

Prof. dr hab. Mariusz Jaskólski

ANATOMIA I TAKSONOMIA BIAŁEK

Białka to liniowe polimery zbudowane z 20 naturalnych α -aminokwasów połączonych wiązaniem amidowym (peptydowym). Łańcuch białkowy wiedzie jednoznacznie od końca aminowego do końca karboksylowego. Jedyne wyjątkiem od tej liniowej topologii mogą stanowić mostki dwusiarczkowe S-S łączące grupy boczne sąsiadujących z sobą w przestrzeni i utlenionych reszt cysteinowych. Centralną pozycję każdej reszty aminokwasowej stanowi tetraedryczny (hybrydyzacja sp^3) atom węgla $C\alpha$ połączony z czterema podstawinkami: N, CO, H, oraz ze stanowiącym o jego indywidualności łańcuchem bocznym R. W związku z asymetrycznym charakterem, atom $C\alpha$ nadaje resztom aminokwasowym strukturę chiralną. Z wyjątkiem glicyny, gdzie $R=H$, aminokwasy białkowe są optycznie czynne i posiadają konfigurację absolutną L. Fundamentalnym dla poznania struktury przestrzennej łańcuchów białkowych było odkrycie przez Linusa Paulinga, że ugrupowanie peptydowe jest sztywne i płaskie. Atomy $C\alpha$ sąsiednich reszt połączonych wiązaniem peptydowym znajdują się zwykle po przeciwnych stronach linii CO—N tego wiązania. Konfiguracja ta nazywa się *trans* i odpowiada wartości 180° kąta torsyjnego ω , $C\alpha(n)$ —CO—N— $C\alpha(n+1)$. Zdarzają się przypadki wiązań peptydowych o konfiguracji *cis*, ale odnoszą się one głównie do peptydów X-P. Wiąże się to ze specyficzną budową proliny (P), której łańcuch boczny jest cykliczny i spina odcinek N— $C\alpha$ jej łańcucha głównego. Przegląd łańcuchów bocznych aminokwasów białkowych stanowi kwintesencję chemii organicznej. Są tu grupy alifatyczna (małe, duże, oraz izomery), aromatyczne, polarne, niepolarne, aminowe, kwasowe, amidowe, alkohole, tiole, (tio)estr. Natura chemiczna grup R nadaje indywidualność poszczególnym resztom aminokwasowym, a ich charakterystyczny układ w łańcuchu białkowym, tj. sekwencja albo struktura pierwszorzędowa, decyduje o indywidualności struktury przestrzennej i właściwości białka.

Struktura przestrzenna białek jeszcze pod koniec lat 1940-tych stanowiła nierozwiązalną zagadkę. Odkrycie podstawowych struktur geometrycznych, zwanych strukturami drugorzędowymi, formowanych przez łańcuch białkowy jest zasługą Paulinga. Odkrycia tego dokonał w 1951 r. wiedziony intuicją, na drodze rozumowania i kojarzenia faktów stereochemicznych. Potwierdzenie doświadczałne przyszło dopiero w roku 1957, kiedy John Kendrew rozwiązał strukturę pierwszego białka, mioglobiny. Oto przesłanki, na których Pauling oparł swoje rozumowanie: (1) wynikająca z badań krystalograficznych wiedza o geometrii cząsteczek aminokwasów i peptydów, (2) przekonanie o planarności grupy peptydowej, (3) przekonanie o roli wiązań wodorowych, (4) teza o powtarzalności trwałych układów geometrycznych. W pierwszym (α) z zaproponowanych modeli łańcuch białkowy ma postać ciasno zwiniętej prawoskrętnej helisy, tj. wije się na kształt linii śrubowej wykorzystując 3.6 jednostki peptydowej na uformowanie jednego zwoju. „Postawiona” na N-końcu helisa α przypomina choinkę świąteczną: czubek stanowi wolna grupa karboksylowa, łańcuchy boczne jak gałęzie spływają ku dołowi, a grupy karbonylowe C=O jak świece wskazują kierunek N→C łańcucha. W związku z takim prawidłowym ustawieniem grup peptydowych, helisa α posiada duży moment dipolowy N(+)-C(-). Skierowane „ku górze” grupy karbonylowe są akceptorami wiązań wodorowych od grup N-H reszt położonych o 4 jednostki łańcucha dalej: (n)C=O...H-N(n+4). W ten sposób spełnia się postulat Paulinga o wysyceniu potencjalnych wiązań

wodorowych, a helisa α uzyskuje symbol 3.6_{13} , gdyż domknięty przez oddziaływanie wodorowe cykl wiązań zawiera 13 atomów (łącznie z H).

