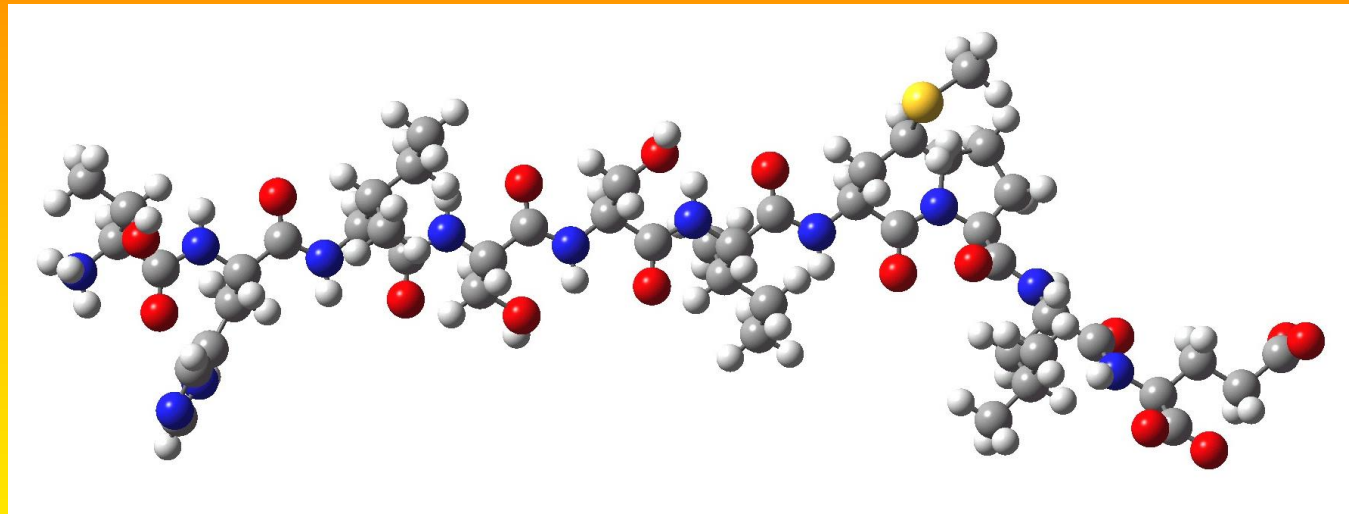
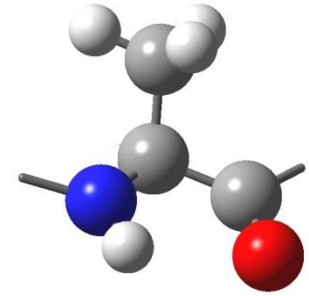


Peptidek és fehérjék szerkezetvizsgálata spektroszkópia és *in silico* módszerekkel



Mik a peptidek és fehérjék?

L-konfigurációjú α -aminosavakból
felépülő lineáris polimerek



3 betűs kód: -Thr-His-Ile-Ser-Ser-Ile-Met-Pro-Leu-Glu-

1 betűs kód: **T -H -I -S** **S -I -M -P -L -E**

Mekkora a méretük?

néhány tucat aminosavtól esetleg több ezerig

Hogyan alakultak ki az evolúció során a fehérjék?

Nem „próbálkozhatott” vaktában a természet:

- pl. 20 aminosav típus egy 100 hosszú fehérjében
 - ismétléses variációk száma $20^{100} \approx 10^{130}$ fehérje típus
 - egy ilyen fehérje molekulatömege ≈ 12000 Dalton $\approx 10^{-18}$ g
 - ha egyetlen példányt csinálunk csupán minden lehetséges kópiából akkor is $\approx 10^{112}$ g annak anyagszükséglete
- az univerzum tömege „csupán” $\approx 2 * 10^{55}$ g

Elsődleges szerkezet:

VDCSEYPKPACPKDYRPVCGSDNKTYSNKCNFCNAVVESNGTLTLNHFGKC

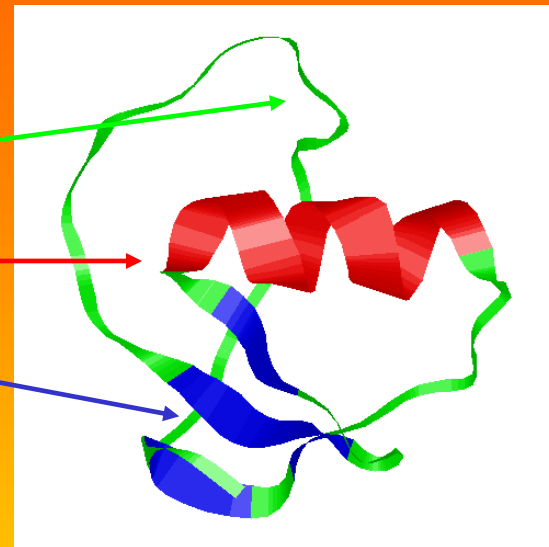
(turkey ovomucid inhibitor III domain)

Másodlagos szerkezet:

hurkok vagy β -kaszarok

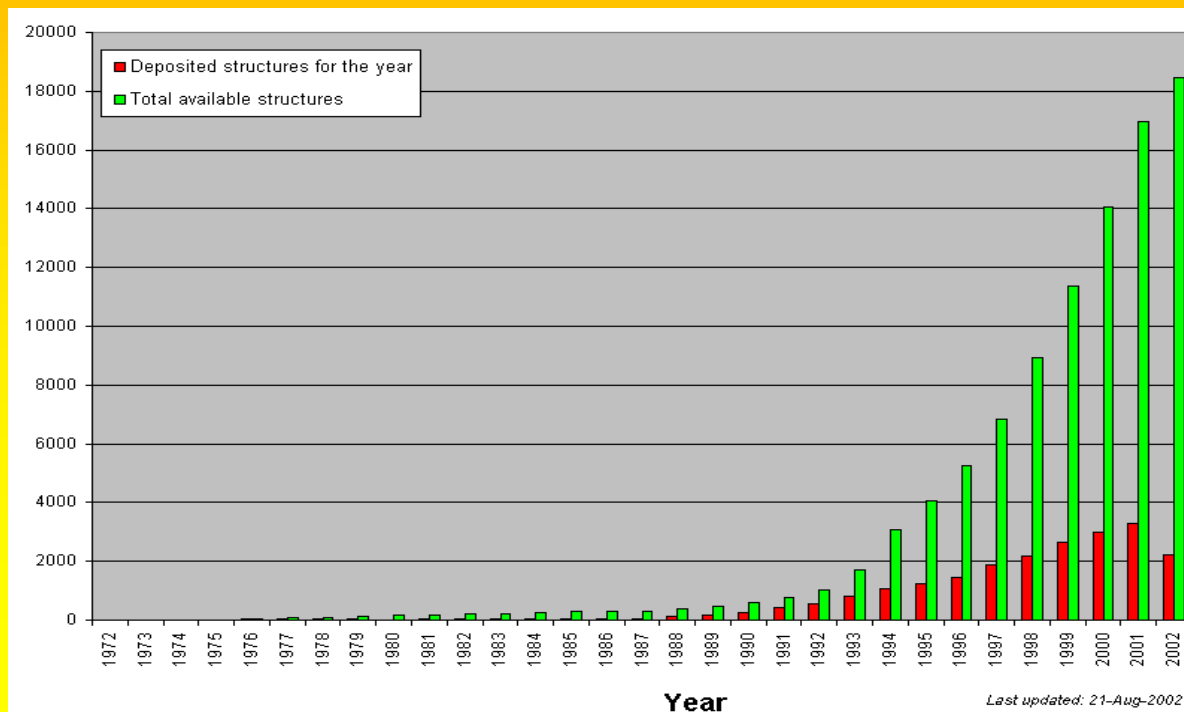
α -hélix

β -redő



Harmadlagos szerkezet:

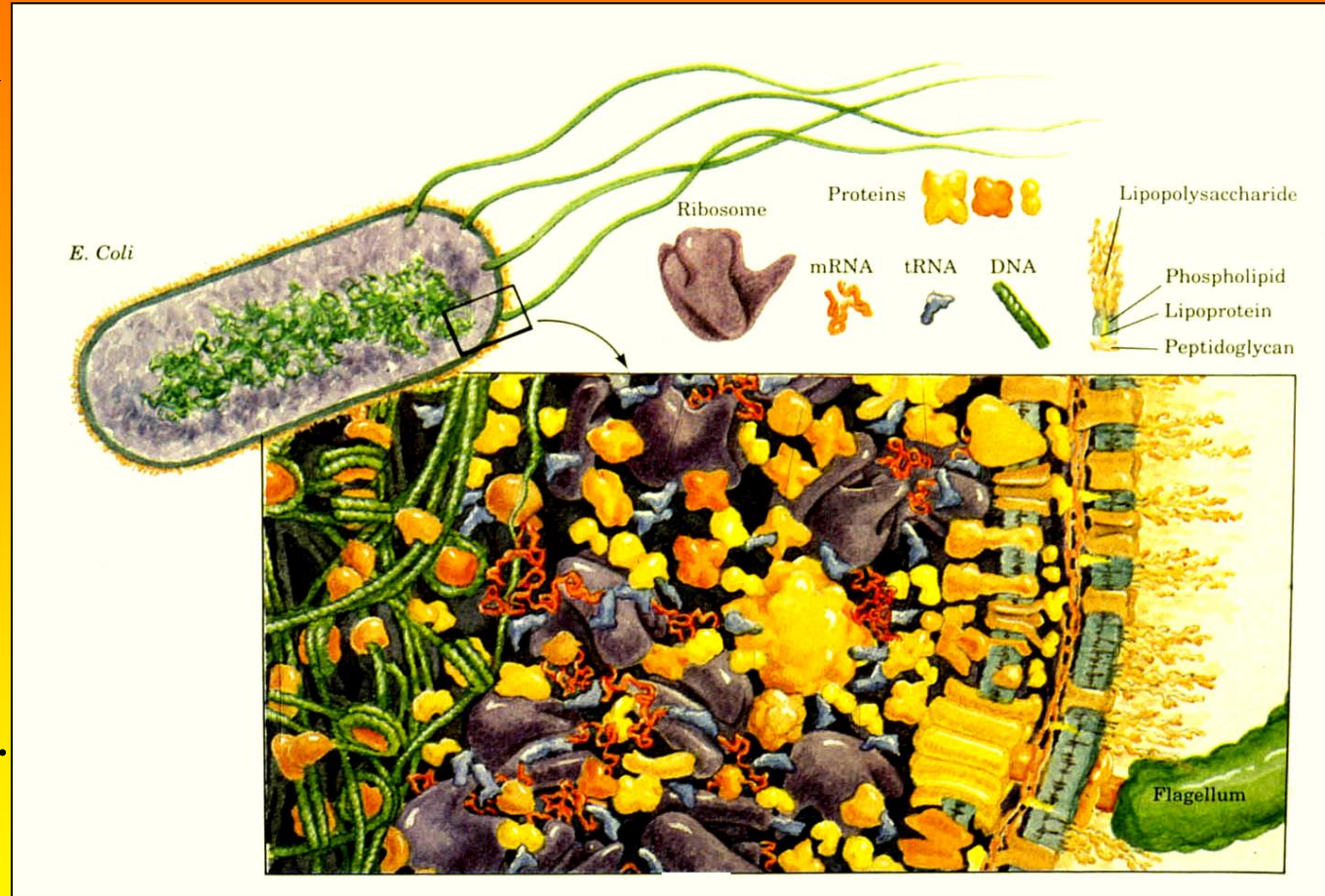
a molekula 3D-szerkezete





A fehérjék jelentősége

Az élő rendszerek legelterjedtebb molekulái a **fehérjék**, amelyek szinte bármilyen, a sejt számára fontos reakciót el tudnak végezni.



Hogyan tud egy mindössze 20 elemből „építkező” polimer ilyen sokrétűvé válni?

Mit kódol a primer szekvencia?

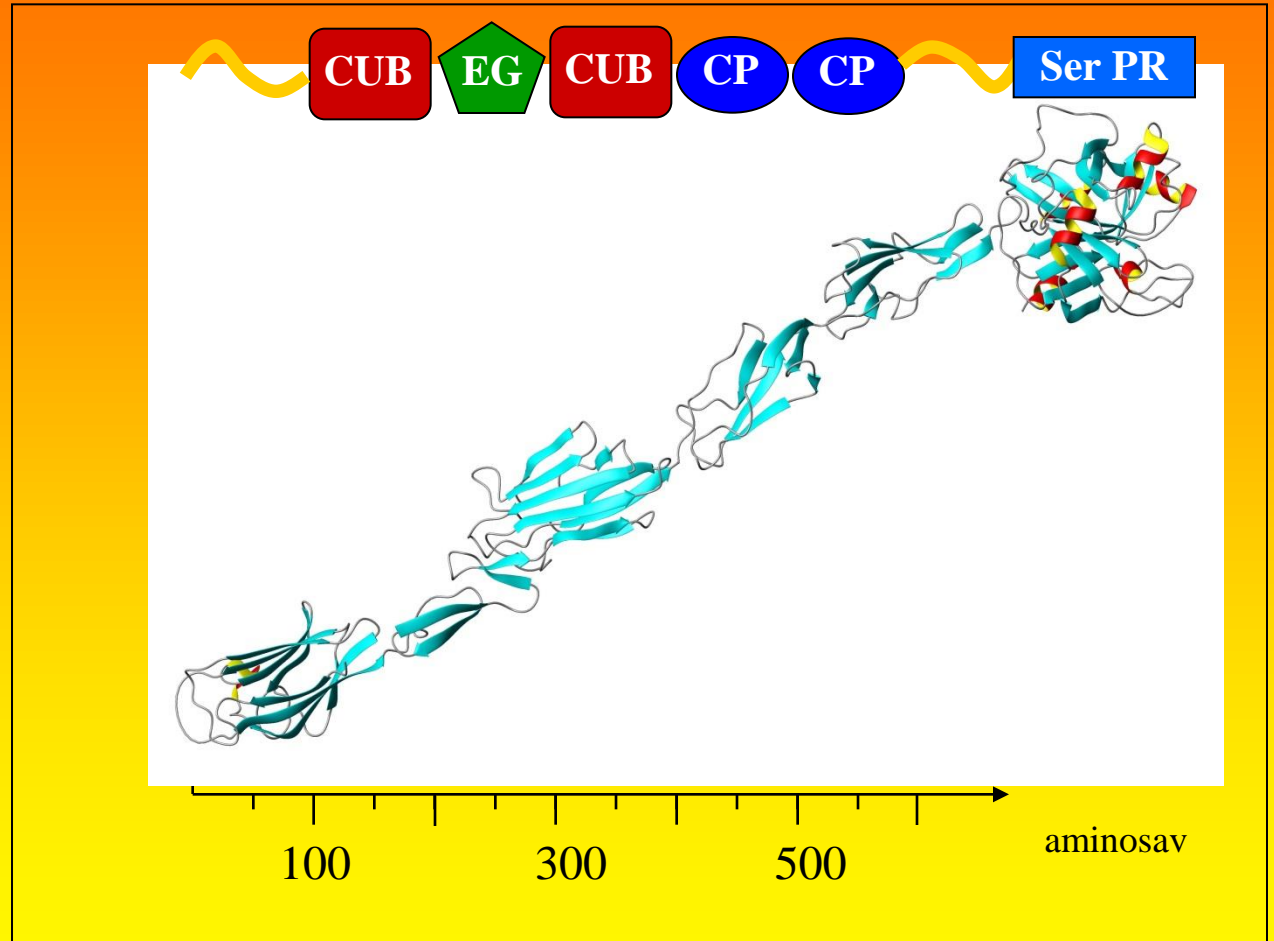
Mind a polipeptidok, mind a fehérjék α -L-aminosavakból felépülő lineáris polimerek

```
MWLLYLLVPALFCRAGGSIPIPIQKLFGEVTSPLFPKPYPNNFETTTVITV
PTGYRVKLVFQQFDLEPSEGCFYDYVKISADKKS LGRF CGQLGSPLGNPP
GKKEFMSQGNKMLLT FHTDFSNEENGTIMFYKGF LAYYQAVDLDECASRS
KSGEEDPQPQCQHLCHNYVGGYFCSCRPGYELQEDRHSCQAECSSELYTE
ASGYISSLEYPRSYPPDLRCNYSIRVERGLTLHLKFLEPFDIDDHQQVHC
PYDQLQIYANGKNIGEF CGKQRPPDLDTSSNAVDLLEFFTDESGDSRGWKL
RYTTEIIKCPQPKTLDEFTIIQNLPQYQFRDYFIATCKQGYQLIEGNQV
LHSFTAVCQDDGTWHRAMP RCKIKDCGQPRNLPNGDFRYTTTGMVNTYKA
RIQYYCHEPYYKMQTRAGSRESEQGVYTCTAQGIWKNEQKGEKI PRCLPV
CGKPVNPVEQRQRIIGGQKAKMGNFPWQVFTNIHGRGGGALLGDRWILTA
AHTLYPKEHEAQSNASLDVFLGHTNVEELMKLGNHPIRRVSVHPDYRQDE
SYNFEGDIALLELENSVTLGPNLLPICLPDNDTFYDLGLMGYVSGFGVME
EKIAHDLRFVRLPVANPQACENWLRGKNRMDVFSQNMFCAGHPSLKQDAC
QGDSGGVFAVRDPNTDRWVATGIVSWGIGCSRGYGFYTKVLNYVDWIKKE
MEEED
```

A primer szekvencia ismeretében a kémiai szerkezet, a **konstitúció** ránézésre megmondható, nem úgy a **térszerkezet**.

A fehérjék térszerkezete moduláris

Az eukarióta
sejteket felépítő
~100 000 fehérje
70% -a több
doménből vagy
modulból áll.

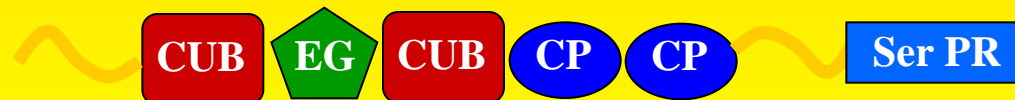


Például a *Homo sapiens* C1r fehérjéje összesen 6 doménből épül fel.

