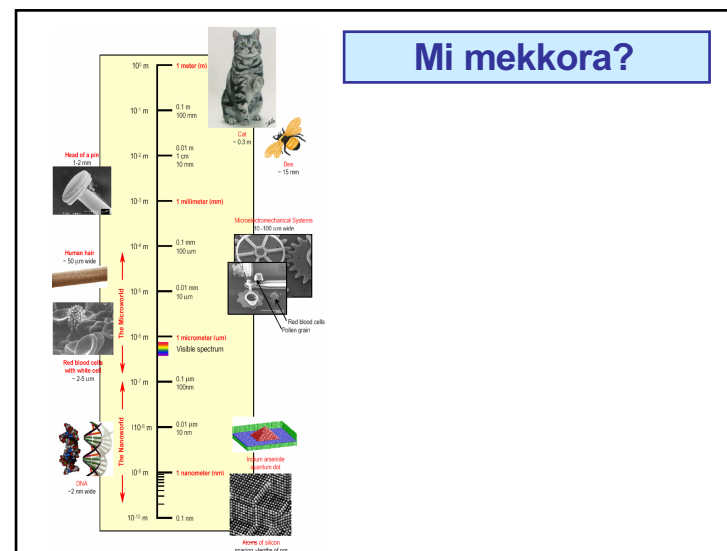


Fehérjék a Biológiába és a Nanotechnológiában

Osváth Szabolcs

Semmelweis Egyetem

osvath.szabolcs@med.semmelweis-univ.hu



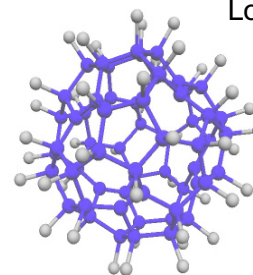
“Plenty of Room at the Bottom”

" The principles of physics, as far as I can see, do not speak against the possibility of maneuvering things atom by atom. It is not an attempt to violate any laws; it is something, in principle, that can be done; but in practice, it has not been done because we are too big."

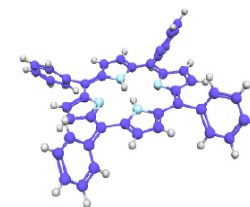
Richard Feynman, 1959

Hullám részecske kettősség

Louis De Broglie: $\lambda = h/p$



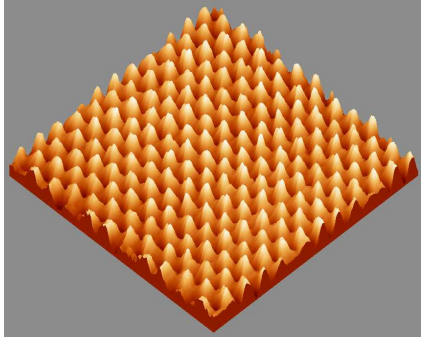
fluorofullerén
 $C_{60}F_{48}$
1632 Da



tetrafenilporfirin $C_{44}H_{30}N_4$

L Hackermuller, S Utenthaler, K Hornberger, E Reiger, B Brezger, A Zeilinger, M Arndt; Phys. Rev. Lett. 91 (2003) 90408

Hullám részecske kettősség



Scanning Tunneling Microscope (STM) kép

Nanotechnológia

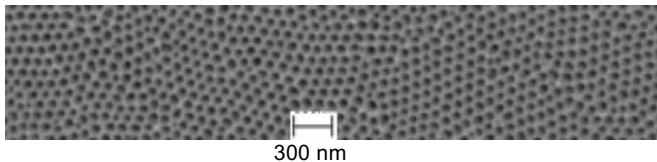
Nanotechnológia: Az 1 nm – 100 nm mérettartományba eső anyagok (részecskék) létrehozása és felhasználása.

Nanobiotechnológia: a nanotechnológia alkalmazása a biológiai alapkutatásban, diagnosztikában és gyógyításban.

