

Ćwiczenie nr 7

dr Mariola Krawiecka

Aminokwasy i peptydy

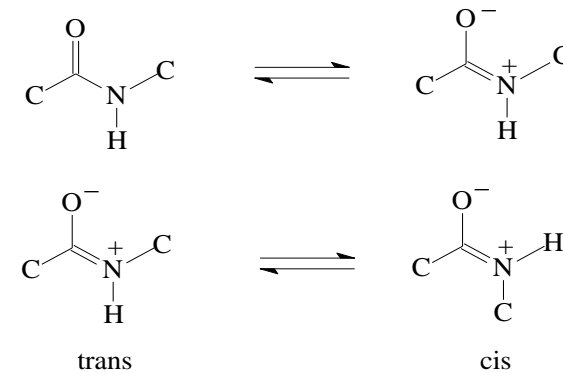
Repetitorium

1. Podział aminokwasów.
2. Właściwości aminokwasów-aminokwasy jako jony obojncze.
3. Reaktywność aminokwasów.
4. Biologicznie ważne peptydy.
5. Leki o budowie aminokwasowej.
6. Choroby związane z zaburzeniami przemiany aminokwasów.
7. Chromatografia bibułowa.

Repetitorium

Aminokwasami nazywamy związki zawierające w swej cząsteczce dwie charakterystyczne grupy funkcyjne: aminową –NH₂ i karboksylową –COOH. Aminokwasy są najmniejszymi elementami strukturalnymi białek, polipeptydów i peptydów we wszystkich organizmach żywych, od bakterii do człowieka tak więc najważniejszą reakcją aminokwasów, z punktu widzenia biochemicznego, jest reakcja tworzenia wiązania peptydowego. Reakcja ta nie przebiega jednak łatwo, gdyż stała równowagi przesunięta jest w kierunku hydrolizy wiązania peptydowego. Aby przeprowadzić syntezę wiązania peptydowego, jedna z grup karboksylowych musi być zaktywowana. Jednym ze sposobów laboratoryjnych jest przeprowadzenie grupy karboksylowej w chlorek kwasowy i kondensacja otrzymanego chlorku z grupą aminową drugiego aminokwasu. W przyrodzie aktywacja grupy karboksylowej zachodzi w wyniku kondensacji z ATP (powstaje aminoacyloadenin) i następnie zachodzi kondensacja z grupą aminową drugiego aminokwasu.

Powstające wiązanie peptydowe jest planarne (płaskie). Dzięki stabilizacji rezonansowej ma częściowo charakter wiązania podwójnego, zatem zahamowana jest swobodna rotacja wokół wiązania C-N i występuje izomeria cis-trans. Trans-konfiguracja jest korzystniejsza energetycznie niż cis-konfiguracja i częściej występuje w łańcuchach peptydowych.



Usztywnienie wiązania peptydowego wpływa na kształtowanie struktury białek.

Aminokwasy występujące w białkach są kwasami α-aminokarboksylowymi o konfiguracji L. Wszystkie z wyjątkiem glicyny są czynne optycznie. Oprócz aminokwasów budujących białka istnieje oczywiście cała gama aminokwasów niebiałkowych, które odgrywają ważną rolę w wielu procesach biochemicznych zachodzących w żywych organizmach. Mogą być substratami w utlenianiu komórkowym, w syntezie różnorodnych związków biologicznie czynnych. Aminokwasy lub ich pochodne są neuroprzekaznikami, neurohormonami lub klasycznymi hormonami.

Aminokwasy zatem spełniają następujące funkcje:

- 1) tworzenie białek- rola strukturalna, hormonalna i katalityczna,
- 2) uczestnictwo w różnorodnych funkcjach wewnątrzkomórkowych jak: przenoszenie impulsów w układzie nerwowym, regulacja wzrostu komórkowego, biosynteza porfiryn, puryn, pirymidyn i mocznika,

3) biosynteza antybiotyków polipeptydowych i substancji przeciwnowotworowych.

