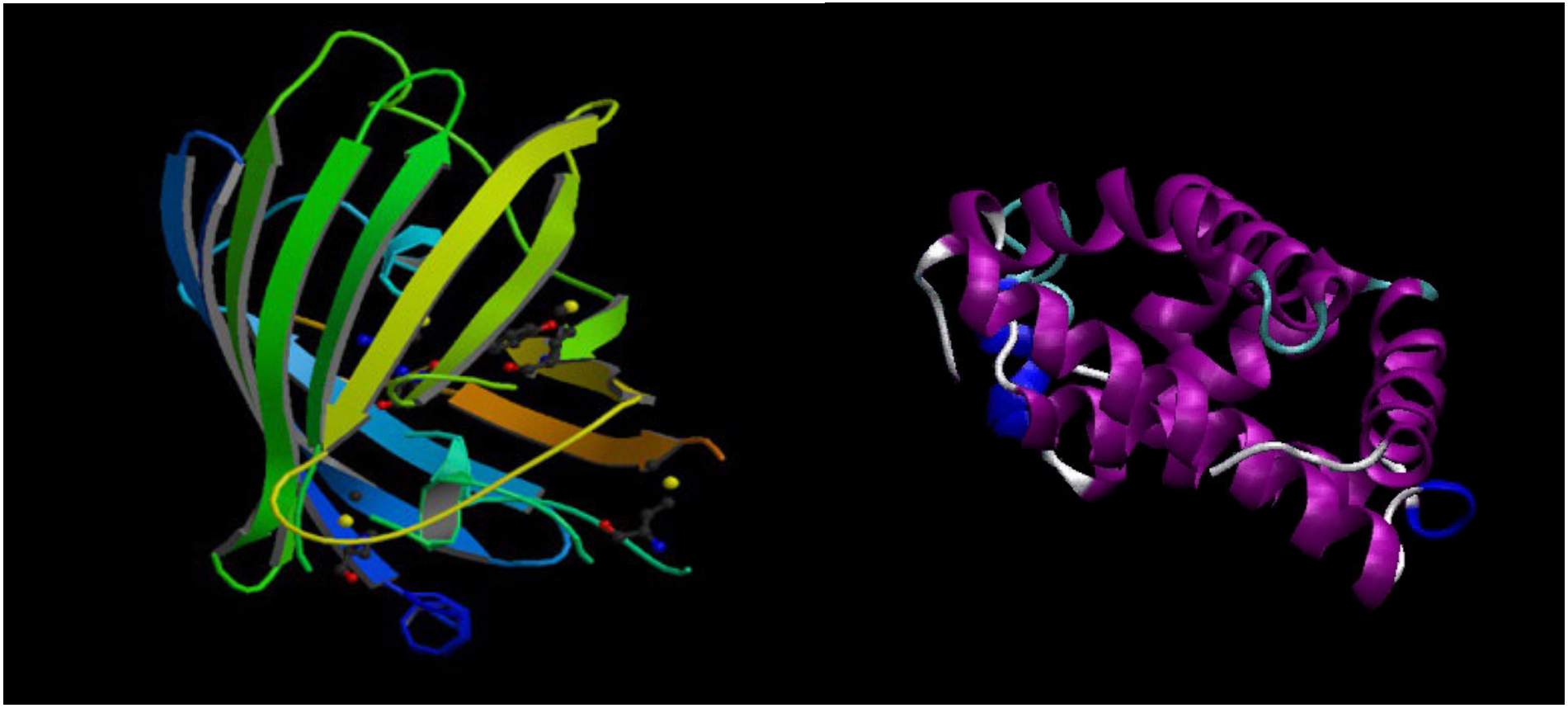
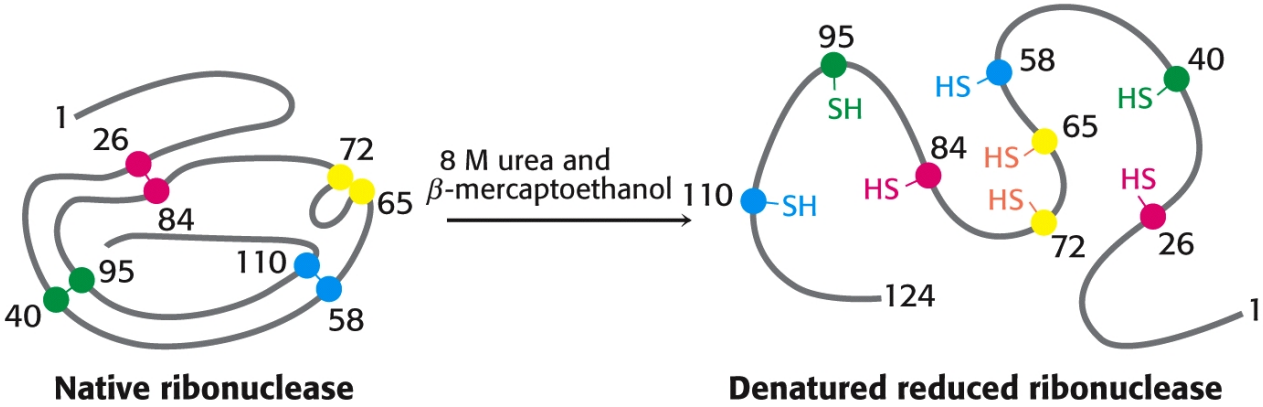
A fehérjék harmadlagos vagy térszerkezete



Még a globuláris fehérjék térszerkezete is sokféle lehet.

A ribonukleáz redukciója és denaturálódása

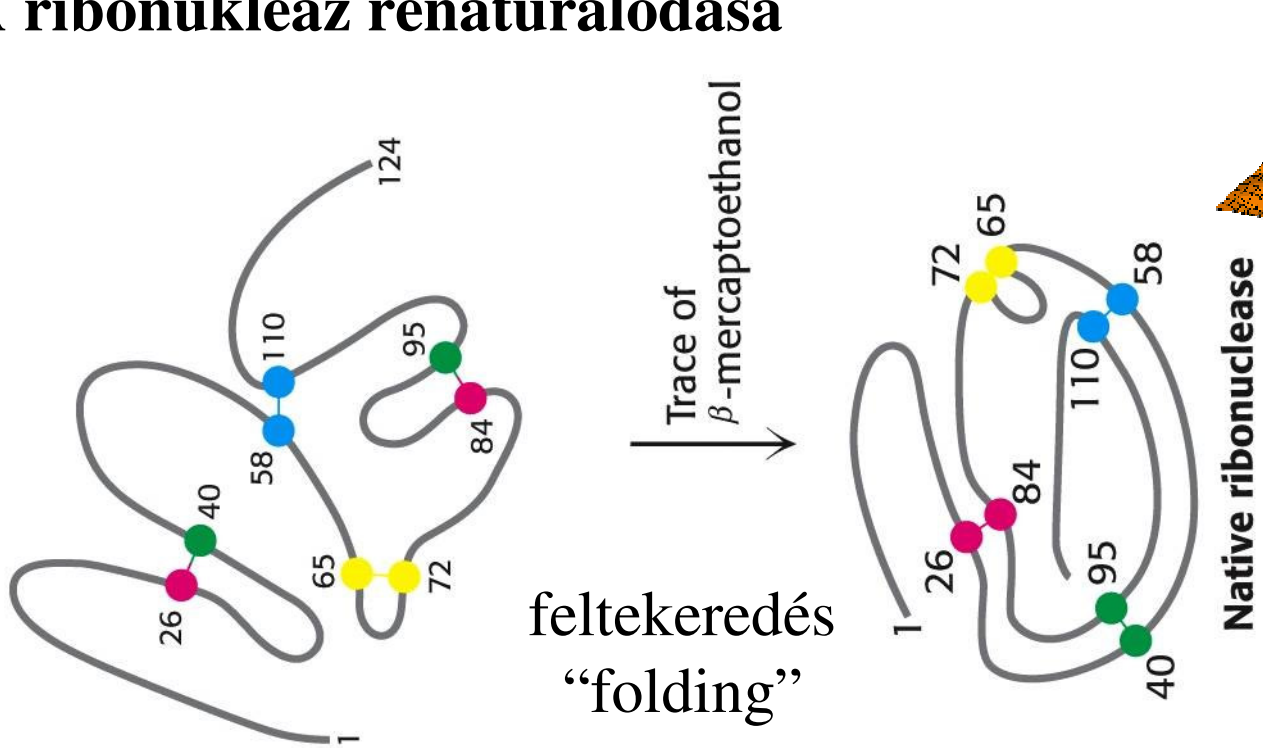


Chrisian B. Anfinsen

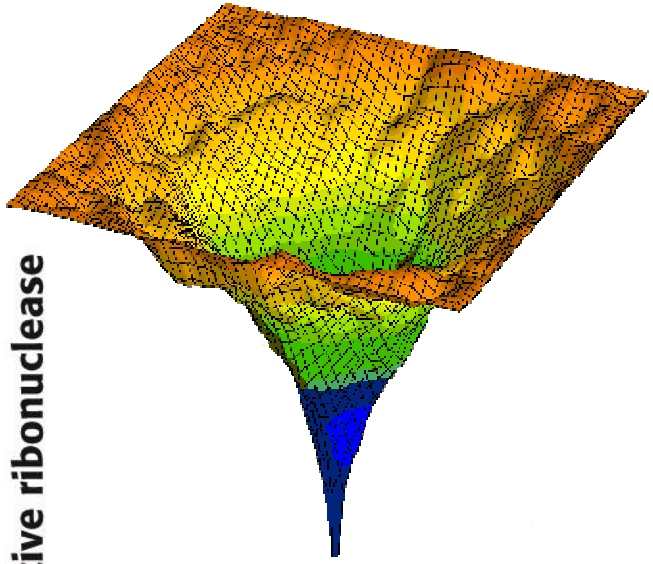
1972 Nobel-díj

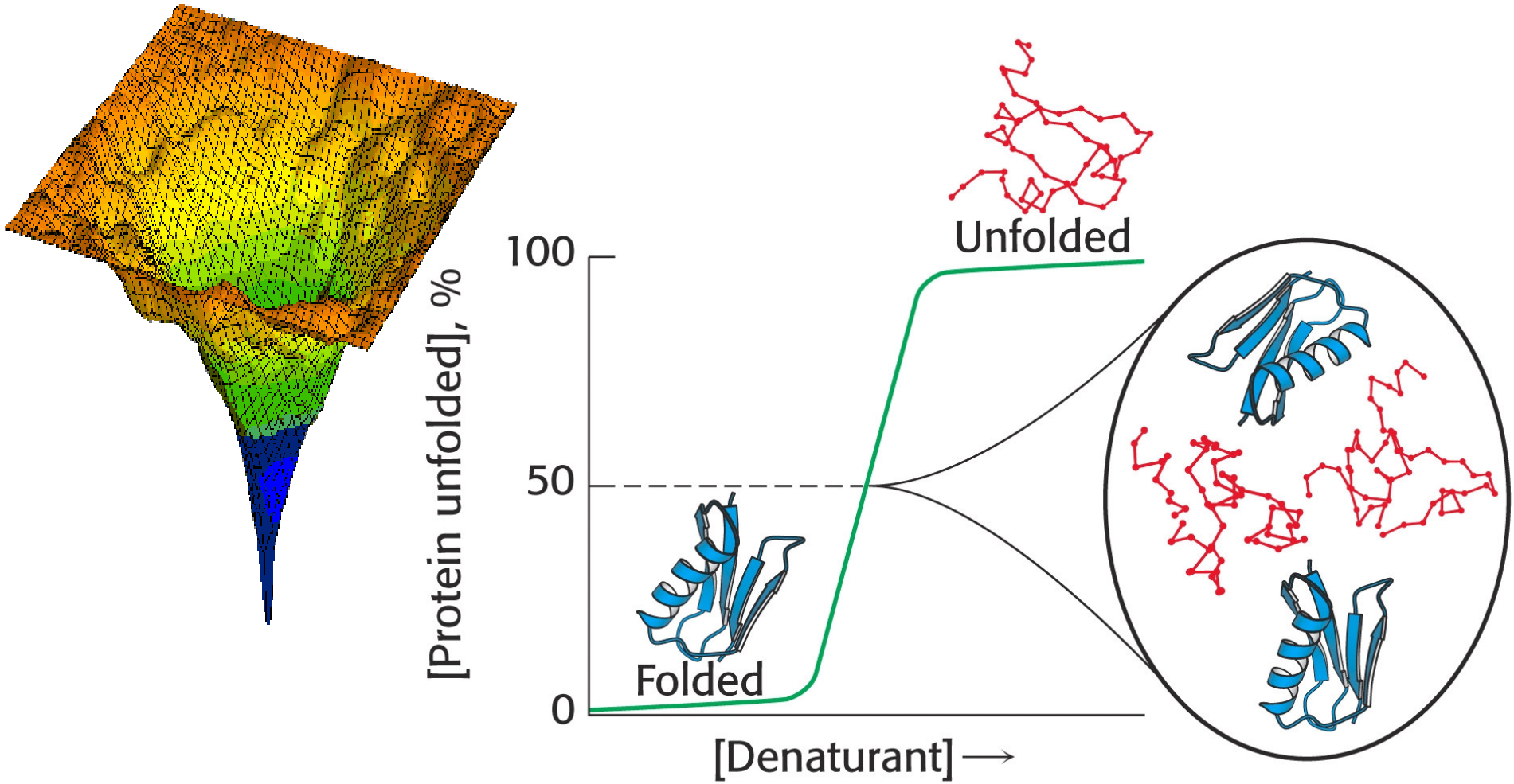
Ribonukleáz feltekeredése

A ribonukleáz renaturálódása



feltekeredés
“folding”

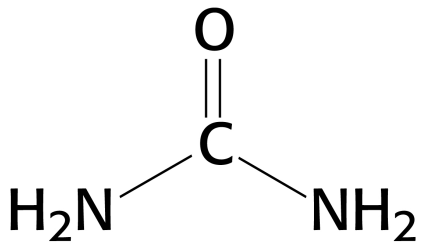




50%-os feltekeredés:
a molekulák fele feltekeredett
másik fele kitekeredett
nincs félig feltekeredés!!!

