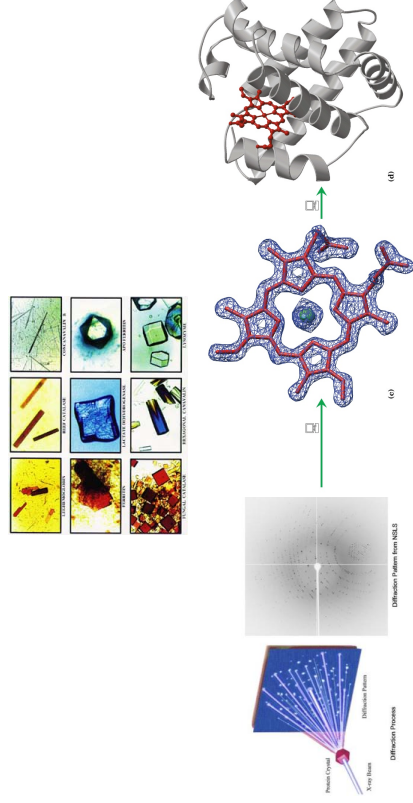


Fehérjék szerkezetének kialakulása

Osváth Szabolcs

Semmelweis Egyetem
szabolcs.osvath@eok.sote.hu

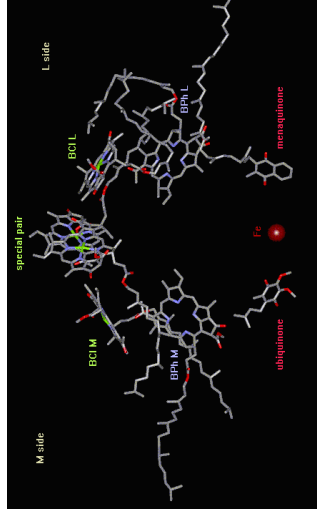
Röntgen kristallográfiás szerkezetmegállapítás



Szerkezet és működés kapcsolata

A molekuláris szinttől az ökoszisztémáig a biológiai rendszerek szerkezete és működése között nagyon szoros kapcsolat van.

Hartmut Michel, Johann Deisenhofer, Robert Huber
1982 – szerkezet meghatározás
1988 – Nobel díj



NMR szerkezetmegállapítás



Az Src fehérje 64 aminosavból álló SH3 doménjének NMR szerkezete

A natív szerkezetet stabilizáló kölcsönhatások

Rövid távú taszítás

Van der Waals kölcsönhatás

Elektrosztatikus kölcsönhatás

Hidrogénkötés

Hidrofób kölcsönhatás

Diszulfidhidak

Rövid távú taszítás

Az elektronpályák taszítása miatt kis távolságokon erős taszítás lép fel.

A távolság csökkenésével gyorsan ($\sim 1/r^{12}$) nő a kölcsönhatásból származó potenciális energia.

Meghatározott sugarú, kemény gömböknek tekinthetjük az atomokat (Van der Waals-sugár).

Van der Waals kölcsönhatás

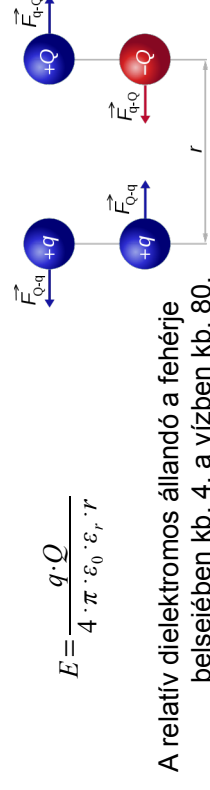
Bármely két atom között hatnak, az indukált dipólmomentumok kölcsönhatása miatt.

A kölcsönhatási energia távolságfüggése: $\sim 1/r^6$

Elektrosztatikus kölcsönhatás

A Coulomb-kölcsönhatás energiájának távolságfüggése:

$$E = \frac{q \cdot Q}{4 \cdot \pi \cdot \epsilon_0 \cdot \epsilon_r \cdot r}$$



A relatív diektromos állandó a fehérje belsejében kb. 4, a vízben kb. 80.

