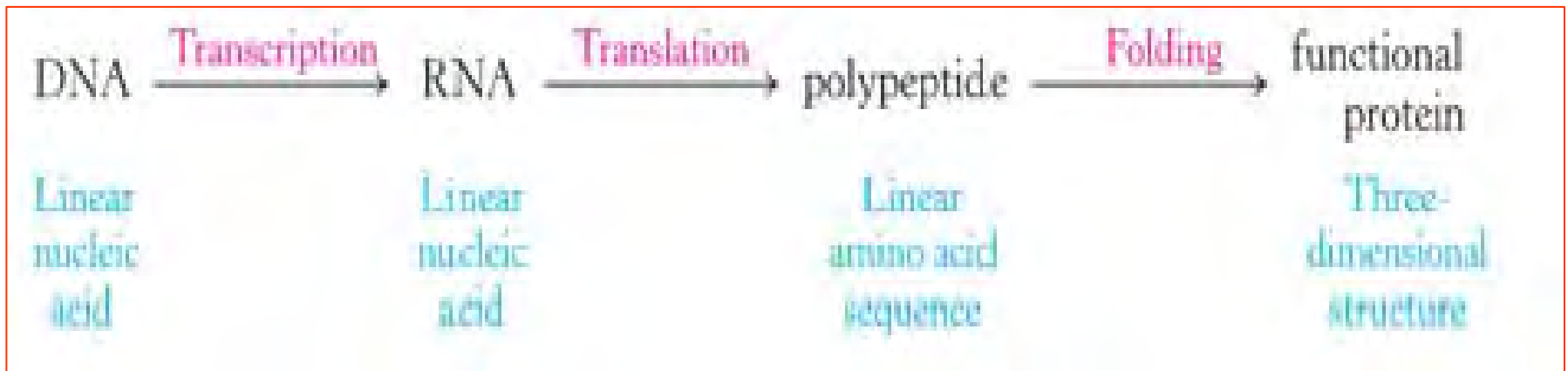


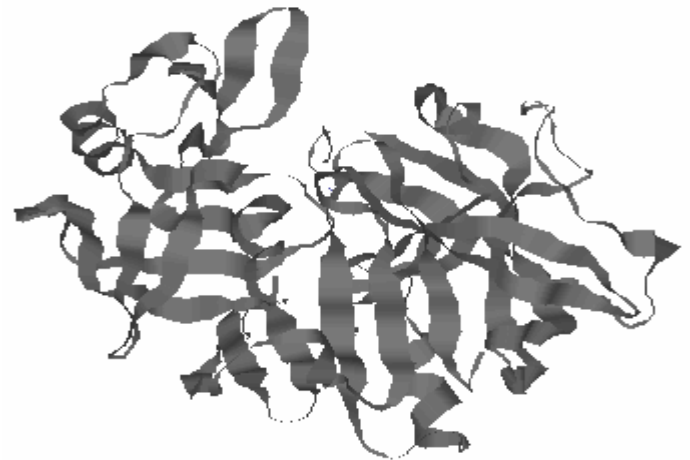
Konformacioni prelazi:

razvijanje (reversibilna denaturacija) i uvijanje proteina



Problem uvijanja proteina (The Protein Folding Problem)

- Data je određena aminokiselinska sekvenca (primarna struktura) kakva će biti terciјarna/kvaternarna struktura?
- Input: AAVIKYGICAL...
Output: $\phi_1\psi_1, \phi_2\psi_2\dots$



Sadržaj predavanja

- Zašto se nativni proteini (lako) denaturišu?
- Denaturanti i mehanizmi denaturacije
- Metode za praćenje razvijanja/uvijanja proteina se zasnivaju na razlikama u osobinama nativnog i razvijenog oblika proteina
- Kooperativna priroda razvijanja/uvijanja proteina
- Određivanje (relativne) konformacione stabilnosti

- Levinthalov paradoks
- Mehanizmi uvijanja proteina
 - mali globularni proteini
 - veliki proteini
- Uvijanje proteina in vivo:
 - molekulski šaperoni
 - konformacione bolesti

Zašto se nativni proteini (lako) denaturišu?

- Nativna konformacija je stabilnija od razvijene, ali je razlika mala:
 - Konformaciona stabilnost (ΔG) malih globularnih proteina:

-20 do - 40 kJ/mol.

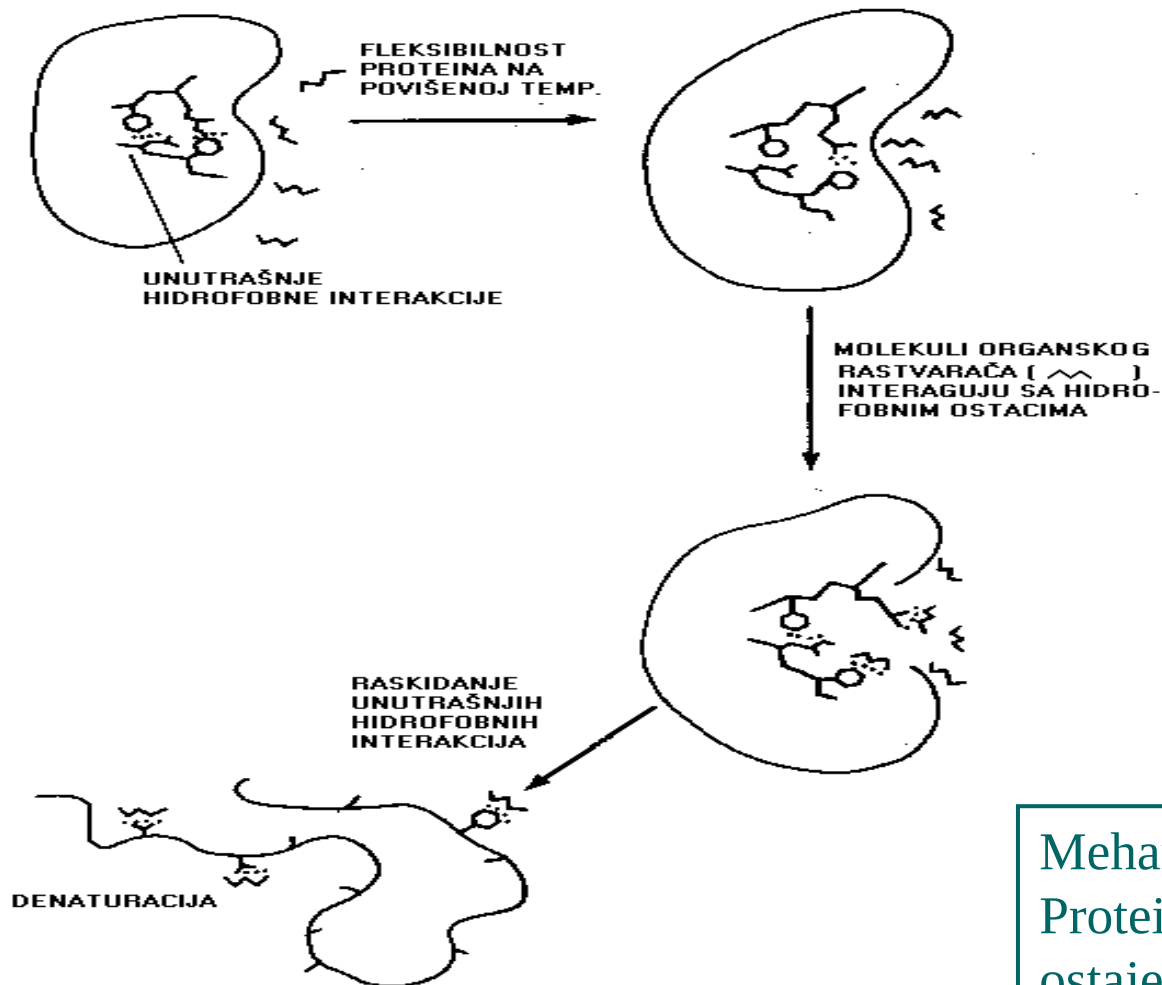
$$\Delta G_{\text{total}} = \Delta H_{\text{niz}} - (T\Delta S_{\text{niz}} + T\Delta S_{\text{vode}})$$
$$\Delta H_{\text{niz}} < 0 \quad \Delta S_{\text{vode}} > 0$$