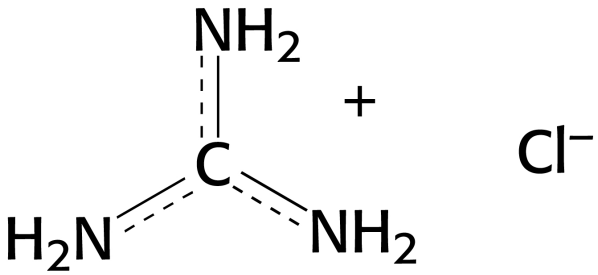
Kaotróp molekulák

$LiClO_4$
4,5 mol



Urea

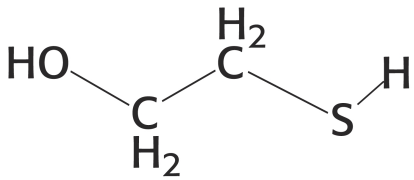
6–8 mol



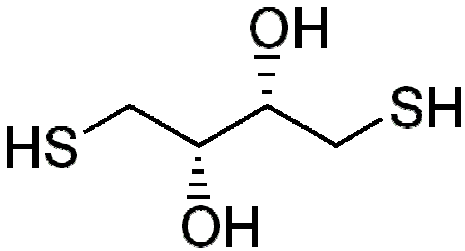
Guanidinium chloride

6 mol

Diszulfidhidak elbontása



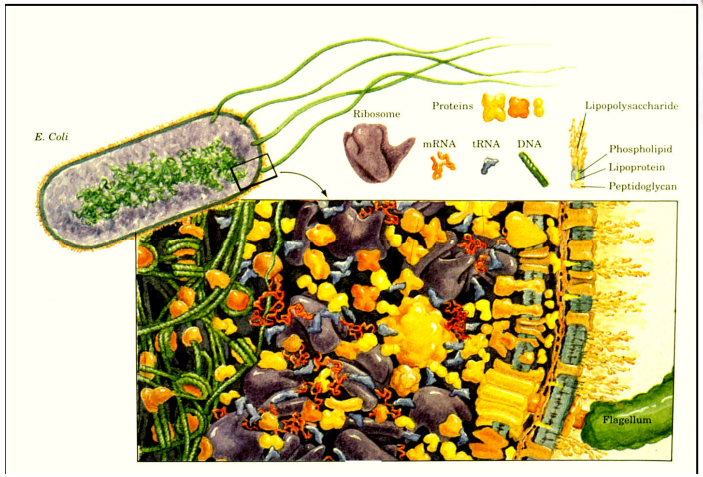
β-Mercaptoethanol

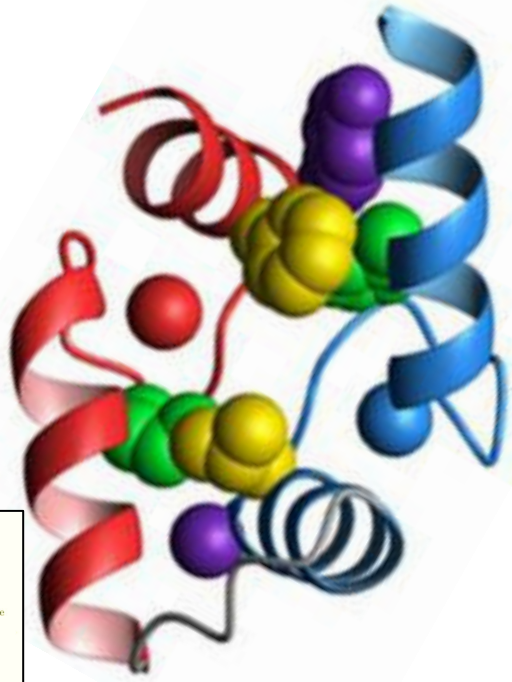


DTT, ditiotreitol

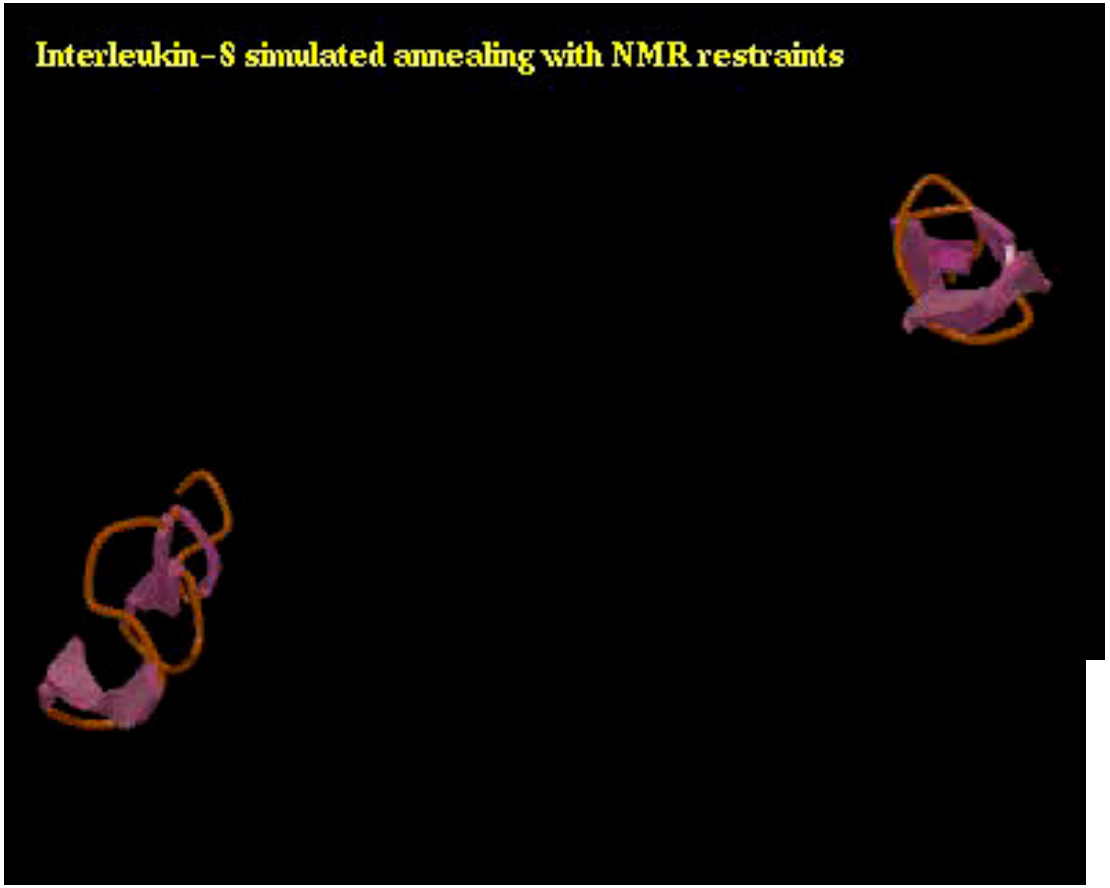
CH_3CO_3H

A fehérjék
dinamikus téralkata
teszi lehetővé
a fehérje-fehérje kölcsönhatást: az **élet megjelenését**

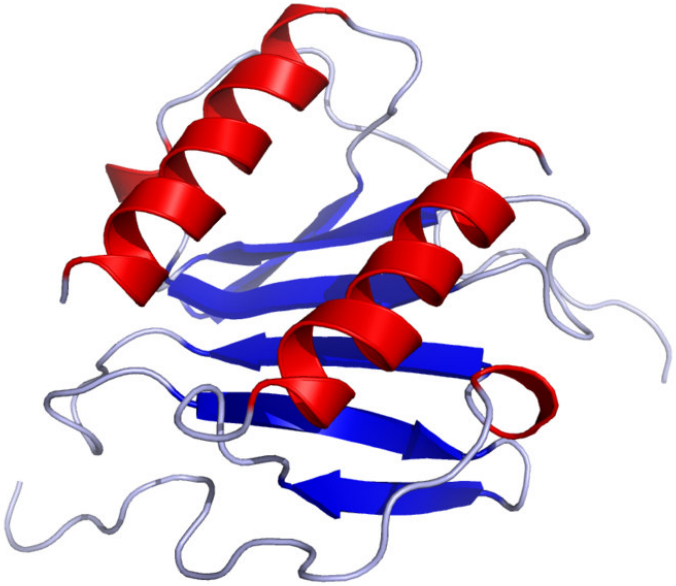




Auguste Rodin

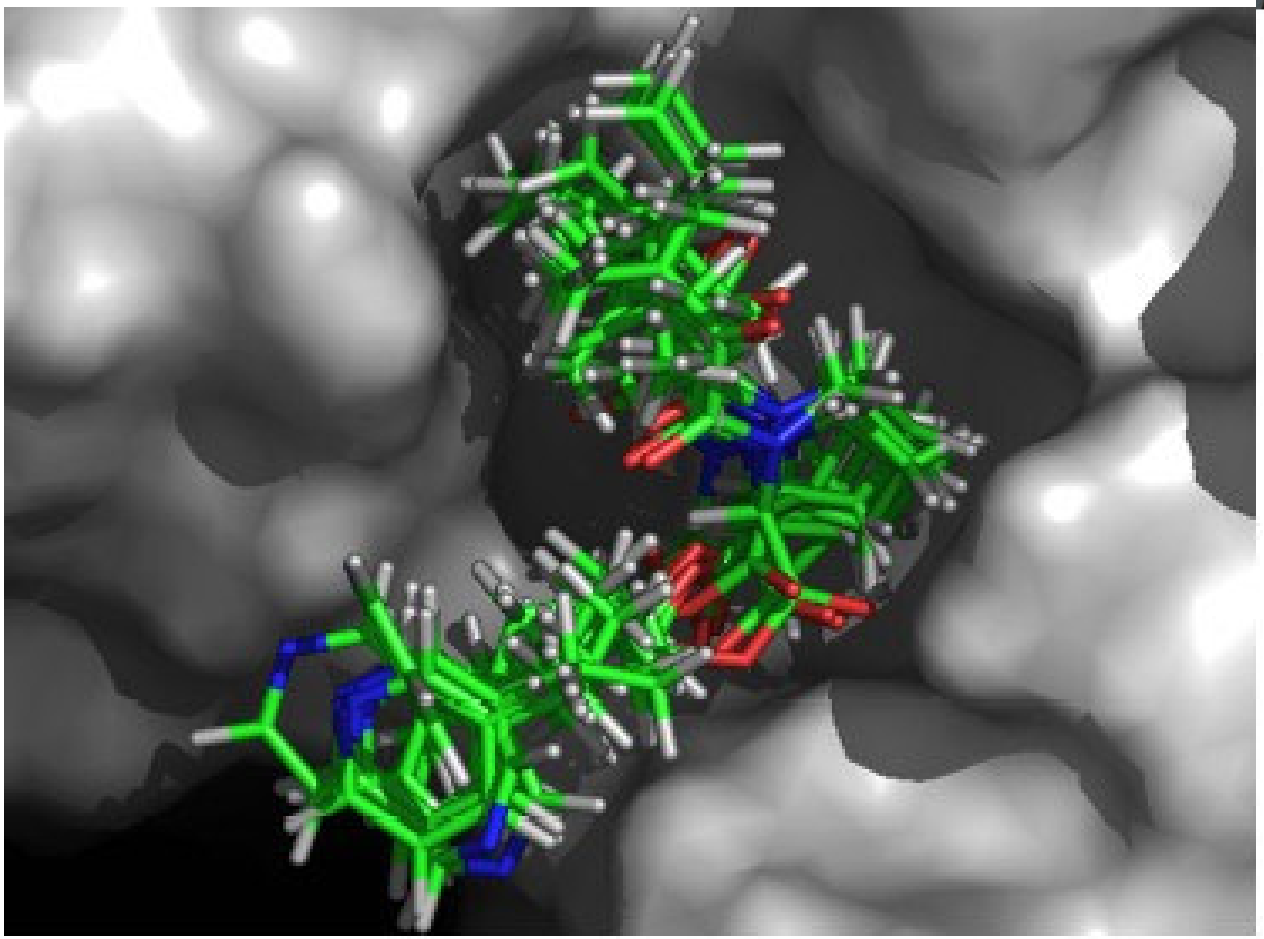


Az önstabilizáció diadala: az Interleukin-8



Az IL-8 legfontosabb feladata a célsejteken a kemotaxis kiváltása.

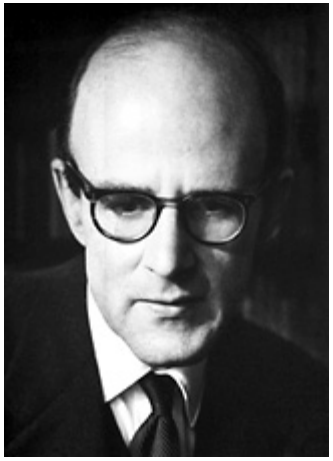
A fehérjék
dinamikus téralkata
teszi lehetővé a fehérje-ligand
kölcsönhatást,
a **gyógyszerek** hatásosságát

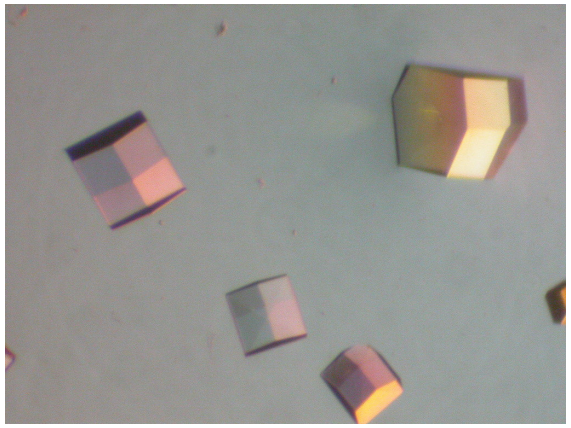


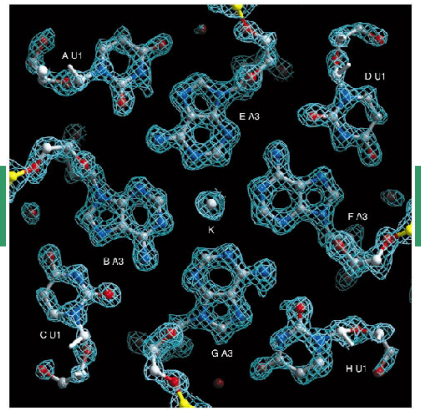
Fehérjék térszerkezete: mit rejt a kristály?