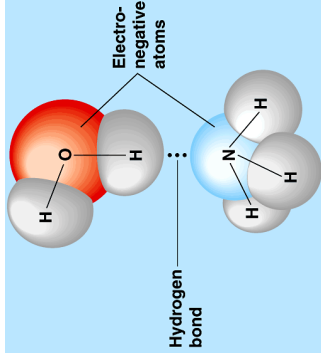
Sóhidak jöhetnek létre ionpárok között (Lys, Arg és Glu, Asp).

Vizes közegben a töltések körött nagyméretű hidrát burok van.

A vizes fázisban lévő mobilis ionok erősen árnyékolják a töltéseket.

Hidrogénkötés

Nagy elektronegativitású atomhoz kapcsolódó hidrogének között jön létre, nagyrészt elektrosztatikus kölcsönhatás.



Diszulfidhíd

A natív szerkezetet azáltal stabilizálja, hogy a kigomblyodott polipeptid lánc konformációs entrópiáját csökkenti:

$$\Delta S = -2,1 \text{ J/K} - 1,5 \cdot R \cdot \ln n$$

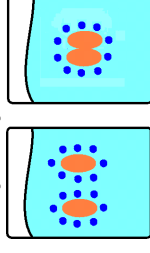
ahol n a két ciszteint elválasztó aminosavak száma.

Minél távolabbi aminosavak vannak összekapcsolva, annál nagyobb az entrópiaváltozás, és a stabilizáló hatás.

Hidrofób kölcsönhatás

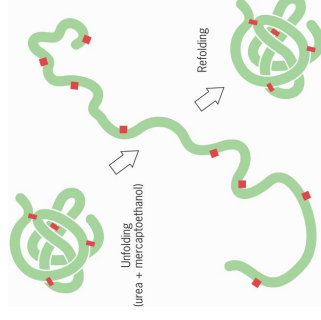
Ha apoláros molekulát vízbe teszünk, a víz az apoláros molekulával nem tud H-kötést képezni, ezért a víz az apoláros molekula körül erősen rendeződik. Ez nagy entrópiacsökkenést eredményez. Az entrópiacsökkenés arányos az apoláros molekula felszínével.

Ha a fehérje apoláros részei egymás mellé rendeződnek, a víznek kitett apoláros felszín csökken, a fehérje-víz rendszer entrópiája nő, a szabadentalpiája csökken. Ez a fehérje kompakt szerkezetbe szerveződésének fő hajtóereje



A hidrofób részek fenti egymásmellé rendeződési tendenciáját szokták hidrofób kölcsönhatásnak nevezni.

Anfinsen dogma



Ribonukleáz A-val végzett kísérlet

Christian B. Anfinsen

A 3D szerkezet kialakításához szükséges információ a fehérje szekvenciájában van kódolva

A fehérje gombolyodási probléma jelentősége

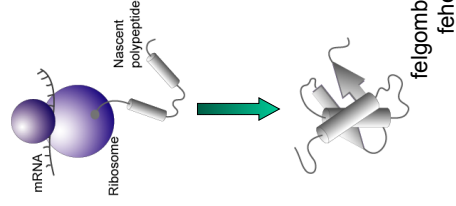
A molekuláris biofizika egyik legérdekesebb kérdése.

A genetikai adatbázisokat el tudjuk olvasni, de nem értjük a szavakat, a megértésükhöz a gombolyodási probléma megoldása a kulcs.

Mintegy két tucat konformációs betegség: bizonyos körülmények között rosszul gombolyodott fehérjék aggregálódnak és ú.n. amiloid plakkokat képeznek (pl. Creutzfeld-Jakob kór, Alzheimer-kór, Parkinson-kór)

Ko-transzlációs gombolyodás

in vivo



Az épp szintetizálódó fehérje C terminálisának 20-30 aminosavja a riboszómában van elrejtve, a gombolyodásban még nem vesz részt.

