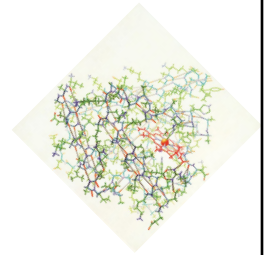




INŻYNIERIA BIAŁEK TERAPEUTYCZNYCH



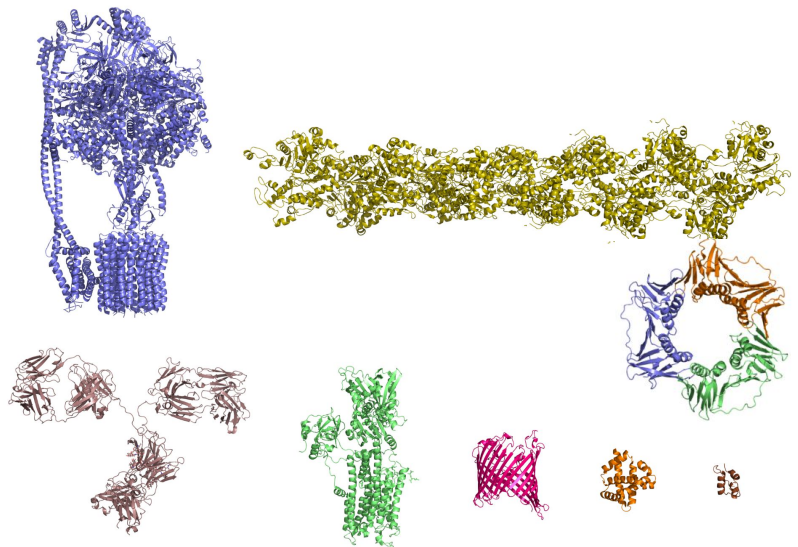
ANDRZEJ ŁYSKOWSKI, DR INŻ.

alyskowski@prz.edu.pl, H.237

Used with permission from the Howard Hughes Medical Institute (www.hhmi.org). All rights reserved.

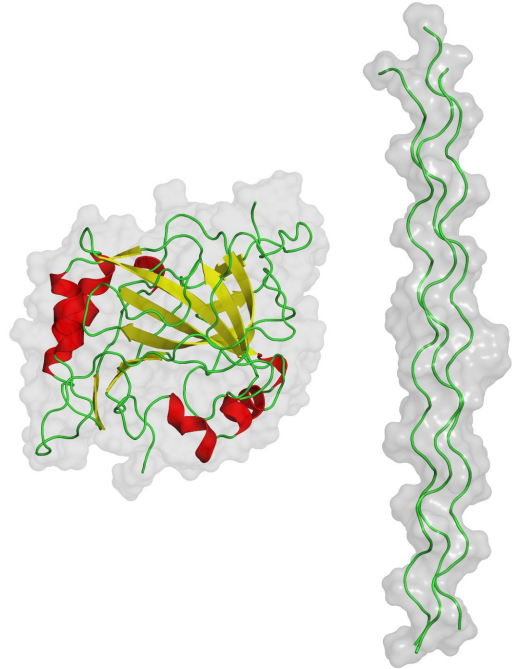
Różnorodność białek

- ATP synthase, 4814 aa
- Actin filament, 4512 aa
- Proliferating cell nuclear antigen, 754 aa
- Insulin, 21 aa
- Myoglobin, 153 aa
- Porin, 413 aa
- Ca²⁺ transporter, 1000 aa
- Antibody, 1316 aa



Strukturalne rodzaje białek

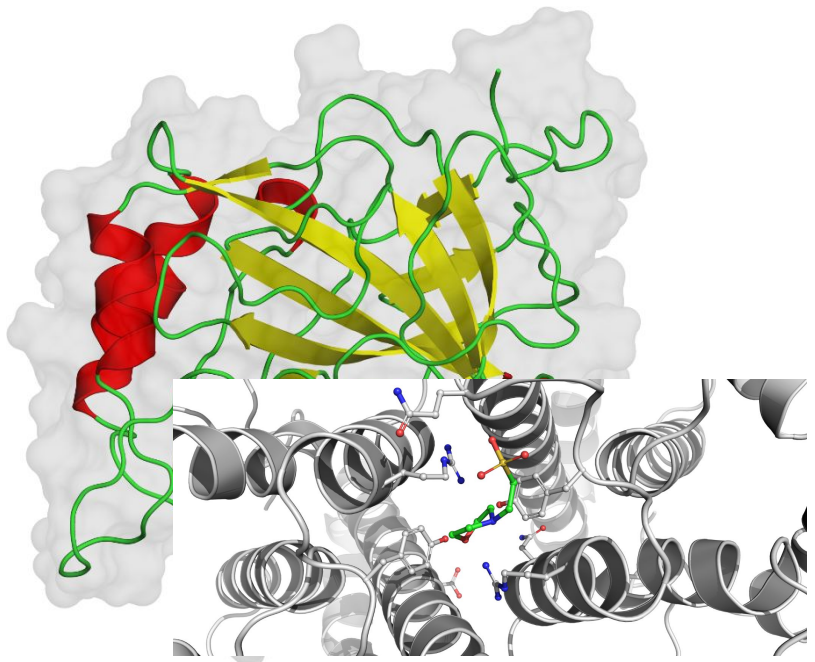
- Globularne
białko globularne, białko o kształcie kulistym lub sferoidalnym, zbudowane z gęsto połączonych lub zwijanych łańcuchów peptydowych; wartość stosunku osiowego cząsteczki nie przekracza 3 : 1 lub 4 : 1; do b. g. należy ogromna większość białek, m.in. albuminy i globuliny oraz wszystkie enzymy.
- Fibrylarne
białka proste o strukturze włóknkowej stanowiące podstawowy materiał budulcowy organizmów zwierzęcych. Są to typowe białka o budowie włóknistej, dzięki temu pełnią funkcje podporowe. Do tej grupy białek należy keratyna, kolagen, miozyna i fibryna.



Właściwości

Fałdowanie białka jest niezbędne dla:

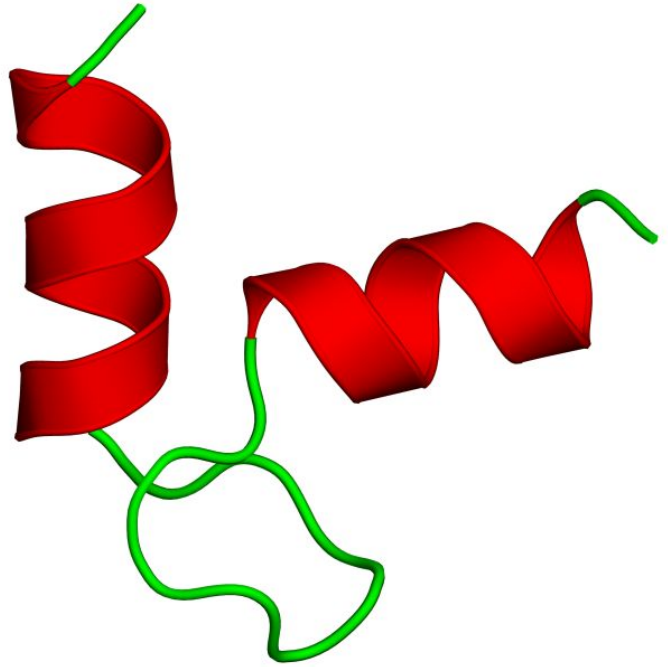
- formacji przestrzennych podstaw aktywności biologicznej:
 - miejsca wiązania
 - miejsca katalitycznego
 - miejsca regulacji/aktywacji
- wiąże się z:
 - zdolnością katalityczną
 - funkcjami transportowymi
 - 'odpornością'
 - regulacją aktywności



HLH
helix-loop-helix

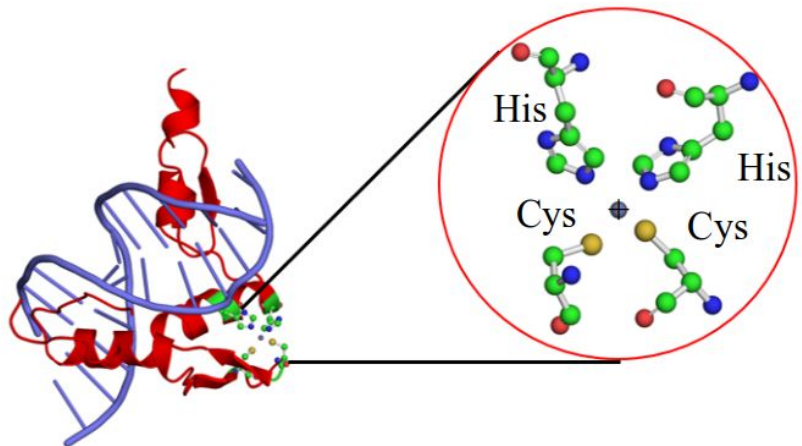
EF-hand (wiązanie Ca^{2+})

bHLH (wiązanie DNA)



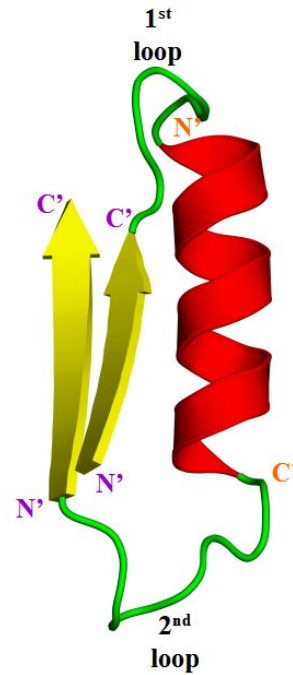
HLH
palec cynkowy

- Palec cynkowy, motyw palca cynkowego (ang. zinc finger domain) – rodzaj domeny białkowej występującej w białkach wiążących DNA i biorący bezpośredni udział w związaniu cząsteczki kwasu nukleinowego przez białko. Palec cynkowy składa się z dwóch antyrównoległych β -katek i α -helisy. Obecność jonu cynku (Zn^{2+}) jest kluczowa dla stabilności domeny – w przypadku jego braku nie dochodzi do powstania wystarczająco dużej domeny posiadającej hydrofobowy rdzeń i przez to funkcjonalnej.