Istnieje około 20 podstawowych aminokwasów budujących białka. Wszystkie one posiadają własne kodony genetyczne warunkujące wbudowanie ich w łańcuch polipeptydowy. Olbrzymia różnorodność kombinacji połączeń aminokwasów warunkuje istnienie wielu białek, które to determinują olbrzymią ilość gatunków. Niewielka zmiana w kolejności połączenia aminokwasów powoduje zmiany w funkcji białka, stąd też olbrzymie zainteresowanie budową białek i możliwościami badania ich struktury. Aby określić kolejność aminokwasów stosuje się metody chemiczne:

1. Określenie rodzaju aminokwasów i ich ilości - hydroliza białka (kwasowa, zasadowa lub najczęściej enzymatyczna)
2. Częściowa hydroliza białka na peptydy i następnie:
 - a) oznaczanie N-końcowego aminokwasu,
 - b) oznaczanie C-końcowego aminokwasu.
3. Oznaczenie sekwencji aminokwasów

1. Podział aminokwasów

Ze względu na budowę łańcucha R aminokwasy zostały podzielone na siedem grup:

1. **Aminokwasy alifatyczne obojętne:** glicyna (Gly), alanina (Ala), walina (Val), leucyna (Leu), izoleucyna (Ile)
2. **Aminokwasy alifatyczne- hydroksyaminokwasy:** seryna (Ser), treonina (Thr)
3. **Aminokwasy zawierające siarkę:** cysteina (Cys), cystyna (Cys-Cys), metionina (Met)
4. **Iminokwasy :** prolina (Pro), hydroksyprolina (Hyp)
5. **Aminokwasy zasadowe:** lizyna (Lys), hydroksylizyna (Hyl), arginina (Arg), histydyna (His)
6. **Aminokwasy kwaśne i ich monoamidy:** kwas asparaginowy (Asp), asparagina (Asn), kwas glutaminowy (Glu), glutamina (Gln)
7. **Aminokwasy aromatyczne i heteroaromatyczne:** fenyloalanina (Phe),

tyrozyna (Tyr), tryptofan (Trp)

Natura łańcuchów bocznych jest odpowiedzialna za właściwości fizykochemiczne aminokwasów stąd też dzielimy aminokwasy na

1. aminokwasy hydrofobowe
2. aminokwasy hydrofilowe
 - a) obdarzone ładunkiem
 - b) pozbawione ładunku

Ze względu na zapotrzebowanie aminokwasów przez organizm zwierzęcy aminokwasy można podzielić na :

Aminokwasy egzogenne (ang. *IAA - indispensable amino acids*) - niezbędne do prawidłowego funkcjonowania organizmu zwierzęcego, ale nie wytwarzane przez ten organizm. Muszą być dostarczane z zewnątrz wraz z pokarmem.

Dla organizmu człowieka są to: walina, leucyna, izoleucyna, lizyna, fenyloalanina, metionina, treonina, tryptofan oraz dla dzieci: arginina, histydyna

Aminokwasy endogenne (ang. *DAA - dispensable amino acids*) - niezbędne do prawidłowego funkcjonowania organizmu i wytwarzane przez ten organizm.

Dla organizmu człowieka są to: glicyna, alanina, seryna, cysteina, tyrozyna, kwas asparaginowy, kwas glutaminowy, hydroksyprolina, asparagina, glutamina, prolina.

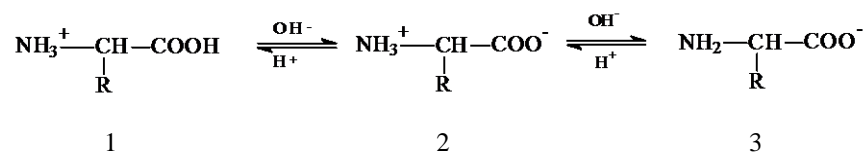
Bardzo ważny dla prawidłowego funkcjonowania organizmu jest odpowiedni dobór diety bogatej w aminokwasy egzogenne, jeśli zabraknie choć jednego aminokwasu egzogennego pozostałe aminokwasy, choć dostarczane w odpowiedniej ilości, nie są całkowicie wykorzystywane przez organizm. Mówiąc o odpowiedniej diecie mamy oczywiście na myśli dobór odpowiedniej diety białkowej, gdyż to białka są dla organizmu głównym źródłem aminokwasów.

Nadmierne zaś ilości białek, a zatem i aminokwasów, w odróżnieniu od lipidów i cukrów, nie są magazynowane. Aminokwasy, które nie zostały bezpośrednio wbudowane w białko ulegają dezaminacji. Azot zostaje usunięty z organizmu

w postaci mocznika, a łańcuchy węglowe są wykorzystywane do biosyntezy tłuszczów i węglowodanów.