A fehérjék moduláris jellege

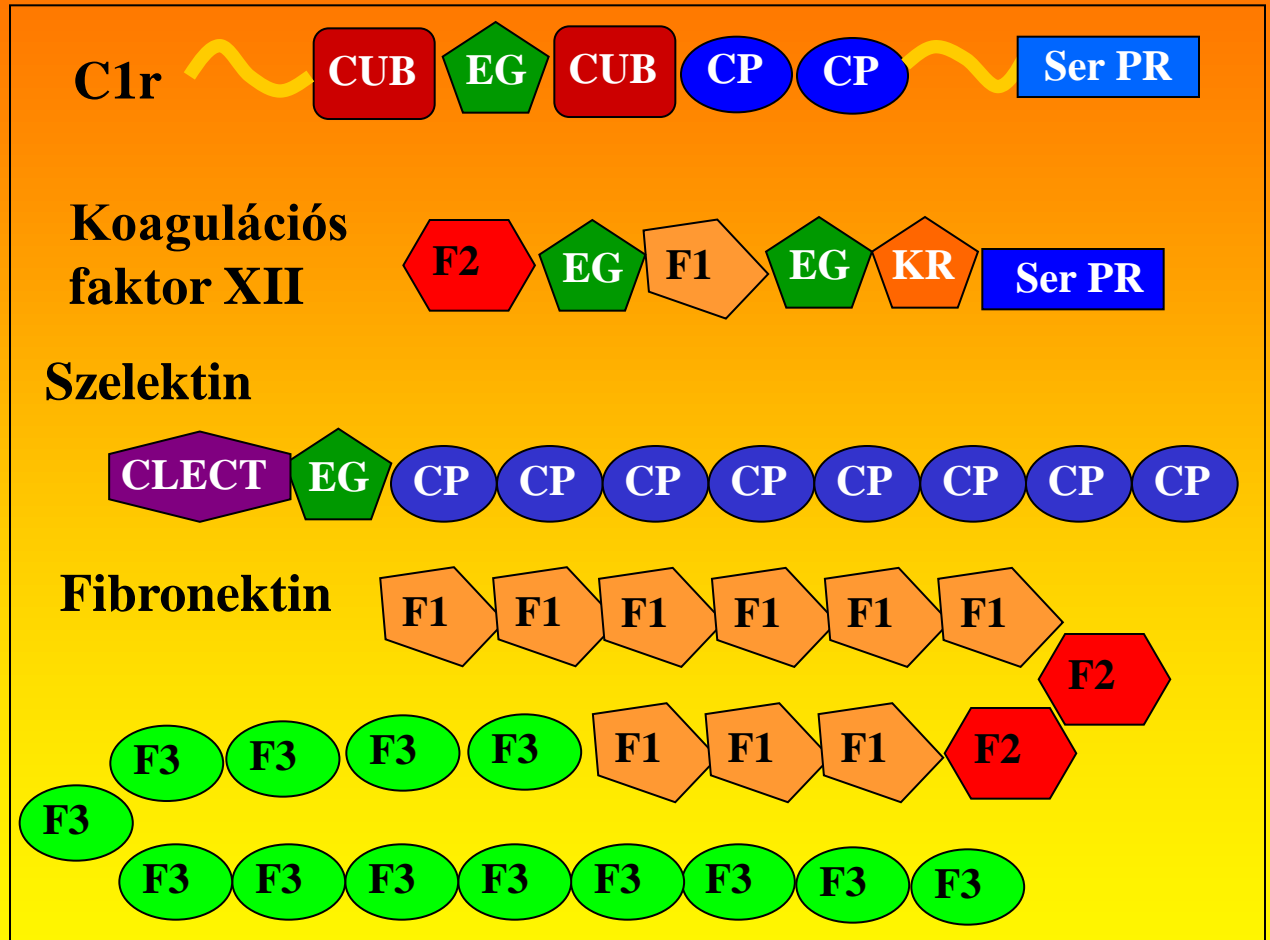
A fehérjék konformációs szempontból **autonóm modulokból** és az ezeket összekötő polipeptid-szakaszokból állnak.

MWLLYLLVPALFCRAGGSIPPIPQKLFGEVTSPLFPKPYPNNFETTTVITV
PTGYRVKLVFQQFDLEPSEGCFYDYVKISADKKS LGRF CGQLGSPLGNPP
GKKEFMSQGNKMLLTFHTDFSNEENGTIMFYKGF LAYYQAVDLDECASRS
KSGEEDPQPQCQHLCHNYVGGYFCSCRPGYELQEDRHSCQAECSSELYTE
ASGYISSLEYPRSYPPDLRCNYSIRVERGLTLHLKFLEPFDIDDHQQVHC
PYDQLQIYANGKNIGEF CGKQRPPDLDTSSNAVDLLEFFTDESGDSRGWKL
RYTTEIIKCPQPKTLDEFTIIQNLQPQYQFRDYFIATCKQGYQLIEGNQV
LHSFTAVCQDDGTWHRAMPRCKIKDCGQPRNLPNGDFRYTTTMGVNTYKA
RIQYYCHEPYYKMQTRAGSRESEQGVYTCTAQGIWKNEQKGEKI PRCLPV
I IGGQKAKMGNEFPWQVFTNIHGRGGGALLGDRWILTA
AHTLYPKEHEAQSNASLDVFLGHTNVEELMKLGNHP IRRVSVHPDYRQDE
SYNFEGDIALLELENSVTLGPNLLPICLPDNDTFYDLGLMGYVSGFGVME
EKIAHDLRFVRLPVANPQACENWLRGKNRMDVFSQNMFCAGHPSLKQDAC
QGDSGGVFAVRDPNTDRWVATGIVSWGIGCSRGYGFYTKVLNYVDWIKKE
MEEED

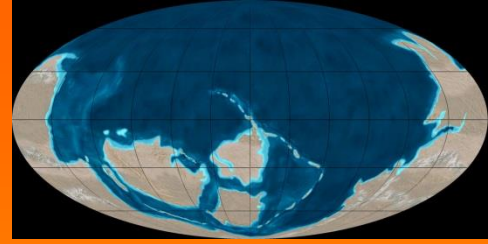


A moduláris építkezés konzerválódott

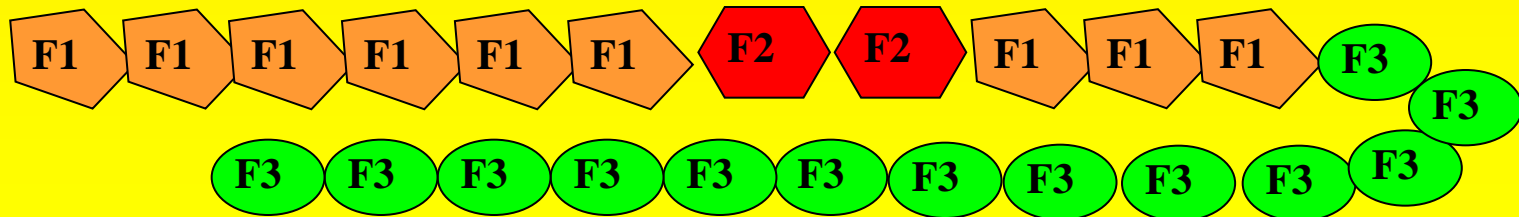
Bár a fehérjék mérete és funkciója sokszínű, a moduláris felépítésük következetesen megőrzött.



A moduláris építkezés előnyös

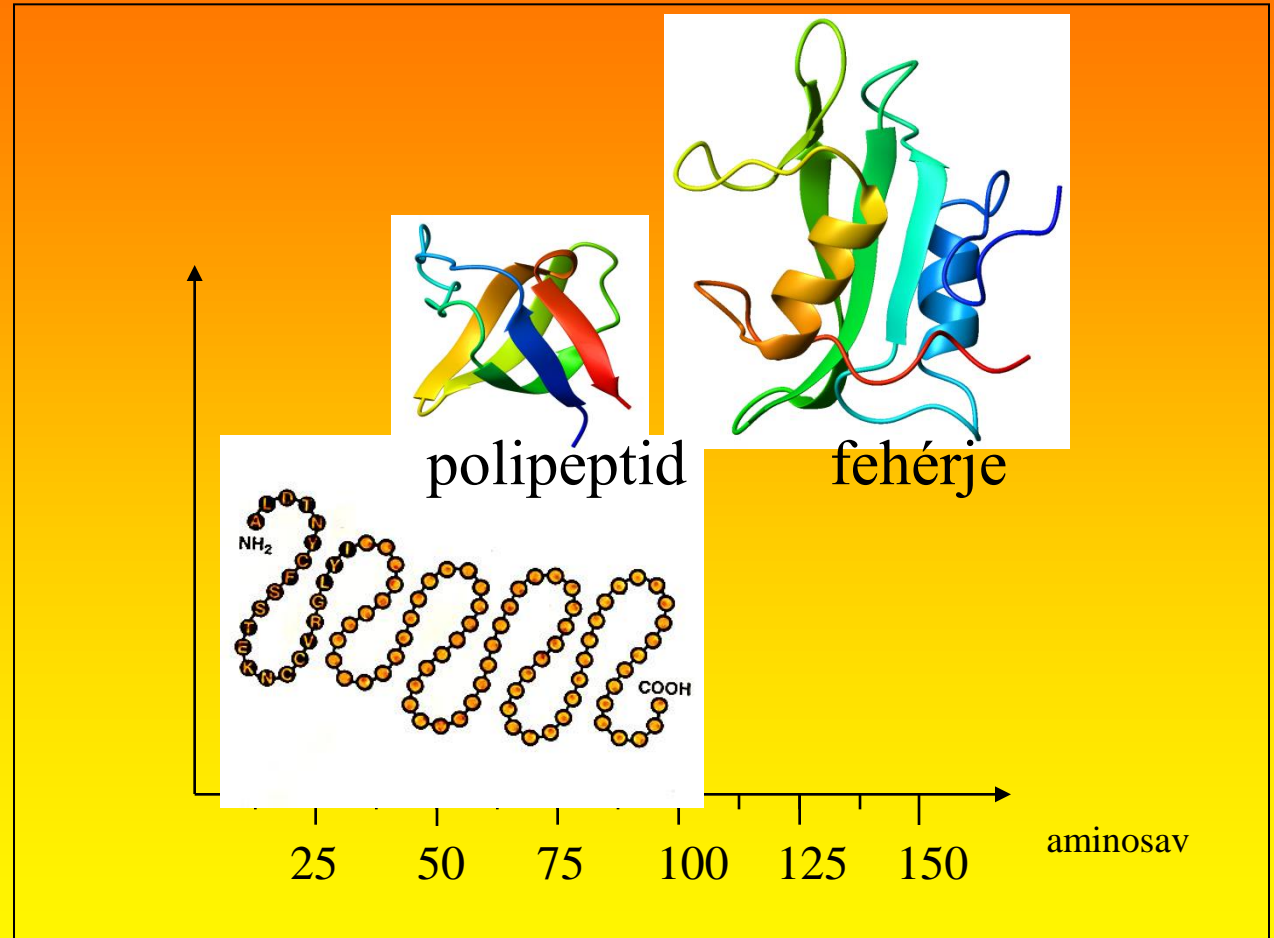


Az állatvilág evolúciójának ún „kambriumi robbanását” a moduláris fehérjék megjelenéséhez kötik (sejt-sejt kommunikáció)



Polipeptidek és fehérjék térszerkezete

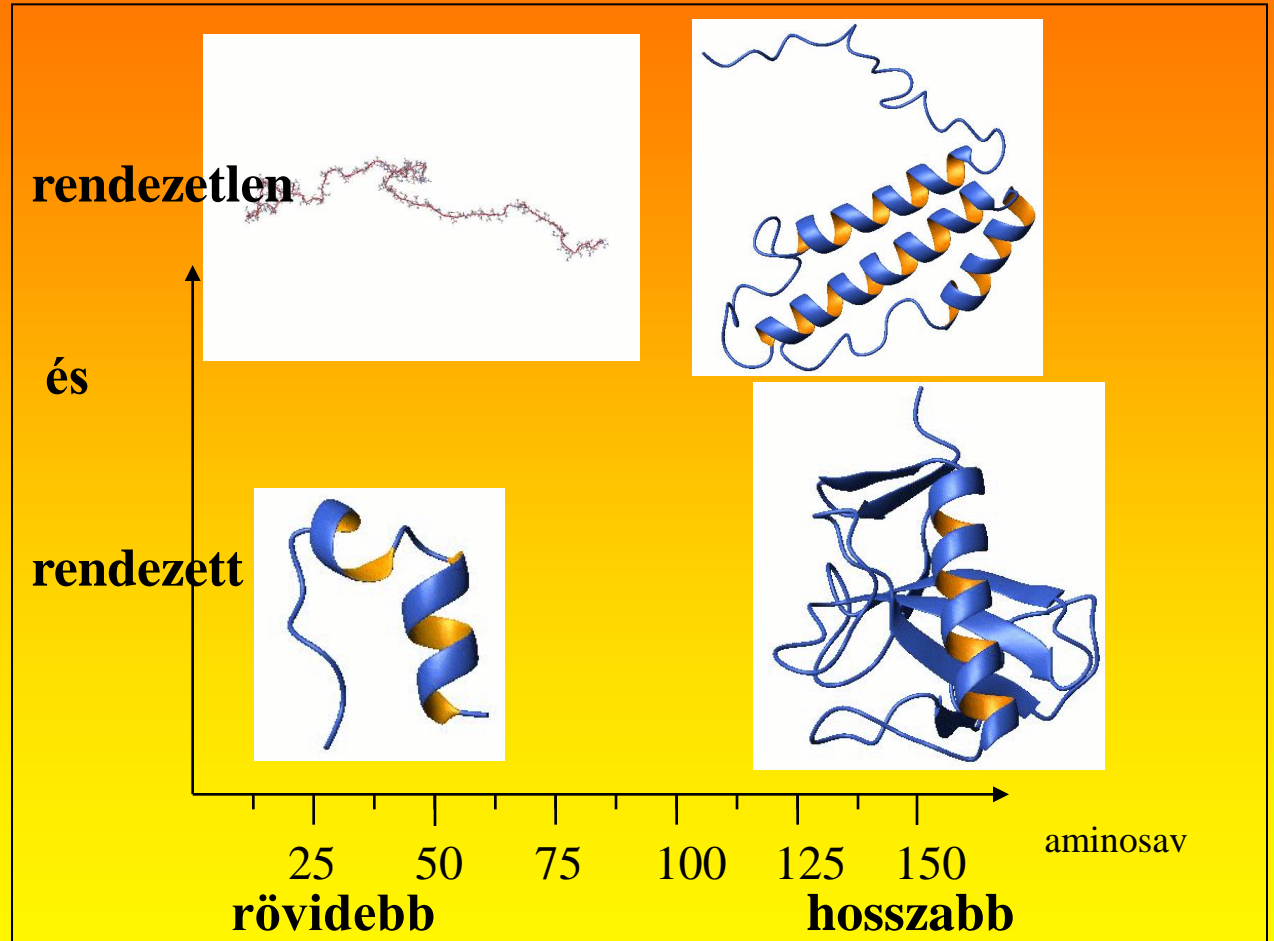
A ma ismert modulok száma 100 körüli, melyek mérete jellegzetesen 60 és 160 aminosav közé esik.



Húzható-e éles határ egy hosszabb polipeptid és egy rövidebb fehérjemodul között?

A globuláris térszerkezet

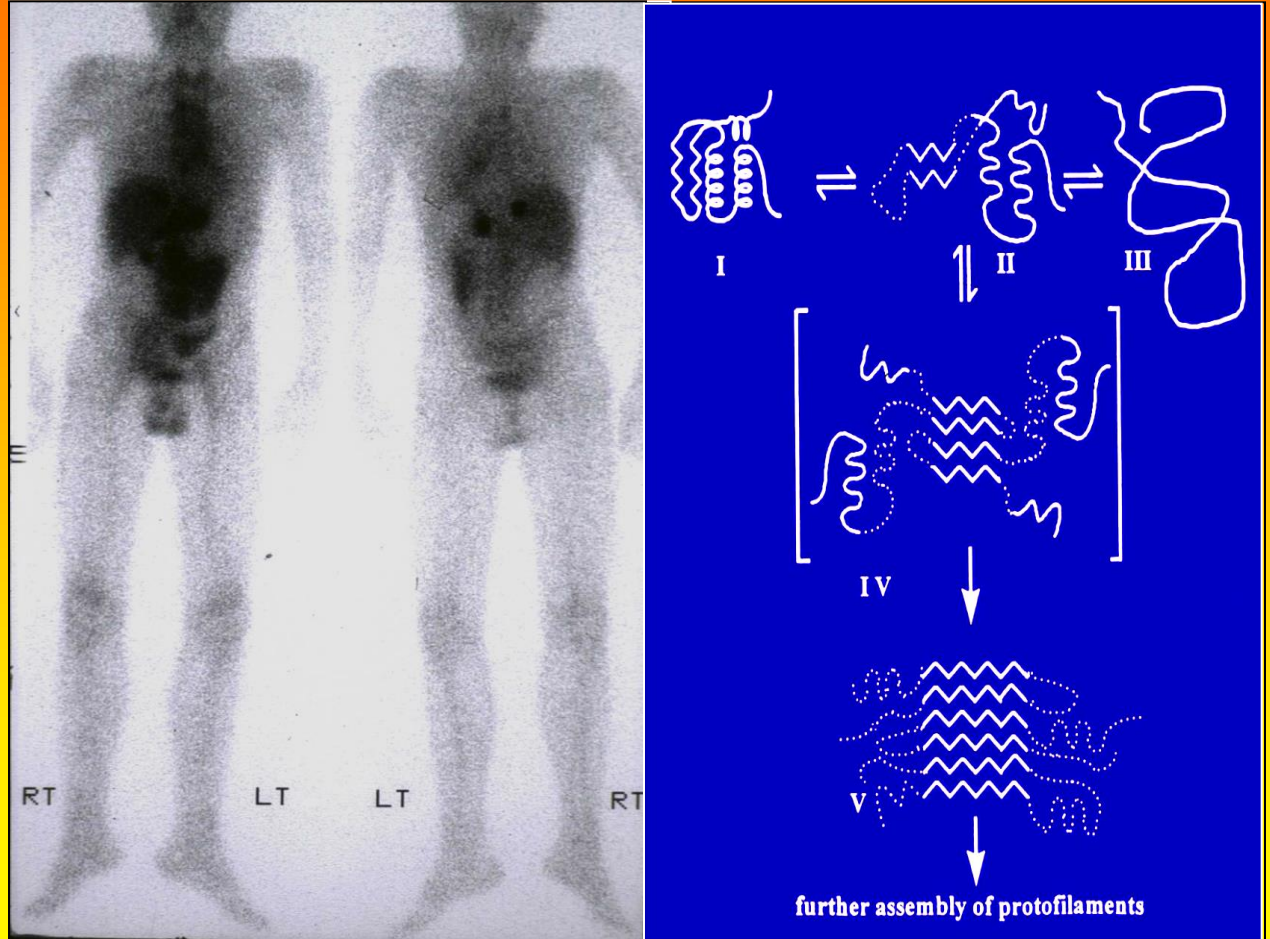
A modulok gyakran autonóm feltekeredésű, globuláris térszerkezetű lineáris polimerek, amelyek konformációja biológiai funkciójukkal szorosan összefügg.



Ha e fehérjét denaturáljuk, akkor elveszti nem csak a 3D térszerkezetét, de a biológiai funkcióját is!

Az lizozim amiloid szerű átalakulása

A lizozim egy pontmutációja miatt a konformációsán nyitottabb térszerkezet betöltöttsége megnő és végül amiloid szerű lerakódás figyelhető meg.



Miért szükséges a fehérjetervezet ismerete?