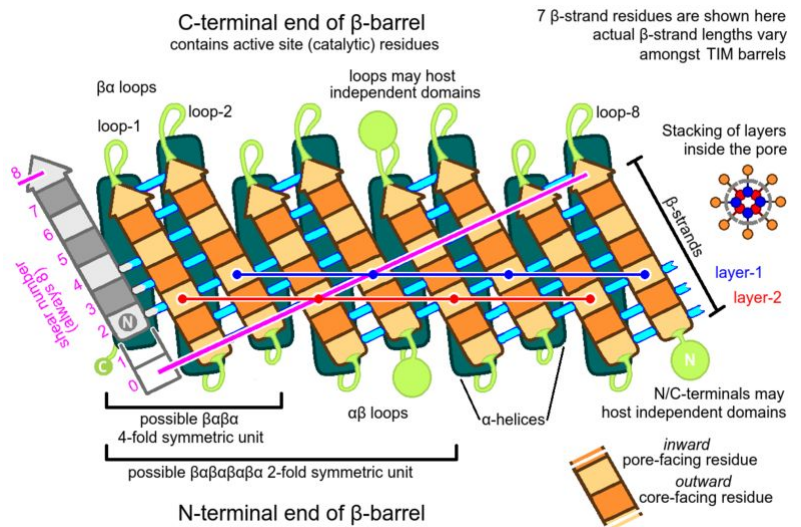
Motywy mieszane

- β - α - β
 - niezwykle popularny(!)
 - pozwala ukrywać reszty aminokwasowe
 - charakterystyczne miejsca wiązania



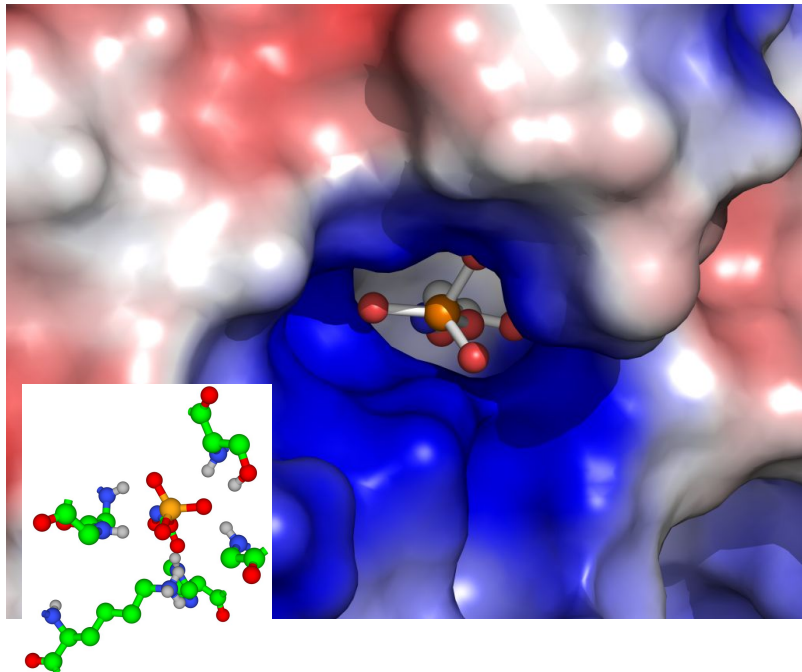
TIM barrel

- Beczka TIM (triose-phosphate isomerase, izomeraza triozowo-fosforanowa), znana również jako baryłka alfa/beta to konserwatywny fałd białkowy składający się z ośmiu helis alfa (helis α) i ośmiu równoległych pasm beta (pasm β), które występują naprzemiennie wzdłuż szkieletu peptydowego.
- Beczki TIM są wszechobecne, a około 10% wszystkich enzymów przyjmuje ten fałd.
- Ponadto pięć z siedmiu klas enzymów komisji enzymatycznej (EC) obejmuje białka baryłkowe TIM.
- Fałd baryłkowy TIM jest ewolucyjnie starożytny, a wielu jego członków ma dziś niewielkie podobieństwo sekwencji.

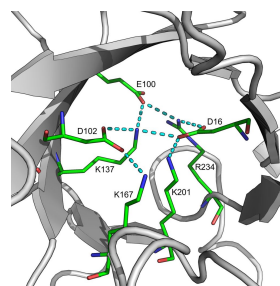
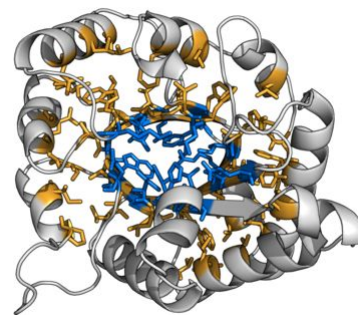
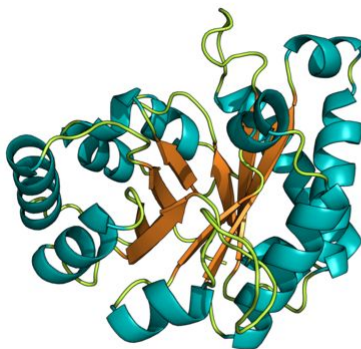
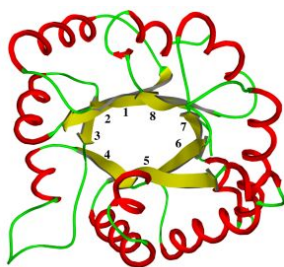


Beczka TIM

Miejsce aktywne



Beczka TIM



Domena

- Motyw strukturalny (lub funkcjonalny) białek.
- Powtarzalny układ (motyw) aminokwasów zachowany w strukturze lub sekwencji.
- Funkcja... często nieznaną.
- Występowanie... zazwyczaj 2-5 na białko.

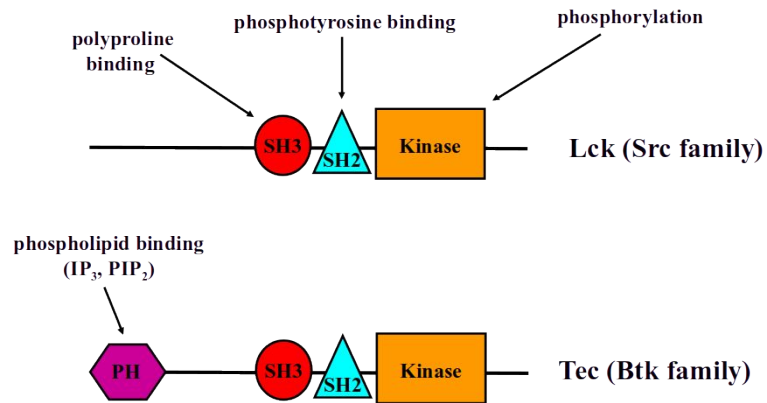
InterPro/Pfam

- InterPro to baza danych rodzin białek, domen białkowych i miejsc funkcjonalnych, w której możliwe do zidentyfikowania cechy znalezione w znanych białkach można zastosować do nowych sekwencji białkowych w celu ich funkcjonalnego scharakteryzowania.
- Pfam to baza danych rodzin białek, która zawiera ich adnotacje i wielokrotne wyrównania sekwencji wygenerowane przy użyciu ukrytych modeli Markowa. Wersja Pfam 36.0, została wydana we wrześniu 2023 roku i zawiera 20 795 rodzin.

The screenshot shows the InterPro website interface. The top navigation bar includes 'Home', 'Search', 'Browse', 'Results', 'Release notes', 'Download', 'Help', 'About', and 'Contact us'. The main content area displays a table of protein families with columns for 'Accession', 'Name', 'Profile type', 'DB', and 'Associated info'. The table lists several families, including transmembrane receptors and ATPase families. A sidebar on the left provides filters for 'Member Database Entry Type' and 'InterPro State'. Below the table, there is a 'Show' dropdown and a 'results' link.

The diagram below the screenshot illustrates the InterPro database structure. It is organized into three main categories: 'SIGNATURE METHOD', 'BIOLOGICAL ENTITY', and 'MEMBER DATABASES'. 'SIGNATURE METHOD' includes Profile HMMs, Profiles, Patterns, and Composition Prediction. 'BIOLOGICAL ENTITY' includes Homologous Superfamilies, Domain & Families, Features & Sites, and Intrinsic Disorder. 'MEMBER DATABASES' includes CAPRI, SUPERFAMILY, Pfam, SMART, SCOP, PROSITE, PROSITE Profiles, CDD, HAMAP, PROSITE Patterns, PROSITE Profiles, PROSITE Patterns, and Pfam. All these categories are connected to the central 'INTERPRO' database.

Modularność białek



Aspekty inżynieryjne

- Mutacja
 - miejsce aktywne:
zmiana aktywności +/-
 - miejsce wiązania:
zmiana powinowactwa +/-
 - struktura:
zmian właściwości makroskopowych +/-

Aspekty inżynieryjne

Co zachować?

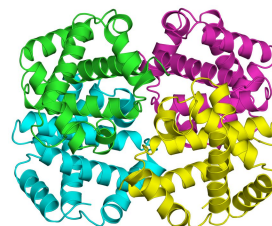
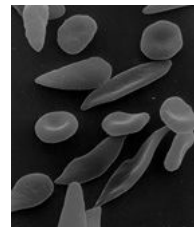
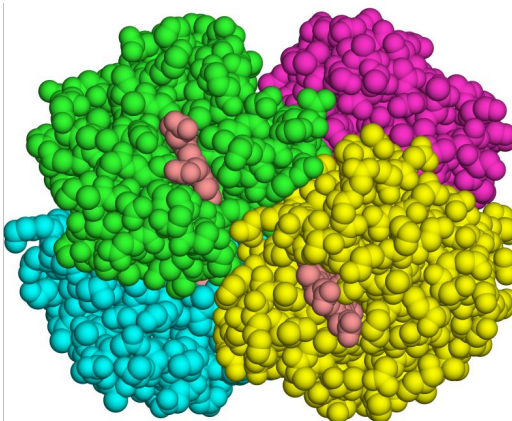
- Obszary funkcjonalne (centrum aktywne, etc.)
- Rdzeń białka
- Integralność struktury drugorzędowej

Jak mutować?