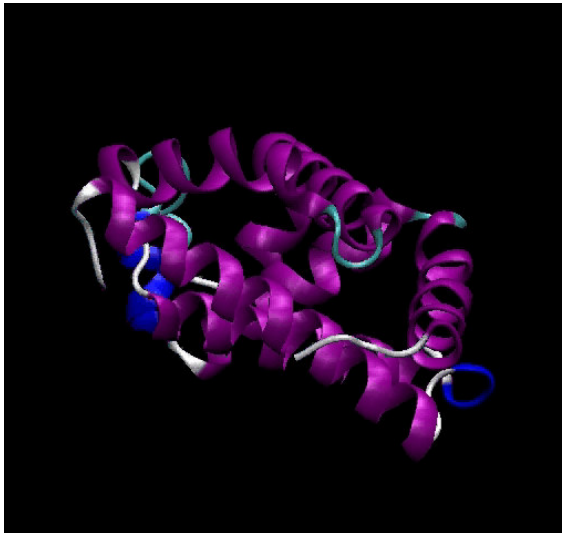
Fehérje röntgenkrisztallográfia: kémiai Nobel-díj, 1962

Max Perutz, John Kendrew





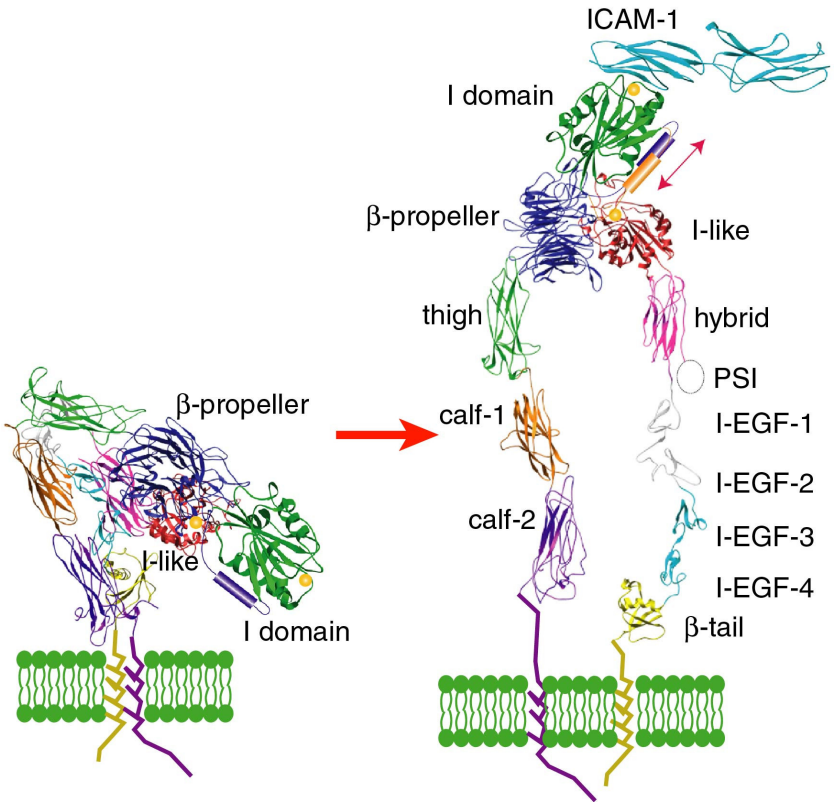


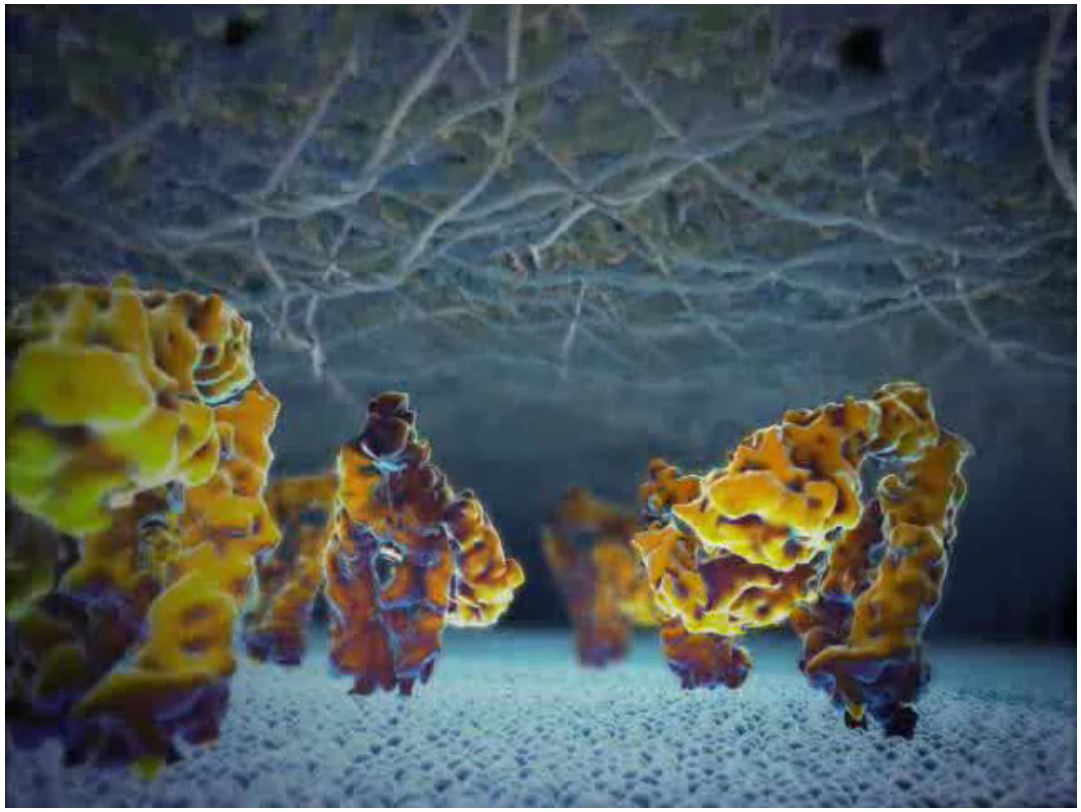


kristályban az egyes atomok helye térben jól meghatározott ⇒ részletgazdag térszerkezet

Több doménből felépülő fehérjék

a működéshez elengedhetetlen a domének kooperativitása



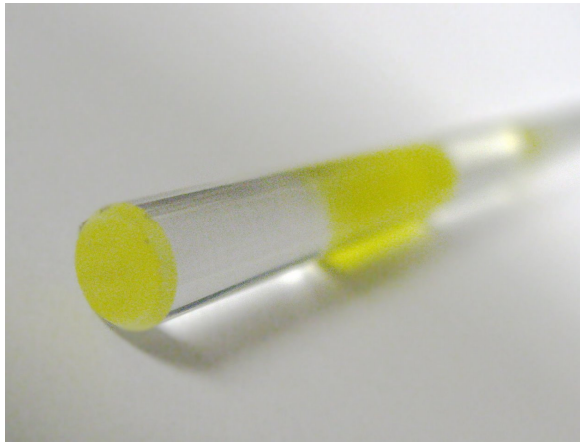


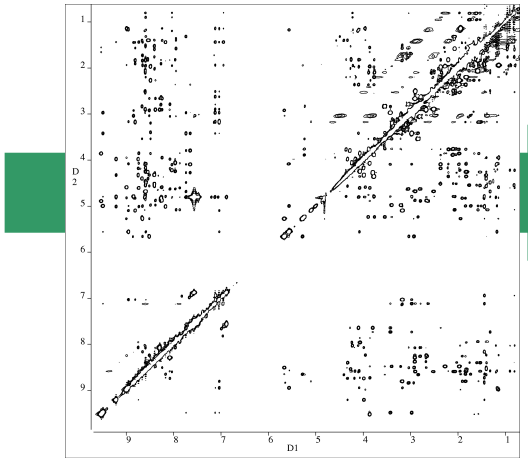
sejt-sejt kapcsolatot kialakító fehérjék (integrinek) aktiválódása
során jellegzetes makroszkopikus szerkezetváltozás következik be.

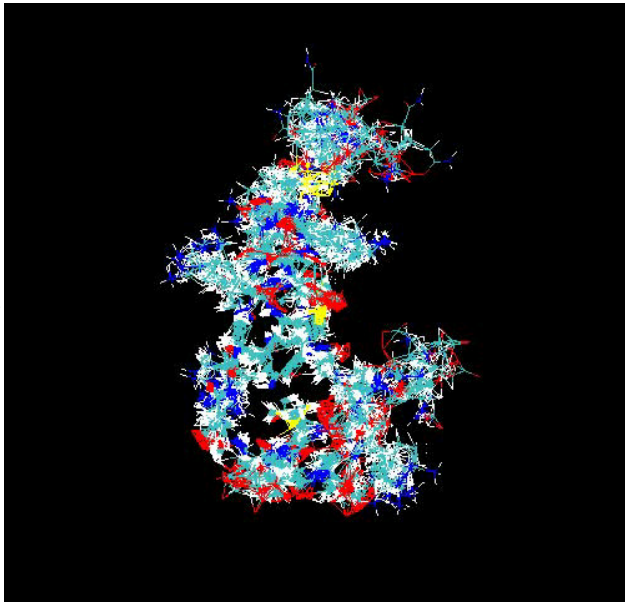
Fehérjék oldatban: NMR-spektroszkópia

Fehérje NMR:
kémiai Nobel-díj, 2002

Kurt Wüthrich





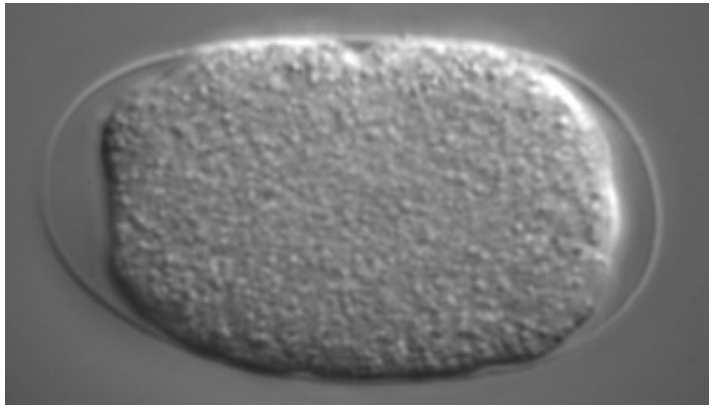


szerkezeti sokaság

A makroszkopikus mozgás mikroszkopikus háttere: „ a táncrend”

10 cm

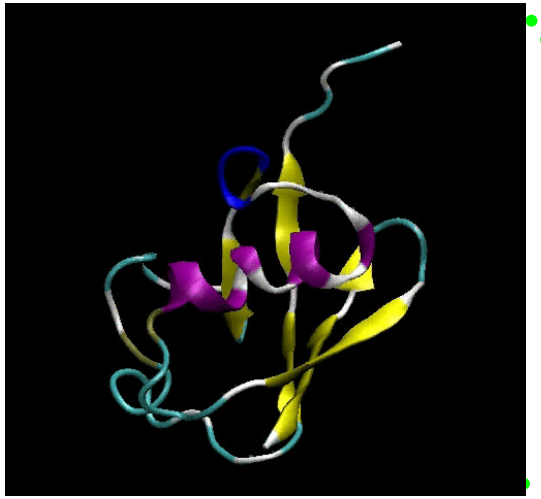
szervezet



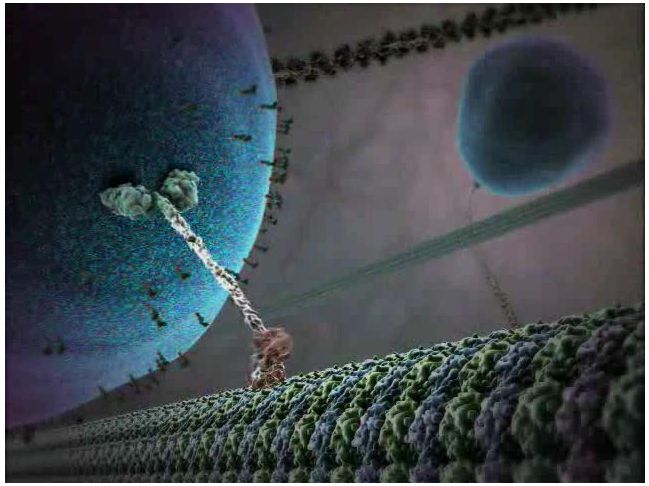
0,1 mm

sejtek

1 nm



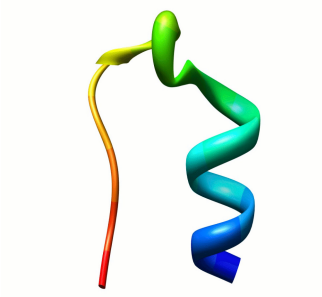
fehérjemolekulák

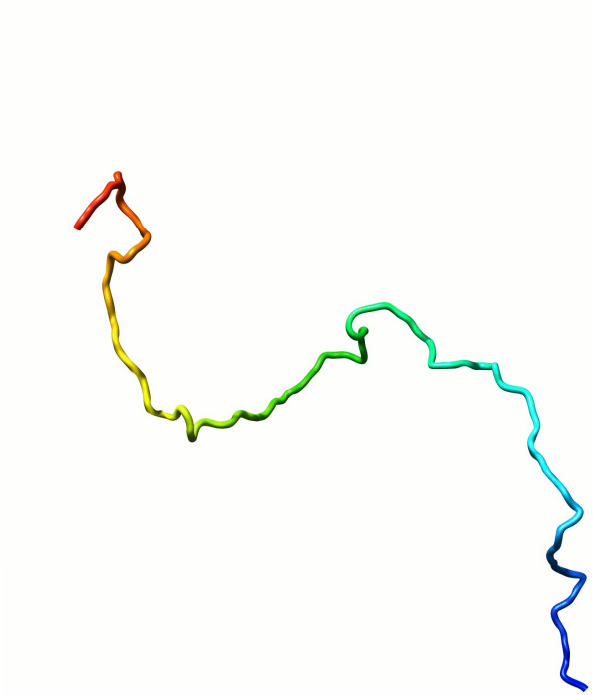


0,1 µm

sejtalkotók

A „táncrend” hátterében a fehérjék térszerkezetének dinamikus jellege áll!