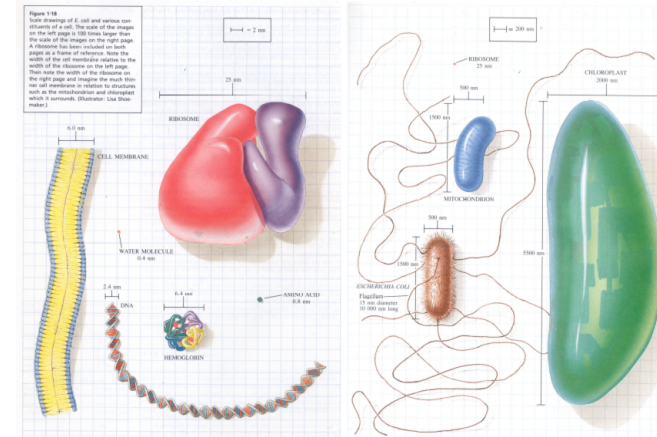
A nanotechnológia elnevezés Norio Taniguchi nevéhez köthető (1974).

A nanotechnológia két megközelítésmódja

Top-down: Egy makroszkopikus darabból kiindulva jutunk el a mikroszkopikus méretig a fölösleges részek eltávolításával (pl. nanopórusok készítése alumíniumoxidban elektrokémiai maratással.)

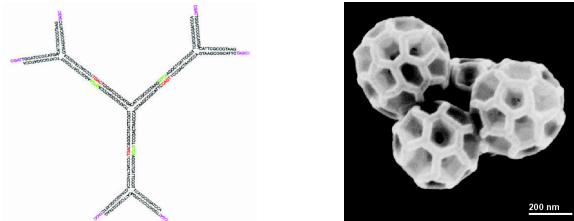


Életfolyamatok - nanotechnológia

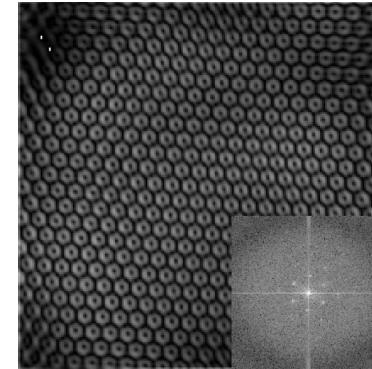


A nanotechnológia két megközelítésmódja

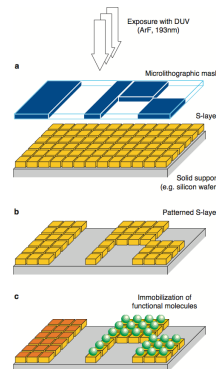
Bottom up: Atomonként vagy molekulánként a részekből rakjuk össze a nanoeszközt (pl. DNS molekulák önszerveződése „futballlabdákká”).



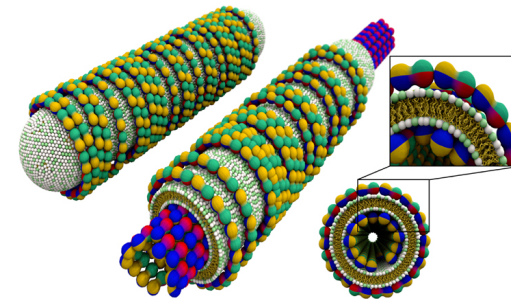
Természetes nanostruktúrák S-layer fehérjéből (TEM felvétel)