- Konserwatywnie wykorzystując pokrewieństwo aminokwasów.
- Liberalnie kompensując wprowadzane zmiany.

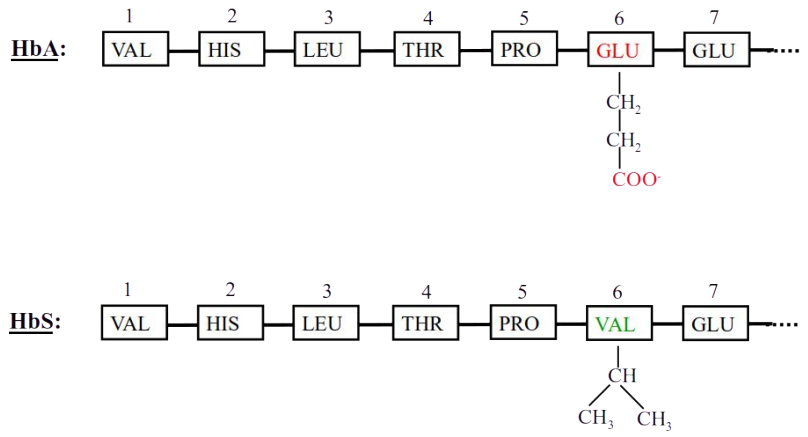
Niedokrwistość sierpowata

- Niedokrwistość sierpowata, anemia sierpowata (łac. anaemia drepanocytica, ang. sickle cell anemia) rodzaj wrodzonej niedokrwistości spowodowanej nieprawidłową budową hemoglobiny.

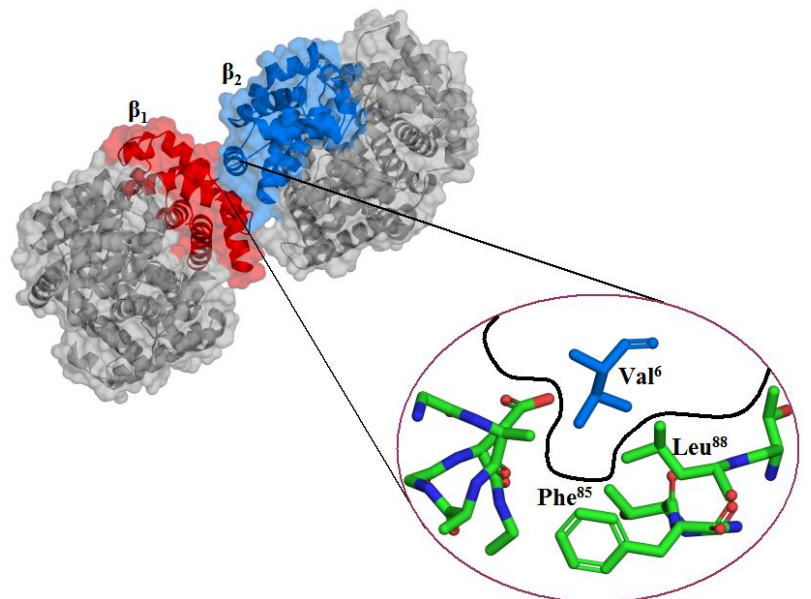


Niedokrwistość sierpowata

- Mutacja punktowa w genie łańcucha β (HBB) hemoglobiny powoduje zmianę pojedynczego aminokwasu w sekwencji białka (z kwasu glutaminowego na walinę, w pozycji 6 od końca NH₂).
- Hemoglobinę z tak zmienioną, nieprawidłową strukturą 1-rzędową określa się jako hemoglobinę S (HbS) w przeciwieństwie do normalnej, występującej u dorosłych hemoglobiny A (HbA). Hemoglobina S charakteryzuje się zmienionymi w porównaniu z hemoglobiną A własnościami fizykochemicznymi.



Niedokrwistość sierpowata



Aspekty inżynieryjne

Co zachować?

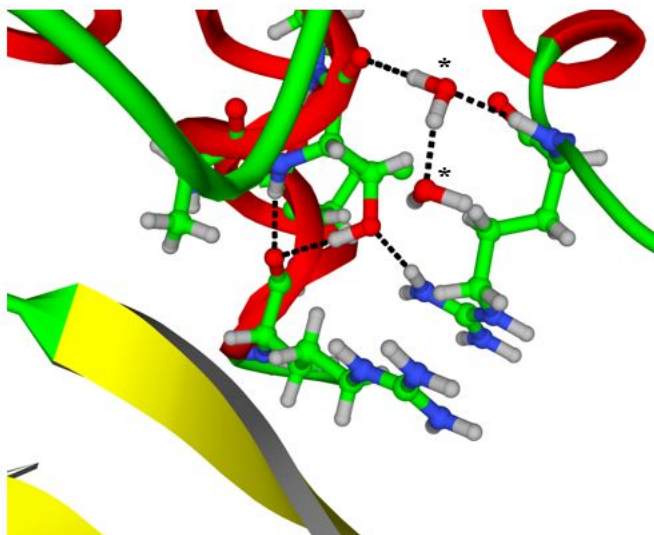
- Obszary funkcjonalne (centrum aktywne, etc.)
- Rdzeń białka
- Integralność struktury drugorzędowej

Jak mutować?

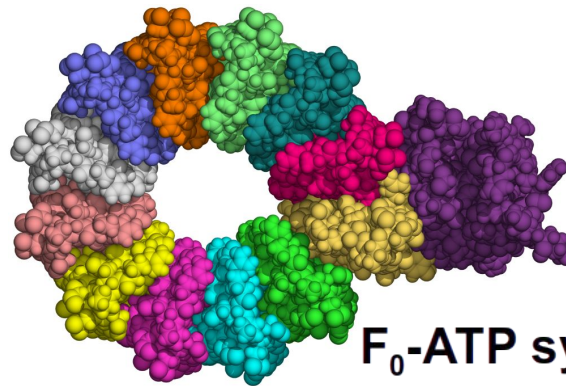
- Konserwatywnie wykorzystując pokrewieństwo aminokwasów.
- Liberalnie kompensując wprowadzane zmiany.

Woda

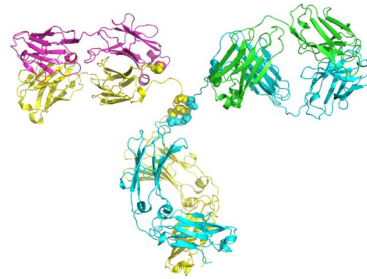
- Maskuje grupy polarne
- Pomaga w wiązaniu związków małocząsteczkowych
- Pomaga w katalizie (kwas/zasada, polaryzacja wiązań)
- Pomaga w transporcie



Struktura czwartorzędowa

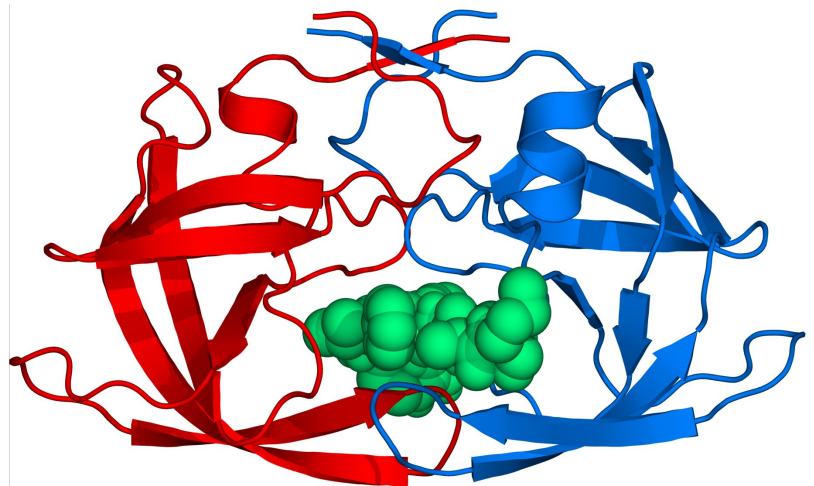


F₀-ATP synthase



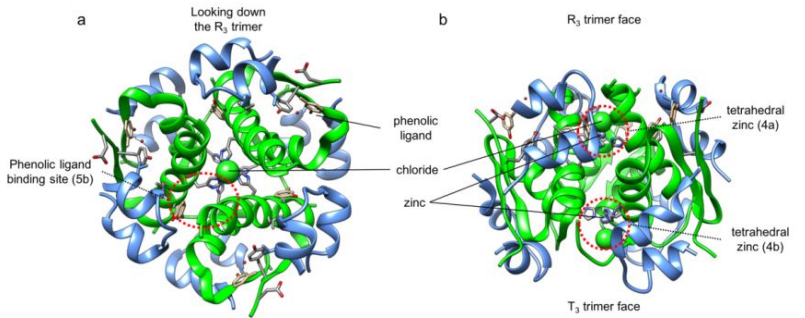
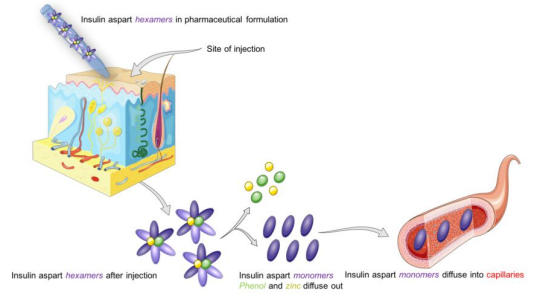
Znaczenie
struktury czwartorzędowej

- Formacja miejsca aktywnego
- Poprawa stabilności (np. insulina)