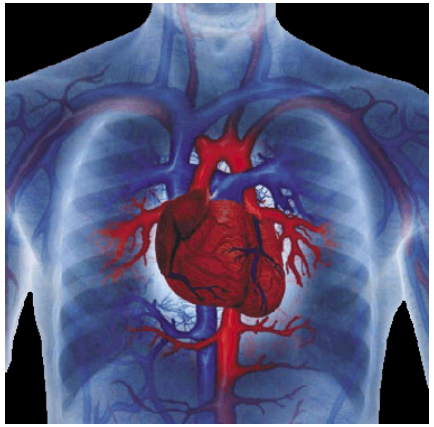




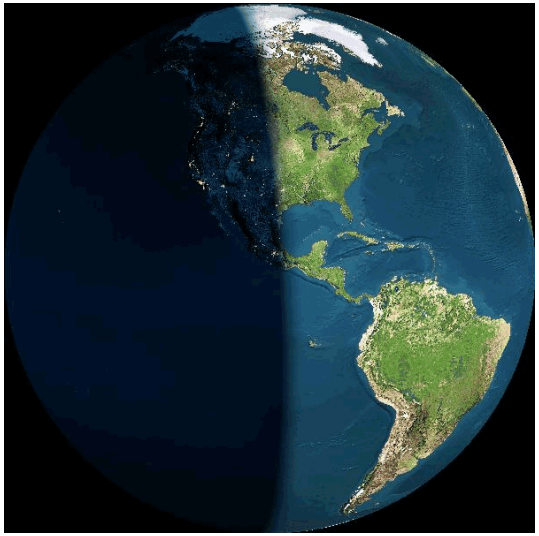
Szinkronizáltabb mozgás, rendezettebb téralkat

szinkronizálatlan mozgás, rendezetlenebb téralkat

A mozgás időskálái

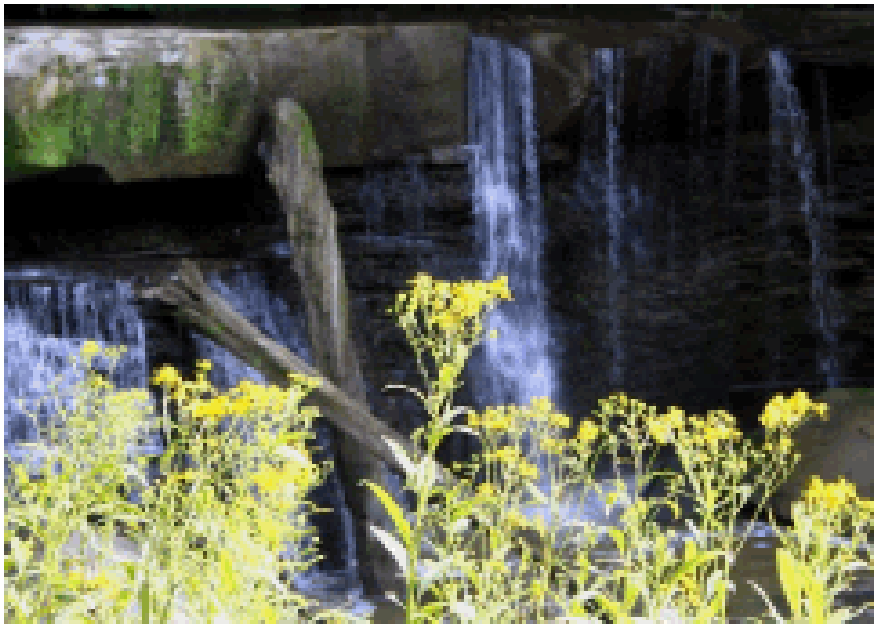


~ 1s



~ 100 ezer

1h

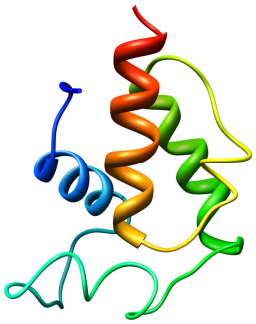


~ 30 millió

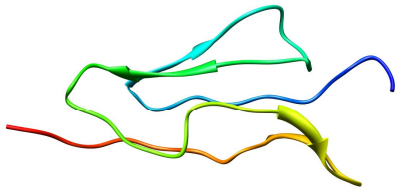
1év

A molekuláris mozgás időskálái

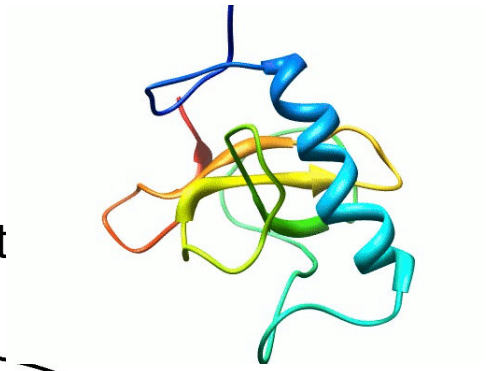
hurkok és kanyarok záródása
0.1ms ↔ 10ms

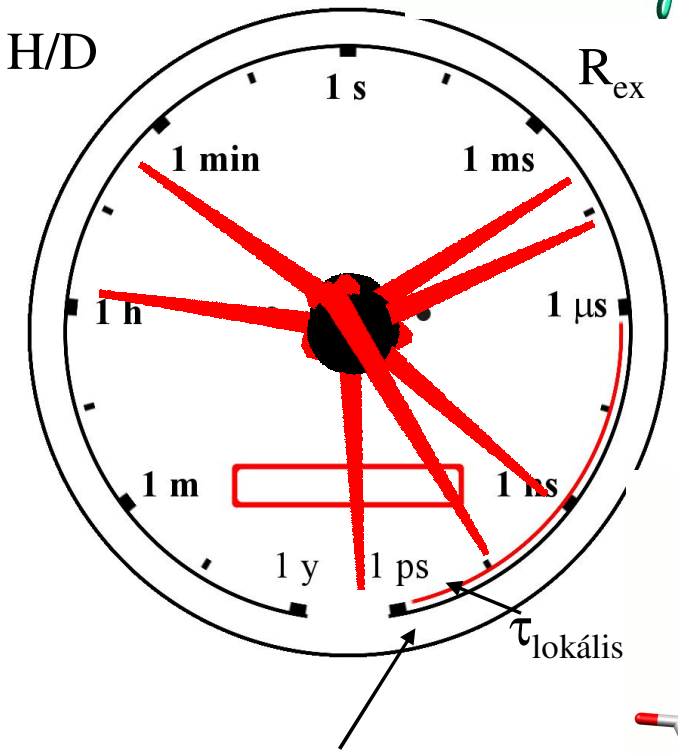


feltekeredés
1ms ↔ 1h

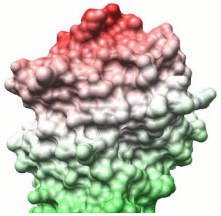


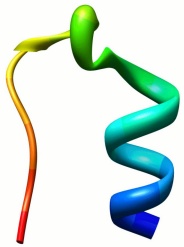
másodlagos szerkezet elemek 10ns ↔ 1ms



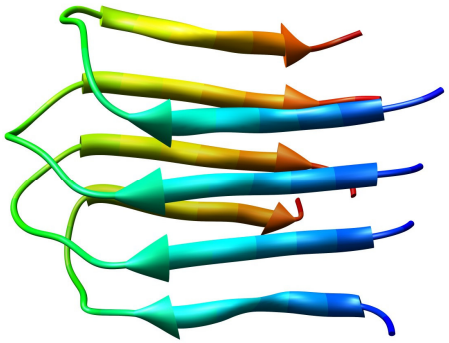


Rot. Dif.
korrel. idő
1ns<τ_c< 10

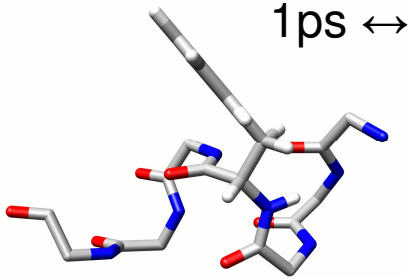




gerinc dinamika
1ps ↔ 10ns

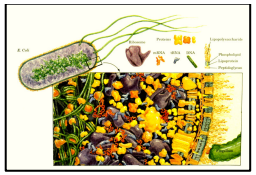


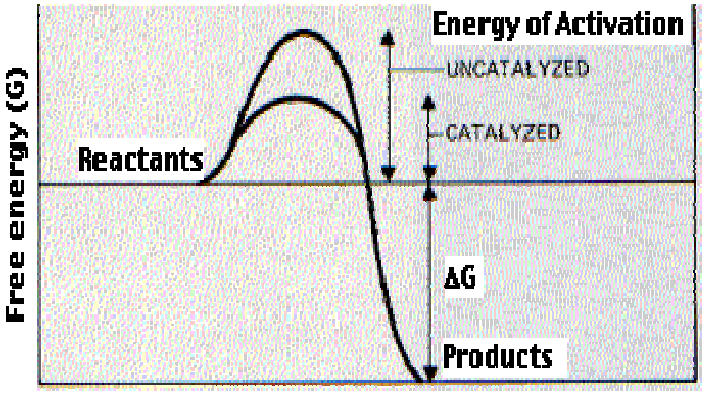
aggregáció
1 s ↔ 1 év



oldallánc forgás
0.1ps ↔ 10 ps

Bevezetés az enzimek világába

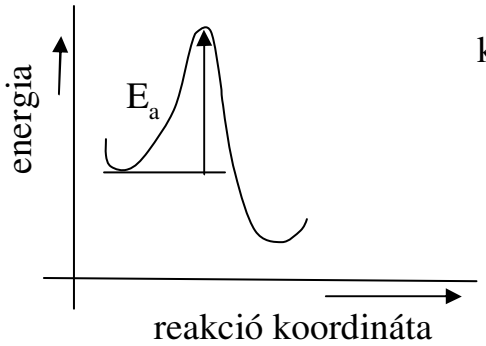


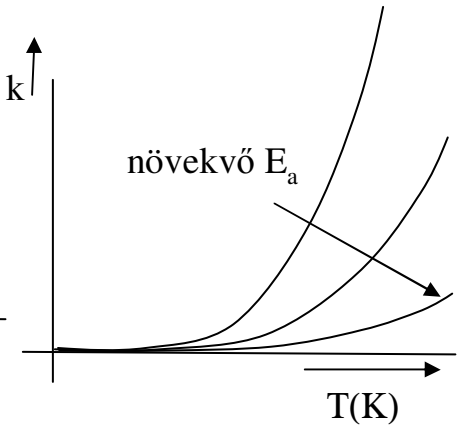


a sejtben előforduló szinte összes **kémiai átalakítást** biológiai katalizátorok, az **enzimek** végzik!

- a legtöbb enzim **fehérje**
- az átalakítás **sebessége** akár 10^6 -10^{12} szeres lehet a biokatalízis hatására.
- így lehetséges, hogy a reakciók **végbemennek** már 37°C-on és neutrális pH-n.

memo: Arrhenius egyenlet (a seb. egy. T függése):
$k = A \exp(-E_a/RT)$





Keeler 138

specificitás: az enzim nagy affinitással köt mind a saját szubsztrátjához, mind a termékhez.
(*E. Fischer* kulcs-zár modell megalkotása.)

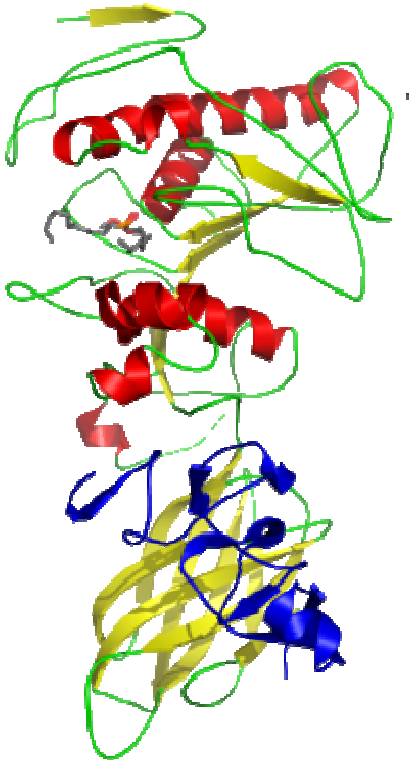
Tipikus reakció:

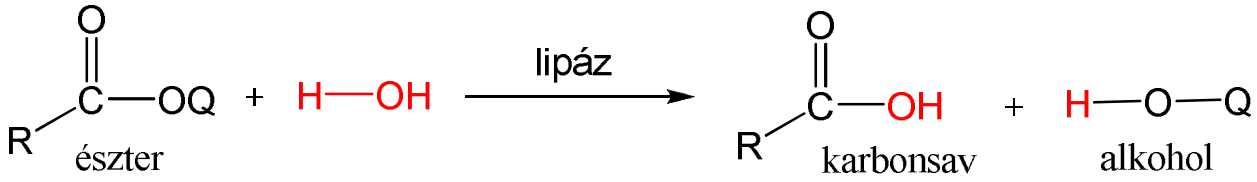
enzim + szubsztrát ↔ enzim-szubsztrát komplex ↔ enzim + termék

A reakció helye: az aktív hely, ahová a szubsztrátot tipikusan nem-kovalans kötés köti.
Az enzimreakciók teljesen sztereospecifikusak:

példa: egy lipáz enzimmel történő észterhidrolízis:

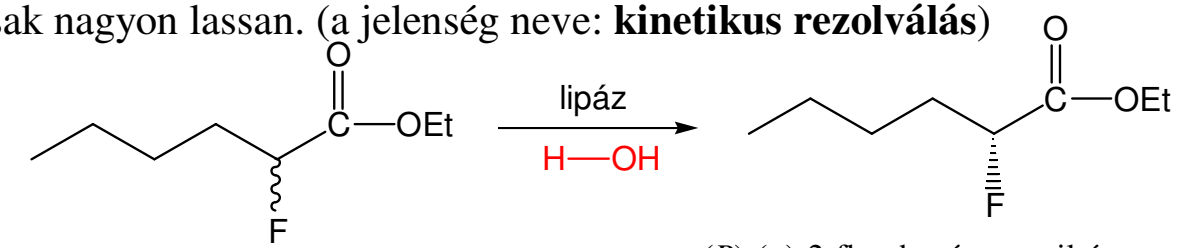
alapreakció: a lipáz enzimek a zsirsavészterek szelektív hidrolízisében vesznek részt. A „glicerin” rész megfelelő pontján hidrolizálnak:





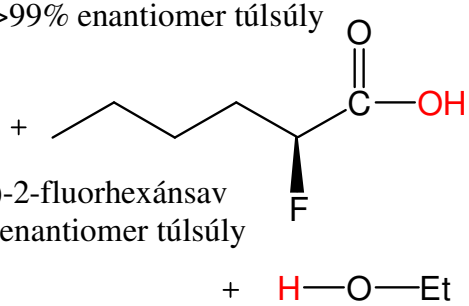
sztereospecificitás: legyen az észter királis és használjunk egy racemátot

megfigyelés: az egyik enantiomer észter elhidrolizál, a másik nem vagy csak nagyon lassan. (a jelenség neve: **kinetikus rezolválás**)



racemát észter
kiindulási anyag

(*R*)-(+)-2-fluorhexánsav-etil-észter
>99% enantiomer túlsúly



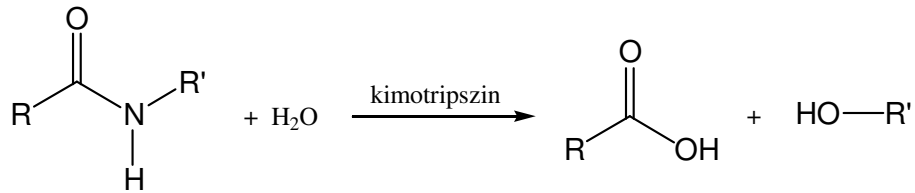
(*S*)-(+)-2-fluorhexánsav
>69% enantiomer túlsúly

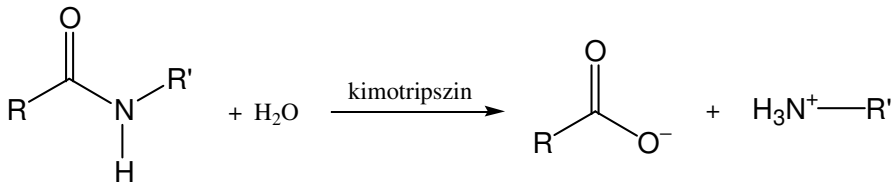
magyarázat:

- a lipáz aktív zsebébe nem fér be az (*R*) enantiomer, ezért az visszamarad és a hidrolízis során 99%-ig dúsul,
- míg az (S)-(-)-sav éppen 69%-ban keletkezik.

