

M. Cieplak i A. Sienkiewicz, “*Białka*”,
artykuł w *Encyklopedii Fizyki Współczesnej*,
Wydawnictwo PWN SA, Warszawa 2004,
publikacja dostępna na stronach:
<http://www.pwn.pl> lub <http://aneksy.pwn.pl/efw/>

Białka

Marek Cieplak i Andrzej Sienkiewicz

Instytut Fizyki PAN, 02-668 Warszawa

W organizmach żywych, zarówno roślinnych jak i zwierzęcych, występują dziesiątki tysięcy różnych białek, które pełnią funkcje związane z podtrzymywaniem i regulacją procesów życiowych oraz stanowią materiał budulcowy struktur komórkowych i tkanek. Białka stanowią podstawowy składnik suchej masy komórki (do 70%), a w żywych komórkach katalizują i regulują większość reakcji biochemicznych. Struktury złożone z białek spełniają podstawą rolę w przekazie i obiegu sygnałów nerwowych oraz są odpowiedzialne za transport innych molekuł we wnętrzu komórek i przez błony komórkowe. Wyspecjalizowane białka są także składnikami komórek mięśni, skóry i włosów. Jeszcze inne białka pełnią funkcję toksyn, przeciwciał, lub hormonów. Wielkiej różnorodności fizjologicznych funkcji białek towarzyszy wielka różnorodność ich rozmiarów, kształtów, rozkładu ładunku elektrycznego, oraz zakresu rozpuszczalności w wodzie. Białko jest liniowym łańcuchem polimerowym zbudowanym z kilkudziesięciu, kilkuset, lub tysięcy monomerów połączonych ze sobą jak koraliki w naszyjniku. Każdy monomer jest jednym z 20 rodzajów naturalnie występujących aminokwasów. Funkcja białka w procesach biologicznych określona jest przede wszystkim przez jego strukturę w stanie zwiniętym zwanym też stanem natywnym.

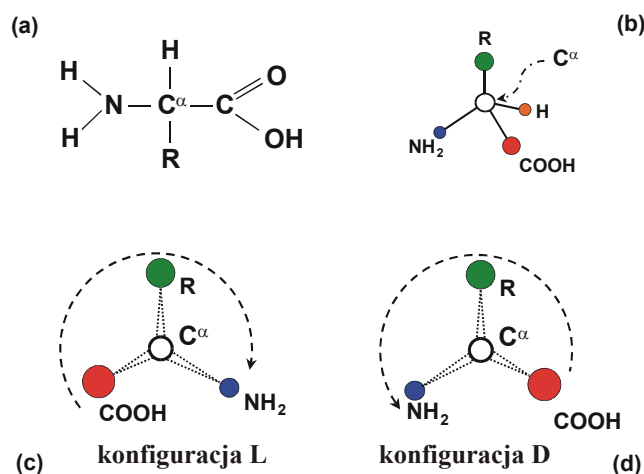
Zrozumienie i przewidzenie sposobu zwinięcia się białka na podstawie sekwencji występujących w nim aminokwasów jest jednym z najtrudniejszych i najważniejszych problemów współczesnej biologii molekularnej. Równie ważny jest także problem projektowania białka, czyli znalezienia sekwencji lub grupy sekwencji aminokwasowych, które zwijają się szybko i odwracalnie do zadanej struktury docelowej. Opracowanie metod projektowania *ab initio* białek o zadanej funkcji biologicznej doprowadzi do wielu nowych zastosowań, np. w katalizie lub w wydajnej konwersji energii światła słonecznego w energię chemiczną (jak w procesie fotosyntezy), względnie przemiany energii chemicznej w mechaniczną (jak podczas działania mięśni). Nowe technologie oparte o wiedzę o białku umożliwią opracowanie nowych lekarstw, hormonów i biosensorów.

A. Białka jako sekwencje aminokwasów

Niewielkie białka zawierają od kilkudziesięciu do kilkuset aminokwasów połączonych ze sobą w ramach jednego lub czasami kilku łańcuchów. Białka uważane za „duże” składają się z kilku tysięcy aminokwasów. Niezależnie od liczby zawartych aminokwasów, masy molekularne białek są znacznie większe od mas molekularnych typowych cząsteczek organicznych. Na przykład, masa stosunkowo niewielkiego białka, cytochromu *c* składającego się ze 104 aminokwasów, wynosi około 12,4 kDa (masa 1 Da odpowiada atomowej jednostce masy, czyli 1/12 masy atomu izotopu węgla ^{12}C ; $1 \text{ Da} = 1,66 \cdot 10^{-27} \text{ kg}$).

Z chemicznego punktu widzenia białka są więc cząsteczkami o niezwykle różnorodnej i skomplikowanej budowie. Mają one natomiast podobny do siebie skład chemiczny. W procentowym przeliczeniu na liczbę wszystkich atomów w białku, składają się one przede wszystkim z węgla (50-55%), tlenu (20-30%), azotu (14-18%), wodoru (6-7%), i siarki (do 2%). Niektóre białka zawierają również bardzo małe ilości innych pierwiastków, takich jak fosfor, wapń, żelazo, miedź, cynk, mangan, molibden i magnez.

Aminokwasy, podstawowe elementy struktur białkowych, są pochodnymi kwasów karboksylowych, w których atom wodoru w łańcuchu alifatycznym kwasu został zastąpiony przez grupę aminową. Aminokwasy są białymi krystalicznymi ciałami rozpuszczalnymi w wodzie, ale nierozpuszczalnymi w alkoholu.



Rys. 1. Budowa cząsteczki α -aminokwasu.

a) Wzór strukturalny aminokwasu w postaci cząsteczkowej. R oznacza decydujący o właściwościach aminokwasu łańcuch boczny. b) Model przestrzenny cząsteczki aminokwasu: cztery podstawniki COOH , R, NH_2 i H tworzą tetraedr wokół węgla C^α . c) Schematyczne przedstawienie aminokwasu w konfiguracji L: grupa COOH , łańcuch boczny R i grupa NH_2 rozłożone są zgodnie z ruchem wskazówek zegara. Niewidoczny atom wodoru znajduje się ponad płaszczyznę rysunku. Na cząsteczkę patrzymy wzdłuż wiązania $\text{H}-\text{C}^\alpha$. d) Konfiguracja D: lustrzane odbicie konfiguracji L.

Wszystkie aminokwasy występujące w białkach ludzkich i zwierzęcych zawierają przynajmniej jedną grupę aminową (-NH₂) i jedną grupę karboksylową (-COOH). Obie grupy dołączone są do tego samego atomu węgla zwanego atomem węgla α i oznaczanym jako węgiel C ^{α} . Dlatego też aminokwasy te noszą nazwę α -aminokwasów. W pozostałych dwóch wiązaniach węgla C ^{α} uczestniczą atom wodoru (H) i łańcuch boczny R, który jest inny dla każdego α -aminokwasu i decyduje o jego właściwościach. Wzór strukturalny cząsteczki α -aminokwasu (zwanego w dalszej części artykułu skrótowo – aminokwasem) przedstawiony jest na **rys.1a**. Wszystkie wiązania tworzone przez węgiel C ^{α} mają charakter wiązań kowalencyjnych. Układ podstawników tworzy tetraedr, w środku którego znajduje się atom węgla C ^{α} , zaś cztery podstawniki leżą w jego narożach (**rys.1b**). Obecność asymetrycznego atomu węgla C ^{α} połączonego z czterema różnymi podstawnikami jest powodem chiralności i aktywności optycznej aminokwasów. Chiralne związki chemiczne to takie, których cząsteczki zbudowane są z dokładnie takich samych atomów, natomiast ich struktury przestrzenne mają się do siebie tak, jak prawa i lewa ręka (z języka greckiego *cheir* – ręka). Dwie możliwe formy strukturalne (dwa izomery optyczne) aminokwasów przedstawione są schematycznie na **rys. 1c** i **1d**. Na obu tych rysunkach patrzymy na cząsteczkę aminokwasu wzdłuż wiązania H-C ^{α} , przy czym atom wodoru nie jest zaznaczony, gdyż znajduje się ponad płaszczyzną rysunku. Odmiana strukturalna, w której grupy karboksylowa, łańcuch boczny i grupa aminowa rozmieszczone są zgodnie z ruchem wskazówek zegara nosi nazwę konfiguracji L (**rys. 1c**). Odbicie lustrzane tej konfiguracji oznaczane jest jako konfiguracja D (**rys. 1d**). Podobnie jak wiele innych związków chemicznych mających swoje lustrzane odpowiedniki, aminokwasy o konfiguracji L i D mają identyczne własności chemiczne i fizyczne z jednym wyjątkiem – każda odmiana konfiguracyjna skręca płaszczyznę polaryzacji światła w innym kierunku. Z uwagi na bliźniacze podobieństwo mało jest metod fizycznych i chemicznych pozwalających na odróżnienie i rozdzielenie obu izomerów optycznych. Świat materii ożywionej rozróżnia je jednak bezbłędnie, gdyż w procesach biochemicznych zachodzących w organizmach żywych wykorzystywana jest odmiana aminokwasów o konfiguracji L. Dlatego też aminokwasy, z których zbudowane są naturalne białka występują w konfiguracji L, a czynniki odpowiedzialne za ten brak symetrii w świecie materii ożywionej nie są dobrze zrozumiane.

W środowisku obojętnym (pH = 7), aminokwasy występują w formie jonów obojnaczych, tzn. posiadają biegun dodatni i ujemny. W tej formie grupa aminowa przyłącza dodatkowy jon wodoru tworząc grupę -NH₃⁺, zaś grupa karboksylowa oddysocjuje

jeden jon wodoru tworząc grupę – COO⁻. Wartość pH, od której zależy stan ładunkowy aminokwasu, zdefiniowana jest jako ujemny logarytm dziesiętny ze stężenia molowego jonów wodoru w roztworze, $pH = -\log[H^+]$. W warunkach zbliżonych do fizjologicznych pH jest bliskie 7. Wartości $pH < 7$ określają środowisko kwaśne, a wartości $pH > 7$ definiują środowisko zasadowe. W środowisku kwaśnym tworzy się jon dodatni aminokwasu: $^+H_3NRHCOOH$ (grupa karboksylowa pozostaje niezjonizowana, zaś grupa aminowa występuje w postaci zjonizowanej – NH₃⁺). Natomiast, w środowisku o charakterze zasadowym powstaje jon ujemny: H₂NRHCOO⁻ (grupa aminowa pozostaje niezjonizowana, zaś grupa karboksylowa występuje w postaci zjonizowanej – COO⁻).

symbole	nazwa	skład %	masa/m _p	pH _i	rok odkrycia
HYDROFOBOWE (NIEPOLARNE)					
GLY G	glicyna	7,2	57,05	5,97	1820
ALA A	alanina	8,3	71,08	6,00	1879
PRO P	prolina	5,1	97,12	6,30	1901
VAL V	walina	6,6	99,13	5,96	1901
LEU L	leucyna	9,0	113,16	5,98	1820
ILE I	izoleucyna	5,2	113,16	5,94	1904
MET M	metionina	2,4	131,20	5,74	1899
PHE F	fenylalanina	3,9	147,18	5,48	1881
TRP W	tryptofan	1,3	186,21	5,89	1902
HYDROFILOWE (POLARNE) <u>nienaładowane</u>					
SER S	seryna	6,9	87,08	5,68	1865
THR T	treonina	5,8	101,11	5,64	1925
CYS C	cysteina	1,7	103,14	5,02	1810
ASN N	aspargina	4,4	114,10	5,41	1932
GLN Q	glutamina	4,0	128,13	5,65	1932
TYR Y	tyrozyna	3,2	163,17	5,66	1849
HYDROFILOWE (POLARNE) <u>naładowane</u>					
<u>kwasowe (-)</u>					
ASP D	kwas asparginowy	5,3	115,09	2,77	1868
GLU E	kwas glutaminowy	6,2	129,12	3,22	1866
<u>zasadowe (+)</u>					
LYS K	lizyna	5,7	128,17	9,59	1889
HIS H	histydyna	2,2	137,14	7,47	1896
ARG R	arginina	5,7	156,19	11,15	1895

Rys. 2. Tablica aminokwasów występujących w naturalnych białkach i ich wybrane własności. M_p oznacza masę protonu a pH_i punkt izoelektryczny.

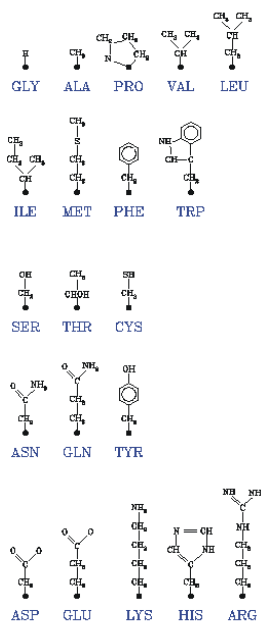
Aminokwasy mają złożoną strukturę chemiczną i na ogół identyfikuje się je według nazw zwyczajowych, a nie systematycznych. Zestawienie wybranych własności 20 aminokwasów występujących w naturalnych. Białkach przedstawiono w tabeli na **rys. 2**. Tabela przedstawia nazwy aminokwasów oraz ich trzy- i jednoliterowe symbole. Kolejne

kolumny w tabeli (**rys. 2**) przedstawiają ich częstość występowania w białkach, masy, punkt izoelektryczny i rok odkrycia — pełny zestaw aminokwasów był znany w 1932 roku. Podane tu masy dotyczą stanu związanego w białku, natomiast punkt izoelektryczny, pH_I , stanu swobodnego aminokwasu. Punkt izoelektryczny odpowiada takiej wartości pH, przy której wypadkowy ładunek aminokwasu jest równy zero. Właściwości elektryczne aminokwasów w białkach silnie zależą od konformacji białka. Lista aminokwasów podzielona jest w tabeli na trzy grupy: hydrofobowe, hydrofilowe nienaładowane i hydrofilowe naładowane w warunkach fizjologicznych. Nazwy te zostaną wyjaśnione w dalszej części artykułu.

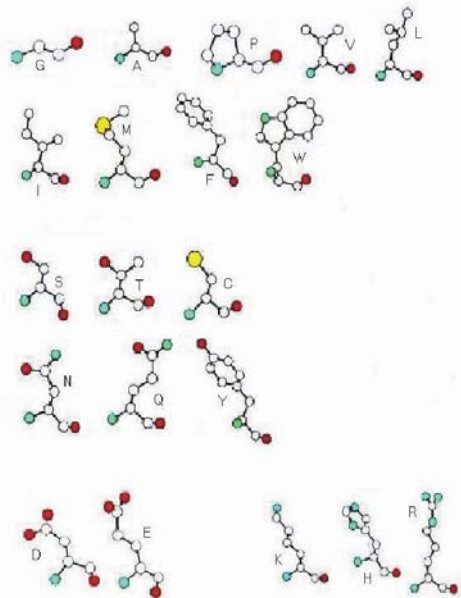
W warunkach fizjologicznych 15 aminokwasów jest obojętnych elektrycznie, tzn. aminokwasy te mają momenty dipolowe, ale nie mają wypadkowego ładunku elektrycznego. Pięć aminokwasów jest naładowanych. Dwa z nich to naładowane ujemnie kwasy, a trzy to naładowane dodatnio zasady. Zasadowy charakter trzem aminokwasom nadają łańcuchy boczne.

Wzory chemiczne definiujące łańcuchy boczne aminokwasów przedstawione są na **rys. 3**. Schematyczne konfiguracje przestrzenne aminokwasów pokazane są natomiast na **rys. 4**. Na rysunku tym atomy tlenu zaznaczone są na czerwono, węgla na biało, azotu na niebiesko, siarki na żółto a mające najmniejsze rozmiary atomy wodoru, nie są zaznaczone. Atomy siarki występują wyłącznie w cysteinie i metioninie.

Każdy aminokwas pełni w białku jakąś rolę. Dwa aminokwasy: glicyna i prolina często określają charakter struktury natywnej białka. Glicyna jest bowiem najmniejszym aminokwasem (jej łańcuch boczny to po prostu atom wodoru) i znaleźć ją można w elementach łączących typowe podstruktury białka. Są nimi tzw. struktury drugorzędowe, których budowa zostanie szerzej omówiona w dalszej części tego artykułu. Prolina jest w istocie nie aminokwasem a cyklicznym iminokwasem (jedyne taki wyjątek wśród „aminokwasów”), gdyż zawiera niearomatyczny sztywny pierścień, do którego należy węgiel C^α . Pierścień ten trudno upakować i dlatego prolina często kończy lub zakrzywia struktury drugorzędowe. Największy aminokwas to tryptofan. Tryptofan jest jednym z trzech aminokwasów zawierających pierścień aromatyczny. Pozostałe dwa to fenyloalanina i tyrozyna, ale tylko tryptofan w znaczący sposób absorbuje światło, o długości fali 280 nm, co z kolei prowadzi do fluorescencji. Badanie fluorescencji tryptofanu jest jedną z podstawowych metod pozwalających wnioskować o konformacji białka, gdyż fluorescencja jest silna, gdy tryptofan jest eksponowany (znajduje się na powierzchni cząsteczki białka), a słaba, gdy jest ściśle otoczony przez inne aminokwasy, a więc w stanie zwiniętym.



Rys. 3. Wzory strukturalne łańcuchów bocznych aminokwasów.



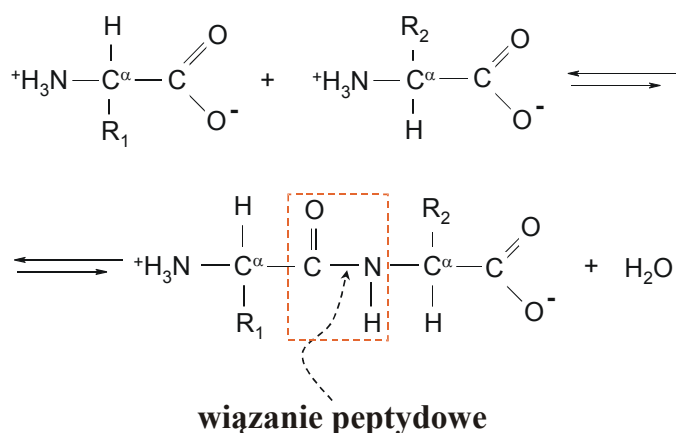
Rys. 4. Ilustracja przestrzennego ułożenia atomów w aminokwasach.

Organizm ludzki potrafi zsyntetyzować dwanaście z dwudziestu aminokwasów potrzebnych do budowy białek, pozostałe muszą być dostarczone z pożywieniem. Aminokwasy podstawowe, które organizm pobiera z pożywieniem noszą nazwę egzogennych. Natomiast te, które potrafi sam wytworzyć nazywają się aminokwasami endogennymi. Podstawowymi (egzogennymi) aminokwasami, które organizm ludzki musi

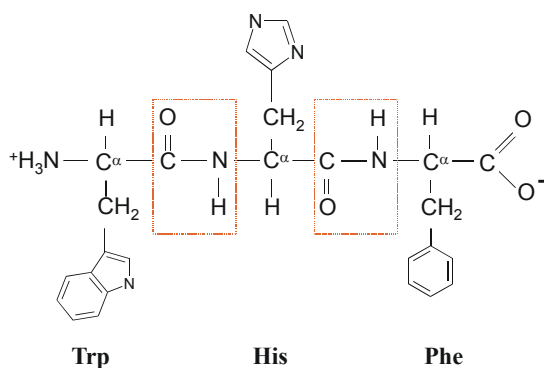
pobrać przyswajając bogate w białko pożywienie są: lizyna, tryptofan, walina, histydyna, leucyna, izoalanina, fenyloalanina i treonina.

Istnieją również inne aminokwasy, które występują w przyrodzie lub są wytwarzane syntetycznie. Podstawowa różnica między tymi aminokwasami a α -aminokwasami występującymi w białkach ludzkich i zwierzęcych polega na tym, że grupy aminowa ($-\text{NH}_2$) i karboksylowa ($-\text{COOH}$) nie są przyłączone do tego samego atomu węgla. Dotychczas wyodrębniono i zidentyfikowano ponad 150 takich odmiennych aminokwasów, występujących, m.in. w białkach niektórych grzybów oraz roślin wyższych.

a)



b)



Rys. 5. a) Powstawanie wiązania peptydowego w dipeptydzie. R_1 i R_2 oznaczają łańcuchy boczne aminokwasów biorących udział w reakcji kondensacji. W prostokącie zaznaczonym linią przerywaną znajduje się grupa atomów tworząca wiązanie peptydowe. b) Krótki łańcuch polipeptydowy – tripeptyd o sekwencji: tryptofan – histydyna – fenyloalanina.

W genetycznie uwarunkowanym procesie syntezy białek aminokwasy łączą się ze sobą kowalencyjnym wiązaniem peptydowym o energii około 4 eV. Odległość pomiędzy kolejnymi atomami węgla C^α w białku wynosi około 0,38 nm. Proces powstawania wiązania peptydowego pokazano na **rys. 5a**. W reakcji tej zjonizowana grupa karboksylową

($-\text{COO}^-$) jednego aminokwasu łączy się ze zjonizowaną grupą aminową ($-\text{NH}_3^+$) drugiego aminokwasu. Tworzy się charakterystyczne ugrupowanie ułożonych w jednej płaszczyźnie atomów ($-\text{COHN}-$), zaznaczonych linią przerywaną na **rys. 5a**. Wiązanie między atomem węgla grupy karbonylowej ($-\text{C}=\text{O}$) a atomem azotu grupy aminowej, o długości około 0,13 nm, ma częściowo charakter wiązania podwójnego, co decyduje o jego sztywności i tym samym utrudnia rotację łańcucha polipeptydowego. Rotacje są jednak dozwolone wokół dwóch przebiegających wzdłuż łańcucha wiązań wychodzących z węgla C^α . Procesowi powstania wiązania peptydowego towarzyszy wydzielenie się jednej cząsteczki wody. Jest to reakcja kondensacji, której równowaga przesunięta jest raczej w kierunku hydrolizy a nie syntezy. Dlatego biosynteza białek polegająca na przyłączaniu kolejnych aminokwasów i wydłużaniu łańcucha wymaga dostarczenia dodatkowej energii. W komórkach proces ten zachodzi w wyspecjalizowanych organellach zwanych rybosomami.