Az épp szintetizálódó fehérje előbukkanó N vége elkezd gombolyodni (másodlagos, harmadlagos szerkezeti elemek kialakulása, folding domének gombolyodása) még a szintézis teljes befejezése előtt.

In vitro és *in vivo* gombolyodás összehasonlítása

in vitro

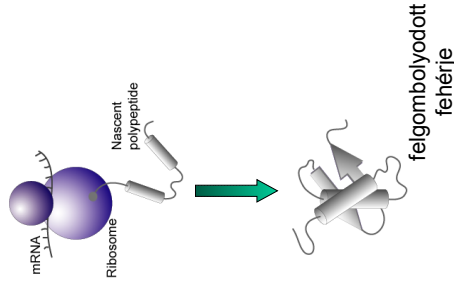


különbségek:

- az egész szekvencia kész van / szintézis közben gombolyodik (ko-transzlációs gombolyodás)
- a sejtbeli környezet „zsúfolt”

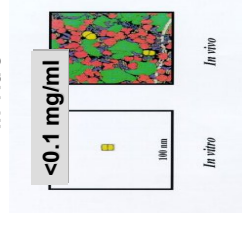
felgombolyodott fehérje

in vivo

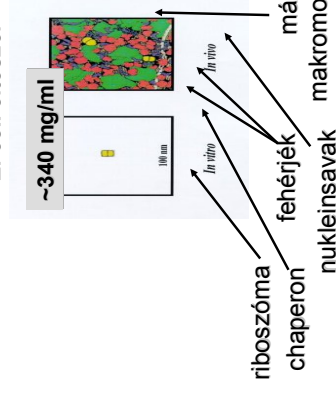


Molekuláris zsúfoltság

in vitro



E. coli citoszol



In vitro kísérletekben

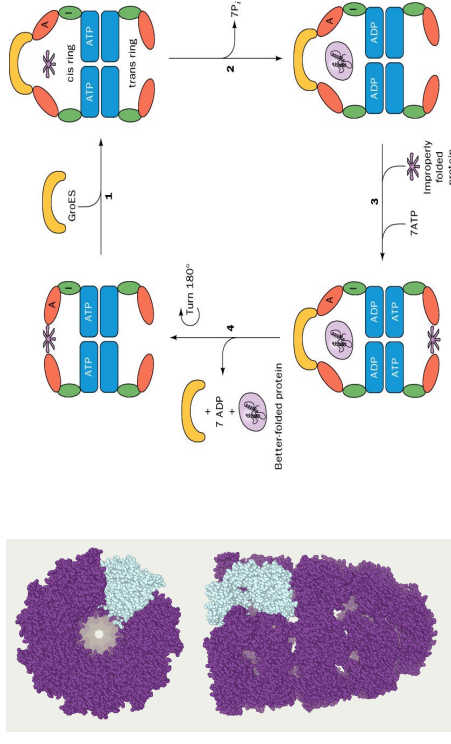
- hiányozhatnak kapcsolódó partner molekulák
- hiányozhatnak poszttranszlációs változtatások
- nagyon más lehet a fiziko-kémiai környezet, mint a sejtben

Molekuláris zsúfoltság hatása

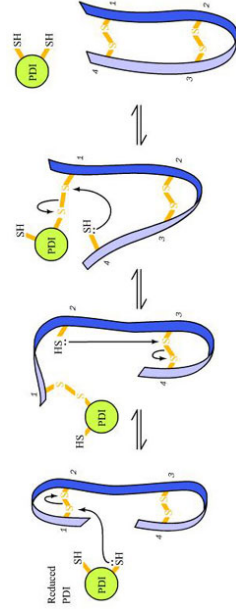
Molekuláris zsúfoltság: a térfogat (citoplazma) jelentős részét nem víz tölti ki, hanem más molekulák.

- disszociációs konstansok lecsökkennek
- megnövekszik a fehérje-fehérje kapcsolódás sebessége
- a denaturált vagy részlegesen denaturált fehérjék asszociációja meggyorsul.