Nanostruktúrák litográfiája S-layer fehérjével

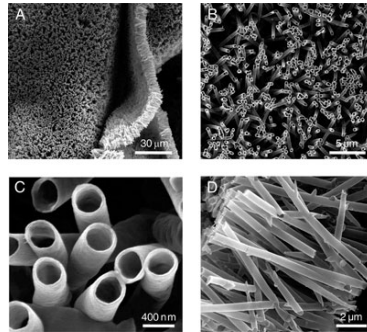


Gyógyszert szállító nanocsövek tubulinból és lipidekből

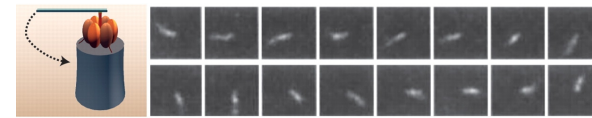


HSA nanocsövek

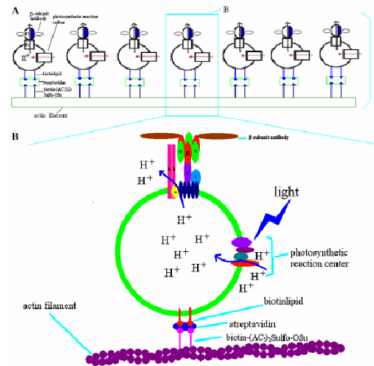
Humán Szérum Albuminból (HSA) nanoporózus polikarbonát membránon növesztett nanocsövek.



F₁-ATPáz által hajtott nikkel propeller



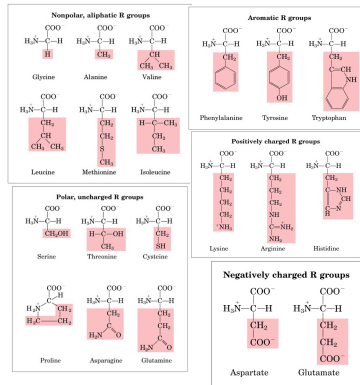
Fénnyel működtetett úszó szerkezet



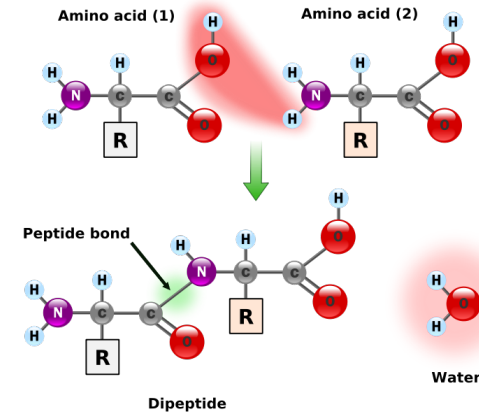
Biopolimerek

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

A fehérjéket felépítő hús standard aminosav



A peptidkötés



Fehérjék szerepe élő rendszerekben

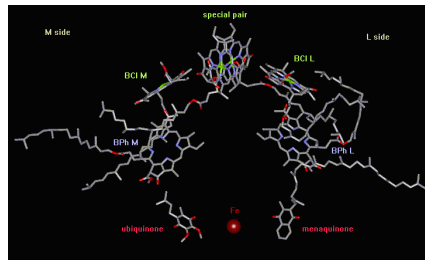
- kémiai katalízis
- transzport
- energia átalakítás és tárolás
- koordinált mozgás
- mechanikai váz
- immunválasz
- molekuláris felismerés
- információ továbbítás
- génreguláció
- növekedés és differenciálódás

Fehérjék szerkezetének kialakulása

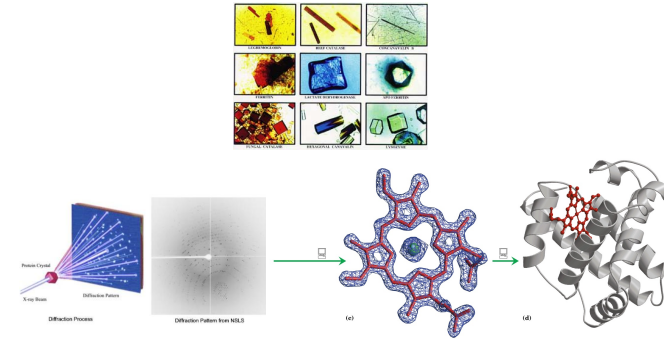
Szerkezet és működés kapcsolata

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

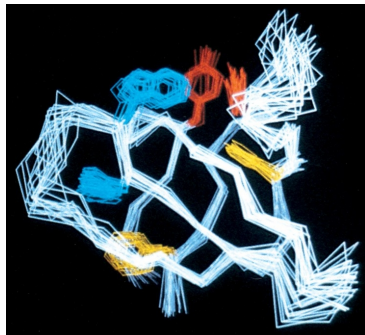
Hartmut Michel, Johann Deisenhofer, Robert Huber
1982 – szerkezet meghatározás
1988 – Nobel díj



