

Albumina - od genu do białka

Wymagane podstawy teoretyczne

1. Właściwości i funkcje albuminy osocza
2. Podstawowe informacje dotyczące ekspresji genu – proces transkrypcji, modyfikacje post-transkrypcyjne u Eukariota (czapeczka, poliadenylacja, usuwanie intronów), właściwości eukariotycznego mRNA. Translacja białek wydzielniczych – znaczenie sekwencji sygnałowej w kierowaniu białek do siateczki śródplazmatycznej.

Wprowadzenie

1. **Albumina osocza** jest u ssaków dominującym białkiem osocza. Stanowi 50- 70% białek osocza (3.4–4.7 g/dL). Około 60% albuminy obecne jest w przestrzeniach międzykomórkowych, a 40% w osoczu. Komórki wątroby produkują i wydzielają albuminę, stanowi ona u naczelnych (małpy i człowiek) około 25% wszystkich tworzonych przez komórki wątroby białek.
2. W wyniku translacji mRNA dla albuminy powstaje pre-pro-białko, po odcięciu sekwencji sygnałowej powstaje pro-białko, które jest transportowane do aparatu Golgiego, gdzie odcinany jest peptyd z N-końca, dając dojrzałe formę białka. U ludzi np. czas półtrwania albuminy w osoczu wynosi około 20 dni. Jest ona białkiem stosunkowo niewielkim – jej masa u człowieka cząsteczkowa wynosi ~67 kDa. Np. homologia z albuminami wołową i króliczą sięga 75%. Zawiera liczne reszty Cys, tworzące 17 mostków disiarczkowych, a jedna wolna grupa –SH ma istotne znaczenie dla funkcji antyoksydacyjnej albuminy. Synteza albuminy spada w odpowiedzi na niedobór białka w diecie.
3. Katabolizm tego białka zachodzi głównie w mięśniach, skórze (około 40–60%) i nerkach (10%), a dokładniej w komórkach śródbłonna naczyń tych tkanek.
4. Funkcje: z uwagi na względnie małą masę cząsteczkową i wysokie stężenie odpowiada za około 75 – 80% ciśnienia osmotycznego osocza. Do endogennych substancji transportowanych przez albuminę należą m.in.: długołańcuchowe kwasy tłuszczowe, aromatyczne kwasy karboksylowe, bilirubina, kwasy żółciowe, porfiryny, tlenek azotu oraz jony metali dwuwartościowych, w tym kationy Co, Cu, Ni, Zn. Jako białko wiążące kationy metali przejściowych uczestniczących w generacji wolnych rodników, takich jak Cu czy Fe, pełni także rolę antyoksydacyjną, a kompleksowanie jonów Cd, Hg i V jest ważne dla procesów detoksyfikacji. Ze względu na obecność wolnej grupy –SH Cys34 albumina per se jest przeciwutleniaczem i ważnym elementem bariery antyoksydacyjnej osocza. Warto również wspomnieć, że białko to stanowi podstawowy materiał zapasowy osocza i jest rozkładane podczas długotrwałego głodzenia lub niedoboru niezbędnych aminokwasów. Wiąże liczne leki, np. sulfonamidy, aspirynę, penicylinę. Katabolizm albuminy jest więc bardzo ważnym problemem badawczym z punktu widzenia patofizjologii, jak również medycyny interwencyjnej.
5. Wskazania do badania albuminy stanowią:
 - a) niedożywienie
 - b) - zaburzenia wchłaniania
 - c) - zespół nerczycowy
 - d) - oparzenia
 - e) - przewlekłe choroby nerek i wątroby

Obniżenie poziomu:

