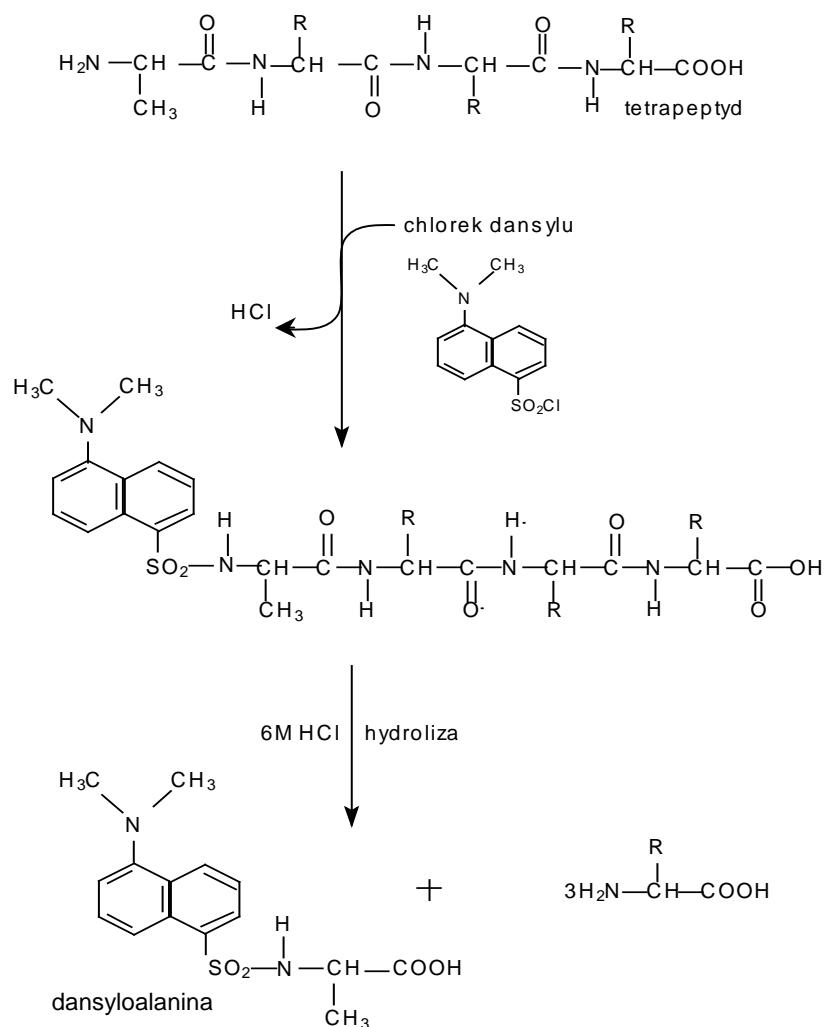
Określając strukturę pierwszorzędową polipeptydu można zidentyfikować aminokwasy N- i C-końcowe oraz poznać sekwencję aminokwasów w łańcuchu polipeptydowym. Najłatwiej jest **zidentyfikować N-końcowy aminokwas**. W tym celu przeprowadza się reakcję znakowania polipeptydu specyficznym związkiem (np. 2,4-dinitro-1-fluorobenzenem lub chlorkiem dansylu czy też chlorkiem dabsylu), który tworzy stabilne wiązanie kowalencyjne z wolną grupą α -aminową aminokwasu. Frederick Sanger, który określił sekwencję 51 aminokwasowej insuliny, użył 2,4-dinitro-1-fluorobenzenu (DNFB), który reagując w środowisku zasadowym (pH 8–9) z wolną grupą α -aminową podstawia swój rodnik 2,4-dinitrofenylowy (DNP) w miejsce jednego atomu wodoru grupy aminowej. W reakcji tej (ryc. 2) powstaje żółto zabarwiona N-DNP-pochodna aminokwasu N-końcowego,



Ryc. 2. Przebieg reakcji Sangera – dinitrofenylowania N-aminokwasu.

która po uwolnieniu w wyniku hydrolizy kwaśnej polipeptydu (6M HCl) może być łatwo zidentyfikowana chromatograficznie. DNFB kondensuje również z dodatkowymi grupami aminowymi aminokwasów zasadowych, z pierścieniem imidazolowym histydyny, z grupą –SH cysteiny, z grupami –OH seryny i tyrozyny. Większość DNP-pochodnych aminokwasów można wyekstrahować z hydrolizatu eterem, natomiast w fazie wodnej pozostają (poza wolnymi aminokwasami) DNP-lizyna, DNP-arginina, DNP-histydyna, DNP-cysteina i O-DNP-tyrozyna.

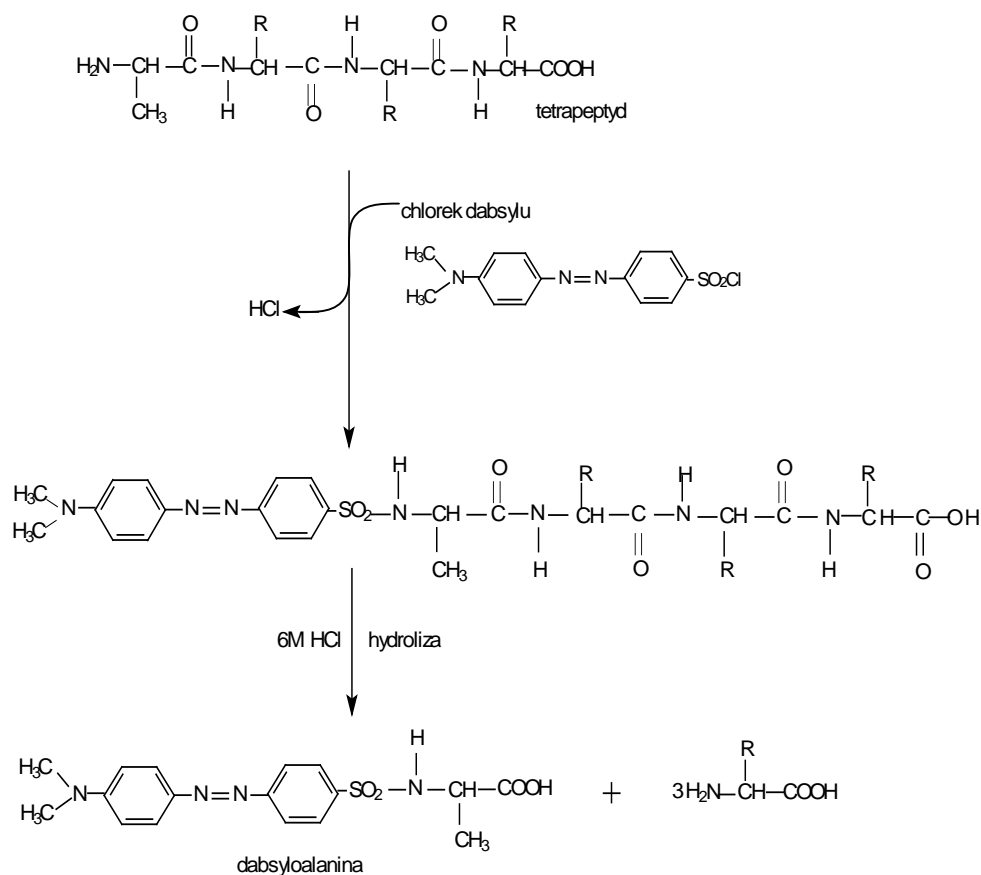
Zastosowanie chlorku dansylu (1-dimetylaminaftaleno-5-sulfonylu) (DNS) do znakowania N-końcowego aminokwasu jest reakcją 100-krotnie czulszą od di-nitrofenylowania (ryc. 3). Dansylowe pochodne aminokwasów (sulfonamidy) sil-



Ryc. 3. Przebieg reakcji dansylowania N-aminokwasu

nie fluoryzują w świetle nadfioletowym i można je wykryć w ilościach rzędu 10^{-10} – 10^{-9} mola.

