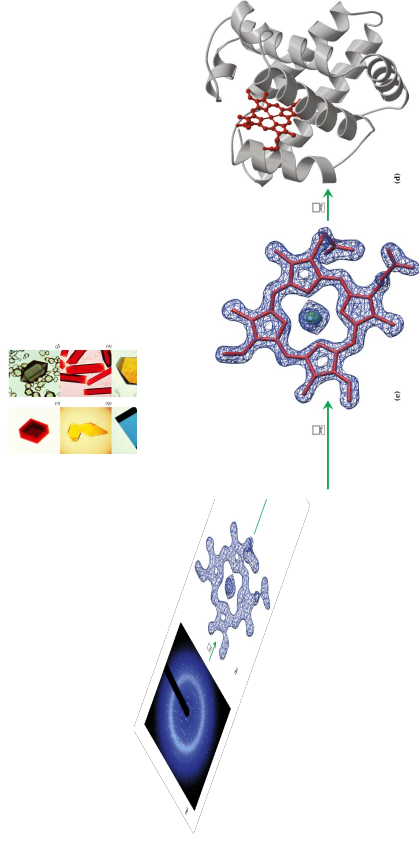


Fehérjék szerkezetének kialakulása

Osváth Szabolcs

Semmelweis Egyetem
szabolcs.osvath@eok.sote.hu

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 tasztítás

Az elektrorpályák tasztítása miatt kis távolságokon erős tasztítás lép fel.

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

Meghatározott sugarú, kemény gömböknnek tekinthetjük az atomokat (Van der Waals-sugar).

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:

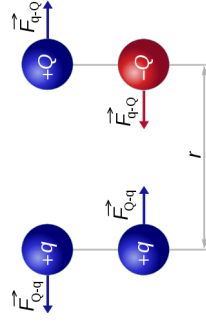
$$E = \frac{q \cdot Q}{4 \cdot \pi \cdot \epsilon_0 \cdot \epsilon_r \cdot r}$$

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

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

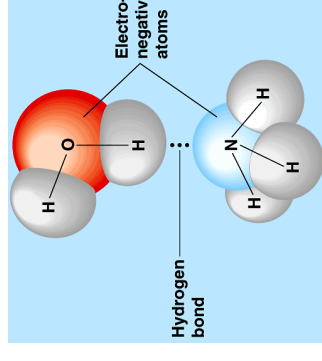
Vizes közegben a töltések között nagymértetű hidrát burok van.

A vizes fázisban lévő mobilis ionok erősen árnyékolják a töltéseket.



Hidrogénkötés

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

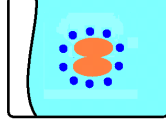
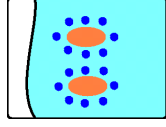


Hidrofób kölcsönhatás

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

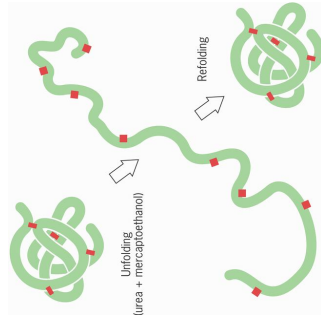
A natív szerkezetet azáltal stabilizálja, hogy a kigombolyodott polipeptid lánc konformációs entrópiáját csökkenti:

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

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.

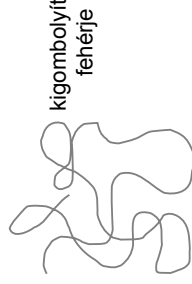
A genetikai adatbázisokat el tudjuk olvasni, de nem értjük a szavakat, a megértésükhöz a gombolyodási probléma megoldása a kulcs.

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

in vitro

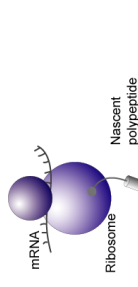


különbségek:

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

felgombolyodott
fehérje

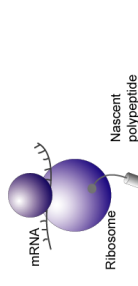
in vivo



felgombolyodott
fehérje

Ko-transzlációs gombolyodás

in vivo



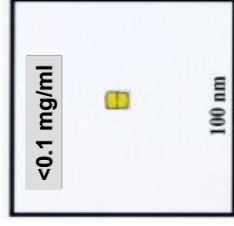
Az épp szintetizálódó fehérje C terminálisának 20-30 aminosavja a riboszómában van elrejtve, a gombolyodásban még nem vesz részt.