- Promena spoljašnjih uslova (koji menjaju ΔH_{niz} i ΔS_{vode}) može da izazove razvijanje (denaturaciju) proteina.

Denaturanti

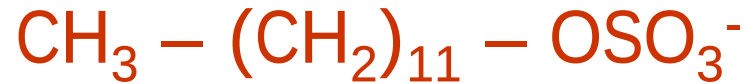
- Temperatura
- pH: promena jonizacionog stanja kritičnih aminokiselinskih ostataka
- Jonski ili polarni denaturanti: urea i guanidinium
- Visoke koncentracije organskih supstanci rastvornih u vodi
- Detergenti:
 - vezuju se jače/više za razvijeni oblik proteina

Denaturacija proteina organskim rastvaračima



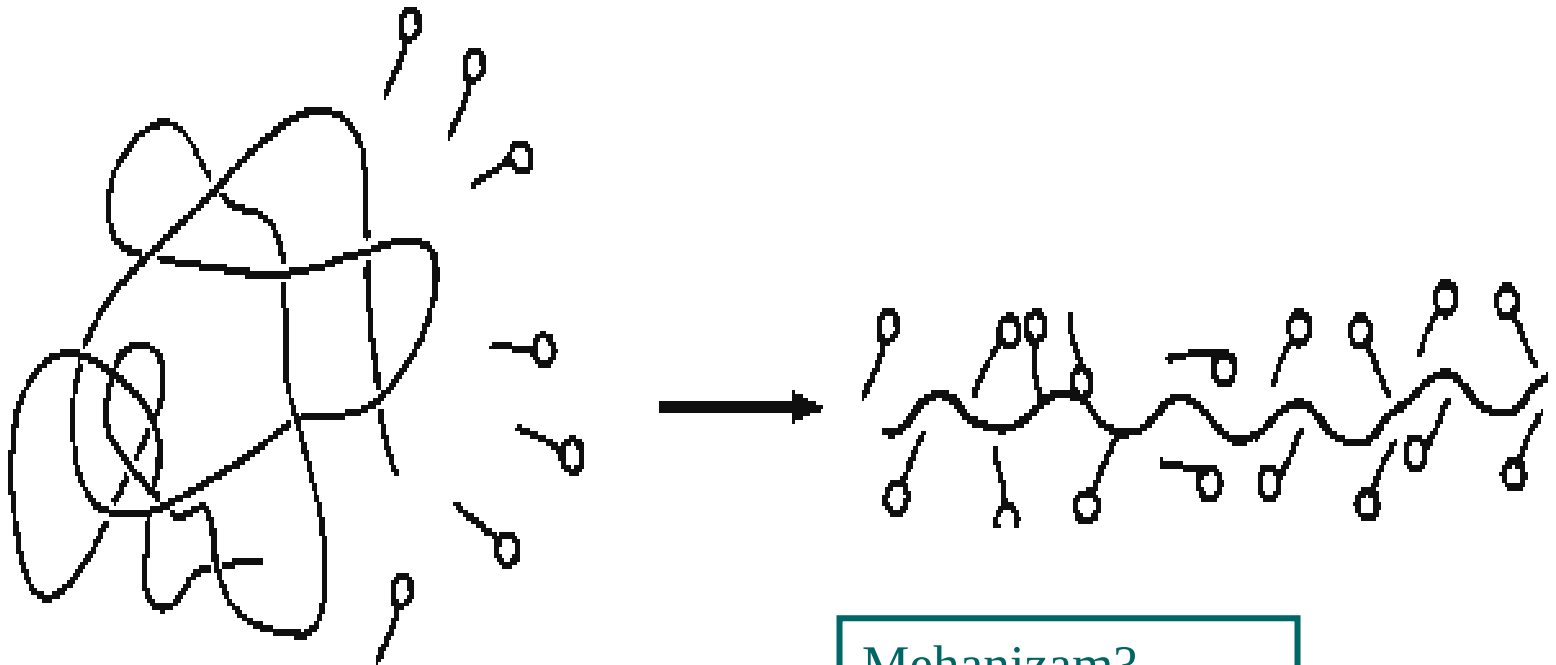
Mehanizam?
Protein se taloži ili
ostaje u rastvoru?