Równie czuła jest reakcja kondensacji N-końcowych aminokwasów z chlorem dabsylu (ryc. 4), dostarczająca intensywnie zabarwione pochodne dabsylowe aminokwasów N-końcowych, które po hydrolizie identyfikuje się na podstawie własności chromatograficznych.

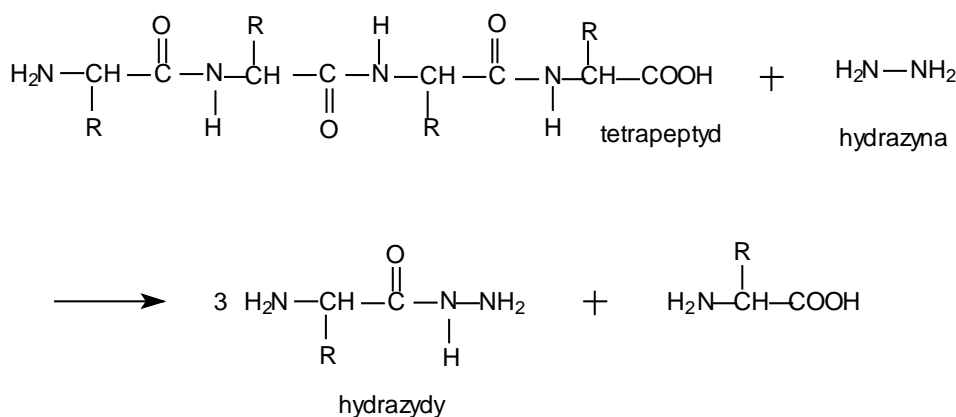


Ryc. 4. Przebieg reakcji dabsylowania N-aminokwasu.

Mimo dużej czułości większości omówionych metod oznaczania aminokwasów N-końcowych, nie można ich stosować wielokrotnie do analizy tej samej próby polipeptydu, ponieważ podczas hydrolizy kwasowej polipeptyd ulega całkowitej degradacji do wolnych aminokwasów.

Identyfikację C-końcowego aminokwasu można przeprowadzić na drodze **hydrazynolizy**.

Reakcja w podwyższonej temperaturze między bezwodną hydrazyną a polipeptydem powoduje rozerwanie wiązań peptydowych z wytworzeniem hydrazydów wszystkich aminokwasów z wyjątkiem aminokwasu C-końcowego (ryc. 5). Wolny aminokwas można oddzielić od mieszaniny hydrazydów i zidentyfikować, lecz stopień odzysku aminokwasów jest niski.

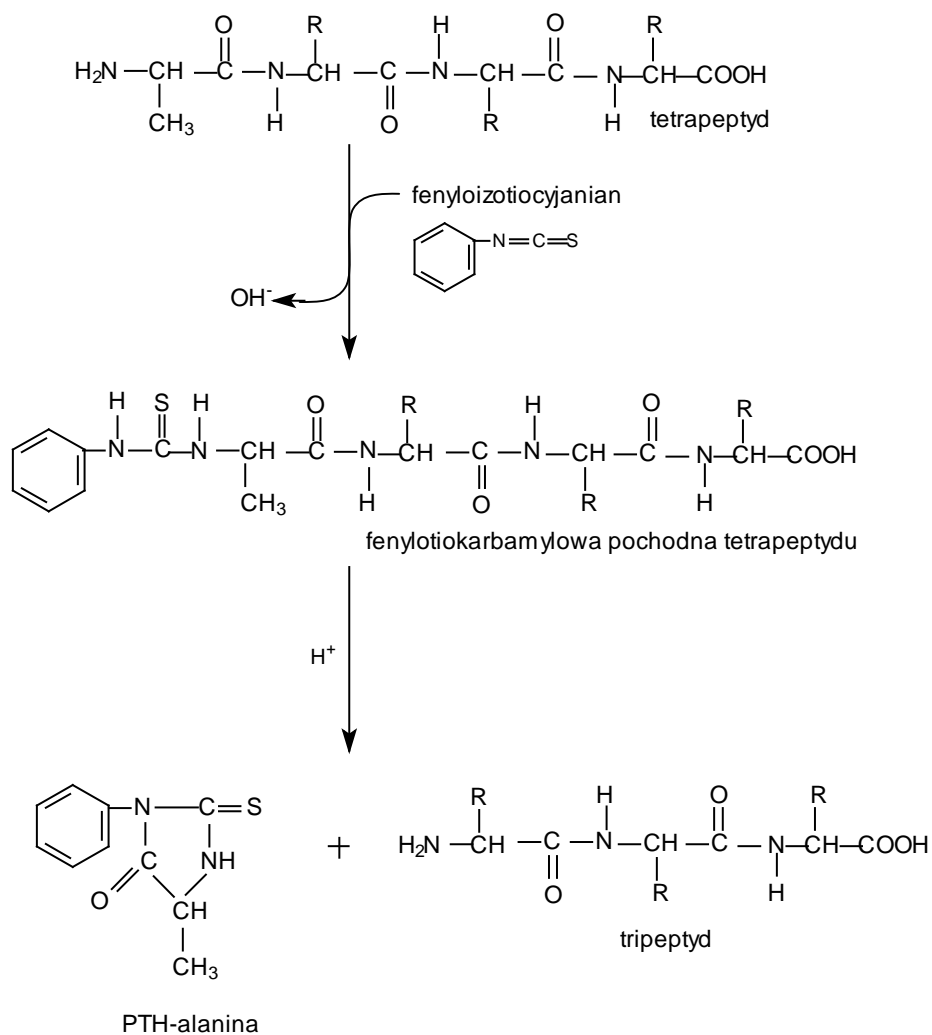


Ryc. 5. Przebieg reakcji hydrazynolizy.

Alternatywną drogę prowadzącą do identyfikacji C-końcowego lub N-końcowego aminokwasu stanowi **hydroliza enzymatyczna polipeptydu** z zastosowaniem specyficznych egzopeptydaz, mianowicie karboksypeptydaz, które odszczepiają po jednej reszcie aminokwasowej od C-końca począwszy, lub aminopeptydaz odszczepiających kolejne reszty od N-końca. Karboksypeptydaza A charakteryzuje się szeroką specyficznością, z C-końca polipeptydu najszybciej uwalnia Tyr, Phe, Trp, Leu, Ile, Met, Thr, Gln, His, Ala, Val, nie uwalnia Pro, ani Arg, natomiast pozostałe aminokwasy odłącza wolno lub bardzo wolno. Karboksypeptydaza B odłącza od C-końca polipeptydu tylko aminokwasy zasadowe. W degradacji enzymatycznej ideałem byłoby, gdyby enzym odszczepiał tylko jeden aminokwas (od C- lub N-końca) i dalej nie działał, jednak tak nie jest, ponieważ enzym po odszczepieniu jednego aminokwasu zaraz odszczepia następny, który pojawił się na końcu. Dlatego produkt reakcji enzymatycznej stanowi mieszanina wolnych aminokwasów i oligopeptydów.

Wszystkie powyższe sposoby postępowania wymagają stosunkowo dużej ilości białka do analiz, co nie zawsze da się osiągnąć, wówczas jest to ujemna strona wszystkich omówionych wyżej metod analizy polipeptydów.