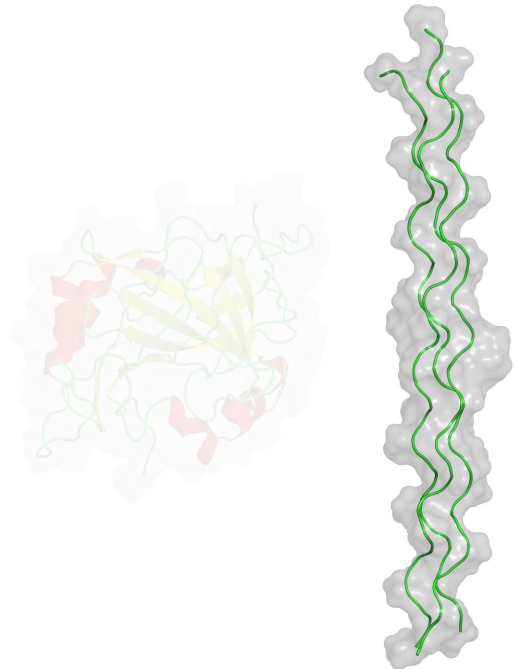
The HIV-1 aspartyl protease

Insulina



Strukturalne rodzaje białek

- Globularne**
 białko globularne, białko o kształcie kulistym lub sferoidalnym, zbudowane z gęsto pofalowanych lub pozwijających łańcuchów peptydowych; wartość stosunku osiowego cząsteczki nie przekracza 3 : 1 lub 4 : 1; do b. g. należy ogromna większość białek, m.in. albuminy i globuliny oraz wszystkie enzymy.
- Fibrylarne**
 białka proste o strukturze włóknkowej stanowiące podstawowy materiał budulcowy organizmów zwierzęcych. Są to typowe białka o budowie włóknistej, dzięki temu pełnią funkcje podporowe. Do tej grupy białek należy keratyna, kolagen, miozyna i fibroina.



Wykorzystanie białek fibrylarnych

- Wsparcie mechaniczne i ochrona
 - cytoszkielet, np. keratyna
 - macierz pozakomórkowa, np. kolagen
- Budowa struktur komórkowych
- Komunikacja wewnątrzkomórkowa
- 'Ruch'
- Budowa struktur zewnętrznych, np. jedwab
- Funkcje regulacyjne
 - pigmentacja
 - wzrost włosów
 - regeneracja nabłonka

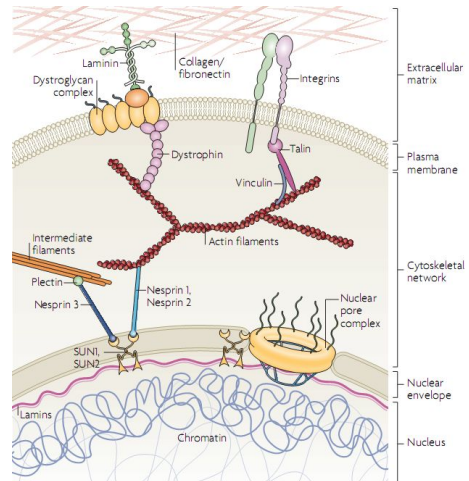
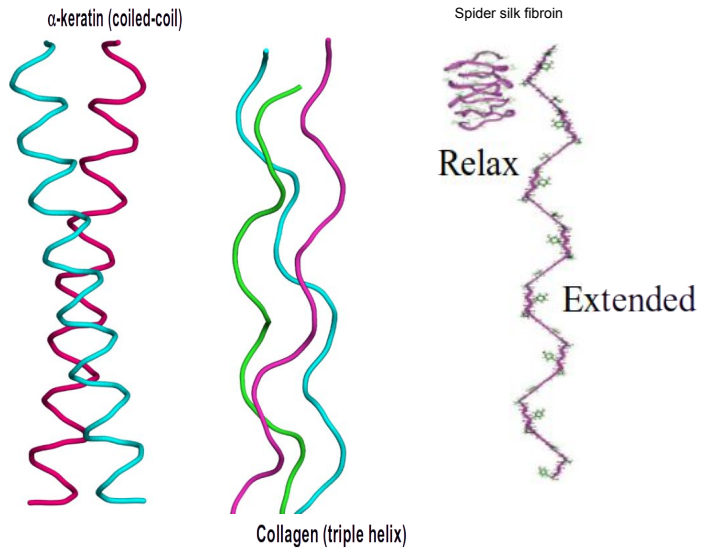


TABLE 2.10 Types of extracellular matrix (ECM) proteins and their functions. ECM: extracellular matrix. The table was adapted from [563].

Protein	Function
Collagen (fibrillar)	<ul style="list-style-type: none"> • Forming structural scaffolds • Stiffness control and tension resistance • Binding of adhesion molecules and some growth factors
Collagen (non-fibrillar)	<ul style="list-style-type: none"> • Aiding ECM organization and stability • Aiding fibrillar collagen formation • Modulation of cellular migration and proliferation • Creating physical barriers for solute penetration to tissue
Fibrin	<ul style="list-style-type: none"> • Forming blood clots • Stiffness control and tension resistance • Binding of adhesion molecules
Elastin	<ul style="list-style-type: none"> • Providing elastic recoil to tissues
Proteoglycans	<ul style="list-style-type: none"> • Compression resistance • Hindering transport of water and macromolecules • Binding of growth factors and chemokines

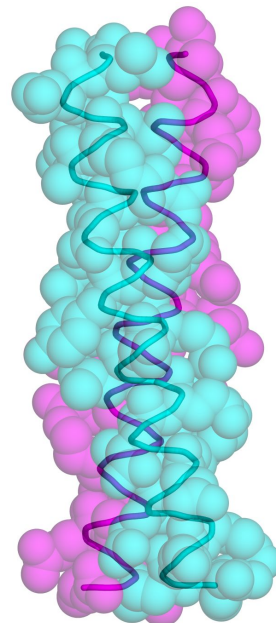
Właściwości ogólne

- Superstruktura drugorzędowa
 - nadrzędne elementy α lub β
- Hydrofobowość
- Zdolność tworzenia makrostruktur czwartorzędowych



Keratyna

- Keratyny – grupa nierozpuszczalnych w wodzie białek fibrylarnych wytwarzanych przez keratynocyty w procesie keratynizacji. Występują w formie miękkiej lub twardej. W komórkach nabłonkowych człowieka zidentyfikowano dwadzieścia izoform cytokeratyn o masie cząsteczkowej od 40 do 70 kDa, natomiast w komórkach innych ssaków wykazano około dziesięciu izoform tzw. keratyn twardych, obecnych w wytworach skóry: piórach, wełnie, rogach, paznokciach i innych. Z keratyny zbudowany jest zrogowaciały naskórek ssaków.
- **Lewoskrętna** helisa (*ang. coiled-coil*) zbudowana z 2 **prawoskrętnych** α helis.
- Bogata w Ala i Gly



Keratyna

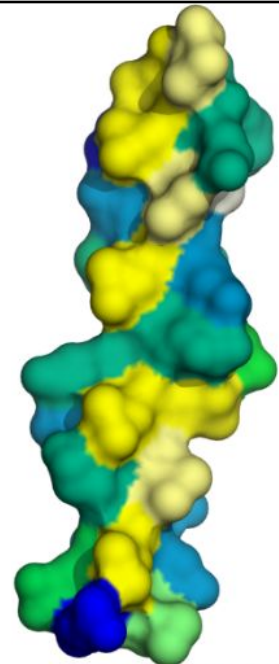
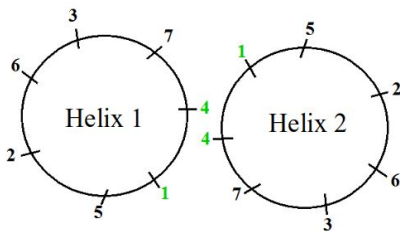
- Powtarzalny motyw: HxxHCxC

H-hydrofobowe

C-naładowane

P-polarne

a	b	c	d	e	f	g
H	P	P	H	C	P	C

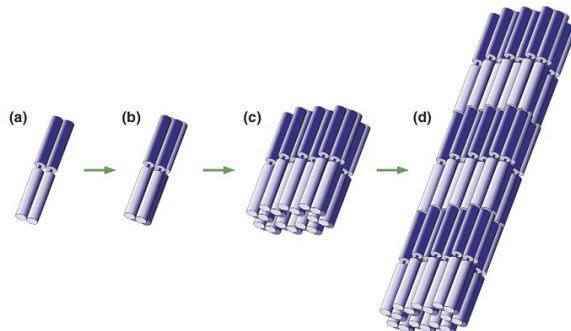


L I F V A G C S T W P Y Q H K N E D R
 Hydrophobic Hydrophilic

Keratyna

- Zdolność tworzenia makrostruktur
 - 'twarde' - paznokcie, rogi, kopyta
 - 'miękkie' - skóra, mięśnie

- Równoległe dimery
- Przeciwrównoległe tetramery
- Octamery
- Włókna ULF



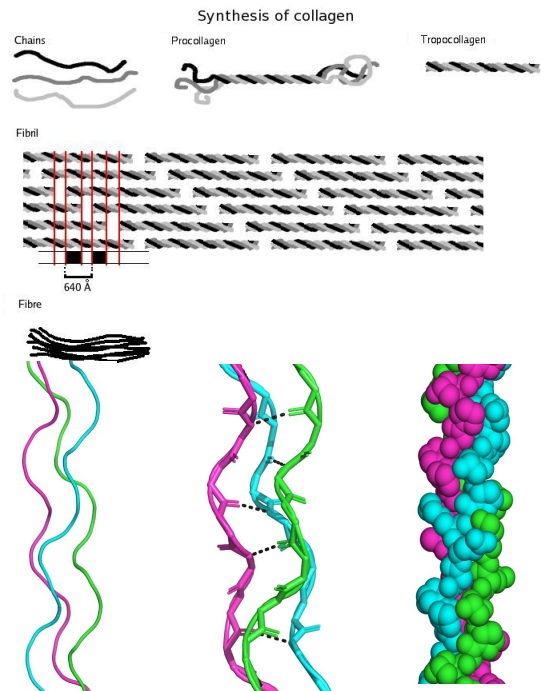
Kolagen

- Kolagen (/ˈkolədʒən/) jest głównym białkiem strukturalnym w macierzy zewnątrzkomórkowej występującej w różnych tkankach łącznych organizmu.
- Jako główny składnik tkanki łącznej, jest najobficiej występującym białkiem u ssaków, stanowiąc od 25% do 35% zawartości białka w całym organizmie.
- Kolagen składa się z aminokwasów połączonych ze sobą, tworząc potrójną helisę wydłużonych włókien znaną jako helisa kolagenowa. Występuje głównie w tkance łącznej, takiej jak chrząstka, kości, ścięgna, więzadła i skóra.
- Witamina C jest niezbędna do syntezy kolagenu, a witamina E zwiększa jego produkcję.