Detergenti: vezivanje SDS-a za molekul proteina



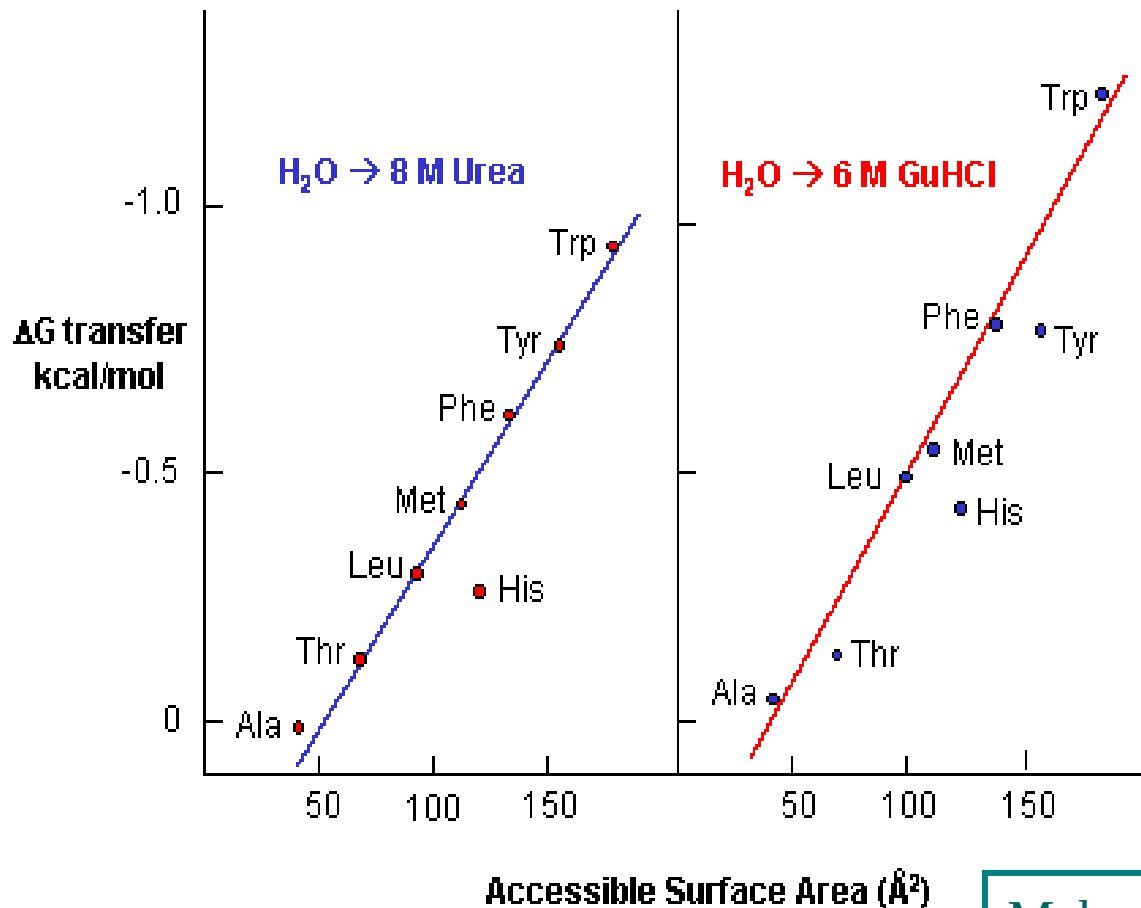
Nativni protein + SDS

Denaturisani polipeptid u formi negativno naelektrisanog štapića



Mehanizam?
Protein se taloži ili
ostaje u rastvoru?

Urea i guanidino hidrohlorid (GuHCl): haotropni agensi (povećavaju neuređenost vode!!!!)



Mehanizam?

Protein se taloži ili ostaje u rastvoru?

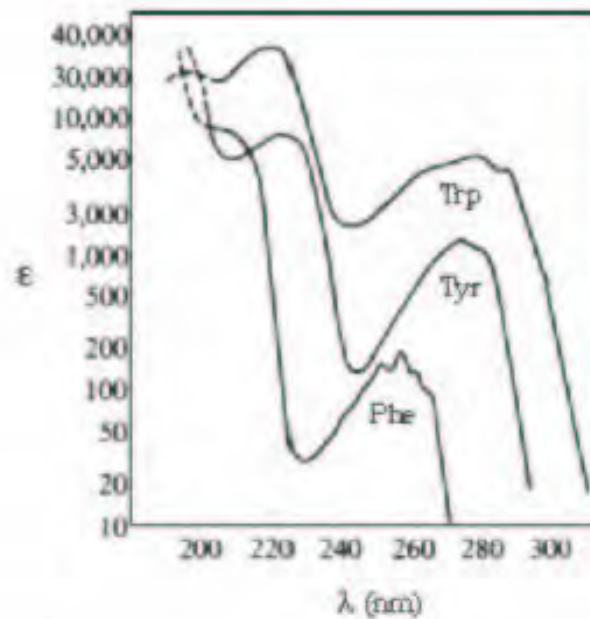
Metode za praćenje razvijanja/uvijanja proteina se zasnivaju na razlikama u osobinama nativnog i razvijenog oblika proteina

- Biološka aktivnost
- Rastvorljivost
- Kalorimetrija
- Optička aktivnost (ORD, CD)
- UV, fluorescentni, NMR spektri
- Reaktivnost aminokiselinskih ostataka
- Hidrodinamičke veličine (viskoznost, gel filtracija...)

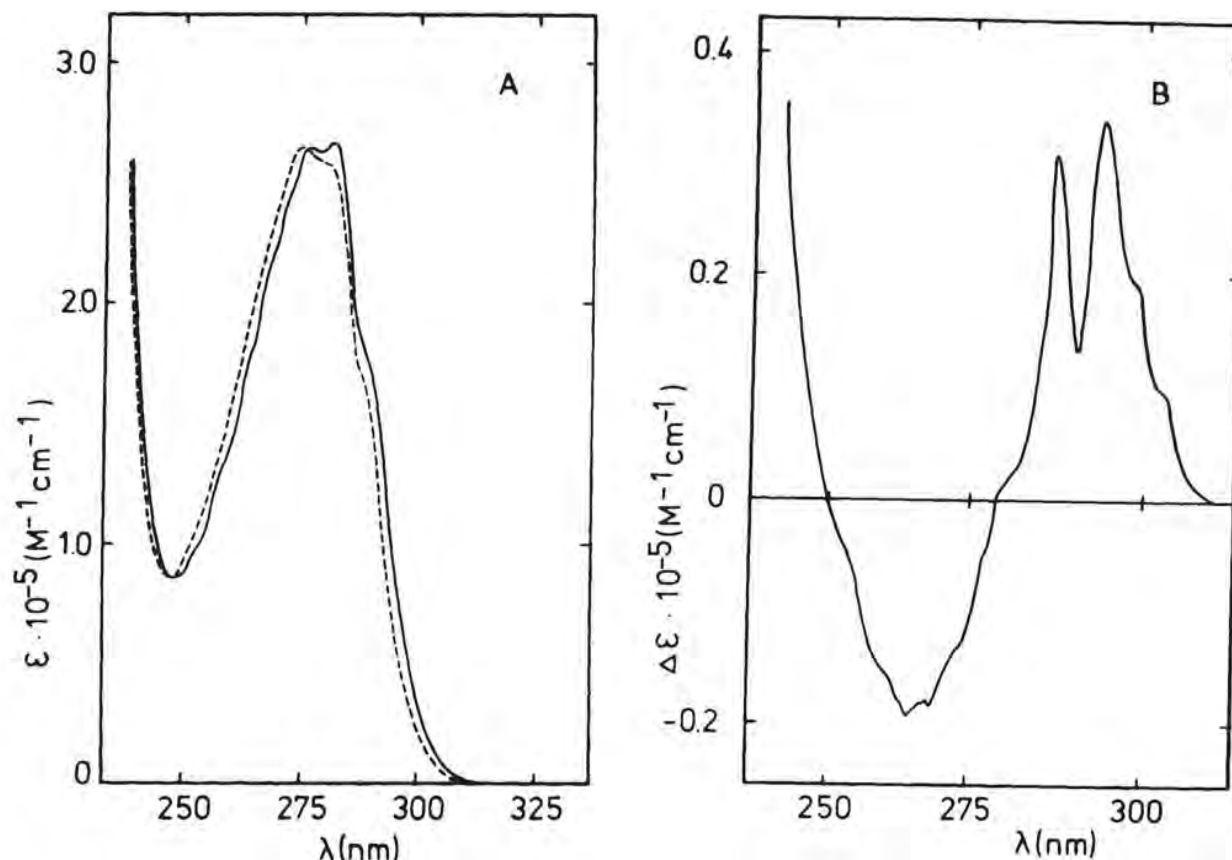
UV spektri Trp, Tyr i Phe

$$A = a(\epsilon) b c$$

Na absorptivnost ($a(\epsilon)$) utiče okolina/rastvarač!