Közismert betegségek megértése:

- Sarlósejtes anémia
(Glu \Leftrightarrow Val mutáció \Rightarrow dezoxihemoglobin fokozott aggregációja)
- Kergemarha kór (*Creutzfeld-Jakob disease*)
(piron fehérje „misfold”)
- szivacsos encefalopátisz
- Alzheimer kór
(β -amiloid „misfold” és aggregáció)

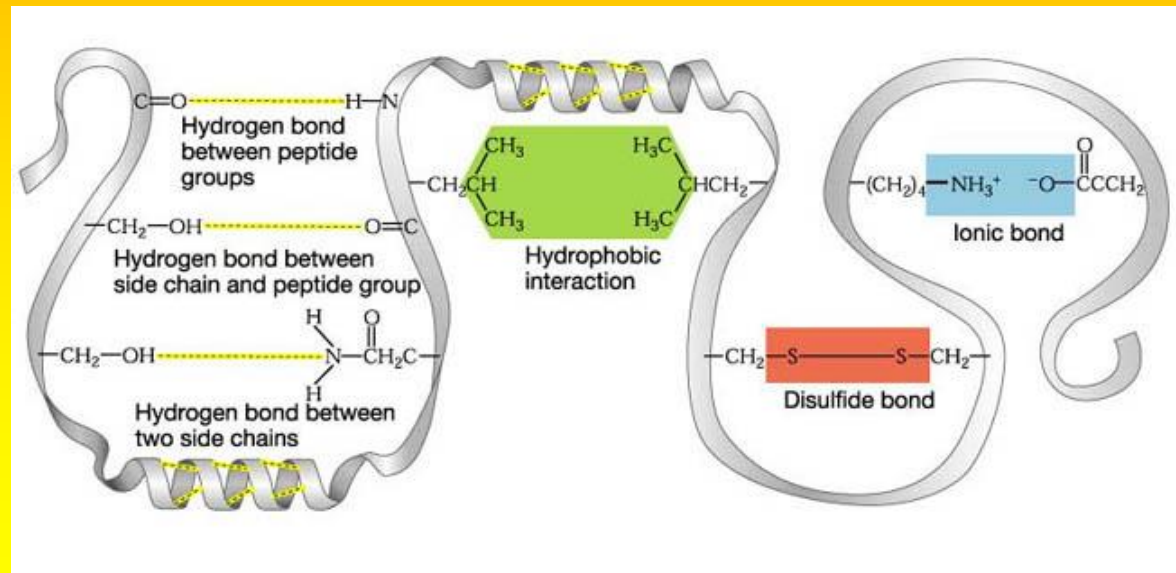
Racionális gyógyszertervezés:

pl. HIV proteáz inhibitor

Egy fehérje harmadlagos szerkezete azonos az azt felépítő egyetlen polipeptidlánc 3D- vagy térszerkezetével. A másodlagos szerkezeti elemek feltekeredése következtében létrejövő téralkat egy időátlagban “kvázi azonos” konformer. Jellegzetes hidrofób- és ionos (só-híd) kölcsönhatások, illetve a diszulfid-hidak stabilizálják a kialakult 3D szerkezetet.

A fehérjék téralkatát stabilizáló
5-fajta kötés:

- peptidkötés,
- hidrogén-híd (kötés),
- diszulfid kötés,
- ionos kötések,
- hidrofób erők (kötés)

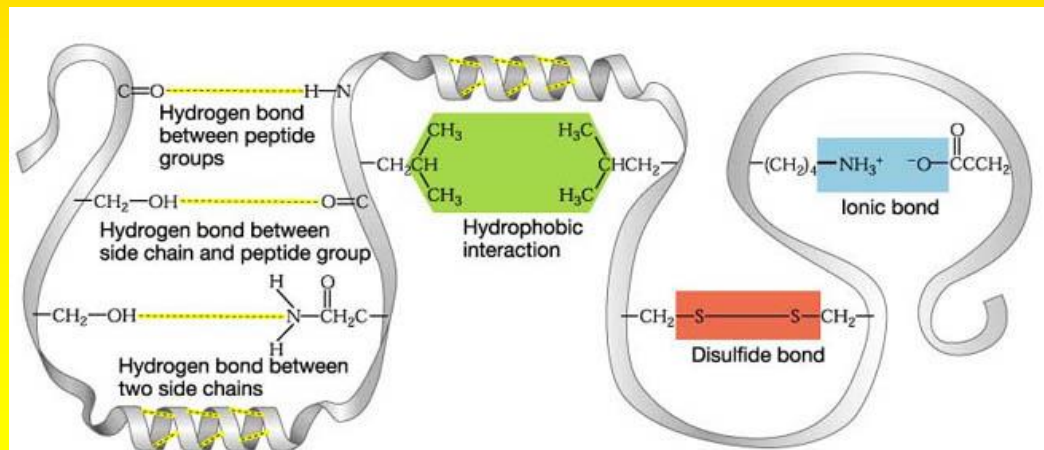


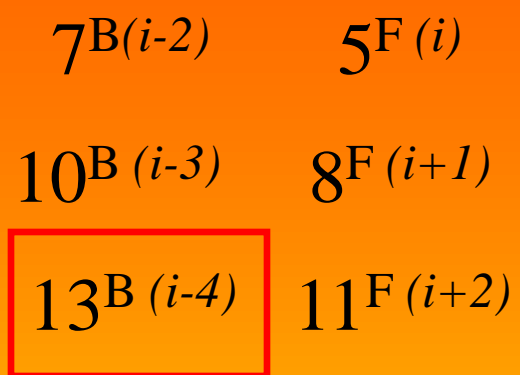
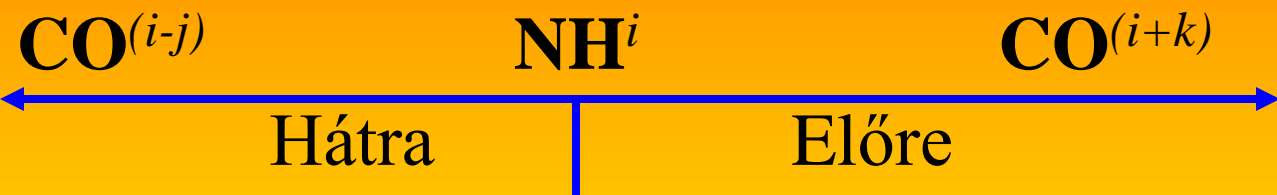
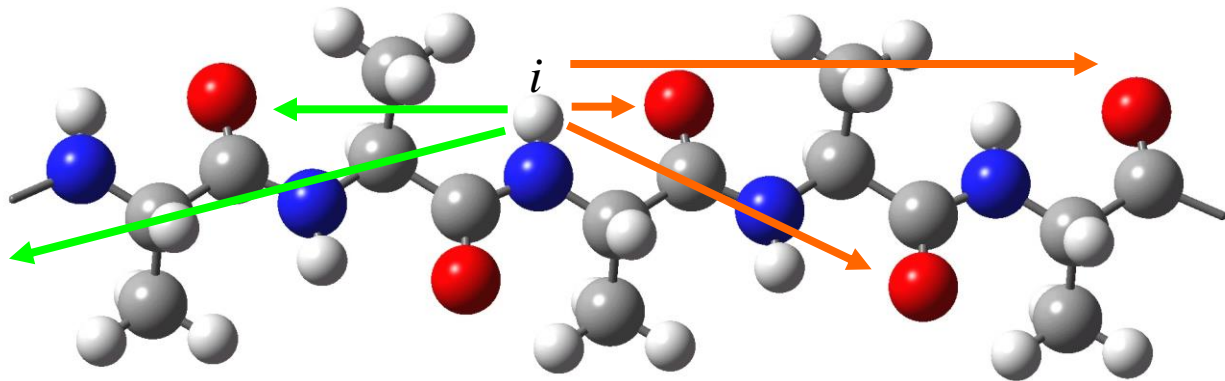
A harmadlagos szerkezet (domének és modulok)

Milyen erők a fehérjét összetartó kötések és erők?

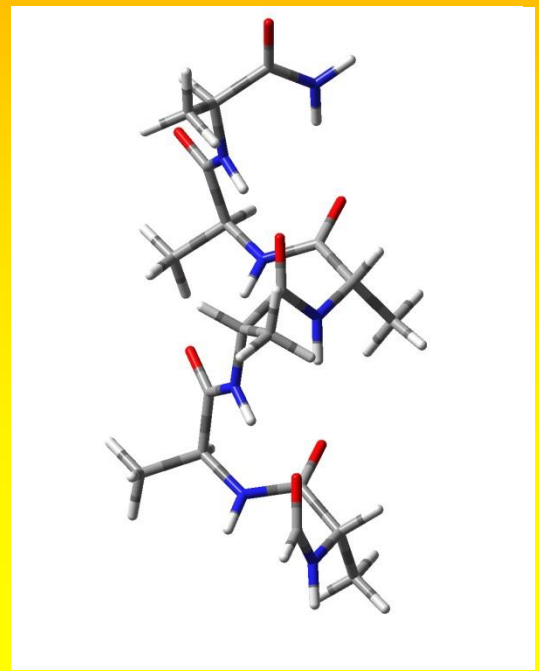
Kovalens kötés	Hidrogén-híd	Ionos-kötés	Van der Waals	Hidrofób erők
~100 kcal/mol	~3 kcal/mol	~ 5 kcal/mol	~1 kcal/mol	~3 kcal/mol
„megosztott” elektronok	víz-víz	teljes töltésátadás	fluktuál	nem igazi kötés
	szerves-vizes	H-híddal kompetícióban	indukált dipól	entrópia vezérelt
	szerves-szerves	erős „száraz” kristályokban	csak sztérikus közelség esetén	csak vízben hatásos
erős	gyenge, orientáció érzékeny	vízben gyenge	gyenge	gyenge

A biomolekulák harmadlagos szerkezetének kialakítása során a gyenge kötések (kölcsonhatások) összessége igen jelentős.





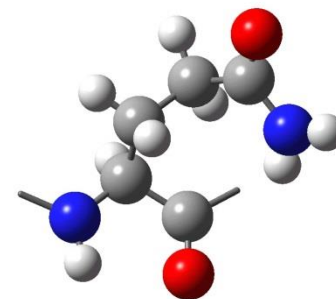
α-hélix



Mik a peptidek és fehérjék?

lineáris polimerek amelyek

L-konfigurációjú α -aminosavakból épülnek fel

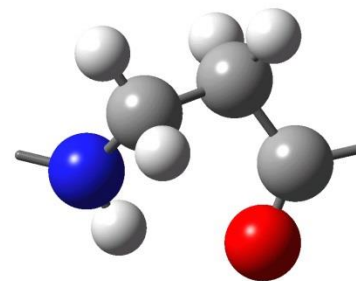


- polaritás (véragyógát)
- emészthetőség
- konformációs mozgékonyság

Miért α -aminosavakból ?

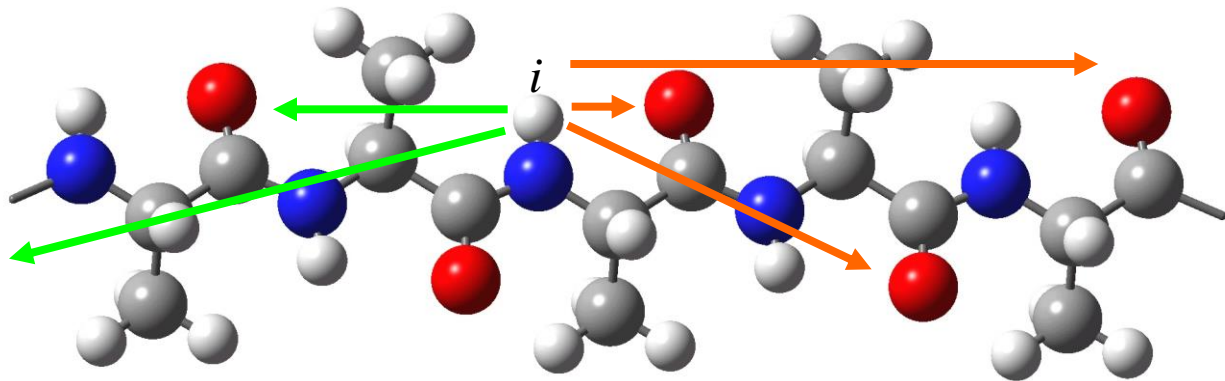
β -aminosavak :

- apolárisabb
- proteázokkal szemben ellenállóak
- eltérő flexibilitás

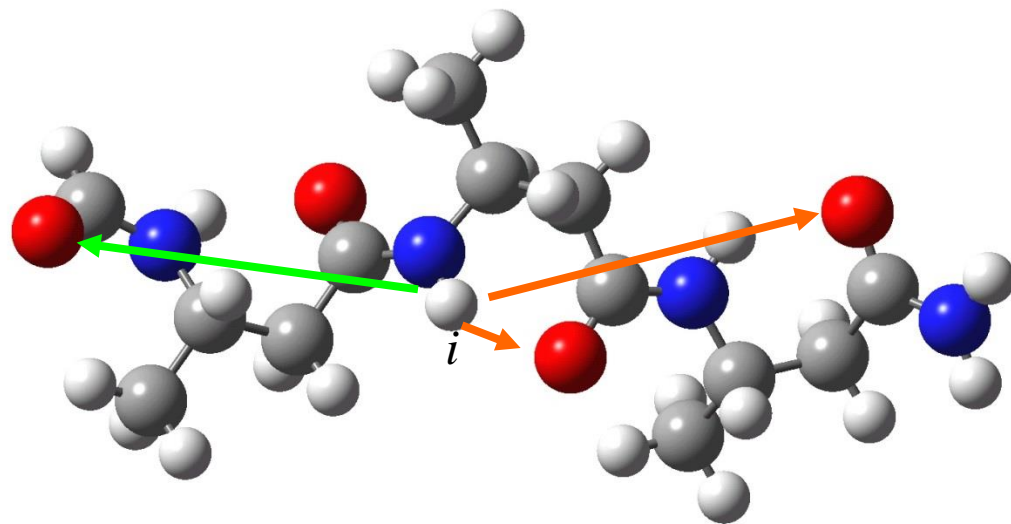
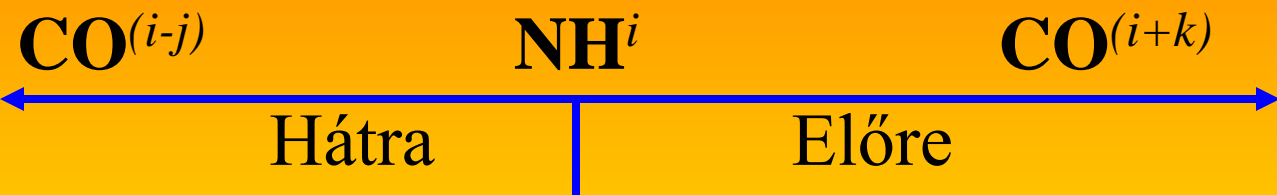


Seebach et. al.
Gellman
Navas et. al.

Helv. Chim. Acta **1996**, 79, 913-941
Acc. Chem. Res. **1998**, 31, 173-180
J. Org. Chem. **1996**, 61, 6849-6855

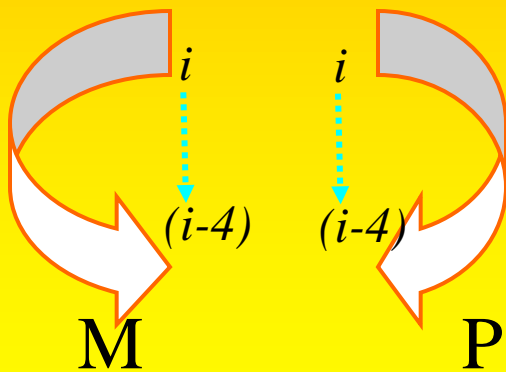
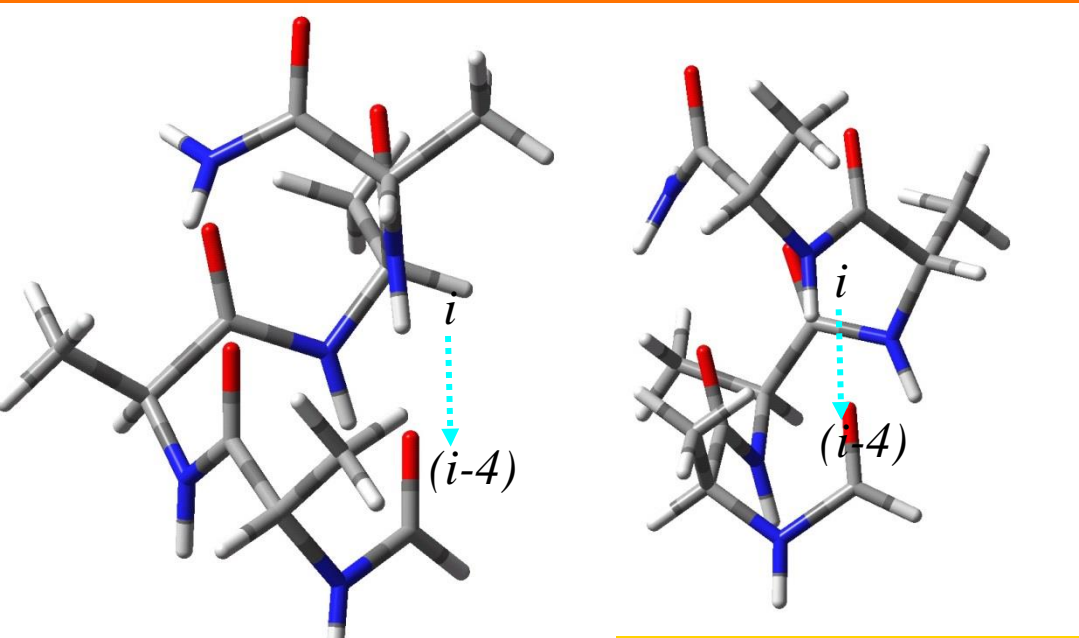


