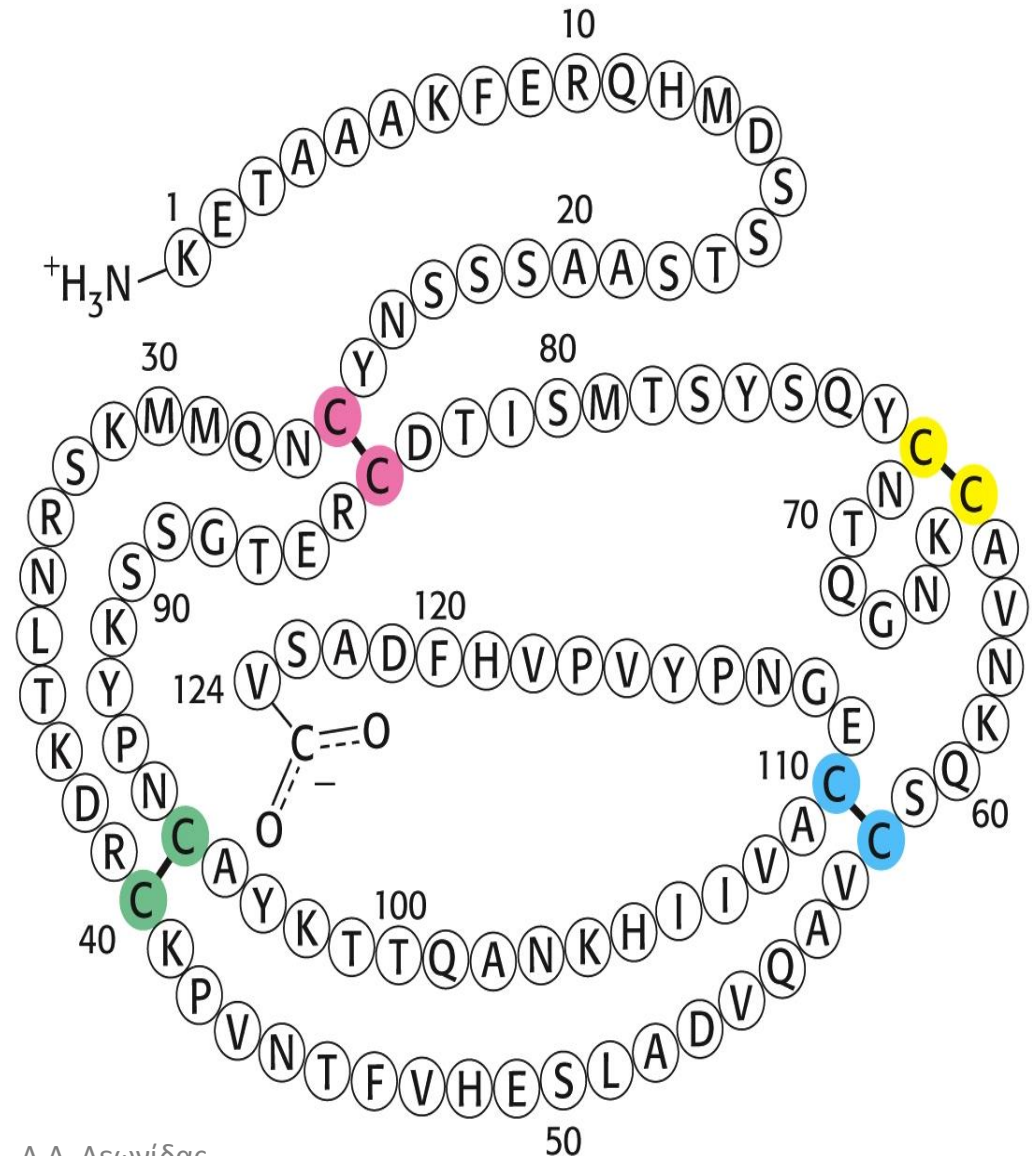


ΑΝΑΔΙΠΛΩΣΗ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ



- Μελέτες Christian Anfinsen, 1950
- Ριβονουκλεάση
- 124 αα,
- 4 δισουλφιδικοί δεσμοί



Αναδίπλωση πρωτεϊνών

«αναμφισβήτητα η πιο σημαντική διαδικασία στη βιολογία»

στο δοκιμαστικό σωλήνα

~ 40 έτη

στο κύτταρο

~ 20 έτη

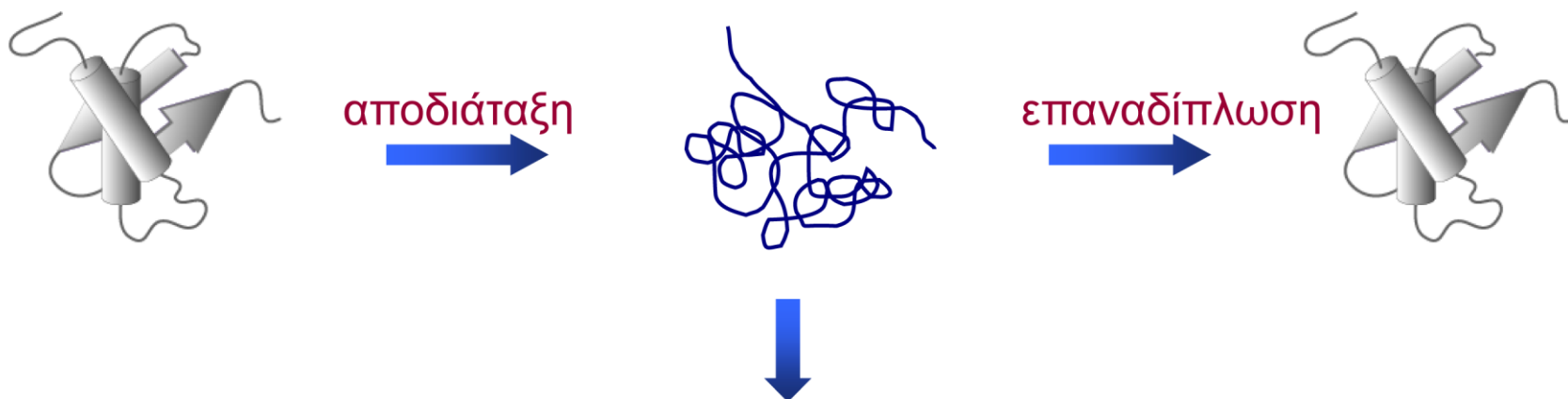
Κέρδισε το βραβείο Nobel το 1972 Prize στη Χημεία μαζί με τους Stanford Moore και William Howard Stein για τις μελέτες του στην ριβονουκλεάση ειδικά για αυτές που αφορούσαν τη σύνδεση μεταξύ της αμινοξικής αλληλουχίας και της βιολογικά ενεργής διαμόρφωσης.



Το **δόγμα του Anfinsen** (είναι γνωστό και ως η **θερμοδυναμική υπόθεση**) πως τουλάχιστον για μικρές σφαιρικές πρωτεΐνες η φυσιολογική δομή καθορίζεται μόνο από την αμινοξική αλληλουχία της πρωτεΐνης.

Anfinsen, C.B. (1973) Principles that govern the folding of protein chains. *Science* **181**, 223-230

Αναδίπλωση της RNase A στο δοκιμαστικό σωλήνα

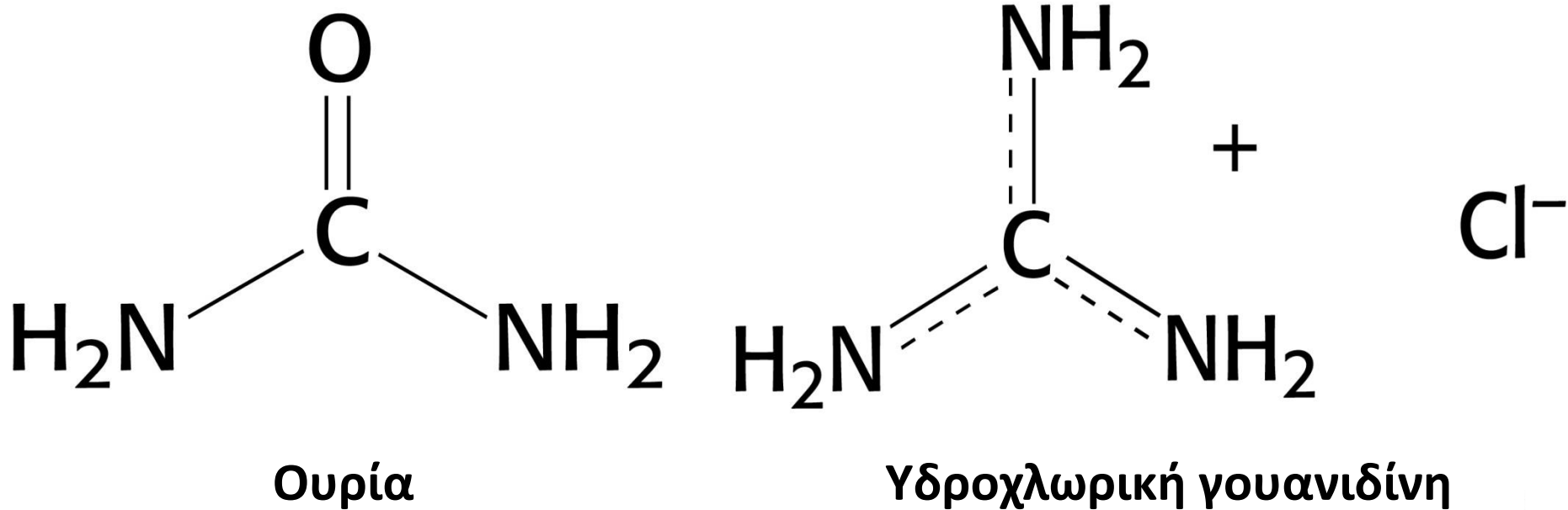


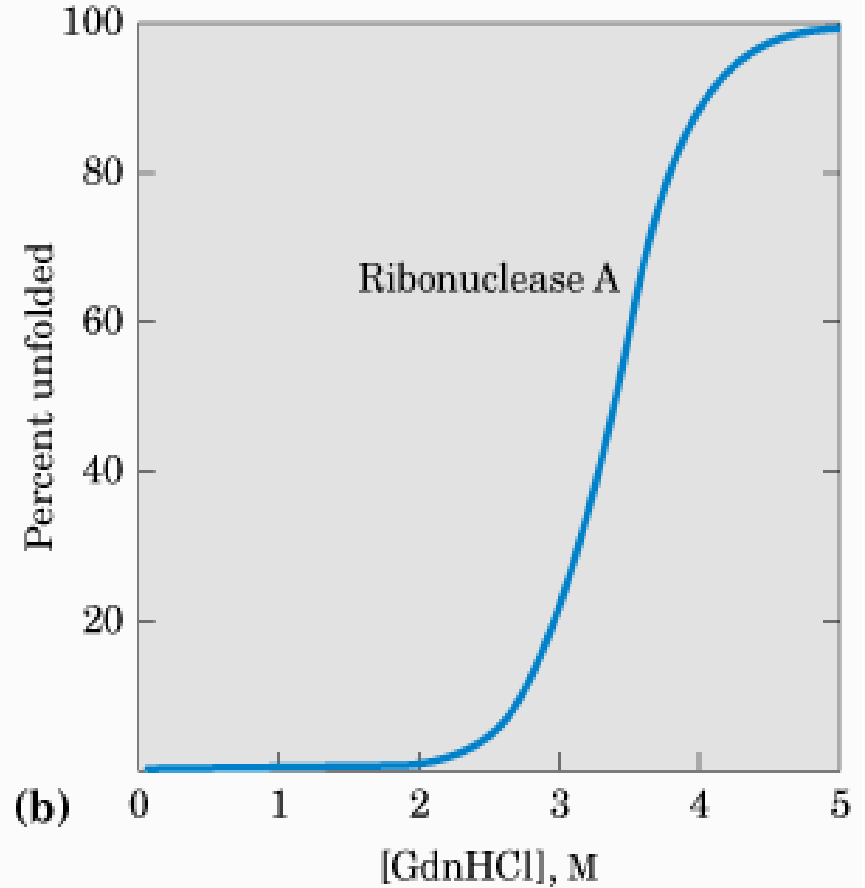
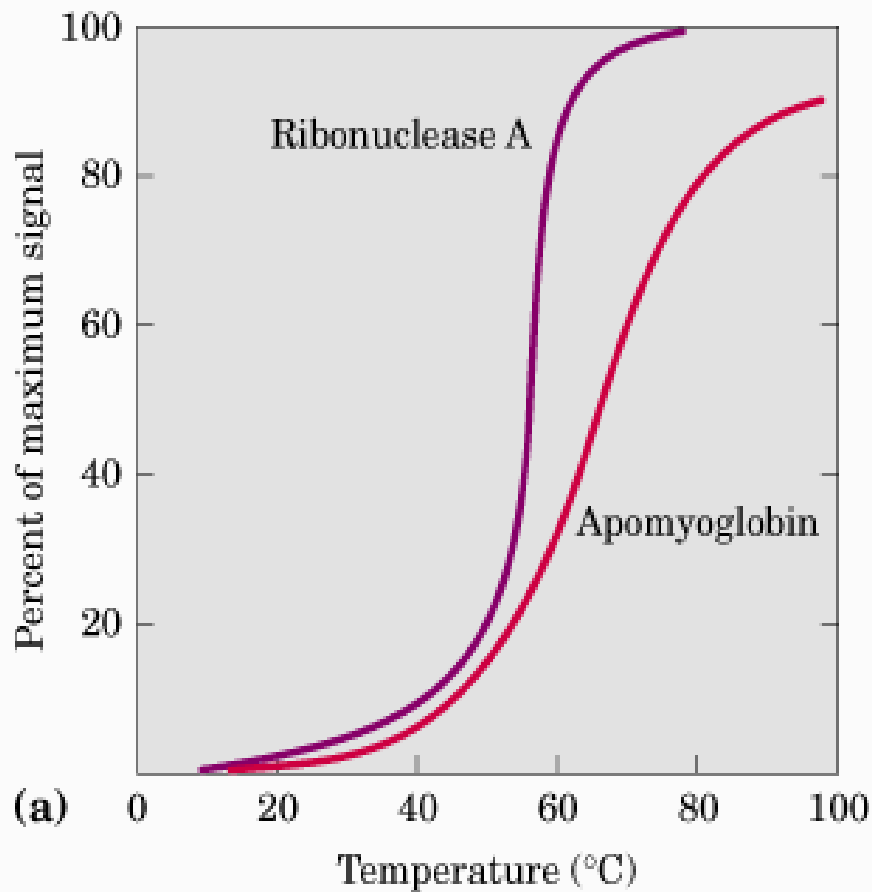
- Η αμινοξική αλληλουχία ενός πολυπεπτιδίου είναι αρκετή για να καθορίσει την τρισδιάστατη δομή του