2. Właściwości aminokwasów-aminokwasy jako jony obojaczne

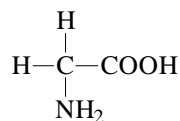
Cząsteczka aminokwasu w roztworze wodnym występować może w jednej z trzech postaci:



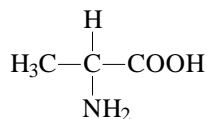
Przewaga odpowiedniej postaci aminokwasu zależy od pH roztworu.

Wartość pH, przy której cząsteczka aminokwasu występuje głównie jako jon obojaczny, nazywamy **punktem izoelektrycznym (pI)**. Gdy $\text{pH} > \text{pI}$ - aminokwas występuje w postaci anionu, gdy $\text{pH} < \text{pI}$ - aminokwas jest w postaci kationu.

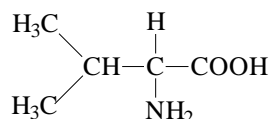
Wzory aminokwasów białkowych



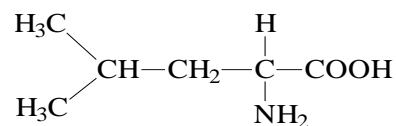
Glicyna (Gly)



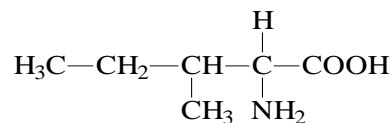
Alanina (Ala)



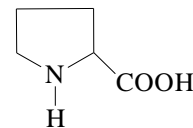
Walina (Val)



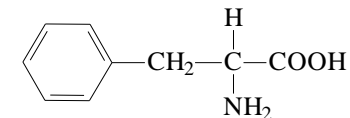
Leucyna (Leu)



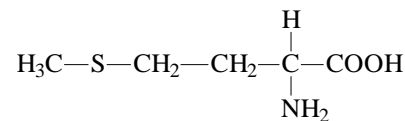
Izoleucyna (Ile)



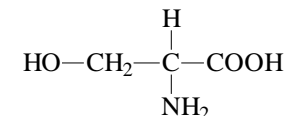
Prolina (Pro)



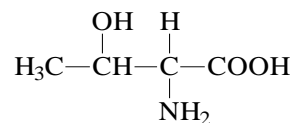
Fenylalanina (Phe)



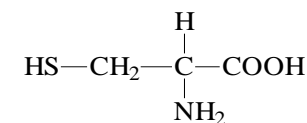
Metionina (Met)



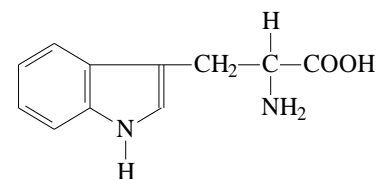
Seryna (Ser)



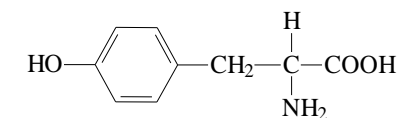
Treonina (Thr)



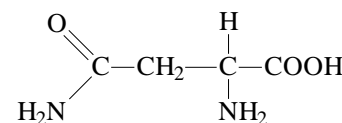
Cysteina (Cys)



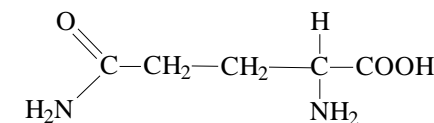
Tryptofan (Trp)



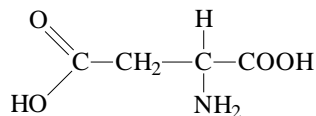
Tyrozyna (Tyr)



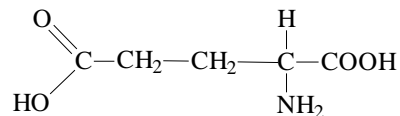
Asparagina (Asn)



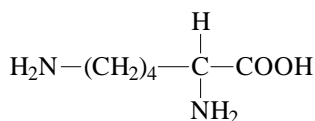
Glutamina (Gln)



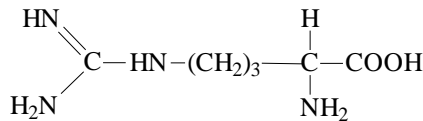
Kwas asparaginowy (Asp)