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 tasztítás

Az elektronpályák 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 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:

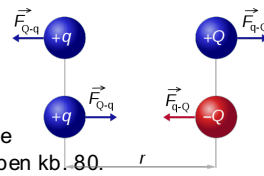
$$E = \frac{q \cdot Q}{4\pi\epsilon_0\epsilon_r \cdot r}$$

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

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

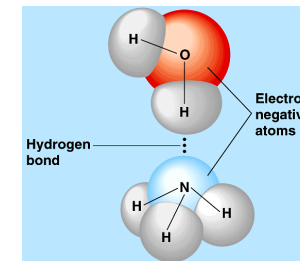
Vizes közegben a töltések körött nagyméretű hidrat burok van.

A vizes fázisban lévő mobilis ionok erősen árnyékolják a töltéseket.



Hidrogénkötés

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

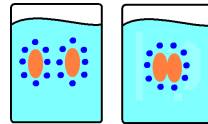


Hidrofób kölcsönhatás

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

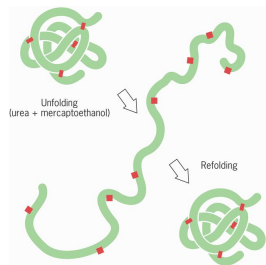
A natív szerkezetet azáltal stabilizálja, hogy a kigombolyodott polipeptid lánc konformációs entrópiáját csökkenti:

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

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

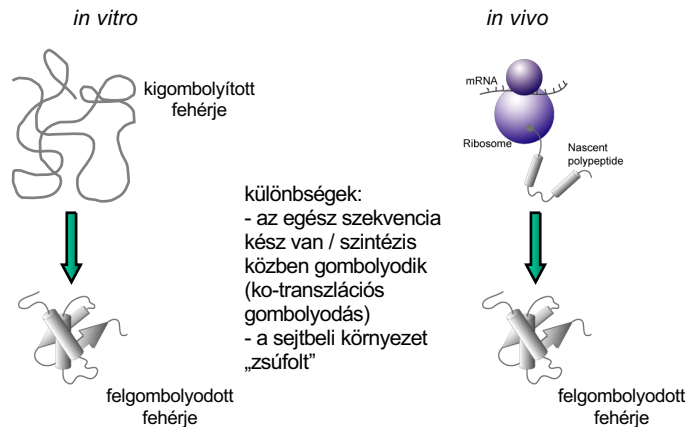
A fehérje gombolyodási probléma jelentősége

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 ún. amiloid plakkokat képeznek (pl. Creutzfeld-Jakob kór, Alzheimer-kór, Parkinson-kór)

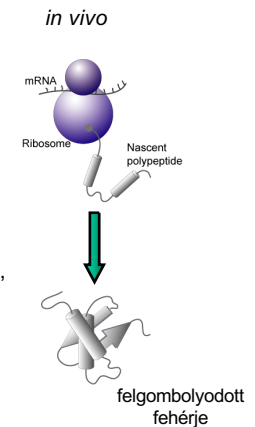
***In vitro* és *in vivo* gombolyodás összehasonlítása**