Powstające w wyniku biosyntezy białka są na ogół długimi liniowymi polimerami aminokwasów i dlatego trudno jest przedstawić ich sumaryczny wzór chemiczny. Można to jednak zrobić dla krótkich polipeptydów. Przykład krótkiego liniowego polimeru – tripeptydu (Trp-His-Phe) z zaznaczonymi wiązaniami peptydowymi pokazano na **rys. 5b**.

B. Synteza i struktura pierwszorzędowa białek

Tak jak wspomniano, białka w żywych komórkach są syntetyzowane przez rybosomy, a kolejność aminokwasów w białku, zwana sekwencją aminokwasów, zakodowana jest w DNA. Każde białko różni się od innych sekwencją i liczbą aminokwasów. Sekwencja chemicznie zróżnicowanych łańcuchów bocznych aminokwasów jest więc czynnikiem decydującym o odmienności białek. Definiuje ona także szkielet polipeptydowy białka, wyznaczając tym samym jego strukturę pierwszorzędową.

DNA jest makrocząsteczką zbudowaną z dwóch nici. Każda z nici jest długim polimerem (np. u człowieka 3×10^6 elementów) zbudowanym z czterech zasad z pierścieniami aromatycznymi: adeniny (A), guaniny (G), cytozyny (C), i tyminy (T). Zasada A z jednej nici jest związana z zasadą T z drugiej nici, a C z G. Mechanizm budowania białka zaczyna się od tzw. procesu transkrypcji, odbywającym się w jądrze komórki. W procesie tym białko enzymatyczne zwane polimerazą RNA przesuwając się wzdłuż DNA, rozszczepia nici DNA i syntetyzuje nić mRNA, która jest komplementarna do otwartego segmentu jednej z nici DNA. Komplementarność polega na tym, że np. z fragmentu CAGACCTTA tworzy się fragment GUCUGGAAU, w którym rolę tyminy pełni bardzo zbliżona zasada – uracyl (U). mRNA jest

kopią kodujących fragmentów DNA (eksonów) a fragmenty niekodujące (introny) są pominięte. Po wyjściu z jądra, mRNA podlega tzw. translacji na białko. Proces translacji zachodzi w rybosomie (**zob. też** → Kwasy nukleinowe).

Sekwencja zasad A, G, C i U jednoznacznie określa sekwencję aminokwasów w białku według kodu genetycznego, przedstawionego na **rys 6**. Kolejna trójka zasad generuje jeden określony aminokwas. Kilka różnych trójek może oznaczać jednak ten sam aminokwas, na przykład, UUA odpowiada leucynie, ale kombinacja UUG także odpowiada leucynie. Sześć kombinacji odpowiada serynie i argininie. Tylko jedna, AUG, odpowiada metioninie, ale AUG oznacza również początek translacji. Kombinacje UAA, UAG i UGA oznaczają koniec translacji.

Liczba możliwych sekwencji aminokwasów jest astronomiczna. Na przykład, dla układu o N monomerach istnieje 20^N możliwych sekwencji (a więc aż 10^{65} dla $N=50$). Tymczasem liczba różnych białek, jakie ludzki DNA może zakodować, jest według obecnej oceny tylko rzędu 10^5 . Oznacza to, że proces ewolucji dokonał niezwykle ostrej selekcji użytecznych sekwencji. Wybrane sekwencje – białka – muszą mieć bardzo szczególne właściwości. Pozostałe sekwencje to zwykle heteropolimery – polimery o niejednorodnych elementach składowych.

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
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
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
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	GAG Ala	GAG Glu	GGG Gly

Rys. 6. Kod genetyczny.

C. Zwijanie się białek

Białka, w zależności od funkcji i umiejscowienia w organizmie, można podzielić na trzy szerokie kategorie: włókniste, membranowe i globularne. Białka włókniste stanowią

elementy strukturalne komórki. Białka membranowe tworzą kanały, przez które odbywa się kontrolowany transfer składników np. poprzez błonę komórkową (*zob. też* → Błony biologiczne).

Białka można podzielić na trzy szerokie kategorie: włókniste, membranowe i globularne, w zależności od funkcji i umiejscowienia w organizmie. Białka włókniste stanowią elementy strukturalne komórki. Białka membranowe tworzą kanały, przez które odbywa się kontrolowany transfer składników np. poprzez błonę komórkową. Białka te funkcjonują zanurzone w dwuwarstwie lipidowej i mają tylko częściowy kontakt ze środowiskiem wodnym. Dlatego też trudniej jest je wyodrębnić oraz wyhodować z roztworów wodnych odpowiednio duże kryształy do zbadania ich struktury. Enzymy, które działają jako katalizatory niemal wszystkich reakcji biochemicznych w komórce są białkami globularnymi. Białka globularne mają zwarty kształt i funkcjonują w środowisku wodnym.

Najważniejszą cechą charakterystyczną białka globularnego jest to, że w typowym dla komórki środowisku roztworu wodnego o odczynie niemal obojętnym ($\text{pH} \sim 7$) i w zakresie temperatur pokojowych (od 20 do 40 °C) zwijają się one do jednej zwartej konformacji – stanu natywnego. Anfinsen wykazał w latach 50-tych, że jest to proces odwracalny. W środowisku wodnym, *in vitro*, duża grupa białek globularnych potrafi znaleźć stan natywny bardzo szybko, często w czasie krótszym niż 1 ms. W odpowiednich warunkach doświadczalnych taki proces zachodzi w sposób odwracalny i to bez pomocy innych mechanizmów, które wspomagają zwijanie białka w naturalnym środowisku żywej komórki. Czas zwijania jest dużo krótszy niż ten, jaki wynikałby z kolejnego przeszukiwania wszystkich możliwych konformacji w celu znalezienia jednej wybranej konformacji odpowiadającej stanowi natywnemu białka (o najniższej energii). Levinthal, w latach 60-tych oszacował bowiem, że czas niezbędny dla takiego przeszukiwania byłby dłuższy niż wiek wszechświata. Tak więc proces zwijania białka zachodzi w pewnym ograniczonym podziorze możliwych konformacji. Można to sobie wyobrazić jako pojawienie się tzw. lejka zwijania ukierunkowującego ewolucję czasową białka w stronę stanu natywnego. W wypadku heteropolimerów, „dolina” odpowiadająca stanowi o najniższej energii nie jest wyróżniona – jest tylko jedną z wielu równie dobrych dolin i stąd procesy ewolucji są powolne.

W warunkach niefizjologicznych, takich jak roztwory wodne o odczynie zasadowym ($\text{pH} > 7$) lub kwaśnym ($\text{pH} < 7$), w roztworach niewodnych, czy w podwyższonej temperaturze, białka rozwijają się do konformacji otwartych (zdenaturowanych). Jednak w

warunkach fizjologicznych stan natywny jest bardziej stabilny niż jakakolwiek konformacja zdenaturowana.

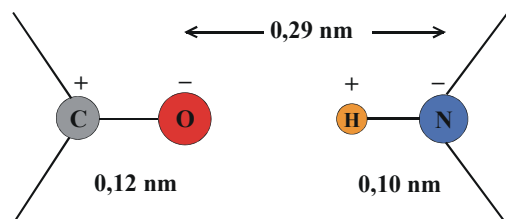
D. Oddziaływania między aminokwasami w białku

Fizyczną przyczyną zwijania się białek do postaci globularnej jest istnienie wzajemnych oddziaływań między aminokwasami oraz oddziaływań aminokwasowych łańcuchów bocznych z cząsteczkami rozpuszczalnika (wody). W wypadku białek są to złożone oddziaływania, w których dominuje charakter przyciągający, ale nie musi tak być w wypadku przypadkowych heteropolimerów. Najsilniejsze wiązania w białku to wiązania kowalencyjne. Są to przede wszystkim wiązania peptydowe (o energii rzędu 4 eV), które cementują aminokwasy ze sobą, ale nie ustalają struktur drugorzędowej i trzeciorzędowej białka. Wiązania kowalencyjne mogą się jednak pojawiać także w innych miejscach niż łańcuch polipeptydowy – w tzw. kontaktach. Mówimy, że aminokwasy tworzą ze sobą kontakt, jeśli są blisko siebie w przestrzeni, ale nie są swymi sąsiadami wzdłuż łańcucha. Oddziaływania kowalencyjne mogą się w kontakcie pojawić, ale tylko wtedy, gdy kontakt tworzą dwie cysteiny. Łańcuch boczny cysteiny kończy się grupą tiolową –SH. Dwie grupy tiolowe mogą łączyć się ze sobą tworząc tzw. mostek dwusiarczkowy. Jednak cysteina jest jednym z najrzadziej występujących aminokwasów i stąd obecność mostków dwusiarczkowych może co najwyżej tylko wspomagać zwijanie się białek.

Oddziaływania elektrostatyczne między naładowanymi aminokwasami są o rząd wielkości słabsze od wiązań kowalencyjnych. Mają one charakter zarówno przyciągający jak i odpychający w zależności od rodzaju aminokwasów. Oddziaływania tego typu nie mogą więc być samodzielnie odpowiedzialne za zwijanie, tym bardziej, że dotyczą one, w warunkach fizjologicznych, tylko pięciu polarnych aminokwasów. Oddziaływania te wnoszą jednak swój wkład do zmian konformacji cząsteczki białka przy zmienianiu wartości pH. Są one bowiem długozasięgowe, a efektywny potencjał oddziaływania elektrostatycznego zależy od pH.

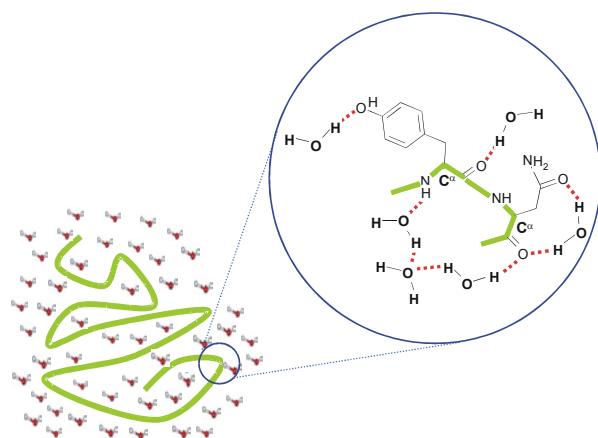
W latach 30-tych Mirsky i Pauling zaproponowali, że kluczową siłą odpowiedzialną za zwijanie się białek powinny być wiązania wodorowe, dla których energia wiązań jest średnio 20 razy mniejsza od energii wiązań peptydowych. Istnieją dwa składniki oddziaływań wodorowych. Pierwszy to przesuwanie się gęstości chmury elektronowej z atomu o mniejszym ładunku jądra atomowego, np. wodoru, w stronę cięższego atomu, o większym ładunku jądra, np. tlenu. Pierwszy to przesuwanie się gęstości chmury elektronowej z atomu

o mniejszym ładunku jądra atomowego, jak w wypadku wodoru, w stronę cięższego atomu, jak tlenu, o większym ładunku jądra. Prowadzi to do zaistnienia wypadkowego efektywnego ułamkowego ładunku (dodatniego na atomie wodoru). Drugi składnik to oddziaływanie elektrostatyczne pomiędzy takimi efektywnymi ładunkami, jak to ilustruje rys. 7. Oddziaływania wodorowe są odpowiedzialne również za istnienie struktury podwójnej helisy DNA. W białkach wiązania wodorowe odgrywają kluczową rolę w powstawaniu i stabilizacji ich struktur przestrzennych.



Rys. 7. Geometria przykładowego wiązania wodorowego.

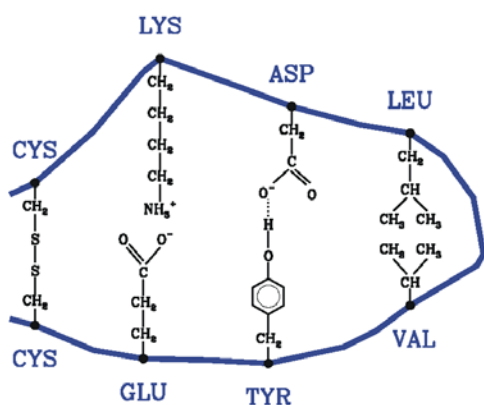
Grupy atomów $-C=O$ i $-NH$ występujące wzdłuż łańcucha polipeptydowego białka mają ujemny ładunek na atomie tlenu i dodatni na atomie wodoru. Umożliwia to powstanie wiązań wodorowych pomiędzy tymi grupami. Segmenty białek stabilizowane przez wiązania wodorowe noszą nazwę struktur drugorzędowych. Są to α -helisy, struktury β i skręty. Istnienie tych struktur przewidzieli Pauling, Corey, i Branson w badaniach modelowych.



Rys. 8. Zachowanie się polimeru złożonego z elementów hydrofilowych w wodzie. W powiększeniu pokazany jest fragment szkieletu polipeptydowego zawierający dwa hydrofilowe łańcuchy boczne: tyrozyny i asparaginy. W łańcuchu głównym naszkicowanym schematycznie zielonymi kreskami zaznaczono tylko grupy $-NH-$, atomy węgla C^α oraz atomy tlenu należące do grupy karbonylowej. Czerwoną przerywaną kreską zaznaczone są wiązania wodorowe, tworzone przez cząsteczki wody z atomami należącymi do szkieletu polipeptydowego i z atomami łańcuchów bocznych aminokwasów.

Jednak w latach 50-tych Kauzmann wykazał, że same tylko wiązania wodorowe między aminokwasami nie są w stanie wytłumaczyć procesów zwiwania się białek. Istnieją bowiem równie silne wiązania wodorowe aminokwasów z cząsteczkami otaczającej wody oraz pomiędzy samymi cząsteczkami wody. Aminokwasy hydrofilowe z tabeli umieszczonej na **rys. 2** to takie, które chętnie wiążą się z cząsteczką wody poprzez wiązanie wodorowe. Sytuację tę ilustruje **rys. 8** w odniesieniu do czysto hydrofilowego polimeru (który nie jest białkiem).

Aminokwasy hydrofobowe to takie, które wody unikają. Fragmenty hydrofobowe nie tworzą wiązań wodorowych z cząsteczkami wody, ale w pobliżu takiego segmentu same cząsteczki wody wykazują tendencję do korelowania swych orientacji poprzez wzajemne oddziaływania wodorowe. Zjawisko to redukuje entropię układu. Segmenty hydrofobowe mają więc tendencję do unikania cząsteczek wody, gdyż w ten sposób maksymalizowana jest objętość obszaru o skorelowanych orientacjach cząsteczek wody. Można to opisać jako wystąpienie efektywnego wzajemnego przyciągania między aminokwasami hydrofobowymi. Przyciąganie to nosi nazwę oddziaływania hydrofobowego i ono właśnie, według Kauzmanna, stanowi najsilniejszy mechanizm odpowiedzialny za zwiwanie. Łańcuch aminokwasów musi mieć dostateczną liczbę aminokwasów hydrofobowych, by móc stać się białkiem globularnym. Zrozumienie szczegółów molekularnych oddziaływań hydrofobowych pozostaje przedmiotem aktualnych badań.



Rys. 9. Przykłady oddziaływań pomiędzy łańcuchami bocznymi aminokwasów w białkach. Mostki dwusiarczkowe, oddziaływania jonowe, wodorowe i hydrofobowe zilustrowane są kolejno od lewej do prawej strony.

Omówione tu oddziaływania są schematycznie zilustrowane na **rys. 9**. Istnieją jednak i inne oddziaływania, na przykład polaryzacyjne typu van der Waalsa (100 razy słabsze od wiązań

peptydowych). Wszelkie wyżej wymienione oddziaływania dotyczą bardzo wielu par oddziaływujących ze sobą atomów. Zredukowanie ich do efektywnych oddziaływań pomiędzy całymi aminokwasami o środku mieszczącym się w położeniu węgla C^α nie jest zadaniem prostym zwłaszcza, że ważne są też oddziaływania z rozpuszczalnikiem.

Rodzaj wiązania	Energia		
	[kcal/mol]	kJ/mol	[eV]
Kowalencyjne	70 - 100	290 - 420	1,7 - 4,4
Jonowe	10	42	0,45
Wodorowe	4 - 5	17 - 21	0,18 - 0,22
Van der Waalsa	1 - 2	4,2 - 8,4	0,044 - 0,088

Rys. 10. Typowe energie wiązań międzyatomowych w białkach.

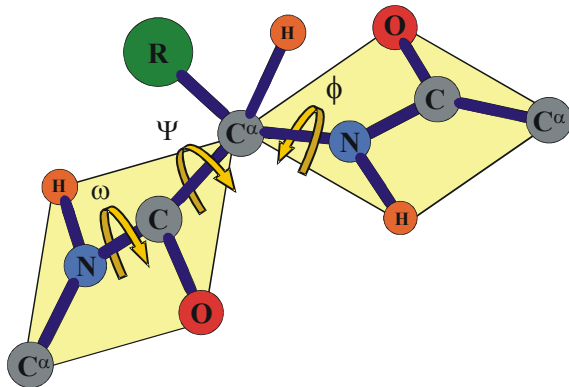
W tabeli na **rys. 10** przedstawiono typowe wartości energii wiązań międzyatomowych występujących w białkach począwszy od najsilniejszych, jakimi są wiązania kowalencyjne, przez jonowe i wodorowe, aż do najsłabszych – wiązań van der Waalsa. Energie wiązań podano w najczęściej stosowanych w chemii i biochemii jednostkach kcal/mol oraz kJ/mol. Dodatkowo, w ostatniej kolumnie podano wartości energii wiązań w jednostkach typowo fizycznych (eV), w przeliczeniu na pojedyncze wiązanie.

Współzawodnictwo pomiędzy energią oddziaływania wiązań wodorowych we wnętrzu białka i entropią faworyzującą stan rozwinięty prowadzi do delikatnej równowagi, w której lekko przeważa energia stanu zwiniętego (o około 40 kJ/mol). Ten niewielki margines stabilności jest także warunkiem spełniania funkcji biologicznych przez białka, gdyż ich własności katalityczne wiążą się często z zmianami konformacyjnymi. Ponadto mała stabilność termodynamiczna białek (podatność na denaturację) ułatwia ich rozkład i wymianę w procesach metabolicznych zachodzących w komórkach.

E. Struktury drugorzędowe

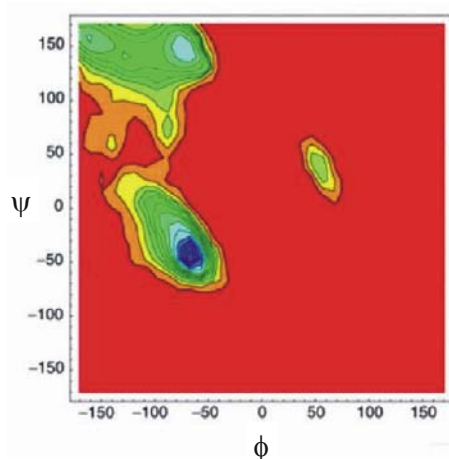
Struktura pierwszorzędowa, czyli sekwencja aminokwasów determinuje natywną strukturę zwiniętą, czyli strukturę trzeciorzędową. W szkielecie wiązań łączących kolejne atomy węgla C^α w konformacjach natywnych rozpoznać można regularne motywy zwane strukturą drugorzędową i złożone ze struktur β , α -helis i skrętów. Są one stabilizowane przede

wszystkim przez wiązania wodorowe. W α -helisie przypada 3,6 aminokwasów na pełen obrót. Istnieją i inne rodzaje helis, ale występują one rzadziej.



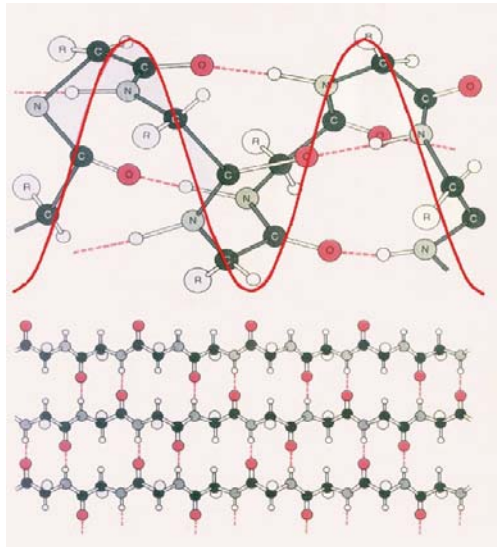
Rys. 11. Kąty definiujące kształt szkieletu białka.

Jeden ze sposobów zidentyfikowania struktury przestrzennej białka polega na określeniu wartości kolejnych kątów dwuściennych: ψ i ϕ , jakie tworzą wiązania uczestniczące w budowie łańcucha głównego czyli szkieletu białka. Kąty te są zdefiniowane na **rys. 11**. Kolejny kąt, ω , również zdefiniowany na **rys. 11**, jest niemal zawsze bliski 180° , gdyż w wiązaniu peptydowym atomy C^α , C, O, N, H, oraz następny C^α leżą w jednej płaszczyźnie. Wszystkie wartości kątów ψ i ϕ znalezione w białkach można umieścić zbiorczo na płaszczyźnie ψ i ϕ , co nosi nazwę wykresu Ramachandrana. Okazuje się, że na wykresie Ramachandrana występują dwa silne zagęszczone obszary. W pierwszym z nich $\phi = -100^\circ \pm 50^\circ$ i $\psi = 120^\circ \pm 40^\circ$. Odpowiada to strukturom β . W drugim $\phi = -70^\circ \pm 40^\circ$ i $\psi = -50^\circ \pm 40^\circ$, co odpowiada α -helisom. Wykres Ramachandrana jest pokazany na **Rys. 12**.