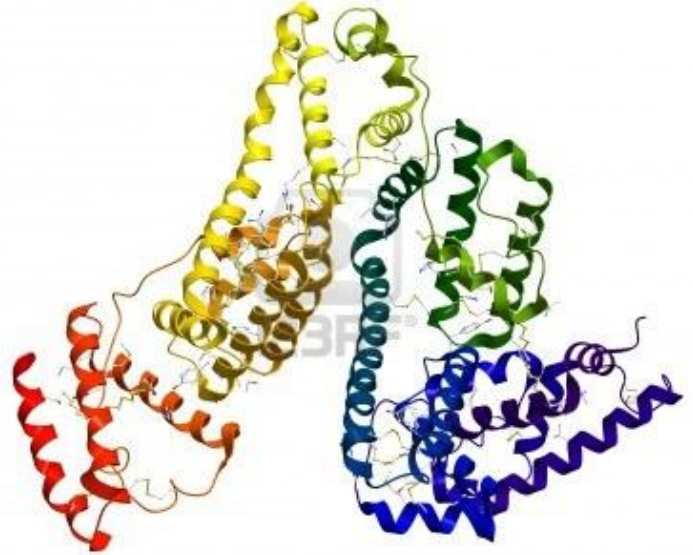
- f) - zaburzenie wchłaniania białek
- g) - niedobory żywieniowe

- h) - utrata białek przez nerki (zespół nerczycowy)
- i) - enteropatia białkogubna
- j) - FIP
- k) - oparzenia
- l) - hipergammaglobulinemia
- m) - utrata krwi
- n) - wysięki
- o) - niedoczynność kory nadnerczy

Do badań albuminę pobiera się z krwi żyłnej "na skrzep".

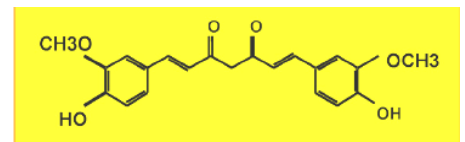
Wartości referencyjne stężeń w osoczu wybranych zwierząt:

Kot	2,7-3,9
Pies	3,3-5,6
Szczur	3,2-4,3
Mysz	3,5-4,6
[g/dl] Koń	2,9-5,9
Królik	2,7-4,6
Fretka	2,6-4,1
Świnka morska	2,1-3,9



Rys. 1. Model struktury albuminy mysiej. Na podstawie struktury z bazy PDB.

Kurkumina to naturalny barwnik otrzymywany z korzeni rośliny *Curcuma Longa*. W formie sproszkowanej korzeń tej rośliny jest podstawą przypraw np. kurkumy, curry i innych. Kurkuma była uważana przez starożytną medycynę Indii jako lek/panaceum na wiele schorzeń. Testy *in vitro* przeprowadzone nowoczesnymi metodami potwierdziły wiele ludowych doniesień dotyczących ekstraktów z kurkumy. Wykazano m.in. działanie antyoksydacyjne, przeciwzapalne, antynowotworowe. Hydrofobowa cząsteczka kurkuminy bardzo słabo rozpuszcza się w wodzie, natomiast rozpuszcza się w rozpuszczalnikach organicznych. Jako substancja niepolarna może być wiązana przez albuminę osocza.



Wiązaniu kurkuminy przez albuminę towarzyszy zmiana widma absorpcyjnego kurkuminy – będąca skutkiem wejścia ligandu w hydrofobowe środowisko miejsca wiążącego w białku.

Bazy na stronach NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) są ogólnodostępne na serwerach NCBI - *Narodowego Centrum Informacji Biotechnologicznej*. Są one uaktualniane codziennie, i zawierają łącznie do wielu ciekawych zasobów. Ze stron NCBI można uzyskać dostęp do licznych podręczników (Bookshelf) oraz dostęp do - pełnej lub częściowej - sekwencji genomów tysięcy organizmów (m.in. człowieka, **myszy**, szympansa, psa, kota, konia, szczura, krowy, owcy, królika, muszki owocowej, drożdży, rzodkiewnika, ryżu, setek bakterii, wielu retrovirusów etc.).

WYKONANIE ĆWICZENIA:

I. Wiązanie kurkuminy przez albuminę osocza:

1. W szklanych probówkach (krótkich) przygotuj roztwory zgodnie z poniższą tabelą:

	Bufor fosforanowy 0.06M pH 7,4 [mL]	Albumina wołowa (3 mg/mL) [mL]	Ekstrakt kurkuminy w etanolu [μL]
1	1	0	10
2	0,7	0,3	10

2. Zarejestruj widma absorpcyjne przygotowanych roztworów w zakresie 380-550 nm względem buforu. Odczytaj położenie maksimum absorpcji (λ_{max}) oraz wartość absorbancji w maksimum.
3. Wykonaj pomiar widmo różnicowego: wyzeruj spektrofotometr na próbkę nr 1. Zmierz widmo absorpcyjne próbki nr 2

Dane wpisz do tabeli, Odczytaj położenia maksimum absorpcji (λ_{max}) oraz wartości absorbancji w maksimum.