Typ	Budowa	Występowanie	Inne cechy
Kolageny fibrylarne (włókniste)			
I	$[\alpha1(I)]_2[\alpha2(I)]$	skóra, ścięgna, więzadła, kości, zębina, inne tkanki łączne niebędące chrząstką	włókno o dł. 300 nm
II	$[\alpha1(II)]_3$	chrząstki, ciało szkliste, jądro miażdżyste (w krążku międzykręgowym)	włókno o dł. 300 nm
III	$[\alpha1(III)]_3$	rozciągliwe tkanki łączne jak skóra, mięśnie, układ naczyniowy; często razem z typem I	włókno o dł. 300 nm
V	$[\alpha1(V)]_2[\alpha2(V)]$, $[\alpha1(V)]_3$	rogówka, zęby, kości, łożysko, skóra, mięśnie gładkie; często razem z typem I	włókno o dł. 390 nm, N-końcowy fragment globularny
Kolageny tworzące układy sieciowe			
IV	$[\alpha1(IV)]_2[\alpha2(IV)]$	wszystkie błony podstawne	
VIII	$[\alpha1(VIII)]_3$, $[\alpha2(VIII)]_3$, $[\alpha1(VIII)]_2[\alpha2(VIII)]^{38}$	śródbłonek, błona Descemeta	tworzy heksagonalne układy sieciowe
X	$[\alpha1(X)]_3$	chrząstka hipertroficzna	tworzy heksagonalne układy sieciowe
Kolageny kotwiczące			
VII	$[\alpha1(VII)]_3$	pódesmosomy	najdłuższa domena trójhelikalna o dł. 420 nm
Kolageny towarzyszące włóknom o przerywanej strukturze helisowej (FACIT)			
IX	$[\alpha1(IX)]_2[\alpha2(IX)]_3[\alpha3(IX)]$	chrząstki, ciało szkliste; towarzyszy kolagenowi typu II	3 krótkie domeny kolagenowe zawierające 4 regiony globularne ¹¹
XII	$\alpha1(XII)^{11}$	towarzyszy kolagenowi typu I	
Kolageny transblonowe			
XIII	$[\alpha1(XIII)]_3$	wiele tkanek, m.in. płytka nerwowo-mięśniowa	kolageny transblonowe mają N-końiec zatopiony wewnątrz komórki i domenę hydrofobową przechodzącą przez dwuwarstwę lipidową błony ¹¹
XVII	$[\alpha1(XVII)]_3$	nabłonek, hemidesmosomy	
Multipleksyny – kolageny o licznych nieciągłych domenach o budowie helikalnej			
XV	$[\alpha1(XV)]_3$	występuje w proteoglikanach, gdzie stanowi rdzeń białkowy połączony z siarczanem chondroityny; towarzyszy kolagenom błony podstawnej	stabilizuje mięśnie szkieletowe i mikronaczynia
XVIII	$[\alpha1(XVIII)]_3$	towarzyszy kolagenom błony podstawnej	utrzymuje strukturalną integralność błony podstawnej; bliski homolog kolagenu typu XV

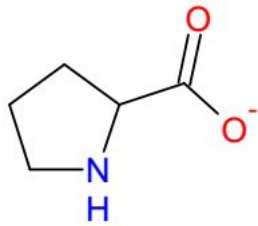
Kolagen

- Hierarchiczna budowa
- Potrójna helisa gwarantuje:
 - stabilność
 - długość: ~1000 AA (~3000 Å)
 - lewoskrętna helisa
 - brak wiązań wodorowych wewnątrz helisy
 - wiązania wodorowe pomiędzy helisami
 - 3,3 AA na obrót
 - 2,9 Å na poziom

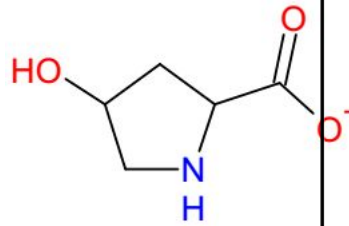


Kolagen

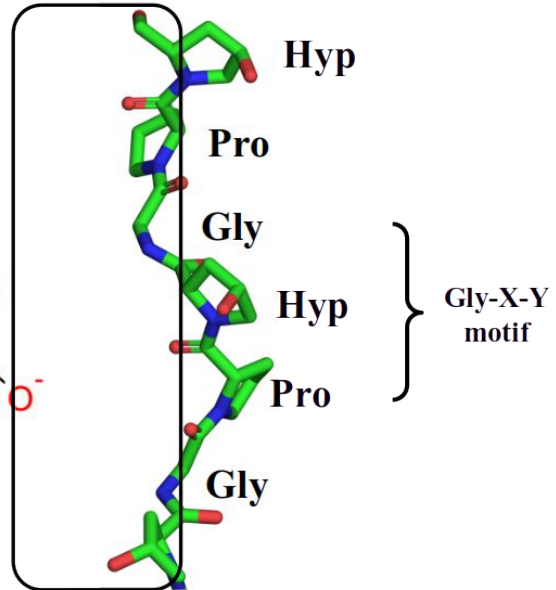
- Wysycenie aminokwasami Pro/Hyp



Pro

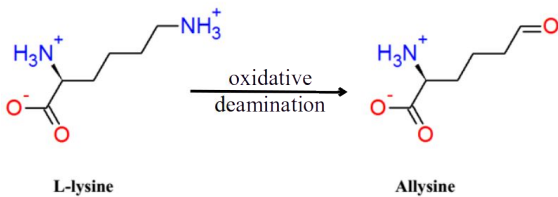


Hyp



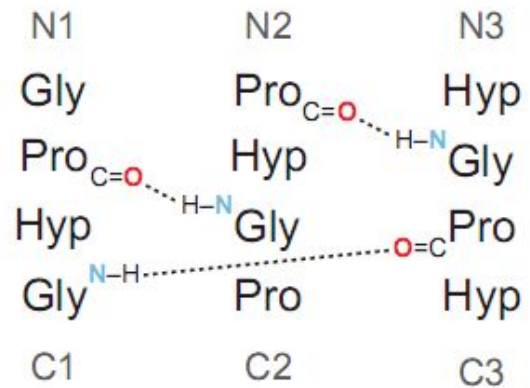
Kolagen

- Stabilność:
 - wiązania wodorowe
 - cross-link związany ze starzeniem



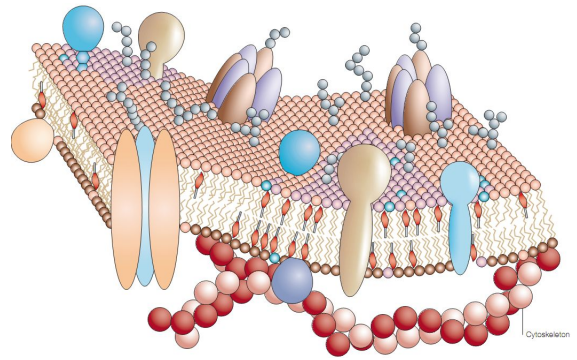
L-lysine

Allylsine



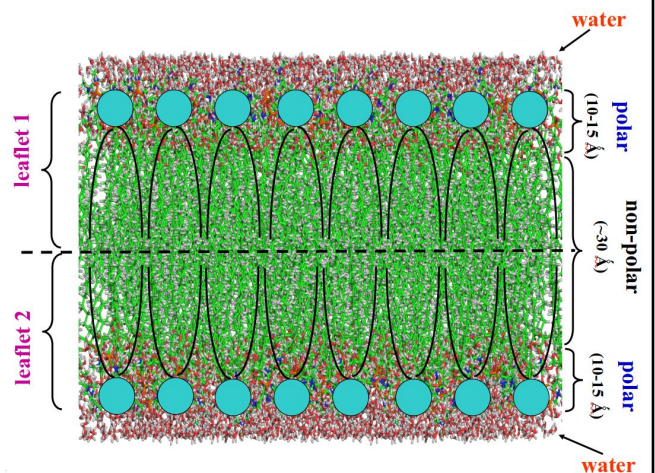
Białka błonowe

- Białka błonowe to powszechne białka, które są częścią błon biologicznych lub wchodzą z nimi w interakcje.
- Białka błonowe dzielą się na kilka szerokich kategorii w zależności od ich lokalizacji.
 - Integralne białka błonowe są stałą częścią błony komórkowej i mogą przenikać przez błonę (transbłonowe) lub wiązać się z jedną lub drugą stroną błony (integralne monotopowe).
 - Peryferyjne białka błonowe są przejściowo związane z błoną komórkową.