$7^B(i-2)$	$5^F(i)$
$10^B(i-3)$	$8^F(i+1)$
$13^B(i-4)$	$11^F(i+2)$



$8^B(i-2)$	$6^F(i)$
$12^B(i-3)$	$10^F(i+1)$
$16^B(i-4)$	$14^F(i+2)$

α -L-aminosavakból
felépülő
 α -hélix
térszerkezetek

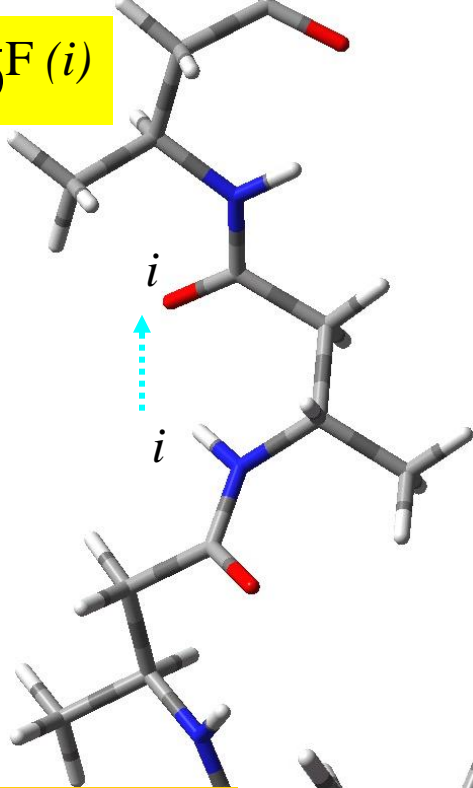


$13^B (i-4)$

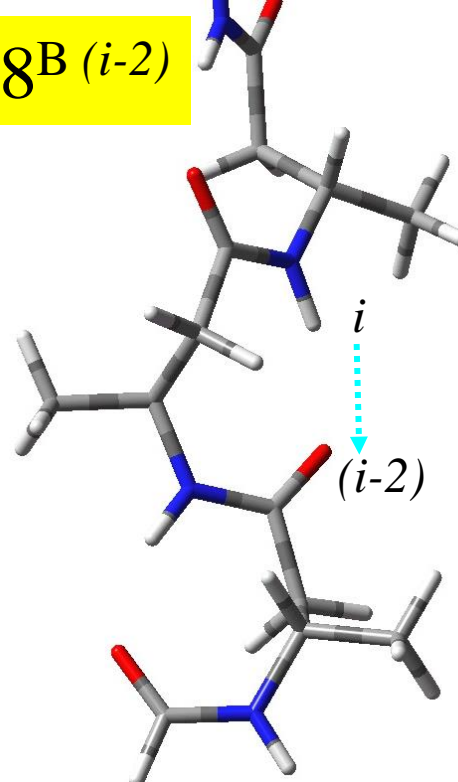
mindkettő „backward” hélix

α -hélix	$13^B (i-4)$	
mínusz	vagy	plusz
bal	vagy	jobb

$6^F(i)$

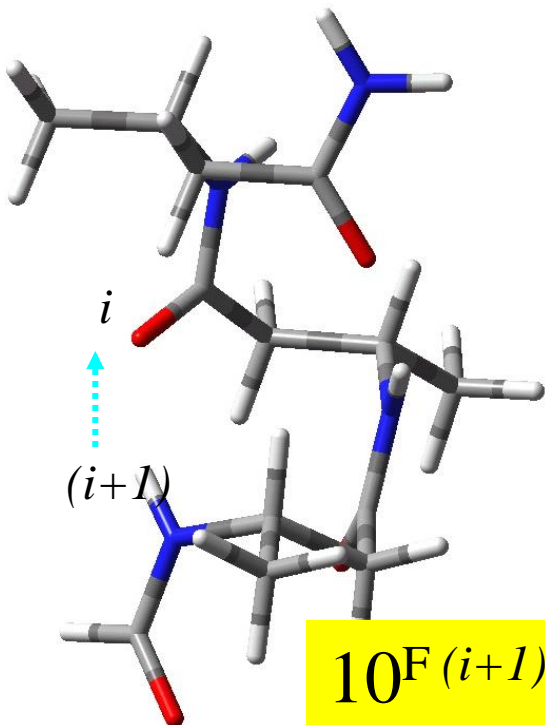


$8^B(i-2)$



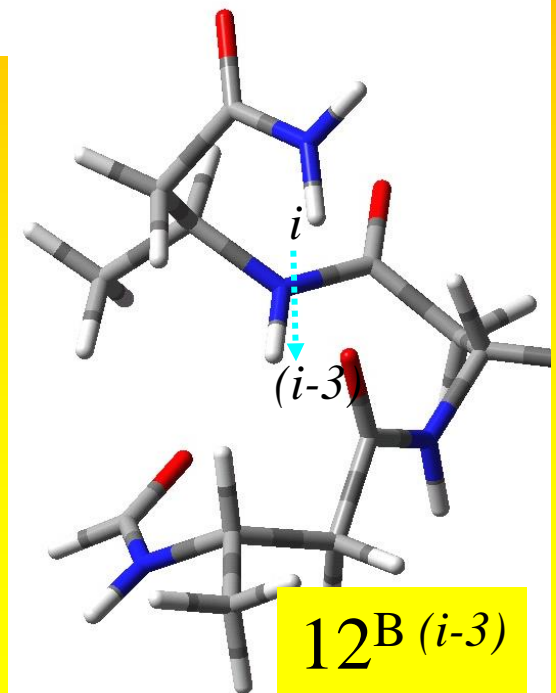
β -amino-
savakból
felépülő
hélixek

i
 $(i+1)$



$10^F(i+1)$

i
 $(i-3)$



$12^B(i-3)$

Homo konformerek periodikus H-hidakkal α - és β -peptidek esetén

α -peptidek

- $5^F(i) \Rightarrow \beta$ -sheet
- $8^F(i+1) \Rightarrow ?$
- $11^F(i+2) \Rightarrow ?$
- $14^F(i+3) \Rightarrow ?$

- $7^B(i-2) \Rightarrow \gamma$ -turn, $^{inv}\gamma$ -turn
- $10^B(i-3) \Rightarrow 3_{10}$ -helix (left, right)
- $13^B(i-4) \Rightarrow \alpha$ -helix (left, right)
- $16^B(i-5) \Rightarrow ? \pi$ -helix

β -peptidek

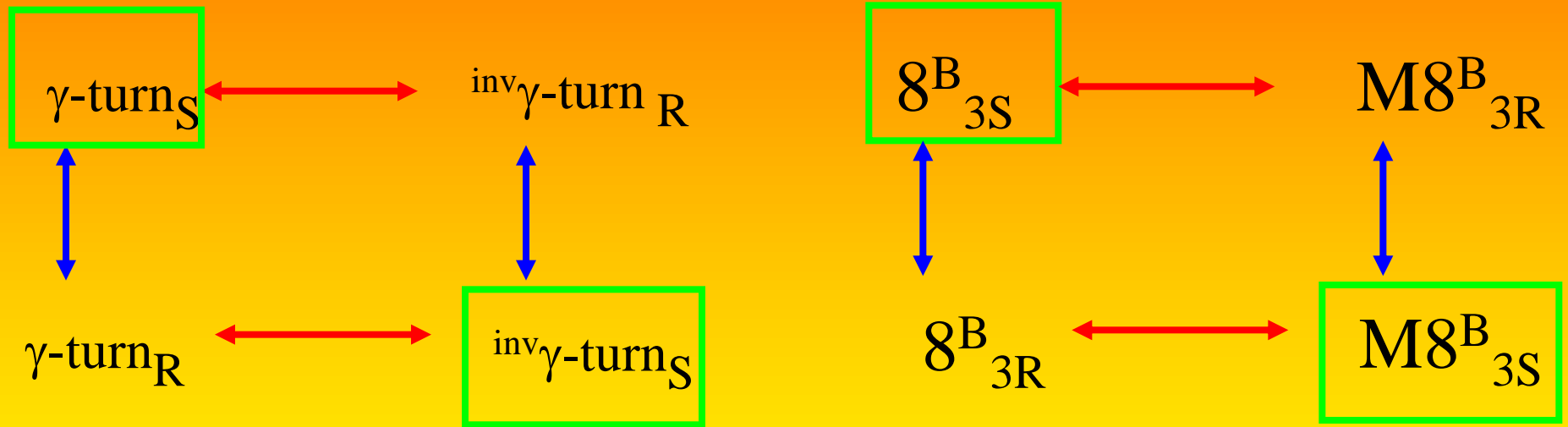
- $6^F(i) \Rightarrow \text{OK}$
- $10^F(i+1) \Rightarrow \text{OK}$
- $14^F(i+2) \Rightarrow \text{OK}$
- $18^F(i+3) \Rightarrow$

- $8^B(i-2) \Rightarrow \text{OK}$
- $12^B(i-3) \Rightarrow \text{OK}$
- $16^B(i-4) \Rightarrow$
- $20^B(i-5) \Rightarrow$

Homo konformerek periodikus H-hidakkal α - és β -peptidek esetén

α -peptides

β -peptides

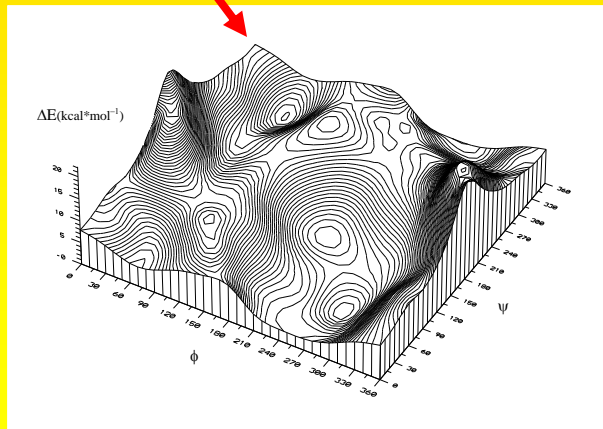
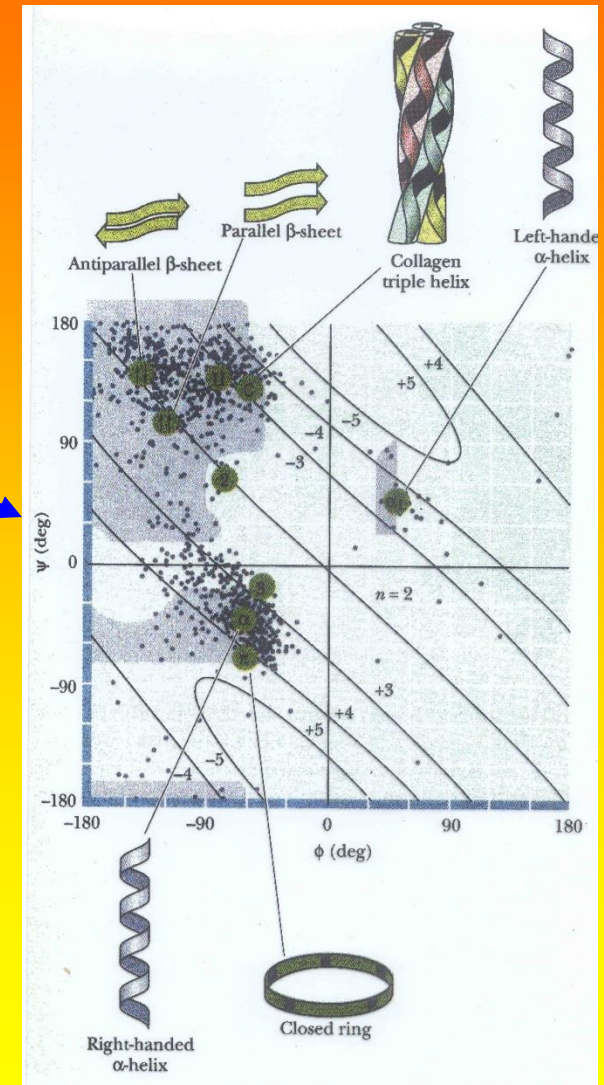
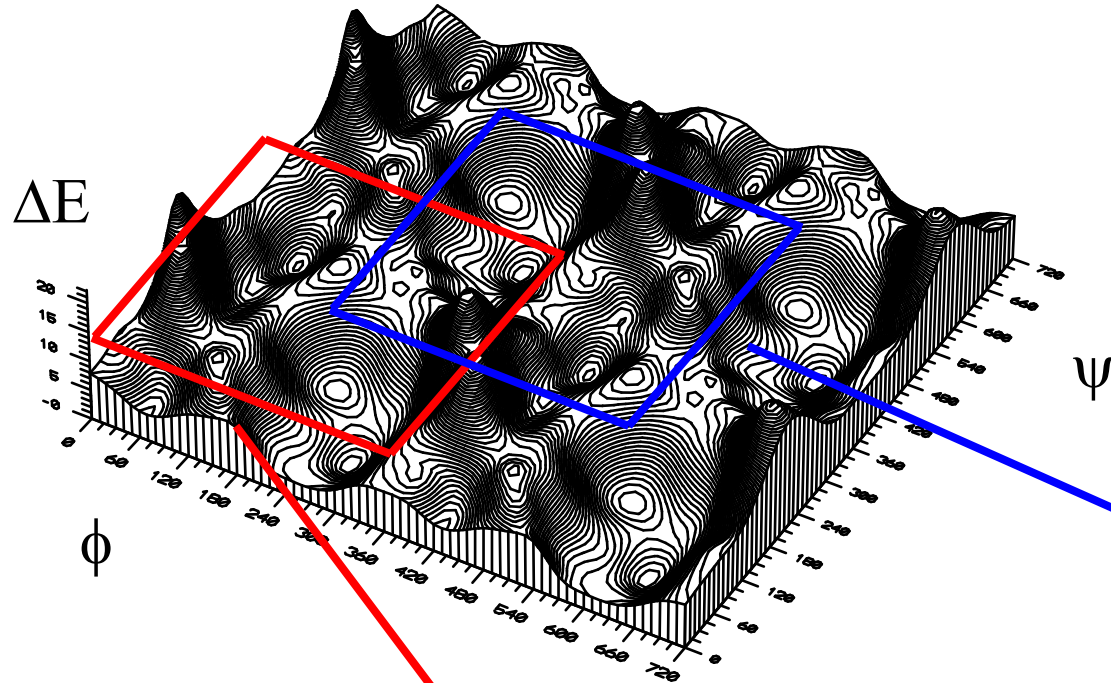


— enantiomere

— diasztereomer

A konformációs alapelemek lokalizálása a

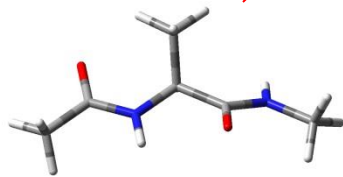
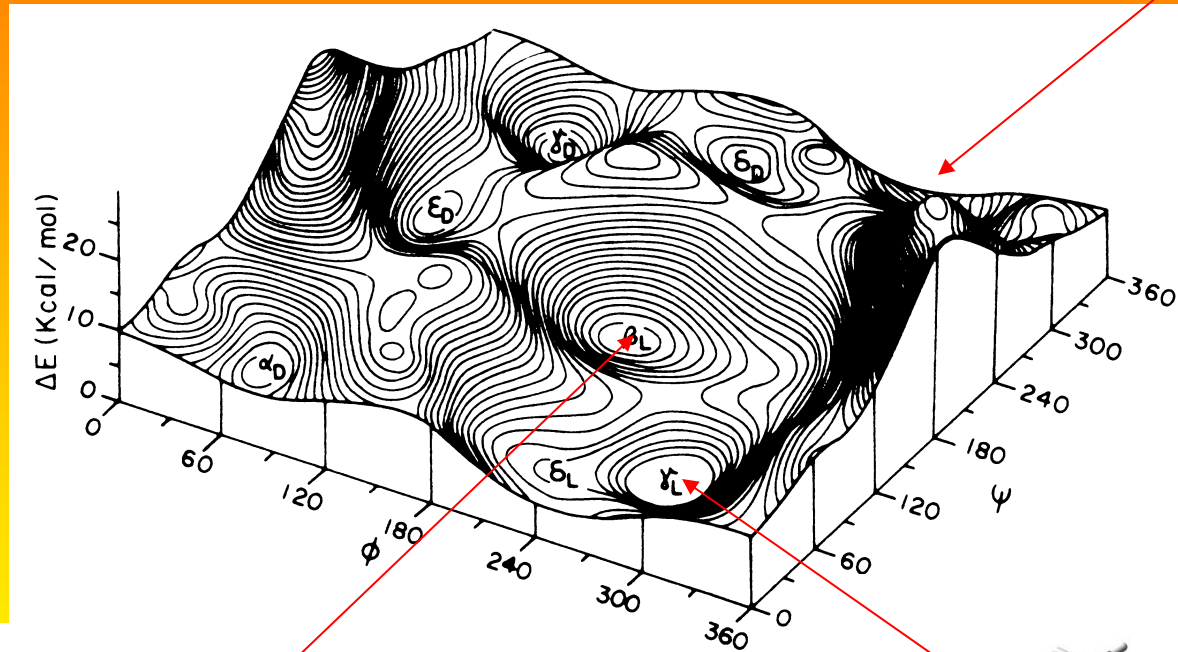
Ramachandran felületen



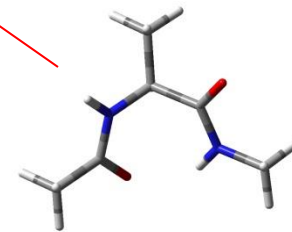
A $0^\circ \leq \varphi, \psi \leq 360^\circ$

intervallum esetén a $E=E(\varphi, \psi)$

α -hélix



β -redő

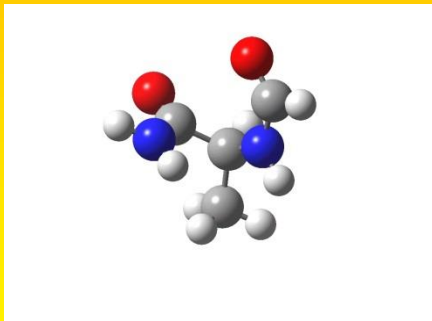


γ -kanyar

α -hélix modell

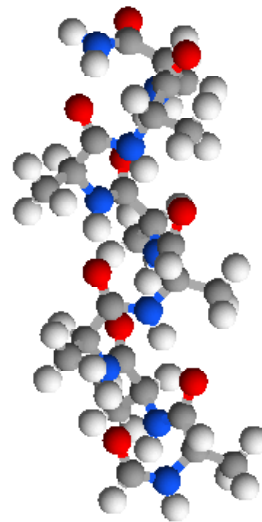


n=1

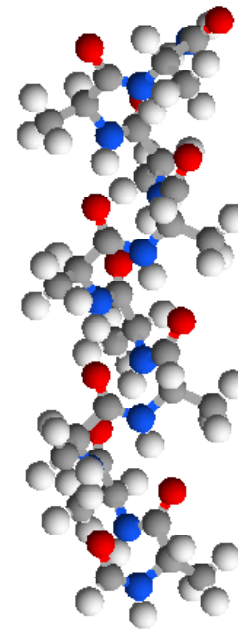


monomer

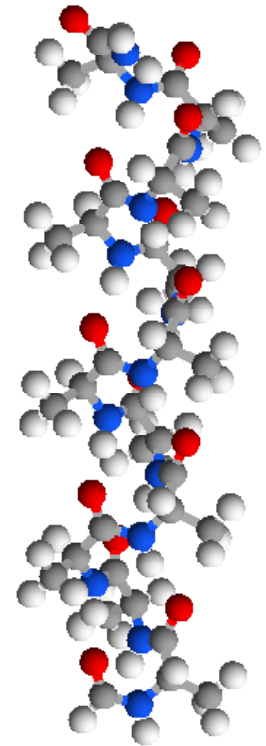
n=8



n=10



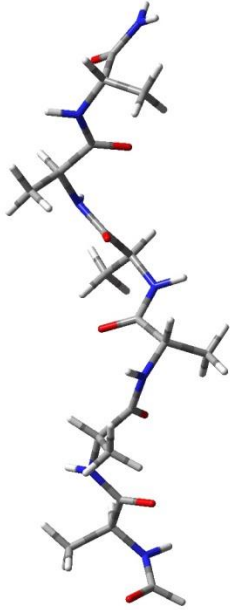
n=12



oligomer

homo-konformerek alegységeiből történő felépülése

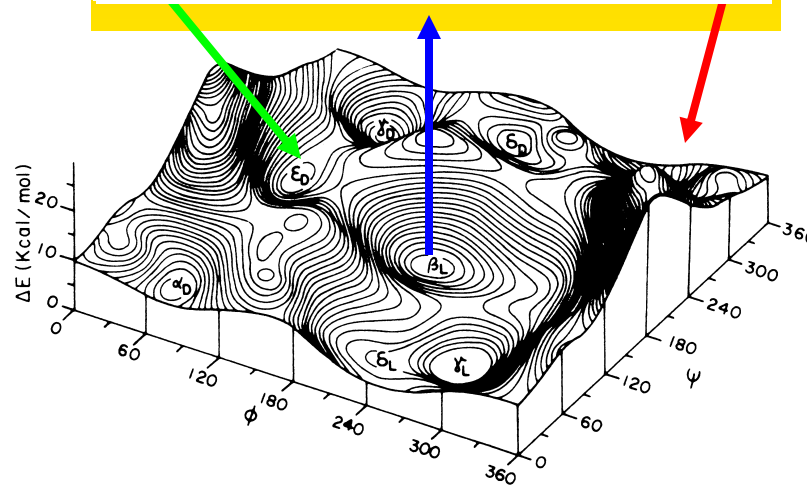
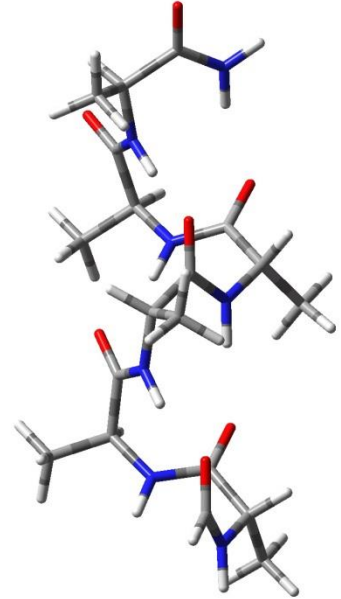
$(\epsilon_D)_n$