II. Analiza danych dotyczących genu, mRNA i białka.

1. Wejdź na stronę internetową bazy NCBI zawierającej informacje o sekwencji genomu oraz sekwencjach mRNA i białek <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.
2. Wybierz w okienku po lewej stronie nazwę GENE: Wpisz w okienku wyszukiwania **ALBUMIN** i kliknij **Go**.

Pojawi się strona z odnośnikami do różnych genów. Pierwszy z nich to link do danych dotyczących ludzkiej albuminy, trzeci dotyczy albuminy mysiej: [Alb – albumin \[Mus musculus \(house mouse\)\]](#)
Kliknij w ten link.

3. Pojawi się strona z informacjami dotyczącymi mysiej albuminy. Możesz zebrać informacje dotyczące budowy genu albuminy, ilości egzonów i intronów, długości genu, mapy SNP. Z lewej strony masz linki dotyczące dodatkowych informacji.

Z lewej strony pod: **Genomic context**: kliknij [MapViewer](#). Otworzy się kolejna strona
Znajdziesz tam schemat genu **ALB** na chromosomie 5. Przewiń tę stronę w dół i kliknij komendę powrotu. Znajdź i kliknij [reference sequence details](#).

Po ustawieniu na nim myszki otwiera się okienko z informacjami, a po kliknięciu okno ze schematami mRNA i białka. Przewiń tę stronę w dół i znajdź: **Genomic context and Genomic regions, transcripts, and products**. Zanutuj:

1. Zbliżoną liczbę nukleotydów we fragmencie DNA, w którym znajduje się gen dla albuminy
2. Liczbę eksonów i intronów w genie dla albuminy (Eksony są zaznaczone jako grube zielone kreski)
3. Schemat genu, z uwzględnieniem wzajemnych proporcji długości intronów i eksonów.

Przewiń stronę dalej w dół aż znajdziesz: **NCBI Reference Sequences**. Kliknij na link:

[NM_009654.3](#) który jest pod: **mRNA and Protein(s)**.

Otworzy się strona z danymi o sekwencji nukleotydów mRNA dla albuminy osocza myszy.

Znajdź i skopiuj do *Notatnika* następujące dane:

1. całkowita długość mRNA (pz)
2. numery nukleotydów mRNA, które kodują sekwencję sygnałową białka (sig_peptide),
3. numery nukleotydów mRNA, które kodują pro-białko (pro_protein)
4. numery nukleotydów w mRNA, które kodują dojrzałe białko (mat_peptide),
5. całą sekwencję mRNA (na samym końcu tej strony). Uwaga! W tej sekwencji mamy T zamiast U, bo jest to *de facto* sekwencja cDNA. Oczywiście w mRNA są U!

Analogicznie możesz dojść do w/w danych klikając: [MGI:87991](#)

Wróć na poprzednie strony. Kliknij w link: [NP_033784.2](#), znajdujący się pod: **mRNA and Protein(s)**.

Otworzy się strona z danymi o sekwencji aminokwasowej albuminy osocza ludzkiego. **Znajdź i skopiuj do Notatnika informacje o:**

- 1) całkowitej liczbie aminokwasów kodowanej przez rejon podlegający translacji,
- 2) liczbie aminokwasów w peptydzie (sekwencji) sygnałowym
- 3) liczbie aminokwasów białka prekursorowego (proprotein)
- 4) liczbie aminokwasów białka dojrzałego (mat_peptide),
- 5) pełnej sekwencji białka (na samym końcu strony)

Wydrukuj dane zebrane w Notatniku (1-2 strony).