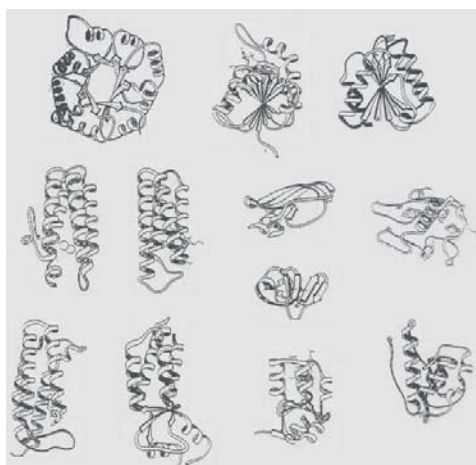
Rys. 12. Wykres Ramachandrana pokazuje dozwolone wartości kątów dwuściennych ψ i ϕ występujących w α -helisach i strukturach β typowego polipeptydu.

Rys. 13 przedstawia ułożenie atomów w α -helisie. Wiązanie wodorowe łączy w niej monomer i z monomerem $i + 4$. Struktura β powstaje z połączenia nici β za pomocą wiązań wodorowych. Nici te mogą przebiegać względem siebie równoległe bądź antyrównoległe w zależności od tego, jak przebiega łańcuch główny białka na zewnątrz obszaru struktury β (**rys. 13**).



Rys. 13. Budowa atomowa wybranych struktur drugorzędowych. Górna część rysunku przedstawia α -helisę, a dolna strukturę β zbudowaną z trzech antyrównoległych nici β .

W schematycznych wykresach struktur trzeciorzędowych białek, nici β zaznacza się często ukierunkowaną płaską strzałką o zwrocie od końca aminowego do końca karboksylowego białka. Helisy natomiast zaznacza się zwiniętymi wstążkami. **Rys. 14** przedstawia przykłady struktur białek. Białka zazwyczaj zawierają zarówno α -helisy, jak i struktury β . Istnieją jednak białka zawierające tylko jeden rodzaj struktury drugorzędowej.

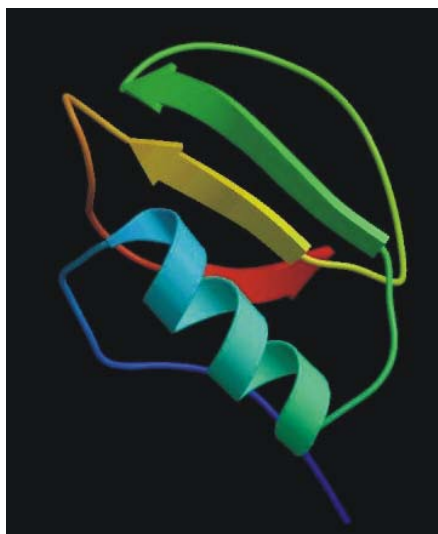


Rys. 14. Przykłady trzeciorzędowej struktury białek. Skręcone wstążki przedstawiają α -helisy, a wstążki ze strzałkami – nici β .

F. Bazy danych o białkach.

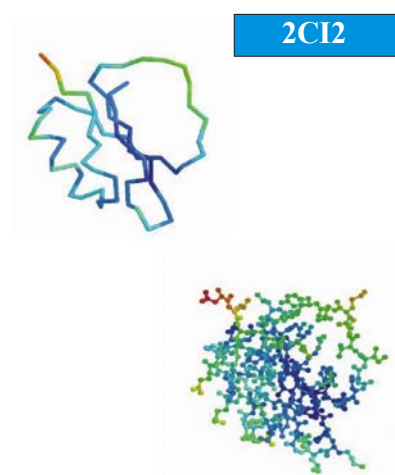
Znajomość trójwymiarowej struktury trzeciorzędowej białka jest kluczowa dla zrozumienia jego funkcji biologicznej. Określenie sekwencji w białku jest obecnie zadaniem rutynowym, natomiast określenie struktury jest dużo trudniejsze. W 1992 roku znano strukturę atomową około 400 białek. 10 lat później – ponad 14500. Zdecydowaną większość z nich określono w wyniku otrzymania białek w postaci krystalicznej. W pewnych warunkach możliwe jest wytworzenie kryształu białka z jego wodnego roztworu (w węzłach sieci takiego kryształu znajdują się molekuly białka) i przeprowadzenie strukturalnej analizy rentgenowskiej. Druga co do znaczenia metoda wyznaczania struktury to technika jądrowego rezonansu magnetycznego, która nie wymaga uprzedniej krystalizacji. W ten sposób wyznaczono około 17% znanych struktur. Około 2% struktur wyznaczono na drodze modelowania teoretycznego.

Struktury białek deponowane są w komputerowych bazach danych. Istnieją niepubliczne i publicznie dostępne bazy danych. Te pierwsze prowadzone są na ogół przez firmy farmaceutyczne. Z tych drugich najbardziej znana jest internetowa baza danych o nazwie Protein Data Bank (PDB) i o adresie www.rcsb.org/pdb/, gdzie rcsb jest skrótem od The Research Collaboratory for Structural Bioinformatics. PDB jest konsorcjum, w którym uczestniczą cztery amerykańskie instytucje: Rutgers University w New Jersey, University of California w San Diego, San Diego Supercomputer Center, i National Institute of Standards and Technology w Marylandzie. Dane zgromadzone w PDB określają przede wszystkim współrzędne atomów w strukturze natywnej białka, w tym w szczególności współrzędne C^α. PDB udostępnia też w dwojaki sposób dane dotyczące struktur drugorzędowych białek. Jeden rodzaj informacji zawarty jest w danych deponowanych przez autorów, drugi zaś jest wynikiem automatycznej analizy danych dokonywanej przez PDB. Te dwa rodzaje danych o strukturze nie są ze sobą w pełni zgodne. Rozbieżności dotyczą najczęściej granic struktur drugorzędowych. Oprócz danych o strukturze, PDB udostępnia również program graficzny RASMOL, który pozwala wykreślić dane strukturalne.



Rys. 15. Schematyczna reprezentacja białka 2CI2 uzyskana z Protein Data Bank.

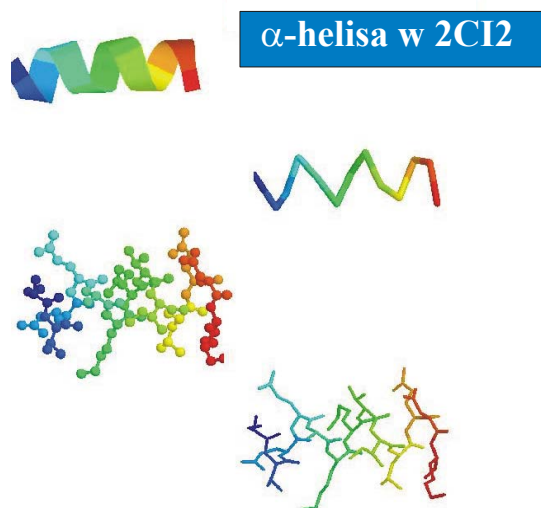
Jako przykład zaznajomienia się ze strukturą białka rozpatrzmy białko zwane inhibitorem trypsyny. Ma ono kod 2CI2 w PDB i jest zbudowane z 83 aminokwasów. Strukturę trzeciorzędową ostatnich 65 z nich udało się określić drogą dyfrakcji rentgenowskiej. 13 aminokwasów (od aminokwasu 31 do 43 według deponujących dane) tworzy α -helisę. Istnieją też cztery nici β , z których dwie są długie: aminokwasy 47-53 i 64-71, a dwie krótkie: aminokwasy 22-24 i 80-83. Wszystkie cztery nici tworzą w sumie jedną strukturę β . PDB udostępnia schematyczny wizerunek struktury przedstawiony na rys. 15. Najkrótsza nić β nie jest widoczna w tej reprezentacji. Jest to przykład różnic w sposobie klasyfikowania i przedstawiania struktur białek dostępnych poprzez PDB i otrzymywanych doświadczalnie.



Rys. 16. Dwa rysunki ilustrujące budowę białka 2CI2. Górny rysunek przedstawia kształt szkieletu, a dolny przedstawia położenia atomów i schemat utworzonych wiązań.

Zdeponowane w internetowych bankach danych struktury białek można też analizować samodzielnie.

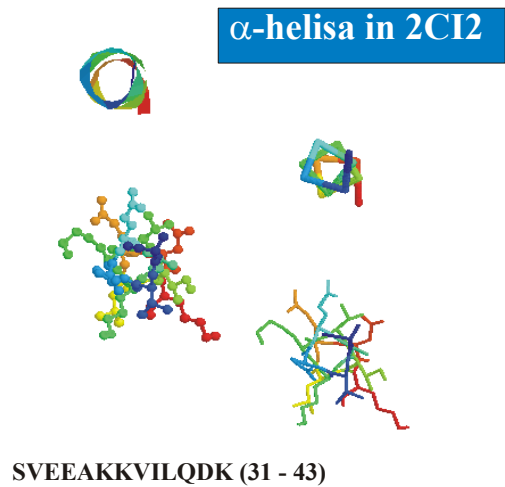
Rys. 16 przedstawia reprezentacje szkieletu (górny panel) i całej struktury atomowej białka 2CI2 (dolny panel) wykonane w programie graficznym RASMOL. W konwencji RASMOL-u rozmiary wszystkich atomów są jednakowe i zostały tu dobrane tak, żeby widoczne były połączenia między atomami. Struktury drugorzędowe widać na rysunku samego szkieletu, ale byłoby bardzo trudno je dostrzec, gdyby wykreślić również łańcuchy boczne. Gdyby użyć promieni atomowych van der Waalsa (odpowiadających rozmiarom twardego rdzenia atomu i zgodnych z równaniem van der Waalsa dla gazu), to wizerunek białka wyglądałby jak zwarta globula zbudowana z gęsto upakowanych kul. Globula ta miałaby szorstką powierzchnię. Tak więc istnieje wiele technik przedstawiania wizerunków białek. Wszystkie one są dosyć umowne, gdyż dotyczą świata fizyki kwantowej. Należy tu jednak zaznaczyć, że wiele właściwości białek, takich jak ich ruch, jest już praktycznie w obszarze fizyki klasycznej z uwagi na stosunkowo duże masy molekuł.



Rys. 17. Cztery reprezentacje α -helisy w białku 2CI2 widzianej z profilu. Kolejno od góry do dołu są to: schemat wstążkowy szkieletu, wiązania tworzące szkielet, położenia atomów i schemat wiązań między nimi oraz schemat wszystkich wiązań chemicznych.

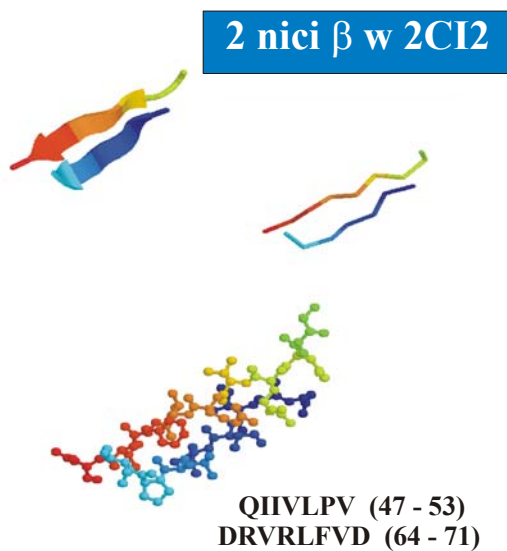
Przyjrzyjmy się teraz fragmentom struktury białka 2CI2. **Rys. 17** przedstawia różne reprezentacje α -helisy jeśli patrzeć na nią „z boku”, a **rys. 18** dotyczy jej obrazu widzianej wzdłuż osi. Rysunek w kształcie zwiniętej wstążki jest schematyczny. „Kanciasty” rysunek szkieletu powstaje wtedy, gdy połączyć odcinkami położenia atomów węgla C^α . Kolejne

panele uwzględniają łańcuchy boczne – wraz z wizerunkami atomów i bez. Symbole literowe określają kolejne aminokwasy, które występują w strukturze.

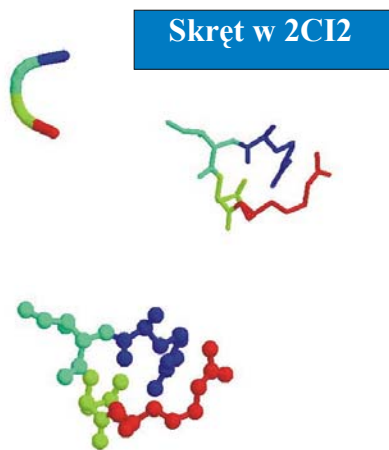


Rys. 18. Tak jak na rys. 17, ale dla α -helisy widzianej wzdłuż jej osi.

Rys. 19 przedstawia różne reprezentacje dwóch dłuższych nici β , które są do siebie równoległe. Wreszcie rys. 20 ilustruje trzecią strukturę drugorzędową – skręt. Struktura ta dotyczy aminokwasów 62 – 65.



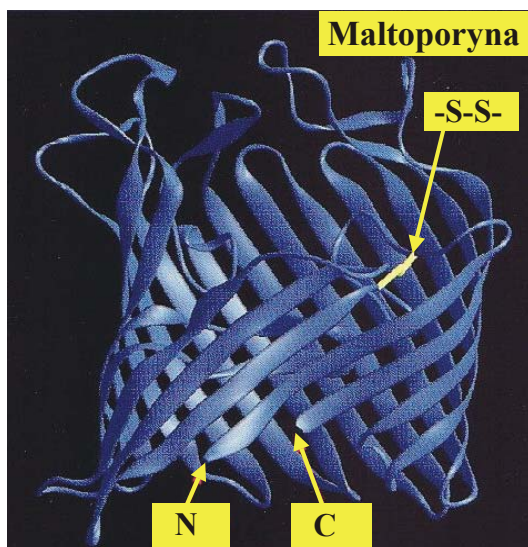
Rys. 19. Trzy reprezentacje dwóch nici β w białku 2CI2.



Skręt w 2CI2

Rys. 20. Trzy reprezentacje skrętu w białku 2CI2 dla aminokwasów w pozycjach 62 –65.

Białko 2CI2 jest globularne. Jeśli chodzi o białka membranowe, to w roku 2001 PDB miał w swoich zbiorach tylko 20 takich białek. Białek membranowych jest w przyrodzie mniej więcej tyle, co globularnych, ale można je wyizolować tylko w specjalnie wybranych detergentach. Z punktu widzenia przemysłu farmaceutycznego są one ważniejsze niż białka globularne, gdyż aż 2/3 obiektów działania leków na poziomie molekularnym to białka membranowe. Rys. 21 przedstawia schematyczną reprezentację białka membranowego, zwanego maltoporyną, uzyskaną ze szwajcarskiej bazy danych SWISSPROT, o adresie www.expasy.ch/sprot/. Białko to wygląda jak rurkowy kanał. Jest ono zbudowane z dwu nici β , które spięte są mostkiem dwusiarczkowym (-S-S-) zaznaczonym na żółto.



Rys. 21. Ilustracja struktury białka membranowego – maltoporyny. Symbole N i C oznaczają odpowiednie zakończenia łańcucha.

G. Przewidywanie struktury

Zrozumienie i przewidzenie sposobu zwinienia się białka na podstawie sekwencji aminokwasów stanowi jeden z najtrudniejszych i najważniejszych problemów współczesnej obliczeniowej biologii molekularnej. Istniejące metody przewidywania struktury można podzielić na dwie klasy. Pierwsza to metody oparte na porównywaniu sekwencji o nieznannej strukturze z biblioteką wzorców zbudowanych na podstawie struktur znanych. Druga to metody *ab initio*, których celem jest określenie struktury natywnej poprzez szukanie globalnego minimum energetycznego w przestrzeni konformacyjnej. Metody *ab initio* są szczególnie pożądane w sytuacji, gdy badana sekwencja ma niski stopień podobieństwa z sekwencjami o poznanych strukturach. Wbrew swej nazwie, większość metod *ab initio* korzysta z informacji uzyskanych z białkowych baz danych.

Skuteczność metod przewidywania struktury testuje się co dwa lata w konkursie zwanym CASP (Critical Assessment of techniques for protein Structure Prediction; adres: www.predictioncenter.llnl.gov), zorganizowanym po raz pierwszy w 1994 roku przez Moulta (University of Maryland). Konkurs ten polega na porównaniu wyników niezależnie prowadzonych prac doświadczalnych i teoretycznych nad tym samym zbiorem sekwencji (np. nad około 100-aminokwasowymi fragmentami białek). Grupa Bakera z Seattle należy do mistrzów konkursu, osiągając sukces dla około 75% układów. Ich metoda polega na składaniu konformacji z fragmentów znanych struktur z bazy danych. Te fragmenty wyznaczone są na podstawie lokalnego podobieństwa sekwencji do sekwencji badanej, gdzie zakres podobieństwa jest określony na podstawie analizy statystycznej.

Z kolei, podejście grupy Levitta jest dwustopniowe i polega na określeniu możliwych struktur drugorzędowych, a następnie na znalezieniu najlepszego upakowania tych struktur na uproszczonej sieci. Scheraga i jego współpracownicy (w tym Liwo i Pillardy z Polski) używają technik związanych z minimalizacją energii w dużej przestrzeni konformacji. Zaczynają od modelu szkieletu łączącego atomy węgla C^{α} , a potem przechodzą do pełnego modelu atomowego. A. Koliński i J. Skolnick rozpatrują zdyskretyzowane konformacje białek i nakładają na nie więzy dotyczące przewidywań struktur drugorzędowych oraz te, które wynikają z porównywania sekwencji z sekwencjami z bazy danych.

Wszystkie te metody w dużej mierze zależą sposobu interpretacji informacji zawartych w bankach danych. Próbą określania struktury bez informacji z bazy danych jest procedura zwana LINUS, którą wypracowali Rose i Srinivasan w Johns Hopkins University w Marylandzie. W procedurze tej ustala się skłonności aminokwasów do przynależenia do określonej struktury drugorzędowej na podstawie fizycznych właściwości łańcuchów bocznych i preferencji kątowych, jakie istnieją w białkach i jakie są związane z brakiem nachodzenia łańcuchów bocznych na siebie (więzy steryczne). Procedura ta nie polega na minimalizacji energii.

H. Białka z perspektywy fizyki statystycznej

Wiele kluczowych idei w nauce o białkach pojawiło się dzięki spojrzeniu na nie z perspektywy fizyki statystycznej. Problem zwijania jest ważnym przykładem ogólnej klasy zagadnień, dla których sprzeczne ze sobą warunki prowadzą zazwyczaj do wielodolinowego krajobrazu energetycznego, tak jak w przypadku szkieł spinowych. (*zob. też* → Układy nieuporządkowane). Zasada minimalnej frustracji strukturalnej (Wolynes) i pojęcie krajobrazu energii swobodnej z „lejką zwijania”, a więc takiego, w którym jedna dolina dominuje, okazały się być cenne dla zrozumienia i przewidywania termodynamicznych oraz kinetycznych właściwości białek i pozwoliły utworzyć obraz procesu zwijania. Symulacje dynamiki molekularnej polegające na numerycznym rozwiązywaniu równań ruchu dla atomów, są obecnie naturalnym narzędziem badania białek. Na początku lat 90-tych symulacje dynamiki molekularnej mogły eksplorować skale czasu rzędu nanosekund a więc rzędy wielkości za krótkie, by badać pełny przebieg procesu zwijania. Obecnie skale rzędu mikrosekundy stały się osiągalne ale pozwalają one jedynie na śledzenie pojedynczej trajektorii w ograniczonych obszarach przestrzeni fazowej. Szczegółowa charakterystyka jest nadal ograniczona do nanosekund.

I. Modele zredukowane

W fizyce, a zwłaszcza w mechanice statystycznej, często stosowana jest procedura renormalizacji, w której eliminuje się stopnie swobody uznane za nieważne i wprowadza efektywne oddziaływania pomiędzy istotnymi stopniami swobody. Ten sposób myślenia stał u podstaw wprowadzenia modeli zredukowanych, czy gruboziarnistych, w których stopnie swobody aminokwasu redukuje się do trzech, a więc jak dla przypadku jednej efektywnej

cząstki, umieszczonej w położeniu węgla C^α. Efektywna energia sekwencji w danej konformacji nie zawiera wtedy wewnętrznych stopni swobody dla aminokwasów ani tych, które dotyczą wody.

Pierwsze tego rodzaju modele pojawiły się pod sam koniec lat 80-tych (Dill) i dotyczyły krótkich modeli na sieci z dwu-literowym alfabetem aminokwasów: hydrofobowe i hydrofilowe, z efektywnym przyciąganiem pomiędzy „literami” hydrofobowymi. Takie proste modele potrafiły uchwycić istotę zwijania białek, a jednocześnie pozwalały na bardzo dokładne lub czasami ściśle scharakteryzowanie równowagowych i kinetycznych właściwości układu. Służyły one więc często do testowania teorii dotyczących białek, np. tych dotyczących właściwości krajobrazów energetycznych heteropolimerów, które się zwijają dobrze i są termodynamicznie stabilne (modele białek) oraz tych, które się zwijają źle (modele sekwencji przypadkowych).

Istotnym elementem uczynienia postępu w problemach zwijania i projektowania białek jest wydedukowanie efektywnych potencjałów oddziaływań pomiędzy aminokwasami. Można szukać rozwiązania tego zadania poprzez statystyczną analizę danych dotyczących doświadczalnie określonych struktur białkowych. Na przykład w 1985 roku Miyazawa i Jernigan określili efektywne oddziaływania na podstawie częstości występowania kontaktów zadanych par aminokwasów (ij) i przypisanie tym częstościom czynników boltzmannowskich, $\exp(-E_{ij}/k_B T)$, gdzie T odpowiada temperaturze pokojowej. Tak określone energie oddziaływań, E_{ij} , mają jednak charakter tylko jakościowy.

Jedną ze strategii uzyskania takich efektywnych oddziaływań opiera się na obserwacji, że dla zadanej sekwencji białkowej poprawne potencjały powinny rozpoznawać stan natywny jako posiadający niższą energię niż inne próbne konformacje o tej samej długości (Banavar, Maritan). Te próbne konformacje zadane są poprzez fragmenty białek z banku białek. Takie próbne struktury mogą nie być fizyczne dla pewnych sekwencji z powodu ograniczeń sterycznych i w dodatku zwykle nie współzawodniczą one energetycznie ze stanem natywnym w znaczący sposób. Praktycznym sposobem ulepszenia metody jest rozważenie próbnego początkowego zestawu oddziaływań, i następnie znalezienie odpowiadających im konformacji o niskich energiach. W następnym kroku parametry potencjałów modyfikuje się tak, by nienatywne stany o niskich energiach zwiększały swe energie w stosunku do

konformacji natywnej. Ten proces powtarza się wielokrotnie aż stany natywne wielu istotnie różnych od siebie białek („niehomologicznych”) staną się jednocześnie w pełni stabilne.

