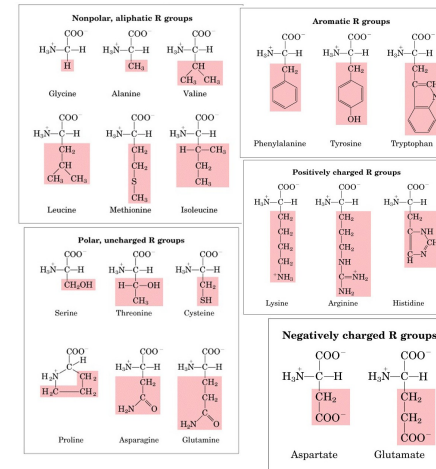


Fehérjék szerkezetének kialakulása

Osváth Szabolcs

Semmelweis Egyetem
szabolcs.osvath@eok.sote.hu

A fehérjéket felépítő hús standard aminosav



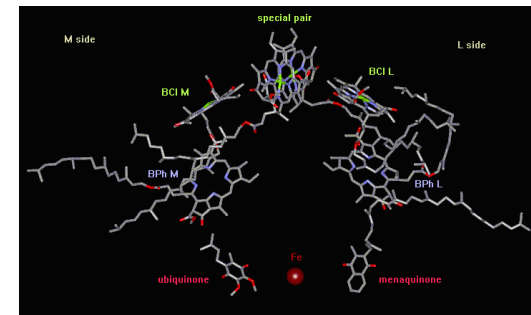
Biopolimerek

reakció	$t_{1/2}$ 25 °C-on	$t_{1/2}$ 100 °C-on	egy polimerben lévő kötések tipikus száma	hányfajta monomer
DNS hidrolízis	140 000 év	22 év	$3 \cdot 10^9$ (humán DNS)	4
RNS hidrolízis	4 év	9 nap	néhány tucat (tRNS)	4
fehérje hidrolízis	400 év	5.5 hét	néhány száz	20

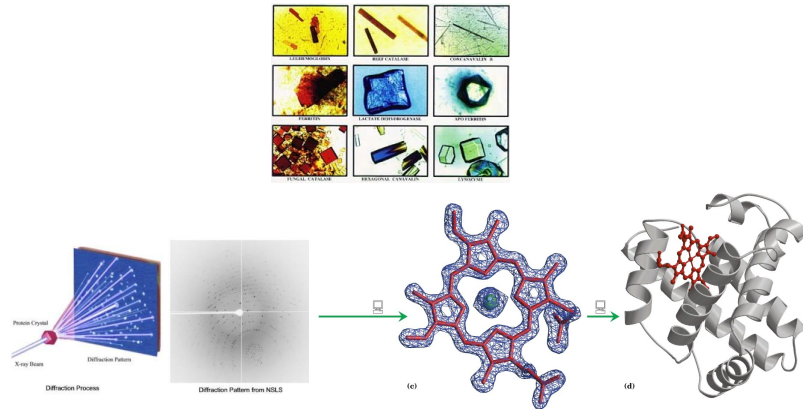
Szerkezet és működés kapcsolata

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



Röntgen krisztallográfiás szerkezetmegállapítás



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).

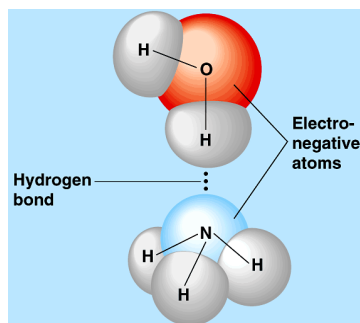
Van der Waals kölcsönhatás

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

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

Hidrogénkötés

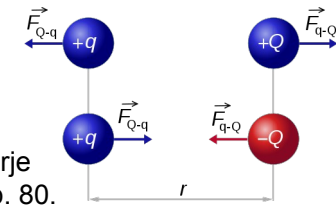
Nagy elektronegativitású atomhoz kapcsolódó hidrogének között jön létre, nagyrészt elektrosztatikus kölcsönhatás.