	U	C	A	G
U	UUU Phe	UCU Ser	UAU Tyr	UGU Cys
	UUC Phe	UCC Ser	UAC Tyr	UGC Cys
	UUA Leu	UCA Ser	UAA STOP	UGA STOP
	UUG Leu	UCG Ser	UAG STOP	UGG Trp
C	CUU Leu	CCU Pro	CAU His	CGU Arg
	CUC Leu	CCC Pro	CAC His	CGC Arg
	CUA Leu	CCA Pro	CAA Gln	CGA Arg
	CUG Leu	CCG Pro	CAG Gln	CGG Arg
A	AUU Ile	ACU Thr	AAU Asn	AGU Ser
	AUC Ile	ACC Thr	AAC Asn	AGC Ser
	AUA Ile	ACA Thr	AAA Lys	AGA Arg
	AUG Met	ACG Thr	AAG Lys	AGG Arg
G	GUU Val	GCU Ala	GAU Asp	GGU Gly
	GUC Val	GCC Ala	GAC Asp	GGC Gly
	GUA Val	GCA Ala	GAA Glu	GGA Gly
	GUG Val	GCG Ala	GAG Glu	GGG Gly

Alanine	Ala	A
Arginine	Arg	R
Asparagine	Asn	N
Aspartate	Asp	D
Cysteine	Cys	C
Glutamate	Glu	E
Glutamine	Gln	Q
Glycine	Gly	G
Histidine	His	H
Isoleucine	Ile	I
Leucine	Leu	L
Lysine	Lys	K
Methionine	Met	M
Phenylalanine	Phe	F
Proline	Pro	P
Serine	Ser	S
Threonine	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosine	Tyr	Y
Valine	Val	V

Cwiczenie IX

Imię Imię i nazwisko

grupa:

data:

Sprawozdanie z ćwiczeń laboratoryjnych nr 9:

- I.
1. Załącz (lub naszkicuj) widma absorpcyjne kurkuminy w roztworze wodnym oraz w kompleksie z albuminą. Opisz obserwowaną zmianę barwy oraz zmiany w widmie absorpcyjnym.
 2. Jakie cechy miejsca wiążącego w albuminie mogą powodować zmiany w widmie absorpcyjnym wiązanych ligandów?
 3. Załącz (lub naszkicuj) widmo różnicowe kompleksu kurkuminy z albuminą względem wolnej kurkuminy. Wyjaśnij w jakim celu sporządza się widma różnicowe.
 4. Oblicz stężenie kurkuminy w próbce nr 1. Współczynnik absorpcji molowej ϵ , przy $\lambda=420$ nm wynosi $24\,000\text{ M}^{-1}\text{ x cm}^{-1}$.
- II.
- (1) Narysuj schemat organizacji genu dla albuminy wskazując pozycje i względne rozmiary eksonów i intronów.
 - (2) Oblicz sumaryczną długość eksonów i intronów oraz proporcję długości eksonów do intronów.
 - (3) Na załączonym wydruku sekwencji mRNA zaznacz pozycje kodonów START oraz STOP.
 - (4) W celu upewnienia się, że poprawnie zaznaczono kodony START i STOP, napisz sekwencje pierwszych 12 nukleotydów kodujących białko oraz 9 nukleotydów poprzedzających kodon STOP.

- (5) Wykorzystując tabelę kodu genetycznego określ jakim aminokwasom odpowiadają, a następnie porównaj je z aminokwasami w wydrukowanej sekwencji pre-pro-białka.
- (6) Narysuj schemat mRNA dla albuminy osocza mysiego, zaznaczając: oba zmodyfikowane końce, rejony nie podlegające translacji (3' i 5' UTR), kodony START i STOP i rejon podlegający translacji. Staraj się przedstawić rzeczywiste proporcje w długościach rejonów UTR i rejonu podlegającego translacji.
- (7) Na wydruku sekwencji aminokwasowej albuminy zaznacz: (1) pozycję sekwencji sygnałowej, (2) podkreśl reszty aminokwasów hydrofobowych w tej sekwencji. (3) wyjaśnij rolę tej sekwencji:

Uzasadnij dlaczego obecność wolnych kwasów tłuszczowych lub podniesionego stężenia niesprężonej bilirubiny w osoczu może wpływać na wiązanie leków przez albuminę:

LICZBA PUNKTÓW		
Test	Wykonanie	Suma pkt.