Geometriai specificitás azt adja meg, hogy mennyire szigorúan csak egyetlen szubsztrátot fogad el az enzim: pl: 1) Karboxipeptidáz A a polipeptidlánc C-terminálisáról lehasít egy aminosavat, ha az nem Arg, Lys, Pro és a megelőző aminosav nem Pro.

2) kimotripszin észtert, is amidot is hidrolizál.





peptid

Inhibitor: molekula, amely az enzimműködésre negatívan hat, azt gátolja.

Kompetitív inhibitor: amelyik a szubsztráttal versenyez az aktív helyért vagy annak bekötését oda gátolja.

Kofaktor: nem-fehérje jellegű, az enzimhez kötött molekula/ion, amely a katalízist segíti

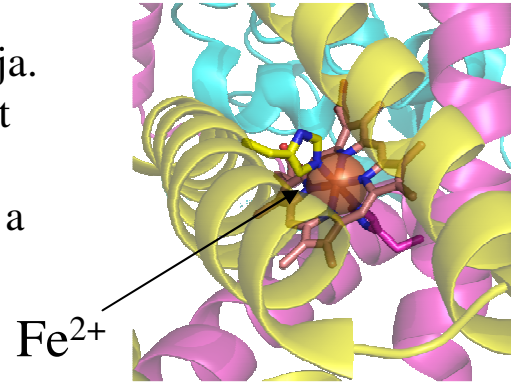
(apoenzim + kofaktor = holoenzim)

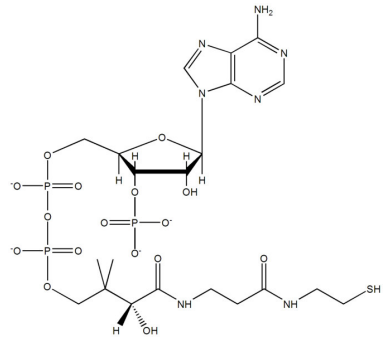
Koenzim (spec. kofaktor) : olyan molekula, amely nincs permanensen az enzimhez kötve pl. NAD

Prosztetikus csoport (spec. kofaktor) : olyan molekula, amely permanensen az enzimhez van kötve pl. Fe-S centrum, hem stb.

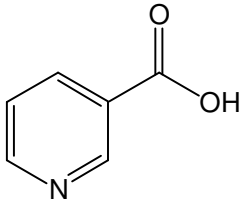
memo: sok vízoldható vitamin koenzim prekurzor:

nikotinsav → NAD, pantoténsav → CoA

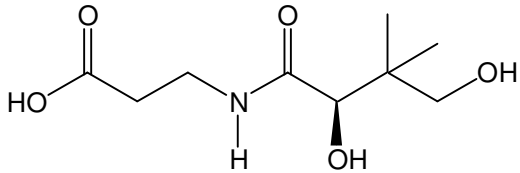




Koenzim A



niacin



pantoténsav

Szerinproteázok (sok egymással nem rokon fehérje)

Kimotripszin, tripszin és elasztáz fehérjék lebontó enzimek (proteázok). Azért szerinproteáz, mert van benne egy döntő fontosságú Ser.

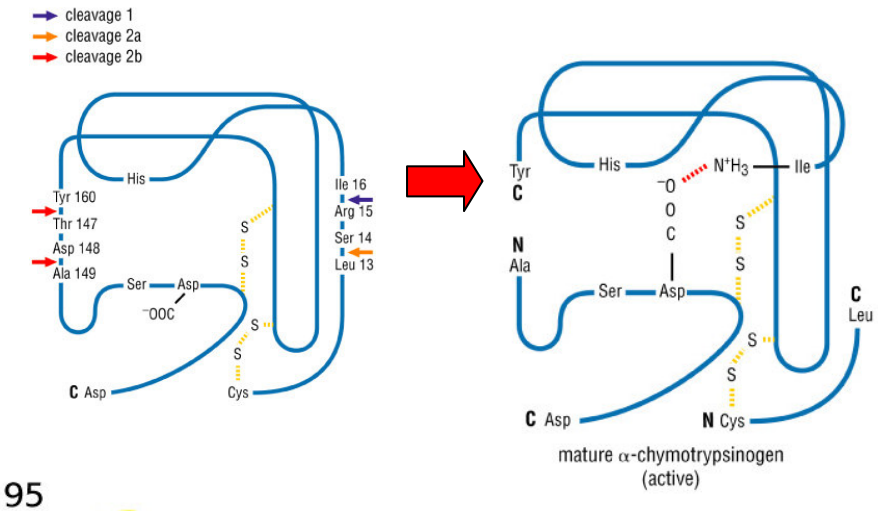
A Kimotripszin:

specificitása: főleg Trp, Tyr, Phe, de Leu, Met után is hasítja az amidkötést

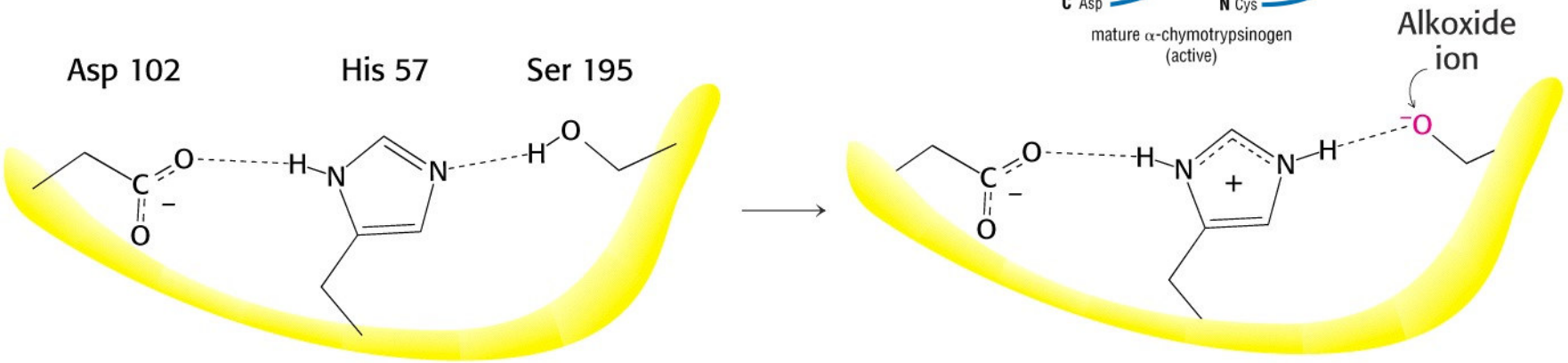
memo: észtereket is hidrolizál

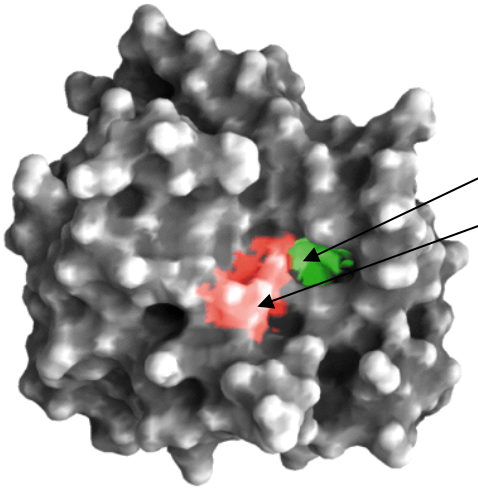
memo: a tripszin más specificitású, az Arg vagy Lys után hasít**.**

Az inaktív kimotripszinogénből (245 as.) két dipeptid kihasadása és egy „*refolding*” során képződik az enzim. A konf. átrendeződés eredményeként sztérikusan közel kerül a katalitikus triád 3 eleme.



A katalitikus triád: Asp…His…Ser

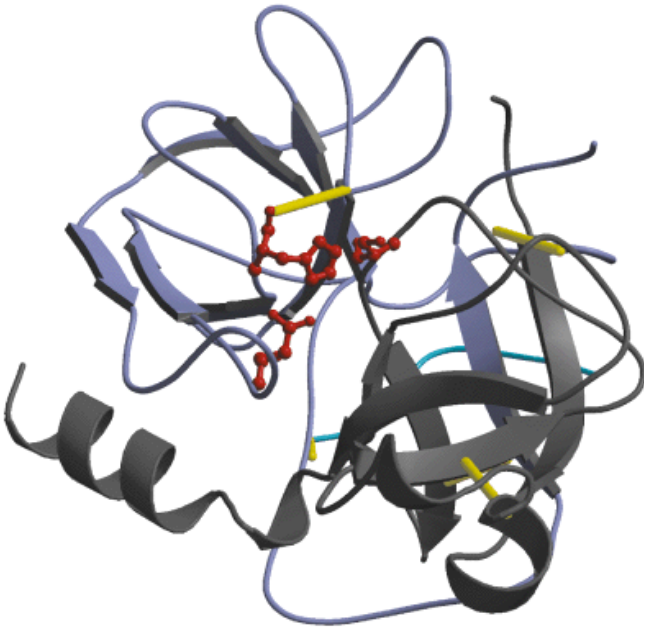




(b)

Szubsztrát kötő hely

Aktív hely a katalitikus triáddal



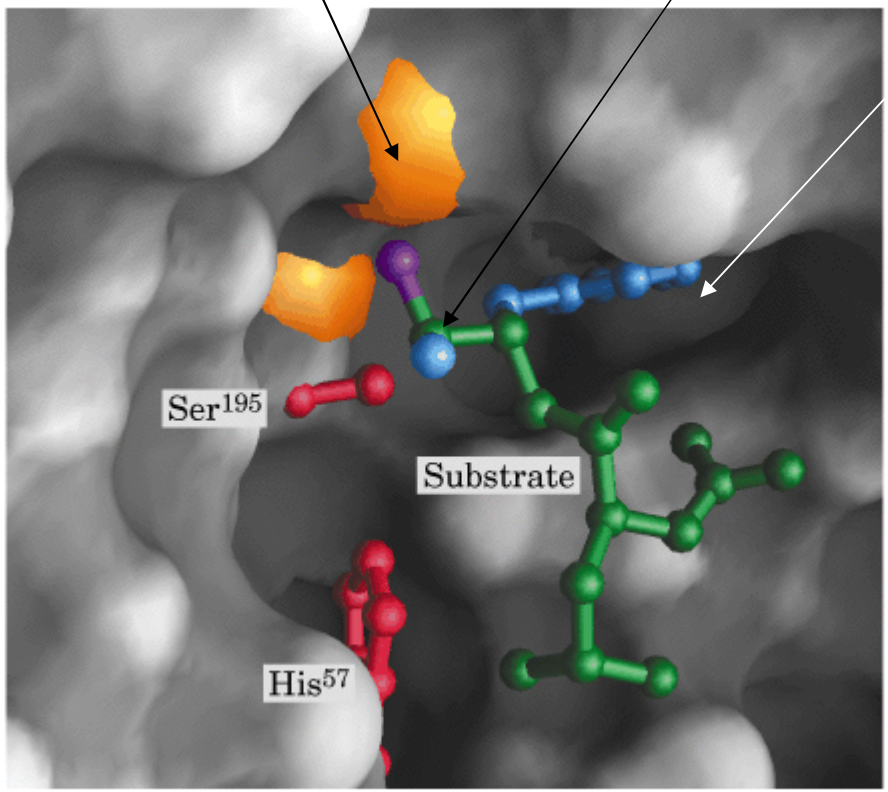
(c)