β -redő

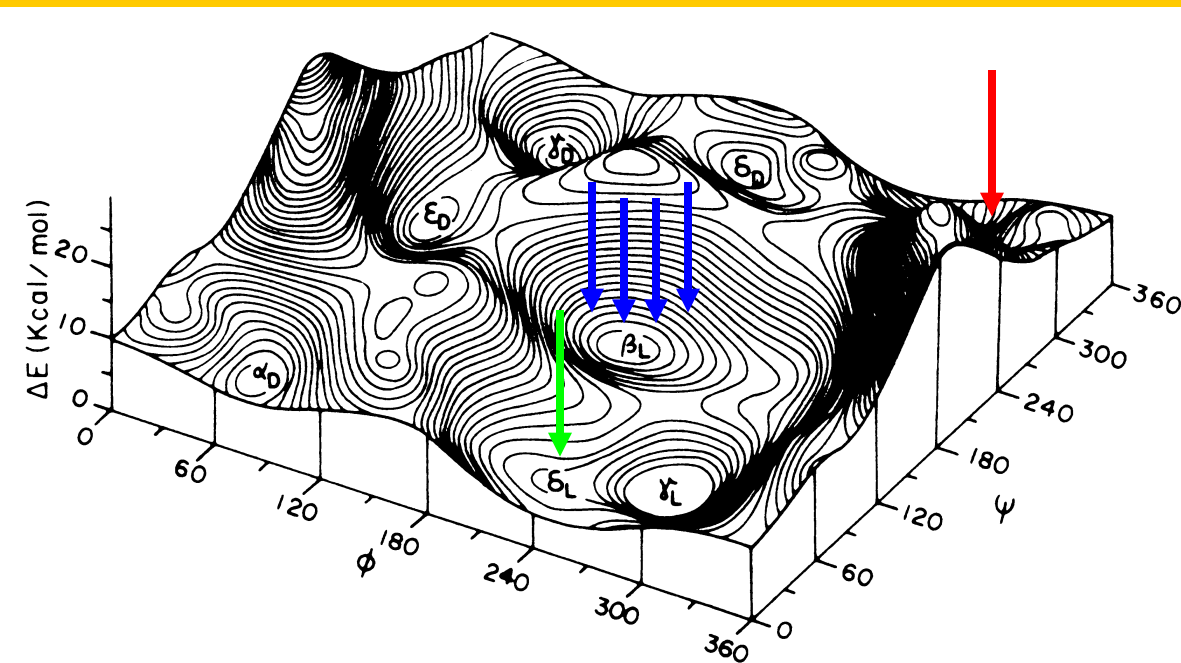
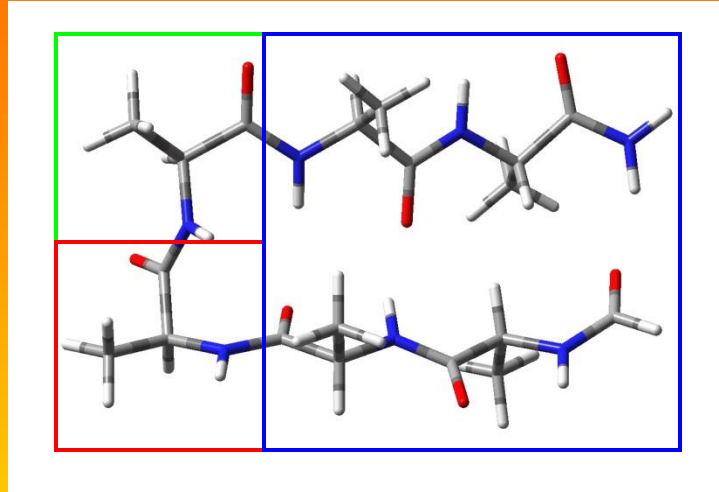


α -hélix

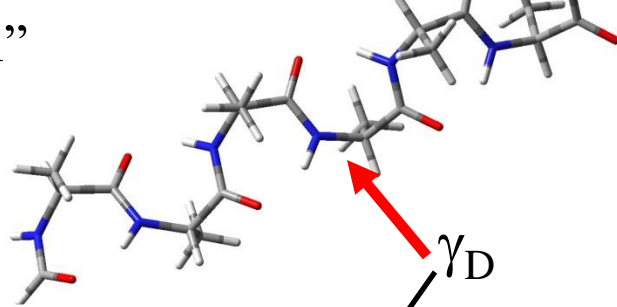


hetero-konformerek alegységekből történő felépülése

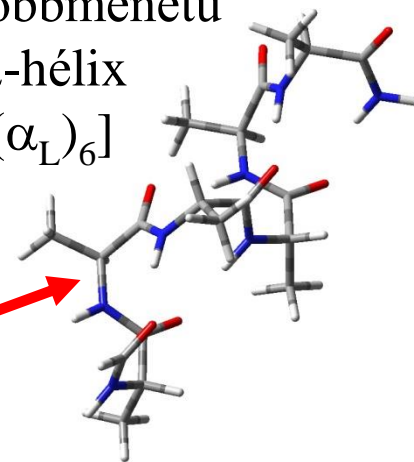
Pl. az I-es típusú β -kanyar ($\beta_L\beta_L\alpha_L\delta_L\beta_L\beta_L$)



ismétlődő “normál”
 γ -kanyar $[(\gamma_D)_6]$

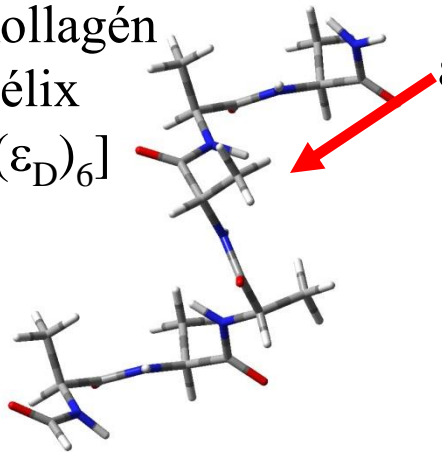


jobbmenetű
 α -hélix
 $[(\alpha_L)_6]$

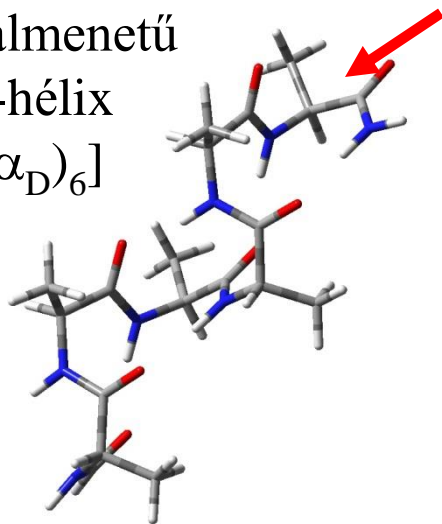


balmenetes

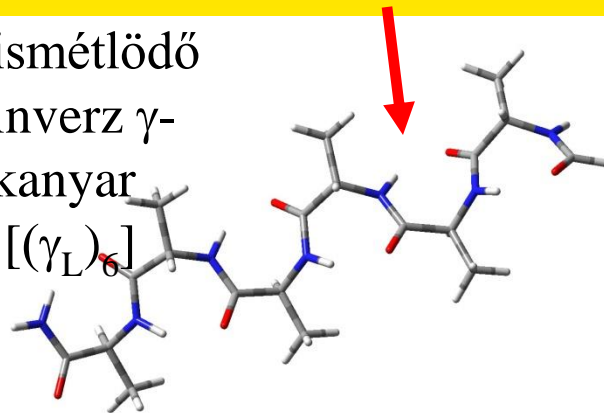
kollagén
hélix
 $[(\epsilon_D)_6]$



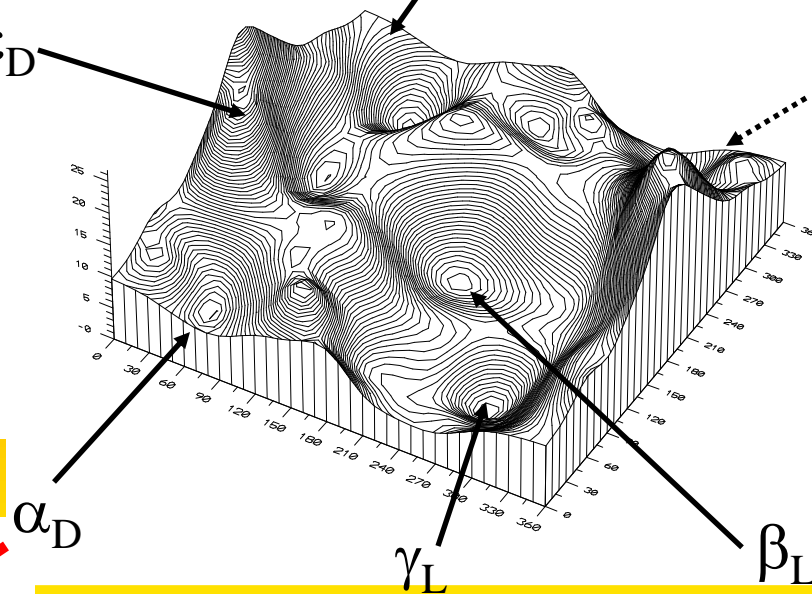
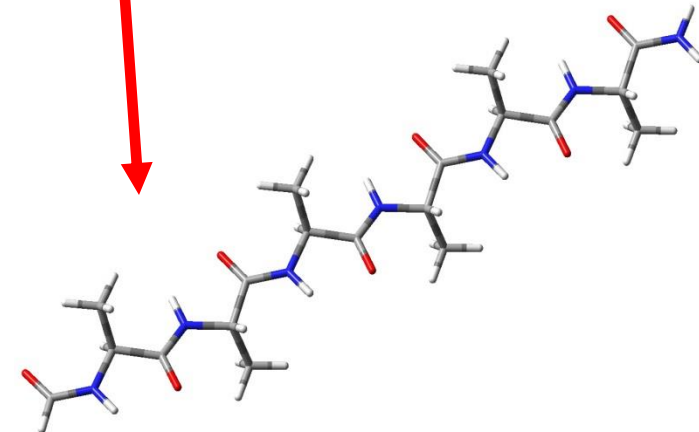
balmenetű
 α -hélix
 $[(\alpha_D)_6]$



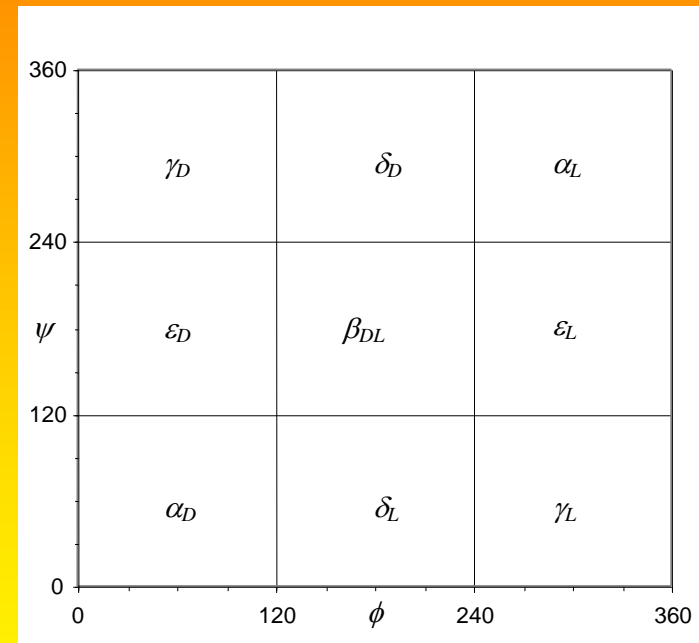
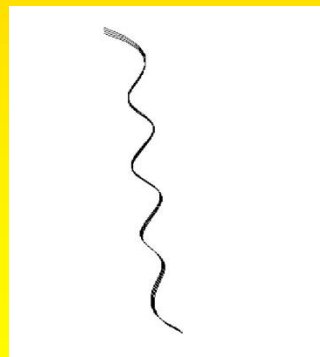
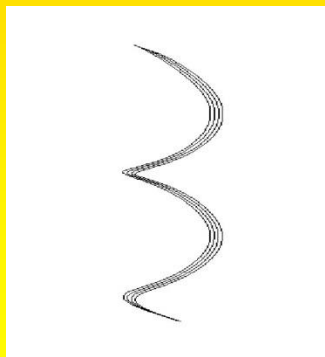
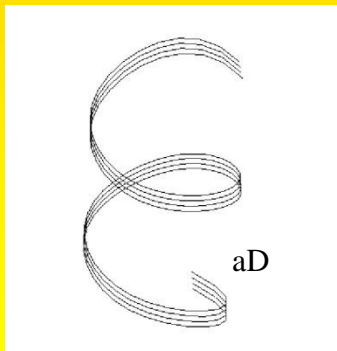
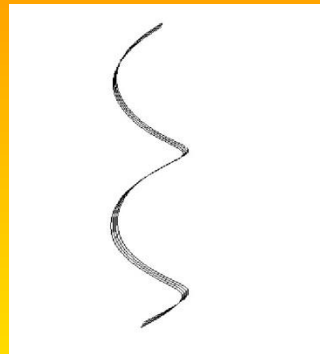
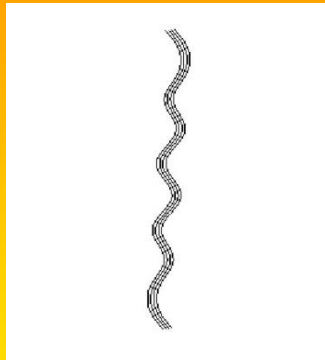
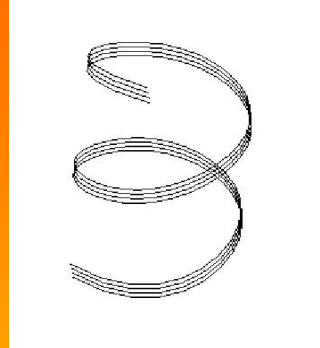
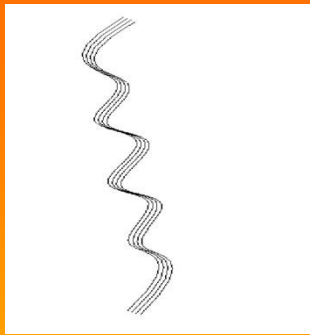
ismétlődő
inverz γ -
kanyar
 $[(\gamma_L)_6]$



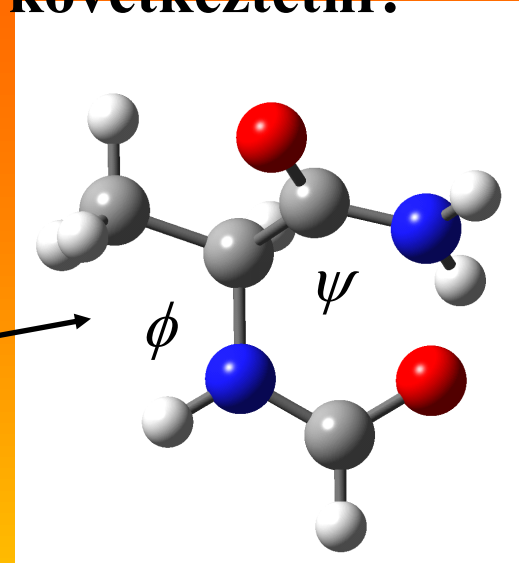
nyújtott
 β -redő $[(\beta_L)_6]$



Minden királis ?

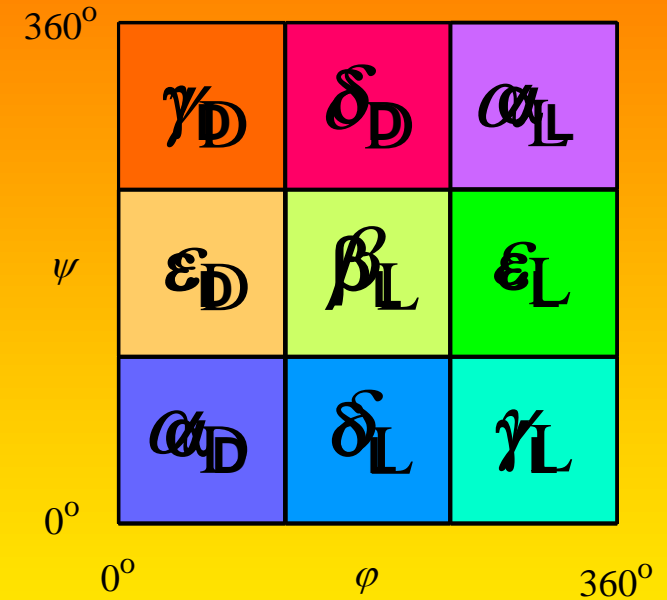
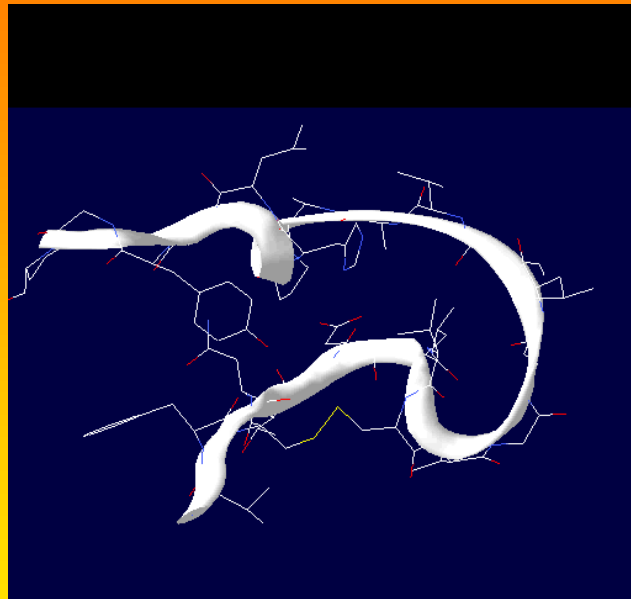


Hogyan lehet a részből az egészre következtetni?