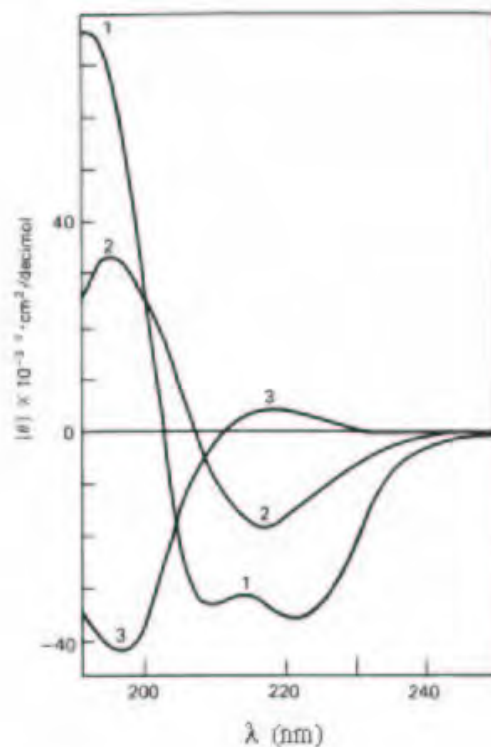
Slika 2.12: UV spektri Trp, Tyr i Phe u rastvoru neutralnog pH. Na ordinati, na kojoj je prikazana apsorptivnost (ϵ), data je logaritamska skala da bi spektri sve tri aminokiseline mogli zajedno da se prikažu. [Prema: D.B. Wetlaufer, *Adv. Protein Chem.*, **17**, 303 (1962).]



(A) Apsorpcioni spektar native (—) i denaturisane (+6M GuHCl) invertaze iz kvasca.

(B) Diferencijalni spektar izmedju native i razvijene invertaze (nativna invertaza se nalazi u kiveti za uzorak, a razvijena u referentnoj kiveti).

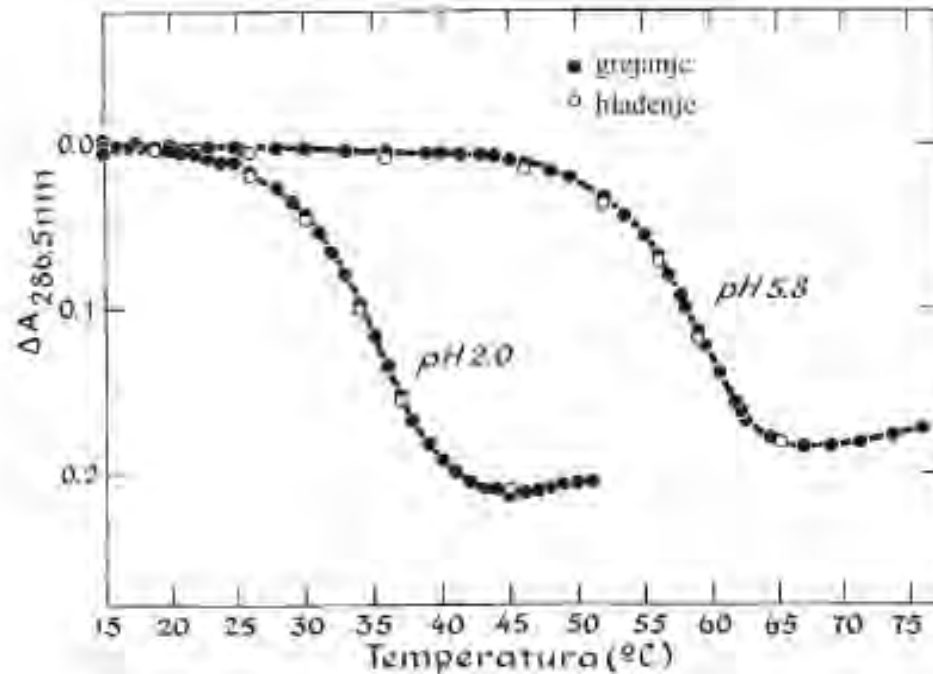
Optička aktivnost sekundarnih struktura



Slika 4.21: CD spektar poli-L-lizina u različitim konformacijama: kriva 1, 100% α -heliks; kriva 2, 100% nabrana β -pločica; kriva 3, neuredjeni razvijeni niz.

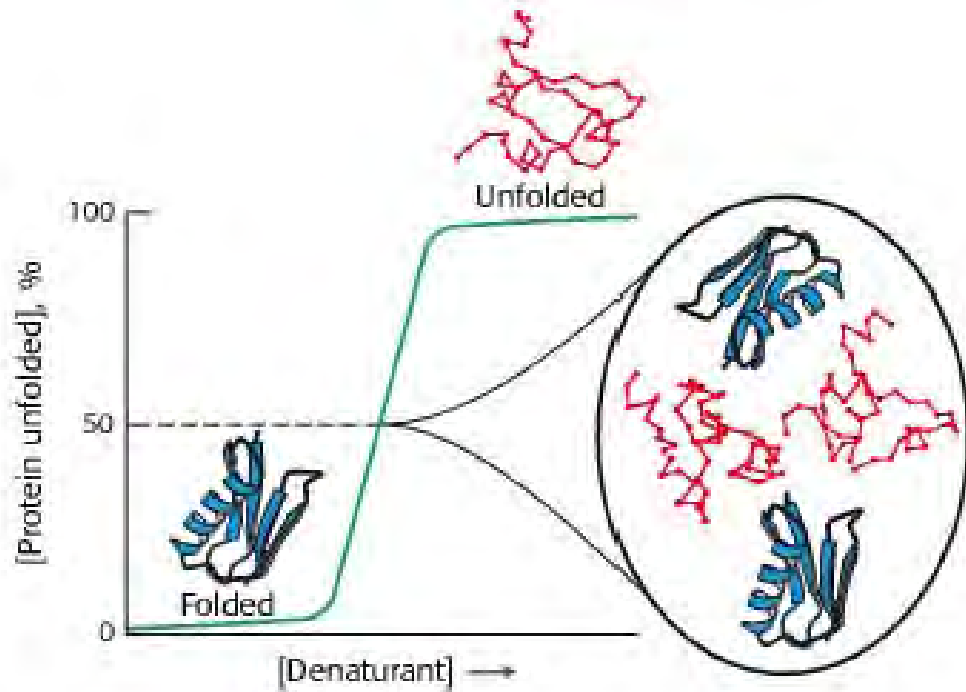
Kooperativna priroda razvijanja/uvijanja proteina

Primer za reversibilnu denaturaciju malih globularnih proteina:



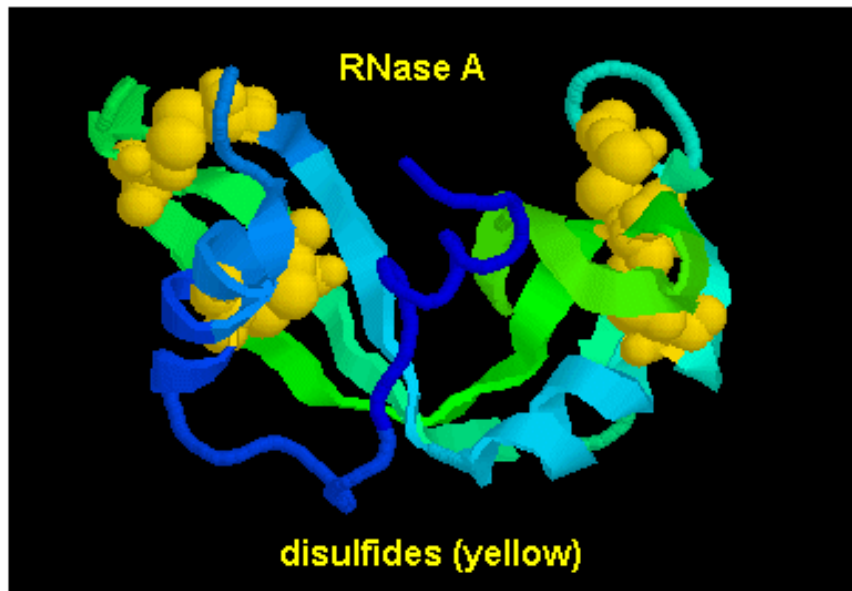
Slika 8.5: Ravnotežne krive za termalnu denaturaciju RNA-ze na dve pH vrednosti. Razvijanje je praćeno na osnovu merenja apsorbance ostatka tirozina (na 287 nm). Iduentične krive se dobijaju pri zagrevanju kao i pri hladjenju, što ukazuje da je proces denaturacije pri uslovima eksperimenta reversibilan i da je ravnoteža između nativnog i denaturisanog proteina uspostavljena. [Adaptirano iz J.R. Garel

Kooperativna priroda razvijanja/uvijanja proteina

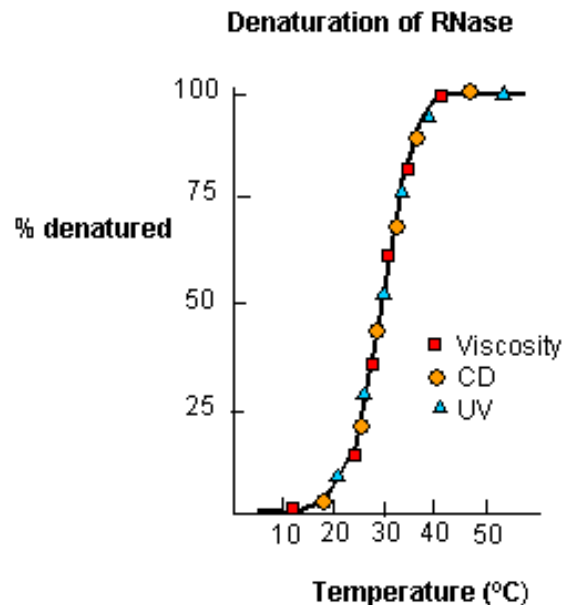


Kriva je sigmoidna.:

- Proces je kooperativan: nema stabilnih intermedijera.
- “Sve ili ništa”!
- U uskom intervalu eksp. uslova nalaze se u ravnoteži nativna i razvijena konformacija proteina.



Određivanje (relativne)
konformacione
stabilnosti proteina



T_m:
temperatura
na kojoj je 50 %
proteina
denaturisano!

Efekat soli na stabilnost RNA-ze

- Soli utiču na stabilnost proteina!
- Kalijum fosfat i amonijum sulfat stabilizuju proteine, zato se ove soli često koriste u radu sa proteinima.

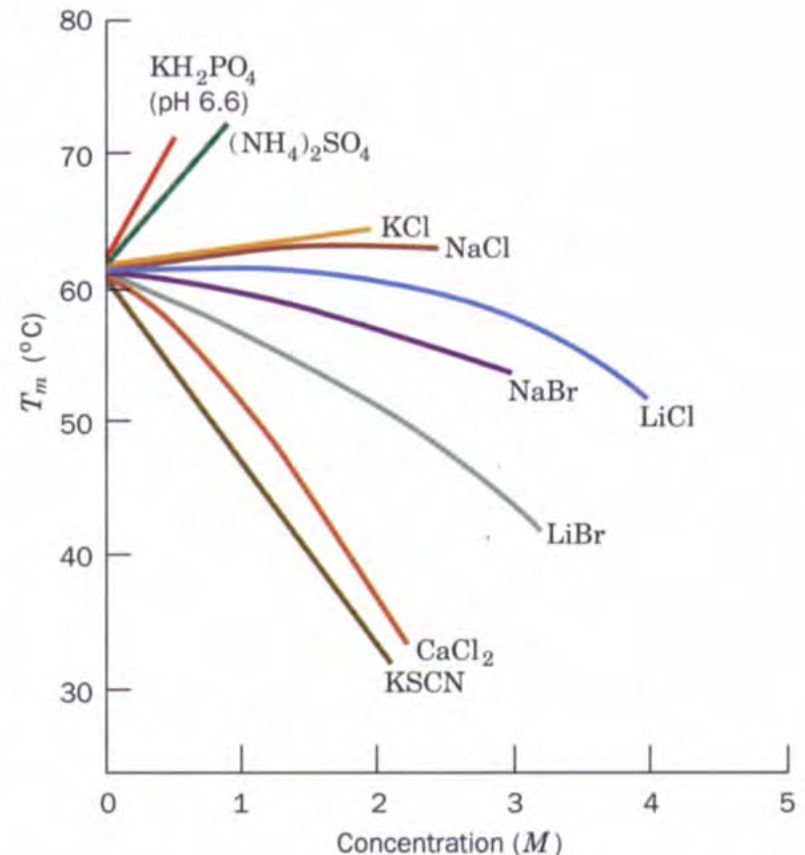
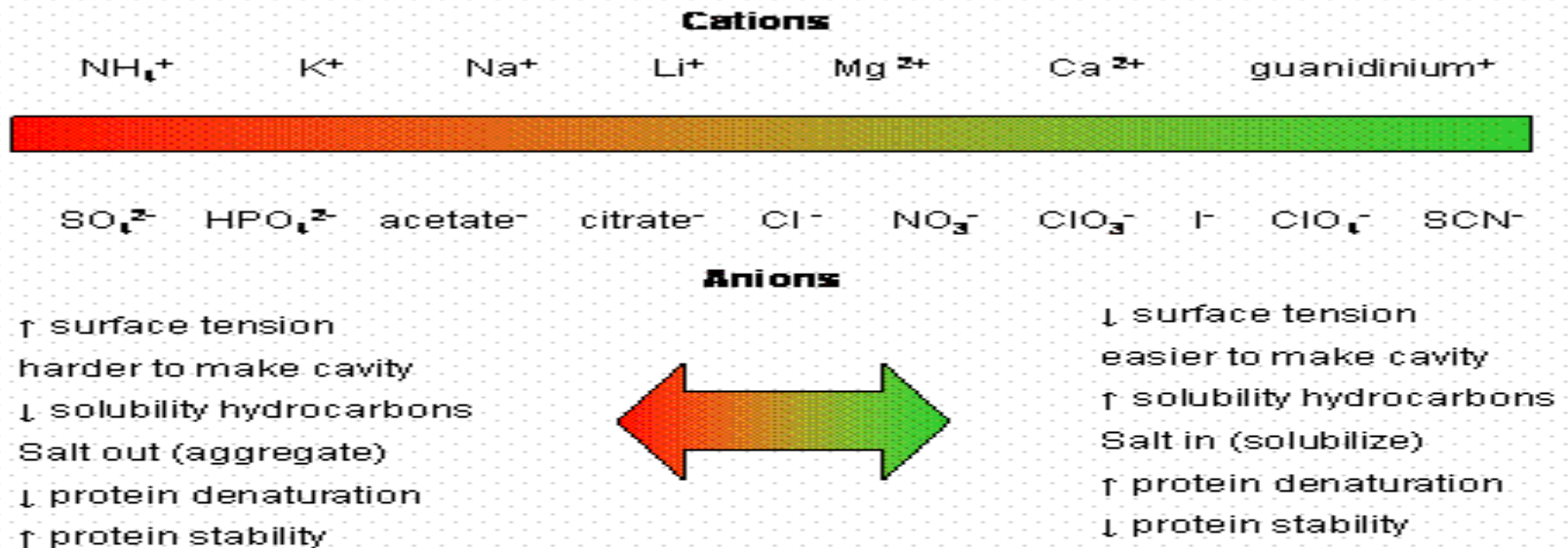