Jeszcze dalej idącą ideę dotyczącą zredukowania opisu białek zaproponował w latach 90-tych Eisenberg. Otóż informacje o strukturze trójwymiarowej białka można odwzorować w jednowymiarowym ciągu danych. Każdemu aminokwasowi można bowiem przypisać informację o sytuacji środowiskowej w jakiej się znajduje. Zwykle sytuację tę charakteryzuje się przez rodzaj struktury drugorzędowej oraz stopień wyeksponowania łańcucha bocznego, tzn. czy jest on schowany, czy odkryty, co jest zazwyczaj miarą hydrofobowości aminokwasu. Przegląd bazy danych białkowych pozwala określić częstości, z jakimi każdy z 20 aminokwasów znajduje się w sytuacjach zdefiniowanych powyżej. Parametry te wprowadzają jednociałowy opis białka (nie rozważa się tu oddziaływań między parami aminokwasów), który idealnie nadaje się do badań porównawczych białek i do określania stopnia podobieństwa pomiędzy sekwencjami w zadanych strukturach. Nie jest to jednak program właściwy do badania np. kinetyki związania.

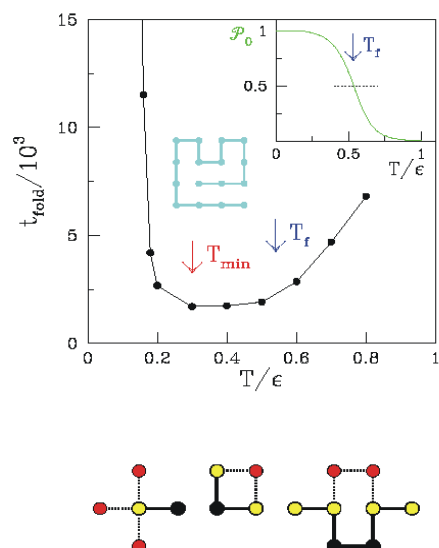
Testowanie statystyczne wyznaczonych jednociałowych parametrów Eisenberga prowadzi do wniosku, że prawdziwe stany natywne są zgodne z parametrami Eisenberga w około 69% białek. Parametry te można jednak wyznaczyć lepiej wprowadzając techniki tzw. sieci neuronowych. Techniki te pozwalają „nauczyć się” właściwych parametrów na podstawie analizy „treningowego” zbioru kilkuset białek (Chang, Cieplak, Dima, Maritan, Banavar). Sukces zidentyfikowania w testach stanu natywnego zwiększa się wtedy do 90%. W procedurze uczenia się parametry dobiera się tak, żeby stany natywne w zbiorze treningowym były dużo bardziej stabilne niż struktury próbne (fragmenty – o tej samej liczbie monomerów – struktur natywnych innych białek). Parametry finalne mają interpretację fizyczną związaną z ich preferencjami do przebywania w określonych środowiskach. Na przykład aminokwasy hydrofobowe (oprócz proliny) oraz cysteina są częściej obecne we wszystkich strukturach drugorzędowych i są ustawione tak, że są bardzo mało eksponowane na wodę. Najbardziej eksponowane miejsca w strukturze są najchętniej obsadzone przez kwasową lizynę, itd.

J. Modele Go

Niemal w każdej dyscyplinie nauki istnieją zagadnienia, które mogą być bardzo skomplikowane, ale w wielu zastosowaniach wystarczy rozważyć ich proste modele, jeśli ujmują one cechy najistotniejsze dla rozpatrywanego zastosowania. Na przykład w przypadku układów magnetycznych pierwszego wglądu w ich właściwości dostarcza model Isinga. Dla białek idea najprostszego sposobu modelowania została sformułowana w Japonii w 1976 i 1981 r. Przez Go. Modele klasy Go opierają się na wielu doświadczalnych obserwacjach, świadczących o tym, że o niemal wszystkich właściwościach białek decyduje ich struktura natywna i to nawet wtedy, gdy białko jest w konformacjach rozwiniętych. Kontakty występujące w strukturze natywnej białka powinny więc pełnić wyróżnioną rolę w opisie teoretycznym białka. Zrealizować ten program można przez taki dobór potencjałów oddziaływań między aminokwasami, żeby w stanie natywnym realizowane było minimum energetyczne układu. W konformacjach wzbudzonych pojawiają się również kontakty nienatywne i należy je uznać za dużo słabsze, np. czysto odpychające, co zapobiega zapętlaniu się szkieletu polimeru ze sobą. Przykładem wyboru potencjału dla kontaktu

natywnego jest potencjał Lennarda-Jonesa: $4\varepsilon \left[\left(\frac{\sigma_{ij}}{r} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{r} \right)^6 \right]$ gdzie r oznacza odległość

między parą aminokwasów (i, j) , ε charakterystyczną skalę energii, a parametr odległości σ_{ij} dobiera się tak, by minimum potencjału odpowiadało odległości między atomami węgla C^α wyznaczonej doświadczalnie. Okazuje się, że tak uproszczony model daje bardzo podobne wyniki (Cieplak, Hoang, Robbins) do pełnoatomowej symulacji w badaniach mechanicznego rozciągania globularnego fragmentu („domeny”) tytyny – gigantycznego białka odpowiedzialnego za właściwości elastyczne mięśni (Lu, Isralewitz, Krammer, Vogel, Schulten). W badaniach rozciągania bada się np. wykres siły przeciwstawiającej się rozciąganiu w funkcji przemieszczenia końca białka.



Rys. 22. Definicja i właściwości modelu Go na dwuwymiarowej sieci – dokładniej omówione w tekście.

Rys. 22 przedstawia sieciową wersję modelu Go. Jest to model – zabawka. Składa się on z 16 połączonych ze sobą koralików poruszających się na sieci kwadratowej. Konformacja przedstawiona na rysunku jest tylko jedną z ponad 800 tys. możliwych i jedną z 37, które są maksymalnie zwarte – jest ułożona na sieci 4 x 4. Przyjmijmy, że wykreślona konformacja ma odpowiadać najniższej energii a więc jest analogiem struktury białka wyznaczonej doświadczalnie. Niech koralik w prawym dolnym rogu odpowiada początkowi „białka”. Dla tego układu istnieje 9 kontaktów natywnych: 1 – 14, 2 – 15, 3 – 16, 5 – 16, 6 – 9, 8 – 11, 9 – 16, 10 – 13, 10 – 15. Przypisujemy im energię – ϵ . Pozostałe kontakty, np. 2 – 9, są nienatywne i im przypisujemy energię równą zero .

Ten układ jest na tyle krótki, że można ściśle numerycznie wyznaczyć sumę statystyczną i w szczególności wyznaczyć P_0 – równowagowe prawdopodobieństwo zdarzenia, że układ jest w stanie natywnym. P_0 jest z pewnością równe jedności dla $T = 0$ i zeru dla wysokich T . Temperatura, dla której P_0 przechodzi przez wartość $\frac{1}{2}$ oznaczana jest symbolem T_f . Jest to temperatura zwijania i jest ona miarą termodynamicznej stabilności układu. W realistycznych modelach oczekivalibyśmy, że T_f powinno być rzędu 50 – 60° C. Temperatura zwijania nic nie „mówi” na temat dynamiki układu. W klasycznych modelach pozasieciowych dynamikę wyznaczają równania Newtona, w których siły wynikają z potencjałów oddziaływania między aminokwasami. Można też uwzględnić wpływ rozpuszczalnika, który w szczególności określa temperaturę układu. Na sieci nie ma równań Newtona i możliwe są tylko ruchy dyskretne. Dynamikę trzeba tu zatem zdefiniować

dodatkowo. Przypuśćmy, że dopuszczamy tylko takie ruchy, jakie są przedstawione w dolnym panelu rysunku: koralik oznaczony kolorem czarnym może przeskoczyć na miejsce zaznaczone kolorem czerwonym, jeśli nie jest ono zajęte. Jest to więc dynamika typu Monte Carlo. Dozwolony ruch jest na pewno realizowany, jeśli prowadzi do obniżenia energii. Jeśli następowaloby podwyższenie energii, to ruch jest akceptowany z prawdopodobieństwem boltzmanowskim, a więc jest w ten sposób kontrolowany przez temperaturę.

Centralna część rysunku przedstawia wykres czasu zwijania w funkcji temperatury. Zdefiniowany jest on poprzez liczbę kroków Monte Carlo potrzebną do znalezienia się po raz pierwszy w stanie natywnym, jeśli konformacją początkową jest jakaś konformacja rozwinięta (wynik jest uśredniany po wielu takich konformacjach początkowych). Wykres ten ma kształt litery U. Czas zwijania jest długi dla dużych T , gdyż proces zwijania przypomina wtedy szukanie igły w stogu siana. Jest on również długi dla małych T , gdyż z powodu pojawienia się zjawisk szklistych układ trafia w lokalne minima energetyczne. Tak więc istnieje temperatura optymalna, T_{min} , (ogólniej warunki optymalne, jeśli by także rozważyć zmiany pH) przy której zwijanie jest najszybsze. Ten wykres w kształcie U jest bardzo typowy – pojawia się on również i w modelach pozasieciowych i prawdziwych białkach. Duża szybkość zwijania dla $T = T_{min}$ oznacza, że wtedy zwijanie się jest najbardziej składne i odpowiada optymalnej średniej kolejności ruchów.

Dla rozpatrywanego tu modelu Go o 16 monomerach T_f jest większe niż T_{min} . Oznacza to, że dla T bliskiego T_f układ jest równowagowo blisko stanu natywnego, a efekty szkliste nie są jeszcze obecne. Jest to sytuacja analogiczna do tego, czego oczekuje się w białkach. Mówimy, że taki ten układ zwija się dobrze. Dla układów, które nie są modelami białek, a przypadkowych sekwencji aminokwasów, T_f jest znacznie niższe niż T_{min} : przy schładzaniu układ pułapkuje się zanim znajdzie się blisko stanu natywnego. Takie układy zwijają się źle. Można pokazać (Cieplak, Hoang), że dla dostatecznie długich polimerów (na sieci i poza siecią) nawet modele Go przestają zwijać się dobrze. Istnieje więc granica funkcjonalności białka, która jest związana z jego rozmiarami.

K. Kolejność zdarzeń w zwijaniu i rozciąganiu białek

W warunkach optymalnych zwijanie się białek polega na optymalnym „składaniu” jego fragmentów. Np. α -helisa zwija się od swych końców do środka. Spinki β – dwie

antyrównoległe nici β połączone skrętem – zwijają się poczynając od skrętu. Pełne białka najczęściej najpierw budują kontakty krótkozasięgowe, gdzie zasięg mierzony jest wzdłuż szkieletu, a dopiero na samym końcu spinające kontakty długozasięgowe. Odejście od warunków optymalności, np. odejście od temperatury T_{min} , powoduje zaburzenie tej kolejności i wydłuża czasy zwijania. Tuż przed końcem XX wieku rozpoczęto badanie dużych białek (np. około 300-domenowej tytyny, w której każda domena ma około 100 aminokwasów) metodami mechanicznego rozciągania za pomocą mikroskopu siły atomowej, czy tzw. szczypczyków optycznych. Analiza modeli teoretycznych wskazuje na to, że kolejność zrywania kolejnych kontaktów na ogół wcale nie jest odwrotna do tej, jaka jest realizowana w procesie zwijania.

L. Inżynieria białkowa

Inżynieria białkowa udostępniła nowe doświadczalne narzędzie badania kinetyki zwijania się białek. Metoda ta polega na wykonywaniu mutacji, czyli zamianie aminokwasu, w różnych miejscach łańcucha białkowego i badaniu wpływu takiej zmiany na stabilność i czasy zwijania się. Najbardziej znaną w tej dyscyplinie grupą badawczą jest zespół z Cambridge, którym kieruje Fersht.

Wyniki tych doświadczeń wskazują na to, że być może 20-literowy alfabet aminokwasów nie jest funkcjonalnie konieczny. Właściwości pewnego zbioru zbadanych białek nie ulegają wielkim zmianom, jeśli w wyniku podstawień zbudować białka tylko z 5 – 6 wybranych aminokwasów.

Drugi aspekt dotyczy czasów zwijania. Podstawienia mogą ten czas zarówno skrócić, jak i wydłużyć w porównaniu z czasami zwijania białek naturalnych. Możliwość skrócenia czasów zwijania sugeruje, że białka naturalne, choć zwijają się szybko, nie są optymalne pod względem kinetycznym. Trzeci aspekt dotyczy zrozumienia „wartości ϕ ” przy zamianie (mutacji) aminokwasów. Otóż przejście od stanu rozwiniętego do zwiniętego w białku globularnym polega na ustanawianiu coraz większej liczby kontaktów natywnych. Interpretacja doświadczeń podstawieniowych w krótkich białkach zakłada obraz dwustanowy (poszczególne molekuly białek w roztworze są albo w stanie zwiniętym albo rozwiniętym), a samo przejście jest podobne do reakcji chemicznej, w której następuje konwersja jednego stanu w drugi. Ta konwersja jest zazwyczaj ograniczona przez jakieś „wąskie gardło” zwane

stanem przejścia. Wartość ϕ jest zdefiniowana jako stosunek mutacyjnej zmiany bariery energetycznej, efektywnie opisującej czas zwijania, do zmiany w energii swobodnej stabilności białka (jest to zmiana w energii efektywnie opisującej P_0). W najprostszym scenariuszu wartości ϕ dla zwijania i rozwijania sumują się do jedności. Wartości 0 i 1 odpowiadałyby brakowi oddziaływania lub pełnemu oddziaływaniu zmutowanego miejsca w stanie przejściowym.

Inna perspektywa spojrzenia na przejście stan rozwinięty – stan zwinięty zauważa analogię do przejścia fazowego pierwszego rodzaju. Kinetyczny mechanizm zwijania polegałby więc na nukleacji. Pojęcie zarodka zwijania powinno się wiązać ze stanem przejścia. Powinna to być pierwsza stabilna struktura, która się pojawia tuż po minięciu stanu przejścia. Czego miarą są tak naprawdę mierzone wartości ϕ ? Czy mutacje powodują przeskoki pomiędzy różnymi możliwymi ścieżkami zwijania? Czy obraz dwustanowy jest prawdziwy? Są to pytania, które wkrótce powinny doczekać się odpowiedzi.

M. Proteomika

Po odcyfrowaniu genomu ludzkiego następnym celem stało się określenie ludzkiego proteomu – przedstawienie listy struktur i właściwości wszystkich białek, jakie mogą istnieć w organizmie ludzkim. Termin "proteom" został po raz pierwszy sformułowany przez grupę szwajcarskich biochemików z ośrodka genewskiego (Hôpital Universitaire de Genève) w 1994 roku. Istnieje ścisły związek pomiędzy genomem (zbiorem wszystkich genów) i proteomem (zbiorem wszystkich białek kodowanych przez dany genom). Należy zwrócić jednak uwagę na to, że choć genom jest niezmienny dla danego osobnika, to proteom może się zmieniać. Najprostszym przykładem może być niezmienny genom dla danego gatunku owada oraz opowiadające mu, zdecydowanie różne, proteomy dla postaci larwalnej i dla dorosłej. Gromadzeniem informacji dotyczącej identyfikacji struktur białkowych, rozpoznawania i selekcjonowania białek oraz badaniem ich funkcji zajmuje się proteomika.

Są dwie kategorie proteomiki. Pierwsza zajmuje się klasyfikowaniem białek polegającym na zidentyfikowaniu i scharakteryzowaniu wszystkich białek i znalezieniu różnic między białkami z tkanek normalnych i chorych. Ta związana z medycznymi zastosowaniami proteomika stwarza nadzieję na opracowanie metod pozwalających na szybszą diagnozę oraz

postęp w leczeniu wielu chorób. Drugą dziedziną proteomiki jest proteomika funkcjonalna, polegająca na wytwarzaniu nowych białek i badaniu ich funkcji.

N. Techniki badania struktury białek

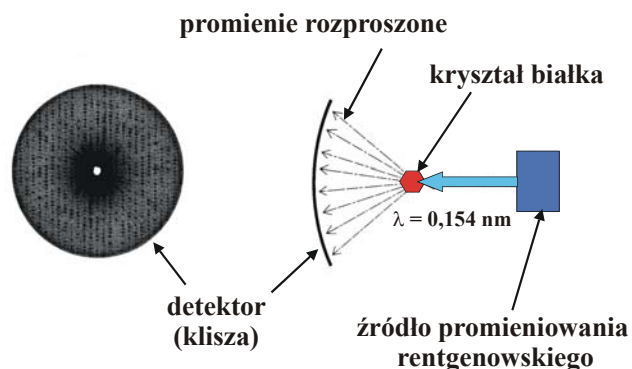
Współczesna biologia strukturalna oraz biofizyka białek wykorzystują wiele technik doświadczalnych. Wydaje się jednak, że w dotychczasowym poznaniu trójwymiarowych struktur białek największą rolę odegrała rentgenowska analiza strukturalna. Drugą podstawową techniką badania struktur przestrzennych cząsteczek białkowych staje się obecnie technika jądrowego rezonansu magnetycznego (skrót angielski NMR i polski JMR). Te techniki wspomagane są przez cały szereg innych metod, z których najważniejszymi są: metody optyczne (spektrometria fluorescencyjna i absorpcyjna oraz dichroizm kołowy), metody innych odmian rezonansów magnetycznych, takich jak, elektronowy rezonans paramagnetyczny (EPR) oraz podwójny jądrowo-elektronowy rezonans magnetyczny (ENDOR), czy też ostatnio wprowadzona do badań pojedynczych molekuł technika mikroskopii sił atomowych (AFM) wspomagana laserową techniką tzw. szczypczyków optycznych.

Najistotniejsze cechy dwóch podstawowych technik badania struktury białek, tj. rentgenowskiej analizy strukturalnej oraz jądrowego rezonansu magnetycznego zostaną omówione poniżej.

O. Rentgenowska analiza strukturalna

Dyfrakcja promieni rentgenowskich dostarcza informacji o trójwymiarowej strukturze tych białek, które udało się zidentyfikować, wyizolować, a następnie wyhodować z nich kryształy odpowiednio dobrej jakości. Jednym z pierwszych białek, które udało się otrzymać w formie wysokiej jakości kryształów oraz zbadać za pomocą dyfrakcji promieni rentgenowskich była insulina (rok 1924). Dzięki znajomości trójwymiarowej struktury przestrzennej oraz poznaniu sekwencji aminokwasów w tym białku (rok 1958), insulina była też pierwszym ludzkim białkiem, które udało się otrzymać drogą całkowicie syntetyczną (rok 1979). Nastąpiło to więc na długo przed poznaniem odpowiedniej sekwencji nukleotydów kodujących insulinę w ludzkim genomie. Zakres badań prowadzonych za pomocą techniki rentgenowskiej stale się powiększa. Poza prostymi białkami w postaci krystalicznej, bada się

także duże asocjaty białek, np. rybosomy, białkowy rdzeń nukleozymu, kompleksy białko-białko (w szczególności białko-przeciwciało) lub też kompleksy białko-DNA.

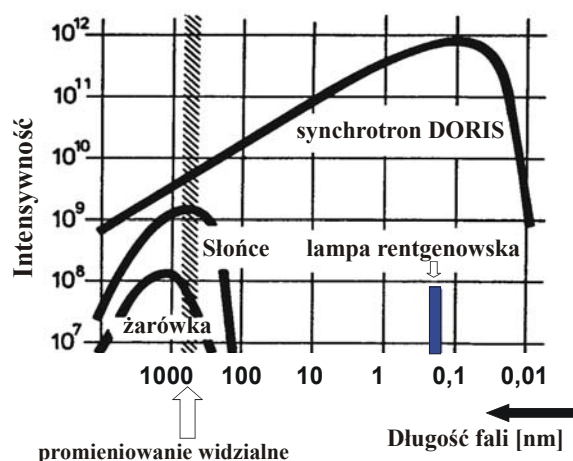


Rys. 23. Schemat aparatury stosowanej w rentgenowskiej analizie strukturalnej. Naświetlona klisza (lewa strona rysunku) przedstawia tzw. lauegram dla monokryształu hemoglobiny.

Odkryte przez Roentgena w 1895 roku promieniowanie (zwane także promieniowaniem X) wytwarzane jest obecnie w urządzeniach zwanych lampami rentgenowskimi. W lampach takich następuje termoemisja elektronów z katody. Są one następnie przyspieszane w obszarze między katodą i anodą za pomocą wysokiego napięcia ($\sim 100 \text{ kV}$). Elektrony o tak dużej energii bombardują anodę, a źródłem promieniowania X są radiacyjne przejścia pomiędzy wewnętrznymi powłokami elektronowymi atomów wchodzących w skład materiału anody. Długości fal emitowanych przez lampy rentgenowskie zawierają się w przedziale od 10^{-11} do 10^{-9} m. W szczególności, charakterystyczne promieniowanie rentgenowskie o długości fali $\sim 10^{-10}$ m znajduje zastosowanie w analizie strukturalnej, gdyż typowe odległości międzyatomowe zarówno w ciałach stałych, jak i w kryształach białek, są właśnie tego rzędu ($\sim 0,1 \text{ nm}$). W praktyce wykorzystuje się najczęściej promieniowanie rentgenowskie o długościach fal od 0,02 do 0,25 nm, co odpowiada energiom z przedziału od 60 do 5 keV.