Cutinase

360°	γ_D	δ_D	α_L
ψ	ϵ_D	β_L	ϵ_L
0°	α_D	δ_L	γ_L
	0°	ϕ	360°



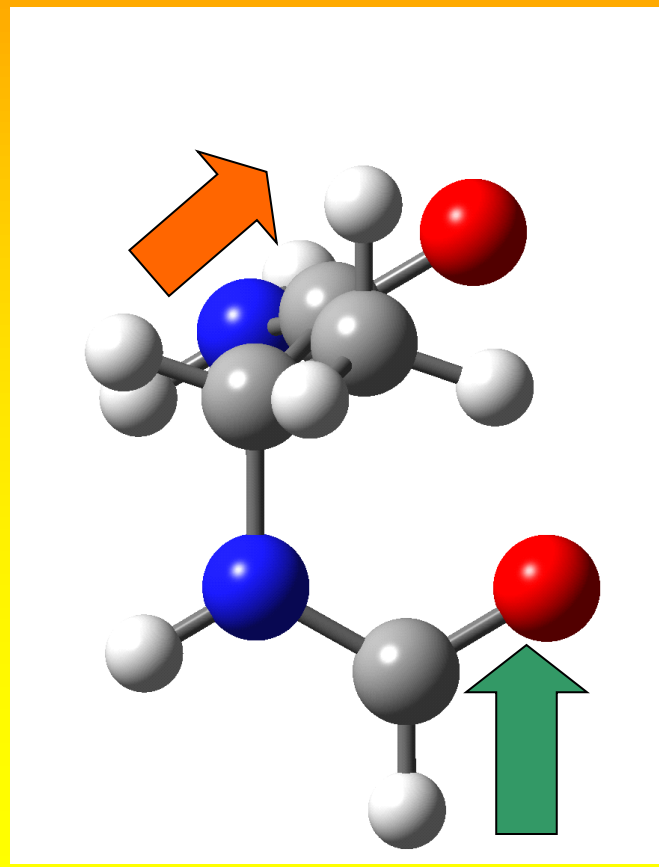
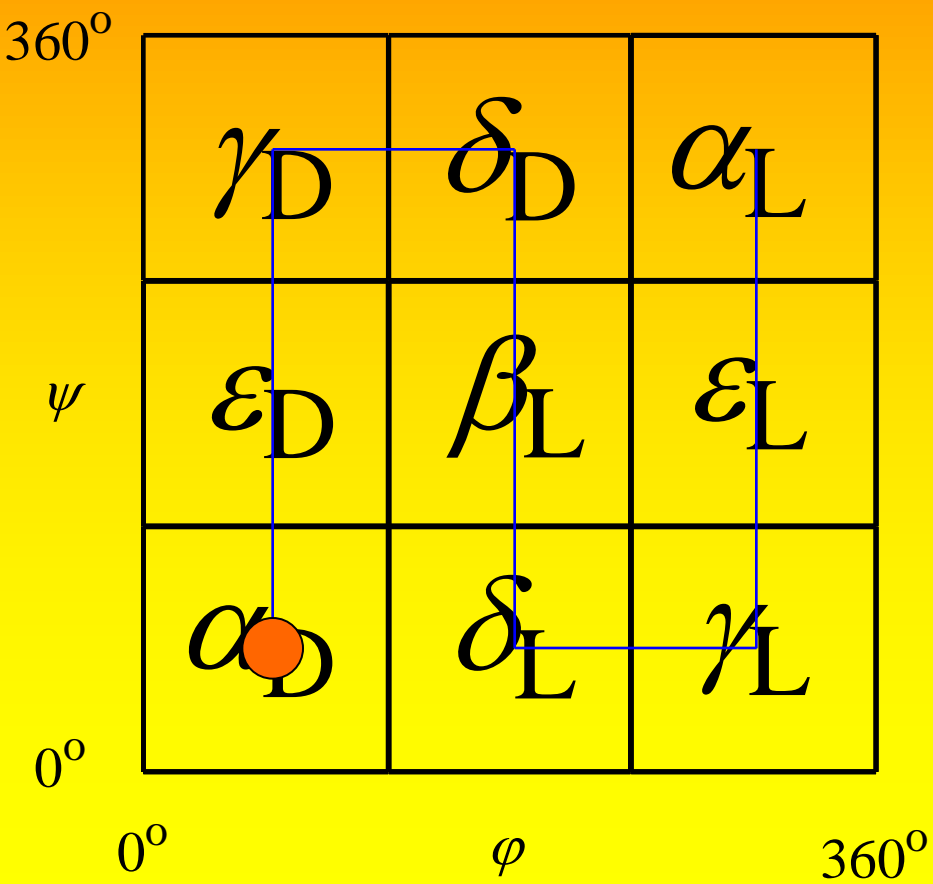
Val-Phe-Cys-Asn-Thr-Gly-Asp-Leu-Val-Cys-Thr-Gly-Ser-Leu-Ile-Val-Ala-Ala-



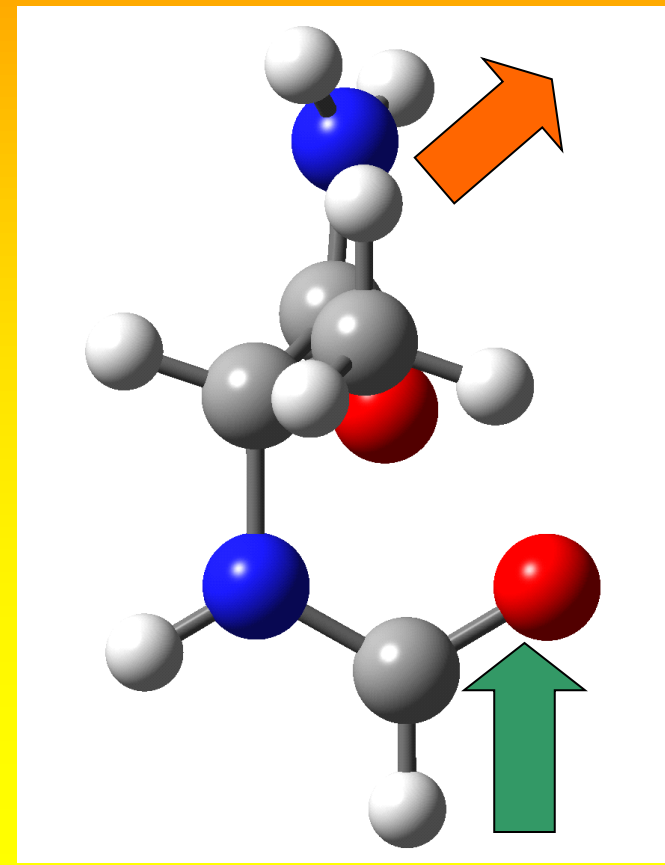
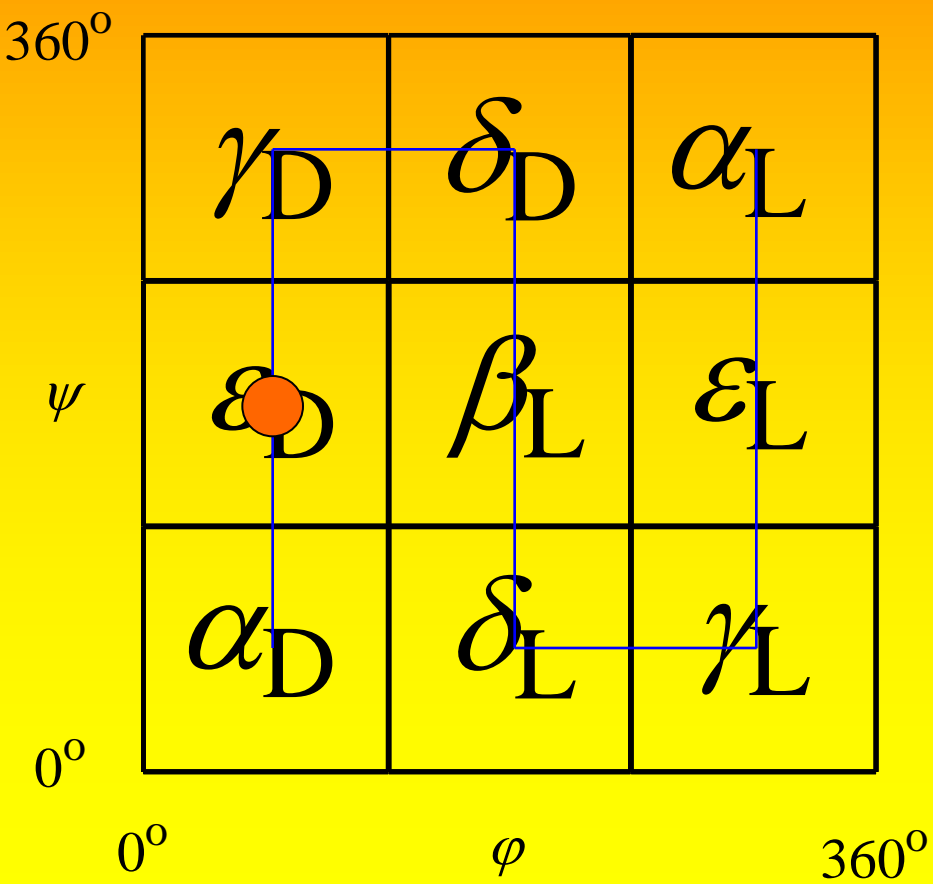
Pro-His-Leu-Ala-Tyr-Gly-Pro



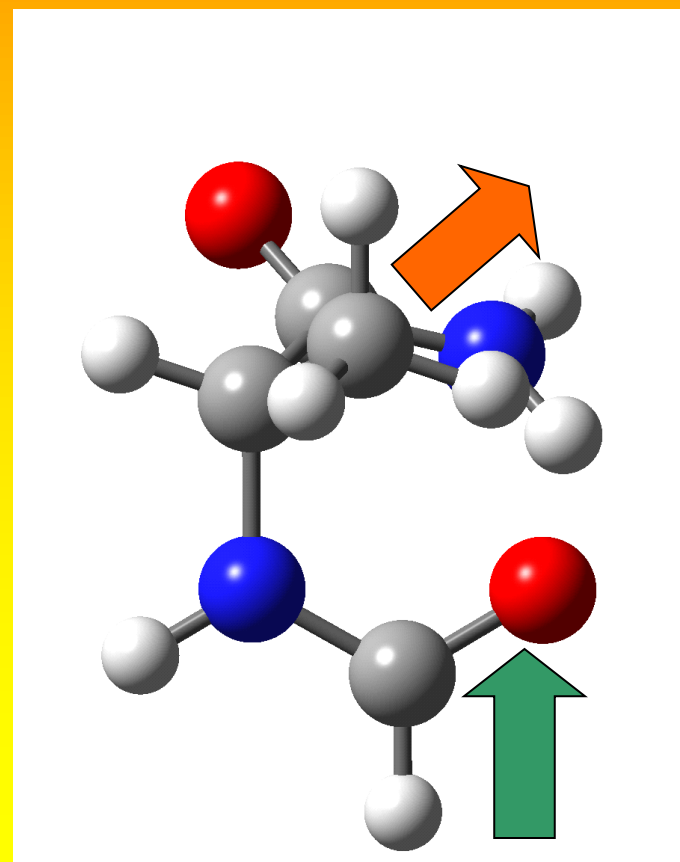
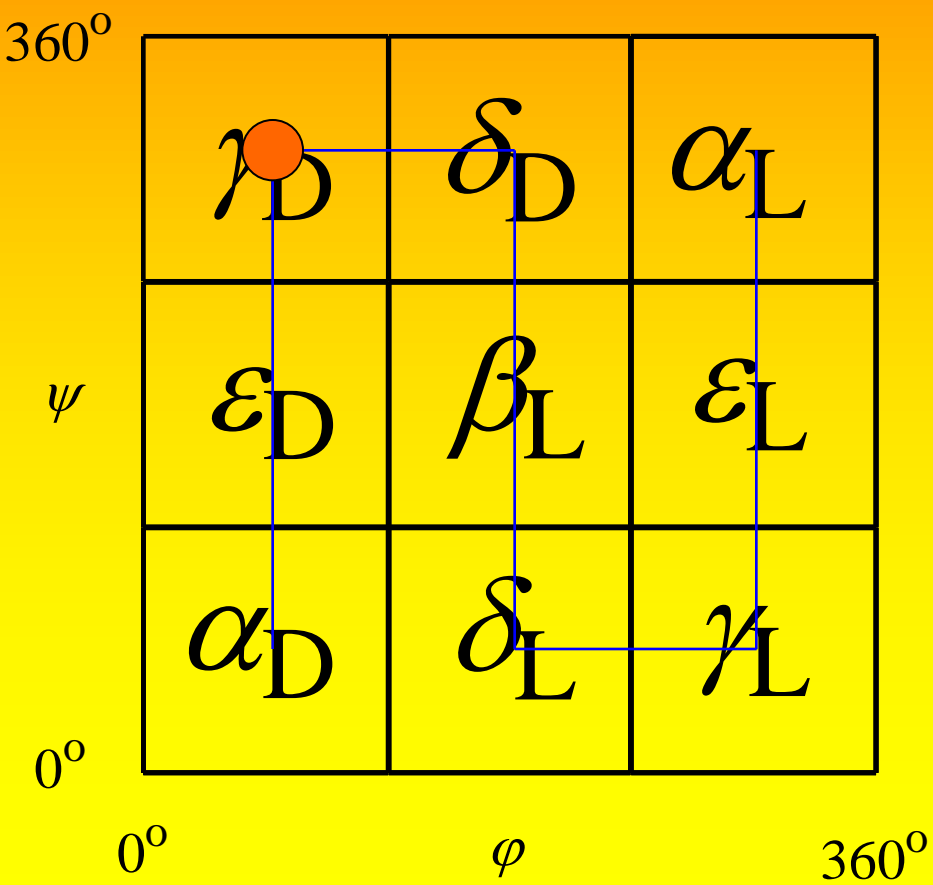
Tipikus fehérjeépítő-elem konformációk



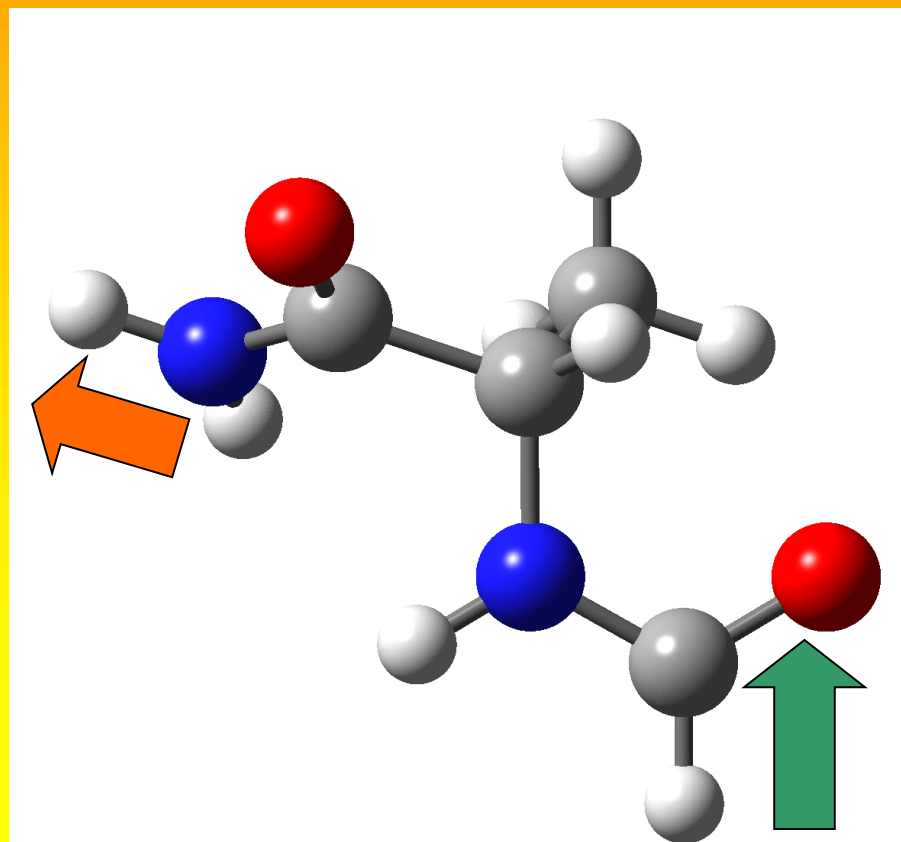
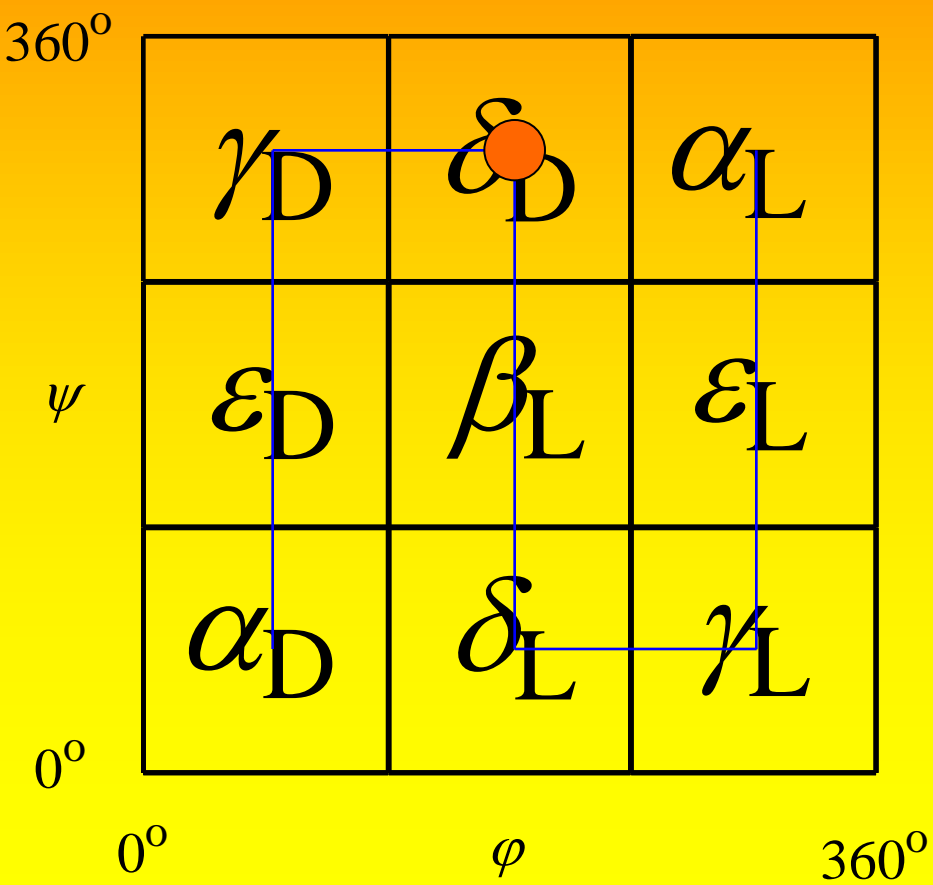
Tipikus fehérjeépítő-elem konformációk