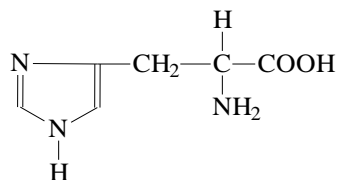
Kwas glutaminowy (Glu)



Lizyna (Lys)



Arginina (Arg)



Histydyna (His)

3. Reaktywność aminokwasów

Aminokwasy ze względu na obecność dwóch grup funkcyjnych ulegają reakcjom charakterystycznym zarówno dla grupy aminowej jak i karboksylowej.

Do najważniejszych reakcji możemy zaliczyć:

- reakcja z kwasami lub zasadami-tworzenie odpowiednich soli
- reakcja z chlorkami kwasowymi-typowe reakcje blokowania grupy aminowej
- reakcja z alkoholami-tworzenie estrów
- reakcja dekarboksylacji-tworzenie amin biogennych
- reakcje dezamiacji-tworzenie kwasów nasyconych i nienasyconych jak również hydroksykwasów i ketokwasów
- reakcja tworzenia wiązania peptydowego- powstają polipeptydy
- reakcja tworzenia laktamów

Do wyliczonych reakcji należy oczywiście dodać reakcje charakterystyczne, identyfikacyjne dla poszczególnych aminokwasów związane bezpośrednio z budową i właściwościami tych aminokwasów.

4. Biologicznie ważne peptydy

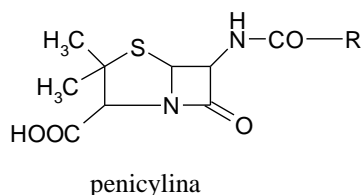
Aminokwasy tworzą wiele oligopeptydów i polipeptydów odgrywających ważne funkcje w żywych organizmach np.: glutation (γ -glutamylcysteinylglycyna, tripeptyd H- γ -Glu-Cys-Gly-OH, odgrywa zasadniczą rolę w procesach utleniania i redukcji dzięki obecności grup -SH), angiotensyna II (hormon tkankowy o budowie oktapeptydu H-Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-OH, zwęża naczynie krwionośne i jest najsilniejszym czynnikiem podwyższającym ciśnienie krwi, nasila uwalnianie noradrenaliny), bradykinina (hormon tkankowy o budowie nonapeptydu H-Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg-OH, obniża ciśnienie krwi-zatem działa antagonistycznie do angiotensyny, odpowiedzialna jest również za uczucie bólu, który towarzyszy uszkodzeniu (zranieniu) skóry), oksytocyna (nonapeptyd, hormon tylnego płata przysadki, działa na system mięśni gładkich, zwłaszcza macicy ciężarnej, wywołuje wydzielanie mleka z gruczołów sutkowych w okresie karmienia), wazopresyna (hormon tylnego płata przysadki, nonapeptyd (hormon antydiuretyczny, ADH) zwiększa wchłanianie zwrotne w dystalnych kanalikach nerkowych. Niedobór ADH powoduje moczówkę prostą), gramicydyna S (antybiotyk działający na bakterie Gram-dodatnie, stosowany w leczeniu oparzeń, owrzodzeń, zakażonych ran), substancja P (neurohormon zbudowany z 11 reszt aminokwasowych, bierze udział w przewodzeniu bodźców bólowych), glukagon (hormon zbudowany z 29 reszt aminokwasowych, jest antagonistą insuliny, zwiększa stężenie glukozy we krwi), endorfyny i enkefaliny (grupa oligo- i polipeptydów wyodrębnionych z przysadki mózgowej wykazujące silne działanie przeciwbólowe), insulina (hormon wytwarzany

przez komórki β -trzustki, zmniejsza stężenie glukozy we krwi, stosowana w leczeniu cukrzycy) itd.

5. Leki o budowie aminokwasowej

Antybiotyki peptydowe są głównie produktami metabolizmu mikroorganizmów. Często są one odporne na działanie enzymów proteolitycznych, znajdujących się w normalnych komórkach. Przyczyną tego jest nie tylko cykliczna budowa tych antybiotyków, ale także występujące w ich łańcuchach peptydowych, mało spotykane w białkach, elementy strukturalne, takie jak D-aminokwasy, rzadkie aminokwasy i nie peptydowe wiązania między resztami.