Idealną reakcją pozwalającą na **ustalenie sekwencji aminokwasów** od N-końca polipeptydu jest **degradacja Edmana**, która polega na reakcji znakowania N-końcowego aminokwasu fenylizotiocyanianem, który w środowisku zasadowym reaguje z wolną grupą α -aminową, tworząc fenylotiokarbamyłową pochodną peptydu (ryc. 6). W środowisku lekko kwaśnym z pochodnej tej odszczepia się 2-fenyl-2-tiohydantoinowa (PTH) pochodna N-końcowego aminokwasu i jednocześnie uwalnia się peptyd pomniejszony o jeden aminokwas (N-końcowy). Skrócony o jedną resztę aminokwasową peptyd może zostać poddany kolejnemu cyklo-

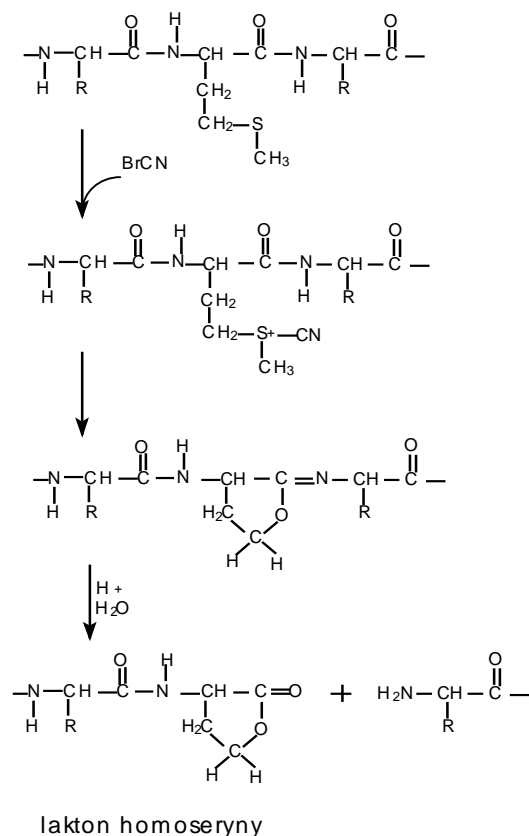


Ryc. 6. Przebieg degradacji Edmana polipeptydu.

wi znakowania i odszczepiania. Uwolnione PTH-aminokwasy mogą być zidentyfikowane chromatograficznie, np. wysokociśnieniową chromatografią ciekłą (HPLC). Technika sekwencjonowania białek została zautomatyzowana, automat służący do ustalania sekwencji aminokwasów nazywa się sekwenatorem, w którym degradację Edmana prowadzi się w fazie stałej. Technika została udoskonalona do tego stopnia, że jest możliwe poznanie sekwencji około 50 aminokwasów od N-końca polipeptydu, wykorzystując pikomolowe ilości materiału wyjściowego.

W celu ustalenia sekwencji długiego polipeptydu należy go najpierw rozciąć na mniejsze fragmenty składające się z 20–50 reszt, które po rozdeleniu poddaje się sekwencjonowaniu. Specyficzne pocięcie polipeptydu można osiągnąć metodami chemicznymi lub enzymatycznymi.

Specyficzną chemiczną hydrolizę polipeptydu można przeprowadzić **bromocyjanem** (BrCN), który rozrywa wiązanie peptydowe utworzone przez grupę karboksylową metioniny (ryc. 7). W wyniku tej reakcji metionina zostaje przekształcona w lakton homoseryny, znajdujący się na C-końcu jednego z dwóch pep-



Ryc. 7. Przebieg chemicznej hydrolizy polipeptydu bromocyjanem.

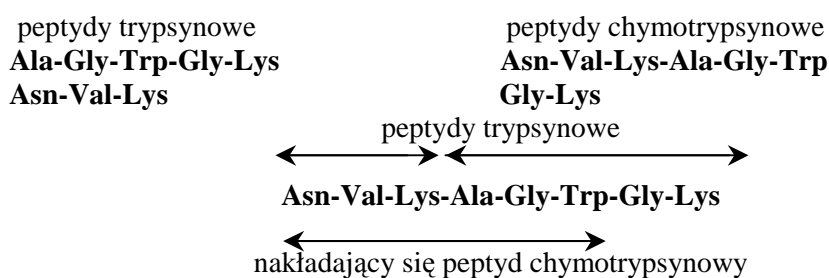
tydów powstających w wyniku rozbicia łańcucha polipeptydowego, zawierającego jedną resztę metioninową. Jeśli polipeptyd zawiera więcej reszt metioniny, wówczas w wyniku hydrolizy powstanie więcej peptydów, np. gdy obecne są 2 reszty metioniny, to powstaną 3 peptydy, gdy 3 reszty metioniny, to 4 peptydy itd.

W chemicznej hydrolizie zamiast bromocyjanu można zastosować hydroksylaminę, która rozrywa wiązanie peptydowe utworzone między asparaginą i glicyną, O-jodobenzen, który rozrywa wiązanie peptydowe utworzone przez grupę karboksylową tryptofanu, 2-nitro-5-tiocyanobenzen, rozrywający wiązanie peptydowe utworzone przez grupę aminową cysteiny.

Enzymatyczna hydroliza polipeptydów do peptydów może być przeprowadzona z wykorzystaniem specyficznych endopeptydaz, mianowicie trypsyny, która rozcina łańcuch polipeptydowy po karboksylowej stronie reszt aminokwasów zasadowych (Lys, Arg), lub chymotrypsyny, rozcinającej łańcuch polipeptydowy po karboksylowej stronie reszt aminokwasów aromatycznych (Phe, Tyr, Trp).

Peptydy, które otrzymano w wyniku specyficznej hydrolizy chemicznej lub enzymatycznej, rozdziela się chromatograficznie i oznacza sekwencję każdego z oczyszczonych peptydów techniką degradacji Edmana. W ten sposób poznajemy sekwencje poszczególnych fragmentów polipeptydu, lecz nie znamy kolejności ułożenia tych fragmentów w całym polipeptydzie.

Kolejność ułożenia fragmentów peptydowych w polipeptydzie możemy wyjaśnić na podstawie tak zwanych **nakładających się peptydów**. W tym celu wyjściowy łańcuch polipeptydowy rozszczepia się innym związkiem lub enzymem niż poprzednio, otrzymane fragmenty rozdziela się i sekwencjonuje. W ten sposób otrzymuje się dwa różne zestawy fragmentów o znanej sekwencji, które powstały z tego samego polipeptydu, skutkiem działania dwóch różnych czynników trawiennych, np. trypsyny i chymotrypsyny.



Jeśli peptyd otrzymany w wyniku trawienia jednym czynnikiem nakłada się na sekwencję dwu peptydów otrzymanych w wyniku trawienia drugim czynnikiem, to jest to sposób na ustalenie kolejności peptydów. Tak jak przedstawiono przykładowo wyżej, peptyd chymotrypsynowy nakłada się na sekwencje dwu peptydów trypsynowych, ustalając w ten sposób ich kolejność. Ustalenie położenia peptydów

wystarczy do określenia sekwencji całego analizowanego białka, którym jest pojedynczy polipeptyd.

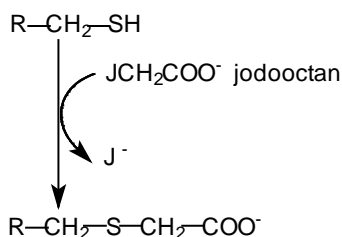
Ustalenie sekwencji białka oligomerycznego jest bardziej skomplikowane, ponieważ należy najpierw doprowadzić do dysocjacji poszczególnych podjednostek polipeptydowych. Jeśli podjednostki połączone są tylko wiązaniami niekowalencyjnymi, wystarczy zastosować czynniki denaturujące, takie jak roztwór 8M mocznika lub roztwór 6M chlorowodoru guanidyny, żeby doprowadzić do ich dysocjacji.