Η αναδίπλωση των πρωτεϊνών είναι μια αυθόρμητη διαδικασία που δεν απαιτεί τη βοήθεια εξωγενών παραγόντων

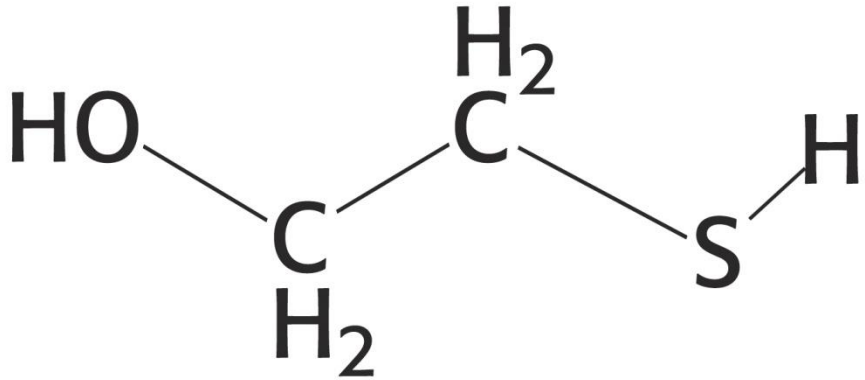
Anfinsen, C.B. (1973) Principles that govern the folding of protein chains. *Science* **181**, 223-230

- Ουρία, Υδροχλωρική γουανιδίνη → **καταστρέφουν** τις μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις

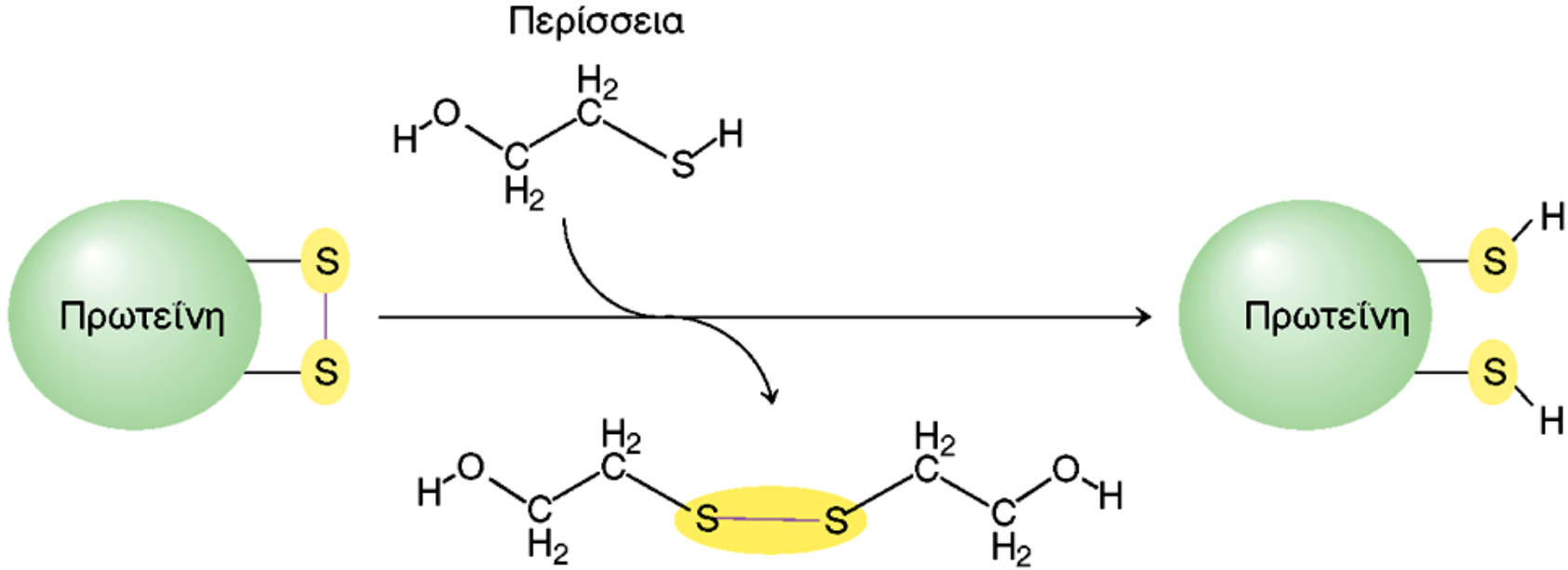


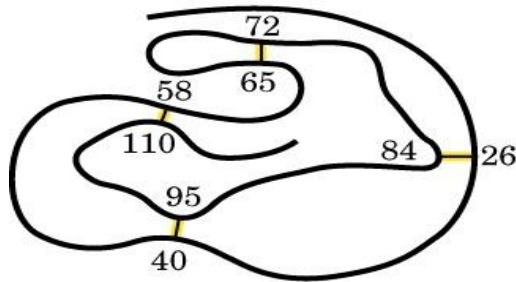


■ β-μερκαπτοαιθανόλη,
διθειοθρεϊτόλη →
ανάγουν δισουλφιδικούς
δεσμούς



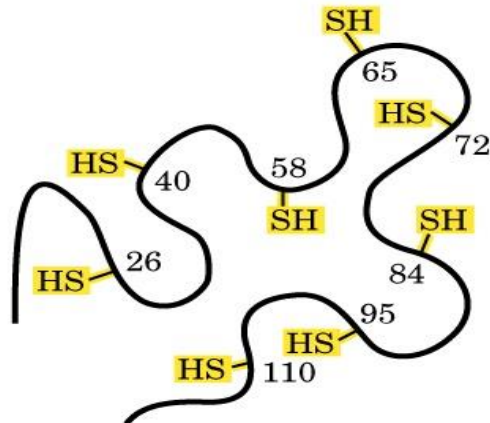
β-μερκαπτοαιθανόλη





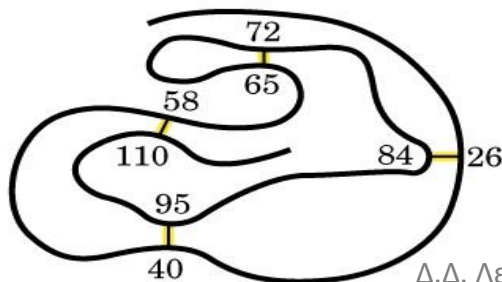
Φυσική μορφή,
καταλυτικά ενεργή

Προσθήκη 8M ουρίας και
β-μερκαπτοαιθανόλης



Αποδιατεταγμένη μορφή,
καταλυτικά ανενεργή. Οι δισουλφιδικοί
δεσμοί ανάγονται δίνοντας ενεργά
αμινοξικά κατάλοιπα κυστεΐνης

Απομάκρυνση ουρίας και
β-μερκαπτοαιθανόλης



Φυσική μορφή,
καταλυτικά ενεργή. Οι
δισουλφιδικοί δεσμοί
επανασχηματίζονται σωστά

■ Οι πληροφορίες που απαιτούνται για να πάρει μια πρωτεΐνη την τρισδιάστατη δομή της περιέχονται στην αλληλουχία των αμινοξέων της

■ **Κεντρικό δόγμα βιοχημείας:**

**Η ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΚΑΘΟΡΙΖΕΙ ΤΗΝ
ΣΤΕΡΕΟΔΙΑΤΑΞΗ → ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΔΡΑΣΗ**

ΠΙΝΑΚΑΣ 3.3 Σχετικές συχνότητες παρουσίας καταλοίπων αμινοξέων σε δευτεροταγείς δομές.

Αμινοξύ	<i>α</i> -έλικα	<i>β</i> -πτυχωτή επιφάνεια	Στροφή
Ala	1,29	0,90	0,78
Cys	1,11	0,74	0,80
Leu	1,30	1,02	0,59
Met	1,47	0,97	0,39
Glu	1,44	0,75	1,00
Gln	1,27	0,80	0,97
His	1,22	1,08	0,69
Lys	1,23	0,77	0,96
Val	0,91	1,49	0,47
Ile	0,97	1,45	0,51
Phe	1,07	1,32	0,58
Tyr	0,72	1,25	1,05
Trp	0,99	1,14	0,75
Thr	0,82	1,21	1,03
Gly	0,56	0,92	1,64
Ser	0,82	0,95	1,33
Asp	1,04	0,72	1,41
Asn	0,90	0,76	1,28
Pro	0,52	0,64	1,91
Arg	0,96	0,99	0,88

Σημείωση: Τα αμινοξέα ομαδοποιήθηκαν σύμφωνα με την τάση τους να βρίσκονται σε *α*-έλικες (πρώτη ομάδα), *β*-πτυχωτές επιφάνειες (δεύτερη ομάδα) ή στροφές (τρίτη ομάδα). Η αργινίνη δεν δείχνει καμιά ιδιαίτερη προτίμηση για κάποια από τις τρεις δομές. [Κατά: T. E. Creighton, *Proteins: Structures and Molecular Properties*, 2d ed. (W.H. Freeman and Company, 1992), p. 256.]

Levinthal paradox

in vitro



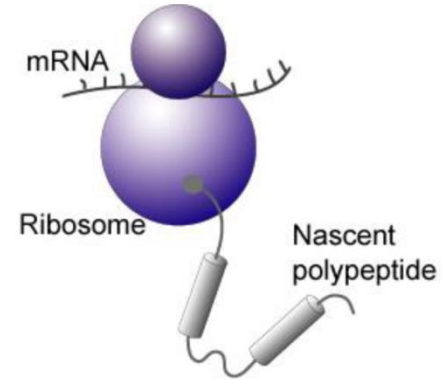
10⁶ πιθανές
διαμορφώσεις

αναδίπλωση



$t = \text{seconds ή λιγότερο}$

in vivo



αναδίπλωση



$t = \text{seconds}$

Πρόβλημα

Αν οι πρωτεΐνες αναδιπλώνονται με τη μέθοδο δοκιμής σφάλματος τότε για να πάρουν τη φυσιολογική τους δομή:

Για κάθε πρωτεΐνη που αποτελείται από 100 αμινοξέα θα χρειάζονται 10^{87} δευτερόλεπτα ----- πολύς χρόνος!!

Στην πραγματικότητα αναδιπλώνουν στη φυσιολογική τους δομή σε λιγότερο από μερικά δευτερόλεπτα!