Rozdzielczość rentgenowskiej analizy strukturalnej stale się poprawia i pozwala na precyzyjne określenie położenia zdecydowanej większości atomów w danej molekułe białka. Dla wielu wykryzalizowanych białek rozdzielczość ta jest lepsza niż 0,2 nm, co odpowiada prawie 1/2 długości wiązania peptydowego. Coraz częściej do badań strukturalnych białek używane jest promieniowanie synchrotronowe wytwarzane w postaci silnie koherentnej wiązki o bardzo dużym natężeniu. Typowy rozkład widmowy źródła promieniowania synchrotronowego pokazany jest na **rys. 24**. W odróżnieniu od klasycznych lamp rentgenowskich, źródła synchrotronowe wytwarzają promieniowanie elektromagnetyczne o

bardzo szerokim spektrum, pokrywając zakres od podczerwieni, poprzez zakres promieniowania widzialnego i ultrafioletu próżniowego, aż po tzw. miękkie i twarde promieniowanie X. Tak szeroki zakres promieniowania odpowiada przedziałowi energii od około 0,1 eV do około 1000 keV. Należy zwrócić uwagę na znacznie wyższe natężenie wiązki oraz na szerszy zakres widmowy promieniowania synchrotronowego w porównaniu z tradycyjnymi źródłami promieniowania elektromagnetycznego. Praktycznie w całym swym dostępnym zakresie promieniowanie synchrotronowe jest kilka rzędów wielkości wyższe niż otrzymywane za pomocą innych źródeł promieniowania, włączywszy w to klasyczną lampę generującą promieniowanie rentgenowskie.



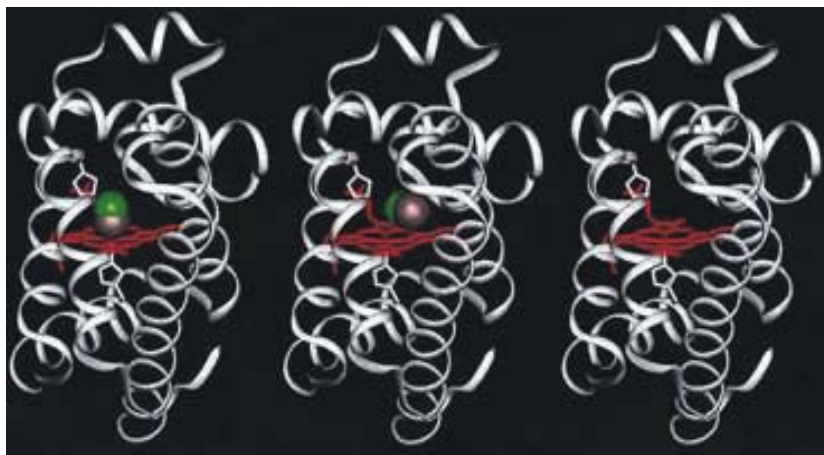
Rys. 24. Rozkład widmowy źródła promieniowania synchrotronowego dla synchrotronu Doris (Double-Ring Storage Device) w ośrodku Deutches Elektronen – Synchrotron (DESY) w Hamburgu. Intensywność promieniowania jest tu rozumiana jako liczba fotonów wyemitowanych w określonym kącie bryłowym w czasie jednej sekundy.

Promieniowanie synchrotronowe wytwarzane jest w pierścieniowych akceleratorach naładowanych cząstek, takich jak elektrony lub pozytony. W systemach tych cząstki poruszają się w bardzo wysokiej próżni po orbitach kołowych o średnicach rzędu kilkudziesięciu metrów z prędkościami bliskimi prędkości światła. Zakrzywienie toru elektronów możliwe jest dzięki zastosowaniu pól magnetycznych o silnym natężeniu (polega to na wykorzystaniu siły Lorentza zakrzywiającej tor naładowanej cząstki poruszającej się w kierunku prostopadłym do linii sił pola magnetycznego). Na przykład, w synchrotronie DORIS, o końcowej energii elektronów rzędu 5,6 GeV, dla zakrzywiania toru elektronów stosowane jest pole magnetyczne o natężeniu 1 T. Ze względu na zamkniętą trajektorię ruchu naładowanych cząstek w synchrotronie pierścieniowym, elektrony doznają przyspieszenia

dośrodkowego, któremu towarzyszy wypromieniowanie energii elektromagnetycznej. Maksymalna energia wyemitowanego promieniowania, E_{\max} , związana jest z promieniem krzywizny orbity i można ją wyrazić wzorem:

$$E_{\max} = \frac{hc}{R} \left(\frac{E}{m_e c^2} \right)^3$$

gdzie m_e oznacza masę elektronu, h – stałą Plancka, c – prędkość światła, E energię wiązki, zaś R opowiada promieniowi krzywizny trajektorii elektronów. Jak wynika z powyższej zależności, dla promienia krzywizny około kilkudziesięciu metrów i energii wiązki około kilku GeV, wypromieniowana energia E_{\max} wynosi około kilkadziesiąt keV. Zastosowanie takich źródeł promieniowania o natężeniu wiązki około trzy rzędy wielkości większej niż w tradycyjnych wysokonapięciowych lampach rentgenowskich pozwala na znaczne skrócenie czasu wykonywania analizy dyfrakcyjnej kryształów białka. Dzięki dużej jasności i silnej zbieżności wiązki promieniowania X wytwarzanej w źródłach synchrotronowych, możliwe jest także otrzymywanie informacji kinetycznych. Analiza rentgenowska pozwala więc na wykonywanie eksperymentów krystalografii rozdzielczej w czasie. Ta technika umożliwia przeprowadzanie bezpośredniej analizy strukturalnej przejściowych struktur białka w procesach dynamicznych w warunkach temperaturowych zbliżonych do temperatury fizjologicznej. Tego typu podejście pozwala na otrzymanie informacji o dynamicznych zmianach struktur konformacji białka z dokładnością około 0,18 nm, z rozdzielczością czasową rzędu 1 ns. Na **rys. 25** przedstawiono wynik doświadczenia, w którym śledzono zmiany konformacji molekuly mioglobiny w procesie odłączania się od niej cząsteczki tlenku węgla (CO). Proces ten zapoczątkowany został impulsem laserowym, który dostarczył wzbudzenia elektronowego grupie prostetycznej mioglobiny (żelazo-protoporfiryna). W wyniku tego wzbudzenia, molekula CO dysocjuje, a proces ten może być śledzony w czasie rzeczywistym. Poszczególne etapy procesu śledzone były w odstępach czasu 150 ps odpowiadającym pojedynczym rozbłyskom promieniowania synchrotronowego. Całkowity proces dysocjacji następował w czasie dziesięć razy dłuższym.



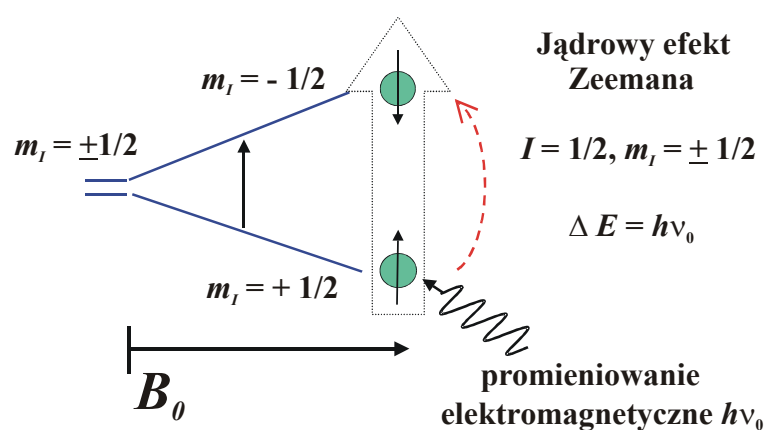
Rys. 25. Obserwacja dysocjacji molekuly CO z mioglobiny. Eksperyment wykonany przez Moffata w Europejskim Ośrodku Promieniowania Synchrotronowego ESRF w Grenoble.

P. Jądrowy rezonans magnetyczny

Badania białek za pomocą rentgenowskiej analizy strukturalnej wspomagane są obecnie przez technikę jądrowego rezonansu magnetycznego (NMR). NMR, w odróżnieniu od rentgenowskich badań prowadzonych na kryształach, pozwala na poznanie trójwymiarowej struktury białek w środowisku bardziej zbliżonym do naturalnego, czyli w roztworach. Ważną zaletą NMR jest także fakt, że ta technika spektroskopowa posługuje się promieniowaniem elektromagnetycznym o stosunkowo niskich energiach od około $1,7 \times 10^{-7}$ eV do około $3,7 \times 10^{-6}$ eV. Ten przedział energii odpowiada falom radiowym o częstościach z zakresu 40-900 MHz. Stosowanie promieniowania elektromagnetycznego o tak niskiej energii w najmniejszym stopniu nie naraża struktury białka na uszkodzenie. Możliwość wygenerowania defektów strukturalnych w badanym białku jest natomiast jednym z podstawowych mankamentów rentgenowskiej analizy strukturalnej wykorzystującej wysokoenergetyczne promieniowanie X.

Metoda NMR wykorzystuje fakt, że część atomów z których zbudowane jest białko wykazuje magnetyzm jądrowy. W szczególności, jądra atomowe zawierające nieparzystą liczbę protonów lub neutronów obdarzone są niezerowym momentem pędu $\mathbf{K} = \hbar \mathbf{I}$, gdzie \mathbf{K} oznacza moment pędu, $\hbar = h/2\pi$, a \mathbf{I} jest spinem jądrowym. Jądra takie wykazują zatem niezerowy moment magnetyczny $\boldsymbol{\mu}$, który może być wyrażony wzorem $\boldsymbol{\mu} = \gamma \hbar \mathbf{I}$, gdzie γ oznacza czynnik giromagnetyczny dla danego jądra. Jeżeli taki układ spinów jądrowych umieścimy w silnym zewnętrznym polu magnetycznym \mathbf{B}_0 , nastąpi uporządkowanie jądrowych momentów magnetycznych wzdłuż kierunku pola. Zgodnie z jednym z

podstawowych praw fizyki (doświadczenie Sterna i Gerlacha z 1923 roku), momenty magnetyczne jąder ustawią się „równoległe” albo „antyrównoległe” do kierunku pola. Dla jąder atomów wodoru ^1H (protonów), o jądrowym spinie $I = 1/2$, będzie to odpowiadało dwóm wartościom magnetycznej liczby kwantowej $m_I = +1/2$ oraz $m_I = -1/2$. W ogólności, w zewnętrznym polu magnetycznym, poziomy energetyczne jąder rozszczepiają się na $(2I + 1)$ podpoziomów różniących się energią $\Delta E = -\gamma \hbar B_0 \Delta m$, gdzie Δm opowiada różnicy wartości odpowiednich magnetycznych liczb kwantowych m_I . Pojawienie się przerwy energetycznej ΔE między poziomami o różnych jądrowych liczbach magnetycznych w zewnętrznym polu magnetycznym nosi nazwę jądrowego zjawiska Zeemana, a odpowiednie poziomy zwane są poziomami zeemanowskimi. W określonych warunkach doświadczalnych jądrowy układ poziomów zeemanowskich może absorbować energię dostarczoną z zewnątrz. Takie warunki doświadczalne stosowane są właśnie w technice NMR do detekcji jąder atomowych obdarzonych niezerowym spinem. Kwantowy obraz zjawiska jądrowego rezonansu magnetycznego dla najprostszego przypadku (dla jąder atomów wodoru, ^1H) przedstawiono na rys. 26.



Rys. 26. Kwantowy obraz zjawiska jądrowego rezonansu magnetycznego.

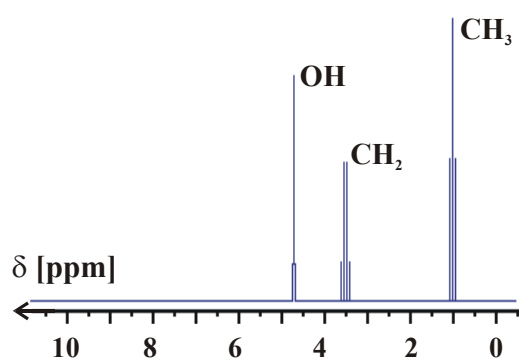
Próbka zawierająca protony umieszczona jest w polu B_0 . Jeśli układ taki naświetlimy dodatkowo promieniowaniem elektromagnetycznym o częstotliwości $\nu = \omega/2\pi = (\gamma B_0)/2\pi$ i o składowej magnetycznej B_1 spolaryzowanej w płaszczyźnie prostopadłej do pola zewnętrznego ($B_1 \perp B_0$ oraz $B_1 \ll B_0$), to wywołane zostaną przejścia pomiędzy sąsiednimi poziomami zeemanowskimi. Dla układu protonów (^1H) o jądrowym spinie $I = 1/2$ i dla dozwolonego przejścia $\Delta m = \pm 1$, warunek jądrowego rezonansu magnetycznego można

wyrazić zależnością $\Delta E = h \nu = \hbar \gamma B_0$. Jeśli taki układ protonów zostanie zanurzony w polu magnetycznym o natężeniu 1 T, to rezonansowa częstość promieniowania elektromagnetycznego wyniesie 42,58 MHz. Jest to zatem częstość z zakresu fal radiowych, nieco tylko niższa od pasma UKF.

Informacja strukturalna w metodzie NMR pochodzi z precyzyjnego pomiaru tzw. przesunięcia chemicznego (δ), które jest silnie zróżnicowane dla poszczególnych atomów wodoru lub ich ugrupowań w danym białku. Przesunięcie chemiczne jest miarą niewielkich różnic natężenia pola magnetycznego "wyczuwanego" przez dane jądro atomowe. Małe lokalne zmiany natężenia pola magnetycznego na poszczególnych jądrach atomowych są wynikiem ich ekranowania przez chmury elektronowe danego atomu i jego najbliższych sąsiadów. W wyniku takiego ekranowania efektywne pole magnetyczne w miejscu obserwowanego jądra jest nieco inne niż pole zewnętrzne. Stopień ekranowania, a więc i przesunięcie chemiczne dla danego jądra zależne są zatem od lokalnego rozkładu gęstości elektronów wokół niego. Prowadzi to do zróżnicowania częstości rezonansowych (ν) dla poszczególnych grup jąder i w rezultacie, przy ustalonym polu B_0 , w widmie NMR ich linie różnią się położeniem na osi częstości. Odległość danej linii od umownej linii wzorca odpowiada właśnie przesunięciu chemicznemu i może być zapisane w postaci:

$$\delta = \frac{V_{linii} - V_{wzorca}}{V_{wzorca}} \cdot 10^6$$

Przesunięcie chemiczne mierzone jest w jednostkach względnych (ppm) w stosunku do wzorcowej substancji, która najczęściej jest tetrametylosilan $(\text{CH}_3)_4\text{Si}$, w skrócie TMS. Przykładowe widmo NMR zarejestrowane dla próbki zawierającej roztwór alkoholu etylowego ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$) w wodzie pokazano na **Rys. 27**.



Rys. 27. Widmo NMR protonów (^1H) dla roztworu alkoholu etylowego w wodzie (pole magnetyczne $B_0 = 4,7$ T, częstość ~ 200 MHz). Wartość $\delta=0$ odpowiada położeniu linii rezonansowej wzorca (TMS).

Widmo NMR prostego związku chemicznego jakim jest C_2H_5OH zawiera trzy wyraźnie rozdzielone zespoły linii, które pochodzą od protonów znajdujących się w grupach CH_3 , CH_2 i OH . Widmo to ilustruje podstawową zaletę metody NMR: jej wysoką zdolność rozdzielczą. Na osi poziomej wykresu odłożone jest przesunięcie chemiczne, które dla poszczególnych grup protonów wynosi odpowiednio: 1, 3,6 oraz 4,7 ppm. Należy zwrócić uwagę na to, że rozszczepienie linii w ramach grup jest wynikiem dodatkowego oddziaływania, zwanego sprzężeniem spinowo-spinowym (dla różnych kombinacji oddziałujących ze sobą spinów jądrowych). Stosunek całkowitych natężeń linii NMR (rozumianych jako suma pól powierzchni linii w ramach danej grupy) dla protonów z grup CH_3 , CH_2 i OH wynosi odpowiednio 3 : 2 : 1, co dobrze odzwierciedla różnicę liczb protonów przynależnych do poszczególnych grup.

Dla bardziej skomplikowanych cząsteczek organicznych, pomiar przesunięcia chemicznego jest wygodnym sposobem badania ich struktury. Przykładowo, dla protonów grupy metylowej ($-CH_3$), δ często wynosi około 1 ppm w stosunku do wartości około 7 ppm dla protonów związanych z pierścieniem aromatycznym. Przesunięcie chemiczne dla większości jąder wodoru w białkach zawiera się pomiędzy 1 i 9 ppm. Dodatkowo, położone w pobliżu siebie jądra atomów wodoru mogą ze sobą oddziaływać magnetycznie w wyniku wspomnianego już wyżej sprzężenia typu spin-spin. Takie oddziaływanie, pomiędzy nierównoważnymi często jądrami atomów wodoru, występuje dla jąder blisko położonych, gdy ich wzajemna odległość nie jest większa niż trzy wiązania kowalencyjne. W wypadku pomiarów NMR molekuł białek oddziaływania spin-spinowe dostarczają dodatkowych ważnych informacji strukturalnych.

W badaniach NMR struktury niektórych białek wykorzystuje się także inne stabilne izotopy, takie jak, np. ^{13}C , ^{14}N , ^{31}P oraz ^{17}O . Istotne z punktu widzenia NMR własności izotopów pierwiastków najczęściej występujących w białkach zestawiono w **tabeli na rys. 28**.

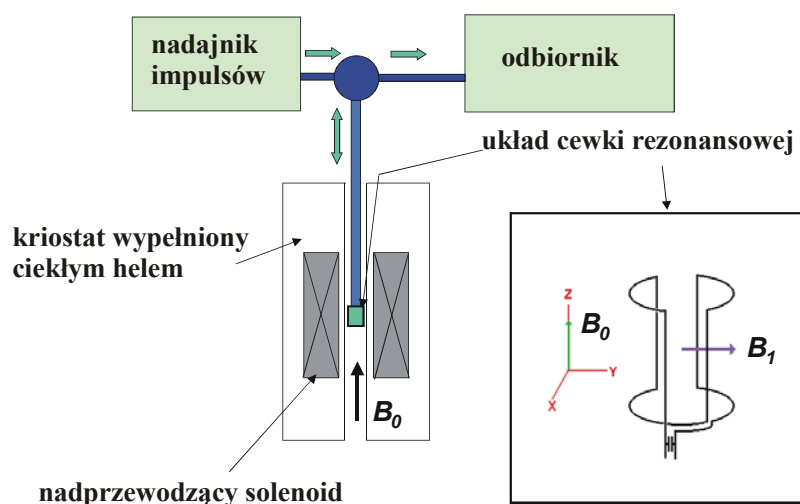
Własności izotopów o niezerowym spinie jądrowym pierwiastków najczęściej występujących w białkach

Izotop	Liczba niesparowanych protonów	Liczba niesparowanych neutronów	Spin jądrowy	Częstotliwość rezonansu jądrowego w polu $B_0 = 1\text{T}$ [MHz]	Zawartość w przyrodzie [%]
^1H	1	0	1 / 2	42,58	99,98
^{19}F	1	1	1 / 2	40,08	100,0
^{31}P	0	1	1 / 2	17,25	100,0
^{13}C	0	1	1 / 2	10,71	1,11
^2H	1	1	1	6,54	0,0156
^{14}N	1	1	1	3,08	99,63

Rys. 28. Własności izotopów o niezerowym spinie jądrowym pierwiastków najczęściej występujących w białkach.

Z danych zamieszczonych w tabeli na **rys. 28** wynika, że przy ustalonym polu magnetycznym o natężeniu 1 T najwyższą częstość rezonansową obserwuje się dla jąder atomów wodoru (^1H). Protony odznaczają się bowiem największym współczynnikiem giromagnetycznym spośród wszystkich stabilnych izotopów pierwiastków występujących w białkach. W związku z tym, że czułość detekcji sygnału NMR rośnie wraz ze wzrostem momentu magnetycznego oraz biorąc pod uwagę fakt, że wodór jest jednym z głównych składników białek, rezonans jądrowy wodoru ^1H jest najszerzej stosowany w strukturalnych badaniach białek.

Badania struktury białek za pomocą metody NMR napotykają na naturalną trudność wynikającą ze złożonej struktury molekuł białka. Widma protonowe dla większych cząsteczek białka w roztworach mogą być niezwykle skomplikowane (nakładanie się wielu linii). Do niedawna zakładano, że metoda NMR najlepiej nadaje się do badań strukturalnych białek nie przekraczających 40 kDa. Począwszy od lat 70-tych, wraz z rozwojem technologii wytwarzania wysokich pól magnetycznych w nadprzewodzących solenoidach, nastąpiło wyraźne polepszenie rozdzielczości i czułości metody NMR. Tendencja do przeprowadzania pomiarów NMR w polach magnetycznych o coraz wyższych natężeniach stale się utrzymuje i współczesne spektrometry NMR wykorzystują pola magnetyczne sięgające do około 21,5 T, (odpowiadające im częstości rezonansowe są bliskie 900 MHz). Schemat typowego spektrometru NMR przedstawiono na **Rys. 29**.



Rys. 29. Uproszczony schemat współczesnego spektrometru NMR. Badana próbka białka w postaci roztworu wodnego umieszczona jest w polu magnetycznym B_0 . Dodatkowe pole o częstotliwości radiowej i o składowej magnetycznej B_1 prostopadłej do pola B_0 wytwarzane jest przez układ cewki rezonansowej (w powiększeniu).