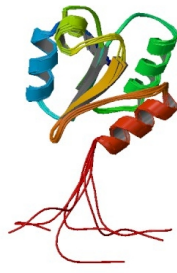
GroEL/ES chaperon szerkezete és működési ciklusa



A fehérje diszulfid izomeráz működése



humán protein diszulfid izomeráz szerkezete

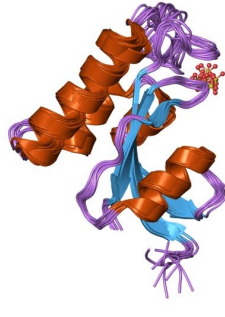
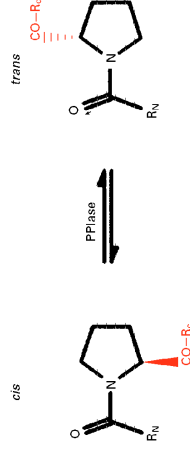


Prolin cisz-transz izomerizáció

A cisz és transz prolinhoz tartozó állapotokat elválasztó aktivációs gát miatt a cisz prolin jelenléte a natív szerkezetben:

- gyorsítja a kezdeti gyors gombolyodási lépéseket
- lassítja a natív szerkezet kialakulásának végső lépéseit.

PPIase (peptidyl-prolyl isomerase) katalizálja az izomerizációt.



PPIase szerkezete

A fehérje sorsa az eukarióta sejtben

citoszolfehérje szintézis, gombolyodás
 extracelluláris térfelgombolyodott fehérje export
 mitokondriumlimitált fehérje szintézis
 kloroplasztiszlimitált fehérje szintézis
 endoplazmatikus retikulum.....kigombolyodott fehérje import
 peroxiszómafelgombolyodott fehérje import
 sejtmagfelgombolyodott fehérje import
 lizoszóma.....kigombolyodott fehérje import

Levinthal paradoxona

Cyrus Levinthal

Vizsgáljuk egy 151 aminosavból álló fehérje gombolyodását.
 Tegyük fel, hogy mind a 150 kötés orientációja csak két
 értéket vehet fel, és hogy a kötések átfordulásának ideje
 10^{-13} s. Ha a fehérje véletlen bolyongással keresné a natív
 szerkezetét, $2^{150} \cdot 10^{-13}$ s = $4,6 \cdot 10^{24}$ év alatt találná meg (A Föld
 kialakulása óta eltelt idő: $4,6 \cdot 10^9$ év).

A fehérje fázistere túl nagy ahhoz, hogy a fehérje véletlen
 bolyongással találjon rá az aktív szerkezetre

Ideális véletlen lánc

Az ideális véletlen lánc olyan modellje a polimereknek,
 amelyekben a láncszemek tetszőlegesen foroghatnak
 egymáshoz képest, és a monomer egységek között minden
 kölcsönhatást elhanyagolunk.

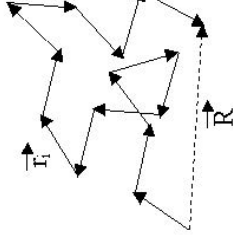
$$L = N \cdot l;$$

N darab l hosszú monomerből áll a lánc

L a lánc összes hossza

$$\langle R^2 \rangle = L \cdot l$$

$$R_G^2 = l^2 \cdot N / 6$$



Kinetikus útvonalak, intermedier állapotok

Minden fehérjére létezik egy szerkezet amelyik a legstabilabb.

A fehérje képes ezt az állapotot megtalálni egy kinetikus intermedier állapotokból kirajzolódó útvonalat követve.

Az intermedier állapotokban történő csapdázódás elkerülését
in vivo fehérje diszulfid izomerázok, peptidil prolin izomerázok
 és chaperonok segítik.

Energia felszín modellek (új szemlélet)

A fehérje minden egyes konformációjához rendeljünk hozzá az állapot szabadentalpiáját (Gibbs féle szabadenergia).