Pod wpływem czynników denaturujących struktura białka zostaje częściowo rozpleciona, dzięki zerwaniu wiązań niekowalencyjnych, i poszczególne łańcuchy polipeptydowe przyjmują konformację kłębka statycznego. Jeśli istnieją w białku wiązania disiarczkowe, należy je zerwać na drodze redukcji białka, takimi związkami są β -merkaptoetanol i ditiotreitól.

β -Merkaptoetanol zrywa odwracalnie mostki disiarczkowe w białku, tworząc mieszane mostki z łańcuchami bocznymi cysteiny. Przy znacznym nadmiarze β -merkaptoetanolu mieszane mostki disiarczkowe ulegają dalszej redukcji do wolnych grup sulfhydrylowych w polipeptydach.

Podobne rozdzielenie łańcuchów polipeptydowych połączonych wiązaniami disiarczkowymi osiąga się stosując ditiotreitól.

Dla zabezpieczenia reszt cysteinowych przed rekombinacją przeprowadza się ich alkilowanie jodoocetanem do stabilnej S-karboksymetylowej pochodnej cysteiny.



Uwolnione polipeptydy rozdziela się np. chromatograficznie, po czym można realizować procedurę, zmierzającą do ustalenia ich sekwencji, omówioną wyżej.

ZADANIA, KLASYFIKACJA I PRZYKŁADY BIAŁEK

Białka są zróżnicowanymi makrocząsteczkami pod względem struktury i funkcji. Najobficiej występują w komórkach zwierzęcych, gdzie stanowią 10–20% masy ciała, czyli 60–80% suchej masy. Makrocząsteczki te są syntetyzowane i występują jedynie w organizmach. U 1,2 miliona gatunków żyjących na Ziemi występuje od 10^{10} do 10^{12} różnych białek. W organizmie ludzkim znajduje się 5 milionów odrębnych białek. Stanowią one nie tylko podłoże wszystkich zjawisk życiowych, ale niektóre z nich zjawiska życiowe warunkują.

Główne zadanie bardzo wielu z nich to kataliza enzymatyczna, dzięki której determinują metabolizm w każdej żywej komórce. Metabolizm stanowią złożone reakcje chemiczne, przebiegające w wąskich, dopuszczalnych dla życia granicach temperatury, z szybkością ponad milionkrotną, dzięki białkowym katalizatorom biologicznym.

Funkcje mechaniczno-strukturalne białek wewnątrz komórki prowadzą do tworzenia cytoszkieletu, czyli zrębu białkowego, zapewniającego trwałe, ale jednocześnie elastyczne zorganizowanie organelli wewnątrzkomórkowych.

Funkcje mechaniczno-strukturalne białek w budowie błon biologicznych są odpowiedzialne za wytworzenie wewnątrzkomórkowych przedziałów funkcjonalnych oraz za odgraniczenie komórek od otoczenia.

Funkcje mechaniczno-strukturalne białek pozakomórkowych prowadzą do tworzenia macierzy zewnątrzkomórkowej, która stanowi spoidło i rusztowanie stabilizujące strukturę tkanek. Takie białkowe biologiczne spoidło jest nie tylko biernym podłożem dla komórek, lecz również aktywnie wpływa na ich kształt, adhezję lub migrację, rozwój, metaboliczne funkcje oraz uczestniczy w tak ważnych biologicznie procesach jak różnicowanie, proliferacja i morfogeneza.

Białka odpowiedzialne są za transport, magazynowanie i wymianę z otoczeniem wielu cząsteczek i jonów. Gdyby zostały pozbawione tej funkcji, komórki zginęłyby z głodu.

Ruch uporządkowany wynika z własności biomechanicznych niektórych białek.

Zadania białek w ochronie immunologicznej polegają na zapobieganiu przed wtargnięciem antygeny, na eliminowaniu antygeny z organizmu oraz utrwaleniu pamięci immunologicznej przeciw danemu antygenowi, którym może być zarówno białko obce, jak i inna wielkocząsteczkowa substancja obca dla danego osobnika, w tym bakterie lub wirusy.

Niektóre białka mają za zadanie odbierać, wytwarzać i przekazywać sygnały chemiczne i fizyczne o stanie środowiska, zarówno wewnątrzkomórkowego, jak i zewnątrzkomórkowego.

Nadrzędnym zadaniem białek jest koordynowanie funkcji biologicznych, w tym kontrola replikacji, wzrostu i różnicowania, na poziomie regulacji ekspresji informacji genetycznej.

Tabela 1. Kryteria podziału białek i ich główne klasy

Kryteria podziału białek	Główne klasy białek
Pochodzenie	zwierzęce, roślinne, bakteryjne, wirusowe,
Rozmieszczenie	wewnątrzkomórkowe, zewnątrzkomórkowe
Występowanie w narządach	mięśni, mózgu, wątroby, osocza, mleka, macierzy łącznotkankowej
Występowanie w organellach	jądrowe, mitochondrialne, lizosomalne, rybosomowe, błonowe
Ogólne funkcje biologiczne	enzymatyczne, strukturalne, zapasowe, transportowe, receptorowe, adhezyjne, hormonalne, kurczliwe, odpornościowe
Brak (lub obecność) związków nieaminokwasowych	<ul style="list-style-type: none"> • proste; • złożone: <ul style="list-style-type: none"> – glikoproteiny, lipoproteiny, – metaloproteiny, fosfoproteiny, – nukleoproteiny, chromoproteiny
Ogólny kształt, rozpuszczalność i ładunek	<ul style="list-style-type: none"> • globularne (kuliste) <ul style="list-style-type: none"> – białka obojętne: (albuminy, globuliny) – kwaśne (prolaminy, gluteliny) – zasadowe (histony, protaminy) • fibrylarne (włókienkowe, skleroproteiny)

Kryteria klasyfikacji białek są różnorodne, lecz żadne nie jest doskonałe. Najlepsza byłaby klasyfikacja białek na podstawie zależności między strukturą a ich aktywnością biologiczną. Przypuszczalnie klasyfikacja taka będzie możliwa w przyszłości, kiedy strukturze przyporządkuje się swoistą aktywność biologiczną większości białek.

BIAŁKA GLOBULARNE

Białka globularne są rozpuszczalne w wodzie i rozcieńczonych roztworach soli. Ich cząsteczki mają kształt kulisty lub elipsoidalny. Zwarta struktura wynika

ze specyficznego połałdowania łańcucha polipeptydowego, spowodowanego w dużym stopniu przez oddziaływania hydrofobowe między niepolarnymi resztami aminokwasowymi, lokalizowanymi we wnętrzu struktury globularnej. Na powierzchni makrocząsteczki znajdują się hydrofilne reszty aminokwasowe otoczone powłoką hydratacyjną, która zapewnia ścisły kontakt białka z rozpuszczalnikiem (wodą) i stanowi podstawę dobrej rozpuszczalności białek globularnych. Białkami globularnymi są wszystkie enzymy, białka krwi (z wyjątkiem fibrynogenu) i pozostałych płynów biologicznych oraz większość innych białek aktywnych biologicznie. Globularnymi białkami zasadowymi są histony oraz polipeptydy protaminy, które oddziałują z kwasami nukleinowymi.