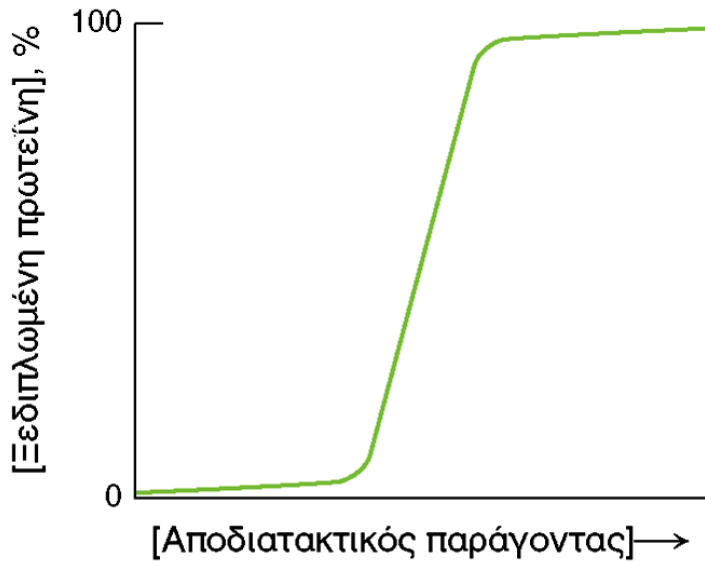
Υποθετική διαδικασία πρωτεϊνικής αναδίπλωσης



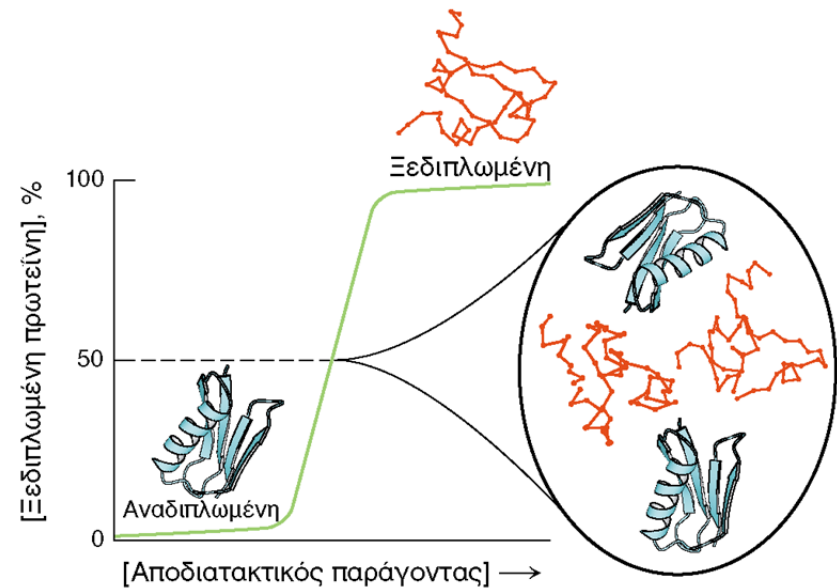
Το μεγαλύτερο μέρος της δευτεροταγούς δομής είναι παρόν. Δεν υπάρχει τριτοταγής δομή ή κατάσταση υδροφοβικής κατάρρευσης είναι γνωστή ως **molten globule**

Η αναδίπλωση μιας πρωτεΐνης είναι μία διεργασία με μορφή «όλα ή τίποτα» και αποτέλεσμα συνεργειακής μετάπτωσης.

Η απώλεια των αλληλεπιδράσεων με την πολυπεπτιδική αλυσίδα οδηγεί στην αποδιάταξη της πρωτεΐνης.

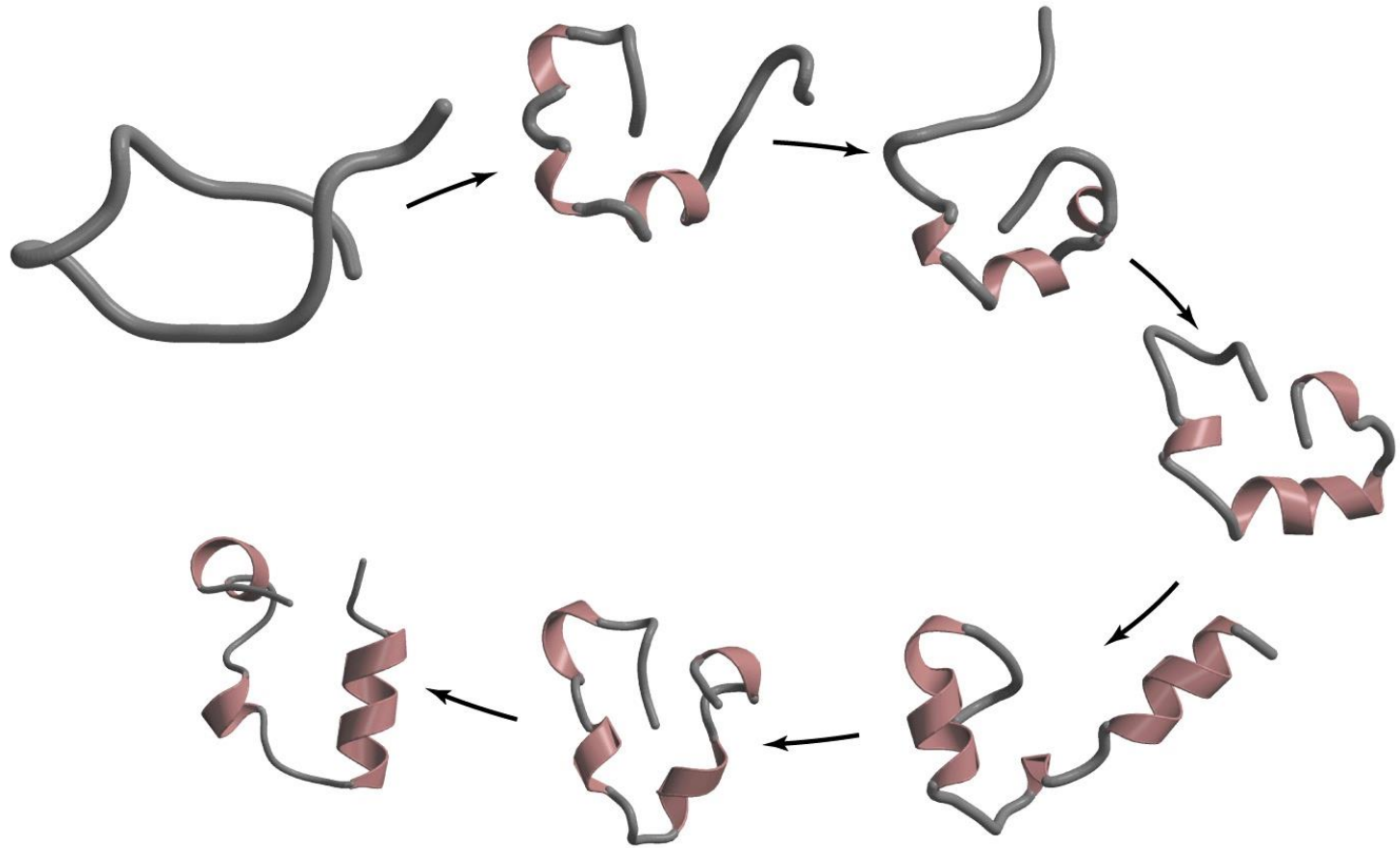


Όταν μία πρωτεΐνη είναι 50% «ξεδιπλωμένη» τότε τα μισά μόρια είναι αναδιπλωμένα και τα άλλα μισά όχι.

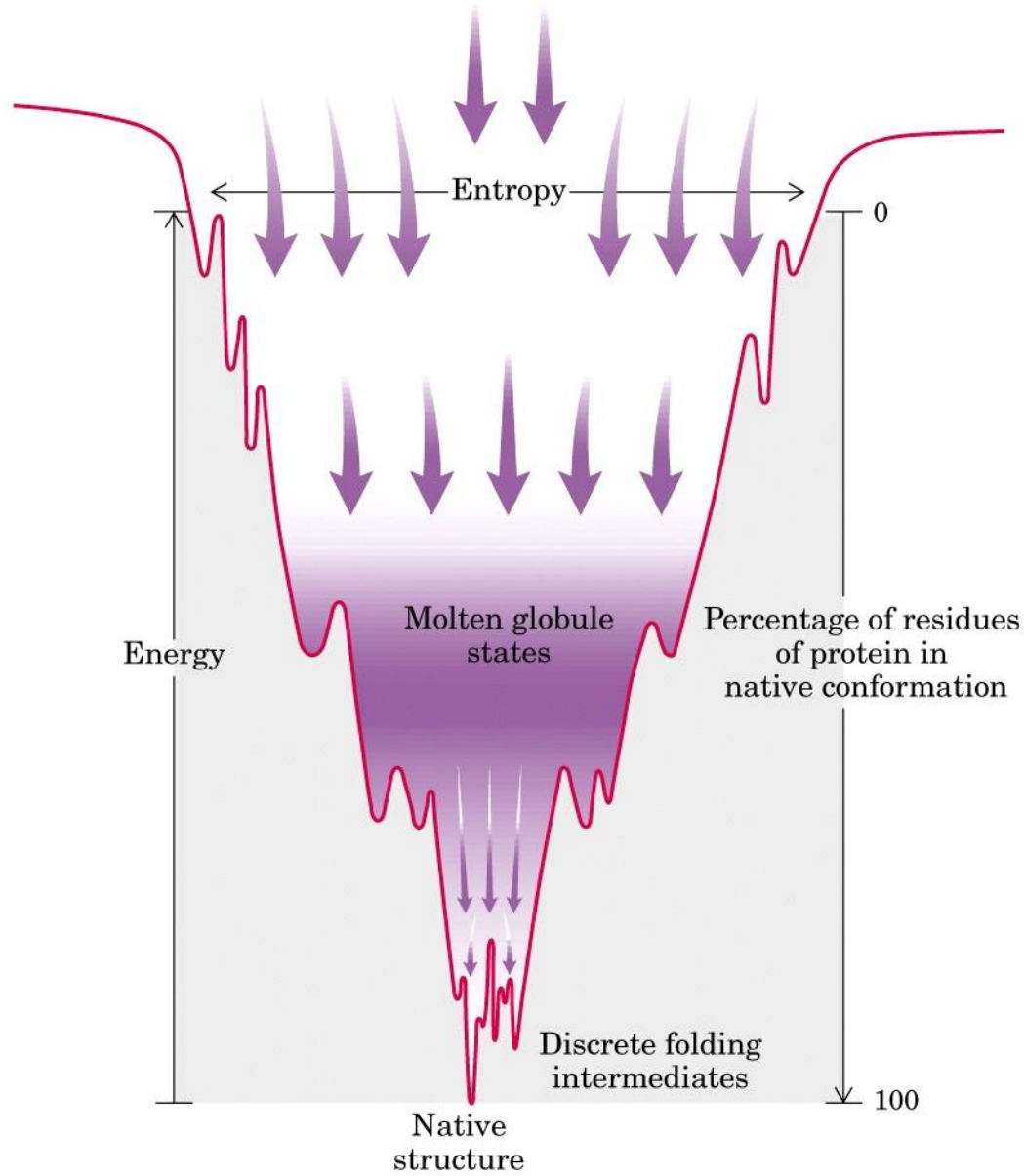


Οι πρωτεΐνες αναδιπλώνονται σταδιακά σταθεροποιώντας σταδιακά ενδιάμεσες δομές και όχι αναζητώντας τυχαία τη σωστή δομή.

Η αναδίπλωση των πρωτεϊνών είναι η διατήρηση των μερικώς σωστών αναδιπλώσεων.



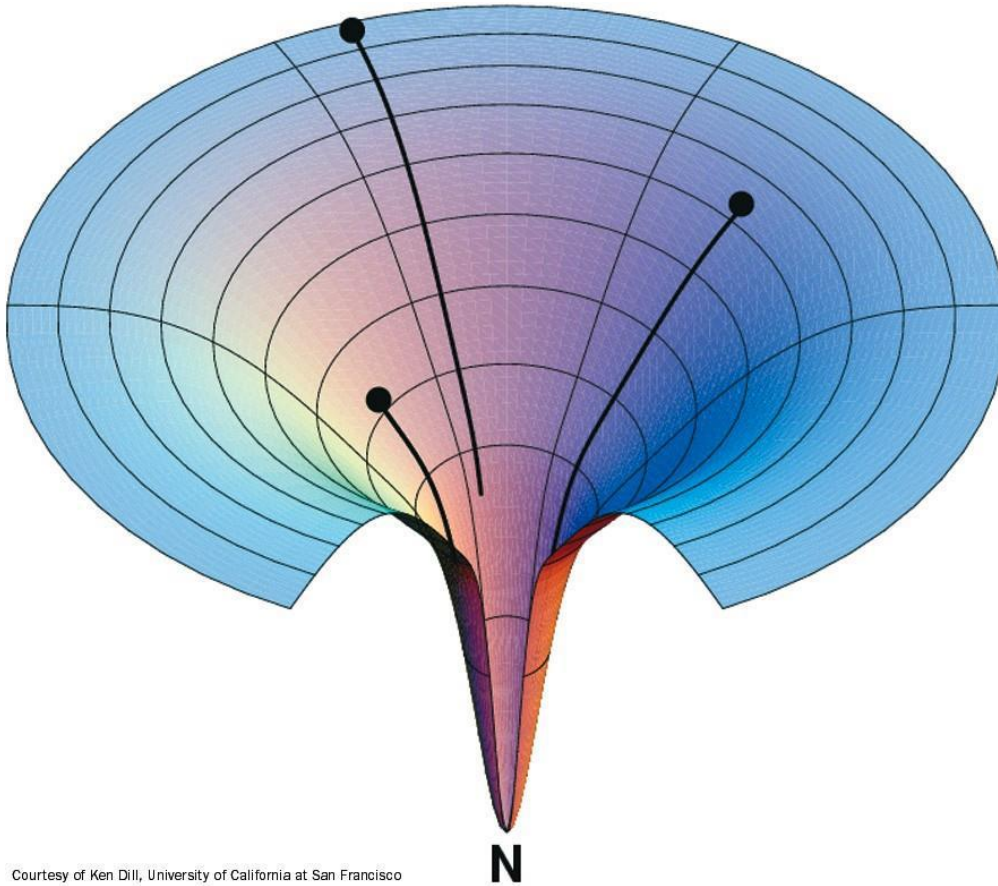
Beginning of helix formation and collapse



