

TEMA 4

AMINOÁCIDOS Y PÉPTIDOS

1. Estructura y clasificación de los aminoácidos.
2. Propiedades ácido-base de los aminoácidos y péptidos
3. El enlace peptídico
4. Péptidos: hidrólisis y secuenciación

1. Estructura y clasificación de los aminoácidos.

Como su nombre indica los aminoácidos son compuestos que poseen un grupo **amino (-NH₂)** y un grupo ácido (**carboxílico -COOH**) en su estructura. Los aminoácidos son los precursores de los péptidos y las proteínas, y en ellos el grupo amino y el grupo carboxilo, se encuentran unidos al mismo átomo de carbono, conocido como **carbono-α (α-aminoácidos)**. La estructura general de los α-aminoácidos (a excepción de la prolina, que es cíclica) se muestra en la Figura 1.

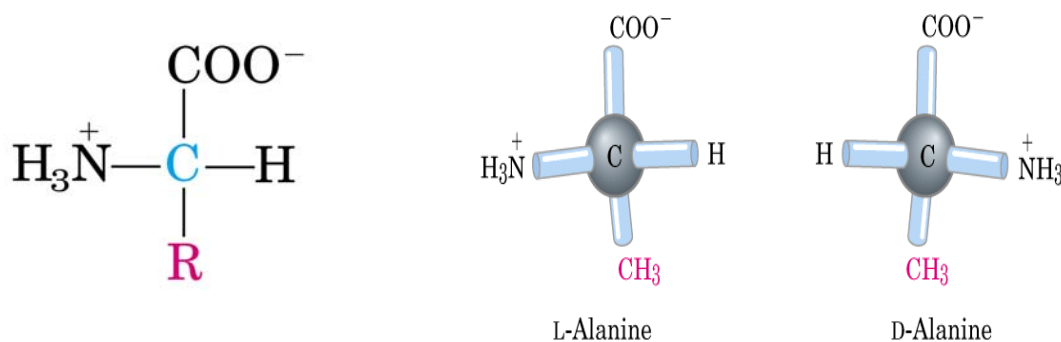


Figura 1.

Estructura química de un aminoácido. Estructura química en el plano y estructura espacial. Enantiómeros del aminoácido alanina.

Como se puede apreciar, el **carbono-α** (a excepción de la glicina) es un carbono quiral y como tal presenta dos enantiómeros (L- y D-). Los 20 α-aminoácidos

presentes en las proteínas son de la serie L- y en su representación de Fischer poseen el grupo amino hacia la izquierda. La diferencia entre los aminoácidos viene dada por el resto **-R**, o cadena lateral, unida al carbono- α . Atendiendo a la naturaleza del grupo **-R** los aa_s pueden clasificarse en:

- Neutros o apolares
- Polares sin carga
- Polares con carga negativa
- Polares con carga positiva

La Figura 2 recoge las estructuras de los 20 L- α -aminoácidos a pH fisiológico.

Neutros o Apolares. Son 8 los aminoácidos que se clasifican como poseedores de cadenas laterales no polares. La **alanina**, **valina**, **leucina e isoleucina**, poseen cadenas laterales de hidrocarburos alifáticos. La **metionina** posee una cadena lateral de éter tiólico (**C-S-C**). La prolina es el único aminoácido cíclico, pues el grupo **-R** se cierra sobre el N del grupo α -amino (realmente es un amina secundaria). Por su parte, la **fenilalanina** y el **triptófano** contienen grupos aromáticos.

Polares sin carga. Siete son los α -aminoácidos cuyo resto **-R** es polar pero sin carga. La **glicina** posee la cadena más simple, un átomo de hidrógeno. La **serina** y la **treonina** son portadores de un grupo hidroxilo (**-OH**). La **asparragina** y la **glutamina**, poseen cadenas laterales portadoras de un grupo amida, y por hidrólisis dan lugar, respectivamente, a aspartato y glutamato, dos aminoácidos con carga negativa. La **tirosina** posee un grupo fenólico y la **cisteína** debe su polaridad a la presencia de un grupo tiólico (**-SH**).

Polares con carga negativa. Existen dos α -aminoácidos cuyo resto polar posee carga negativa a pH fisiológico, debida a la presencia de un grupo carboxilo (**-COOH**), el **ácido glutámico** y el **ácido aspártico**.

Polares con carga positiva. Tres son los α -aminoácidos que poseen restos **-R** cargados positivamente a pH fisiológico. La **lisina** posee una cadena lateral de butilamonio, la **arginina** presenta un grupo **-R** de guanidina y la **histidina** es portadora de un grupo **-R** de imidazolio.