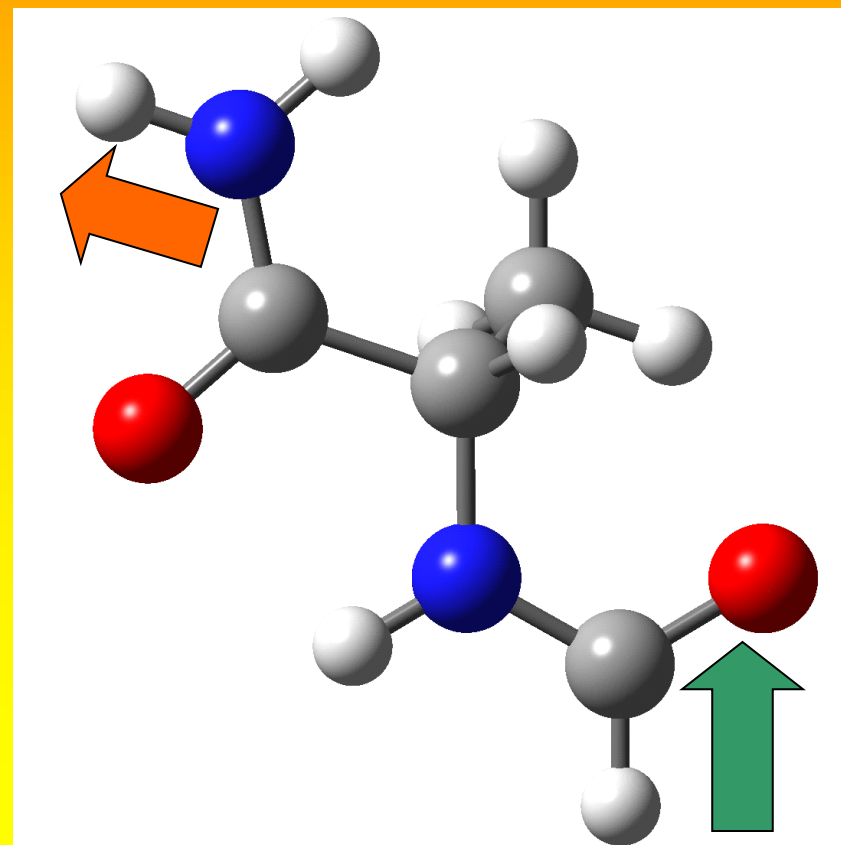
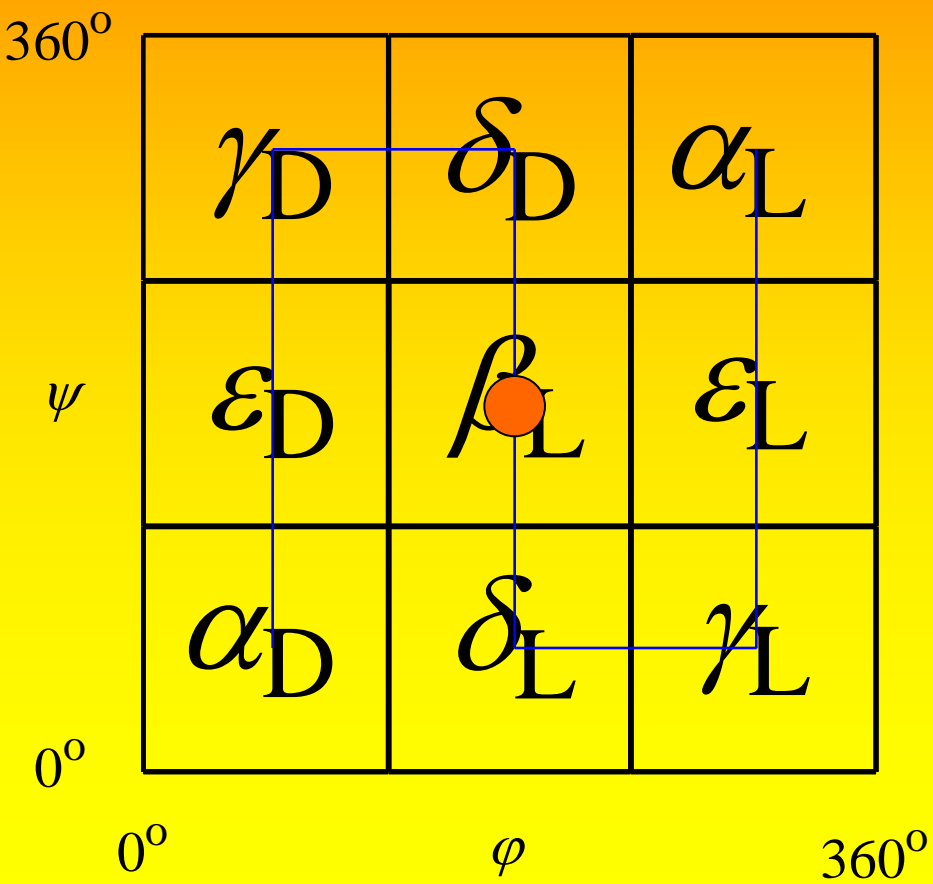
Tipikus fehérjeépítő-elem konformációk



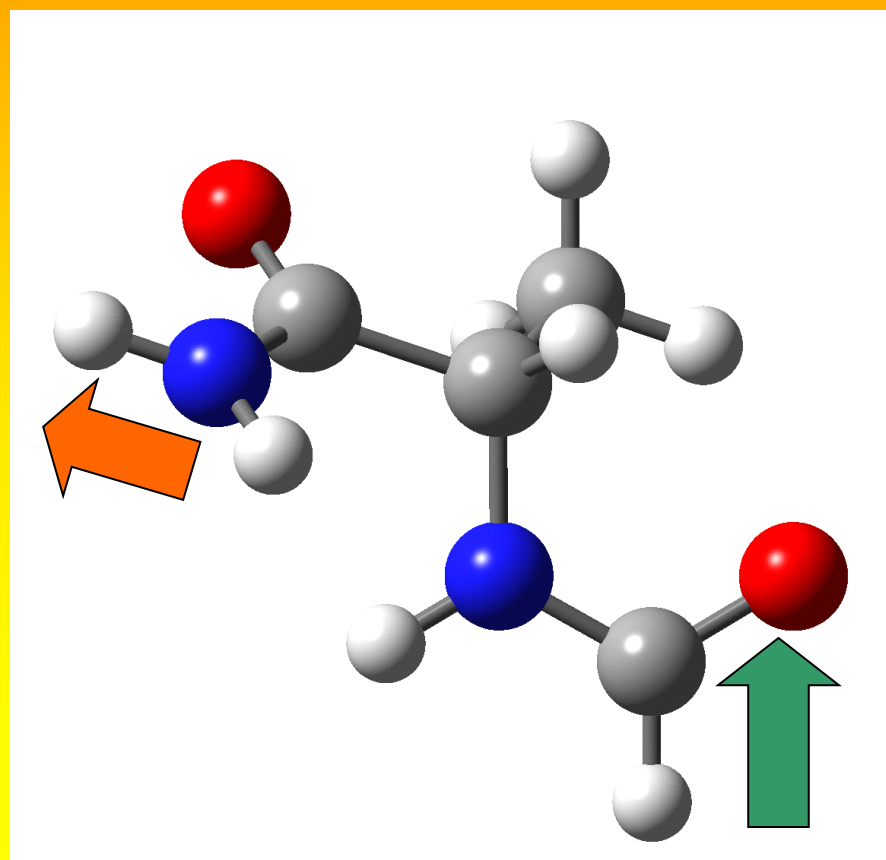
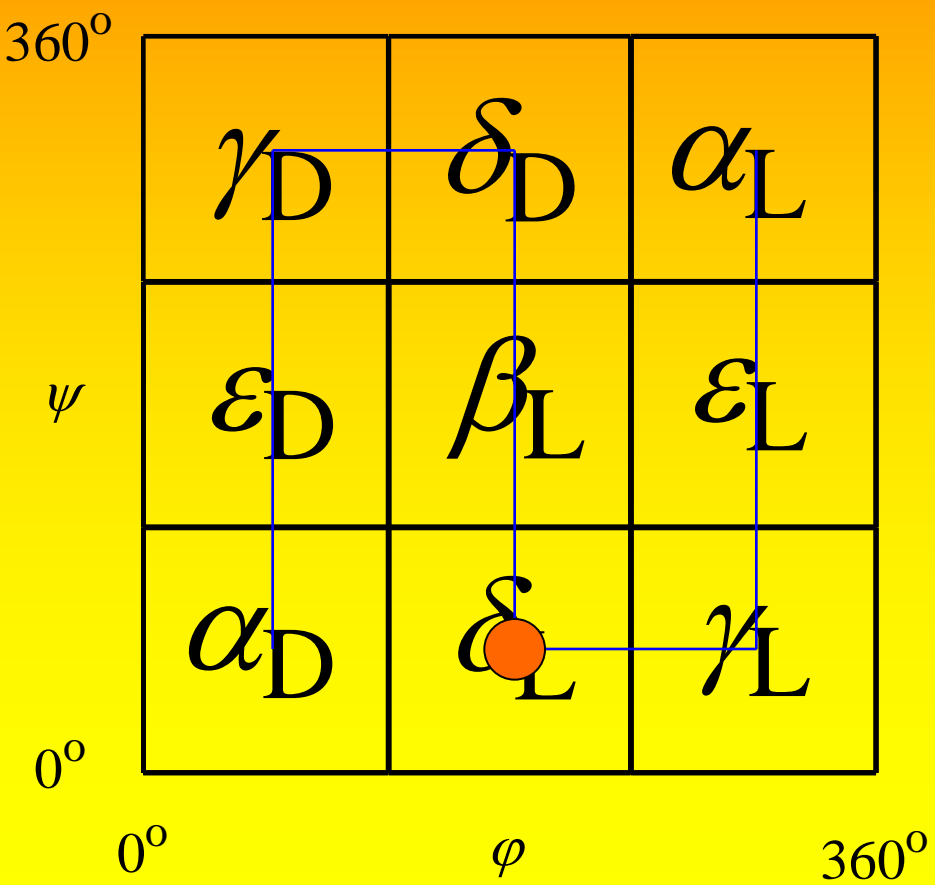
Tipikus fehérjeépítő-elem konformációk



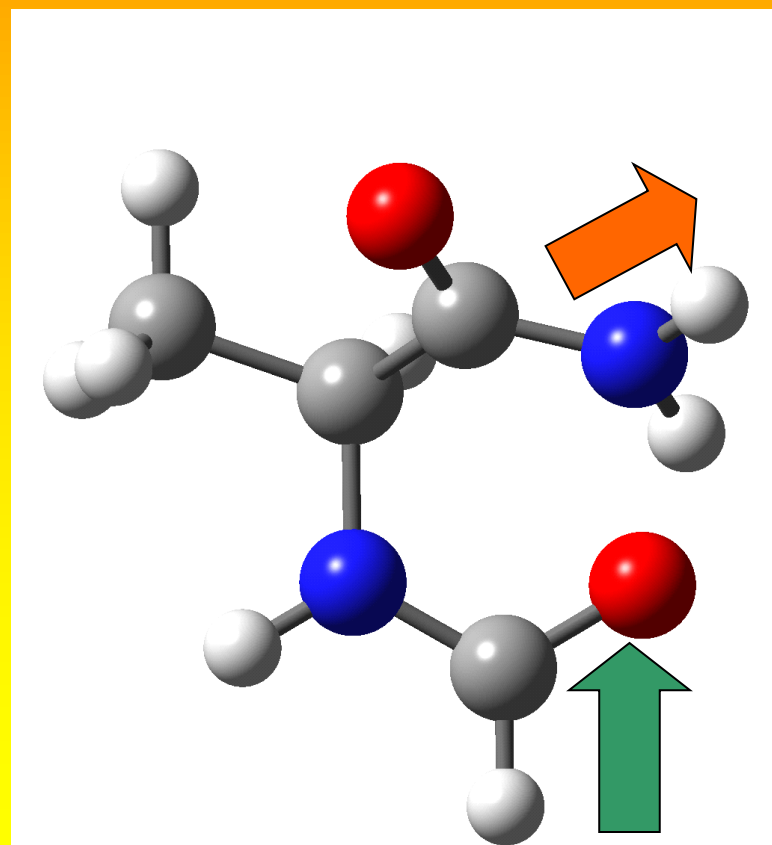
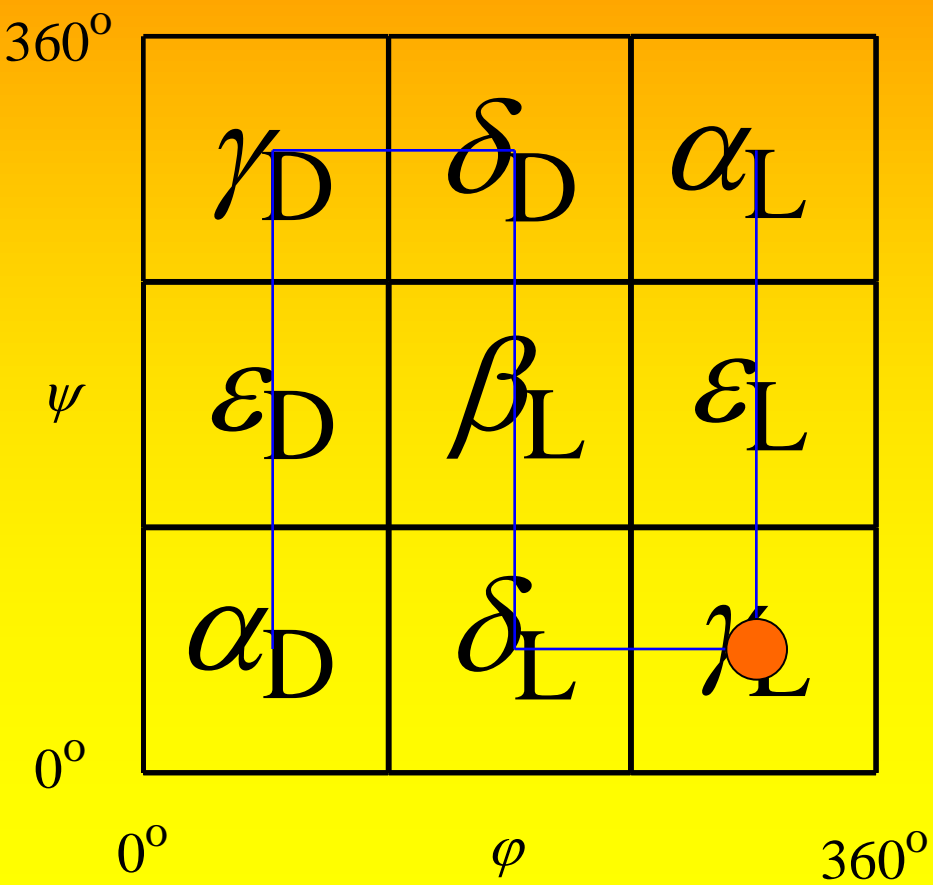
Tipikus fehérjeépítő-elem konformációk



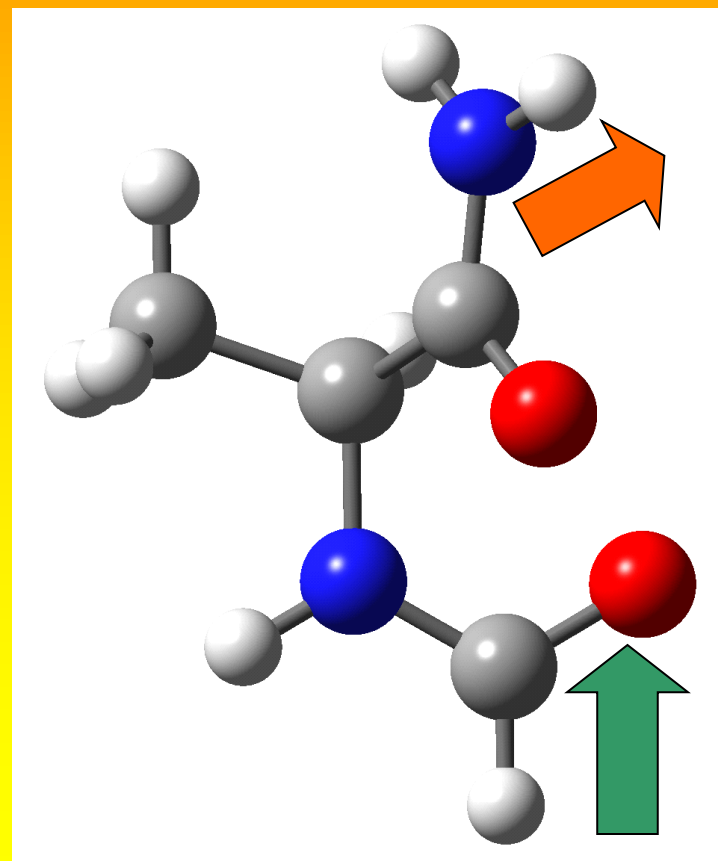
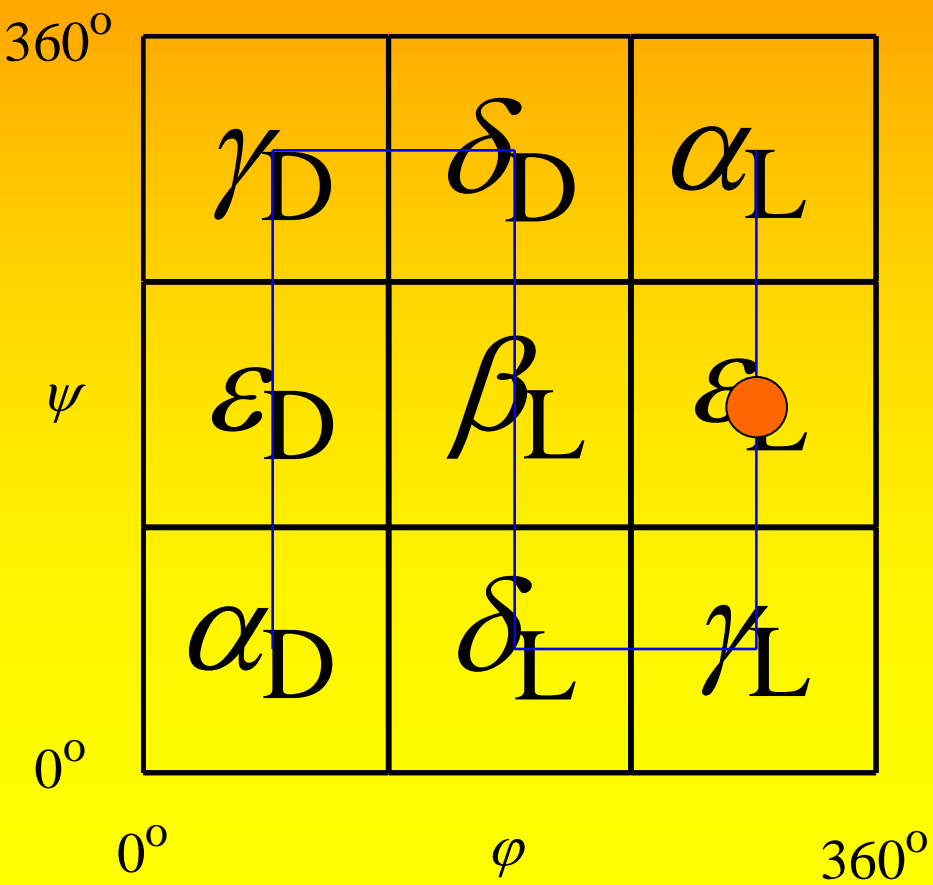
Tipikus fehérjeépítő-elem konformációk