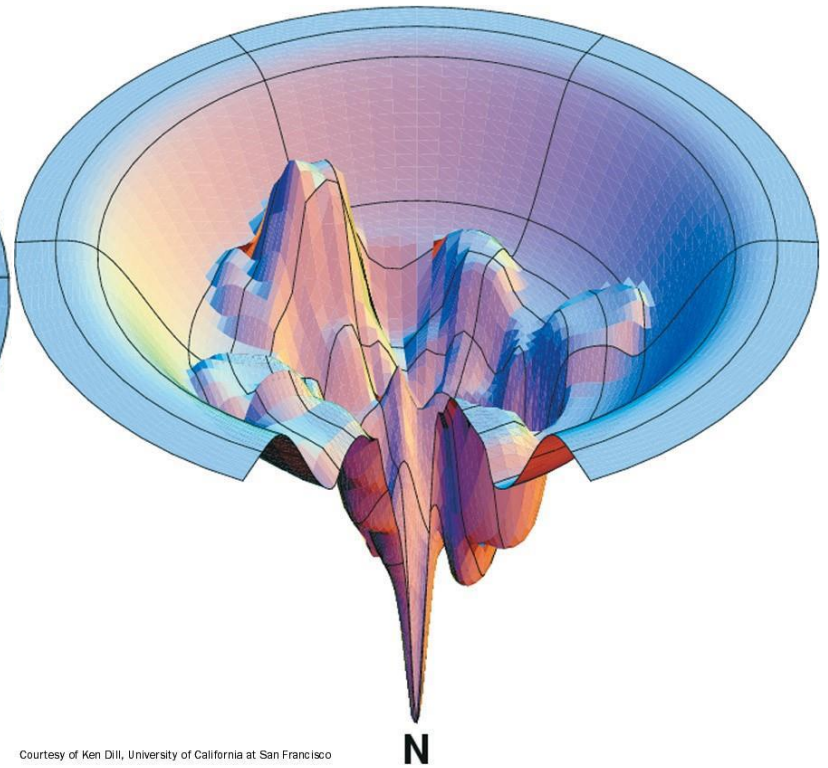
Χοάνη του μονοπατιού αναδίπλωσης πρωτεϊνών με την επίτευξη της ελάχιστης ελεύθερης ενέργειας



Χοάνες αναδίπλωσης



Ιδεατή γεωγραφία της χοάνης

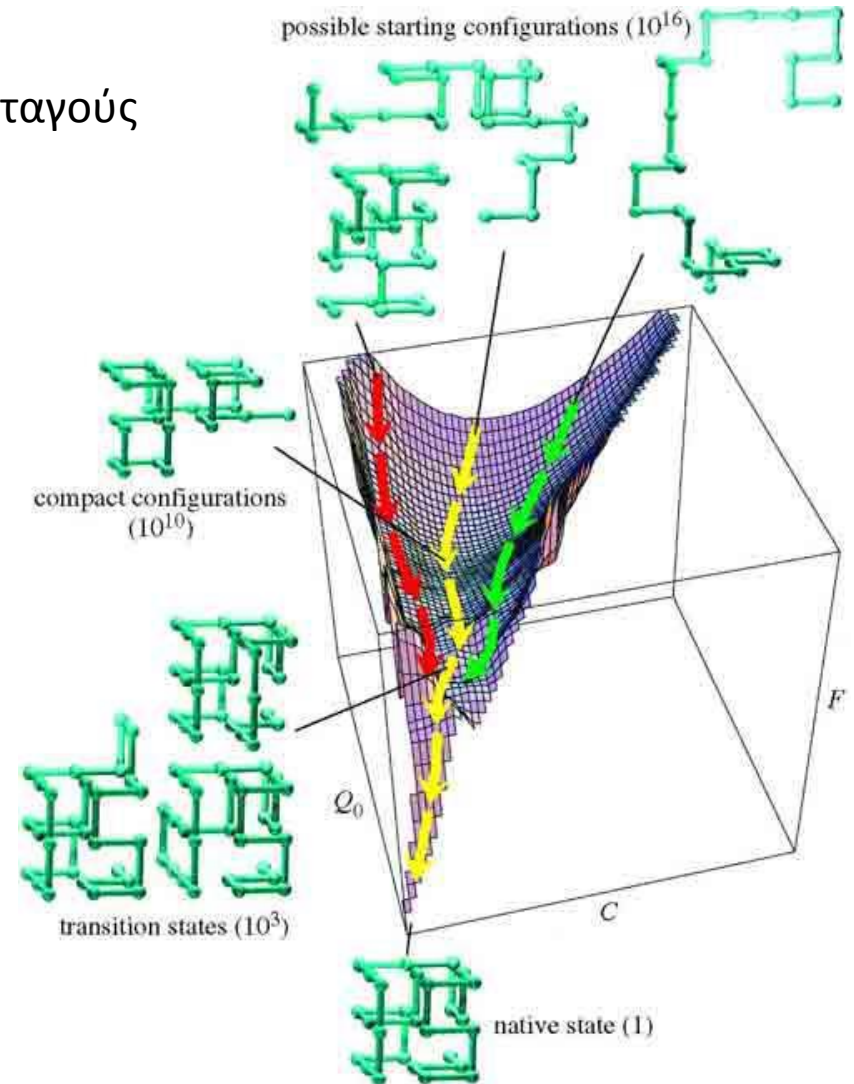


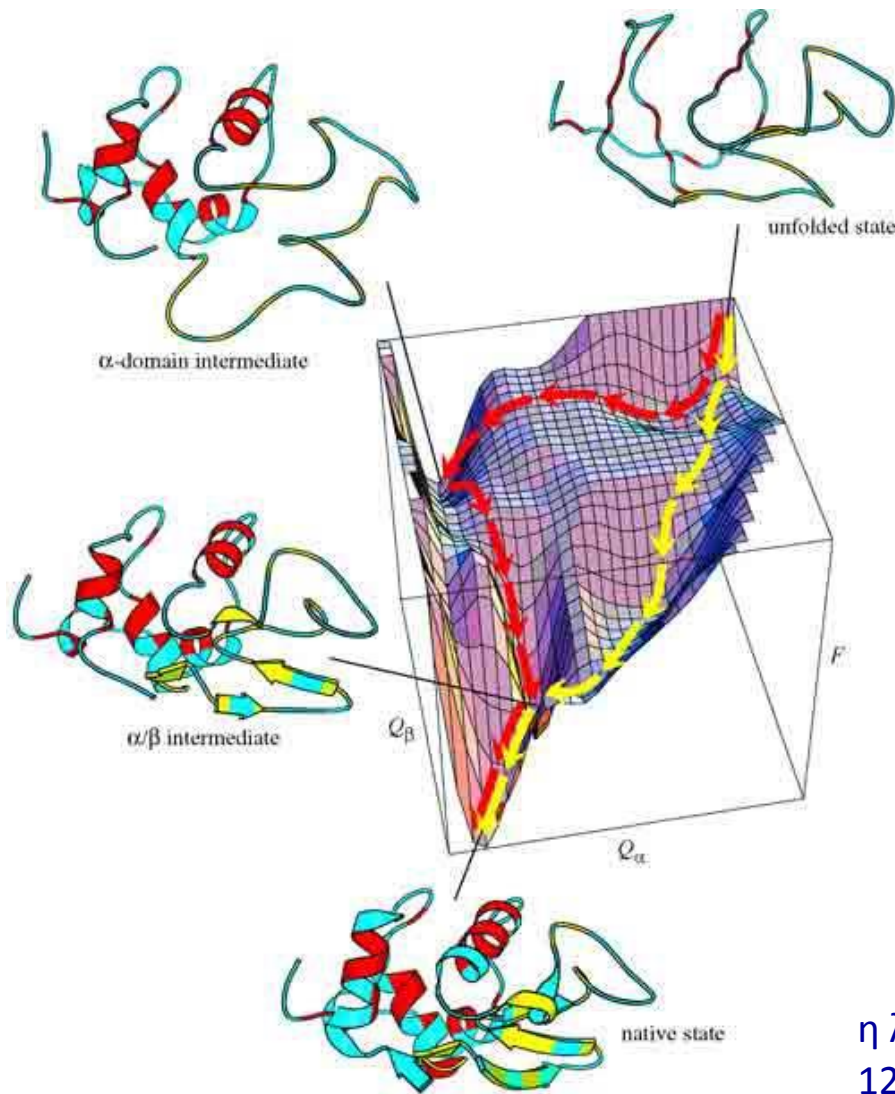
Πτυχωμένη επιφάνεια ενέργειας

Θεωρία πρωτεϊνικής αναδίπλωσης

- περιορισμένος αριθμός στοιχείων δευτεροταγούς δομής: α -έλικες, β -ελάσματα και βρόχοι

- η αναδίπλωση μπορεί να θεωρηθεί πως γίνεται κατά μήκος των **ενεργειακών επιφανειών**



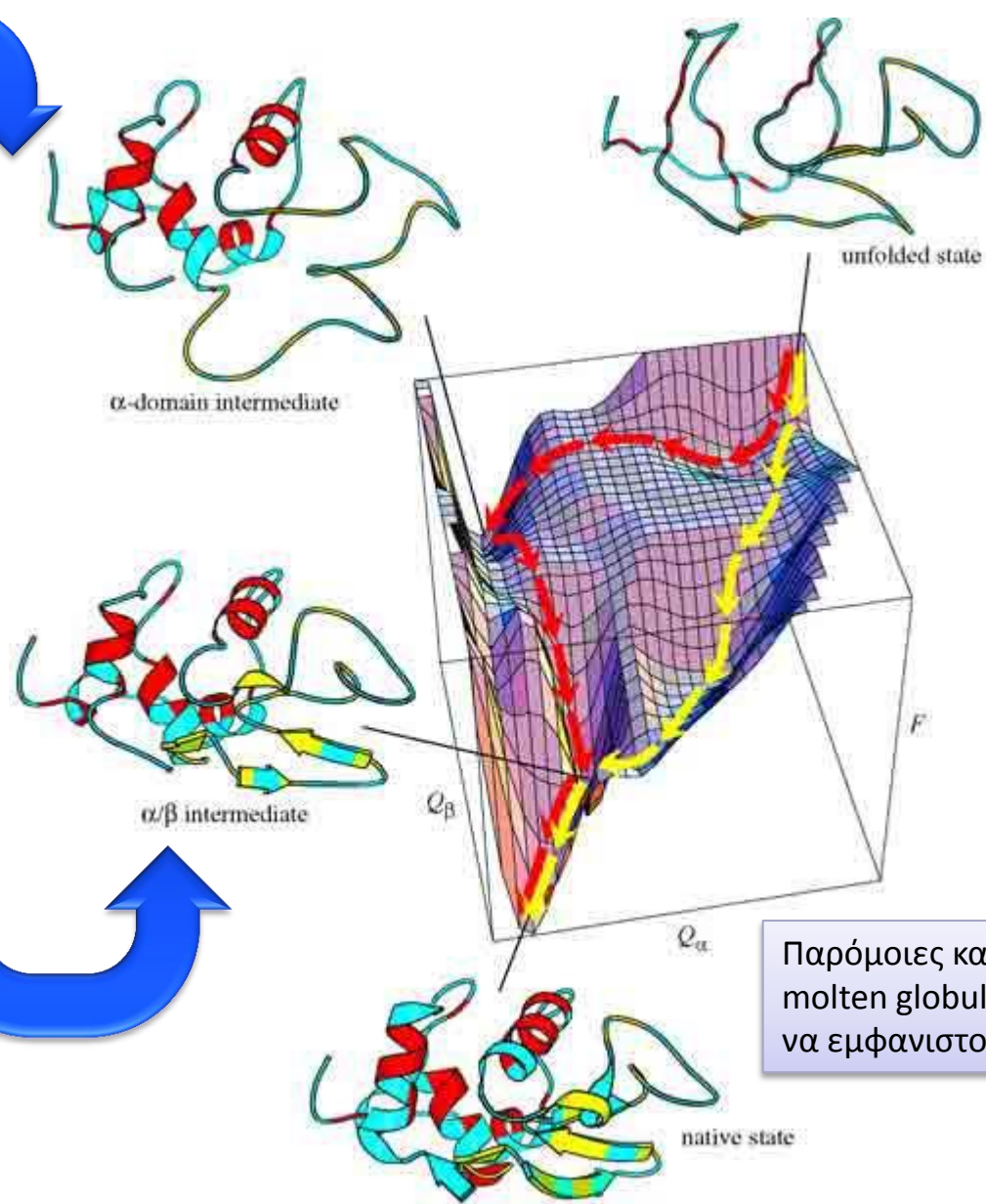


Υδροφοβική κατάρρευση : κατά την αραίωση της ξεδιπλωμένης πρωτεΐνης σε ρυθμιστικό διάλυμα, η πρωτεΐνη θα «καταρρεύσει» στον εαυτό της, προσπαθώντας να θάψει όσο το δυνατόν περισσότερες υδρόφοβες επιφάνειες – στη διαδικασία αυτή η πρωτεΐνη ή θα αναδιπλωθεί σωστά ή : θα διπλωθεί λάθος και θα δημιουργήσει συσσωματώματα θα παγιδευτεί σε ένα ενδιάμεσο στάδιο

η λυσοζύμη αποτελείται από 129 αμινοξέα και συγκροτεί 2 επικράτειες (α και β)

“molten globule states”

παρατηρήστε πώς δύο διαφορετικές διαδρομές αναδίπλωσης συγκλίνουν σε ένα τοπικό ελάχιστο (χαμηλότερη ενεργειακή κατάσταση) που είναι κοντά, αλλά δεν έχουν φτάσει, στην κατάσταση χαμηλότερη ενέργεια (διπλωμένο).