HISTONY

Histony to białka zasadowe jąder komórkowych i jednocześnie najsilniej dodatnio naładowane w roztworach o pH około 7, wśród dotąd poznanych białek, poza protaminami. Histony mają niską masę cząsteczkową rzędu 11 000–23 000 (największy jest histon H1) oraz punkt izoelektryczny (pI), mieszczący się w granicach 10–11. W strukturze pierwszorzędowej wykazują przewagę sumy aminokwasów zasadowych nad kwaśnymi. Charakteryzują się znaczną zawartością reszt lizynowych i argininowych. Wartości stosunków molowych lizyny do argininy są podstawą wyróżniania trzech frakcji histonowych: VLR, SLR i AR.

Histony silnie lizynowe (ang. *very lysine-rich*; VLR) cechują wartości stosunku molowego Lys/Arg powyżej 4.

Histony umiarkowanie lizynowe (ang. *slightly lysine-rich*; SLR) cechują wartości stosunku molowego Lys/Arg w granicach od 1 do 4.

Histony argininowe (ang. *arginine rich*; AR) cechują wartości stosunku molowego Lys/Arg poniżej jedności.

W składzie aminokwasowym histonów brak jest reszt tryptofanu, cysteiny (z wyjątkiem histonu H3), mało znajduje się tyrozyny i fenyloalaniny. Nieznaczne ilości aminokwasów aromatycznych sprawiają, że histony odznaczają się niskim pochłanianiem światła w nadfiolecie.

Histony klasyfikuje się w 5 klas, różniących się rozmiarem, składem aminokwasowym i dodatnim ładunkiem. Histony określa się literą H z odpowiednim znakiem numerycznym klasy, mianowicie: histony H1 (silnie lizynowe), histony H2A i H2B (umiarkowanie lizynowe), histony H3 i H4 (argininowe). W erytrocytach jądrzastych występuje histon H5 (silnie lizynowy), który jest alternatywną formą (skrajnym wariantem) H1. Histon H5 wiąże się szczególnie silnie z DNA chromatyny nie ulegającej transkrypcji. Histony H3 są jedynymi, które zawierają reszty cysteiny uczestniczące w tworzeniu mostków disiarczkowych.

Struktura pierwszorzędowa większości histonów jest konserwatywna i zachowawcza. Najbardziej konserwatywną strukturę pierwszorzędową ma histon H4, który pozbawiony jest całkowicie specyficzności gatunkowej. Najbardziej zmienną sekwencję aminokwasową ma histon H1 zarówno w obrębie jednego gatunku, jak i między gatunkami.

Histony są zasocjowane z jądrowym DNA komórki eukariotycznej, współtworząc jego nukleosomalną strukturę. Histony H2A, H2B, H3 i H4 (po dwie cząsteczki z każdego) oddziałują ze sobą, tworząc oktamer histonowy, na którym nawinięta jest helisa DNA nukleosomu. Histon H1 znajduje się poza oktamerem, oddziałuje zewnętrznie z nicią DNA i łatwo oddysocjowuje. Może być zastępowany przez histon H5, w szczególnie nieaktywnej chromatynie, tak jak np. w erytrocytach ptaków. Histony mają wpływ na zmianę stabilności konformacji chromatyny (euchromatyna ↔ heterochromatyna), między innymi poprzez wykorzystywanie alternatywnych odmian histonów oraz poprzez modyfikacje chemiczne (acetylacja), którym ulegają histony.

Histony, w odróżnieniu od protamin, dają się wytrącać amoniakiem z kwaśnego ekstraktu, ponieważ są nierozpuszczalne (z wyjątkiem histonów z przewagą lizyny) w nadmiarze tego rozpuszczalnika. Rozpuszczają się natomiast w nadmiarze alkaliów nieorganicznych oraz są kwasorozpuszczalne.

PROTAMINY

Protaminy są silnie zasadowymi polipeptydami związanymi z DNA, szczególnie w komórkach spermy, gdzie stanowią ostateczny produkt przekształceń składników białkowych, towarzyszących spermatogenezie. Podczas spermatogenezy i spermiogenezy, szczególnie w tworzonych główkach plemników, ma miejsce zastąpienie histonów somatycznych protaminami. Najlepiej poznano właściwości protamin spermy ryb, które charakteryzują się niską masą cząsteczkową, rzędu 4000–5000 oraz niewielką liczbą reszt aminokwasowych w łańcuchu polipeptydowym (około 30), z czego 50% stanowią reszty argininy, decydujące o wybitnej zasadowości protamin. Polipeptydy te pozbawione są aminokwasów kwaśnych, cysteiny, histydyny i lizyny.

Protaminy ssaków mają wyższą masę cząsteczkową i bardziej zróżnicowany skład aminokwasowy, ponieważ zawierają reszty cysteiny, histydyny, lizyny, a nawet aminokwasy kwaśne.

BIAŁKA FIBRYLARNE

Białka fibrylarne są praktycznie nierozpuszczalne w wodzie i w rozcieńczonych roztworach soli, z wyjątkiem rozpuszczalnego fibrynogenu osocza krwi. Cha-

Charakteryzują się równoległym ułożeniem polipeptydów, w postaci długich włókienek tworzących elementy strukturalne, szczególnie tkanki łącznej.

Wewnątrzkomórkowymi białkami fibrylarnymi są keratyny- α i keratyny- β . Keratyna- α jest zbudowana z trzech prawoskrętnych helis zwiniętych wokół siebie w postaci lewoskrętnego superhelisu.

Zewnątrzkomórkowymi białkami fibrylarnymi są kolageny i elastyna. Dotychczas opisano ponad 10 głównych typów kolagenów. Kolageny są glikoproteinami, przeważnie o niewielkiej zawartości cukrów.

Białka kolagenowe stanowią 20–40% wszystkich białek zwierzęcych. Powszecnie występują w skórze, ścięgnach, więzadłach, chrząstkach, kościach, zębach i innych rodzajach tkanki łącznej, gdzie stanowią główne tworzywo włókien klejodajnych (kolagenowych). Elastyna stanowi tworzywo włókien sprężystych, które są bardzo rozciągliwe.

Kolageny są białkami nierozpuszczalnymi, które charakteryzują się dużą wytrzymałością na rozciąganie. Zerwanie włókna o średnicy 1 mm wymaga obciążenia, co najmniej 10 kg.

Nierozpuszczalność kolagenu i elastyny wynika z ich usieciowania kowalencyjnymi wiązaniami poprzecznymi (krzyżowymi). Brak tego usieciowania w kolagenie młodych zwierząt sprawia, że można go izolować w formie rozpuszczalnej. Powtarzającym się elementem w kolagenie jest tropokolagen, cząsteczka o kształcie sztywnej liny o długości około 300 nm, średnicy 1,5 nm i masie cząsteczkowej około 300 000. Tropokolagen tworzą trzy lewoskrętne helisy zwinięte wokół siebie w prawoskrętny superhelis.

LIPOPROTEINY

Lipoproteiny (Lp) są globularnymi, złożonymi cząstkami, które transportują w płynach ustrojowych hydrofobowe triacyloglicerole, estry cholesterolu i cholesterol. W ich strukturze można wyróżnić amfipatyczną powłokę, utworzoną przez białka, zwane apolipoproteinami (apoLp), fosfolipidy i cholesterol. Powłoka ta otacza hydrofobowy rdzeń lipoprotein złożony z triacylogliceroli i estrów cholesterolu. Lipoproteiny klasyfikuje się na podstawie różnic w ich podstawowej własności fizycznej, którą jest gęstość, na pięć głównych klas: chylomikrony, lipoproteiny o bardzo małej gęstości (VLDL), lipoproteiny o pośredniej gęstości (IDL), lipoproteiny o małej gęstości (LDL) i lipoproteiny o dużej gęstości (HDL). Ogólną charakterystykę głównych klas „dojrzałych” form lipoprotein osocza krwi zestawiono w tabeli 2.