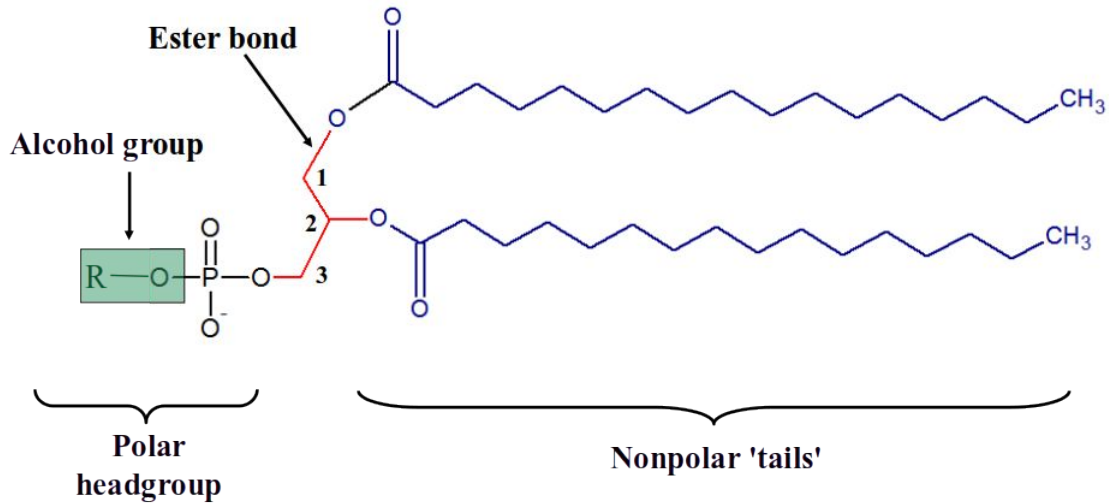


Błona komórkowa

- Błona biologiczna, biomembrana lub błona komórkowa to selektywnie przepuszczalna błona, która oddziela wnętrze komórki od środowiska zewnętrznego lub tworzy przedziały wewnątrzkomórkowe, służąc jako granica między jedną częścią komórki a drugą.
- Błony biologiczne, w postaci błon komórek eukariotycznych, składają się z dwuwarstwy fosfolipidowej z wbudowanymi, integralnymi i peryferyjnymi białkami wykorzystywanymi w komunikacji i transporcie substancji chemicznych i jonów. Większość lipidów w błonie komórkowej zapewnia płynną matrycę dla białek, które mogą się obracać i dyfundować na boki w celu fizjologicznego funkcjonowania.
- Białka są przystosowane do wysokiej płynności środowiska dwuwarstwy lipidowej z obecnością pierścieniowej otoczki lipidowej, składającej się z cząsteczek lipidów ściśle związanych z powierzchnią integralnych białek błonowych. Błony komórkowe różnią się od izolujących tkanek utworzonych przez warstwy komórek, takich jak błony śluzowe, błony podstawne i błony surowicze.

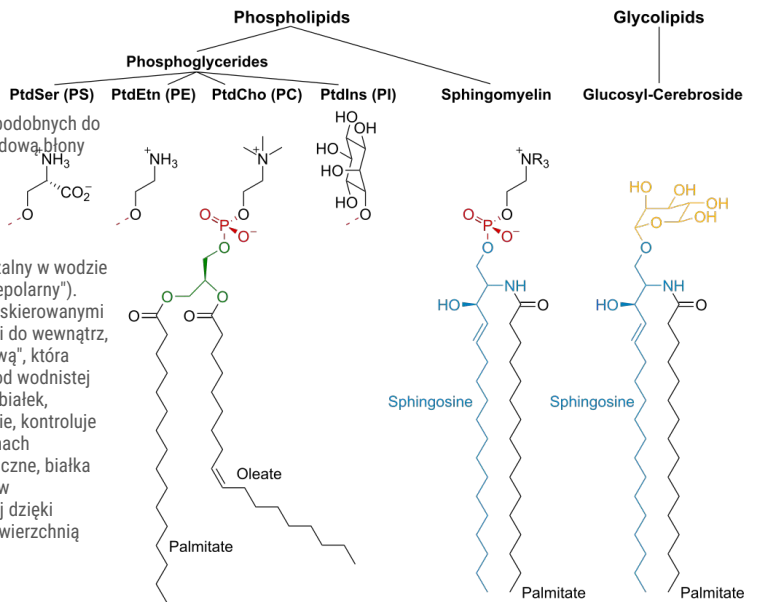


Budowa błony komórkowej



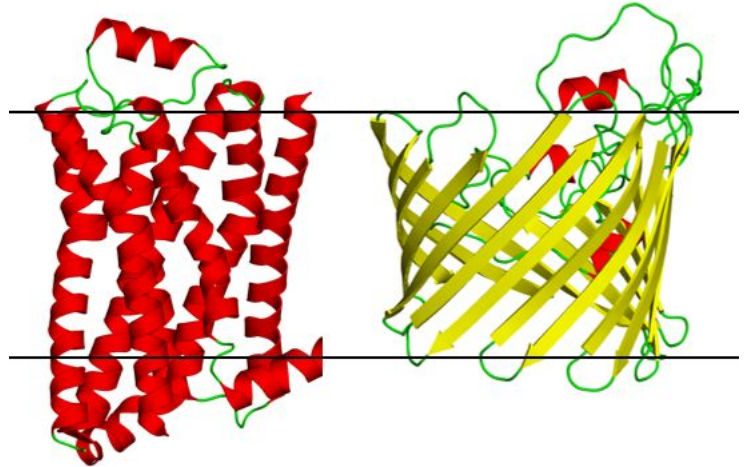
Budowa błony komórkowej

- Lipidy błonowe to grupa związków (strukturalnie podobnych do tłuszczów i olejów), które tworzą dwuwarstwę lipidową błony komórkowej.
- Trzy główne klasy lipidów błonowych to
 - fosfolipidy
 - glikolipidy
 - cholesterol.
- Lipidy są amfifilowe: mają jeden koniec rozpuszczalny w wodzie ("polarny") i koniec rozpuszczalny w tłuszczu ("niepolarny"). Tworząc podwójną warstwę z polarnymi końcami skierowanymi na zewnątrz i niepolarnymi końcami skierowanymi do wewnątrz, lipidy błonowe mogą tworzyć "dwuwarstwę lipidową", która utrzymuje wodniste wnętrze komórki oddzielone od wodnistej powierzchni zewnętrznej. Układ lipidów i różnych białek, działających jako receptory i pory kanałów w błonie, kontroluje wejście i wyjście innych cząsteczek i jonów w ramach metabolizmu komórki. Aby pełnić funkcje fizjologiczne, białka błonowe mogą obracać się i dyfundować na boki w dwuwymiarowej przestrzeni dwuwarstwy lipidowej dzięki obecności otoczki lipidowej ściśle związanej z powierzchnią białka, zwanej pierścieniową otoczką lipidową.



Białka błonowe struktura

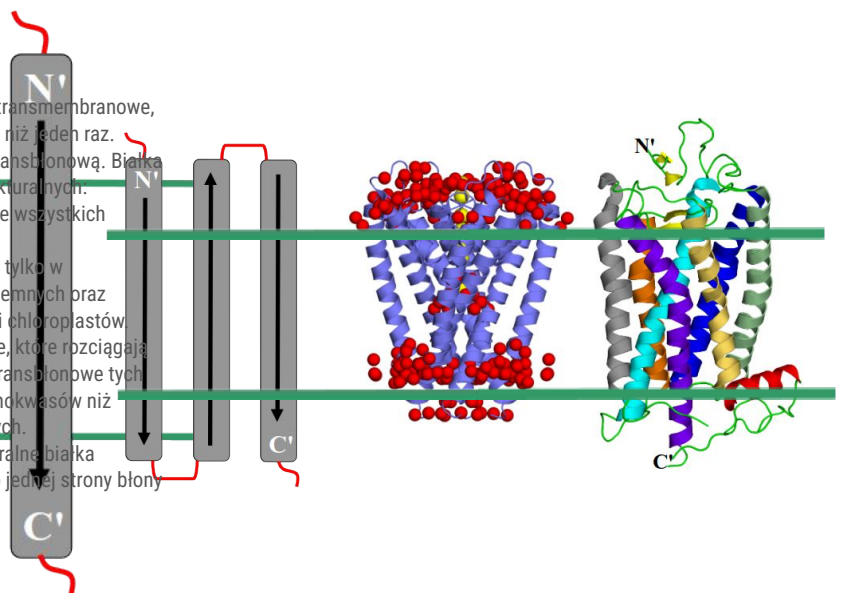
- >90 %: α helikalne



Białka błonowe struktura

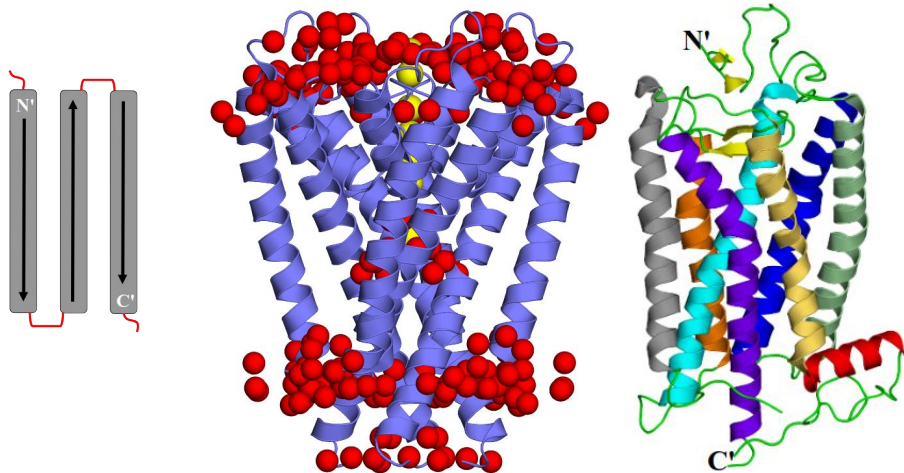
Bitopic

- >90 %: α helikalne
- Integralne białka politopowe to białka transmembranowe, które rozciągają się przez błonę więcej niż jeden raz. Białka te mogą mieć różną topologię transbłonową. Białka te mają jedną z dwóch architektur strukturalnych.
- Białka wiązki helisy, które są obecne we wszystkich typach błon biologicznych;
- Białka beta-beczkowe, które występują tylko w zewnętrznych błonach bakterii Gram-ujemnych oraz zewnętrznych błonach mitochondriów i chloroplastów
- Białka bitopowe to białka transbłonowe, które rozciągają się w poprzek błony tylko raz. Helikty transbłonowe tych białek mają znacznie inny rozkład aminokwasów niż helikty transbłonowe białek politopowych.
- Integralne białka monotopowe to integralne białka błonowe, które są przyłączone tylko do jednej strony błony i nie rozciągają się na całej długości.