Παρόμοιες καταστάσεις molten globule είναι πιθανό να εμφανιστούν *in vivo*

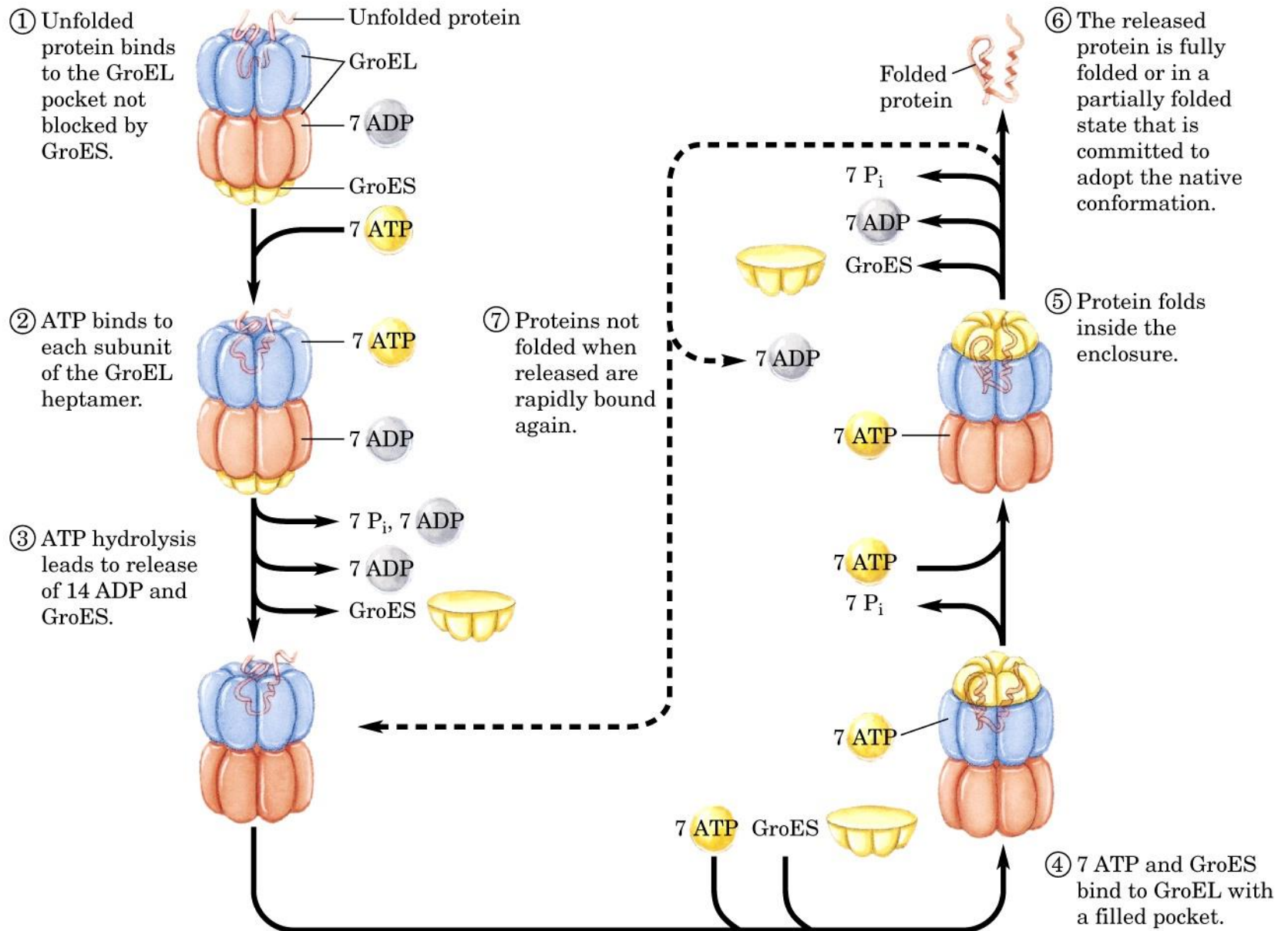
- Chaperones
- Ανακαλύφθηκαν ως heat shock proteins (hsp's)
- Δεν αλλάζουν το τελικό αποτέλεσμα της αναδίπλωσης αλλά παρεμποδίζουν την δημιουργία συσσωματωμάτων πριν την ολοκλήρωση της αναδίπλωσης ή τον σχηματισμό «λανθασμένων» ενδιάμεσων
- Βοηθούν επίσης την αναδίπλωση πρωτεϊνών αφού περάσουν την κυτταρική μεμβράνη
- Υδρολύεται ATP

Chaperones

Dictionary definition:

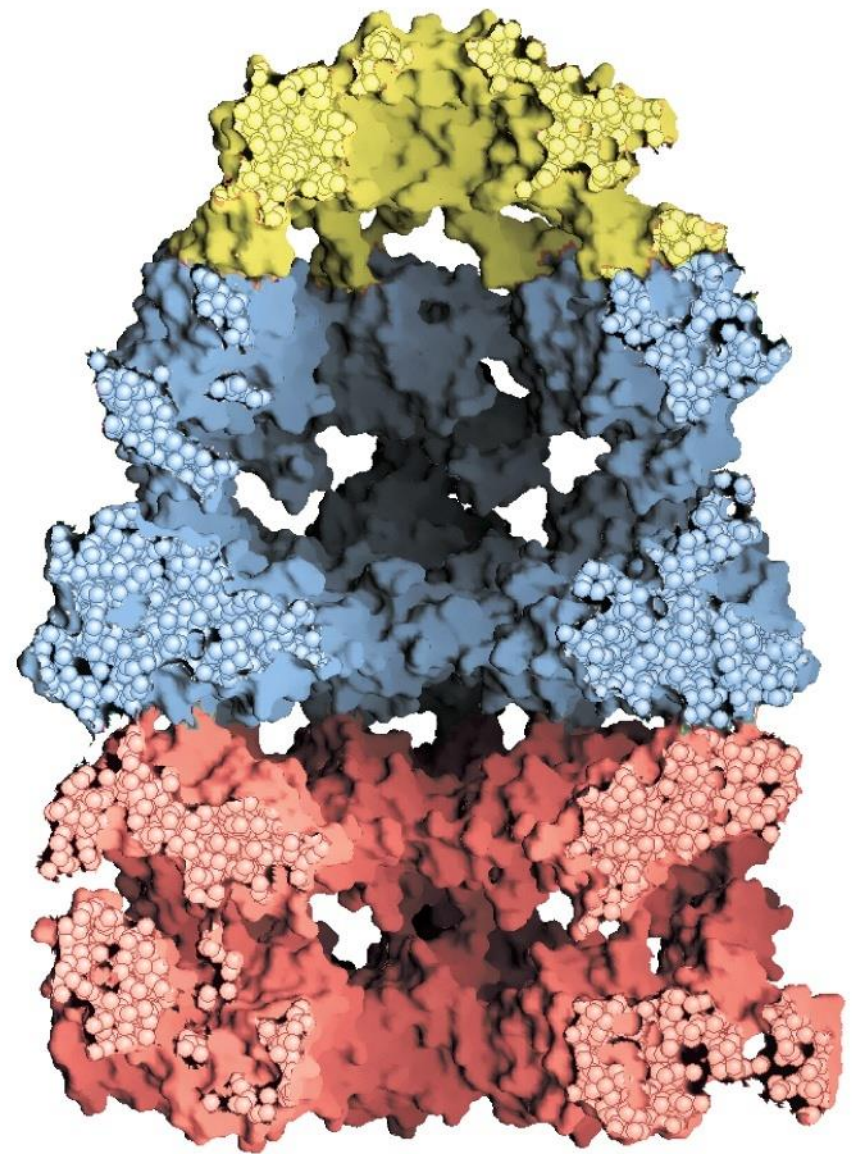
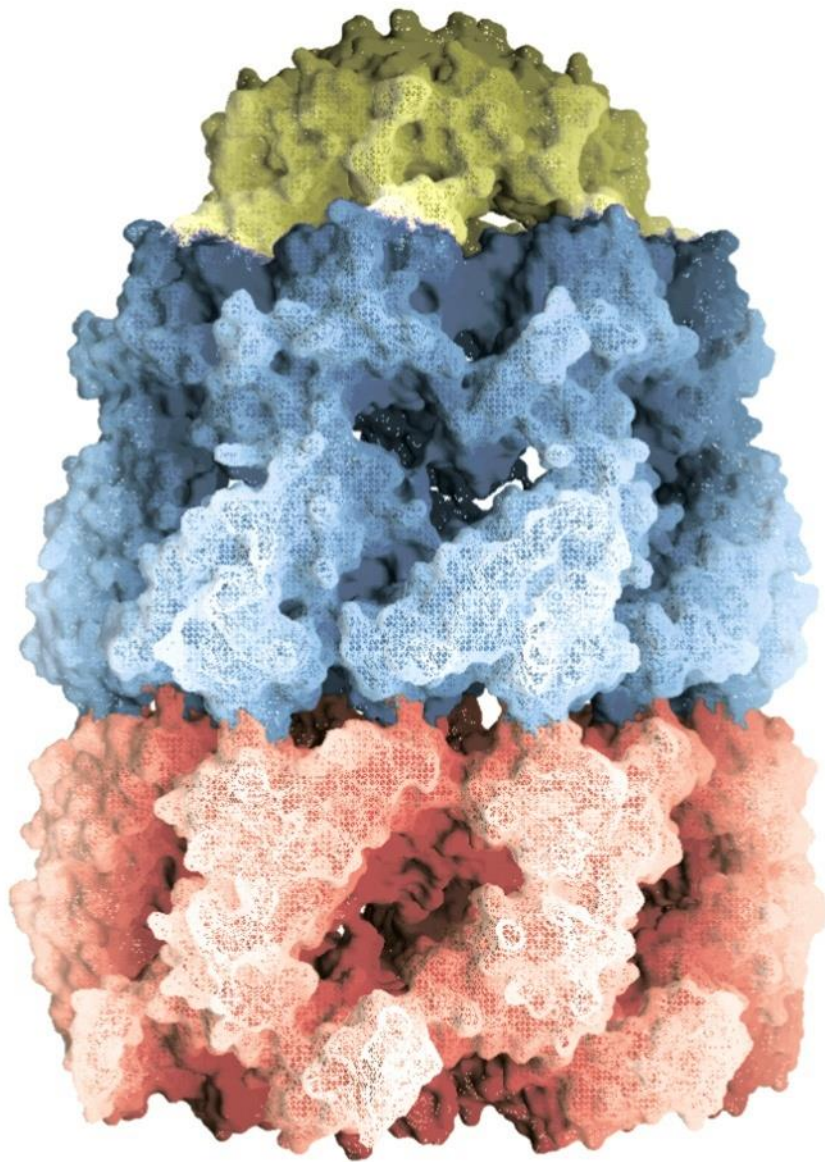
1: a person (as a matron) who for propriety accompanies one or more young unmarried women in public or in mixed company

2: an older person who accompanies young people at a social gathering to ensure proper behavior; broadly : one delegated to ensure proper behavior



(a)