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

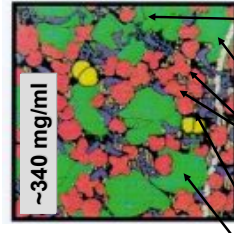


Molekuláris zsúfoltság

in vitro



E. coli citoszol



riboszóma
chaperon
nukleinsavak
fehérjék
más
makromolekulák

In vitro kísérletekben

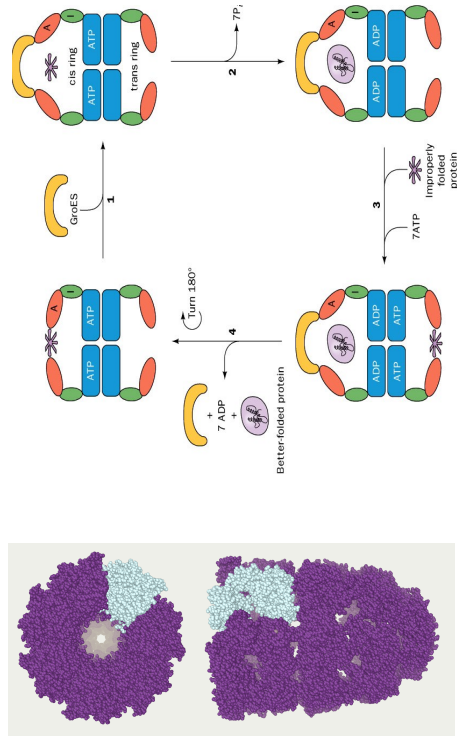
- hiányozhatnak kapcsolódó partner molekulák
- hiányozhatnak poszttranszlációs változtatások
- nagyon más lehet a fiziko-kémiai környezet, mint a sejtben

Molekuláris zsúfoltság hatása

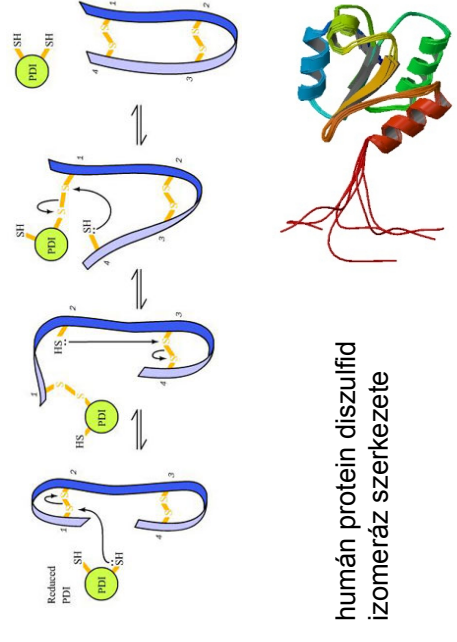
Molekuláris zsúfoltság: a térfogat (citoplazma) jelentős részét nem víz tölti ki, hanem más molekulák.

- 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

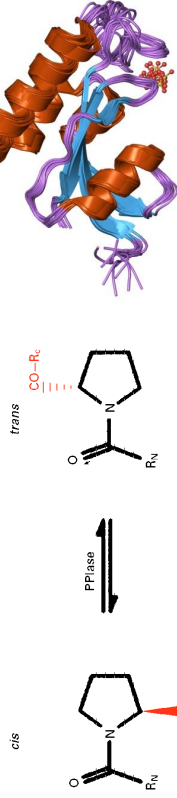


Prolin cisz-transz izomerizáció

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 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

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.

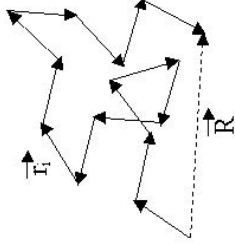
$$L = N \cdot l;$$

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

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.

Energia felszín modellek (új szemlélet)

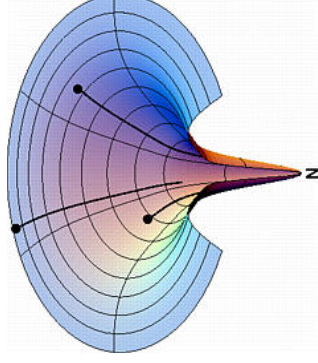
A fehérje minden egyes konformációjához rendeljünk hozzá az állapot szabadentalpiaját (Gibbs féle szabadenergia).