Do grupy leków aminokwasowych zaliczyć można penicyliny. Część cząsteczki penicyliny jest produktem cyklizacji dwóch aminokwasów: L-cysteiny i D-waliny. Poszczególne penicyliny różnią się od siebie tylko resztą R, którą w przypadku najbardziej znanego antybiotyku z tej grupy jest reszta benzylowa.



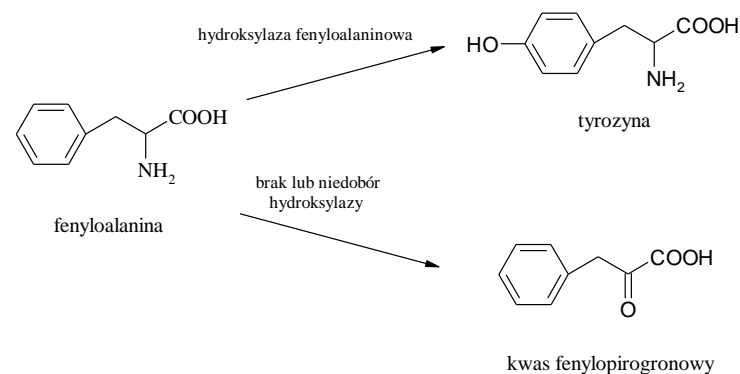
6. Choroby związane z zaburzeniami przemiany aminokwasów

Przyczynami tych chorób są:

- niedobór odpowiednich enzymów
- pierwotne zaburzenia wchłaniania zwrotnego w cewkach nerkowych.

Wspólnym objawem jest obecność aminokwasów w moczu - czyli aminoacyduria. Zaburzenia przemiany aminokwasowej z powodu braku odpowiednich enzymów powodują nagromadzenie się w organizmie toksycznych związków co wtórnie powoduje uszkodzenie tkanek i układów (nerwowego, wydzielniczego).

Jedną z chorób, znaną od 1953 roku jest fenyloketonuria - choroba uwarunkowana genetycznie. Przyczyną jej występowania jest brak lub mała aktywność enzymu - hydroksylazy fenyloalaninowej (enzym ten przekształca fenyloalaninę w tyrozynę). W konsekwencji fenyloalanina przekształca się nie w tyrozynę, a w kwas fenylopirogonowy, którego nadmiar prowadzi do uszkodzenia centralnego układu nerwowego i niedorozwoju u noworodka. Testy przeprowadzane na krwi noworodków dają możliwość wczesnego wykrycia choroby. Leczenie oparte jest o niskofenyloalaninową dietę do szóstego roku życia dziecka, potem CUN staje się odporny na wysokie stężenie fenyloalaniny i może nastąpić powrót do normalnej diety.



7. Chromatografia bibułowa

Chromatografia bibułowa jest odmianą chromatografii podziałowej, w której rolę nośnika odgrywa odpowiednio spreparowana bibuła filtracyjna. Najczęściej używane bibuły pochodzą z firmy Whatmana i w zależności od stosowanej techniki są odpowiednio zróżnicowane (Whatman 1, 2, 3, 3MM).

Chromatografię bibułową można wykonać techniką zstępującą (spływową), wstępującą i krążkową.

W chromatografii zstępującej migracja składników odbywa się z góry w dół, w chromatografii wstępującej wykorzystana jest kapilarna struktura bibuły umożliwiająca migrację solwentu do góry. W chromatografii krążkowej natomiast ruch rozpuszczalnika odbywa się odśrodkowo na krążku bibuły umieszczonym między dwiema płytkami Petriego. Ten sposób rozdzielania wymaga niewiele bibuły, pozwala na stosunkowo szybkie uzyskanie rozdzielania mieszaniny i umożliwia wywołanie chromatogramu, pociętego na fragmenty, jednocześnie kilkoma próbami identyfikacyjnymi. Ponadto na jednym krążku można wyznaczyć sektory i wykonać jednocześnie rozdzielanie mieszaniny oraz odpowiednich substancji wzorcowych. Identyfikację poszczególnych składników mieszaniny wykonuje się porównując położenia ich plam i plam odpowiednich substancji wzorcowych oraz obliczając współczynnik R_f