O ile helisa α stanowi najbardziej zwartą postać łańcucha białkowego, o tyle kolejna struktura drugorzędowa zaproponowana przez Paulinga, łańcuch β , ma formę maksymalnie rozciągniętą. Pojedynczy łańcuch β spełnia wszystkie postulaty Paulinga z wyjątkiem (3): nie jest w stanie wypełnić „programu” wiązań wodorowych swoich grup donorowych N-H i akceptorowych O=C. Wiązania te zostaną jednak zrealizowane w sposób idealny pomiędzy biegnącymi równoległe sąsiednimi łańcuchami. Dwa lub więcej łańcuchów β powiązanych „w poprzek” wiązaniami wodorowymi tworzy arkusz β . Jeśli łańcuchy mają ten sam zwrot, arkusz jest równoległy, jeśli zwrot sąsiednich łańcuchów jest przeciwny, mamy antyrównoległy arkusz β . Arkusz β nie jest idealnie płaski, jest pofałdowany („plisowany”), a „wyboje” odpowiadają atomom $C\alpha$, z których na przemian w górę i w dół sterczą łańcuchy boczne. Inny rodzaj odstępstwa arkuszy od planarności stanowi ich skręcenie, w skrajnym przypadkach doprowadzające do pełnego „owinięcia” arkuszem pobocznic walca i domknięcia systemu oddziaływań wodorowych poprzez powiązanie ostatniego łańcucha z pierwszym.

Mimo swoich gigantycznych długości, łańcuchy białkowe są monotonne jeśli idzie o liczbę opisujących je parametrów konformacyjnych. Są to powtarzające się trzy kąty torsyjne: peptydowy ω $C\alpha$ -CO—N- $C\alpha$, ϕ CO-N— $C\alpha$ -CO oraz ψ N- $C\alpha$ —CO-N. W związku z planarnością kąta ω , zmienność konformacyjna dotyczy różnych wartości kątów ϕ i ψ związanych ze stosunkowo swobodną rotacją wokół pojedynczych wiązań N— $C\alpha$ i $C\alpha$ —CO. W łańcuchu białkowym ten swobodny obrót jest jednak drastycznie ograniczony, gdyż osie tych obrotów mają wspólny zwornik ($C\alpha$), co prowadzi do licznych kolizji zlokalizowanych w ich sąsiedztwie atomów. Konieczność korelacji pomiędzy tymi obrotami pierwszy systematycznie przebadął Gopalasamudram Narayana Ramachandran w 1963 roku, konstruując wykres przedstawiający sterycznie (i energetycznie) dozwolone pary kątów ϕ (odcięta) i ψ (rzędna). Na wykresie Ramachandrana są zasadniczo tylko dwa dozwolone obszary konformacyjne. Pierwszy odpowiada w przybliżeniu kątom $\phi = -60^\circ$ i $\psi = -60^\circ$, drugi $\phi = -120^\circ$ i $\psi = 120^\circ$. Konstruując łańcuch peptydowy w oparciu o powtarzające się kąty ϕ i ψ z pierwszego obszaru zbudujemy helisę α . Nietrudno zgadnąć, że kąty z drugiego obszaru definiują łańcuch β . Wykres Ramachandrana oraz rozszyfrowywane w latach 60-tych struktury kolejnych białek potwierdziły genialne odkrycie Paulinga.