Δ.Δ. Λεωνίδας

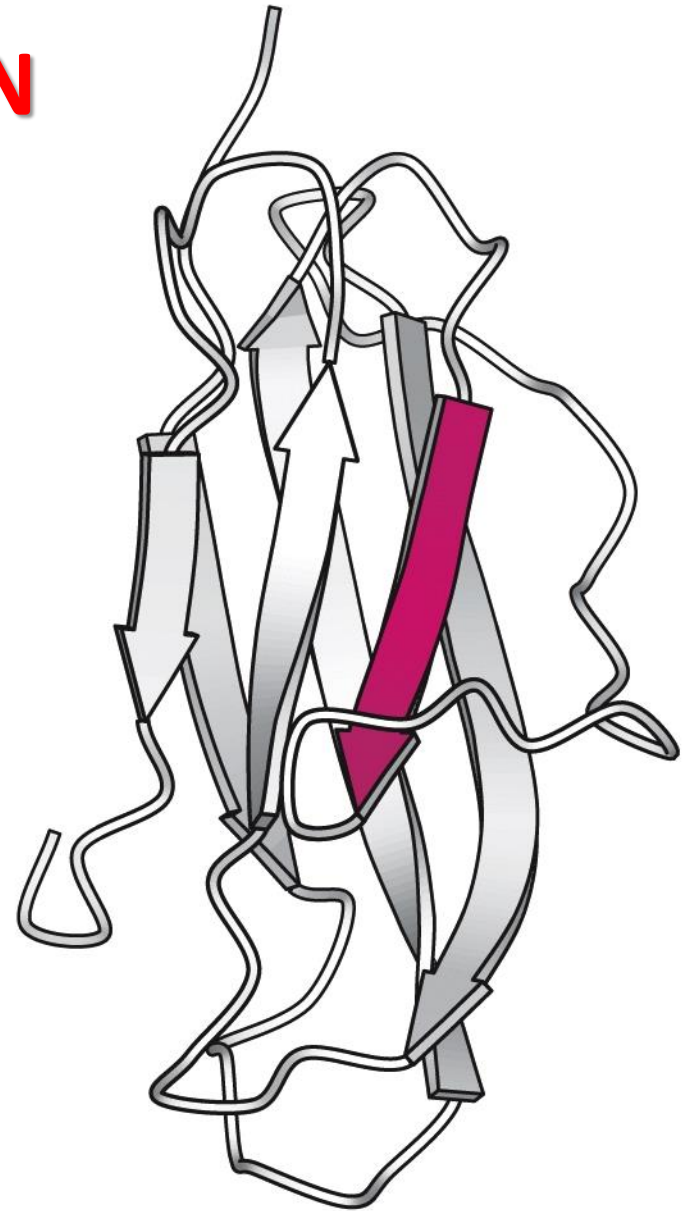
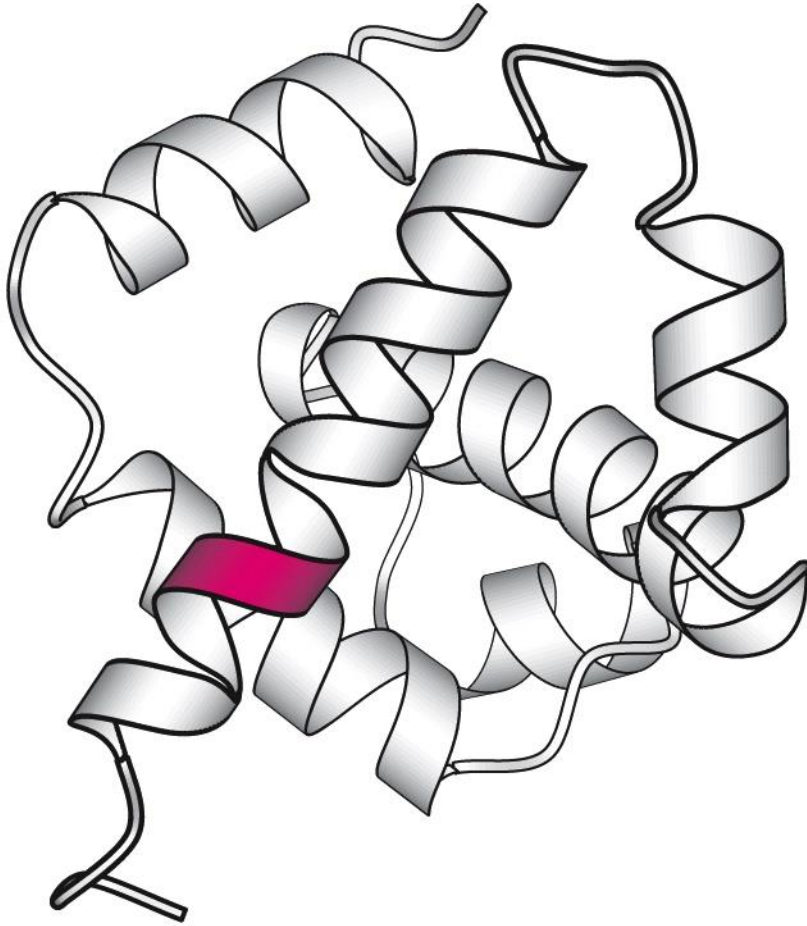


Τι καθορίζει το αν μια συγκεκριμένη αλληλουχία θα πάρει διαμόρφωση **α-έλικας** ή **β-πτυχωτής επιφάνειας** ;

- Val, Thr, Ile: διακλάδωση στον α-C τείνει να αποσταθεροποιήσει την α-έλικα
- Ser, Asp, Asn: περιέχουν δότες ή δέκτες δ.Η που αποσταθεροποιούν δ.Η της κύριας αλυσίδας στην α-έλικα
- Pro: αποσταθεροποιεί και α-έλικα και β-πτυχωτή επιφάνεια → δεν έχει NH και ο δακτύλιος περιορίζει την $\phi \sim 60^\circ$
- Gly: χωράει παντού

- Προβλέψεις δευτεροταγούς δομής με βάση την αλληλουχία ~60% ακριβής
- Δεν καθορίζουν όλες οι αμινοξικές αλληλουχίες την δευτεροταγή δομή
- Παίζουν ρόλο και οι τριτοταγείς ή τεταρτοταγείς αλληλεπιδράσεις
- Κάθε πρωτεΐνη εξελίχθηκε για να λειτουργεί σε ένα συγκεκριμένο περιβάλλον
- Prions

VDLLKN



■ Πρόβλεψη τρισδιάστατης δομής πρωτεΐνης (modelling):

1. *ab initio*
2. Προσομοίωση διαδικασίας αναδίπλωσης με ελαχιστοποίηση ελεύθερης ενέργειας
3. Με βάση γνωστές τρισδιάστατες δομές (Μοριακή αντικατάσταση)

Αναδίπλωση *in vitro* και *in vivo*

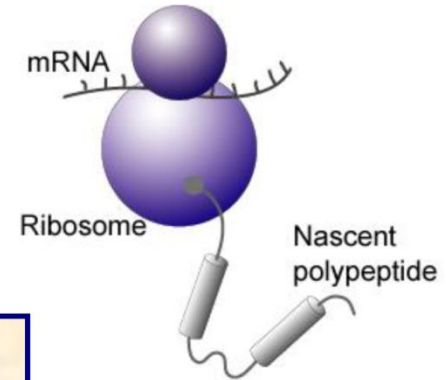
in vitro



Αναδίπλωση
με αραίωση
σε
ρυθμιστικό
διάλυμα



in vivo



Αναδίπλωση



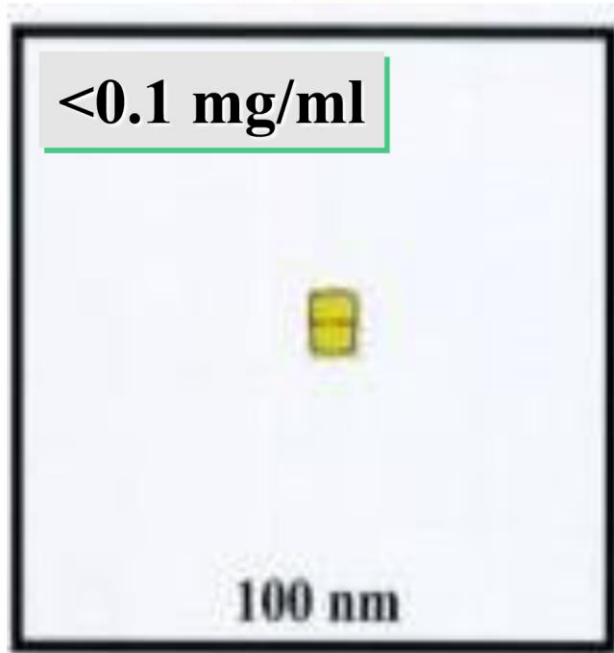
Διαφορές:

1. Υπάρχουν όλες οι πληροφορίες άμεσα διαθέσιμες για αναδίπλωση ενώ η άλλη διαδικασία είναι σταδιακή
2. το κυτταρικό περιβάλλον είναι πολύ διαφορετικό (πιο συνωστισμένο)

Δ.Δ. Λεωνίδας

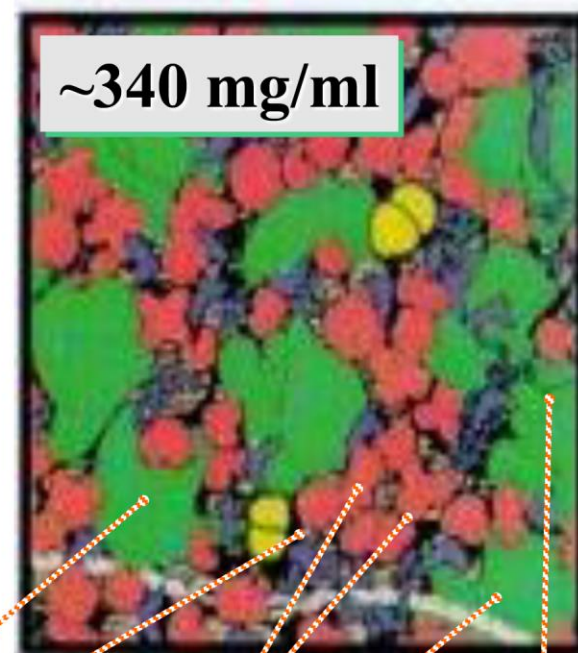
Μακρομοριακός συνωστισμός

in vitro



Ellis and Hartl (1996)
FASEB J. 10:20-26

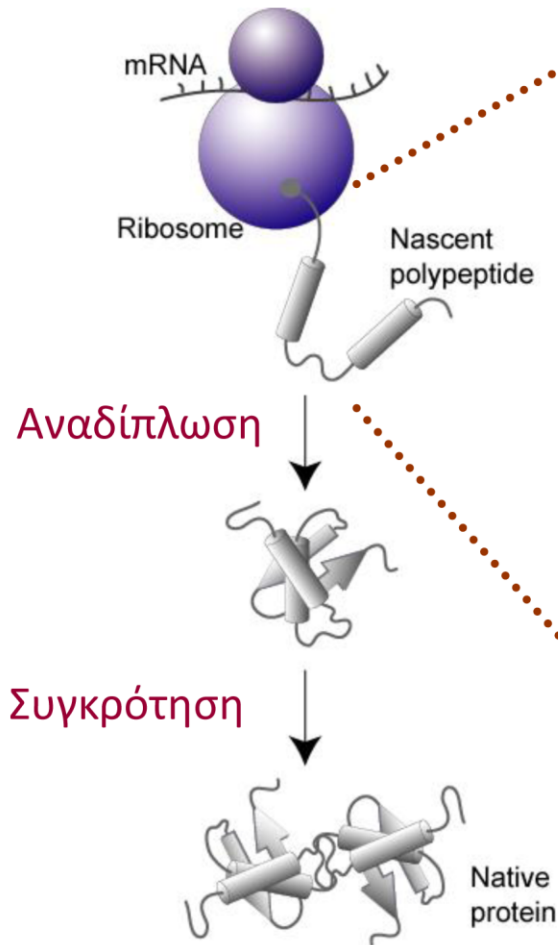
E. coli κυττόςολιο



ριβόσωμα
chaperonin
πρωτεΐνες
Νουκλεϊκά οξέα
Άλλα μακρομόρια

Όταν διεξάγουμε πειράματα *in vitro*, θα πρέπει όλοι να σκεφτόμαστε πως οι πρωτεΐνες σε απομονωμένα συστήματα μπορεί να μην συμπεριφέρονται όπως κάνουν στο κύτταρο

Πρωτεϊνική αναδίπλωση με συν-μετάφραση



Γεγονός:

-~ 30 πρώτα αμινοξέα της πολυπεπτιδικής αλυσίδας εντός του ριβοσώματος περιορίζεται (το N-άκρο προκύπτει πρώτα)

Υπόθεση:

μόλις η πολυπεπτιδική αλυσίδα εξωθείται, θα αρχίσει να διπλώνει συν-μεταφραστικά (δηλαδή, να αποκτά δευτεροταγείς δομές, υπερ-δευτεροταγείς δομές, επικράτειες) μέχρι να παραχθεί και να εξωθηθεί το πλήρες πολυπεπτίδιο

Ασθένειες που προκαλούνται από σφάλματα στην αναδίπλωση πρωτεϊνών

Κυστική ίνωση: ανωμαλία στην αναδίπλωση της μεμβρανικής πρωτεΐνης Tran η οποία ελέγχει την διέλευση χλωρίου διαμέσου των μεμβρανών των επιθηλιακών κυττάρων διαφόρων οργάνων του σώματος όπως των πνευμόνων, του παγκρέατος, των ιδρωτοποιών αδένων και του εντέρου.