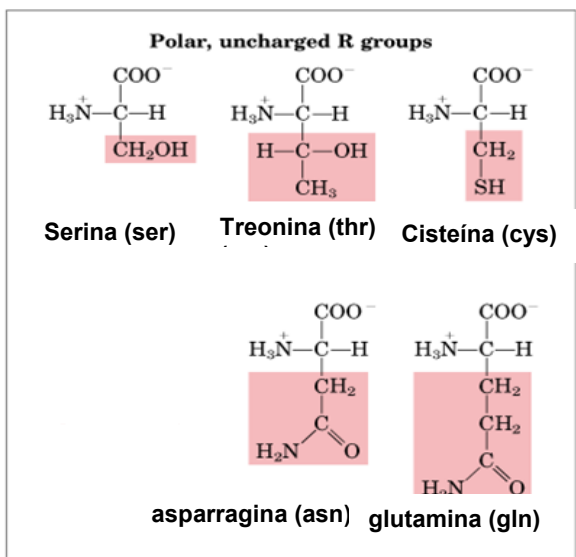
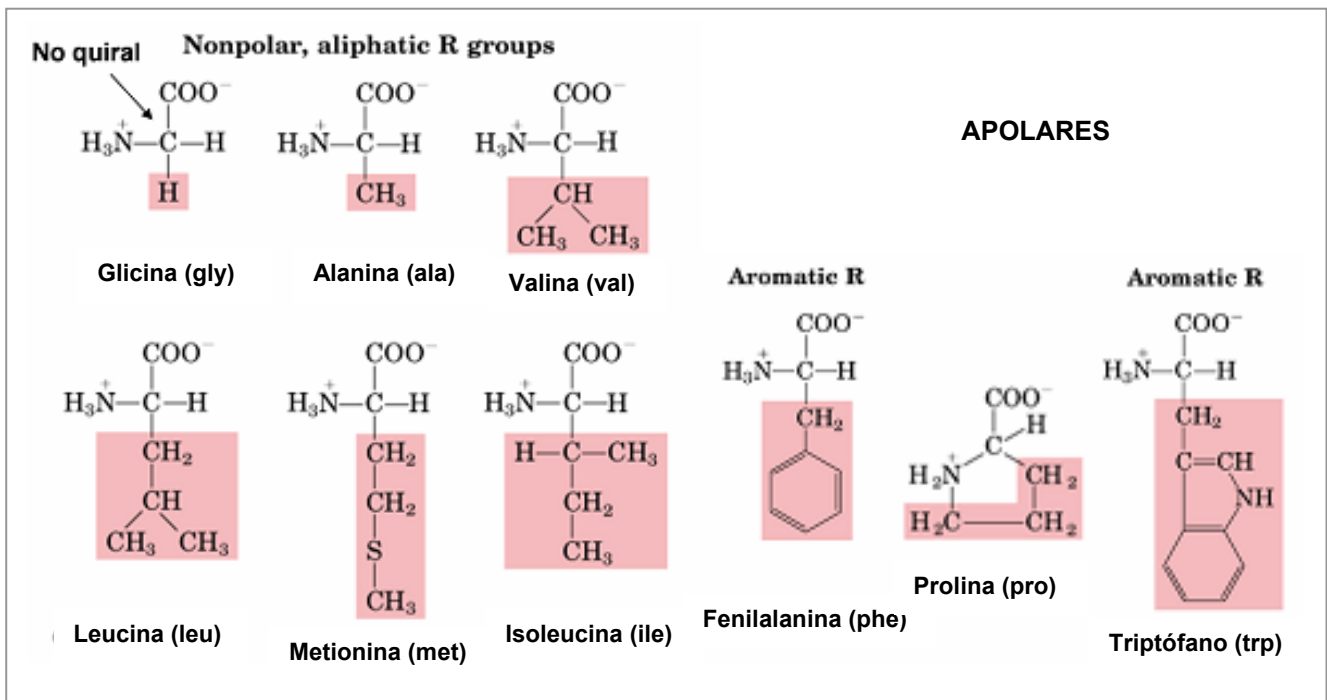
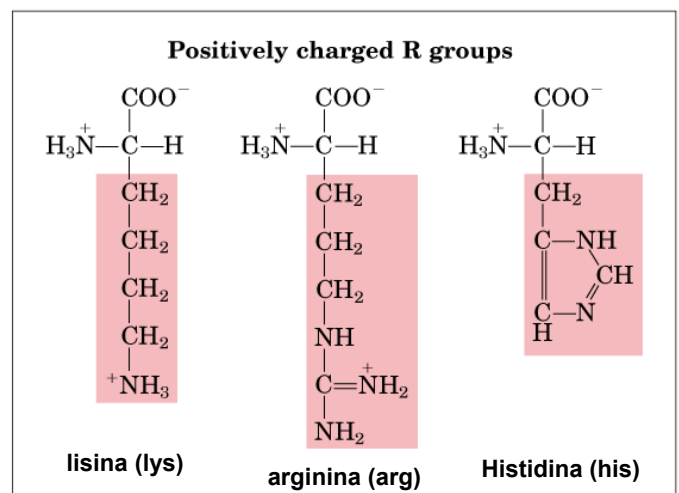
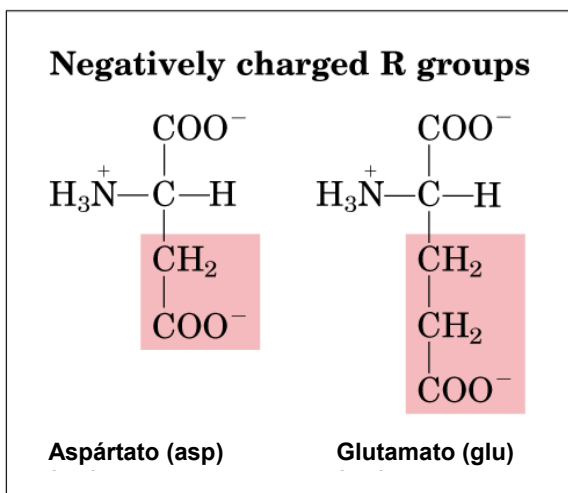