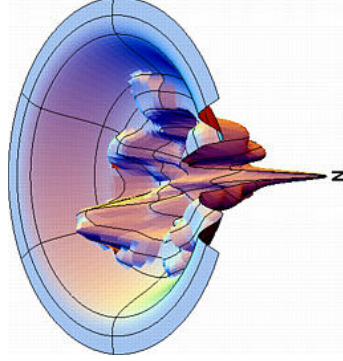
Állandó hőmérsékleten és nyomáson a rendszer az alacsonyabb szabadentalpia felé fog tartani.

A fehérje nem bolyongja be az egész fázisteret, hanem a kigombolyodott állapotból kiindulva egyre kisebb energiák felé tart.

Gödrös tölcser

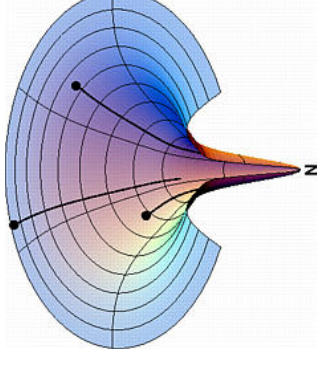
A kitekert állapotból a natív állapot felé igyekvő fehérje a gödrökben ideiglenesen csapdába tud esni.

Ez folding intermediér állapotok felhalmozódásához vezet.



Simafalú tölcser

A tölcser pereme a kitekert állapotokat jelenti, amelyekből kiindulva a rendszer a legalacsonyabb energiájú natív állapot felé igyekszik.



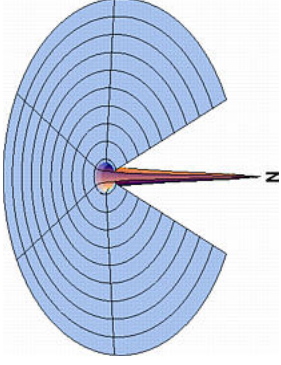
A régi és az új szemlélet összehasonlítása

régi szemlélet	új szemlélet
meghatározott útvonal	energiafelszín
jól elkülöníthető állapotok	állapotok sokasága
egymást követő lépések sorozata	párhuzamosan futó gombolyodási reakciók
klasszikus reakciókinetika alkalmazása fehérjékre	spinűvegekre kidolgozott statisztikus fizika alkalmazása fehérjékre

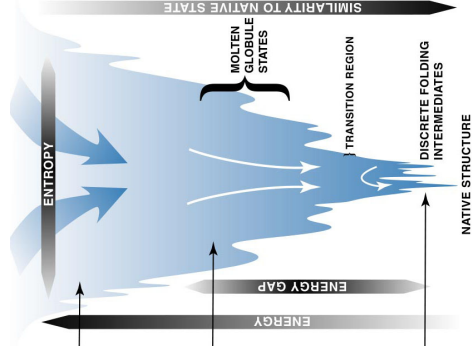
Levinthal paradoxonának energiefelszín megfogalmazása

A kitékért állapotok között nincs energiakülönbség, a felszín nem vezeti a molekulát a natív szerkezet felé.

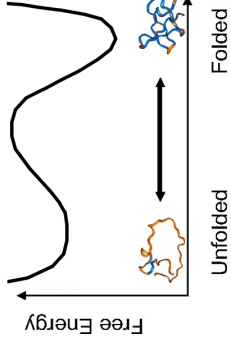
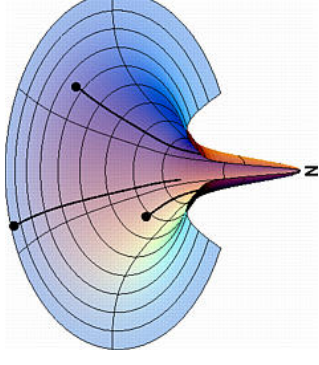
A natív szerkezet kialakulása csak a hatalmas fázistér véletlen bebarangolásával található meg.