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 dielektromos állandó a fehérje belsejében kb. 4, a vízben kb. 80.

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

Vizes közegben a töltések körül nagyméretű hidrát burok van.

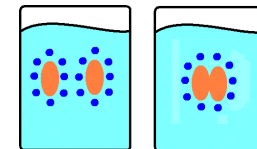
A vizes fázisban lévő mobilis ionok erősen árnyékolják a töltéseket.

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.



Diszulfidhíd

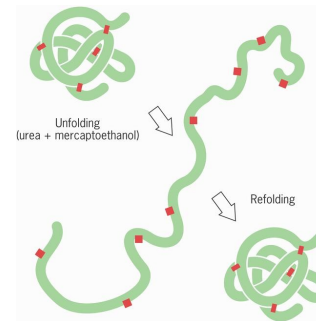
A natív szerkezetet azáltal stabilizálja, hogy a kigombolyodott polipeptid lánc konformációs entrópiáját csökkenti:

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

ahol n a két ciszteint elválasztó aminosavak száma.

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

Anfinsen dogma



Ribonukleáz A-val végzett kísérlet

Christian B. Anfinsen

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

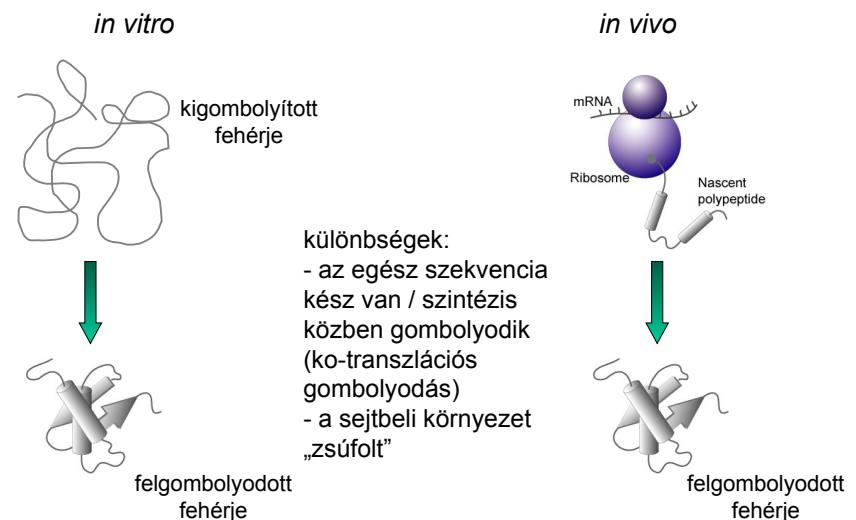
A fehérje gombolyodási probléma jelentősége

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)

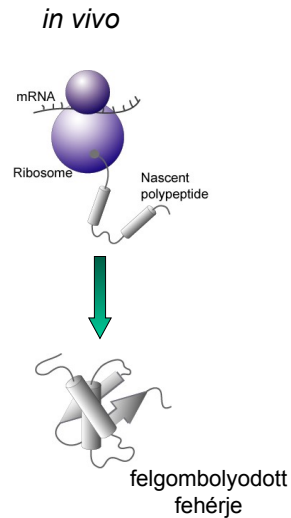
In vitro és *in vivo* gombolyodás összehasonlítása



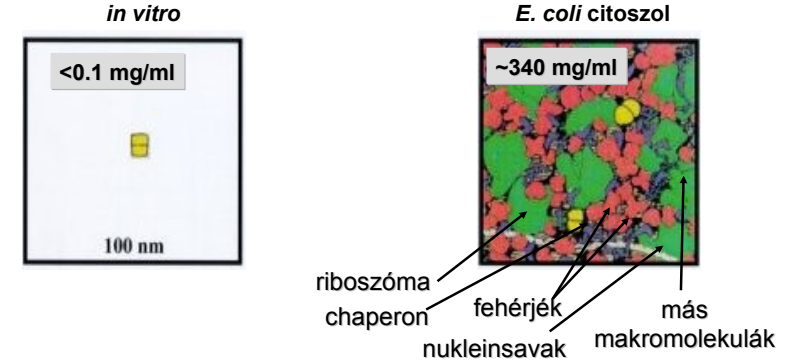
Ko-transzlációs gombolyodás

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 elkezdi gombolyodni (másodlagos, harmadlagos szerkezeti elemek kialakulása, folding domének gombolyodása) még a szintézis teljes befejezése előtt.