Struktury drugorzędowe (a więc lokalnie zorganizowane ciągłe fragmenty sekwencji oparte na powtarzającym się motywie kątów ϕ i ψ oraz charakterystycznym motywie wiązań wodorowych) układają się w przestrzeni w zwartą trójwymiarową strukturę białka zwaną strukturą trzeciorzędową. W białkach oligomerycznych, aranżacja przestrzenna indywidualnych łańcuchów białkowych (podjednostek) w funkcjonalną całość nazywa się strukturą czwartorzędową. Siła napędowa dla zwijania się łańcucha białkowego w jednoznaczną i unikalną strukturę bierze się z obecności w jego sekwencji licznych reszt hydrofobowych, nie dających się pogodzić z wodnym środowiskiem cząsteczki. Zwijający się łańcuch białka globularnego ukrywa te reszty w hydrofobowym rdzeniu, a powierzchnię kontaktu z rozpuszczalnikiem dekoruje pozostałymi, hydrofilowymi grupami. Uformowanie rdzenia rozwiązuje problem reszt hydrofobowych lecz jednocześnie generuje nowy poważny problem, związany z polarnymi grupami N-H i C=O, które również muszą znaleźć się w hydrofobowym środowisku rdzenia.

Białka „rozwiązały” ten dylemat za pomocą struktur drugorzędowych, w których grupy N-H i C=O ulegają wzajemnej protekcji za pośrednictwem wiązań wodorowych.

Helisy i łańcuchy β często występują w prostych i trwałych kombinacjach geometrycznych nazywanych motywami lub strukturami naddrugorzędowymi. Należą do nich (1) helisa-zwrot-helisa, (2) spinka β oraz (3) motyw β - α - β . Motyw helisa-zwrot-helisa występuje w białkach wiążących DNA i w białkach wiążących wapń (motyw prawej dłoni EF). Spinka β jest typowym motywem architektonicznym w antyrównoległych arkuszach β , podczas gdy obejście β - α - β znajdujemy w arkuszach równoległych. Może być one prawoskrętne, gdy biegnący w kierunku N \rightarrow C łańcuch przechodząc (helisą α) od jednej do kolejnej (równoległej) nici β kreśli prawoskrętną linię śrubową, albo też, choć rzadko, lewoskrętne.

Struktury drugorzędowe, proste motywy oraz łączące je pętle formują domeny. Domena jest autonomiczną częścią (niekoniecznie ciągłą) łańcucha białkowego mającą trwałą strukturę i, przynajmniej teoretycznie, zdolną do samodzielnego istnienia. Wiele białek składa się z pojedynczej domeny. W białkach wielodomenowych poszczególne domeny mogą pełnić różne funkcje. Domeny (albo zwoje białkowe) należą do jednej z trzech klas: (1) klasy α , (2) klasy β , lub (3) klasy α/β . Białka w formie α mogą być typu wiązki 4 helis, z czterema antyrównoległymi helisami α połączonymi krótkimi pętlami, lub też mogą mieć zwój globinowy składający się z 8 helis formujących kieszeń do wiązania grupy prostetycznej, np. hemu. Upakowanie helis w tych strukturach przebiega z „zazębaniem” się rzeźby na ich powierzchni mającym miejsce gdy osie helis tworzą kąt 20 lub 50°. Zupełnie inny typ oddziaływania pojawia się, gdy kontaktują się dwie helisy zwrócone do siebie stronami, na których, w każdej z nich, co siódma reszta, a więc reszta przypadająca niemal dwa zwoje ponad poprzednią, ma charakter hydrofobowy. Resztą tą jest zwykle leucyna, stąd nazwa tego motywu: zamek (suwak) leucynowy. W związku z tym, że siódma reszta niezupełnie kończy drugi zwój helisy α ($3.6 \times 2 = 7.2$), helisy w zamku leucynowym oplatają się nawzajem tworząc łagodny lewoskrętny zwój superhelikalny.