Rendezettség kialakulása a gombolyodás során



Átlagolás a kevésbé fontos koordináták szerint



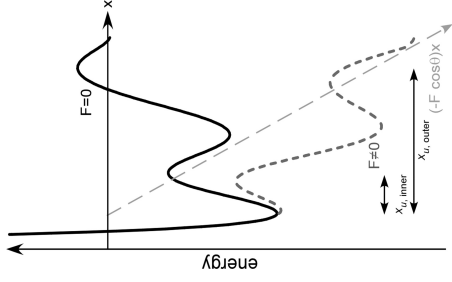
Olvadt gombóc állapotok

Oleg Ptitsyn megjósolta egy köztes állapot létezését amely:

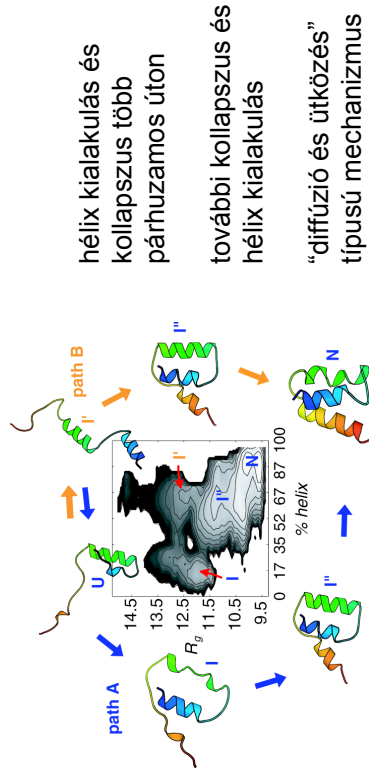
- kompakt, globuláris
- natív szerű másodlagos szerkezete van
- nonspecifikus hidrofób kölcsönhatások stabilizálják
- hasonlít a natív szerkezethez
- nincs merev harmadlagos szerkezete

Destabilizálás hatása az energiefelületre

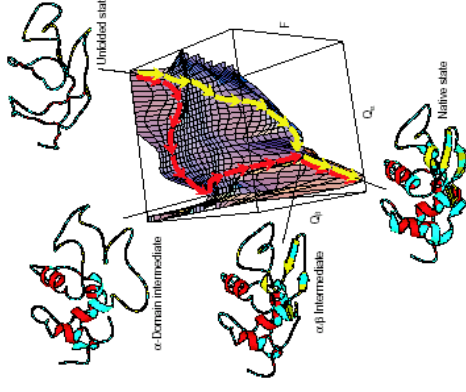
Mechanikai húzóerő hatása



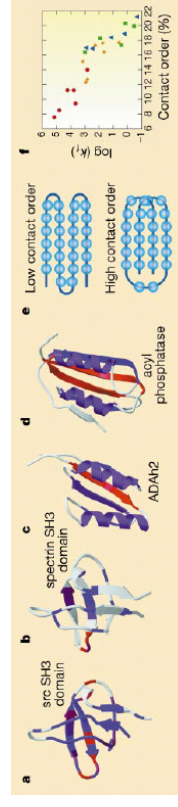
Egy kis fehérje gombolyodása több párhuzamos úton



Lizozim gombolyodásának energiefelület leírása

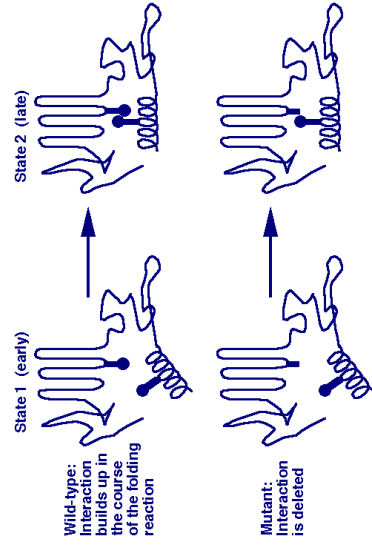


A natív szerkezet hatása a gombolyodás kinetikájára



A kisebb kontaktus rendű szerkezetek gyorsabban gombolyodnak, mint a magasabb kontaktus rendűek.
A korreláció a natív kontaktusok átlagos távolsága és gombolyodás sebessége között 6 nagyságrenden keresztül fennáll.

A tranziens állapot vizsgálata Φ érték analízissel



A tranziens állapot vizsgálata Φ érték analízissel