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

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

Simafalú tölcser

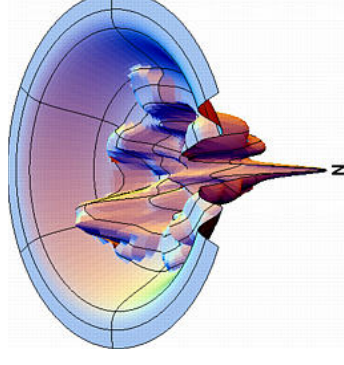
A tölcser pereme a kitekert állapotokat jelenti, amelyekből kiindulva a rendszer a legalacsonyabb energiájú natív állapot felé igyekszik.



Gödrös tölcser

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

Ez folding intermediér állapotok felhalmozódásához vezet.



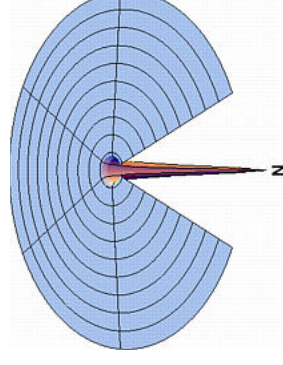
A régi és az új szemlélet összehasonlítása

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

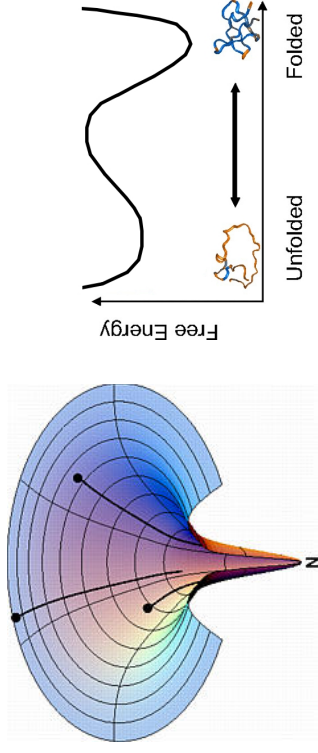
Levinthal paradoxonának energiefelszín megfogalmazása

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

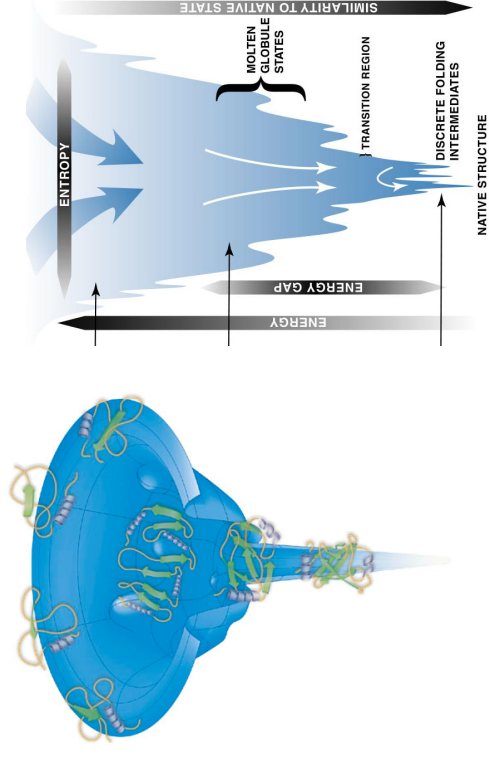
A natív szerkezet kialakulása csak a hatalmas fázistér véletlen bebarangolásával található meg.



Átlagolás a kevésbé fontos koordináták szerint



Rendezettség kialakulása a gombolyodás során

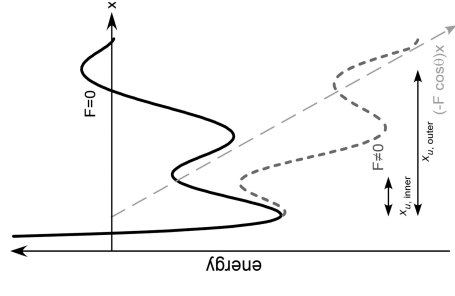


Olvadt gombóc állapotok

Oleg Ptitsyn megjósolta egy köztes állapot létezését amely:

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

Destabilizálás hatása az energiaszínre



Mechanikai húzóerő hatása