Białka w formie β formują najczęściej cylindry, z łańcuchami hydrofobowymi ukrytymi we wnętrzu, a hydrofilowymi na zewnętrznej ścianie walca. Cylindry β występują w trzech odmianach. Najprostszy, cylinder „góra-dół”, uformowany jest wyłącznie ze spinek β , powodujących, że kolejny łańcuch jest antyrównoległym sąsiadem poprzedniego. Ostatni łańcuch wiąże się wodorowo z pierwszym. Przykładem są białka wiążące kwasy tłuszczowe czy retinol. Łańcuch białkowy β może utworzyć czteroodcinkowy meander, w którym odcinki 1-2 oraz 2-3 połączone są spinkami β , a odcinek 4 sąsiaduje z 1. Dwa motywy meandryczne mogą uformować cylinder meandryczny, taki jaki spotykamy w γ -krystalinie soczewki oka. Najbardziej skomplikowany cylinder β nazywa się cylindrem typu rolady. Najłatwiej wyprowadzić go z długiej spinki β , łamiąc ją (zwijając) w trzech miejscach tak, aby otoczyła walec, a (załamane) odcinki łącznikowe pojawiły się u górnej i dolnej podstawy walca i przebiegały we wzajemnie prostopadłych kierunkach. Strukturę cylindra typu rolady przybiera hemaglutynina wirusa grypy.

Osnową struktury białek α/β jest zwykle równoległy arkusz β , którego nici połączone są za pośrednictwem helis. Może w ten sposób powstać cylinder α/β lub otwarty arkusz β . W grupie tej często znajdujemy enzymy, w których helisy i łańcuchy β tworzą rusztowanie dla pętli zawierających grupy funkcyjne. Cylinder α/β występuje w izomerazie triozofosforanowej i

dlatego ta urzekająca struktura stała się źródłem synonimu nazwy tego cylindra: TIM. W strukturze tej równoległy ośmioniciowy cylinder β ukryty jest wewnątrz wieńca utworzonego z helis. Otwarte arkusze β są zwykle rozległe i oflankowane po obu stronach helisami.

Osobną grupę tworzą małe białka składające się z mniej niż 100 reszt, z reguły niezdolne do uformowania trwałego rdzenia hydrofobowego. Ich strukturę stabilizują mostki dwusiarczkowe (np. w insulynie) lub skoordynowany jon metalu. Tę drugą sytuację ilustruje grupa białek wiążących DNA, w których występuje tzw. motyw cynkowy. Klasyczny motyw cynkowy zawiera N-terminalną spinkę β oraz krótką C-terminalną helisę i stabilizowany jest jodem cynku skoordynowanym przez dwie reszty histydynowe i dwie reszty cysteinowe z odcinka zawierającego ok. 30 reszt aminokwasowych.

Postulat o jednoznaczności i trwałości zwoju białkowego ("jedna sekwencja - jedna struktura") pozwolił nam uporządkować ogrom faktów strukturalnych, dał poczucie głębokiego zrozumienia kodu genetycznego, przekładającego się w ostateczności na trwałą strukturę przestrzenną białek, oraz okazał się nieoceniony gdy idzie o wyjaśnienie ich funkcji na podstawie struktury. Najnowsze badania odsłaniają jednak przypadki wyłamujące się spod tego prostego i użytecznego kanonu. Przykładem są białka nie posiadające uporządkowanej struktury w stanie natywnym (IUP, *ang.* Intrinsically Unfolded Proteins) czy białka prionowe mogące oprócz formy prawidłowej przyjmować również konformację patologiczną związaną z odkładaniem się nierozpuszczalnych złogów amyloidowych. Osnową architektury włókien amyloidowych (formowanych przez bardzo różnorodne białka) jest tzw. poprzeczna struktura β , która może być zrealizowana jako helikalny arkusz β lub ewentualnie jako helisa β . W helikalnym arkuszu β powtarzające się monotennie łańcuchy β są prostopadłe do osi włókna, a uformowany z nich nieskończony i skręcony helikalnie arkusz jest do tej osi równoległy. W helisie β natomiast, odcinki łańcucha β wiją się wokół osi włókna, oplatając ją na wzór linii śrubowej.

Innym przykładem przyjmowania przez jedną sekwencję polipeptydową różnych konformacji jest zjawisko wymiany domen przestrzennych, w którym łańcuchy białkowe, po częściowym rozpleceniu, odtwarzają początkową aranżację elementów struktury przestrzennej lecz w sposób nieprawidłowy, bo z elementów pochodzących z kilku cząsteczek białka. Zjawisko wymiany domen przestrzennych prowadzi do oligomeryzacji białka i może być jednym z mechanizmów agregacji amyloidowej.