oxianion üreg

ez a peptidkötés fog elhasadni

szubsztrátkötő zseb

egy aromás (R1) csoporttal rendelkező szubsztrát N-terminális része

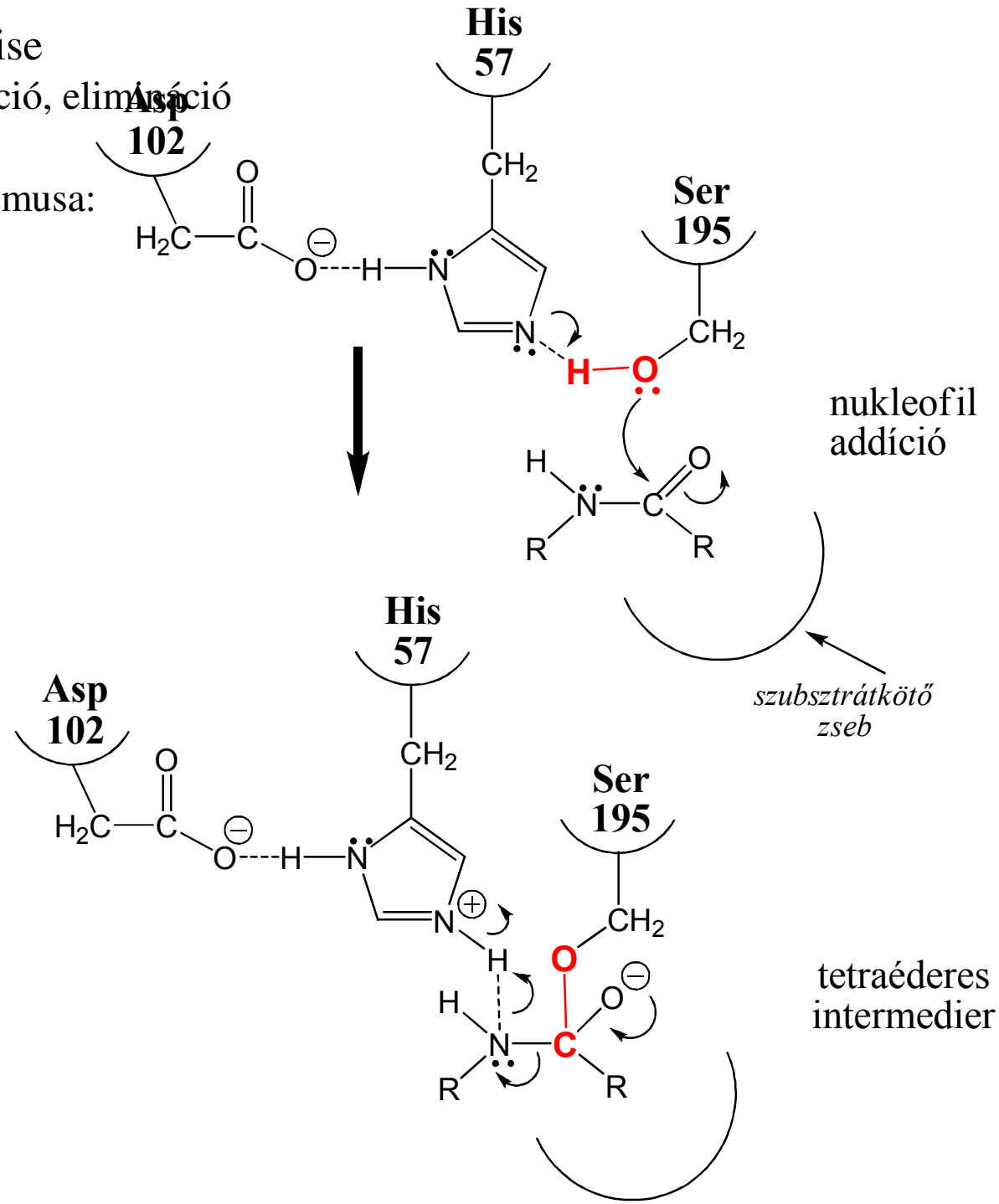


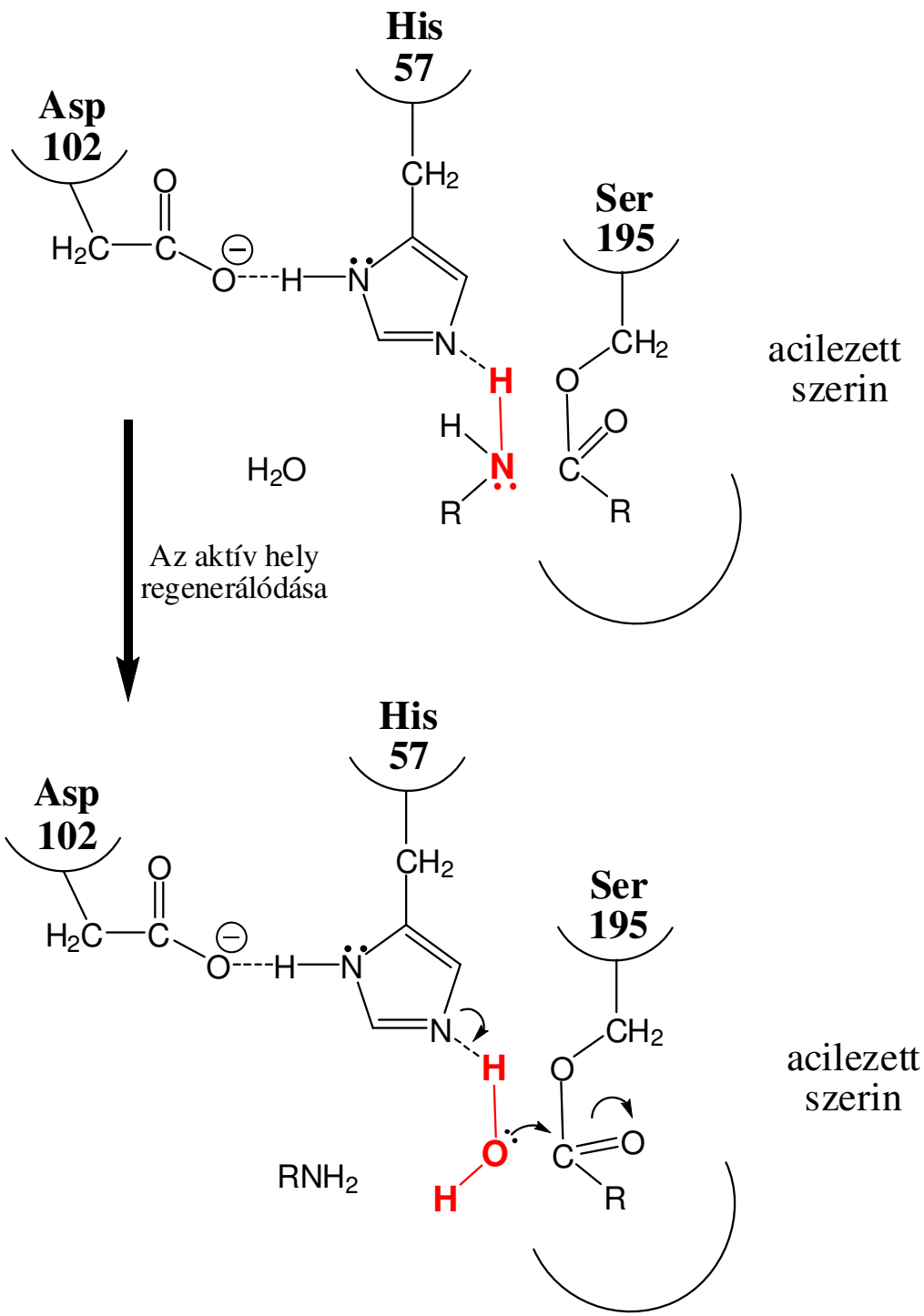
(d)

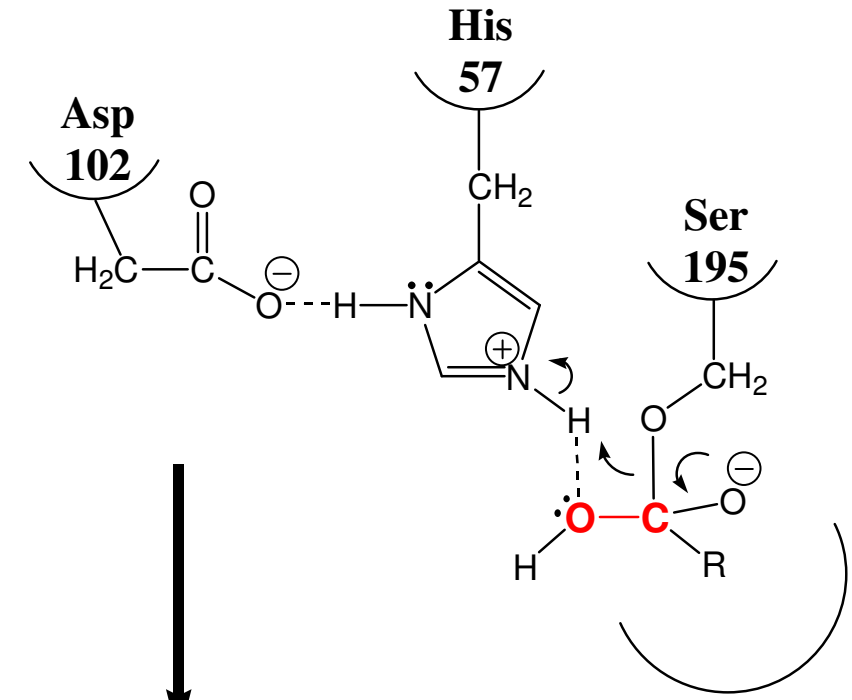
Biodegradáció: amidok hidrolízise

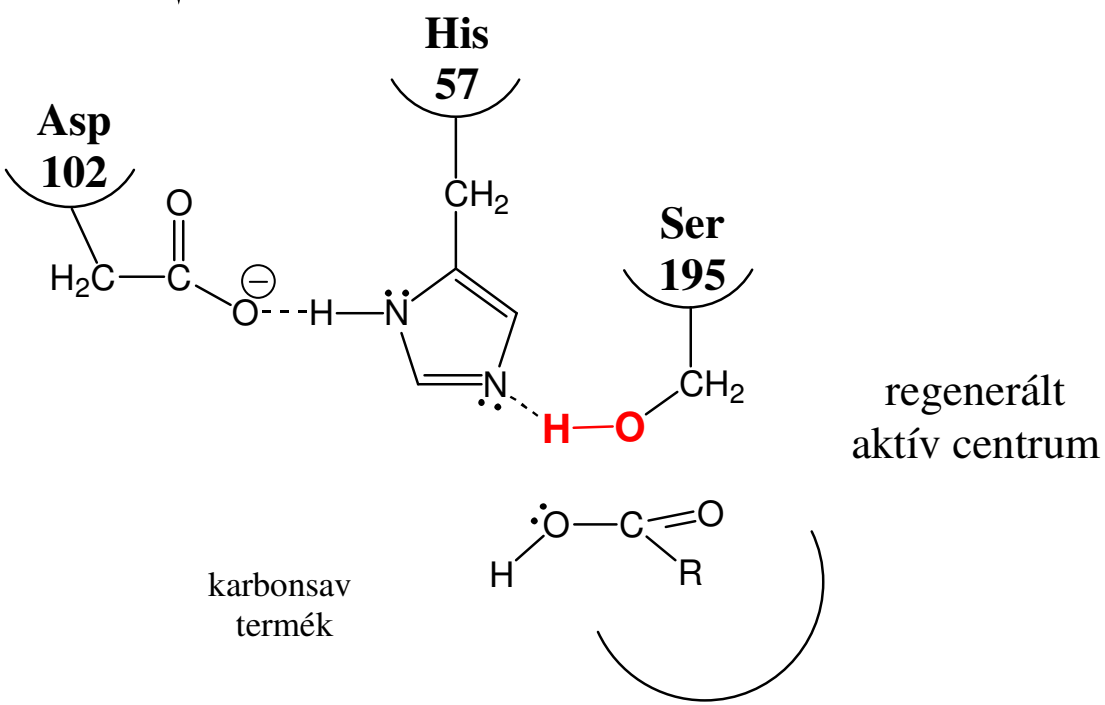
kémiai reakciótípusok: nuklofil addíció, elimináció

Szerinproteázok működési mechanizmusa:




His
57
Asp
102
Ser
195
acilezett
szerin
H_2O
Az aktív hely
regenerálódása
His
57
Asp
102
Ser
195
acilezett
szerin
RNH_2





memo: lehet készíteni olyan enzimet, amelyik a fordított folyamatot katalizálja.

Feltehetőleg a riboszómán a fehérjeszintézis során (RNS-részek közreműködésével) ilyen fordított folyamat zajlik.

Összefoglalás:

Oxyanion hole

Tetrahedral intermediate

Acyl-enzyme

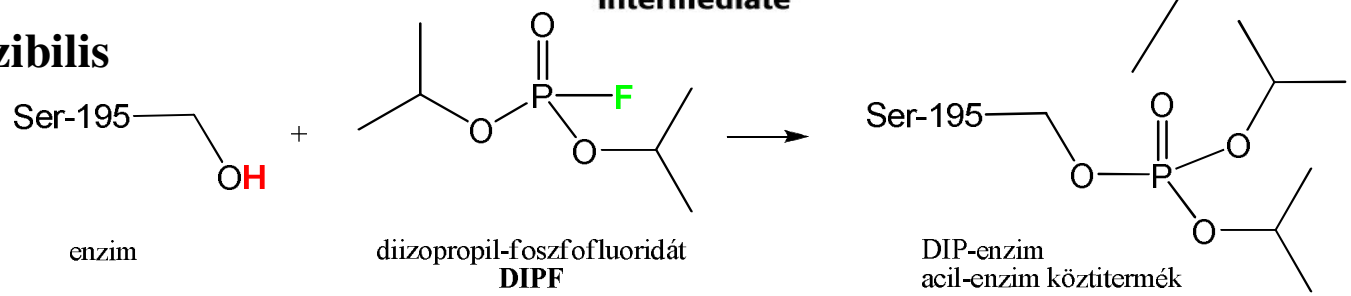
Acyl-enzyme

Oxyanion hole

Tetrahedral intermediate

Acyl-enzyme

A kimotripszin irreverzibilis inhibitora: pl. DIPF



enzim

diizopropil-foszfofluoridát
DIPF

DIP-enzim
acil-enzim köztitermék

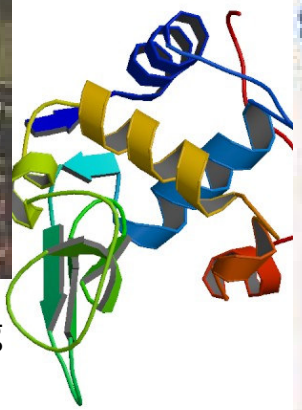
Lizozim: egy tipikus enzimműködés

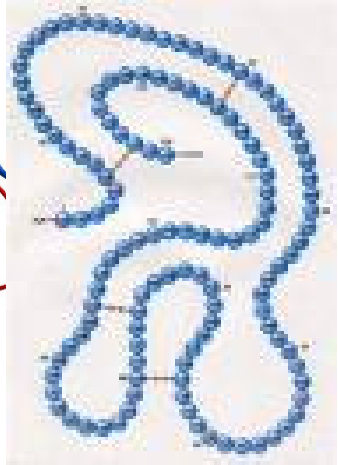
(Lysozyme:= lyse: felold + enzyme)