Znaczną poprawę czułości spektrometrów NMR uzyskano także dzięki wprowadzeniu wielokrotnego zapisu widm (tzw. akumulacja widm) oraz szerokiemu zastosowaniu metod impulsowych (techniki tzw. echa spinowego wspomagane obróbką sygnału NMR za pomocą transformaty Fouriera). Milowym krokiem w wykorzystaniu techniki NMR do analizy strukturalnej białek było pojawienie się w latach 80-tych metody dwuwymiarowej spektroskopii NMR (2D NMR). Należy tu zazaczyć, że w klasycznym eksperymencie NMR widma rejestrowane są przy jednym zmiennym parametrze. Jest nim na ogół zmienna częstość promieniowania elektromagnetycznego doprowadzana do badanej próbki (przy ustalonej wartości pola magnetycznego B_0). Możliwa jest jednak rejestracja widm NMR przy dwu zmiennych lecz skorelowanych ze sobą parametrach. Ten drugi parametr (np. dodatkowe promieniowanie o częstotliwości radiowej) pozwala na znacznie lepsze wykorzystanie zdolności rozdzielczej metody NMR. W szczególności do badań struktury białek stosuje się obecnie metodę 2D NMR opartą o tzw. jądrowy efekt Overhausera (w skrócie NOESY). Metoda ta wykorzystuje mechanizm wzajemnego przekazu energii między układami jąder biorących udział w rezonansie (tzw. jądra „rezonansowe”) i układem jąder aktualnie niebudzanych (tzw. jądra „nierezonansowe”). W technice NOESY stosuje się dodatkowe naświetlenie jąder „nierezonansowych” słabym promieniowaniem o odpowiednio dobranej częstości. Jest to oczywiście częstość rezonansowa dla tej grupy jąder, różna jednak od częstości pobudzającej rezonans głównej grupy jąder „rezonansowych”. W wyniku oddziaływań dipolowych energia pobudzenia z grupy jąder „nierezonansowych” przenosi się

do grupy jąder „rezonansowych” (tzw. relaksacja skrośna). Za pomocą techniki NOESY można wyznaczać odległości międzyatomowe wykorzystując fakt, że szybkość relaksacji skrośnej zależy od odległości między oddziałującymi ze sobą dipolami jądrowymi jak r^{-6} , gdzie r oznacza odległość międzyatomową. Technika NOESY umożliwia zatem określenie trójwymiarowych struktur białek w roztworach.

Spektroskopia NMR wraz z metodą dyfrakcji promieniowania X są jedynymi technikami pozwalającymi wyznaczyć przestrzenną strukturę białka z rozdzielczością „atomową”. Bez wątplenia, metody rentgenowskiej analizy strukturalnej, w szczególności z wykorzystaniem promieniowania synchrotronowego, dostarczają danych strukturalnych o najwyższej precyzji. Wymagają jednak, tak jak wspomniano wyżej, wyhodowania wysokiej jakości kryształów białka, co często jest bardzo poważnym utrudnieniem. W tych wypadkach właśnie metoda NMR jest bardzo pomocna, zwłaszcza gdy uda się przygotować roztwory białka o dużym stężeniu (przykładowo: około 10^{-3} mol/l dla białka o masie molekularnej około 15 kDa). Białka o dużej masie molekularnej stanowią jednak ciągle poważne wyzwanie dla badań za pomocą NMR, gdyż rozdzielczość tej metody znacznie się pogarsza dla białek o masie przekraczającej 40 kDa.

R. Badania dynamiki białek

Metoda rentgenowskiej analizy strukturalnej oraz technika NMR dostarczają podstawowych danych o trójwymiarowej, „statycznej”, strukturze białek. Informacje te są wstępem do lepszego zrozumienia mechanizmów działania białek w procesach zachodzących w żywych komórkach. Wiadomo jest jednak, że biologicznie aktywne molekuly białka, biorąc udział w procesach komórkowych, nieustannie zmieniają swój kształt. W zależności od stadium takiego procesu, konformacje przestrzenne białek mogą przybierać różne formy. Typowym przykładem mogą być tu białka membranowe, których globularne na ogół kształty w roztworze wodnym ulegają wyraźnym zmianom w czasie łączenia się z dwuwarstwą lipidową. Zmiany konformacji molekuł białka towarzyszą także takim procesom, jak oddziaływanie białko-białko, generacja siły w mięśniach w białkowym kompleksie aktynomiozyna, przyłączanie molekuł nieorganicznych (np. wiązanie cząsteczek O_2 , CO lub NO przez białka zawierające hemową grupę prostetyczną), pochłanianie kwantów promieniowania przez molekuly białka (np. konformacyjne zmiany rodopsyny będące podstawą procesu widzenia), itp.

Odrębną klasę zagadnień reprezentuje dynamika procesów zwijania i rozwijania białka. Doświadczalne określenie poszczególnych stadiów tych procesów oraz poznanie struktur pośrednich jest niezbędnym etapem na drodze do zrozumienia mechanizmów zwijania się białek z liniowych polimerów w trójwymiarowe struktury aktywne biologicznie. Stosunkowo od niedawna, prace eksperymentalne w tej dziedzinie wspomagane są przez coraz bardziej zaawansowane modelowanie teoretyczne (*patrz rozdziały: G – J*). W dynamice białek zawarta jest także informacja o wielu procesach chorobowych. Jednym z częściej dyskutowanych zagadnień dotyczących patologicznych zmian tego typu jest problem schorzeń wywoływanych przez priony. Termin priony oznacza patogenne odmiany białek naturalnie występujących w organizmie ludzkim lub zwierzęcym. Priony składają się dokładnie z takich samych sekwencji aminokwasów jak ich natywne odpowiedniki. Różnica w ich działaniu w procesach komórkowych wynika z niewielkiej (na ogół) zmiany konformacji molekuly. Obecność patogennych białek (prionów) w organizmie może prowadzić do szeregu nieuleczalnych schorzeń. W szczególności dotyczy to indukowanego przez priony zapalenia mózgu (choroba Creutzfeldta-Jakoba u ludzi oraz jej odpowiednik, gąbczaste zapalenie mózgu, u zwierząt). Częściowa degeneracja niektórych białek oraz postępujące wraz z nią procesy agregacji mogą prowadzić do innych, nieuleczalnych schorzeń takich jak, m.in. choroby Alzheimera, Parkinsona, czy też tworzenie się zaćmy w soczewce oka.

Istnieje zatem duże zapotrzebowanie na możliwość obserwowania struktur białkowych w procesach dynamicznych. Z tego powodu wiele metod doświadczalnych stosowanych dotychczas do „statycznych” badań białek (badania na kryształach białek lub w stężonych roztworach), zostało przystosowanych do prowadzenia pomiarów pozwalających obserwować zmiany konformacji cząsteczek białka w funkcji czasu. Najważniejsze grupy metod badawczych wykorzystywanych w badaniach dynamiki białka przedstawiono w **tabeli na rys. 30**.

Dynamika molekuł białka - metody eksperymentalne

Grupa metod	Nazwa/specyfika metody	Skala czasu	Badane parametry
Optyczne	Wygaszanie fluorescencji samoistnej oraz znaczników. Pomiary czasów życia oraz rezonansowy transfer energii.	ns - s	Sąsiedztwo TRP lub TYR, ekspozycja powierzchni hydrofobowej, miejsca aktywne enzymów, wiązanie białek z substratami, wyznaczenie odległości pomiędzy elementami struktury białka.
	Dichroizm kołowy w dalekim i bliskim nadfiolecie.	ns - s	Formowanie się struktur drugorzędowych oraz trzeciorzędowych.
	Absorpcja (bliski nadfiolet) oraz spektroskopia FT IR	ns - s	Sąsiedztwo łańcuchów aromatycznych oraz formowanie się struktur drugorzędowych.
Promieniowanie rentgenowskie i synchrotronowe	Dyfrakcja promieni rentgenowskich.	\geq ms	Rozmiary i kształt łańcucha polipeptydowego.
	Dyfrakcja promieniowania synchrotronowego (SRS)	\geq ps	Dynamika struktury białka oraz wiązanie ligandów.
JMR	Jądrowy rezonans magnetyczny	s	Dynamika związania i rozwijania białka oraz wiązanie białka z substratem.
EPR	Elektronowy rezonans paramagnetyczny	$> 0,5$ ms	Dynamika związania i rozwijania białka oraz wiązanie białka z substratem; w szczególności: informacja "lokalna" i "globalna" o stadiach związania białka.
AFM sprzężony ze szczypczykami optycznymi	Spektroskopia sił atomowych wspomaganą techniką laserowych szczypczyków optycznych	s	Siły związane ze związaniem i rozciąganiem białka oraz stałe czasowe tych procesów mierzone dla pojedynczych molekuł.

Rys. 30. Najważniejsze metody doświadczalne stosowane w badaniach dynamiki białek.

Dzięki szybkiemu postępowi technicznemu w dziedzinie rentgenowskiej analizy strukturalnej technika ta jest ostatnio wykorzystywana także do badań dynamiki molekuł białka. W szczególności, przy zastosowaniu promieniowania synchrotronowego o dużym natężeniu wiązki, możliwe stały się obserwacje zmian konformacji molekuł białek w roztworach wodnych, w procesach inicjowanych przez skokową zmianę warunków termodynamicznych (np. na skutek szybkiego mieszania substancji denaturującej z białkiem). W technice tej wykorzystuje się fakt, że rozproszenie promieni X przez wodne roztwory białek zależy od lokalnej gęstości elektronów w molekułach białka. Gęstość ta zależy z kolei od stadium związania się białka i jest najwyższa dla upakowanej formy natywnej (białko związane). Eaton wraz ze współpracownikami obserwował za pomocą tej metody proces związania się cytochromu *c*, małego białka składającego się ze 104 aminokwasów. Proces związania białka w roztworze wodnym inicjowany był przez bardzo szybką zmianę pH. Miniaturowe urządzenie mieszające pracujące w ciągłym przepływie powodowało skok pH z

wartości 2 (białko zdenaturowane) do wartości 7 (białko zwinięte). Niskokątowe rozpraszanie promieni synchrotronowych pozwoliło na wykazanie, że cytochrom *c* zwija się w sposób stopniowy, tworząc silnie upakowane formy pośrednie. Czas tworzenia się form pośrednich został oceniony na około 50 μ s przy całkowitym czasie zwijania cytochromu *c* w warunkach tego eksperymentu oceniono na 400 μ s.

Tradycyjna metoda dyfrakcji promieni X może być także zastosowana do badań dynamiki molekuł białka. W wypadku rentgenowskiej analizy strukturalnej, opartej na badaniu krystalicznych form białka, wykorzystywana jest porowata struktura wielu kryształów białek. Umożliwia to wnikanie w kryształ białka innych cząsteczek (np. cząsteczek wody lub niektórych gazów). Asocjacja takich „dodatkowych” molekuł prowadzi często do zmian w strukturze badanego białka. Jak jednak widać z danych zamieszczonych w tabeli na **rys. 30**, do badania szybkich procesów dynamiki białek w środowisku roztworów wodnych najlepiej nadają się metody optyczne. Wolniejsze procesy kinetyczne, zachodzące w skali czasu powyżej 1 s można obserwować za pomocą techniki NMR. W ostatnich kilku latach rośnie zainteresowanie wykorzystaniem techniki elektronowego rezonansu paramagnetycznego (EPR) do badań kinetyki zwijania się białek. Metoda EPR zostanie szerzej opisana w dalszej części tego artykułu.

Metody optyczne oparte są na ogół na obserwacji zaniku fluorescencji tryptofanu, aminokwasu o właściwościach aromatycznych. Występuje on naturalnie w wielu białkach. Tryptofan znajdujący się w rozwiniętych łańcuchach białkowych wzbudzony światłem laserowym o długości 280 nm emituje fluorescencję o długim czasie zaniku. Dla form zwiniętych białka obserwuje się natomiast gwałtowne skrócenie czasu zaniku fluorescencji. Metoda polegająca na obserwacji zaniku fluorescencji tego naturalnie występującego barwnika pozwala obserwować kinetykę zwijania się niektórych niewielkich białek globularnych z rozdzielczością czasową rzędu nawet 1 μ s. Za pomocą tej techniki badano, m.in. kinetykę zwijania się niewielkiego białka jakim jest składający się ze 129 aminokwasów lizozym (wyzolowany składnik białka kurzego). Prace Eatona i jego grupy wykazały, że białko to, o bardzo dużym stopniu upakowania w stanie natywnym, zwija się stopniowo, przy czym drugorzędowe struktury (α -helisy) osiągają pełen stopień zwinięcia już po około 50 μ s. Podobne wyniki sugerujące wieloetapowy proces zwijania tego białka otrzymano za pomocą techniki NMR (prace Radforda i Dobsona). W badaniach NMR dynamiki zwijania lizozymu

wykorzystano technikę wymiany protonów (^1H) na deuterony (^2H) w grupach amidowych. Wykazano także, że formowanie się innej drugorzędowej struktury, struktury β , przebiega wolniej niż kształtowanie się struktur helikalnych.

Obserwacja procesów zwijania lub rozwijania molekuł białka możliwa jest dzięki sprzężeniu standardowych metod optycznych (jak np. spektrofluorymetria lub badania dichroizmu kołowego) oraz metod rezonansów magnetycznych (NMR i EPR) z wyspecjalizowanymi technikami pozwalającymi na bardzo szybkie zmiany warunków równowagi termodynamicznej w jakich w danym momencie znajdują się molekuly badanego białka. Gwałtowne zmiany takich parametrów fizycznych, jak temperatura (skokowa zmiana temperatury układu) lub ciśnienie (skokowa zmiana ciśnienia), względnie bardzo szybka zmiana stężeń substratów w roztworach zawierających białko, prowadzą do sytuacji, w której białko musi zmienić swą konformację aby dostosować ją do warunków nowej równowagi termodynamicznej. Dla niektórych białek, takie bardzo szybkie zmiany konformacji mogą być też zapoczątkowane przez impuls światła laserowego.

Spośród w/w technik stosunkowo najszerszej stosowaną obecnie jest metoda szybkiego przepływu i mieszania substratów (tzw. technika Flow/Stopped-Flow). Metoda ta pozwala na obserwację kinetyk zwijania/rozwijania molekuł białka w roztworach wodnych, a więc w środowisku zbliżonym do naturalnego. Procesy te inicjowane są w warunkach szybkiego przepływu i mieszania reagentów. Proces rozwijania (denaturacji) wyzwalany jest na ogół przez szybkie mieszanie roztworu zawierającego białko w stanie natywnym z roztworem czynnika niszczącego trójwymiarową strukturę białka. Typowymi czynnikami niszczącymi globularną strukturę białek są takie substancje, jak stężony mocznik ($\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$) lub chlorowodorek guanidyny (w skrócie GdnHCl), względnie wysokie stężenie jonów wodorowych (odpowiadają im niskie wartości pH). Zakłada się, że taki chemiczny sposób denaturacji białka polega przede wszystkim na niszczeniu wiązań wodorowych. Dla przykładu, obecność GdnHCl o stężeniu 6 mol/l niszczy trzeciorzędową i drugorzędową strukturę większości białek. Odwrotny proces zwijania inicjowany jest przez szybkie mieszanie roztworu zawierającego rozwinięte (zdenaturowane) białko z odpowiednim buforem, którego obecność zmniejsza efektywne stężenie czynnika denaturującego. W odpowiednio zaprojektowanych mieszaczach proces mieszania reagentów zachodzi w czasie znacznie krótszym niż przebieg czasowy odpowiadający obserwowanej kinetyce. Obserwacja procesów zwijania lub rozwijania białka może być przeprowadzana zarówno w warunkach

ciągłego przepływu substratów i zmiennej prędkości mieszania, jak też po szybkim zmieszaniu substratów i zatrzymaniu przepływu. Ten drugi sposób jest często preferowany w badaniach kinetyk zwijania/rozwijania białka, gdyż towarzyszy mu znacznie mniejsze zużycie substratów.

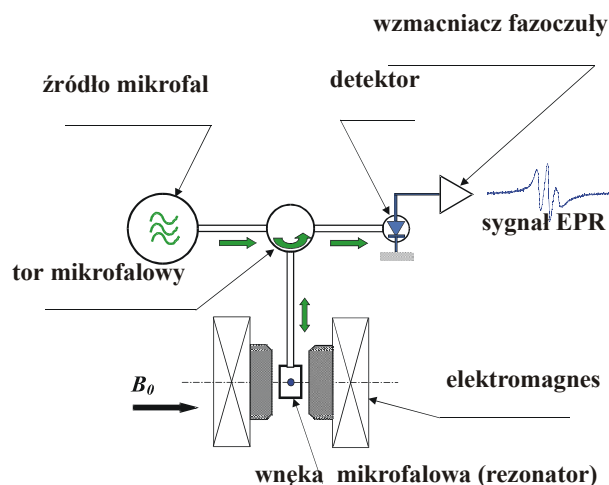
S. Zastosowanie metody EPR do bezpośredniej obserwacji kinetyki zwijania i rozwijania białka.

Zasadniczy mechanizm fizyczny, na którym oparta jest metoda elektronowego rezonansu paramagnetycznego (EPR) jest zbliżony ideowo do opisanego wyżej jądrowego rezonansu magnetycznego. W odróżnieniu jednak od techniki NMR, która jest czuła na magnetyzm jądrowy, metoda EPR odnosi się do magnetyzmu spinów elektronowych. Za pomocą EPR wykrywa się zatem cząsteczki, atomy lub jony, które zawierają jeden lub więcej niesparowanych elektronów. Obiekty takie noszą nazwę centrów paramagnetycznych. Są nimi defekty strukturalne lub domieszki paramagnetyczne w ciałach stałych (np. jony metali przejściowych lub ziem rzadkich o częściowo zapełnionych podpowłokach elektronowych d lub f). Mogą być nimi także molekuly zawierające zerwane wiązania lub niesparowane elektrony (np. dobrze znane z chemii wolne rodniki organiczne lub nieorganiczne), a także molekuly organiczne o sparowanych spinach w stanie podstawowym, w których spinowy moment elektronowy wzbudzany jest na krótki czas na skutek pochłonięcia kwantu promieniowania elektromagnetycznego o energii wystarczającej dla „odwrócenia” spinu (cząsteczki we wzbudzonych światłem stanach trypletowych).

Niesparowany elektron wykazuje różny od zera spinowy moment pędu S , któremu odpowiada elektronowy spinowy moment magnetyczny $\mu = -g \mu_B S/\hbar$, gdzie μ_B oznacza tzw. magneton Bohra o wartości $9,2732 \times 10^{-24} \text{ JT}^{-1}$, a g jest bezwymiarowym współczynnikiem proporcjonalności pomiędzy spinowym momentem pędu a momentem magnetycznym. Współczynnik g ma charakterystyczną wartość dla danego centrum paramagnetycznego. Spełnia on więc podobną funkcję jak współczynnik γ charakteryzujący dane jądro atomowe w wypadku NMR. Kwantowy obraz EPR jest analogiczny do kwantowego modelu NMR (przedstawionego na rys. 26). Dla najprostszego przypadku jakim jest jeden niesparowany elektron i przy braku innych oddziaływań (np. oddziaływań niesparowanego spinu elektronowego ze spinem jądrowym), warunek dla przejść rezonansowych w EPR w polu

magnetycznym o natężeniu B_0 można zapisać następująco: $\Delta E = h\nu = -g\mu_B B_0$. Ze względu na fakt, że moment magnetyczny niesparowanego elektronu jest około 1000 razy większy od elementarnego jądrowego momentu magnetycznego, odpowiednie przejścia rezonansowe obserwuje się dla częstości o wartościach trzy rzędy wyższych niż dla NMR. Przykładowo, dla molekuł posiadających jeden niesparowany elektron (w chemii zwanych często wolnymi rodnikami), w polu magnetycznym około 0,35 T, przejście rezonansowe obserwowane jest przy częstości około 9,8 GHz, a więc w zakresie mikrofal. Odpowiednie przejście rezonansowe dla jąder wodoru (^1H) w tym samym polu magnetycznym byłoby obserwowane przy częstości radiowej około 14,9 MHz.

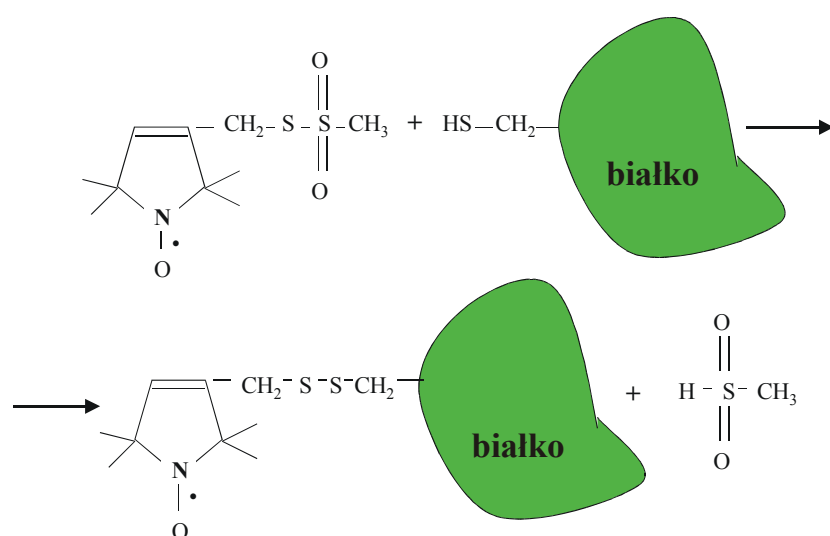
Uproszczony schemat blokowy spektrometru EPR pokazano na rys. 31. Należy zwrócić uwagę, że typowy spektrometr EPR rejestruje widmo w funkcji pola magnetycznego przy ustalonej częstości promieniowania mikrofalowego. Ze względu na sposób detekcji z zastosowaniem dodatkowej modulacji pola magnetycznego, typowe widmo EPR odpowiada pierwszej pochodnej sygnału absorpcji (amplituda linii widma osiąga wartości zerowe w punktach odpowiadających maksimum absorpcji).



Rys. 31. Schemat blokowy spektrometru EPR.