Różnice w gęstości poszczególnych klas lipoprotein wynikają przede wszystkim z różnej proporcji składnika lipidowego do białkowego, tj. odmiennego składu ilościowego. Poza składem ilościowym lipoproteiny różnią się składem jako

Tabela 3. Charakterystyka głównych rodzin apolipoprotein (apoLp)

Główne ApoLp	Masa cząsteczkowa (kDa)	Główne miejsce powstawania	Główne funkcje i inne właściwości
AI	28,3	jelito, wątroba	– strukturalna w HDL, główne ilościowo białko HDL; – aktywator LCAT; – ligand receptora HDL
AII	17,0	wątroba, jelito	– strukturalna w HDL, stanowi ok. 1/3 ilości AI w HDL
AIV	46,0	jelito	– aktywator LCAT; – ligand receptora HDL w wątrobie
B48	265,0	jelito	– strukturalna w chylomikronach; – nie rozpoznawana przez receptor apoB/E
B100	550,0	wątroba	– strukturalna w VLDL, IDL, LDL; – główny ligand receptora apoB/E
CI	6,5	wątroba	– aktywator LCAT
CII	8,8	wątroba	– aktywator lipazy lipoproteinowej
CIII	8,9	wątroba	– inhibitor lipazy Lp-nowej; – występując w lipoproteinach zawierających apoE zapobiega wiązaniu apoE z receptorem apoE – stanowi to sposób na zapobieganie przedwczesnemu usuwaniu z krążenia chylomikronów, VLDL, IDL
D	20,0	wątroba ?	– przenosi lipidy, estry cholesterolu z HDL do LDL
E (-1,-2,-3,-4)	39,0	wątroba	– ligand receptora apoE, receptora LRP, receptora apoB/E

gdzie:

LCAT – acylotransferaza lecytyna: cholesterol;

LRP – (ang. *LDL receptor – related protein*) – białko podobne do receptora LDL

ściowym obu komponent (tab. 2). Przykładowo, w chylomikronach całkowita komponenta lipidowa stanowi 98–99% ich masy, resztę (1–2% masy) natomiast białko. Chylomikrony są lipoproteinami najbogatszymi w triacyloglicerole, najuboższymi zaś w białka. Najbogatsze w białka, pod względem ilościowym oraz jakościowym są lipoproteiny o dużej gęstości (HDL). Większość klas głównych lipoprotein w krążeniu występuje w wielu formach różniących się składem jakościowo-ilościowym oraz właściwościami, tak jak np. HDL₁, HDL₂, HDL₃. Różnorodność form tych samych klas Lp jest konsekwencją przemian chemicznych, którym ulegają lipoproteiny w krążeniu. Przemiany te polegają głównie na reakcjach hydrolizy (lipoliza) triacylogliceroli, reakcjach estryfikacji cholesterolu, wzbogacaniu i wymianie apolipoprotein.

Apolipoproteiny odpowiadają za wiele funkcji, w tym determinują własności strukturalno-funkcjonalne lipoprotein w najwyższym stopniu spośród wszystkich ich składników. W tabeli 3 przedstawiono charakterystykę głównych pięciu rodzin (oznaczone kolejnymi literami alfabetu) apolipoprotein z podgrupami (oznaczone dodatkowo cyframi rzymskimi).

Rola strukturalna apolipoprotein wynika z ich zdolności wiązania i solubilizacji (rozpuszczania) lipidów i polega na współtworzeniu amfipatycznego płaszczka lipoproteiny, który bezpośrednio odpowiedzialny jest za solubilizację hydrofobowych lipidów w wodnym środowisku płynów ustrojowych. Apolipoproteiny mogą być związane silnie lub luźno z częścią lipidową. Silnie związane z komponentą lipidową apolipoproteiny (integralne) nie opuszczają nigdy lipoprotein, tak jak np. apoB100, apoB48. Apolipoproteiny luźno związane (powierzchniowe) z komponentą lipidową mogą swobodnie opuszczać lipoproteiny lub podlegać wymianie między lipoproteinami, tak jak np. apoA, apoC, apoE.

Rola funkcjonalna apolipoprotein polega na regulowaniu katabolizmu lipoprotein w krążeniu. Niektóre apolipoproteiny są aktywatorami, inne inhibitorami podstawowych enzymów uczestniczących w katabolizmie lipidów, np. lipazy lipoproteinowej, acylotransferazy lecytyna:cholesterol. Apolipoproteiny (np. apoB100, apoE) są bezpośrednimi ligandami rozpoznawanymi przez specyficzne receptory błonowe dla lipoprotein komórki docelowej. Wynikiem interakcji bezpośredniego liganda (apoLp) ze specyficznym receptorem jest wytworzenie kompleksu Lp-receptor, jego internalizacja do wnętrza komórki i eliminacja lipoprotein z krążenia.

Większość apolipoprotein należy do glikoprotein (np. apoAII, apoAIV, apoB, apoC, apoD, apoE), niektóre występują w izoformach różniących się zawartością reszt kwasów sjałowych, np. apoCIII.

GLIKOPROTEINY

Glikoproteiny są białkami, które mają węglowodany kowalencyjnie przyłączone do części polipeptydowej. Wśród białek złożonych są najliczniejszą i najpowszechniejszą grupą. Wśród glikoprotein są zarówno białka globularne, jak i fibrylarne. Wiele enzymów, hormonów, białek transportowych, immunoglobulin, białek wydzielin śluzowych, białek osocza, białek błon plazmatycznych podstawowych wyłącznie z typowymi białkami strukturalnymi macierzy pozakomórkowej, np. kolageny, należy do glikoprotein.

Komponenty cukrowe glikoprotein mogą spełniać różnorodne funkcje, m.in. utrzymują właściwą konformację łańcuchów polipeptydowych, ochraniają je przed rozpadem proteolitycznym, determinują czas półtrwania glikoprotein w płynach ustrojowych i ułatwiają transport białka zarówno wewnątrz, jak i na zewnątrz komórki. Wiążą różne patogeny, np. bakterie i wirusy. Pełnią one rolę determinant antygenowych i uczestniczą w zjawiskach biologicznego rozpoznawania i adhezji, przyczyniając się do biologicznej specyficzności komórkowej, narządowej, osobniczej i gatunkowej.

W zależności od typu wiązań glikozydowych obecnych w glikoproteinach, białka te podzielono umownie na:

- ⇒ **glikoproteiny typu surowiczego**, w których składniki węglowodanowe są połączone przede wszystkim wiązaniem N-glikozydowym z polipeptydem; ta zwyczajowa nazwa przyjęta dla białek surowicy (będących w większości glikoproteinami, które mają przede wszystkim ten typ wiązania, choć zawierają czasami również wiązania O-glikozydowe) obejmuje także wiele innych białek nie występujących w surowicy, w tym także glikoproteiny błonowe i macierzy pozakomórkowej;
- ⇒ **glikoproteiny typu mucyny**, zawierające wiązanie O-glikozydowe poprzez α -GlcNAc;
- ⇒ **glikoproteiny typu proteoglikany**, zawierające glikozoaminoglikany połączone wiązaniem O-glikozydowym, utworzonym przez ksylozę i resztę seryny lub treoniny, choć niektóre zawierają również inne wiązania O-glikozydowe i/lub N-glikozydowe;
- ⇒ **glikoproteiny typu kolagenu**, typowe białka strukturalne, zawierające unikalne alkalistabilne wiązanie O-glikozydowe.