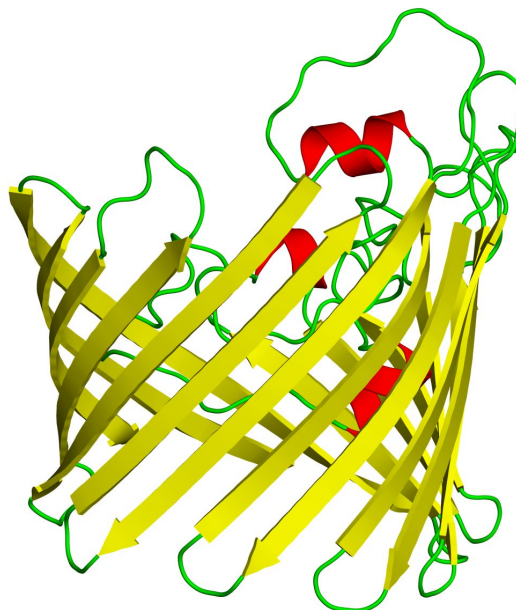
Białka błonowe struktura

- >90 %: α helikalne
- Białka politopowe:
 - Receptory
 - Transportery



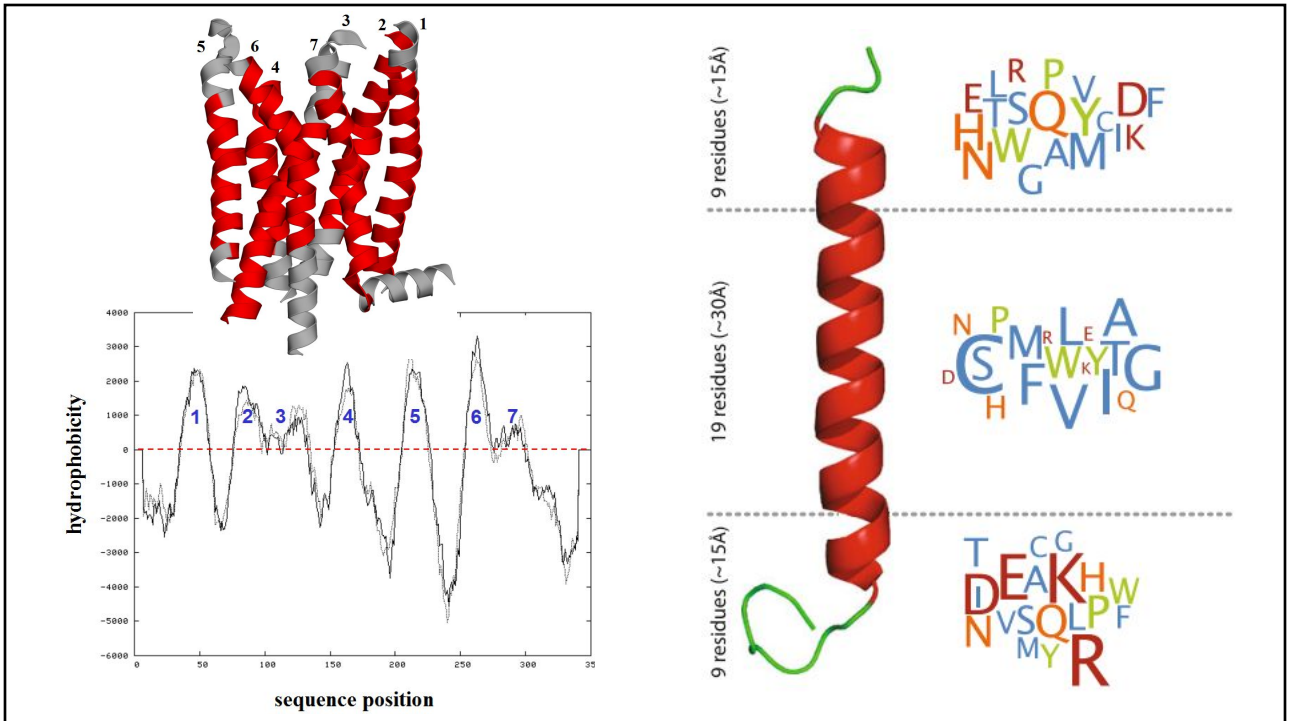
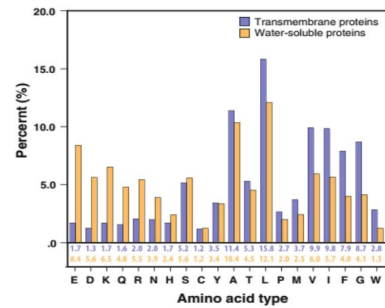
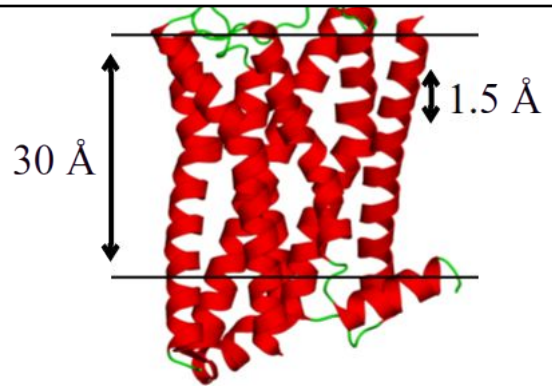
Białka błonowe struktura

- β harmonijka
- Kształt beczki



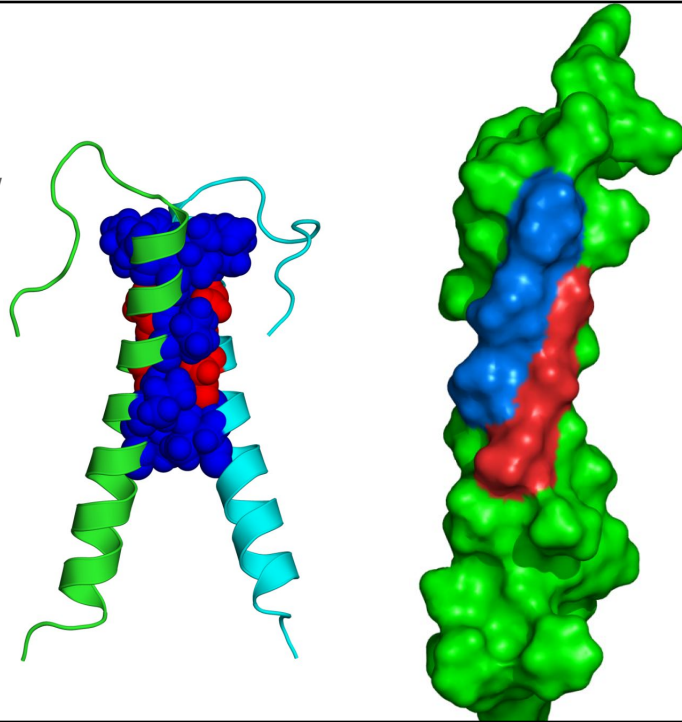
Identyfikacja

- Składa elementów TM (*ang. trans membrane*) odpowiada składowi błony:
 - 15-39 AA (optymalnie 20 AA)
- Leu, Ile, Val, Phe powszechnie obecne
- Rdzeń bardziej polarny niż powierzchnia!



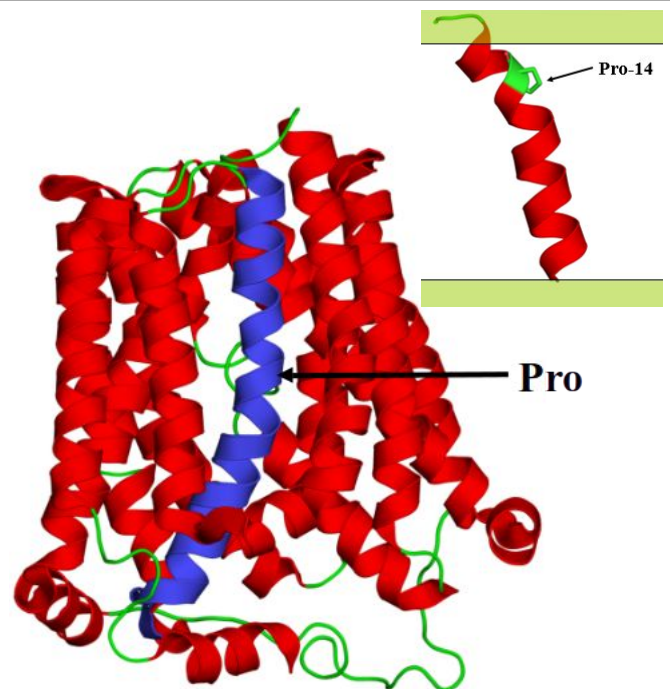
Upakowanie

- Występowanie charakterystyczny
 - grzbietów V/L/I
 - wgłębień G/S/T/A
 -

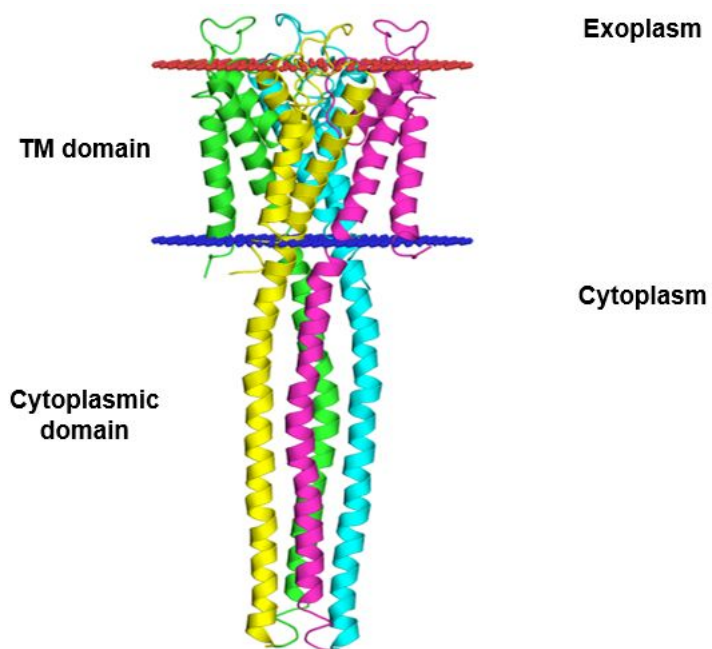


Dynamika

- Zmiana konformacji związana z funkcją:
 - kanał/transporter musi wykazywać selektywność
 - receptor musi posiadać formę aktywną i nieaktywną