FIGURE 7-56. The melting temperature of RNase A as a function of the concentrations of various salts. All solutions also contain 0.15M KCl and 0.013M sodium cacodylate buffer, pH 7. [After von Hippel, P.J. and Wong, K.Y., *J. Biol. Chem.* **10**, 3913 (1965).]

HOFMEISTER SERIES



Sposobnost jona da stabilizuju nativnu strukturu proteina je
u korelaciji sa Hofmeisterovom serijom!

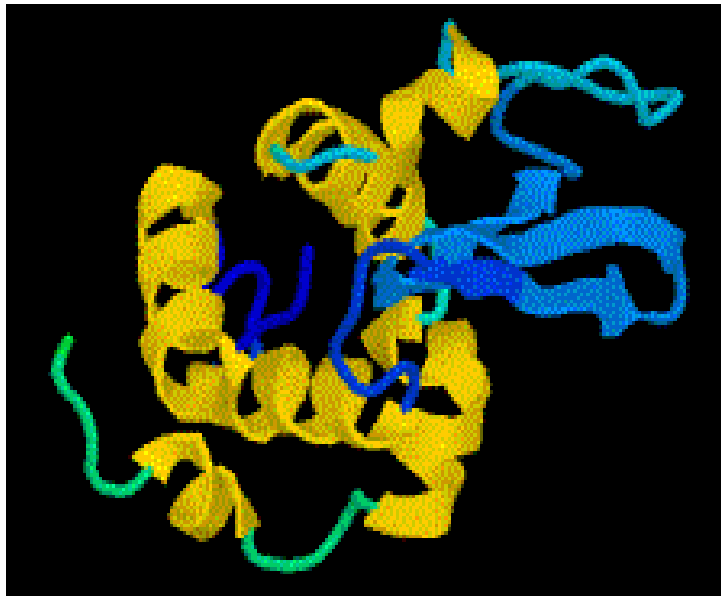
Objasniti polazeći od podataka na slici!

Levinthalov paradoks

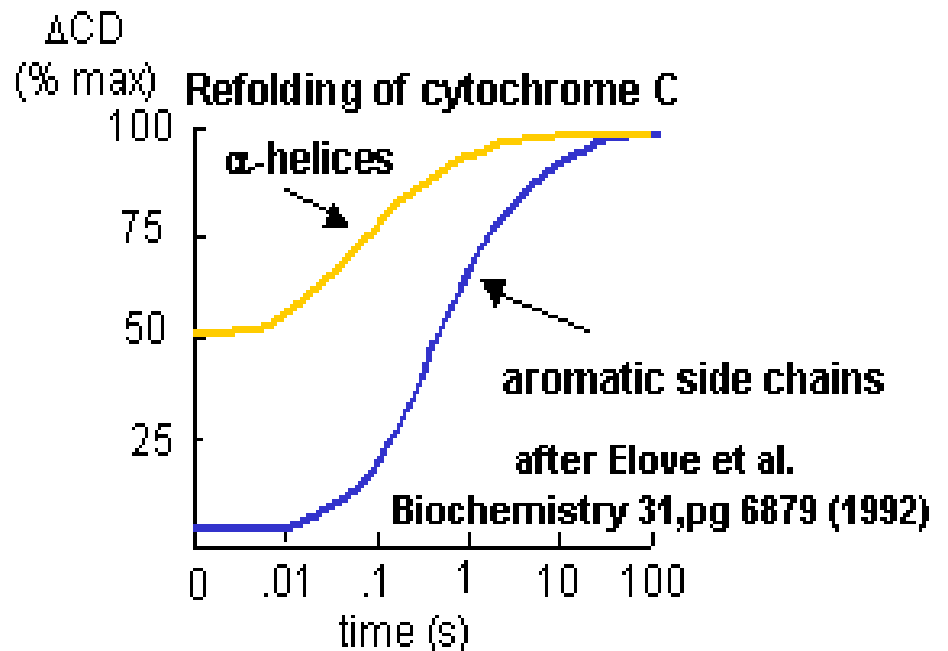
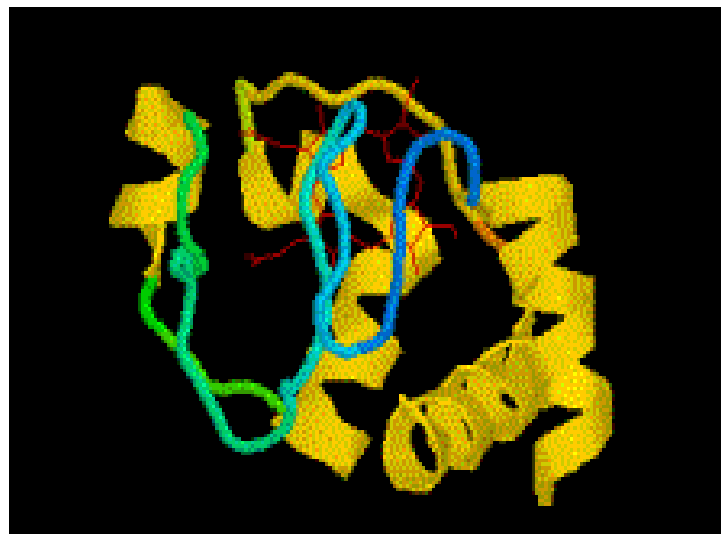
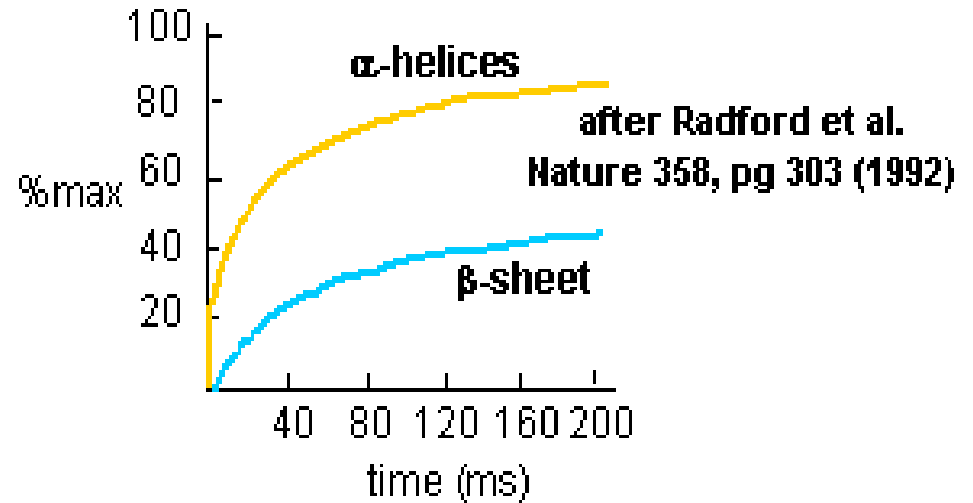
- Kako se razvijeni polipeptidni niz uvija u nativnu konformaciju?
- Cyrus Levinthal:
 - Kada bi se protein uvijao “pokušajima i greškama” (isprobavao sve konformacije!) uvijanje proteina od 100 aminokiselina bi trajalo 10^{50} godina!!!! (Levinthalov paradoks!)
- Brzina uvijanja in vitro je brz proces: milisekunde - minuti
- Brzina uvijanja in vivo je još veća!
- Zaključak:
 - Polipeptidni niz isprobava samo manji deo mogućih konformacija jer aminokiselinska sekvenca određuje i mehanizam (put) uvijanja.