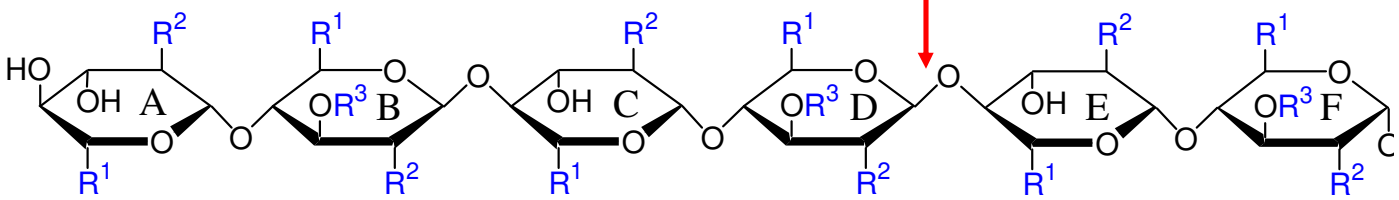
A Lizozim feloldja (kilukasztja) a baktériumok sejtfalát mivelhogy katalizálja a sejtfal poliszacharid egy adott részének hidrolízisét:

Nag-Nam-Nag-Nam-Nag-Nam

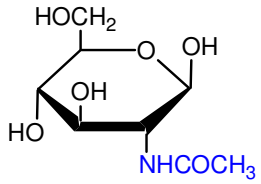
Alexander Fleming
1922-ben megfázott



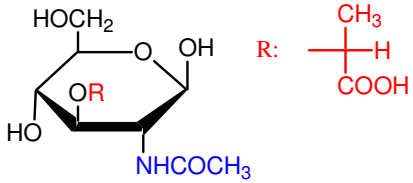




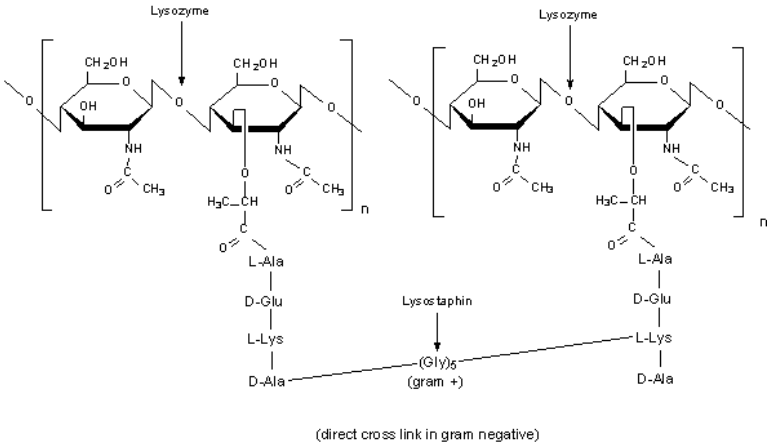
$R^1 = CH_2OH$ $R^2 = NHCOCH_3$ $R^3 = CH(CH_3)COOH$

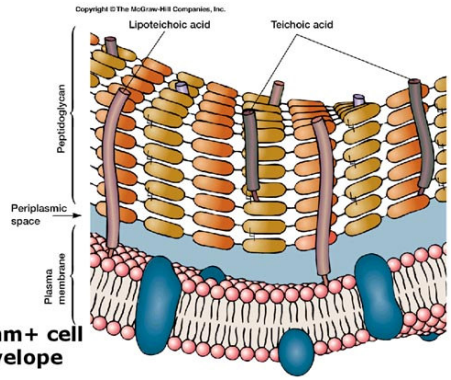


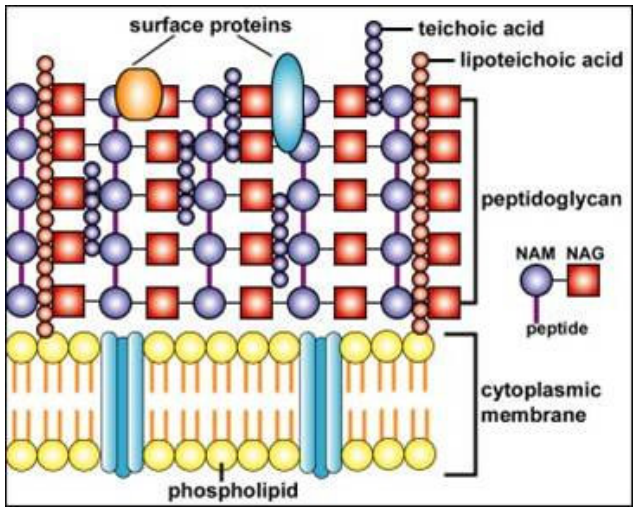
β-D-*N*-acetil-glükozamin
(Nag)



β-D-*N*-acetil-muraminsav
(Nam)



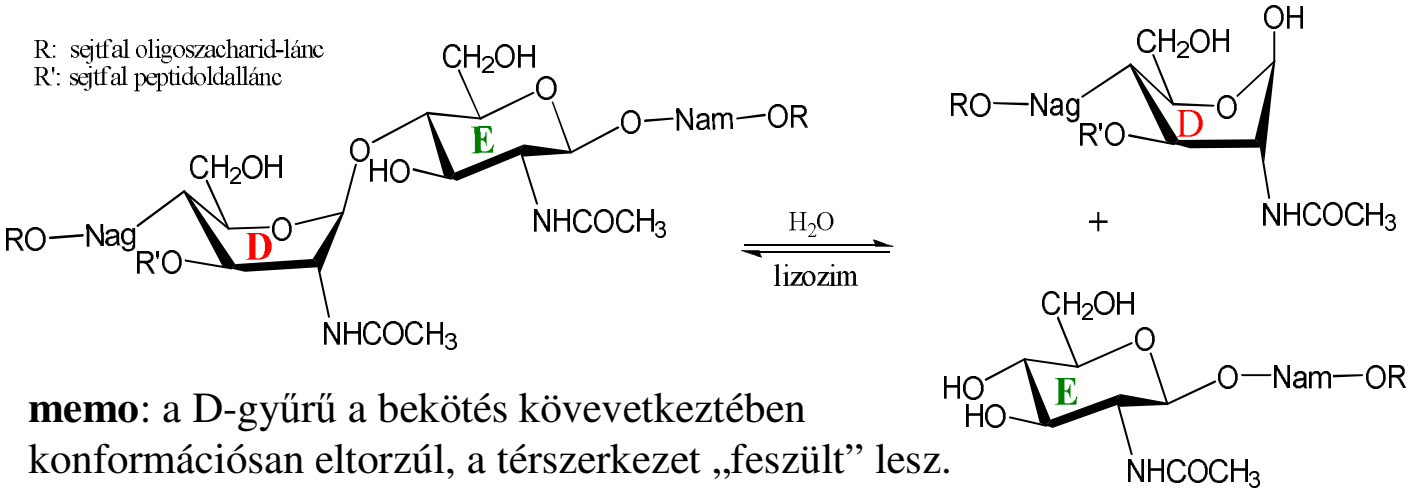




A Lizozim biokatalizált glikozidkötés hidrolízisének molekuláris háttere:

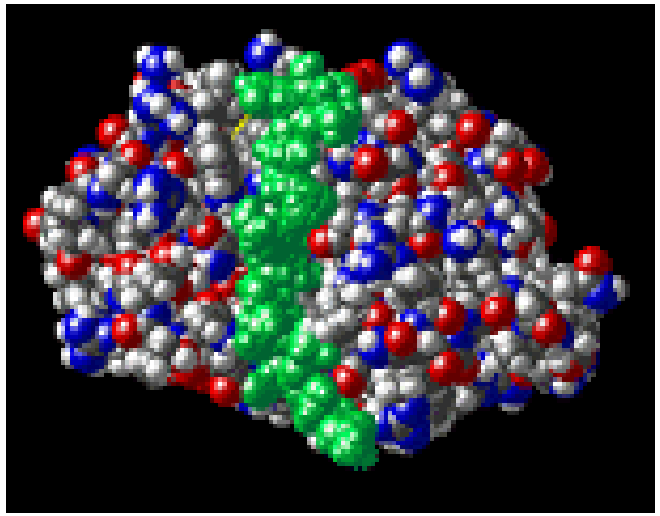
1) A D-E glükopiranóz gyűrűk elhidrolizálása

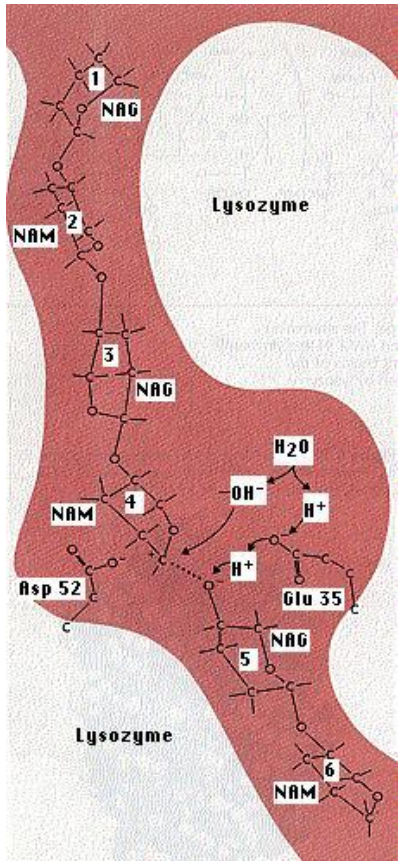
David Chilton Phillips
1924-99



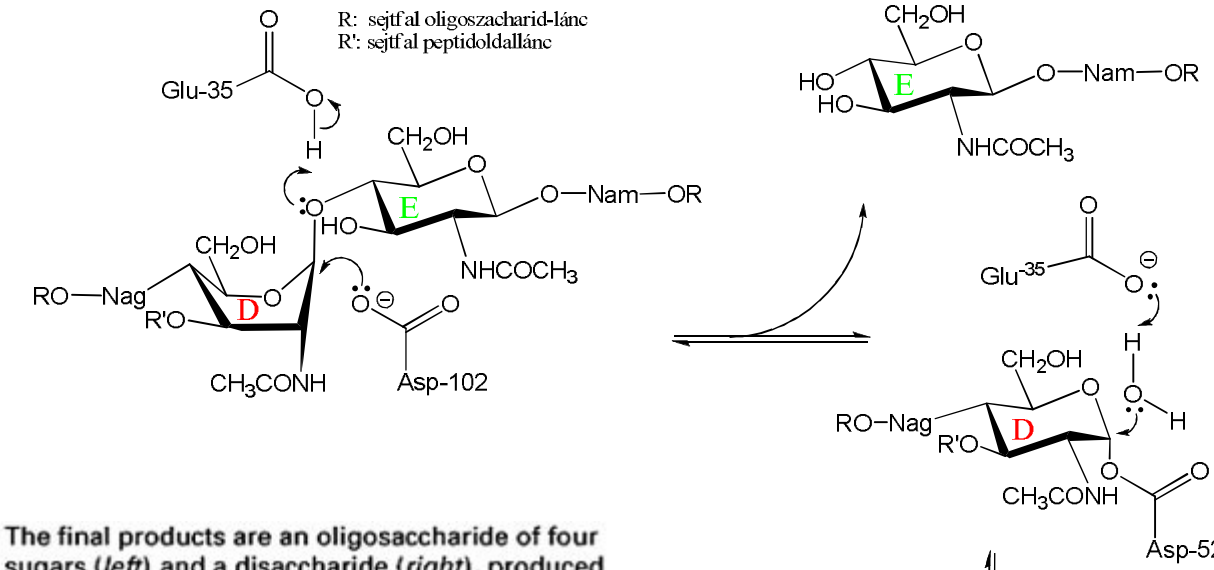
memo: a D-gyűrű a bekötés kövevetkeztében konformációsan eltorzúl, a térszerkezet „feszült” lesz.

2) A molekuláris felismerés és a hexaszacharid megkötésének atomi részletei:

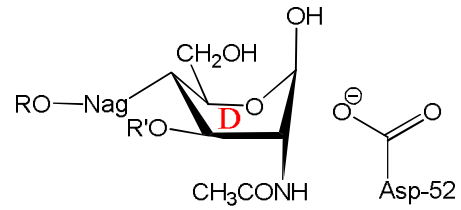




3) A hidrolízis legvalószínűbb mechanizmusának kétfajta bemutatása:



A közti termékben kialaku karbokationt stabilizálja az karboxilát oldallánca.