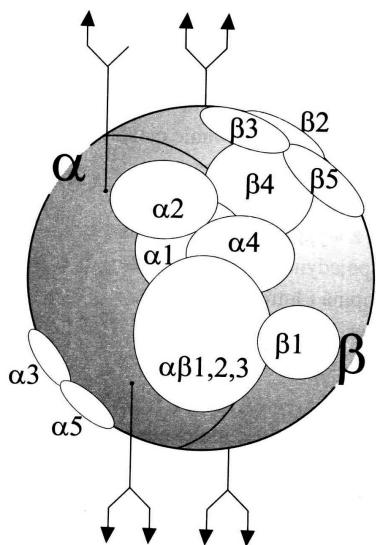
Glikoproteiny zawierające reszty kwasów sjałowych w swych jednostkach oligosacharydowych zwyczajowo nazywane są sjałoglikoproteinami, a pozbawione tego monocukru asjałoglikoproteinami.

Indywidualne glikoproteiny zazwyczaj składają się z szeregu izoform. Istnienie różnych izoform tej samej glikoproteiny wynika przede wszystkim z różnorodności struktury ich oligosacharydów. Mikroheterogenność oligosacharydowa

wynika również z różnych proporcji między oligosacharydami obojętnymi i kwaśnymi oraz odmiennej zawartości w nich nośników ładunków ujemnych. Heterogenność oligosacharydów glikoprotein moduluje funkcje biologiczne tych makrocząsteczek, czyli bioaktywność.

Zróznicowanie oligosacharydów dotyczy poszczególnych glikoprotein w obrębie jednego, ale również w obrębie różnych gatunków. Odmienność oligosacharydów glikoprotein może również dotyczyć różnych etapów ontogenezy.

Masa cząsteczkowa glikoprotein waha się w szerokich granicach, np. od 14 500 Da dla rybonukleazy B do $2 \cdot 10^6$ Da dla większości mucyn. Zawartość węglowodanów w glikoproteinach może wahać się od około 0,4 do 85% masy. Na po-



jedynczy łańcuch polipeptydowy przypadać może jedna jednostka oligosacharydowa, jak np. w łańcuchu ciężkim immunoglobuliny IgG, kilka jednostek, jak np. w α_1 -kwaśnej glikoproteinie, w pojedynczych podjednostkach ludzkiej gonadotropiny kosmówkowej (hCG), kilkanaście jednostek, jak np. w α_2 -makroglobulinie, a nawet kilkaset, jak w mucynach z gruczołów podszczękowych, śluzu dróg żołądkowo-jelitowych, tchawiczo-oskrzelowych i szyjki macicy.

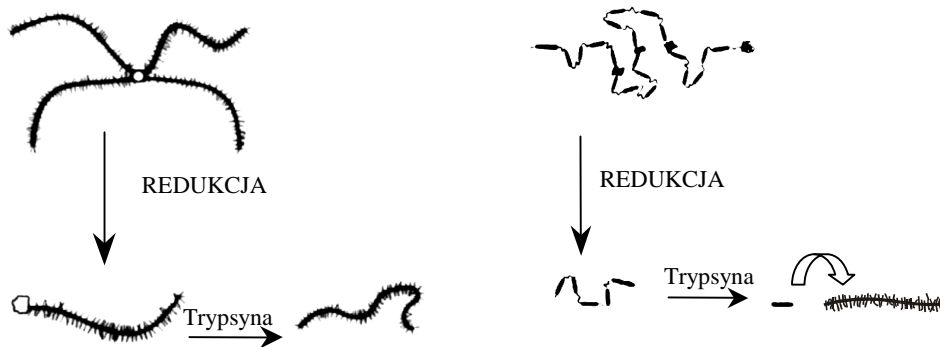
Glikoproteiny typu surowiczego

należą do białek globularnych, których kształt zazwyczaj jest sferyczny, jak np. w przedstawionym obok modelu hCG.

Glikoproteiny typu mucyny są zasadniczymi składnikami każdej wydzieliny śluzowej, warunkującymi własności fizykochemiczne śluzu. Mucyny mają powinowactwo do kationów dwu- i trójwartościowych, lipidów, leków o strukturze trzeciorzędowych amin oraz wiążą wolne rodniki tlenowe i hydroksylowe. Mucyny mogą mieć budowę podjednostkową, zwykle złożoną z czterech monomerów, jak np. mucyny przewodu pokarmowego, której model strukturalny przedstawiono poniżej.

Cząsteczka mucyny ze śluzu żołądkowego ma charakterystyczny „rozpostarty” kształt podobny do skrzydeł wiatraka, utworzony przez cztery monomery połączone wiązaniami disiarczkowymi. Pojedynczy monomer mucyn przewodu pokarmowego przypomina szczotkę do butelek, której trzonek stanowi nieglikozylowany region polipeptydu (ok. 25%) o strukturze globularnej, wrażliwej na działanie enzymów proteolitycznych. Resztę polipeptydu (ok. 75%) stanowi region bardzo gęsto glikozylowany, który odporny jest na działanie proteaz. Konformacja

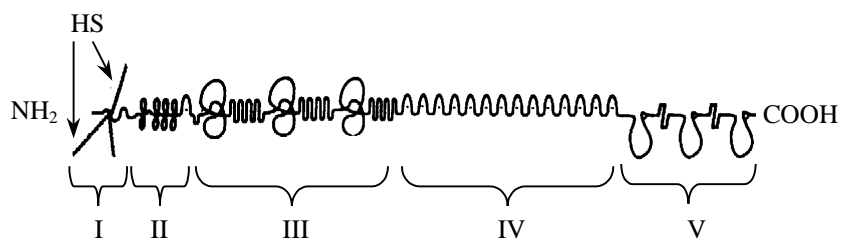
przestrzenna regionu glikozylowanego monomeru jest fibrylarna, liniowa i giętka, dzięki dużej gęstości jednostek oligosacharydowych.



Mucyny ze śluzu szyjki macicy i mucyny oskrzelowe mają kształt odmienny od mucyn śluzu przewodu pokarmowego. Nitkowaty kształt mucyn oskrzelowych i innych wynika z połączenia czterech podjednostek typu „koniec do końca” za pomocą wiązań disiarczkowych.

W pojedynczej podjednostce występuje zazwyczaj pięć obszarów gęsto glikozylowanych, poprzedzielanych rejonami nieglikozylowanymi, wrażliwymi na działanie proteaz. Rejony glikozylowane charakteryzują się liniową strukturą, którą stabilizują gęsto rozmieszczone jednostki oligosacharydowe. Śluz oskrzelowy zawiera mały procent wody.

Proteoglikany są polianionowymi glikoproteinami zawierającymi łańcuchy glikozoaminoglikanowe kowalencyjnie połączone z łańcuchem polipeptydowym. Występują przede wszystkim pozakomórkowo, we wszystkich tkankach, szczególnie obficie w tkance łącznej.