Figura 2.

Estructura química de los L-aminoácidos.



Esta clasificación se ha realizado en base al grupo -R, pero es importante indicar que a pH fisiológico (pH 7,3), el grupo α -amino se encuentra cargado positivamente y el grupo α -carboxilo lo está negativamente, por esta razón en la Figura 2 estos grupos aparecen siempre cargados.

Dentro del conjunto de los aminoácidos naturales, existen unos que pueden ser sintetizados por las células humanas a partir de otras sustancias, pero también hay aminoácidos que debemos tomarlos en la dieta, ya que nuestras células no pueden sintetizarlos o, cuando menos, no en cantidad suficiente para satisfacer la demanda del organismo; se conocen con el nombre de **aminoácidos esenciales** y son valina, leucina, isoleucina, treonina, metionina, fenilalanina, triptófano y lisina.

Ácido Aspártico (Asp) D	Cistina Cys) C	Isoleucina (Ile) I	Serina (Ser) S
Ácido Glutámico (Glu) E	Fenilalanina (Phe) F	Leucina (Leu) L	Tirosina (Tyr) Y
Alanina (Ala) A	Glicina (Gly) G	Lisina (Lys) K	Treonina (Thr) T
Arginina (Arg) R	Glutamina (Glu) Q	Metionina (Met) M	Triptófano (Trp) W
Asparagina (Asn) N	Histidina (His) H	Prolina (Pro) P	Valina (Val) V

2. Propiedades ácido-base de los aminoácidos y los péptidos

El pH del medio en el que se encuentre el aminoácido es esencial para determinar sus propiedades ácido-base, aspecto importante pues de ello dependen las propiedades químicas y la funcionalidad biológica de los péptidos y proteínas que forman.

Las propiedades ácido-base de un aminoácido vienen determinadas por los grupos protonables que posea. Un aminoácido puede actuar bien como ácido o como base (sustancias **anfóteras**), pudiendo tener hasta tres grupos con carácter ácido-base: el α -amino, el α -carboxilo y, en algunos casos, el resto -R. Lo importante es que estos grupos poseen un carácter **ácido-base débil**, lo que hace que, dependiendo del pH, el correspondiente equilibrio pueda desplazarse en un sentido o en otro (hacia la forma protonada o hacia la desprotonada, Figura 3).

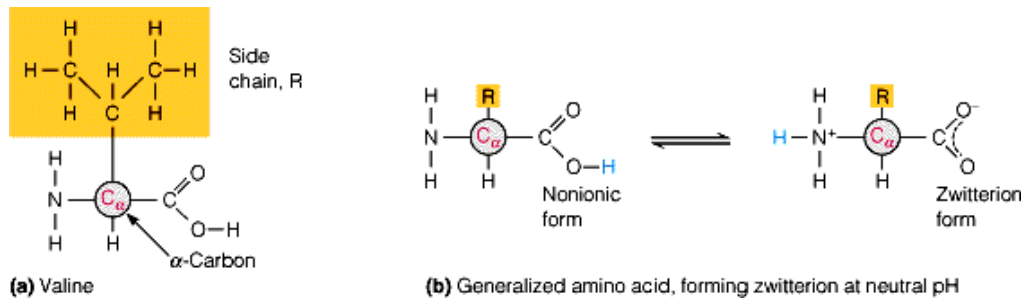
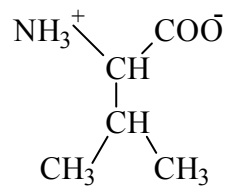


Figura 3

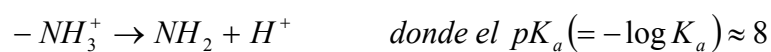
La expresión que regula la protonización de un L-aminoácido.

$$pH = pK_a + \log \frac{DP}{P}$$

Donde DP es la forma protonada y P es la forma desprotonada. Veamos como afecta el pH a la valina. La val posee sólo dos grupos protonables, el α -amino y el α -carboxilo. A pH fisiológico la valina presentaría la siguiente estructura:



Tomemos los grupos por separado y veamos como les afecta el pH. El grupo α -amino presentaría dos formas, una protonada (P) y cargada positivamente ($-\text{NH}_3^+$), y otra desprotonada (DP) y sin carga ($-\text{NH}_2$), según el siguiente equilibrio:



si el pH aumenta, el equilibrio se desplaza hacia la derecha (dominando la forma con carga 0) y si disminuye lo hará hacia la izquierda (dominando la forma con carga +1).