Molekuláris zsúfoltság



In vitro kísérletekben

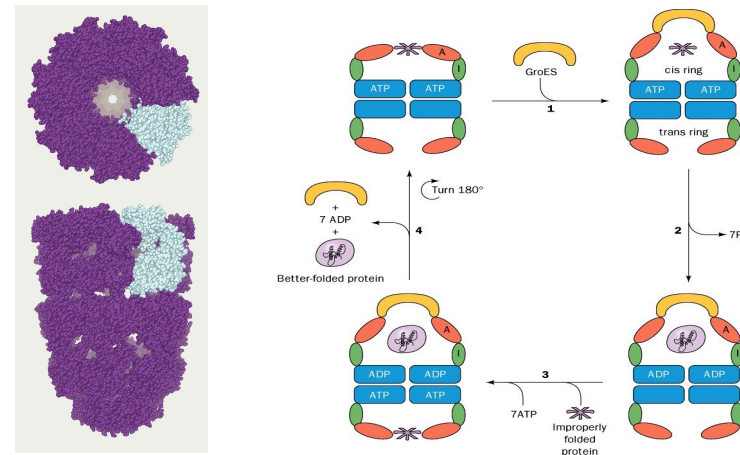
- hiányozhatnak kapcsolódó partner molekulák
- hiányozhatnak poszttranszlációs változtatások
- nagyon más lehet a fiziko-kémiai környezet, mint a sejtben

Molekuláris zsúfoltság hatása

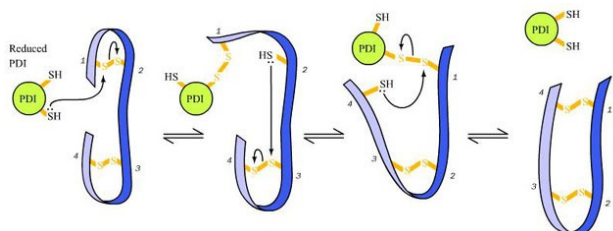
Molekuláris zsúfoltság: a térfogat (citoplazma) jelentős részét nem víz tölti ki, hanem más molekulák.

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

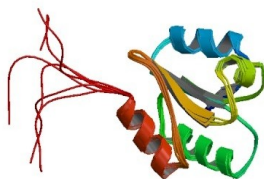
GroEL/ES chaperon szerkezete és működési ciklusa



A fehérje diszulfid izomeráz működése



humán protein diszulfid izomeráz szerkezete

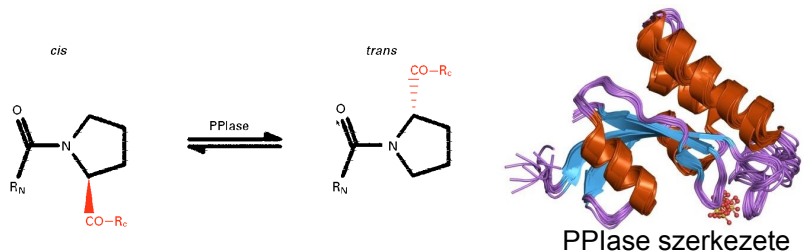


Prolin cisz-transz izomerizáció

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.