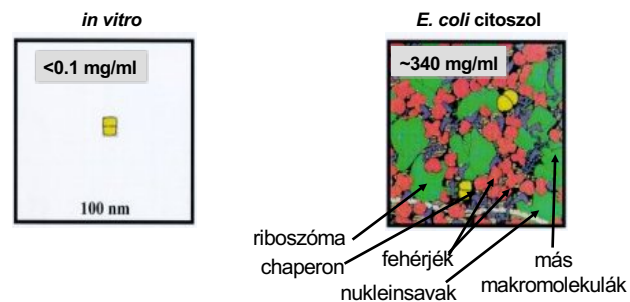
Ko-transzlációs gombolyodás

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



Molekuláris zsúfoltság



In vitro kísérletekben

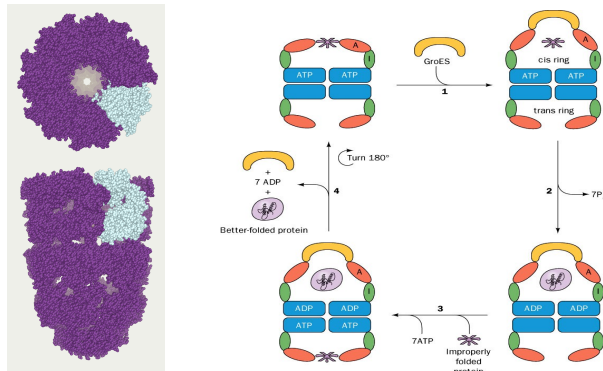
- hiányozhatnak kapcsolódó partner molekulák
- hiányozhatnak poszttranszlációs változtatások
- nagyon más lehet a fiziko-kémiai környezet, mint a sejtben

Molekuláris zsúfoltság hatása

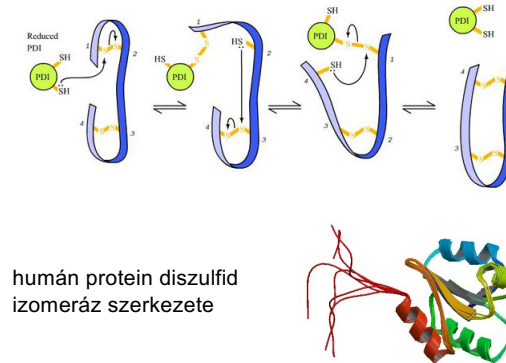
Molekuláris zsúfoltság: a térfogat (citoplazma) jelentős részét nem víz tölti ki, hanem más molekulák.

- 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

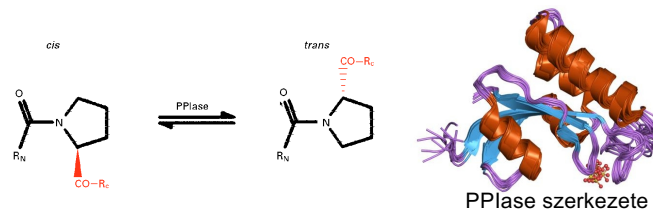


Prolin cisz-transz izomerizáció

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.



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, amelyikben a láncszemek tetszőlegesen foroghatnak egymáshoz képest, és a monomer egységek között minden kölcsönhatást elhanyagolunk.

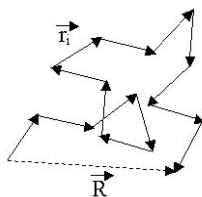
$$L = N \cdot l;$$

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 proil izomerázok és chaperonok segítik.

Energia felszín modellek (új szemlélet)

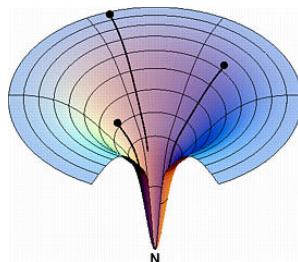
A fehérje minden egyes konformációjához rendeljünk hozzá az állapot szabadentalpiaját (Gibbs féle szabadenergia).