W przypadku badań materiałów biologicznych, metoda EPR ze względu na jej wysoką czułość pozwala pracować ze znacznie mniejszymi objętościami próbek, niż ma to miejsce w spektroskopii NMR. Należy jednak zwrócić uwagę na to, że w większości przypadków białka nie zawierają niesparowanych elektronów i nie mogą być badane za pomocą techniki EPR. Tylko niewielka grupa białek zawierających atomy metali grupy przejściowej, takich jak Fe, Cu, Mn lub Co, o częściowo wypełnionej wewnętrznej powłoce d , wykazuje obecność

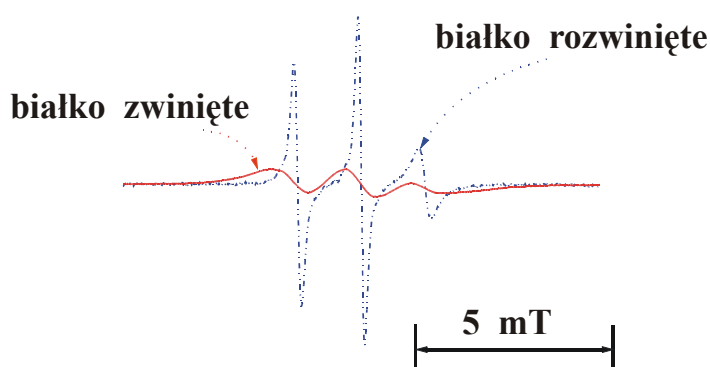
trwałego spinowego momentu magnetycznego. Z reguły jednak, w warunkach zbliżonych do fizjologicznych, tzn. w temperaturze około 300 K oraz dla typowych "fizjologicznych" stężeń, białka takie nie są wykrywalne metodą EPR ze względu na znaczne poszerzenie linii rezonansowych. Dlatego też, w celu wykorzystania walorów metody EPR do badań dynamiki molekuł białka, stosuje się pewien dodatkowy zabieg zwany znakowaniem spinowym. Polega on na przyłączeniu do badanego białka w drodze reakcji chemicznej znacznika spinowego, dodatkowej, na ogół niewielkiej, cząsteczki zawierającej trwały spinowy moment magnetyczny. Takimi cząsteczkami są m.in. organiczne rodniki zawierające grupę NO^\bullet (symbol \bullet oznacza tu niesparowany elektron). Mechanizm przyłączania znacznika spinowego do cząsteczki białka pokazano schematycznie na **rys. 32**.



Rys. 32. Schematyczne przedstawienie techniki znakowania spinowego białek. Znacznik spinowy (MTSSL) przyłączany jest do grupy tiolowej reszty aminokwasowej cysteiny.

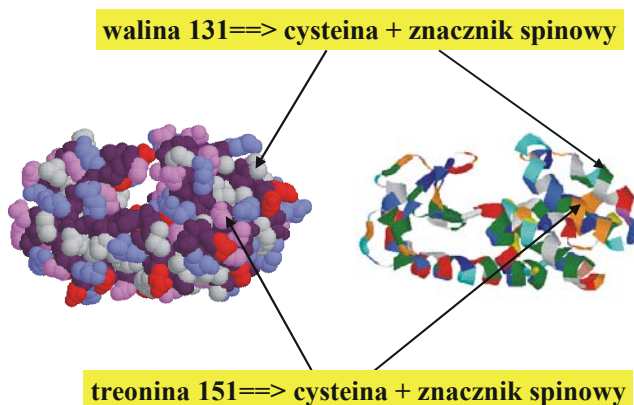
W znakowaniu spinowym wykorzystuje się najczęściej jeden z naturalnie występujących w białku aminokwasów, cysteinę. Jak już wspomniano, aminokwas ten zawiera grupę tiolową -SH . Ten właśnie fragment reszty aminokwasowej wykorzystywany jest do przyłączenia cząsteczki znacznika spinowego. Mechanizm reakcji prowadzi do powstania mostka dwusiarczkowego (-S-S-) pomiędzy cysteiną a znacznikiem spinowym. Jeśli cysteina nie jest „dostępna” w danym białku, metodami inżynierii genetycznej mutuje się białko. Pozwala to na umieszczenie cysteiny w określonym położeniu w ramach łańcucha polipetydowego. Dla niektórych niewielkich białek globularnych tą drogą udało się wprowadzić znacznik spinowy w bardzo wiele położen bez jednoczesnej destabilizacji struktury trzeciorzędowej białka. Na przykład, Mchaourab wprowadził znaczniki spinowe w około 50 różnych położen w tak niewielkim białku, jakim jest lizozym T4L (164 aminokwasów, masa molekularna 18,6 kDa).

Na **rys. 33** zestawiono widma EPR uzyskane dla znakowanego spinami lizozymu T4L. Wyraźnie poszerzone widmo (linia ciągła) odpowiada zwiniętej formie białka. Zawężone widmo (linia przerywana) odpowiada białku rozwiniętemu. Białko rozwinięto mieszając jego wodny roztwór z czynnikiem denaturującym (GdnHCl). Końcowe stężenie GdnHCl wynosiło 4 mol/l. Oba widma na **rys. 33** odpowiadają dokładnie tej samej ilości rejestrowanych spinów. Różnice w kształcie widm wynikają wyłącznie z odmiennej dynamiki spinu-znacznika przyłączonego do rozwiniętej i zwiniętej formy białka. W przypadku białka rozwiniętego znacznik spinowy silnie oddziałuje z roztworem i dzięki szybszej rotacji linie EPR ulegają zawężeniu. Przeciwnie, dla białka zwiniętego, ruch znacznika jest spowolniony, gdyż w znacznym stopniu reprezentuje ona dynamikę zwiniętej, globularnej struktury białka.



Rys. 33. Widma EPR dla zwiniętego i rozwiniętego lizozymu T4L zarejestrowane w postaci pierwszej pochodnej sygnału absorpcji w funkcji natężenia pola magnetycznego. Białko było znakowane znacznikami spinowymi (MTSSL). Formę rozwiniętą białka uzyskano po dodaniu czynnika denaturującego (GdnHCl). Końcowe stężenie GdnHCl wynosiło 4 mol/l.

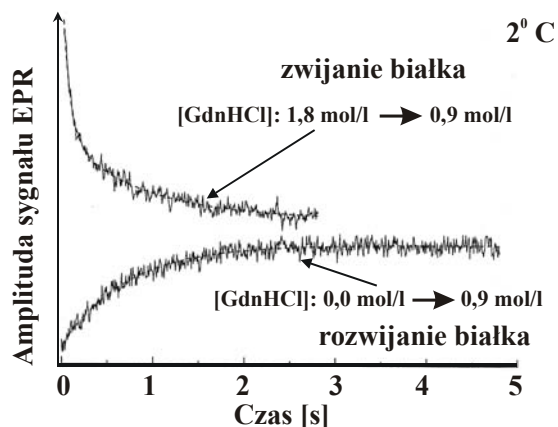
Na **rys. 34** pokazano rozmieszczenie znaczników spinowych na molekułe lizozymu T4L. Znaczniki zostały umieszczone w następujących miejscach łańcucha polipeptydowego: 131 (walina) i 151 (treonina). Aby przyłączyć znaczniki MTSSL oba aminokwasy zostały uprzednio zamienione na cysteinę. Obecność dwóch znaczników w tym białku, zlokalizowanych na sąsiadujących ze sobą α -helisach (**rys. 34**), jest źródłem dodatkowego poszerzenia linii EPR (tzw. poszerzenie „dipol-dipol”) dla struktury zwiniętej.



Rys. 34. Struktura molekuly lizozymu T4L znakowanego spinowo znacznikami MTSSL. Dla lepszego zobrazowania lokalizacji spinów molekula bialka przedstawiona jest w modelu upakowania poszczegolnych aminokwasow (lewa strona rysunku) oraz w postaci „wstazki” (prawa strona rysunku).

Podwójne znakowanie spinami wykorzystuje się, m.in., do mierzenia odległości pomiędzy poszczególnymi fragmentami struktury białka. Bardzo duże różnice w kształcie widm dla znakowanego spinowo białka zwiniętego i rozwiniętego wyraźnie sugerują możliwość zastosowania metody EPR do kinetycznych badań konformacji białek.

Badania dynamiki procesu zwijania i rozwijania molekuł białka mogą być przeprowadzane w stosunkowo wygodny sposób za pomocą metody EPR po sprzęgnięciu jej z techniką szybkiego przepływu i mieszania substratów. Jednym z podstawowych warunków udanego eksperymentu przeprowadzonego za pomocą techniki przepływowego EPR jest umieszczenie mieszacza substratów możliwie blisko rezonatora mikrofalowego, tak aby czas przemieszczania się mieszaniny substratów do rezonatora był jak najkrótszy.



Rys. 35. Obserwacja za pomocą techniki EPR procesu zwijania i rozwijania cytochromu *c*. Białko znakowane znacznikiem MTSSL w pozycji 102. Proces zwijania białka inicjowany był skokową zmianą stężenia czynnika denaturującego (GdnHCl) z 1,8 do 0,9 mol/l. Proces rozwijania zapoczątkowano skokową

zmianą stężenia GdnHCl z poziomu 0,0 do 0,9 mol/l. W celu spowolnienia procesów, zwijanie i rozwijanie obserwowane były w temperaturze 2⁰C.

Wyniki obserwacji procesu zwijania i rozwijania małego białka za pomocą metody przepływowego EPR pokazano na **rys. 35**. Badanym białkiem był cytochrom *c* wyhodowany w komórkach drożdży. Cytochrom *c* jest białkiem często występującym w mitochondriach komórek zwierzęcych, a zwłaszcza w tkankach mięśni serca. Białko to składa się z pojedynczego łańcucha polipeptydowego liczącego 104 aminokwasy. W swej strukturze cytochrom *c* zawiera także grupę prostetyczną, którą jest cząsteczka hemu. Masa molekularna tego białka wynosi 12,4 kDa. Białko znakowano znacznikiem MTSSL w pozycji 102, czyli w miejscu naturalnie występującej cysteiny. Proces zwijania białka inicjowany był skokową zmianą stężenia czynnika denaturującego (GdnHCl) z 1,8 do 0,9 mol/l. Proces rozwijania natomiast był zapoczątkowany skokową zmianą stężenia GdnHCl z poziomu 0,0 do 0,9 mol/l. Dla spowolnienia procesów, kinetykę zwijania i rozwijania obserwowano w obniżonej temperaturze (2⁰C). W tych warunkach proces zwijania cytochromu *c* przebiega dwustopniowo. Jedna składowa ma stałą czasową 0,084 s, a druga, wolniejsza, przebiega ze składową czasową 0,83 s. Ten dwustanowy przebieg zwijania się białka tłumaczono powstaniem formy częściowo zwiniętej, dla której dalszy proces zwijania był na moment zablokowany przez „niewłaściwe” wzajemne położenie płaszczyzny hemowej oraz pierścienia imidazolowego jednej z histydyn (His²⁶ lub His³³). Proces rozwijania zachodził jednostopniowo i był wolniejszy, przebiegając ze stałą czasową około 0,7 s.

Zespolenie technik przepływowych z metodą EPR oferuje szereg istotnych korzyści w przypadku badania procesów dynamicznych w białkach. Możliwość umieszczania znaczników spinowych wybiórczo w różnych, „strategicznie” znaczących miejscach białka dostarczyć może bardzo istotnych, lokalnych informacji o procesach dynamiki zwijania i rozwijania cząsteczek białkowych. Natomiast metody optyczne, takie jak spektrofotometria absorpcyjna i fluorescencyjna, czy dichroizm kołowy, lepiej nadają się do śledzenia procesów globalnych.

T. O roli białek w żywych komórkach

Dotychczas omawialiśmy zagadnienia dotyczące budowy i dynamiki pojedynczych molekuł białka. Żywe komórki zawierają dziesiątki tysięcy rozmaitych białek, które biorąc udział w większości zachodzących w komórkach procesów ściśle współdziałają ze sobą w ramach

wielu wzajemnie powiązanych ze sobą szlaków metabolicznych. Rola białek w procesach komórkowych oraz ich wzajemne oddziaływania dobrze ilustrują podstawową cechę materii ożywionej - dążność do tworzenia i zachowywania stanów uporządkowanych. Aby takie stany wytworzyć, w żywych komórkach muszą stale zachodzić ciągi procesów biochemicznych, w których substancje pokarmowe ulegają modyfikacji lub przemianie na prostsze cząsteczki. W taki sposób przyswajane są dostarczane z zewnątrz cukry, lipidy lub niektóre aminokwasy, a uzyskiwane z ich rozkładu proste związki chemiczne oraz energia wykorzystywane są następnie do syntezy różnorodnych białek, kwasów nukleinowych i innych makrocząsteczek niezbędnych dla prawidłowego funkcjonowania organizmów żywych. Jednym z takich ciągów procesów biochemicznych ukierunkowanych na tworzenie stanów uporządkowanych jest wspomniany na początku artykułu (punkty **A** i **B**) komórkowy proces syntezy białek. Poniżej, na wybranych przykładach, omówione zostaną niektóre białka oraz ich rola w procesach komórkowych.

Procesy enzymatyczne

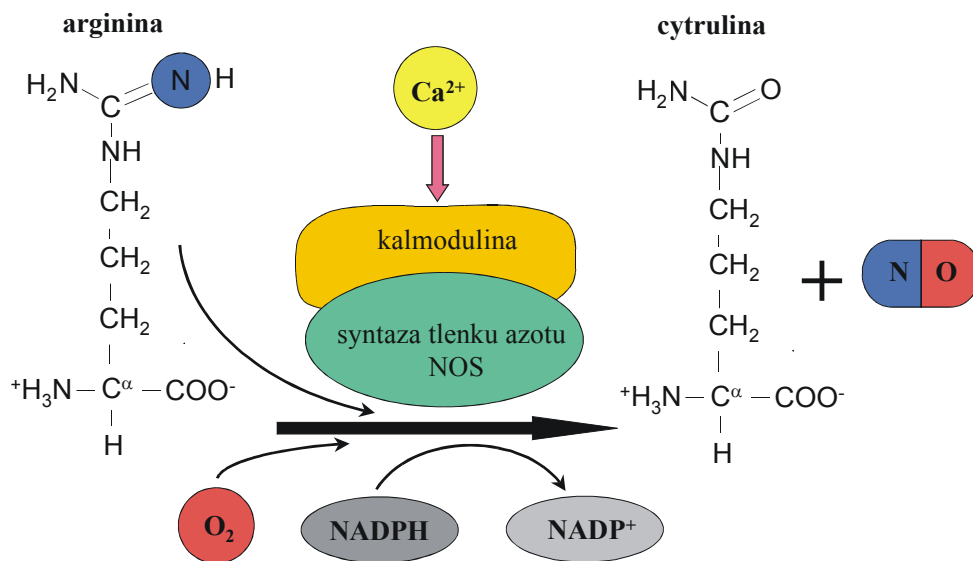
Prawie 50% wszystkich białek występujących w komórkach to wyspecjalizowane katalizatory - enzymy, z których każdy katalizuje jedną określoną reakcję. Reakcje katalizowane przez enzymy są na ogół sprzężone, tak że produkt jednej reakcji staje się materiałem wyjściowym dla kolejnego procesu. Enzymy odznaczają się wysoką elastycznością działania, która polega na ścisłym uzależnieniu ich aktywności od stanu komórki. Dzięki temu możliwe są procesy regulujące, które adaptują metabolizm komórki do stale zmieniających się warunków zewnętrznych. Enzymy wydajnie obniżają energie aktywacji substratów, zwiększając tym samym prawdopodobieństwo zachodzenia procesów chemicznych. W obecności enzymów wiele reakcji chemicznych zachodzi znacznie szybciej (często nawet 10^{10} razy) niż w obecności katalizatorów syntetycznych. Dlatego też organizmy żywe mogą wytwarzać substancje, których otrzymanie w procesach technicznej syntezy jest albo niemożliwe, albo bardzo trudne.

Przykładem substancji wytwarzanej z dużą wydajnością w komórkach żywych, a trudnej do otrzymania na drodze syntezy chemicznej jest tlenek azotu (NO). NO jest małą molekułą nieorganiczną, która spełnia wiele funkcji regulujących w komórkach i tkankach. W szczególności, jest on odpowiedzialny za regulację ciśnienia tętniczego, gdyż bierze udział w mechanizmie rozluźniania mięśni gładkich wyścielających tętnice i żyły. Cząsteczki NO grają także bardzo ważną rolę w przekazywaniu sygnałów w komórkach

nerwowych. Obecność tlenu azotu jest również niezbędna w procesie regulacji krzepliwości krwi. W pewnych warunkach jednak, zwiększone i niekontrolowane stężenie tlenu azotu może być zagrożeniem dla różnych struktur komórkowych, gdyż cząsteczka NO wykazuje bardzo duże powinowactwo chemiczne do wielu białek, w szczególności do enzymów zawierających hemowe grupy prostetyczne. Toksyczne są także produkty przemian NO, gdyż w środowisku komórki łączy się on łatwo z niektórymi reaktywnymi formami tlenu (np. $O_2^{\cdot-}$) wytwarzając w rezultacie jeden z najsilniejszych komórkowych utleniaczy - $ONOO^-$.

Należy podkreślić, że gazowy NO jest także silnie toksyczny przy wdychaniu. Jest on składnikiem spalin samochodowych, gdyż jest wytwarzany (w niewielkich ilościach) z podstawowych składników powietrza - tlenu i azotu - w wyniku działania wysokich temperatur i ciśnień panujących w silnikach spalinowych.

Synteza NO w żywych komórkach zachodzi w warunkach fizjologicznych, a więc w stosunkowo niskiej temperaturze i pod normalnym ciśnieniem. Jest to możliwe dzięki istnieniu wyspecjalizowanego enzymu zwanego syntazą tlenu azotu (*ang.* nitric oxide synthase – w skrócie NOS). Enzym ten jest białkiem globularnym średniej wielkości i masie cząsteczkowej około 45 kDa. Jego łańcuch polipeptydowy składa się z 388 aminokwasów. Oksydaza tlenu azotu zawiera też grupę prostetyczną – pojedynczą grupę hemową. NOS syntetyzuje tlenek azotu wykorzystując dwa substraty: bogaty w azot aminokwas – argininę oraz rozpuszczony w płynie komórkowym tlen molekularny (O_2). Schemat komórkowej (endogennej) syntezy NO przedstawiono na **rys. 36**. W procesie tym bierze także udział inny enzym – kalmodulina, która zapoczątkowuje ciąg reakcji przechwytyjąc „sygnałowy” kation wapnia (Ca^{2+}). Aktywnym nośnikiem energii w procesie syntezy tlenu azotu jest cząsteczka fosforanu dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego w formie zredukowanej (NADPH), która po odszczepieniu jonu wodorkowego (H^+) przechodzi do formy utlenionej ($NADP^+$). Obok tlenu azotu, w procesie katalizowanym przez NOS wytwarzany jest także inny aminokwas – cytrulina. Cytrulina jest jednym z tych α -aminokwasów, które choć często pojawiają się w komórkach w wyniku różnych przemian metabolicznych, nie wchodzi jednak w skład cząsteczek białka.



Rys. 36. Synteza tlenu azotu w komórkach. Atom azotu uzyskiwany jest z aminokwasu – argininy, zaś atom tlenu z molekuly O_2 .

Działanie NOS, wyspecjalizowanego i występującego w kilku odmianach enzymu, silnie zależy od stanu komórki. W określonych warunkach NOS może wydajnie produkować tlenek azotu nie tylko w celach regulacji napięcia mięśni lub na potrzeby przekazywania chemicznych sygnałów między komórkami, ale także w celu neutralizacji toksyn wytwarzanych przez bakterie.

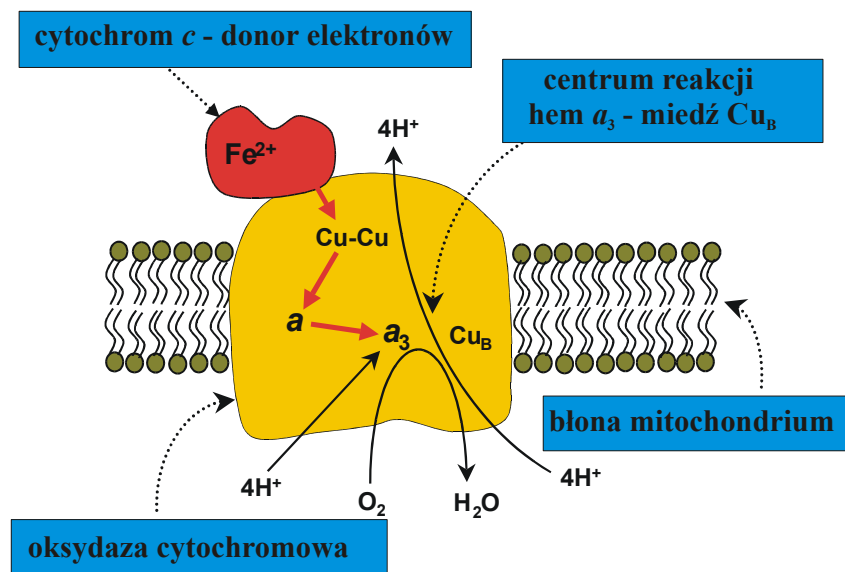
Wyizolowanie tlenu azotu jako najsilniejszej endogennej substancji rozszerzającej naczynia krwionośne oraz wytłumaczenie procesów komórkowych prowadzących do jego syntezy jest wynikiem prac trzech niezależnych od siebie grup badawczych kierowanych przez Furchgotta, Murada i Ignarro. Rezultaty tych badań otworzyły drogę do stworzenia wielu nowych leków, w tym leków działających przeciwko nadciśnieniu tętniczemu (leki te nasilają endogenną syntezę tlenu azotu).

Ważną grupą procesów enzymatycznych zachodzących w żywych komórkach są procesy kataboliczne, w których złożone i bogate w energię substraty rozkładane są na proste cząsteczki w celu uzyskania energii. Dzięki enzymom, proces uwalniania energii zmagazynowanej w wiązaniach chemicznych substratów, np. cukrów, nie zachodzi gwałtownie, tak jak w zwyczajnej reakcji spalania, lecz odbywa się stopniowo. Dlatego energia uzyskana z całkowitego rozkładu cukrów i utlenienia ich do końcowych produktów, jakimi są dwutlenek węgla (CO_2) i woda (H_2O), może być w pełni „zmagazynowana” w

wysokoenergetycznych wiązaniach chemicznych aktywnych nośników energii – cząsteczek takich jak ATP (adenozyno-5'-trifosforan) lub wspomniany już wyżej NADPH.