Con el grupo α -carboxilo ocurriría algo similar:



En función del pH, la proporción de forma protonada (carga 0) o forma desprotonada (carga -1) variará, respetando siempre la constante de ionización del grupo en cuestión si la temperatura se mantiene constante.

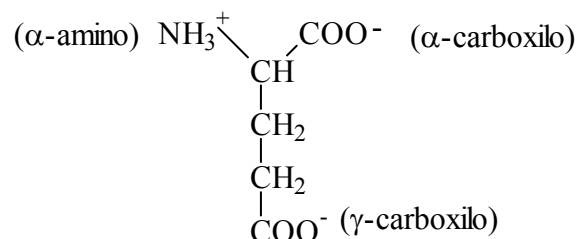
Supongamos que estamos ahora a pH 1; en estas condiciones de elevada concentración de protones en el medio ambos equilibrios estarían desplazados en un 100 % hacia las formas protonadas. Si aumentamos el pH los equilibrios comenzarían a desplazarse hacia la derecha hasta llegar a un pH muy básico, momento en el que las formas dominantes (al 100 %) serían las desprotonadas.

Pero, ¿qué ocurre a pHs intermedios?. Para ello debemos tener en cuenta la K_a de cada equilibrio, o mejor dicho su pK_a (que sería el $-\log K_a$). El grupo α -amino de la valina tiene un pK de 8, y esto quiere decir que a pH 8 el 50 % de los grupos amino estarán protonados (si tenemos 100 moléculas de valina, 50 tendrán el grupo amino protonado y 50 lo tendrán desprotonado, al menos teóricamente, según se desprende de la constante de ionización). Por su parte el grupo α -carboxilo de la valina, ($pK = 2$), estará protonado al 50 % cuando el pH del medio sea 2.

En general se asumen las siguientes consideraciones, para determinar el porcentaje de protonación de un grupo ionizable en un aminoácido:

- Si el $pH < pK-1$ el grupo está al 100 % protonado
- Si el $pH > pK+1$ el grupo está al 100 % desprotonado
- Si el $pH = pK$ el grupo está al 50 % protonado

Tomemos ahora un aminoácido con tres grupos ionizables, el ácido glutámico:



que posee el grupo α -amino, el α -carboxilo y el γ -carboxilo. Los tres grupos ionizables darán lugar a tres equilibrios ácido-base distintos, cada uno con su correspondiente pKa (2, 4 y 8 respectivamente). Para ver como afecta el pH a la carga de cada grupo vamos a realizar la siguiente tabla, en la que ordenamos (de menor a mayor pK) los grupos protonables y sus correspondientes valores de carga en función del pH:

GRUPO	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
α -carboxilo (pK=2)	0	-0,5	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1
γ -carboxilo (pK=4)	0	0	0	-0,5	-1	-1	-1	-1	-1	-1
α -amino (pK=8)	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	0,5	0	0
carga total	+1	0,5	0	-0,5	-1	-1	-1	-1,5	-2	-2

1) a pH= 1, el pH es inferior en una unidad al pK del grupo α -COOH, el cuál estará protonado al 100 %, luego su carga será 0; y lo mismo le ocurrirá al grupo γ -COOH, protonado al 100 % y con carga 0. Por su parte, el grupo α -amino también estará protonado, aunque en este caso la carga del grupo es +1.

2) a pH= 2, se produce coincidencia del pH con el pK del α -COOH, por lo que estará al 50 % protonado. Luego la carga será -0,5 ; este pH es aún dos unidades inferior al pK del grupo γ -COOH, que seguirá protonado (0), como también le ocurriría al grupo α -amino (+1). La carga total del glutámico sería 0,5.

3) a pH= 3, se ha superado en una unidad el pKa del α -COOH, luego estará desprotonado al 100 % y su carga será -1 para valores superiores de pH. Los otros dos grupos siguen estando protonados al 100 % (0 y +1, respectivamente). Y la carga total será cero.

4) a pH= 4, el pH coincide con el pKa del grupo γ -COOH y estará protonado en un 50% (carga -0,5). El α -COOH seguirá desprotonado (0) y el α -amino protonado (+1). La carga total será ahora -0,5.

5) a pH=5 el grupo γ -COOH estará al 100 % desprotonado y el resto de grupos seguirá igual, hasta llegar a pH= 8, donde el α -amino estará desprotonado al 50 % (0,5) , grupo que se desprotonará al 100 % a partir de un pH= 9.

Como se puede apreciar en la tabla, la carga total del aminoácido depende del pH de la disolución en que se encuentre.