A fehérje sorsa az eukarióta sejtben

citoszol	fehérje szintézis, gombolyodás
extracelluláris tér	felgombolyodott fehérje export
mitokondrium	limitált fehérje szintézis
kloroplasztisz	limitált fehérje szintézis
endoplazmatikus retikulum.....	kigombolyodott fehérje import
peroxiszóma	felgombolyodott fehérje import
sejtmag	felgombolyodott fehérje import
lizoszóma.....	kigombolyodott fehérje import

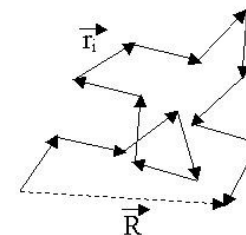
Ideális véletlen lánc

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

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

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



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

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.

Kinetikus útvonalak, intermedier állapotok

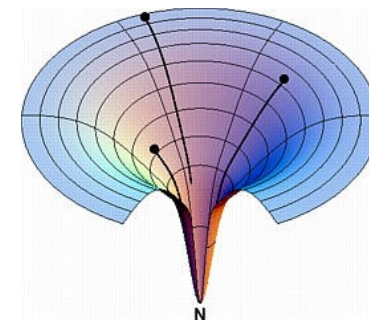
Minden fehérjére létezik egy szerkezet amelyik a legstabilabb.

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 prolil izomerázok és chaperonok segítik.

Simafalú tölcsér

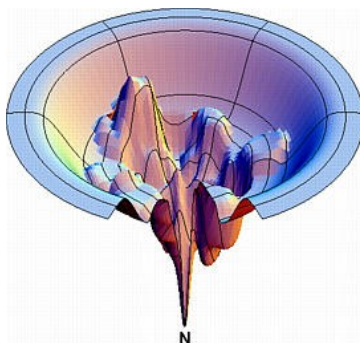
A tölcsér pereme a kitekért állapotokat jelenti, amelyekből kiindulva a rendszer a legalacsonyabb energiájú natív állapot felé igyekszik.



Gödrös tölcser

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

Ez folding intermediér állapotok felhalmozódásához vezet.



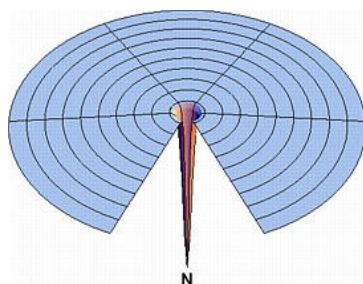
A régi és az új szemlélet összehasonlítása

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

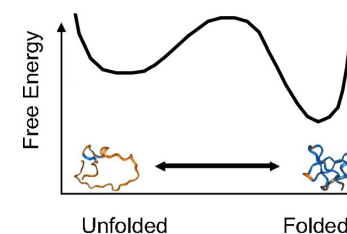
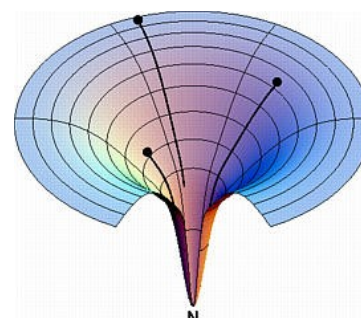
Levinthal paradoxonának energiafelszín megfogalmazása

A kitekert állapotok között nincs energiakülönbség, a felszín nem vezeti a molekulákat a natív szerkezet felé.

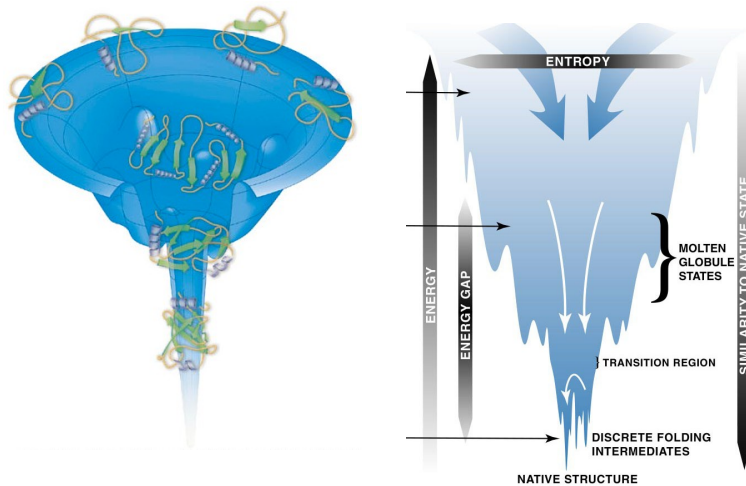
A natív szerkezet kialakulása csak a hatalmas fázistér véletlen bebarangolásával található meg.