Cząsteczki ATP są głównymi przenośnikami energii chemicznej w komórkach. ATP zawiera dwa wysokoenergetyczne wiązania z grupami fosforanowymi ($-\text{PO}_3^{2-}$). Kiedy w komórce zachodzi potrzeba pobrania „zmagazynowanej” energii, w korzystnie energetycznym procesie hydrolizy od cząsteczki ATP odłączana jest grupa fosforanowa. Zależnie od warunków wewnątrz komórki, reakcja ta dostarcza od 46,0 do 54,4 kJ/mol użytecznej energii. Substratem wykorzystywanym w syntezie ATP jest cząsteczka-prekursor, czyli ADP (adenozyno-5'-difosforan). Cząsteczka ATP powstaje w wyniku przyłączenia jednej grupy fosforanowej pochodzenia nieorganicznego do cząsteczki ADP. Reakcja syntezy ATP wymaga dostarczenia energii z dodatkowego, zewnętrznego źródła. W przypadku komórek roślinnych oraz niektórych bakterii, zewnętrznym źródłem energii jest światło słoneczne, a mechanizmem odpowiedzialnym za jej pobieranie jest proces fotosyntezy. W komórkach zwierzęcych, ta dodatkowa energia uzyskiwana jest w procesie utleniania substancji pokarmowych w komórkowym łańcuchu oddechowym. Większość energii pochodzącej z rozkładu cząsteczek pokarmu jest uzyskiwana i przetwarzana w końcowym ogniwie łańcucha oddechowego – w procesach enzymatycznych zachodzących w wewnętrznych błonach mitochondriów. Mitochondria są tymi organellami, w których zużywany (redukowany) jest prawie cały tlen pobierany przez komórki. W wyniku redukcji tlenu w mitochondriach uzyskiwana jest energia potrzebna dla syntezy ATP.

W procesie polegającym na transferze elektronów do wnętrza mitochondriów oraz na wytworzeniu przeciwnie skierowanego gradientu stężenia jonów wodorowych (H^+) bierze udział około czterdziestu białek. Ostatnim ogniwem przepływu elektronów uzyskiwanych z utleniania substancji pokarmowych, a także kluczowym elementem podtrzymującym gradient jonów wodorowych w poprzek błony mitochondrialnej, jest białko środbłonowe zwane oksydazą cytochromową. Schemat kompleksu białkowego składającego się z oksydazy cytochromowej i cytochromu *c* pokazany jest na **rys. 37**.



Rys. 37. Schemat działania kompleksu cytochrom *c* - oksydazy cytochromowej - ostatniego ogniwa przepływu elektronów w komórkowym łańcuchu oddechowym. Oksydaza cytochromowa jest osadzona w wewnętrznej błonie mitochondrialnej. Czerwone strzałki pokazują kierunek przepływu elektronów od cytochromu *c* (donora elektronów) do centrum reakcji: hem *a*₃ – miedź Cu_B.

Oksydaza cytochromowa jest stosunkowo dużym białkiem o masie cząsteczkowej wynoszącej około 160 kDa. Białko to zawiera cztery grupy prostetyczne: dimer miedziowy Cu-Cu, dwie grupy hemowe *a* i *a*₃ oraz centrum reakcji z atomem miedzi (Cu_B). Oksydaza cytochromowa katalizuje przepływ elektronów od innego białka - cytochromu *c* do końcowego receptora - tlenu molekularnego (O₂). Na rys. 37 cząsteczka cytochromu *c* zaznaczona jest kolorem czerwonym. Cytochrom *c*, donor elektronów, także zawiera grupę prostetyczną - pojedynczą grupę hemową. W czasie transferu elektronów do oksydazy cytochromowej, hemowy atom żelaza w cytochromie *c* cyklicznie zmienia swoją wartościowość, ulegając na zmianę utlenianiu i redukcji (Fe²⁺ ⇌ Fe³⁺). W wyniku takich czterech cykli, cytochrom *c* przekazuje kolejno cztery elektrony do grup prostetycznych oksydazy cytochromowej. W uproszczonym zapisie proces ten można przedstawić następująco: $4 \text{ cyt } c (\text{Fe}^{2+}) + 4 \text{ H}^+ + \text{O}_2 \rightarrow 4 \text{ cyt } c (\text{Fe}^{3+}) + 2 \text{ H}_2\text{O}$, gdzie cyt *c* (Fe²⁺) i cyt *c* (Fe³⁺) oznaczają, odpowiednio, zredukowany i utleniony cytochrom *c*. Zakłada się, że przepływ elektronów pomiędzy kolejnymi grupami prostetycznymi następuje na wyniku efektu tunelowania, gdyż zarówno grupy hemowe *a* i *a*₃, jak i jony miedzi ukryte są wewnątrz oksydazy cytochromowej. W tzw. centrum reakcji, złożonym z hemu *a*₃ i z atomu miedzi Cu_B, oksydaza cytochromowa przechwytuje i „przechwytuje” cząsteczkę O₂ aż do momentu zgromadzenia wspomnianych wyżej czterech elektronów. W wyniku redukcji tlenu molekularnego i przyłączenia pobranych ze środowiska wodnego czterech protonów powstają

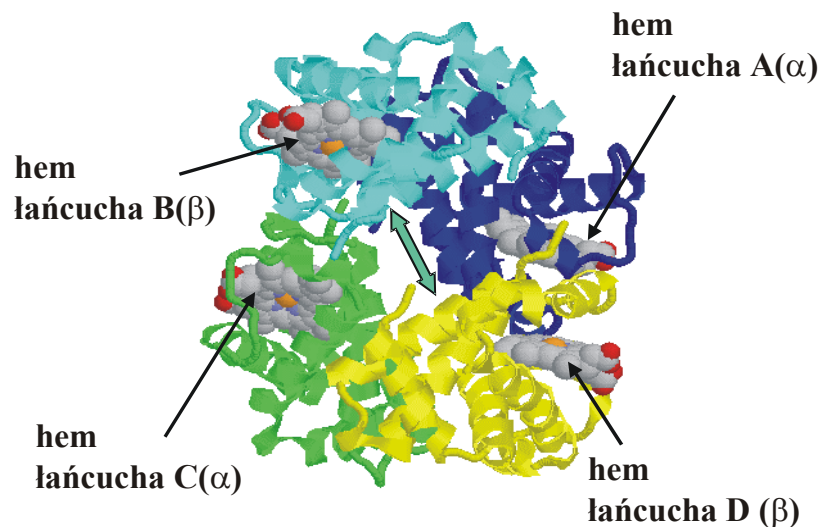
dwie cząsteczki wody. Transferowi elektronów od cytochromu *c* do centrum reakcji w oksydazie cytochromowej towarzyszy przepływ protonów (H^+) w kierunku przeciwnym. „Pompowanie” H^+ jest możliwe dzięki zmianom konformacji oksydazy cytochromowej wywołanym dopływem energii wytwarzanej w procesie dołączania elektronów do cząsteczki O_2 . Po obu stronach błony mitochondrialnej powstaje więc elektrochemiczny gradient stężenia protonów, przy czym różnica stężeń wynosi około 3 w jednostkach pH. To właśnie gradient H^+ jest czynnikiem aktywującym kolejny enzym, syntazę ATP. Tak więc, nadmiar energii uzyskiwany w enzymatycznie kontrolowanym procesie łączenia jonów wodorowych z tlenem wykorzystywany jest następnie w procesie syntezy uniwersalnego komórkowego nośnika energii – cząsteczki ATP.

Białka transportujące

Dużą grupę białek stanowią białka transportujące, które przenoszą małe cząsteczki lub jony. Takimi białkami są, m.in. takie białka jak: przenosząca lipidy albumina, gromadząca i przenosząca żelazo transferyna oraz podstawowy nośnik tlenu molekularnego – hemoglobina. Hemoglobina jest białkiem występującym obficie w czerwonych krwinkach (erytrocytach) i to właśnie dzięki jej obecności możliwe jest zwiększenie stężenia tlenu molekularnego w płynach ustrojowych o prawie dwa rzędy wielkości w stosunku do ilości tlenu zawartego pod ciśnieniem atmosferycznym w wodzie. Warto bowiem zauważyć, że stężenie O_2 w wodzie w temperaturze $36.5\ ^\circ C$ (temperatura ciała ludzkiego) i pod normalnym ciśnieniem atmosferycznym wynosi 2.1×10^{-4} mol/l, co stanowi zaledwie 1% zapotrzebowania organizmu na tlen. Strukturę cząsteczki hemoglobiny pokazano na **rys. 38**. Hemoglobina jest białkiem globularnym o prawie kulistym kształcie, masie molekularnej około 62 kDa i średnicy 5,5 nm. Jest ona także przykładem białka powstałego w wyniku symetrycznego połączenia się dwóch identycznych podjednostek, z których każda zawiera po dwa różniące się nieco od siebie łańcuchy polipeptydowe. Łańcuchy te oznaczane są odpowiednio jako łańcuch α (141 aminokwasów) i łańcuch β (146 aminokwasów). Łańcuchy te oddziałują ze sobą za pośrednictwem wiązań niekonwalencyjnych tworząc charakterystyczny tetramer oznaczany jako $\alpha\text{-}\beta\text{-}\alpha\text{-}\beta$ lub $\alpha_2\beta_2$ (względnie jako zespół łańcuchów A, B, C, D w danych dostępnych poprzez PDB). Na **rys. 38** poszczególne łańcuchy – domeny: A, B, C, i D zaznaczone są różnymi kolorami. Tetramer $\alpha_2\beta_2$ ma dobrze ukształtowaną strukturę czwartorzędową – przestrzenną organizację domen o określonej strukturze trzeciorzędowej. Choć łańcuchy α i β różnią się między sobą długością oraz sekwencją aminokwasów, to

jednak każdy z nich ma bardzo zbliżoną strukturę trzeciorzędową i zawiera taką samą niebiałkową grupę - cząsteczkę hemu. Hem jest związkiem kompleksowym, w którym atom żelaza dwuwartościowego (Fe^{2+}) znajdujący się w środku pierścienia porfirynowego tworzy wiązania koordynacyjne z czterema atomami azotu porfiryny. Atom żelaza może przyłączyć cząsteczkę O_2 bez zmiany swojej wartościowości, tworząc tzw. utlenowaną formę hemoglobiny (zwaną też oksyhemoglobina) o jasnoczerwonym kolorze. Przyłączanie tlenu jest odwracalne i zależy od ciśnienia cząstkowego tlenu w narządach.

Ze względu na obecność czterech grup hemowych, pojedyncza cząsteczka hemoglobiny może przenosić od jednej do czterech cząsteczek O_2 . Wiązanie tlenu przez hemoglobinę ma charakter kooperatywny, gdyż przyłączenie cząsteczki O_2 do grupy hemowej jednego z łańcuchów ułatwia wiązanie się następnych cząsteczek tlenu z grupami hemowymi pozostałych łańcuchów. Taki mechanizm przyspiesza wychwyt O_2 w środowisku bogatym w tlen. Natomiast w środowisku o niskiej zawartości tlenu, hemoglobina łatwo oddysocjuje cząsteczki O_2 . Ta właściwość pozwala hemoglobinie szybko wiązać tlen w tkankach płuc i równie szybko go oddawać w tkankach obwodowych.



Rys. 38. Struktura nieutlenowanej hemoglobiny. Zielona strzałka wskazuje hydrofobowe wnętrze cząsteczki, które zmienia swoje wymiary w miarę przyłączania lub oddysocjowania cząsteczek tlenu. Dla hemoglobiny w pełni utlenowanej wnętrze białka ma najmniejszą objętość. Struktura cząsteczki tego białka jest udostępniona przez PDB (kod 1A3N).

Białkiem spokrewnionym z hemoglobiną i także bardzo silnie wiążącym tlen jest mioglobina. Składa się ona z jednej pojedynczego łańcucha polipeptydowego (153 aminokwasy) i z tylko jednej grupy hemowej. Mioglobina ma jednak zdecydowanie inne właściwości związane z

wychwytywaniem tlenu, gdyż przede wszystkim szybko wiąże tlen w środowisku o niskim stężeniu O_2 . Będąc białkiem o strukturze monomerycznej, mioglobina nie posiada zdolności kooperatywnego wiązania cząsteczek O_2 i dlatego służy do magazynowania tlenu w tkankach mięśni. Tlen ten jest wykorzystywany podczas wzmożonej aktywności mięśni.

Wiele wyspecjalizowanych białek transportujących funkcjonuje w błonach komórkowych gdzie tworzy selektywne kanały transportowe dla rozmaitych jonów, np. takich jak H^+ , Na^+ , K^+ lub Ca^{2+} . W szczególności, w błonach komórek mięśni znajdują się białka transportujące jony Ca^{2+} , które są niezbędne dla wyzwolenia ich skurczu. Aktywny proces transportu jonów wapnia przez odpowiednie białko śródbłonowe wymaga dodatkowej energii, która czerpana jest z hydrolizy cząsteczki ATP. Dlatego białko tworzące kanał dla jonów wapnia jest także enzymem katalizującym hydrolizę ATP, skąd wynika jego nazwa – Ca^{2+} ATPaza. Przykładem białka będącego kanałem przepustowym dla cząsteczek prostych cukrów jest maltoporyna pokazana na **rys. 21**.

Białka strukturalne i motoryczne

Białka mogą występować także na zewnątrz komórek. Kolagen i elastyna są na przykład składnikami substancji międzykomórkowej. Tworzą one także włókna w więzadłach i ścięgnach. Wewnątrz komórek, inne grupy białek tworzą skomplikowaną sieć włókien białkowych (tzw. filamentów białkowych), które składają się na szkielet komórki (cytoszkielet). Cytoszkielet spełnia szczególnie ważną rolę strukturalną w przypadku komórek zwierzęcych, które w odróżnieniu od komórek roślinnych nie posiadają sztywnych ścian komórkowych. Cytoszkielet zbudowany jest z trzech rodzajów filamentów białkowych: filamentów pośrednich, mikrotubul i filamentów aktynowych.

Filamenty pośrednie, zabezpieczające komórkę w momencie jej rozciągania, zbudowane są z białek włóknistych. Średnica włókien filamentów pośrednich wynosi około 10 nm. Struktury tworzone przez nie w komórce należą do najtrwalszych, gdyż stanowią jedyną część cytoszkieletu, która nie ulega rozpuszczaniu po poddaniu komórki działaniu stężonych roztworów soli i niejonowych detergentów.

Elementami spełniającymi w komórce rolę pasów transmisyjnych dla innych cząsteczek są mikrotubule. Zbudowane są one z cząsteczek tubuliny, z których każda jest dimerem złożonym z dwóch bardzo podobnych do siebie białek globularnych zwanych α -tubuliną i β -tubuliną. Te dwa białka łączą się ze sobą za pomocą wiązań niekonwalencyjnych tworząc

dimery α/β -tubuliny. To właśnie z takich dimerów α/β -tubuliny powiązanych ze sobą także za pośrednictwem wiązań niekonwalencyjnych powstają mikrotubule, długie struktury w kształcie wydłużonych cylindrów, o średnicy około 25 nm. Białka motoryczne, takie jak kinezyzna oraz dyneina mogą łączyć się z mikrotubulami i przesuwać wzdłuż nich różne obiekty. Zarówno kinezyzna, jak i dyneina mają dwie globularne „głowy”, które zawierają fragmenty aktywne pozwalające na wiązanie się z mikrotubulą. Globularne fragmenty obu tych białek są także enzymami hydrolizującymi ATP (ATPazami), gdyż energia potrzebna do wykonania przemieszczenia wzdłuż mikrotubul czerpana jest z hydrolizy ATP. Zespoły białek motorycznych i mikrotubul są wykorzystywane przy przemieszczaniu niektórych składników komórek, takich jak np. pęcherzyki lub organelle.

Filamenty aktynowe (zwane także mikrofilamentami) są z kolei helikalnymi polimerami innego białka – aktyny. Filamenty te wykorzystywane są w komórkach do wykonywania niektórych ruchów, szczególnie tych, które związane są ze zmianą kształtu powierzchni komórki (np. pełzanie). W komórkach mięśni, włókna aktynowe łączą się w kompleksy z innym białkiem motorycznym, miozyną, tworząc struktury kurczliwe.

Białka regulujące geny

Istnieje grupa białek, które mogą wiązać się z cząsteczkami DNA w celu regulacji procesów transkrypcji i ekspresji poszczególnych genów. W ten sposób komórka może reagować na zmieniające się warunki zewnętrzne i syntetyzować pewne składniki, w tym także niektóre aminokwasy, szczególnie gdy ich dostępność w środowisku ulega zmniejszeniu. Białka, które uruchamiają geny nazywają się aktywatorami, zaś te które geny wyłączają nazywają się represorami. Białka te łączą się z odpowiednimi fragmentami DNA za pomocą wiązań wodorowych, jonowych i hydrofobowych tworząc kompleksy białko – DNA. Ponieważ każde pojedyncze wiązanie tego typu jest słabe, w kompleksach białko – DNA pojawia się na ogół około dwudziestu takich wiązań, które sumując się zapewniają kompleksowi trwałość i specyficzność oddziaływań.

Białka sygnałowe

Istnieje wiele wyspecjalizowanych białek, które przenoszą sygnały z komórki do komórki. Takimi białkami są niektóre białka-hormony i tzw. czynniki wzrostu, które koordynują rozmaite funkcje fizjologiczne. Na przykład insulina kontroluje poziom glukozy, netryna przyciąga rosnące komórki nerwowe w odpowiednim kierunku, a czynnik wzrostu nerwu

(NGF) stymuluje wzrost niektórych typów komórek nerwowych. Natomiast czynnik wzrostu naskórka (EGF) stymuluje wzrost i podziały komórek nabłonkowych.

Oddziaływania między takimi samymi białkami

Oddziaływania między molekułami białka tego samego rodzaju mogą prowadzić do szkodliwego zjawiska, zwanego aglomeracją białek. Proces ten wciąż jest dość słabo poznany, mimo bardzo wielu osiągnięć w obliczeniowych teoriach dotyczących zwijania i rozwijania białek. Zagadnienie to ma jednak kapitalne znaczenie dla podstawowej chemii białek, biotechnologii oraz medycyny. Agregacja pewnych białek może bowiem prowadzić do bardzo poważnych schorzeń, takich jak wspomniane już wyżej choroby Alzheimera lub Parkinsona. Proces agregacji ma także bardzo ważne znaczenie dla wytwarzania, przechowywania oraz dystrybucji leków opartych na białkach. Agregacja może towarzyszyć procesom zwijania, oczyszczania, zwiększania stężenia, liofilizacji, czy też uwadniania białek, a więc zupełnie typowym sytuacjom zarówno dla badań naukowych, jak i w produkcji przemysłowej.

U. Podsumowanie

Dzięki współczesnym osiągnięciom genetyki związanym z kończącym się wielkim przedsięwzięciem naukowym, jakim jest projekt ludzkiego genomu (*ang.* Human Genom Project), oraz nowym narzędziom badawczym wykorzystywanym na coraz większą skalę w proteomice, nasza wiedza o białkach szybko się poszerza. Wyniki badań mają bezpośrednie przełożenie na nowe technologie, które wdrażane są obecnie w wielu dziedzinach. Poza tradycyjnymi zastosowaniami w biochemii, farmakologii, medycynie i przemyśle spożywczym, najnowsze technologie oparte o białka wkraczają więc w takie dziedziny, jak np. przemysłowe otrzymywanie barwników do farbowania tkanin. Trudny do otrzymania w warunkach syntezy chemicznej niebieski barwnik indygo jest otrzymywany obecnie na drodze biosyntezy w odpowiednio zmutowanych genetycznie komórkach szczepu bakterii *Echerichia Coli*. Przemysł lotniczy i zbrojeniowy próbują wykorzystać prowadzony w komórkach zwierzęcych proces biosyntezy do wytwarzania białka o budowie zbliżonej do fibroiny. To duże białko o masie molekularnej ~ 150 kDa jest podstawowym składnikiem najbardziej wytrzymałego naturalnego włókna – włókna sieci pajęczej.

Badanie składu białek i produktów ich rozpadu pod kątem zawartości aminokwasów o konfiguracjach L i D znalazło zastosowanie w metodach datowania (stosowanych np.

kryminalistycy). Wykorzystuje się tu fakt, że procentowa zawartość aminokwasów o konfiguracji D wyraźnie rośnie po ustaniu procesów fizjologicznych (śmierci organizmu). Pojawiają się też nowe technologie białkowe, które w połączeniu z planarną technologią krzemowych struktur scalonych pozwalają wytwarzać czułe urządzenia detekcyjne, tzw. biosensory. Stale wzrasta zainteresowanie nanostrukturami białkowymi, w których odpowiednie konfiguracje naturalnie występujących i wyizolowanych z komórek białek motorycznych, takich miozyna lub kinezyna, pozwalają osiągnąć zorganizowany transport molekul w tzw. nanoskali (nanomaszyny).

To tylko wybrane przykłady niektórych zastosowań wiedzy o białkach, które świadczą jednak o tym, że doświadczalne i teoretyczne badania białek stały się ostatnio zajęciem wybitnie interdyscyplinarnym. Oprócz biologów zaangażowani są w nie chemicy, informatycy i fizycy. W nauce o strukturze i dynamice białek wciąż są stawiane nowe, ważne pytania.

Bibliografia

-
- C. Branden i J. Tooze *Introduction to Protein Structure*, Garland Publishing, New York 1999;
 - A. M. Brzozowski *Zastosowanie dyfrakcji promieni Roentgena do badań struktury biomolekul. Struktura białek globularnych*, w: *Biospektroskopia*, t. 1, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 1989;
 - T. E. Creighton *Proteins: Structures and Molecular Properties*, W.H. Freeman and Company, New York 1992;
 - K. H. Hauser i H. R. Kalbitzer *NMR w biologii i medycynie*, Wydawnictwo Naukowe UAM, Poznań 1993;
 - D. J. Kosman *Physical Techniques in Biology and Medicine — Structural and Resonance Techniques in Biological Research*, Academic Press, Inc. 1984;
 - A. R. Leach *Molecular Modelling — Principles and Applications*, Addison Wesley Longman, Essex 1996;
 - A. M. Lesk *Introduction to Protein Architecture*, Oxford University Press, Oxford 2001;
 - D. Marsh *Biological Magnetic Resonance* Vol. 1, New York 1989;
 - L. Stryer *Biochemia*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 1997;
 - K. Zakrzewski *Białka*, w: *Encyklopedia Fizyki Współczesnej*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 1983;