Existe un pH al cual la carga neta del aminoácido es cero (si lo colocamos en un campo eléctrico no se desplazará hacia ninguno de los polos). El pH al cuál un aminoácido posee carga neta cero recibe el nombre de **punto isoeléctrico (pI)**, que es la media aritmética de los valores de pK_1 y pK_2 que delimitan la forma con carga cero.

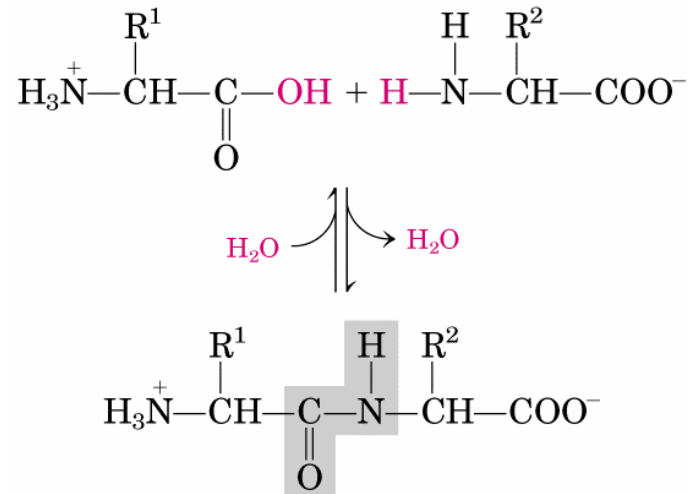
En la siguiente tabla pueden localizarse los aminoácidos que, al igual que el ácido glutámico, poseen grupos -R protonables.

Group	Acid \rightleftharpoons base + H^+	Typical pK^*
Terminal carboxyl	$-\text{COOH} \rightleftharpoons -\text{COO}^- + \text{H}^+$	3.1
Aspartic and glutamic acid	$-\text{COOH} \rightleftharpoons -\text{COO}^- + \text{H}^+$	4.4
Histidine	$ \begin{array}{c} -\text{CH}_2 \\ \\ \text{+HN} \quad \text{NH} \\ \backslash \quad / \\ \text{C} \\ / \quad \backslash \\ \text{N} \quad \text{NH} \end{array} \rightleftharpoons \begin{array}{c} -\text{CH}_2 \\ \\ \text{N} \quad \text{NH} \\ \backslash \quad / \\ \text{C} \\ / \quad \backslash \\ \text{N} \quad \text{NH} \end{array} + \text{H}^+ $	6.5
Terminal amino	$-\text{NH}_3^+ \rightleftharpoons -\text{NH}_2 + \text{H}^+$	8.0
Cysteine	$-\text{SH} \rightleftharpoons -\text{S}^- + \text{H}^+$	8.5
Tyrosine	$ \begin{array}{c} \text{C}_6\text{H}_4 \\ \\ \text{OH} \end{array} \rightleftharpoons \begin{array}{c} \text{C}_6\text{H}_4 \\ \\ \text{O}^- \end{array} + \text{H}^+ $	10.0
Lysine	$-\text{NH}_3^+ \rightleftharpoons -\text{NH}_2 + \text{H}^+$	10.0
Arginine	$ \begin{array}{c} \text{H} \quad \text{NH}_2^+ \\ \backslash \quad / \\ \text{C} \\ / \quad \backslash \\ \text{N} \quad \text{NH}_2 \end{array} \rightleftharpoons \begin{array}{c} \text{H} \quad \text{NH} \\ \backslash \quad / \\ \text{C} \\ / \quad \backslash \\ \text{N} \quad \text{NH}_2 \end{array} + \text{H}^+ $	12.0

* pK values depend on temperature, ionic strength, and the microenvironment of the ionizable group.

3. El enlace peptídico

Los aminoácidos se encuentran unidos en los péptidos y las proteínas mediante un **enlace amida (-CO-NH-)**:



Este enlace se forma entre el grupo carbonilo de un aminoácido y el α -amino del siguiente (con pérdida de una molécula de agua) y recibe el nombre de **enlace peptídico**.