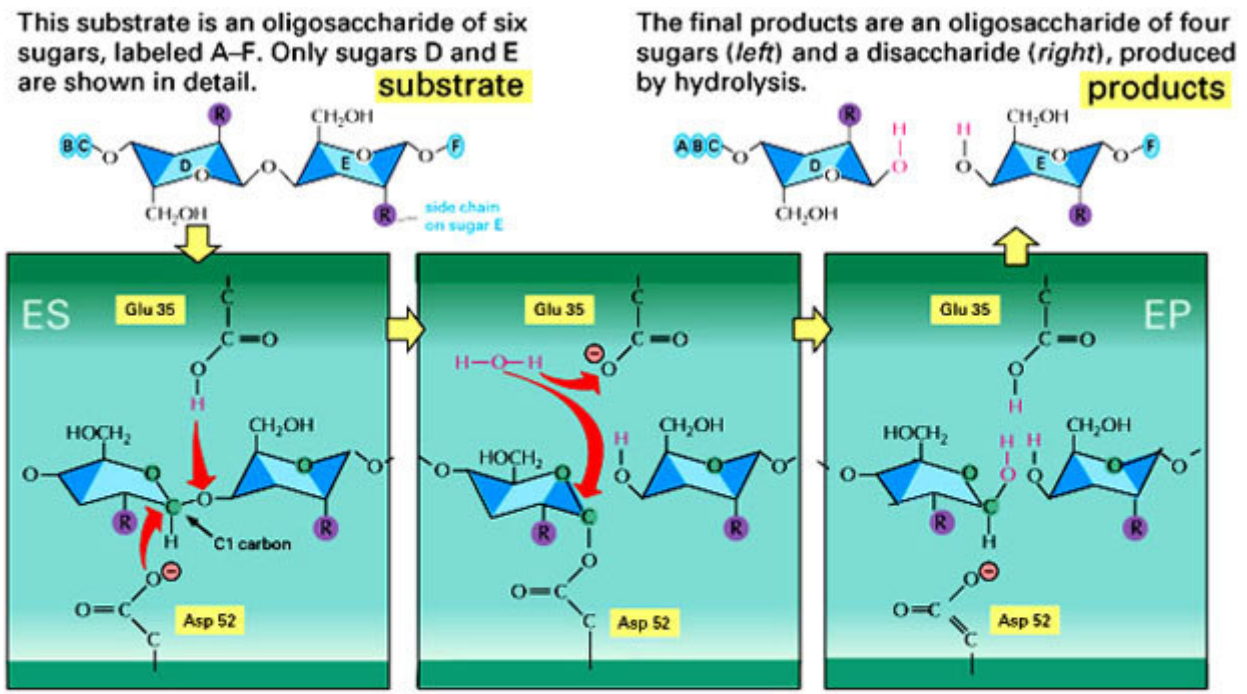


Figure 4-34 Essential Cell Biology, 2/e. (© 2004 Garland

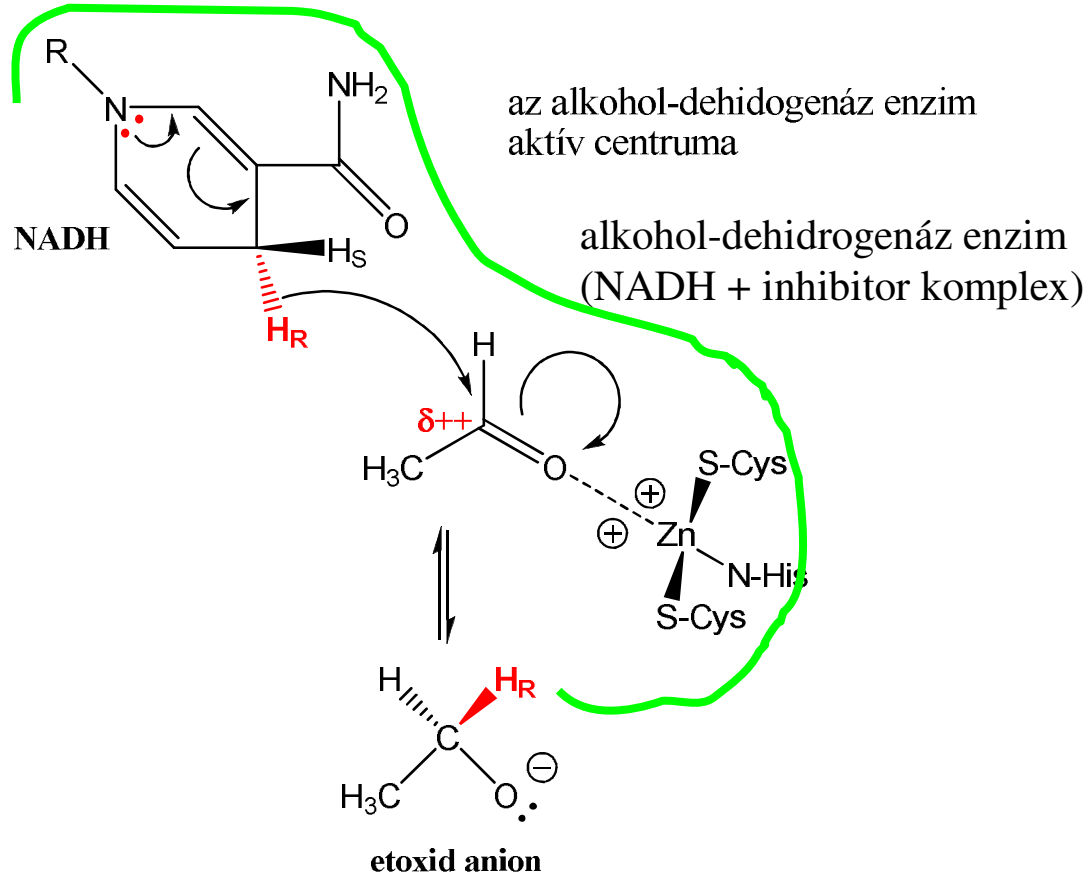
memo: a természetes védekezésünk fontos enzimje tehát a Lizozim, amely patogének (pl. szalmonella, E.coli vagy Pszeudomonász) ellen nyújt védelmet.

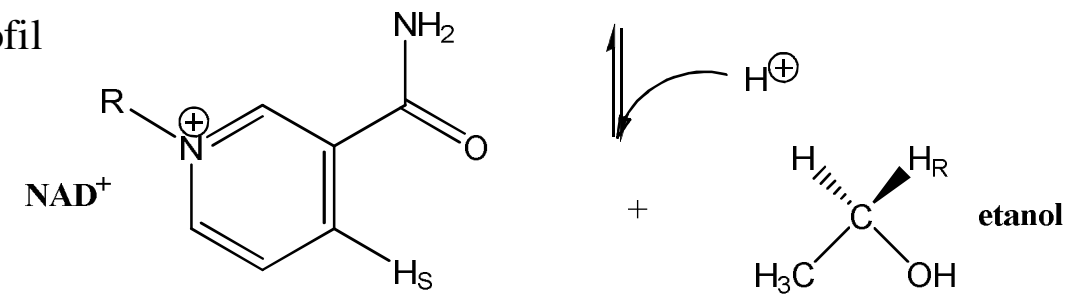
Alkohollebontás (oxido-redukció, aromatizáció):

A NADH egyensúlyi reakciója az acetaldehidet etil-alkohollá redukálja.

A működés lépései és leírása:

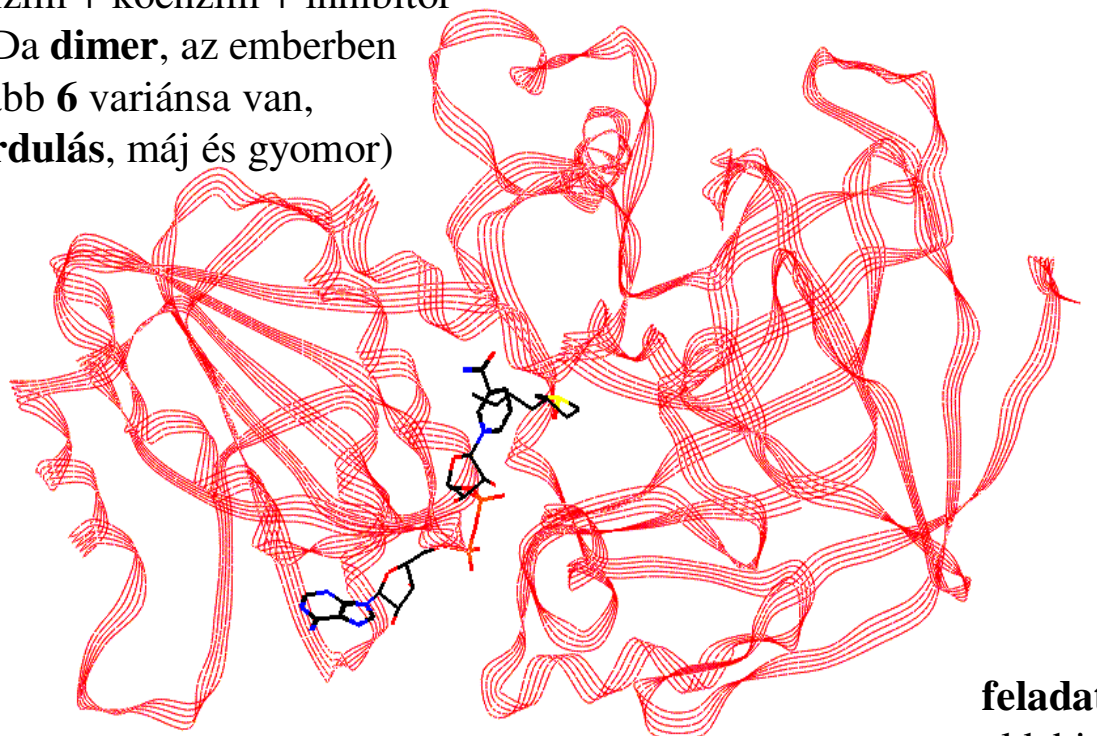
1) A NADH és az aldehid megkötődik, utóbbit a Zn^{2+} koordinálja,
2) a nikotinsavamid nitrogénjének nemkötő elektronpárja delokalizálódik, a dihidropiridin gyűrű aromássá válik az egyik C4-es hidrogénatomot anionként leadva. **(oxidáció)**
3) A **hidridion** redukálja az acetaldehidet, majd a képződő alkoholát anion protonálódik. A cink mint **Lewis-sav** fokozza a **karbonil-szén pozitív** polározottságát, s így annak elektrofil jellegét.

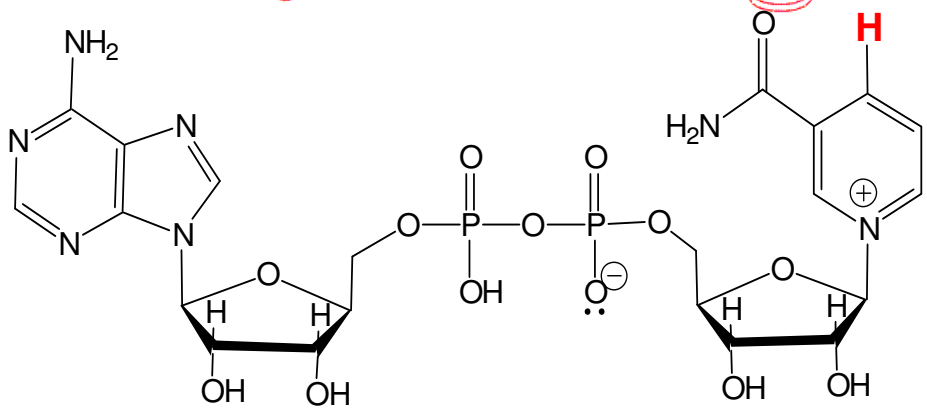




méregtelenítés: ha nagy az alkoholkoncentráció, akkor az egyensúlyi reakció megfordul és az etil-alkohol acetaldehidé oxidálódik.

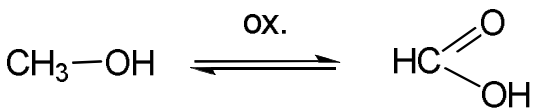
az alkohol-dehidrogenáz enzim
apoenzim + koenzim + inhibitor
(80 kDa **dimer**, az emberben legalább **6** variánsa van, **előfordulás**, máj és gyomor)



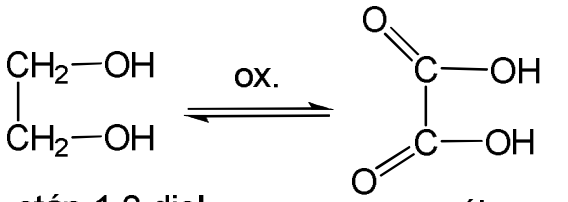


A NAD+ (Nikotinamid-adenin-dinukleotid)
(az élő sejt egyik oxidáló vagy dehidrogénező szere)

memo: Miért mérgezők az alkohol végzetes adalékai: metanol, etilénglikol?

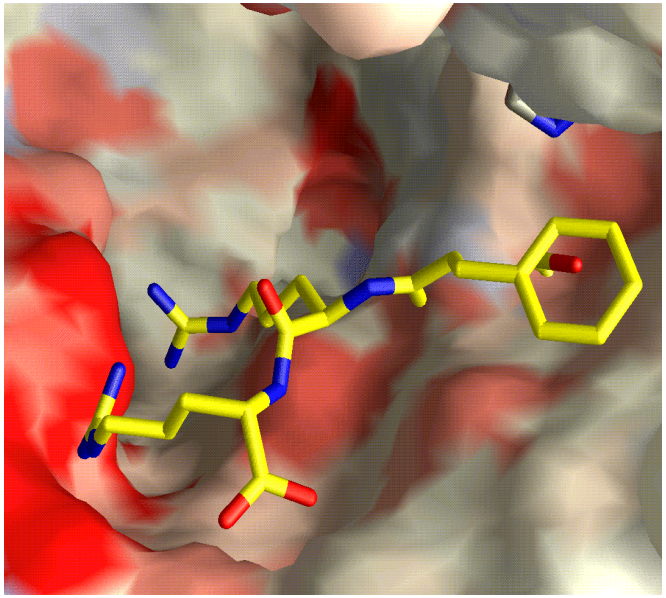


metanol — hangyasav (sejtméreg)



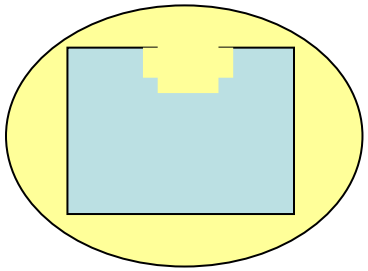
etán-1,2-diol (*etilénglikol*) — oxálsav (sejtméreg)

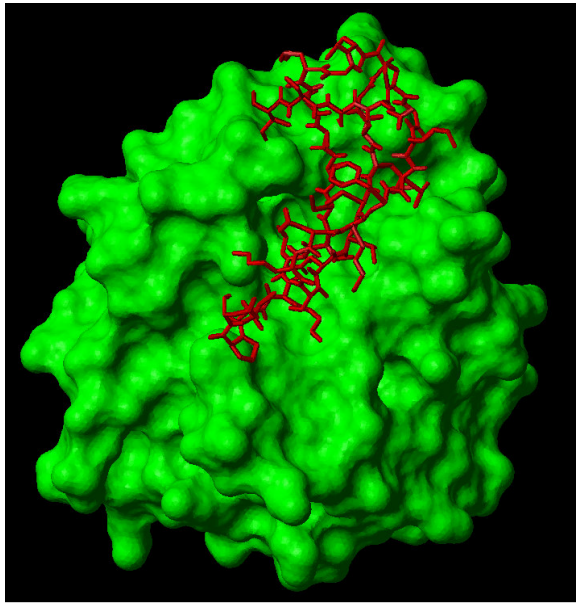
feladatuk: egyensúlyt tartani az alkoholok aldehidek és ketonok között.
- méregtelenítés (emlősben): a toxikus alkoholból aldehidet csinál
- fermentálás (baci és élesztő): aldehidből alkoholt készít **(redukció)**



A "kulcs & zár" modell

(Emil Fischer)





Hogyan tervezzünk gyógyszert?

Minél többet meg kell tudnunk a fehérjék dinamikus téralkatáról!