Mehanizam uvijanja malih globularnih proteina:

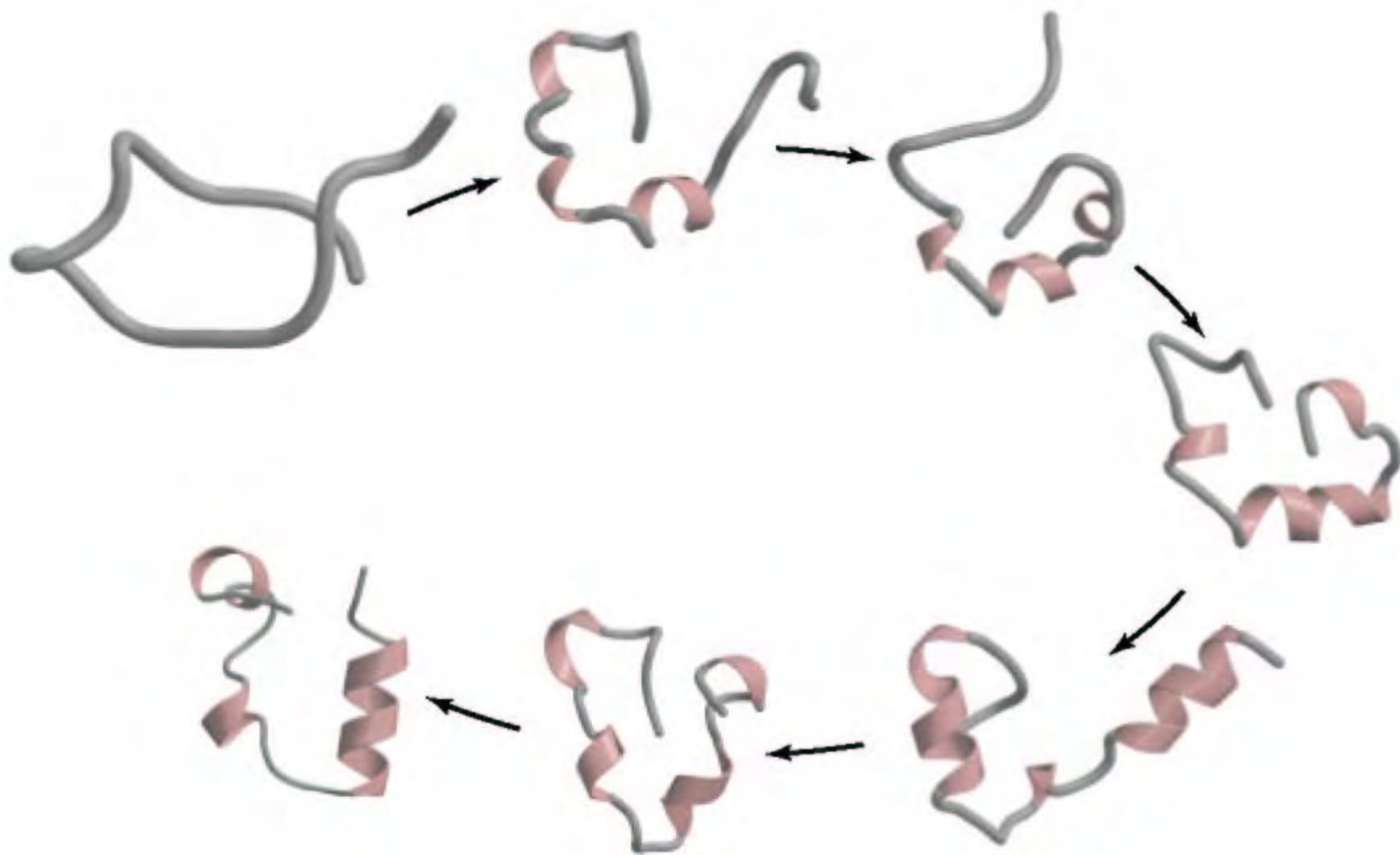
- brzo, < 5 ms, nastajanje sekundarnih struktura (“burst”)
- “hidrofobni kolaps”: 5 - 1000 ms



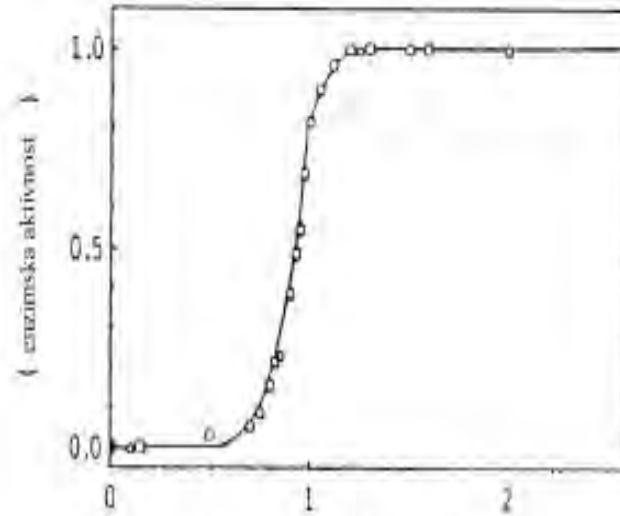
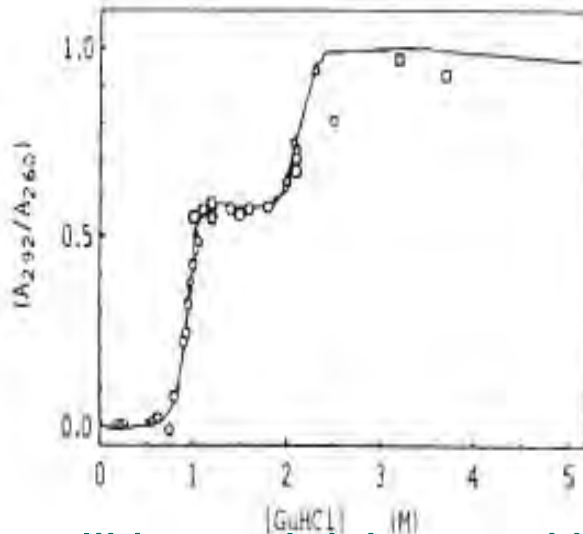
Refolding of Lysozyme