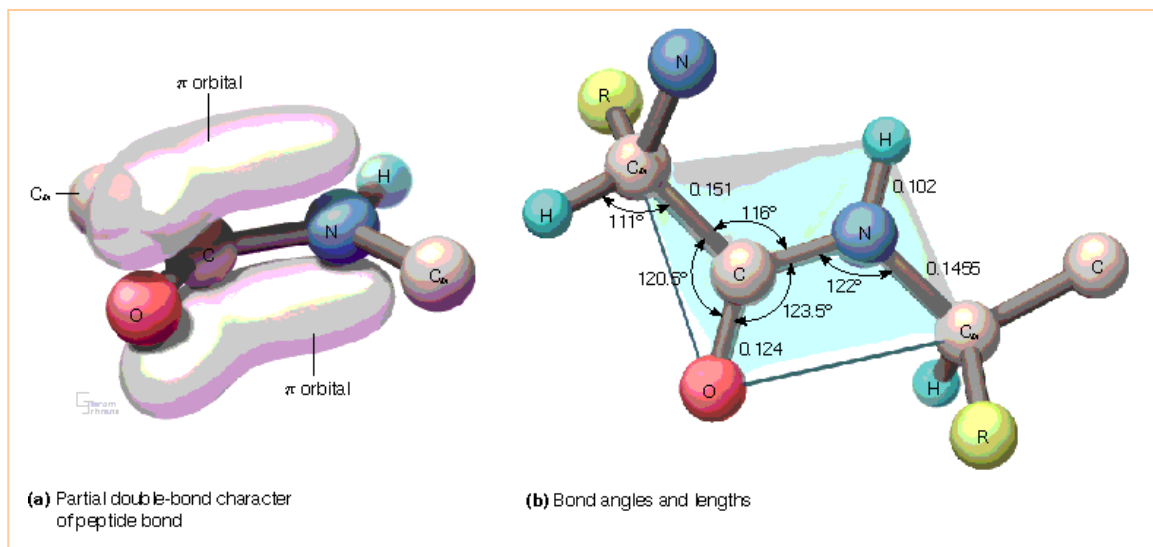


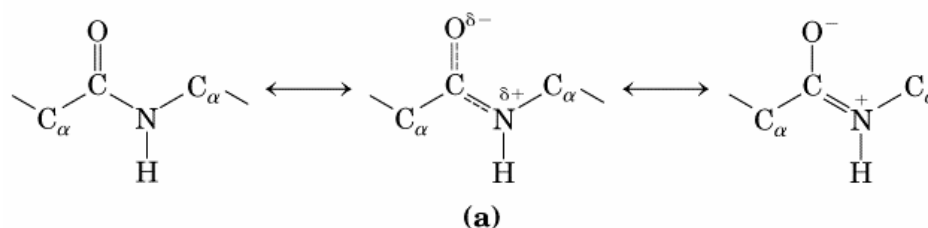
Figura 4.

Estructura espacial del enlace peptídico. (a) Ilustración del carácter parcialmente doble del enlace peptídico. (b) Configuración del plano que conforman el enlace peptídico y los carbonos α extremos.

Entre los años 1930-1940, Pauling y Corey, mediante el estudio de Rayos X de cristales de aminoácidos, dipéptidos y tripéptidos, dilucidaron la estructura tridimensional del enlace peptídico (Figura 4). Así, descubrieron que la unión C-N del enlace peptídico era más corta que en la mayor parte de los demás enlaces C-N y llegaron a la conclusión de que el enlace debía tener algún carácter de doble enlace, por la aparición de dos formas resonantes:

Luego dedujeron que los 4 átomos que rodeaban al enlace peptídico C-N (O, C α , C, H) estaban situados en el mismo plano, de tal manera que el oxígeno del grupo carbonilo y el hidrógeno del N-H estarían en posición *trans*. Esta ordenación es rígida, y es el resultado de la estabilización por resonancia de las formas anteriormente citadas.

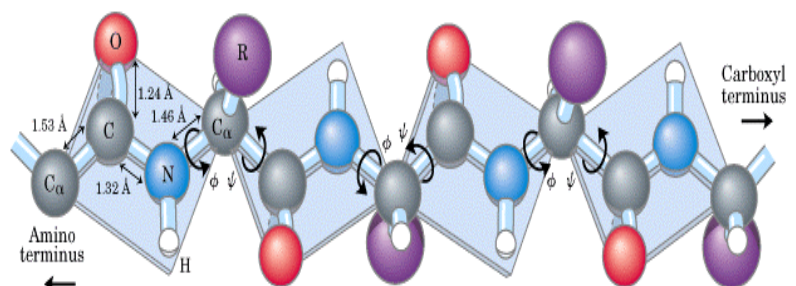
The carbonyl oxygen has a partial negative charge and the amide nitrogen a partial positive charge, setting up a small electric dipole. Virtually all peptide bonds in proteins occur in this *trans* configuration; an exception is noted in Figure 6–8b.



Partiendo de estos dos hechos, puede describirse el armazón de una cadena polipeptídica como constituido por una serie de planos, con posibilidad de giro en los C α . De esta forma podemos escribir la estructura de un péptido como una sucesión de planos en la que los grupos -R se van alternando (Figura 5).

Figura 5.

Estructura espacial de un péptido. Secuencia ordenada de los planos de enlace peptídico en el espacio. Los grupos R se alternan por encima y debajo del plano general de la molécula.



4. Secuenciación de un péptido

La posición que ocupa cada aminoácido dentro de la cadena polipeptídica, esto es la secuencia, constituye el primer nivel estructural de las proteínas, su estructura primaria. La secuencia de un péptido tiene gran importancia porque entre otras cosas condiciona los siguientes niveles estructurales.

La insulina bovina fue la primera proteína que se secuenció completamente por Sanger en 1953, lo que le valió el premio Nobel. La determinación de la secuencia de la insulina fue el resultado del trabajo de muchos científicos durante 10 años, desde entonces se han secuenciado miles de proteínas.