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

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

Simafalú tölcsér

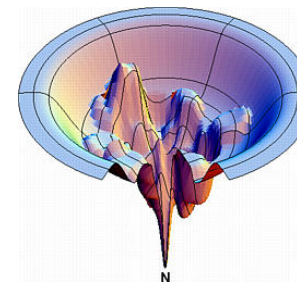
A tölcsér pereme a kitekert állapotokat jelenti, amelyekből kiindulva a rendszer a legalacsonyabb energiájú natív állapot felé igyekszik.



Gödrös tölcsér

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

Ez folding intermediér állapotok felhalmozódásához vezet.



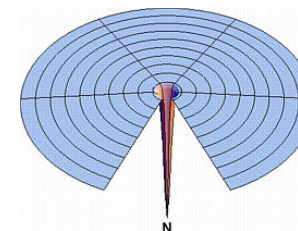
A régi és az új szemlélet összehasonlítása

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

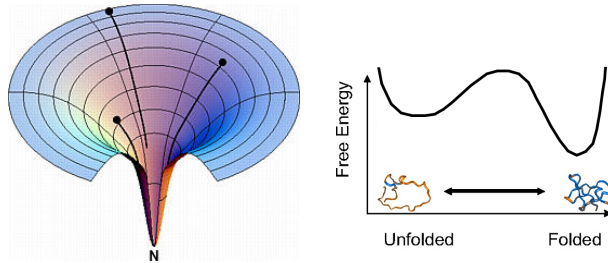
Levinthal paradoxonának energiafelszín megfogalmazása

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

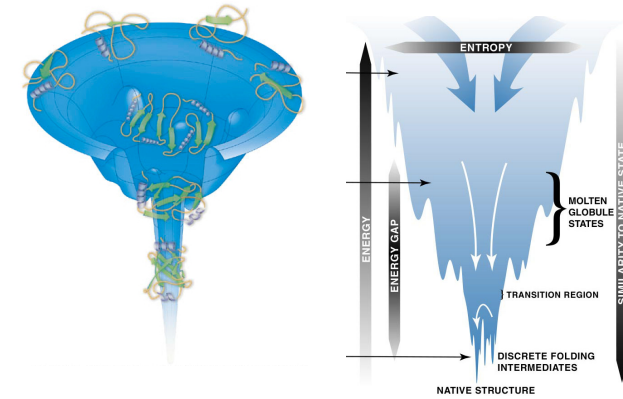
A natív szerkezet kialakulása csak a hatalmas fázistér véletlen bebarangolásával található meg.



Átlagolás a kevésbé fontos koordináták szerint



Rendezettség kialakulása a gombolyodás során



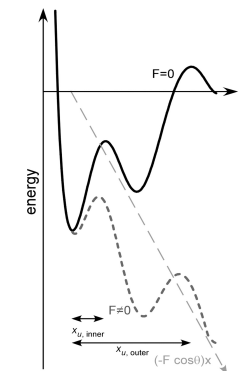
Olvadt gombóc állapotok

Oleg Ptitsyn megjósolta egy köztes állapot létezését amely:

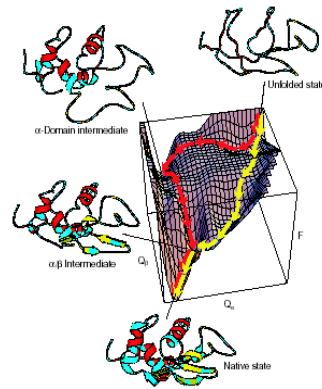
- kompakt, globuláris
- natív szerű másodlagos szerkezete van
- nonspecifikus hidrofób kölcsönhatások stabilizálják
- hasonlít a natív szerkezethez
- nincs merev harmadlagos szerkezete