Ασθένειες που προκαλούνται από τη λανθασμένη αναδίπλωση των πρωτεϊνών Prion :

Ασθένεια Kuru

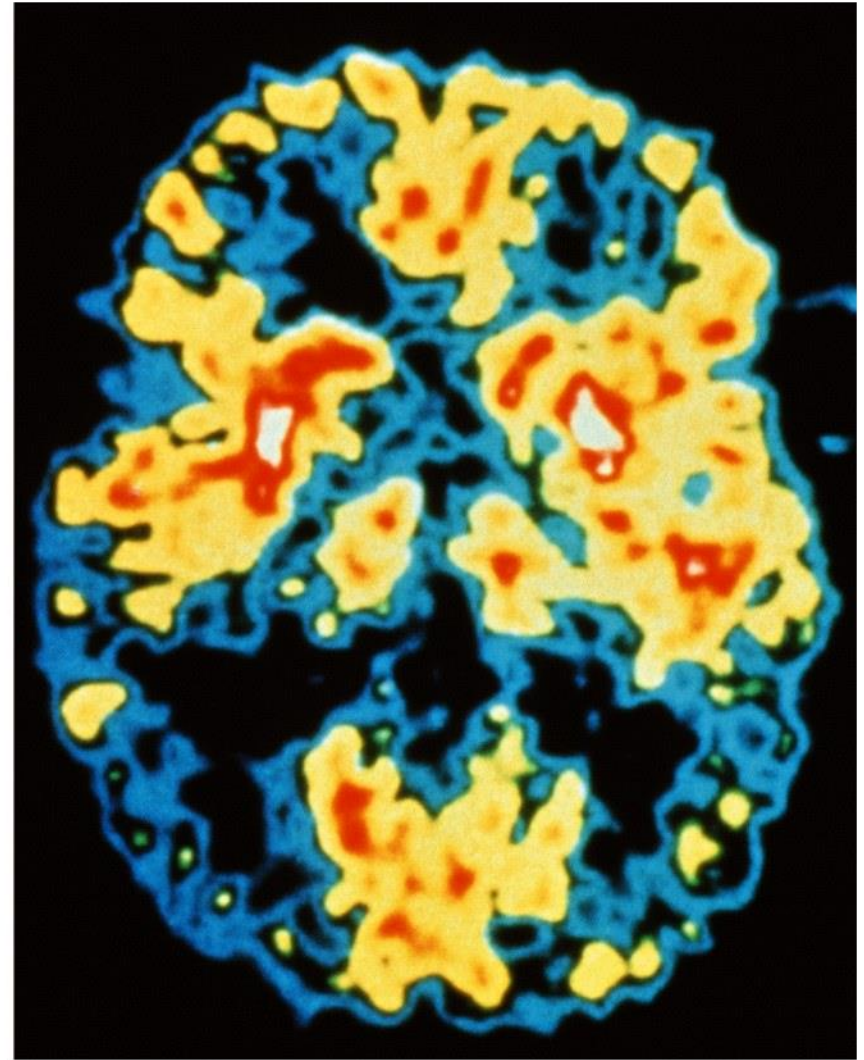
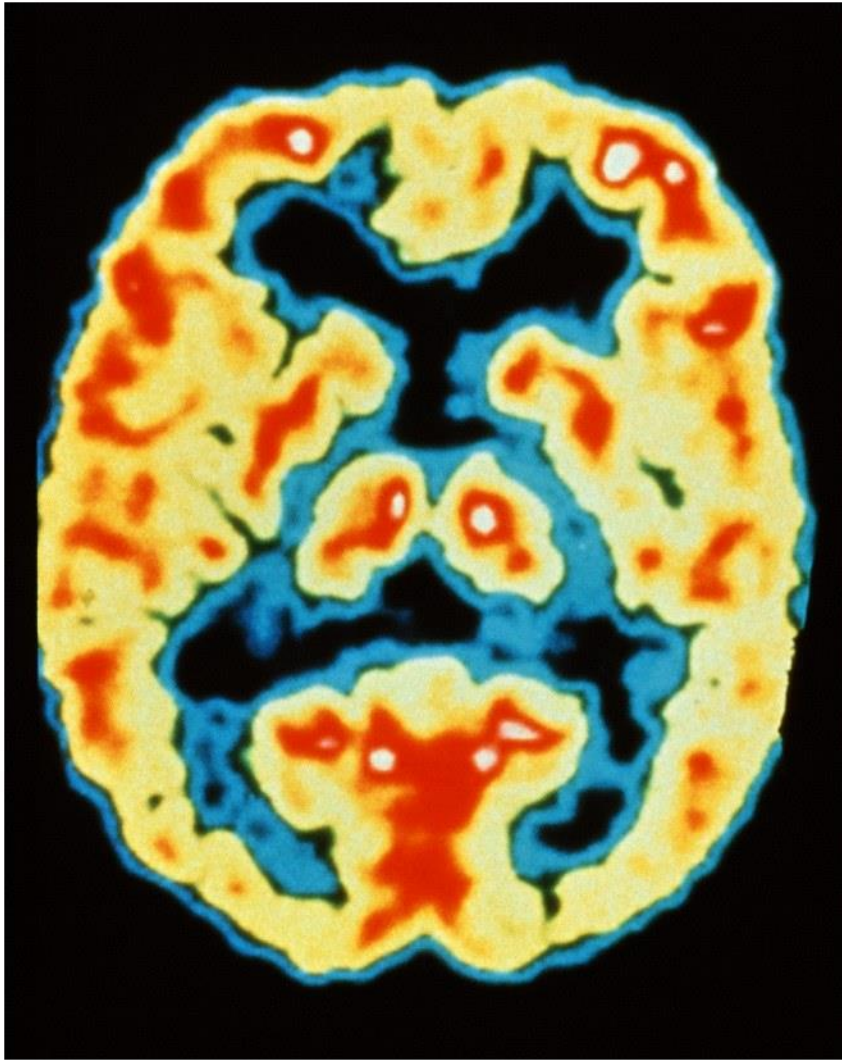
Νόσος Creutzfeldt-Jakob

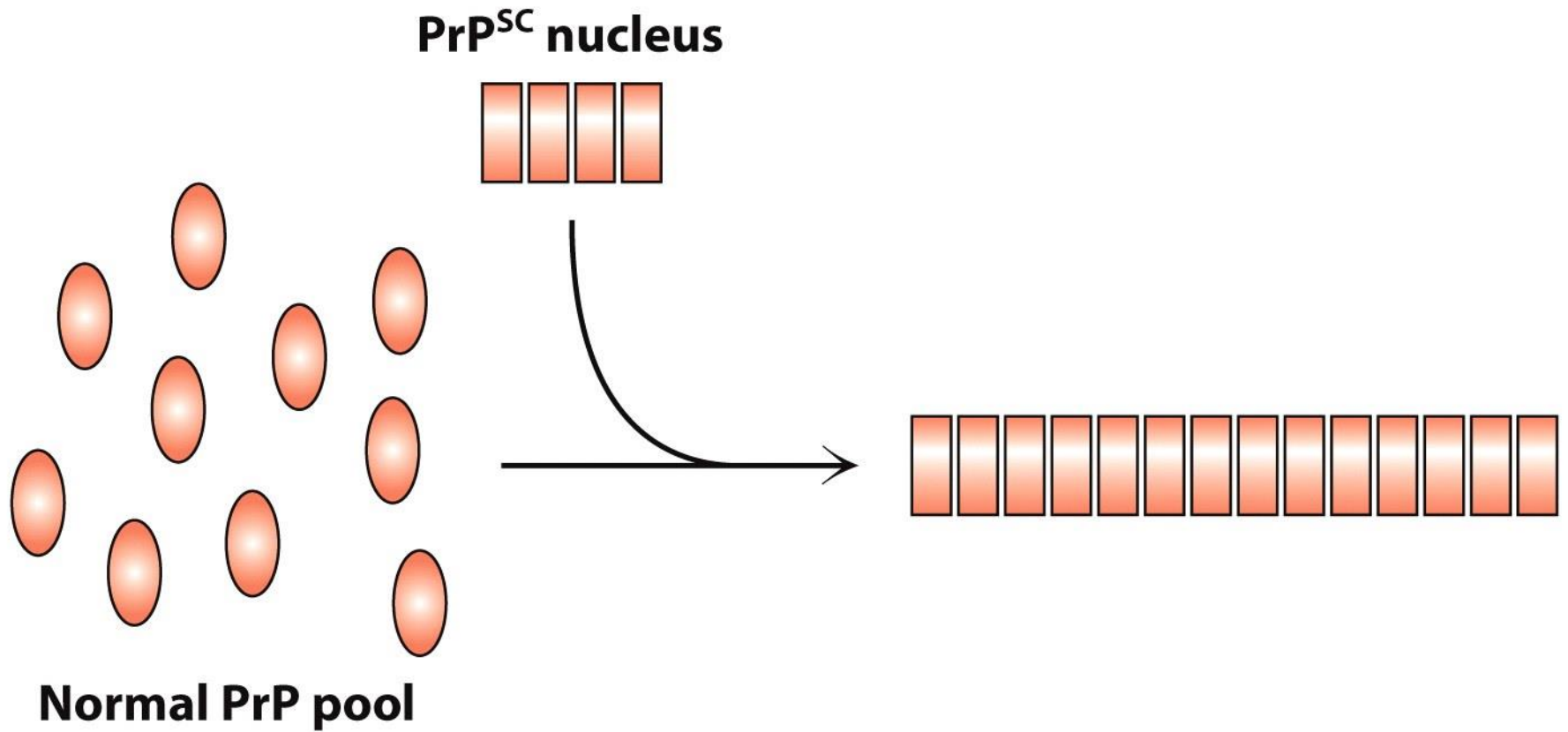
Τρομάδης νόσος των προβάτων

Νόσος των τρελών αγελάδων

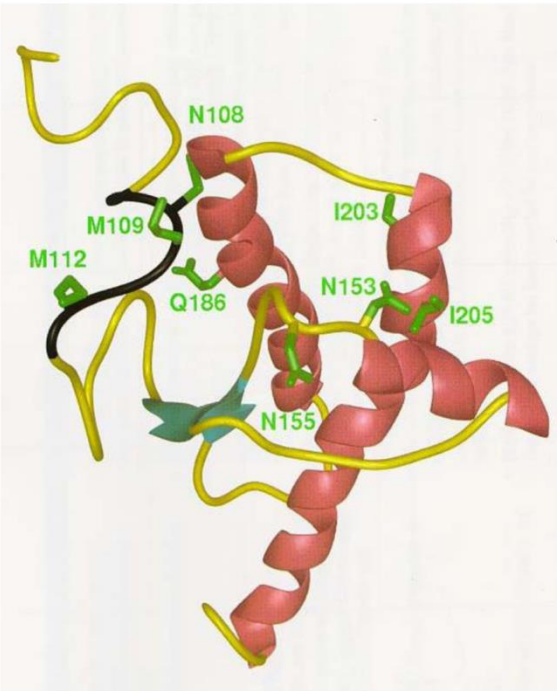
Οι λανθασμένα διπλωμένες πρωτεΐνες prion δρουν ως μολυσματικοί παράγοντες. Το επιτυγχάνουν αυτό επειδή ενεργούν ως chaperons τα οποία μπορούν να πολλαπλασιαστούν με πρόσδεση στη φυσιολογική PrP και αναδιπλώνοντας της στην μολυσματική της μορφή.

Οι μηχανισμοί λειτουργίας της φυσιολογικής πρωτεΐνης prion αλλά και αυτών που προκαλούν ασθένειες δεν είναι ακόμα προσδιορισμένες.



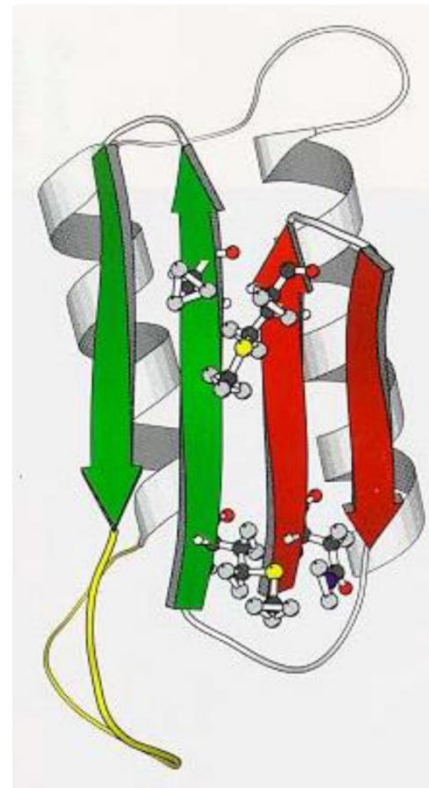


Δύο διαφορετικές διαμορφώσεις της πρωτεΐνης prion



Φυσιολογική διαμόρφωση

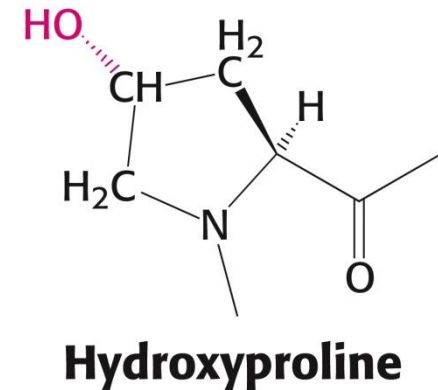
PrP^{Sc} είναι μια πολύ σταθερή ισομορφή της πρωτεΐνης πριόν και σχετίζεται με την ασθένεια τρελών αγελάδων



PrP^{Sc} έχει υψηλή θερμοδυναμική σταθερότητα και είναι ιδιαίτερα ανθεκτική στην θερμότητα αποδιάταξης (μπορεί να θερμαίνεται σε θερμοκρασίες αποτέφρωσης και εξακολουθεί να διατηρεί τη δομή της και να παραμένει αρκετά παθογόνα).

Μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις

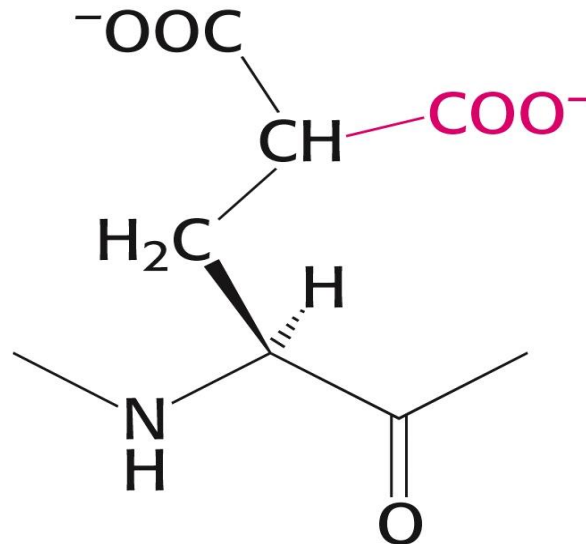
- Ομοιοπολική τροποποίηση
- Ακετυλοομάδες στο αμινοτελικό άκρο → ανθεκτικότητα σε πρωτεόλυση
- Υδροξυλίωση προλίνης → σταθεροποιεί ίνες κολλαγόνου (σκορβούτο)



■ γ-καρβόξυγλουταμινικό

■ Έλλειψη βιταμίνης K →

ανεπαρκής καρβοξυλίωση προθρομβίνης →
αιμορραγία

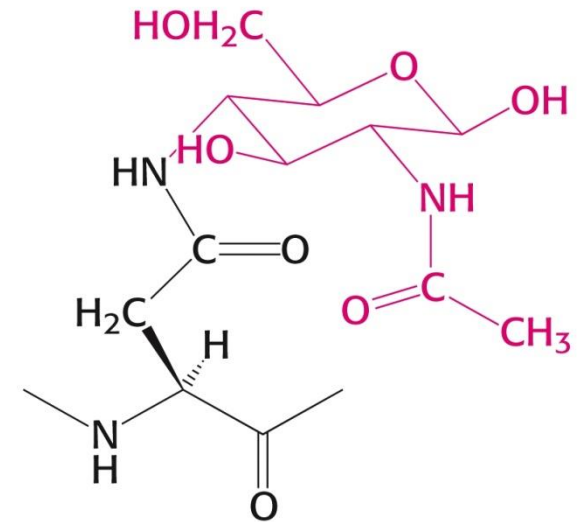


γ-Carboxyglutamate

■ Γλυκοζυλίωση Asn
Κυρίως για εξωκυτταρικές
πρωτεΐνες → πιο υδρόφιλες

■ Συμμετέχουν σε αλληλεπι-
δράσεις με άλλες πρωτεΐνες

■ Γλυκοζυλιωμένη αιμοσφαιρίνη – Εξάρτηση από
υπεργλυκαιμία



**Carbohydrate-asparagine
adduct**

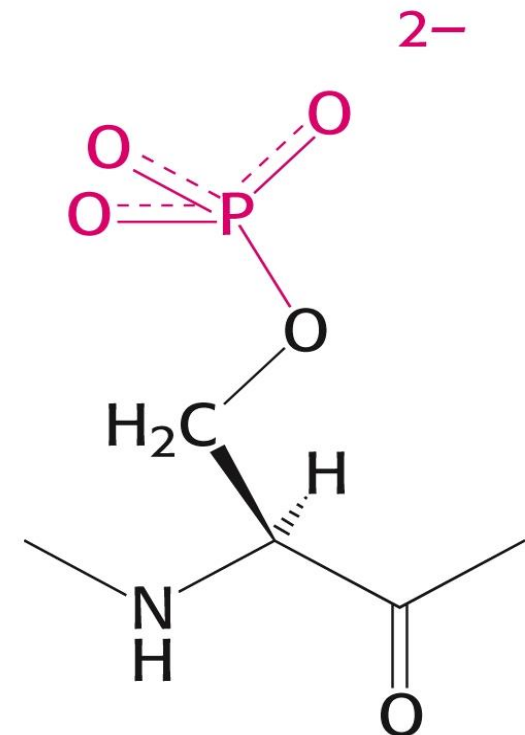
■ Προσθήκη λιπαρού οξέος σε α- αμινομάδα ή σουλφυδρυλομάδα Cys → υδρόφοβος χαρακτήρας

■ ΦΩΣΦΟΡΥΛΙΩΣΗ

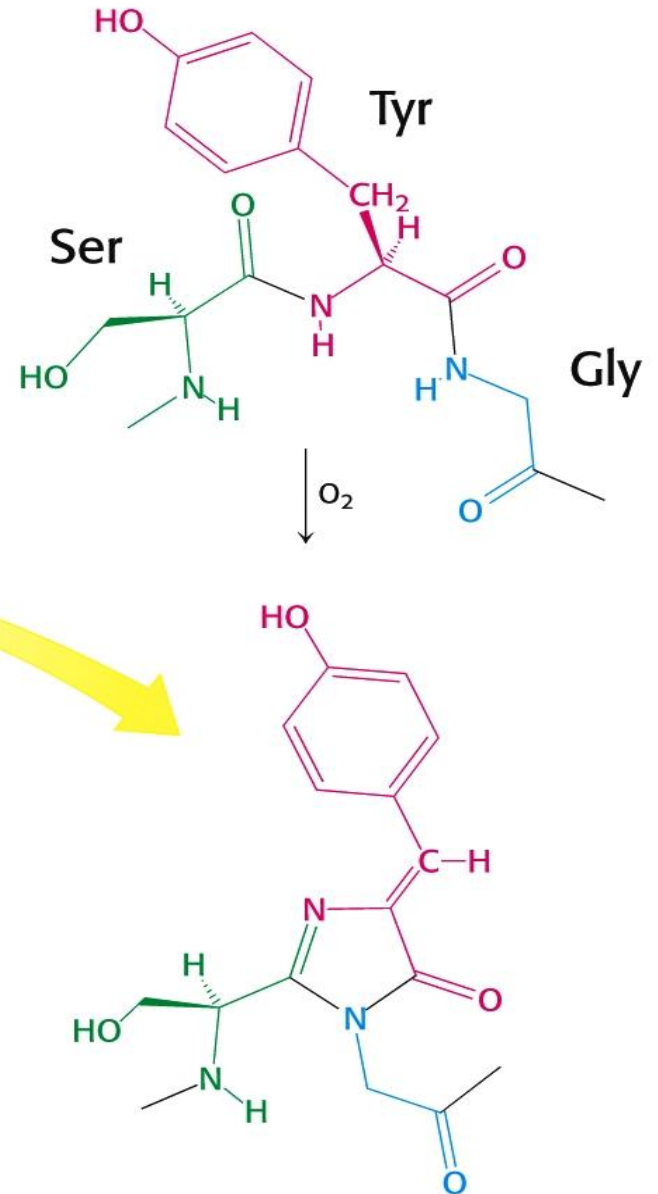
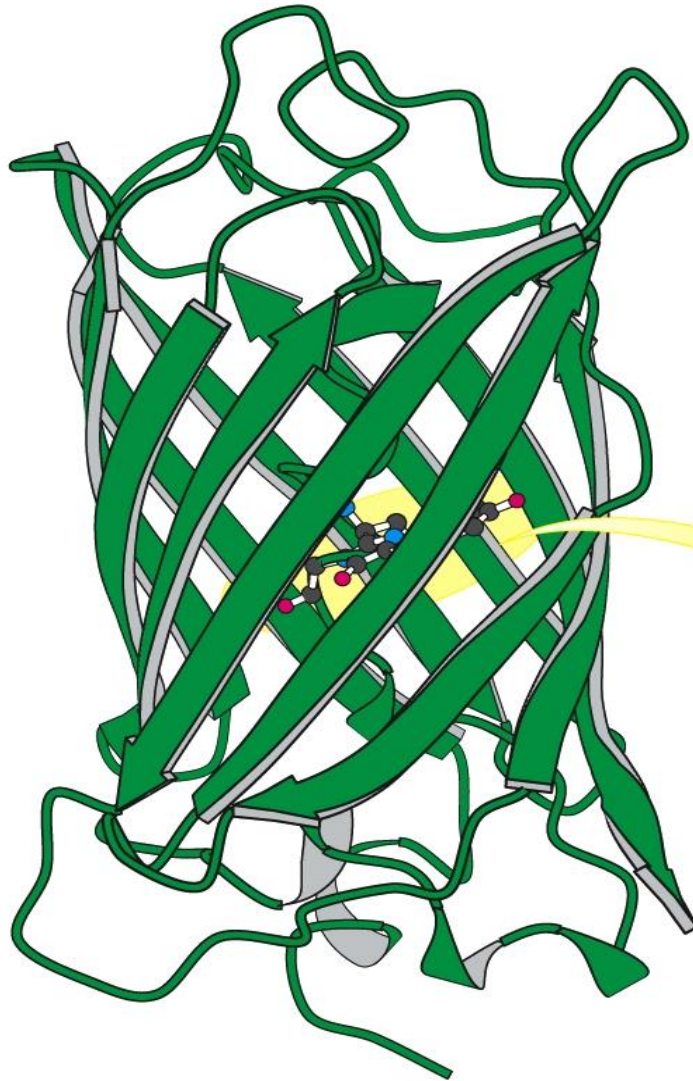
Ser, Thr, Tyr →

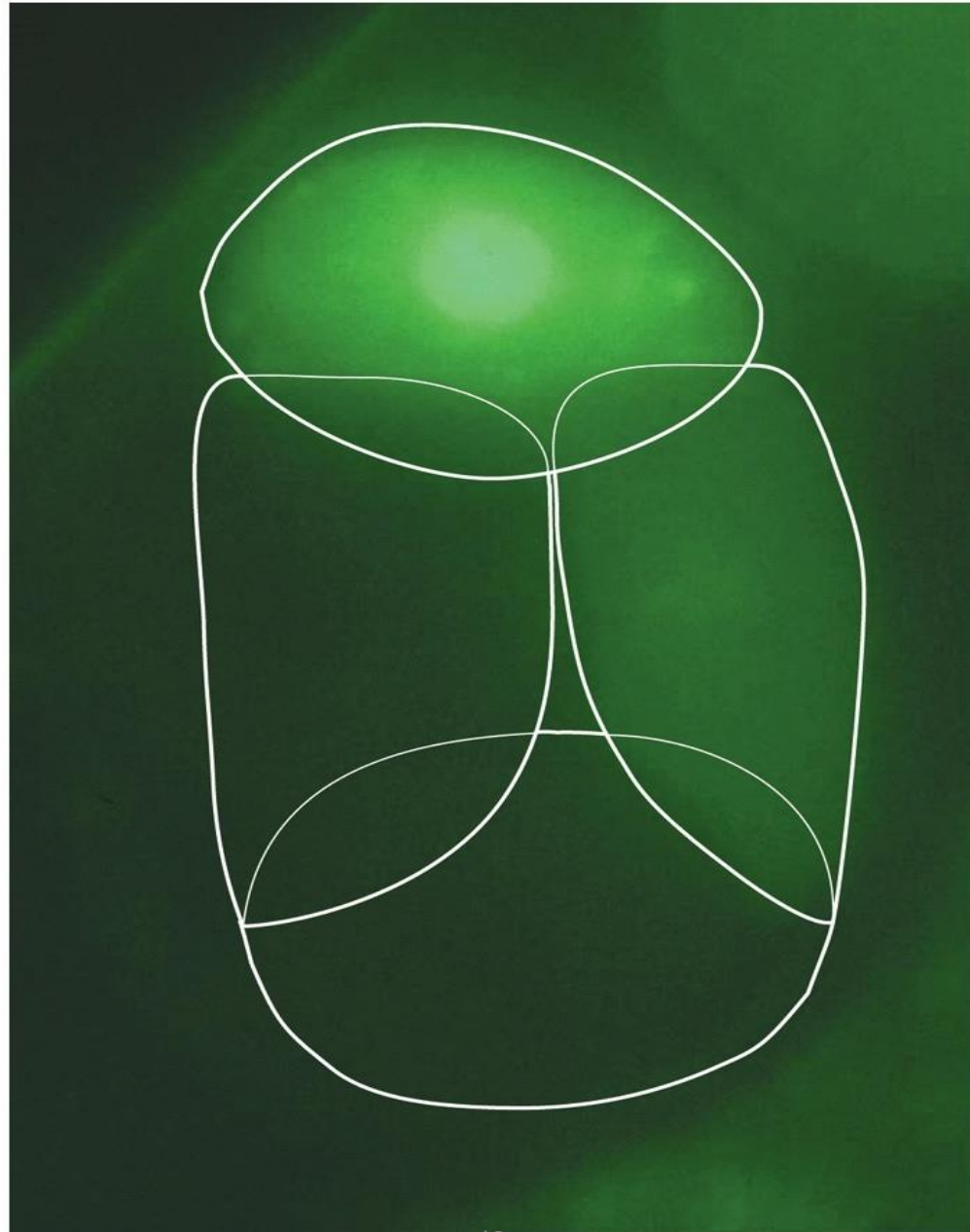
Αντιστρεπτοί διακόπτες

→ Ρόλος στην μεταγωγή σήματος



Phosphoserine





14/10/2015

Δ.Δ. Λεωνίδας