La secuencia de una proteína, si conocemos el gen del que proviene, puede obtenerse indirectamente, secuenciando dicho gen. Pero también puede hacerse la secuenciación química directa. Los pasos a seguir son:

- Determinación de la composición del péptido por hidrólisis total y posterior análisis cromatográfico.
- Determinación de los extremos C-terminal y N-terminal
- Fragmentación por hidrólisis selectiva
- Secuenciación: Degradación de Edman

La determinación de la composición del péptido se realiza por **hidrólisis total** presencia de HCl 6N, calentando a 100 °C durante 10-24h, y en tubo al que se le ha hecho el vacío. Tras el proceso se utiliza un sistema cromatográfico que permita separar y determinar cuántos y cuáles son los aminoácidos que forman la cadena.

Hay distintos métodos que permiten determinar el primer aminoácido (Resto **N-terminal**) o el último (Resto **C-terminal**) de una cadena polipeptídica.

- La determinación del resto N-terminal, se puede realizar, entre otros métodos, mediante la **Degradación de Edman**: en este proceso el péptido reacciona con **fenil isotiocianato** que se une selectivamente al primer aminoácido. A continuación se escinde con HF anhidro el aminoácido marcado, separándolo del resto selectivamente con un disolvente orgánico. Tras un tratamiento en medio ácido el compuesto resultante se determina cromatográficamente (Figura 6).

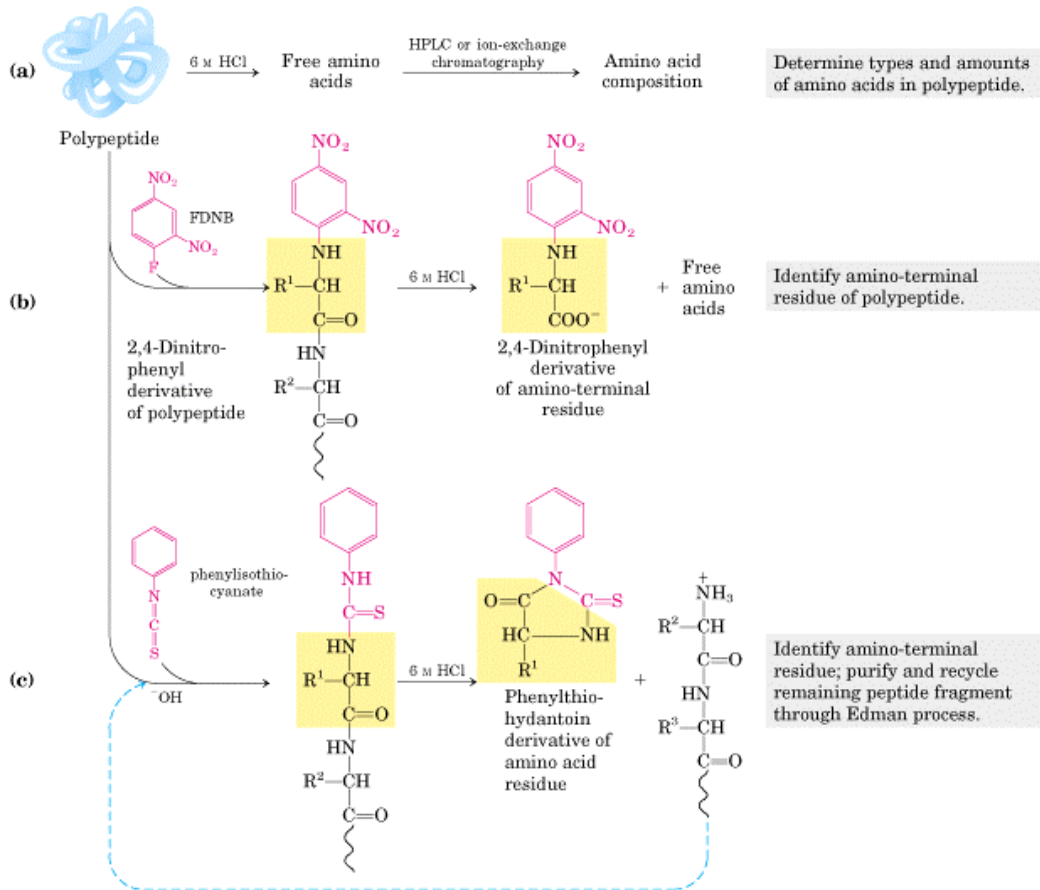
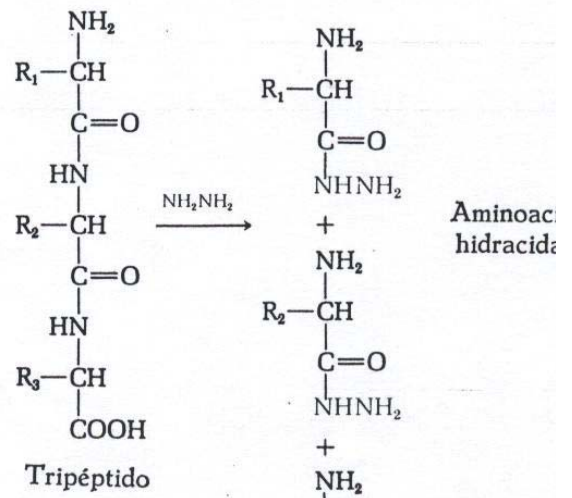


Figura 6.