Destabilizálás hatása az energiefelületre

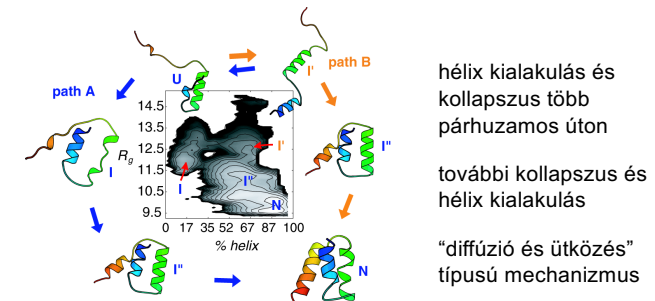
Mechanikai húzóerő hatása



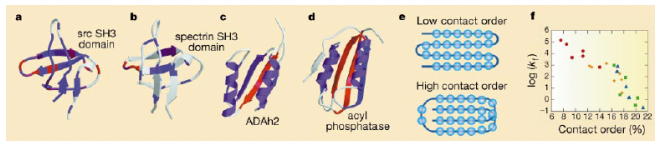
Lizozim gombolyodásának energiafelszín leírása



Egy kis fehérje gombolyodása több párhuzamos úton

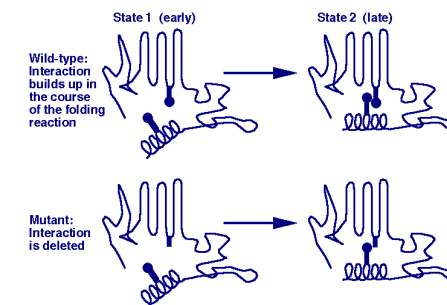


A natív szerkezet hatása a gombolyodás kinetikájára

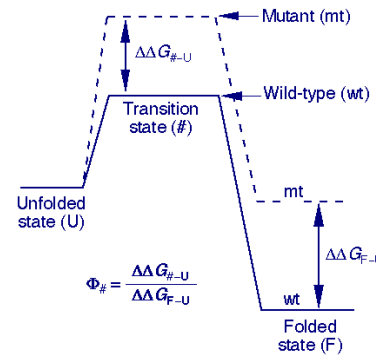


A kisebb kontaktus rendű szerkezetek gyorsabban gombolyodnak, mint a magasabb kontaktus rendűek. A korreláció a natív kontaktusok átlagos távolsága és gombolyodás sebessége között 6 nagyságrenden keresztül fennáll.

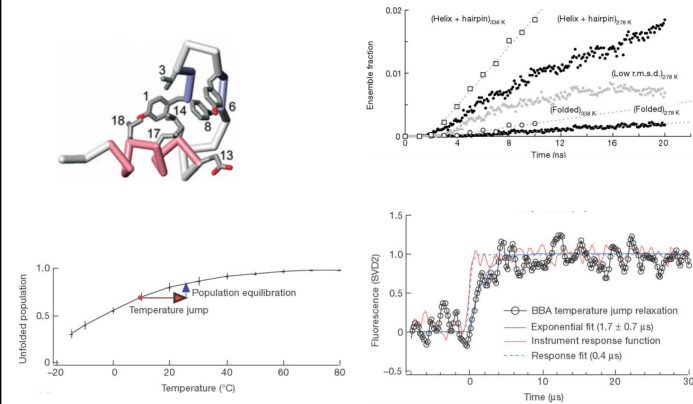
A tranzienst állapot vizsgálata Φ érték analízissel



A tranziens állapot vizsgálata Φ érték analízissel



Kísérlet és elmélet: BBA5 minifehérje folding



Kísérlet és elmélet: PGK folding

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

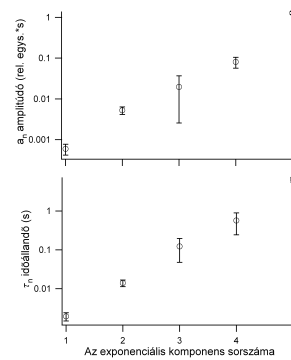
$$a_n = a_1 \cdot \alpha^{n-1} \quad (0 < \alpha < 1)$$

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

$$N \rightarrow \infty$$

hatványfüggvény

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



Kísérlet és elmélet: PGK folding