Átlagolás a kevésbé fontos koordináták szerint



Rendezettség kialakulása a gombolyodás során



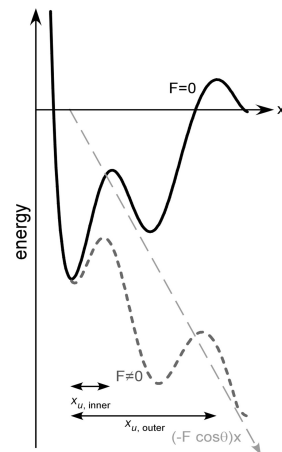
Olvadt gombóc állapotok

Oleg Ptitsyn megjósolta egy köztes állapot létezését amely:

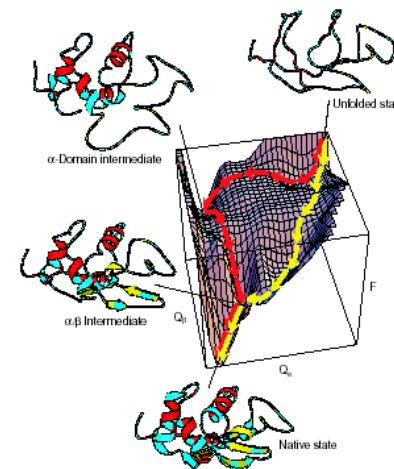
- kompakt, globuláris
- natív szerű másodlagos szerkezete van
- nonspecifikus hidrofób kölcsönhatások stabilizálják
- hasonlít a natív szerkezethez
- nincs merev harmadlagos szerkezete

Destabilizálás hatása az energiaszínre

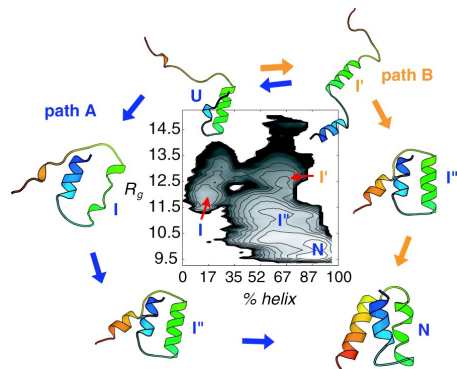
Mechanikai húzóerő hatása



Lizozim gombolyodásának energiaszín leírása



Egy kis fehérje gombolyodása több párhuzamos úton

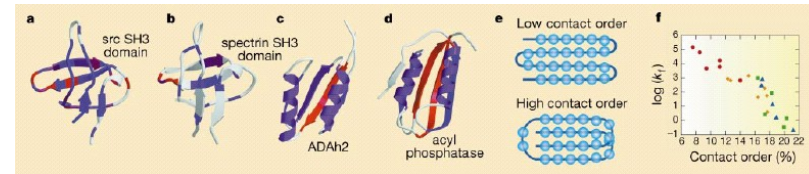


hélix kialakulás és
kollapszus több
párhuzamos úton

további kollapszus és
hélix kialakulás

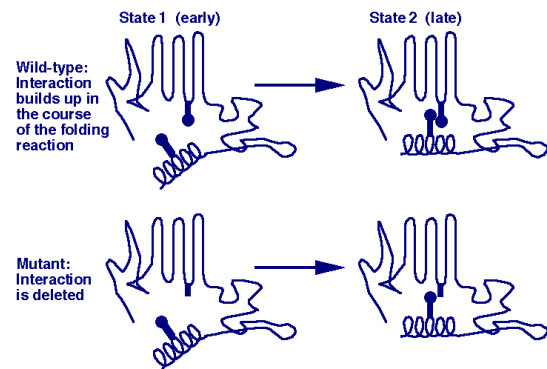
“diffúzió és ütközés”
típusú mechanizmus