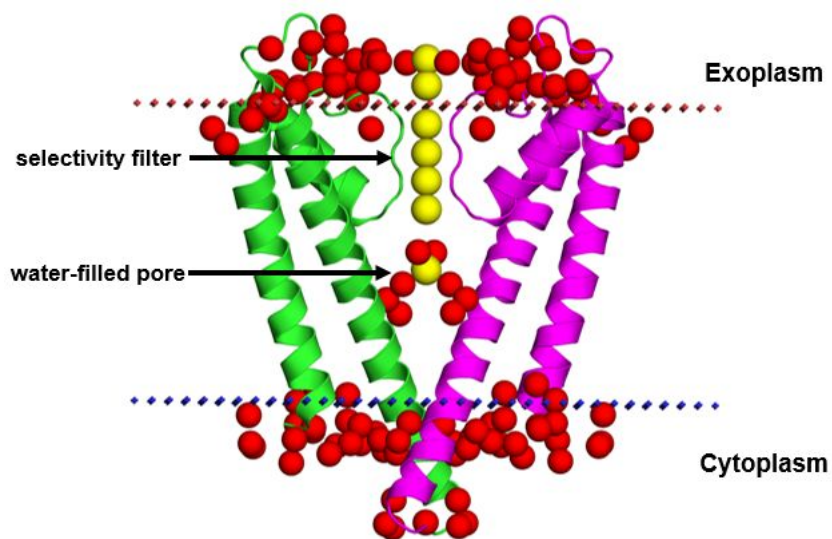


Białka transportowe



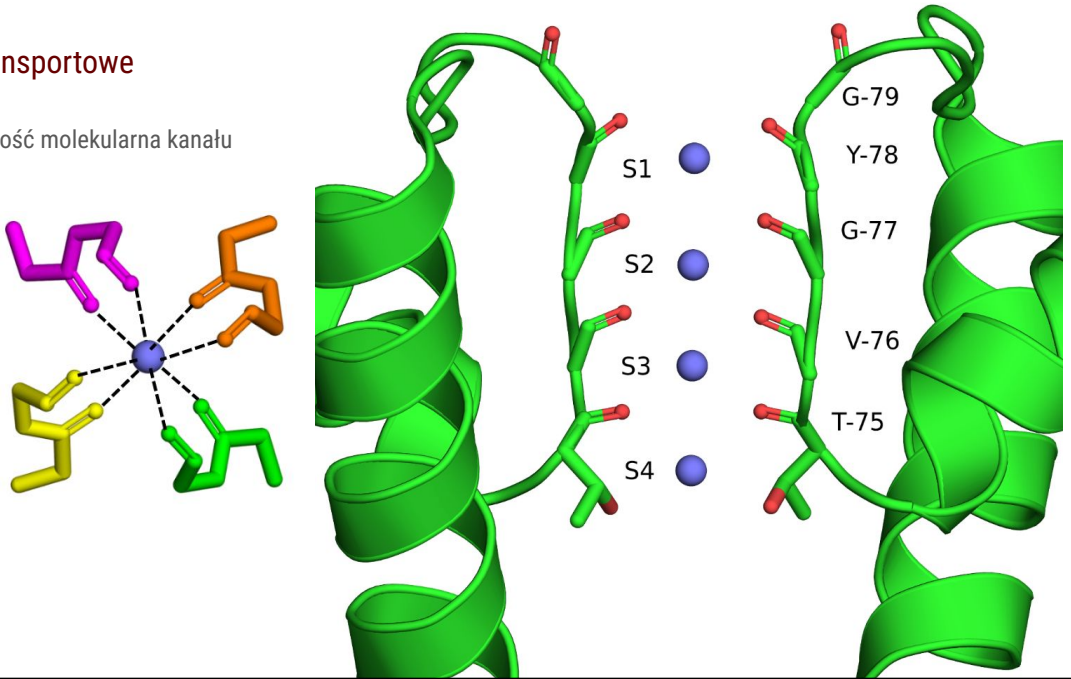
Białka transportowe

- Selektywność



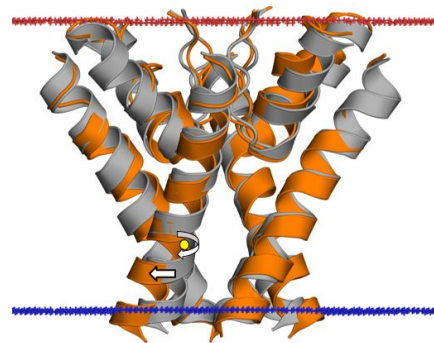
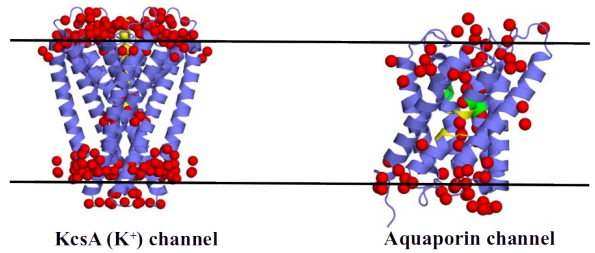
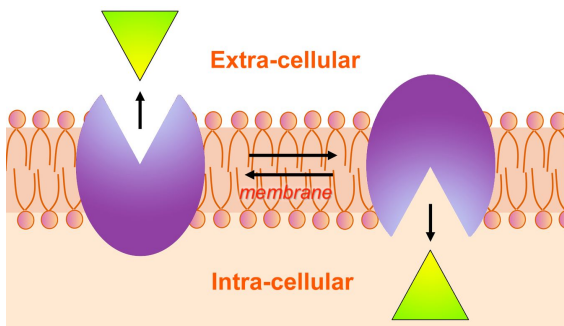
Białka transportowe

- Zgodność molekularna kanału



Białka transportowe

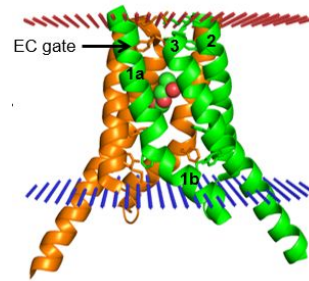
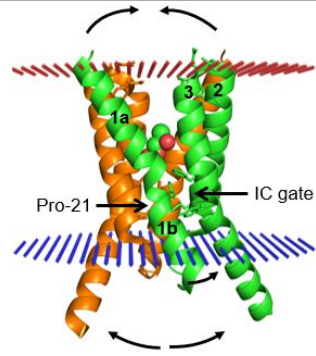
- Reaktywność



Transportery pasywne

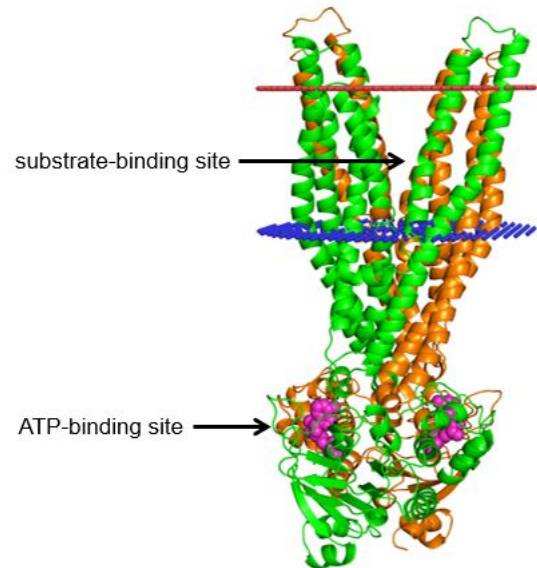
Transport cukrów u bakterii (*ang. semi-sweet transporter*):

- wewnątrzna wiąże substrat
- zewnętrzna bramka jest blokowana przez Y, R, D tworzące interakcje polarna



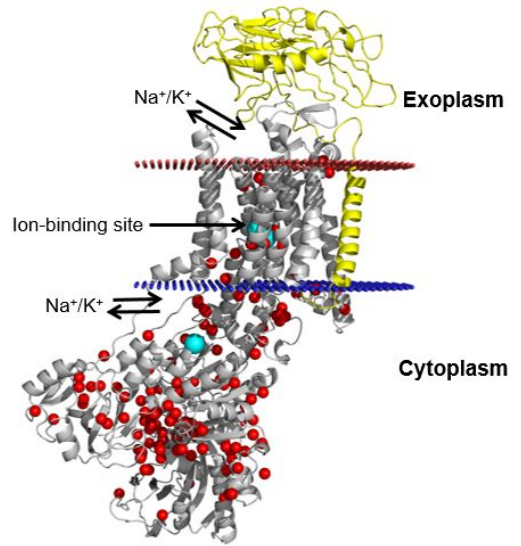
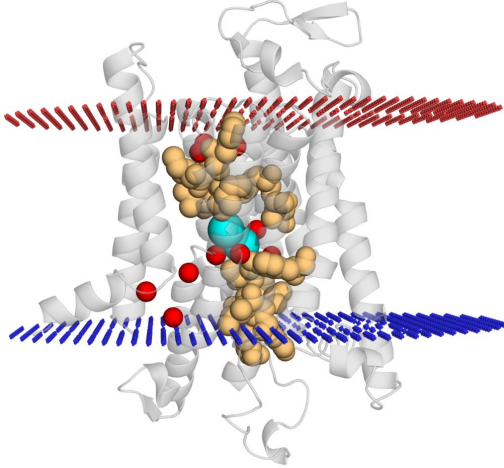
Transportery aktywne

- Wiązanie ATP/SDP/Pi determinuje konformację transportera
- Brak ATP konformacja otwarta
- Związane ATP konformacja stabilna, otwarta na zewnątrz
- Hydroliza ATP powrót do konformacji otwartej



Transportery kaskadowe

- brak kanałów wypełnionych wodą



Transportery kaskadowe

- W transporcie jonów pomaga rozpraszanie ładunków w sekwencji.