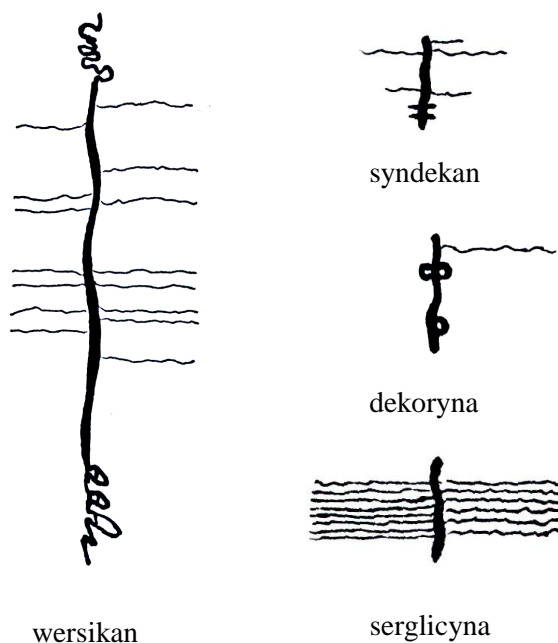


Ryc. 8. Model struktury wielodomenowej i modułowej perlekanu (cyframi rzymskimi oznaczono kolejne różne domeny – wg. 29, zmodyfikowane).

Liczne proteoglikany są białkami wielodomenowymi (mozaikowymi), gdyż poza domenami wiążącymi glikozoaminoglikany mogą zawierać inne, mianowicie domeny: lektynowe (oddziałujące z cukrowcami), z modułami podobnymi do epi-

dermalnego czynnika wzrostowego (EGF), z modułami immunoglobulinopodobnymi, domeny z modułami CCP, czyli podobnymi do białek dopełniacza i inne. Przykładami proteoglikanów o budowie mozaikowej są zarówno białka błon podstawnych, np. perlekan z trzema łańcuchami siarczanu heparanu lub wersikan z wieloma łańcuchami siarczanu chondroityny, jak i proteoglikany błon plazmatycznych, np. trombomodulina, która odpowiedzialna jest za aktywność antykrzepliwą śródbłonnków.

Najbardziej charakterystyczną strukturę przestrzenną mają wielkocząsteczkowe, pozakomórkowe proteoglikany typu agrekan z chrząstki oraz typu wersikan z fibroblastów. Proteoglikany te zawierają łańcuchy siarczanu chondroityny i siarczanu keratanu kowalencyjnie przyłączone do rdzenia białkowego. Niekowalencyjna asocjacja wielu (ok. 140) takich rdzeni białkowych z długim łańcuchem kwasu hialuronowego (poprzez białka wiążące) doprowadza do wytworzenia kompleksu o długości około 2 μm , który zwany jest agrekanem. Proteoglikany tego typu są silnie uwodnione i sprężyste, odginają się po zdeformowaniu, dlatego chrząstka może amortyzować siły odkształcające.



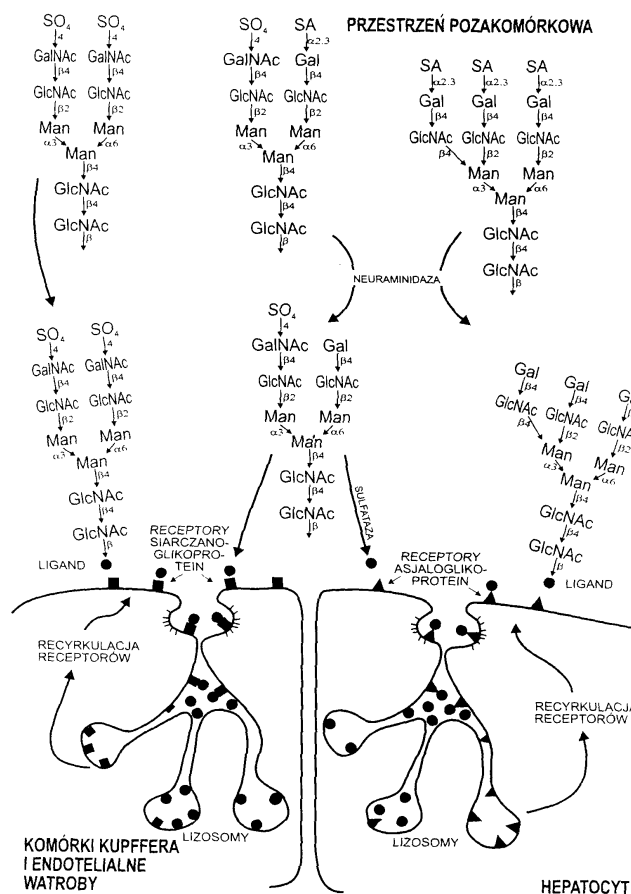
Ryc. 9. Schematyczna struktura proteoglikanów, przedstawicieli poszczególnych rodzin (wg. 29, zmodyfikowane).

Inne małe proteoglikany mogą również zawierać liczne łańcuchy glikozaminoglikanowe siarczanu chondroityny, tak jak np. serglicyna występująca w ziarnistościach płytek krwi, która jest nośnikiem czynników wzrostowych.

Serglicyna wiąże płytkowy czynnik 4 (PF4) i w tej postaci jest on uwalniany z płytek. Błonowe proteoglikany (np. betaglikan) lub wolne niskocząsteczkowe (np. dekoryna) wiążą wewnątrz komórki transformujący czynnik wzrostowy (TGF); inny czynnik wzrostowy (FGF), wiązany jest przez błonowy syndekan.

Znaczenie oligosacharydów w determinacji okresu półtrwania białek w krążeniu

Jednostki oligosacharydowe glikoprotein są bogate w informację biologiczną, która może kierować wieloma procesami. Przykładem może być eliminacja glikoprotein z krążenia, determinująca ich okres biologicznego półtrwania w organizmie. W proces ten zaangażowane są dwa rodzaje receptorów lektynowych (rozpoznających węglowodany), mianowicie receptor asjaloglikoprotein, znajdujący się w błonach hepatocytów, oraz receptor siarczanoglikoprotein, występujący w błonach komórek Kupffera i komórek endotelialnych w wątrobie (ryc. 10).



Ryc. 10. Eliminacja glikohormonów z krążenia (wg 32, za zgodą wydawcy i redaktora).

Monocukry znajdujące się na nieredukujących końcach oligosacharydów decydują o szybkości usuwania glikoprotein z krążenia. Sjaloglikoproteiny są wolno eliminowane z krążenia, ponieważ nie mogą być rozpoznawane przez receptory asjaloglikoprotein ani receptory siarczanoglikoprotein. Szybkość usunięcia kwasu sjałowego z glikoprotein jest kontrolowana przez samą strukturę białka oraz aktywność i dostępność specyficznych sjalidaz, np. neuraminidazy. Sjalidazy usuwają reszty kwasów sjałowych, uwidaczniając reszty galaktozylowe przy nieredukujących końcach oligosacharydów. Te reszty galaktozylowe są rozpoznawane przez receptory asjaloglikoprotein. Glikoproteiny związane z receptorem asjaloglikoproteinowym są usuwane z krwi do hepatocytów drogą endocytozy i hydrolizowane w lizosomach.

Specyficzne siarczanoglikoproteiny są bardzo szybko usuwane z krążenia (tuż po pojawieniu się we krwi), wówczas gdy ich natywne makrocząsteczki „oznakowane” są sekwencją $SO_4-4GalNAc\beta 1,4GlcNAc\beta -1,2Man\alpha$ (ryc. 10), która jest rozpoznawana i wiązana przez receptor siarczanoglikoprotein, obficie występujący w błonach komórek Kupffera i endotelialnych w wątrobie. Szybka eliminacja (niektórych glikohormonów) wynika z faktu, że ich oligosacharydowy ligand nie wymaga żadnych wcześniejszych reakcji modyfikujących potrzebnych do rozpoznania przez ten receptor błonowy, w odróżnieniu od eliminacji za pośrednictwem receptora asjaloglikoprotein. Dlatego niemal w momencie pojawienia się takiej glikoproteiny we krwi może być ona eliminowana w wątrobie z krążenia, drogą endocytozy receptorowej.