Simulacija uvijanja



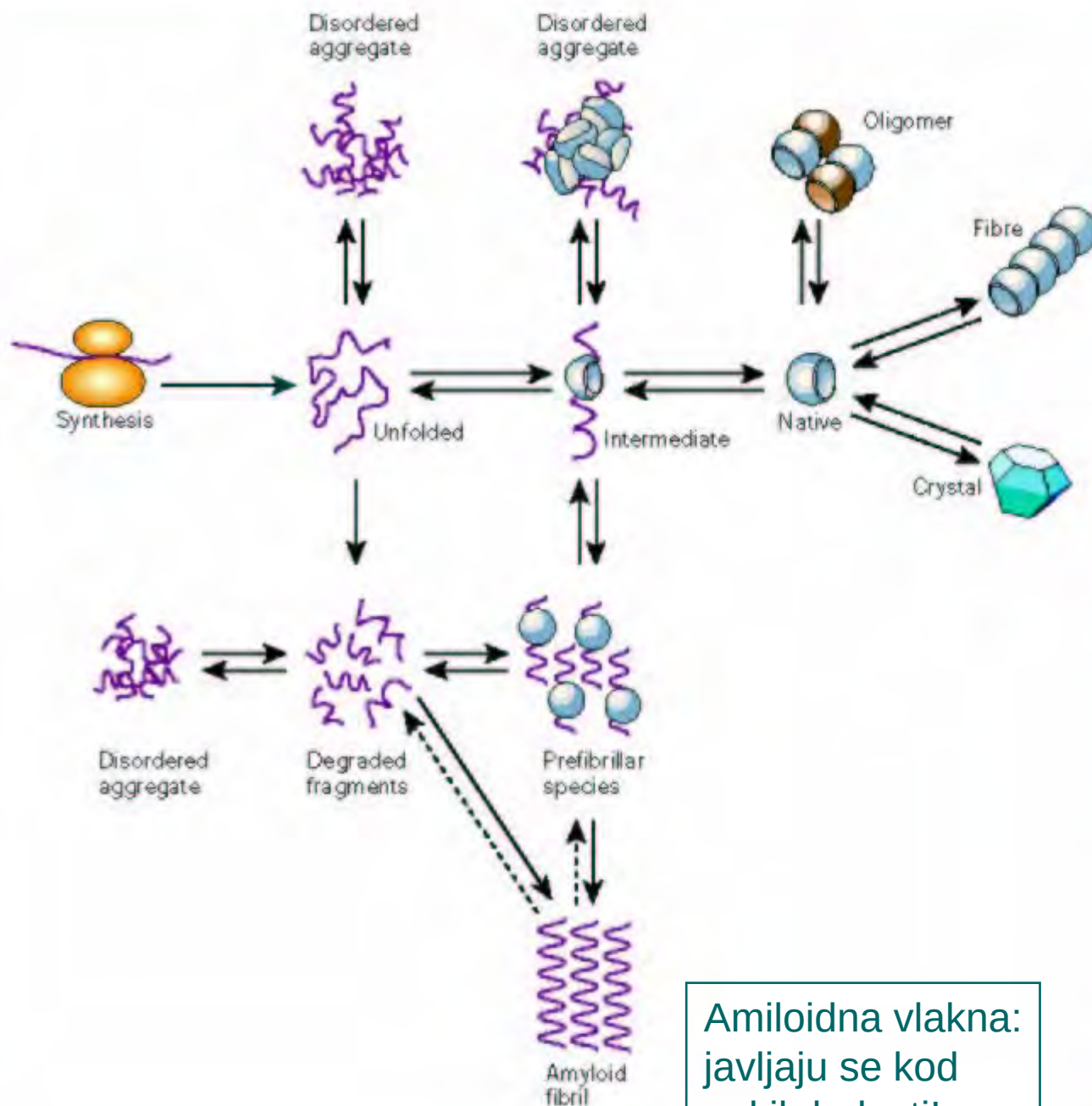
Uvijanja velikih (>100 ak) globularnih proteina: intermedijer - “stopljena globula”



- Veliki proteini (>100 ak) imaju i veći sadržaj nepolarnih aminokiselina!
- Mehanizam obuhvata:
 - (1) hidrofobni kolaps u kompaktne intermedijere, “stopljenu globulu” (zapremina 10% veća od zapremine nativnog molekula!)
 - (2) fino podešavanje konformacije !

Uvijanje proteina in vivo

- Živi organizmi mogu da sadrže i do 100 000 različitih proteina!
- Razvijeni proteini in vivo imaju tendenciju da se agregiraju jer se:
 - u novo-sintetisanim polipeptidnom nizu nepolarni ostaci nalaze u dodiru sa vodom;
 - proteini in vivo uvijaju u prisustvu visoke koncentracije drugih proteina (300 g/L).
- Molekulski šaperoni sprečavaju neproduktivne interakcije delimično uvijenog proteina, posebno one koje dovode do njegovog agregiranja
- Konformacione bolesti: dolazi do agregiranja inače rastvornih proteina (amiloidna vlakna i prioni)



Amiloidna vlakna:
javljaju se kod
nekih bolesti!

Figure 4 A unified view of some of the types of structure that can be formed by polypeptide chains. An unstructured chain, for example newly synthesized on a ribosome, can fold to a monomeric native structure, often through one or more partly folded intermediates. It can, however, experience other fates such as degradation or aggregation. An amyloid fibril is just one form of aggregate, but it is unique in having a highly organized 'misfolded' structure, as shown in Fig. 3. Other assemblies, including functional oligomers, macromolecular complexes and natural protein fibres, contain natively folded molecules, as do the protein crystals produced *in vitro* for X-ray diffraction studies of their structures. The populations and interconversions of the various states are determined by their relative thermodynamic and kinetic stabilities under any given conditions. In living systems, however, transitions between the different states are highly regulated by the environment and by the presence of molecular chaperones, proteolytic enzymes and other factors. Failure of such regulatory mechanisms is likely to be a major factor in the onset and development of misfolding diseases. Adapted from ref. 54.

“Šaperonini”.....

....uvlače delimično/pogrešno uvijeni protein u nepolarnu šupljinu (i pomoću ATP-a) obezbeđuju pravilno uvijanje!