Determinación de la secuencia de un péptido. Hidrólisis total de la proteína. (a). Determinación del primer aminoácido utilizando 2,4-dinitrofluorobenceno (b) o fenilisotiocianato (c). Este último método también se conoce como *degradación de Edman* y permite la secuenciación del péptido.

- Por otro lado, la determinación del resto C-terminal, se puede realizar con **Hidracina**: este compuesto reacciona con todos los enlaces peptídicos del péptido, provocando la hidrólisis de los mismos y dando lugar a aminoacil-hidracinas con todos los aminoácidos excepto con el último (C-terminal), pudiendo separarse del resto fácilmente y determinarse con posterioridad su naturaleza.



La fragmentación por hidrólisis parcial es necesaria porque por lo general no pueden secuenciarse péptidos con más de 20 o 30 aminoácidos. Se realiza con reactivos selectivos, en la mayoría de los casos se utilizan proteasas, enzimas que hidrolizan determinados enlaces peptídicos.

- La **tripsina** hidroliza por la derecha de Arg , Lys
- La **quimotripsina** hidroliza por la derecha de Phe, Trp, Tyr
- La **pepsina** hidroliza por la izquierda de Phe, Trp, Tyr
- La **termolisina** hidroliza por la izquierda de Val, Leu, Ile

- El **bromuro de cianógeno (BrCN)** hidroliza por la derecha de la Met

La secuenciación. Entre los distintos métodos existentes, podemos citar la degradación de Edman, cuyo fundamento hemos visto en la determinación del extremo N-terminal. La aplicación continuada de varios ciclos de la degradación de Edman me permite la secuenciación de todo el péptido, siempre que este no tenga más de 20 o 30 aminoácidos.

No obstante los actuales requerimientos de secuenciación de gran cantidad de péptidos en poco tiempo, han dado origen al desarrollo de nuevos métodos de secuenciación, desarrollados principalmente para afrontar proyectos como el del proteoma humano. Entre estos métodos podemos citar el **MALDI MS** y el **ESI MS**, ambos basados en la espectrometría de masas.

La espectrometría de masas permite calcular la masa del compuesto analizado con gran precisión. Esta técnica se basa en que la desviación que sufre una partícula cargada al atravesar un campo magnético depende básicamente de su carga y masa. Si ionizamos las moléculas, la mayoría con carga +1, y las sometemos a un barrido de campo magnético obtenemos un espectro de masas. Esta técnica se utilizaba con moléculas en fase gaseosa lo que impedía su aplicación a moléculas sensibles a la descomposición por calor o por los tratamientos tradicionales utilizados para pasar la muestra a fase gaseosa. En 1988 se desarrollaron dos técnicas que permiten evitar este problema.

La espectrometría de masas da mucha información sobre la masa molecular, la presencia de cofactores, etc. Y además puede utilizarse para secuenciar pequeñas cadenas de polipéptidos, mediante una técnica conocida como tandem MS, que básicamente consiste en dos espectrometros de masas en serie. La proteína bajo

estudio se trata con proteasas para obtener una mezcla de pequeños péptidos. En el primer espectrómetro la mezcla de péptidos se trata de forma que solo uno de los péptidos es seleccionado para su posterior análisis. El péptido seleccionado se fragmenta en la cámara de colisión que se encuentra entre los dos espectrómetros donde una pequeña cantidad de gas noble (He o Ar) produce la fragmentación del péptido preferentemente por los enlaces peptídicos, como la cámara está al vacío y no hay agua los productos son radicales. Los fragmentos son medidos en el segundo espectrómetro. En un espectro típico los picos mayoritarios corresponden a radicales que difieren en la masa de un aminoácido particular. Así puede deducirse la secuencia. La única ambigüedad tiene lugar entre la leucina y la isoleucina que tienen la misma masa molecular.

Este método es rápido, requiere sólo minúsculas cantidades de muestra que pueden ser extraídas de una electroforesis bidimensional. Las grandes compañías como Celera (participó en el proyecto genoma humano) disponen de sistemas automatizados en que una gran cantidad de proteínas se separan por electroforesis bidimensional o HPLC, cada punto puede ser luego secuenciado por un espectrómetro en tandem. Este método podría usarse también para la secuenciación de DNA, pero los métodos tradicionales son tan rápidos que no es rentable.

La figura muestra un típico espectro realizado por espectrometría en tandem de un pequeño péptido de 10 aminoácidos. La secuencia deducida de este péptido fue; Phe-Pro-Gly-Gln-(Ile/Leu)-Asn-Ala-Asp-(Ile/Leu)-Arg.