A natív szerkezet hatása a gombolyodás kinetikájára

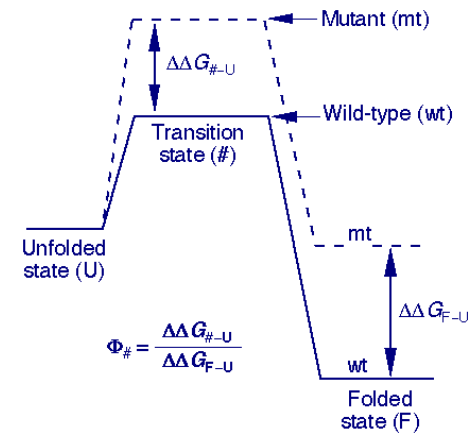


A kisebb kontaktus rendű szerkezetek gyorsabban gombolyodnak, mint a magasabb kontaktus rendűek. A korreláció a natív kontaktusok átlagos távolsága és gombolyodás sebessége között 6 nagyságrenden keresztül fennáll.

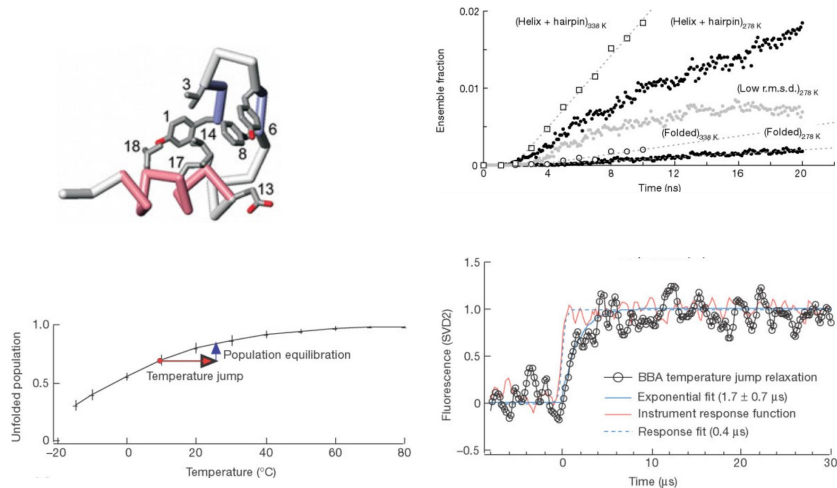
A tranziens állapot vizsgálata Φ érték analízissel



A tranziens állapot vizsgálata Φ érték analízissel



Kísérlet és elmélet: BBA5 minifehérje folding



Kísérlet és elmélet: PGK folding

$$C(t) = \sum_{n=1}^N \frac{a_n}{\tau_n} \exp\left\{-\frac{t}{\tau_n}\right\}$$

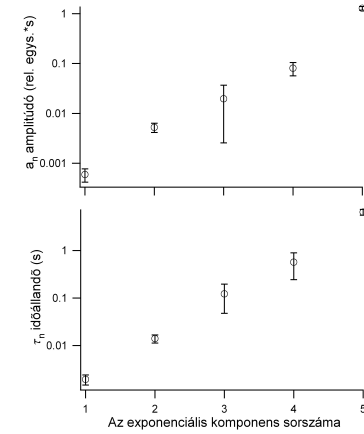
$$a_n = a_1 \cdot \alpha^{n-1} \quad (0 < \alpha < 1)$$

$$\tau_n = \tau_1 \cdot \lambda^{n-1} \quad (\lambda > 1)$$

$$N \rightarrow \infty$$

hatványfüggvény

$$C(t) \propto [1 + (t/\tau_1)]^{1 - \ln \alpha / \ln \lambda}$$



Kísérlet és elmélet: PGK folding