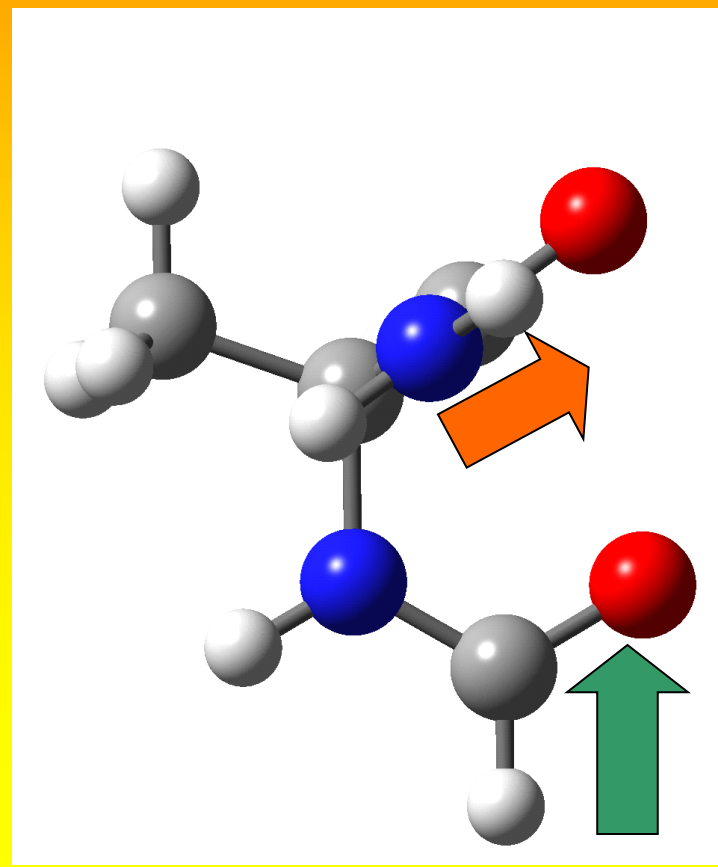
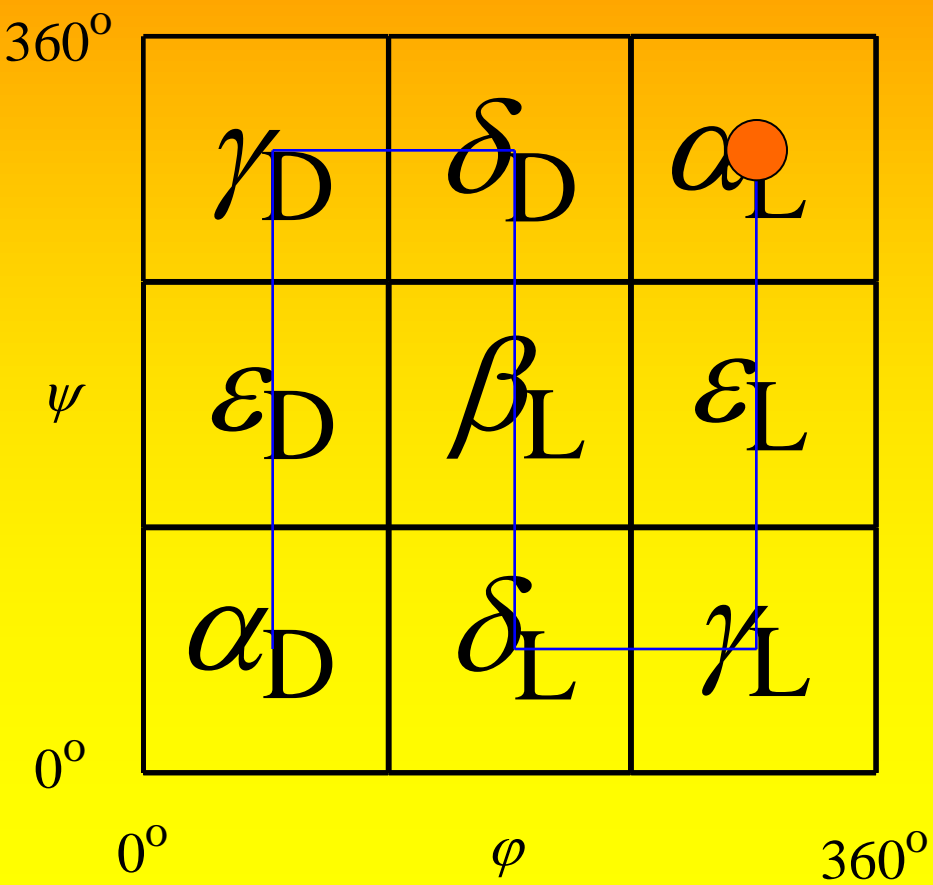
Tipikus fehérjeépítő-elem konformációk



Tipikus fehérjeépítő-elem konformációk



Tipikus fehérjeépítő-elem konformációk



Secondary structure of peptides and proteins:

- homo-conformers:

α -helix

β -pleated sheet

collagen helix

repeated inverse γ -turn

.

- hetero-conformers:

β -turn

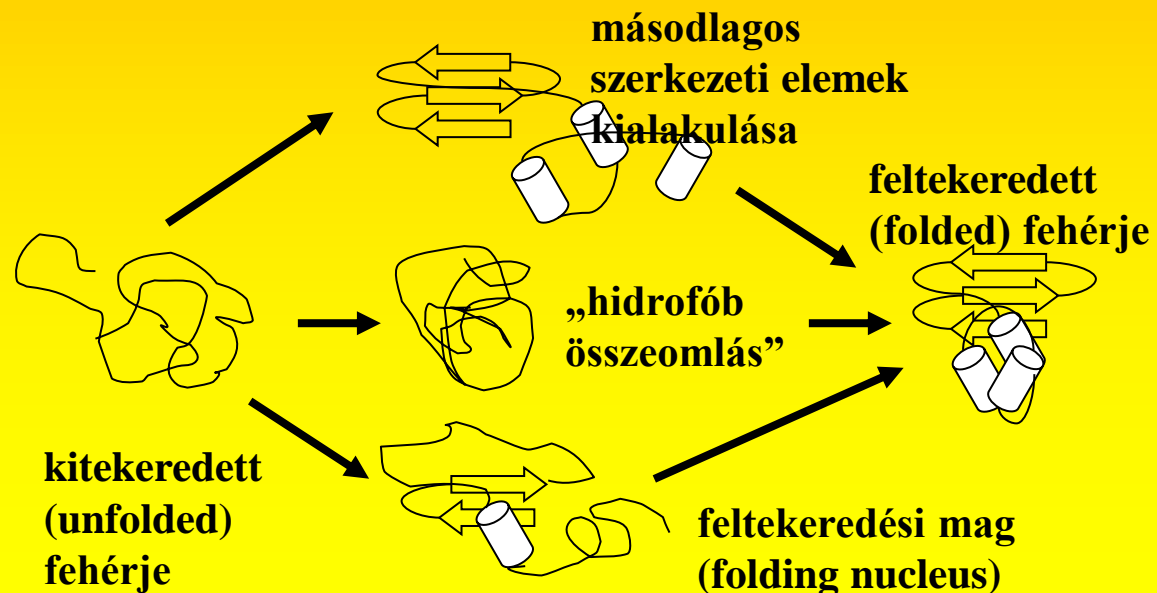
Peptidek és fehérjék másodlagos szerkezeti elmei

<i>deskripció</i>	<i>kód</i>	<i>alternatív kód</i>
jobbmenetű α -hélix	α_L	α_R
balmenetű α -hélix	α_D	α_L
β - redő	β_L	C5
inverz γ -kanyar	γ_L	C7 _{eq}
γ -kanyar	γ_D	C7 _{ax}
collagén hélix (polyProII)	ϵ_L	β
collagén hélix tükörképi párja	ϵ_D	α_D
	δ_L	β_2
	δ_D	α'

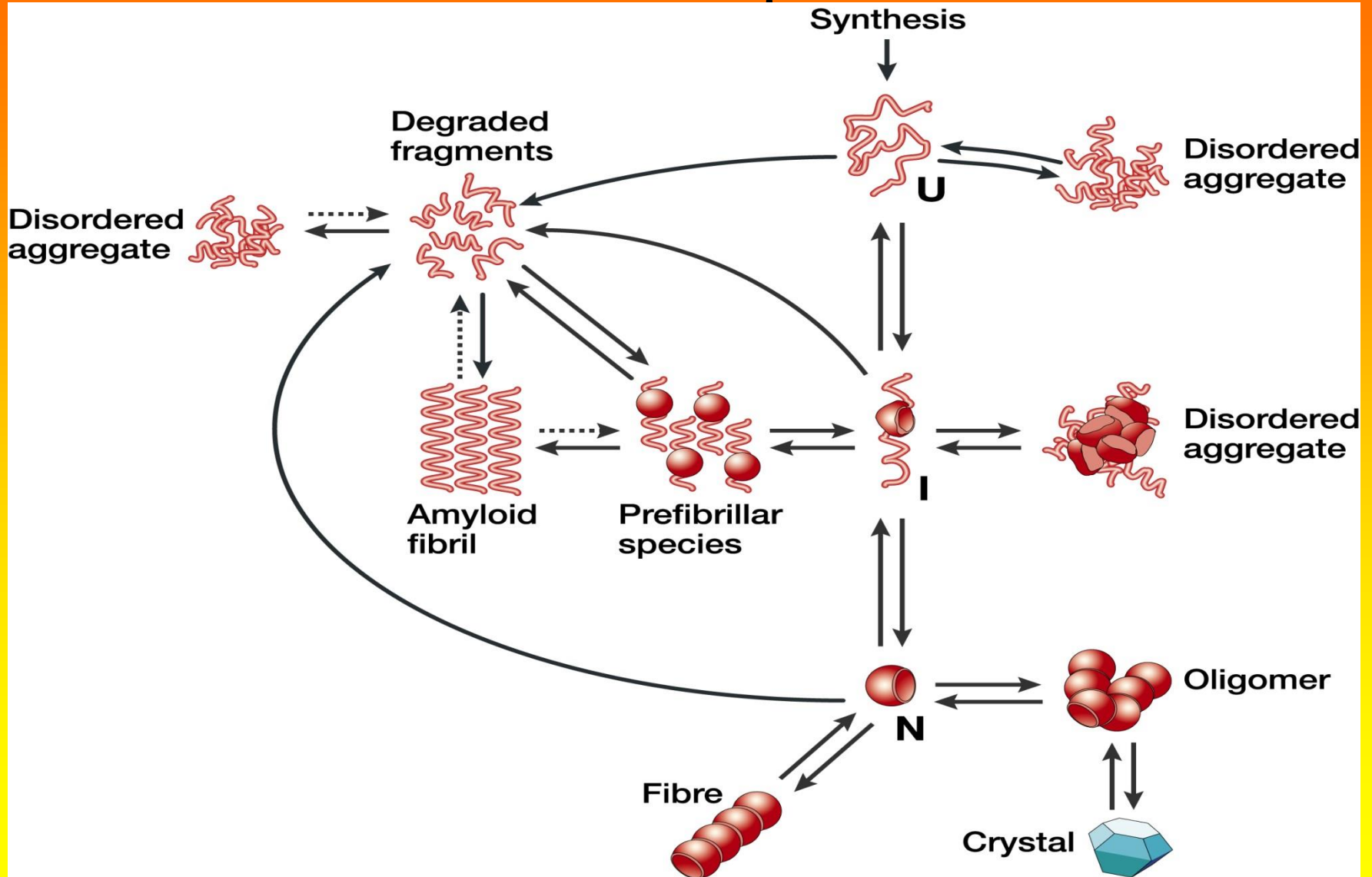
A fehérjék feltekeredése

A szerkezeti biokémia „dogmája”

- Általánosan elfogadott, hogy az aminosavszekvencia meghatározza a térszerkezetet
- Bizonyíték: denaturációs-renaturációs kísérletek (Anfinsen)
- A fehérje natív térszerkezete az esetek túlnyomó többségében a globális energiaminimumnak felel meg
- **Hogyan „találja meg” a fehérje a natív térszerkezetet?**
- *Levinthal-paradoxon*:
 - egy polipeptidlánc lehetséges konformációs állapotainak száma csillagászati (100 aminosav, 9 gerinckonformer/aminosav: $9^{100} \approx 2.6 \times 10^{95}$)
 - Az ismert fehérjék néhány másodperc (vagy rövidebb idő) alatt feltekerednek: nincs idő a lehetséges téralkatok töredékének kipróbálására sem (világegyetem kora $< 10^{18}$ s)
- A feltekeredés adott útvonalon (útvonalakon) zajlik, lényeges a lokális kölcsönhatások és az azok révén kialakuló szerkezeti „magok” szerepe
- **Alapvető feltekeredési modellek:**



A polipeptidlánc számára akár több konformációs állapot is elérhető



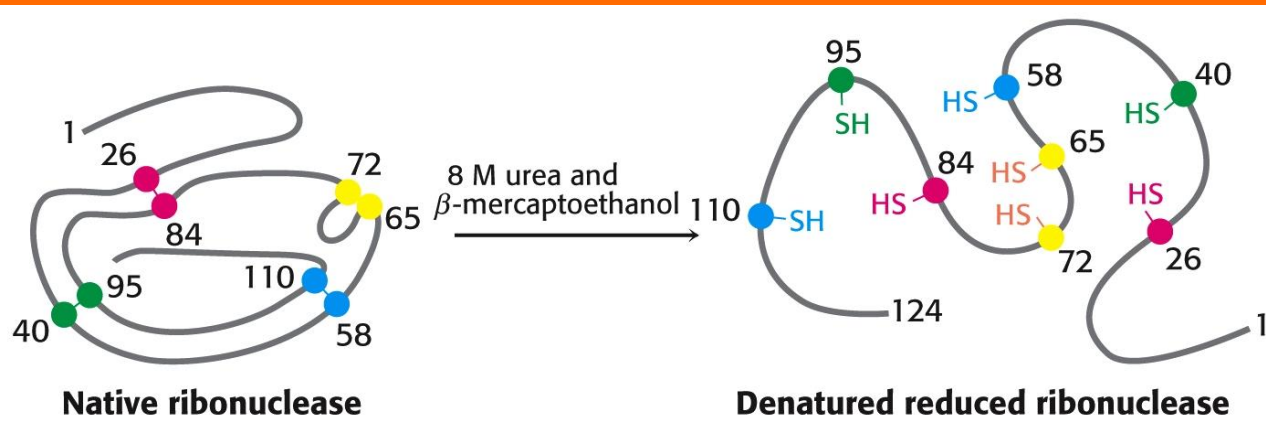
A ribonukleáz redukciója és denaturálódása



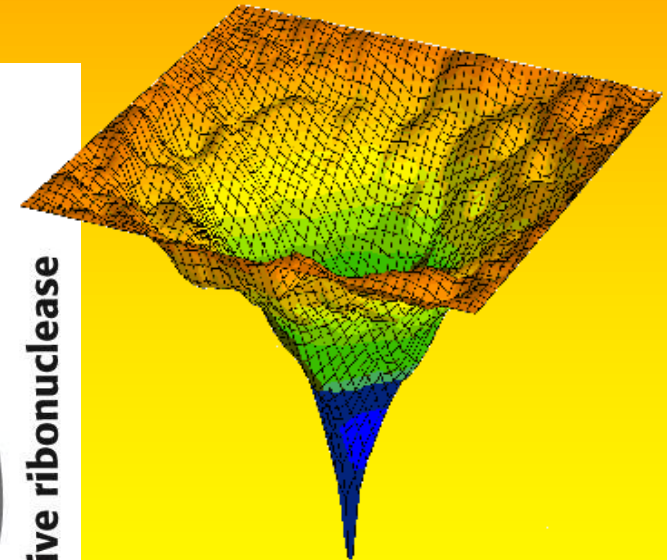
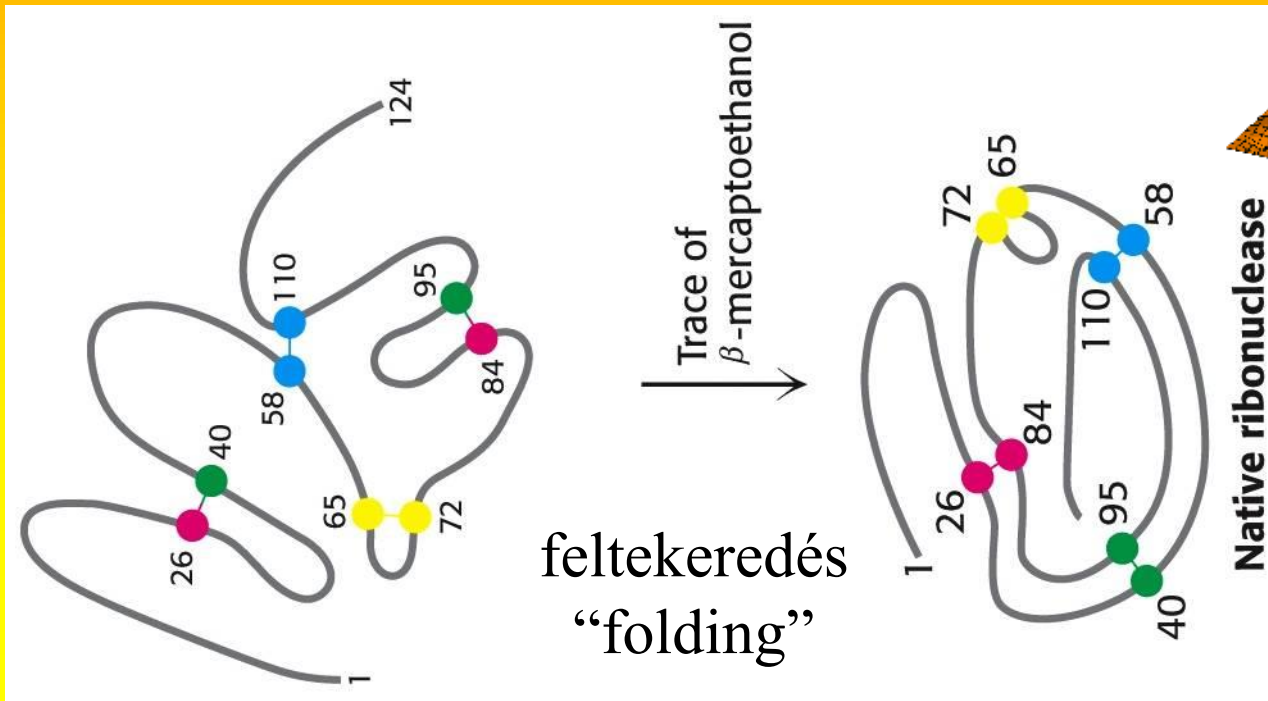
Christian B. Anfinsen

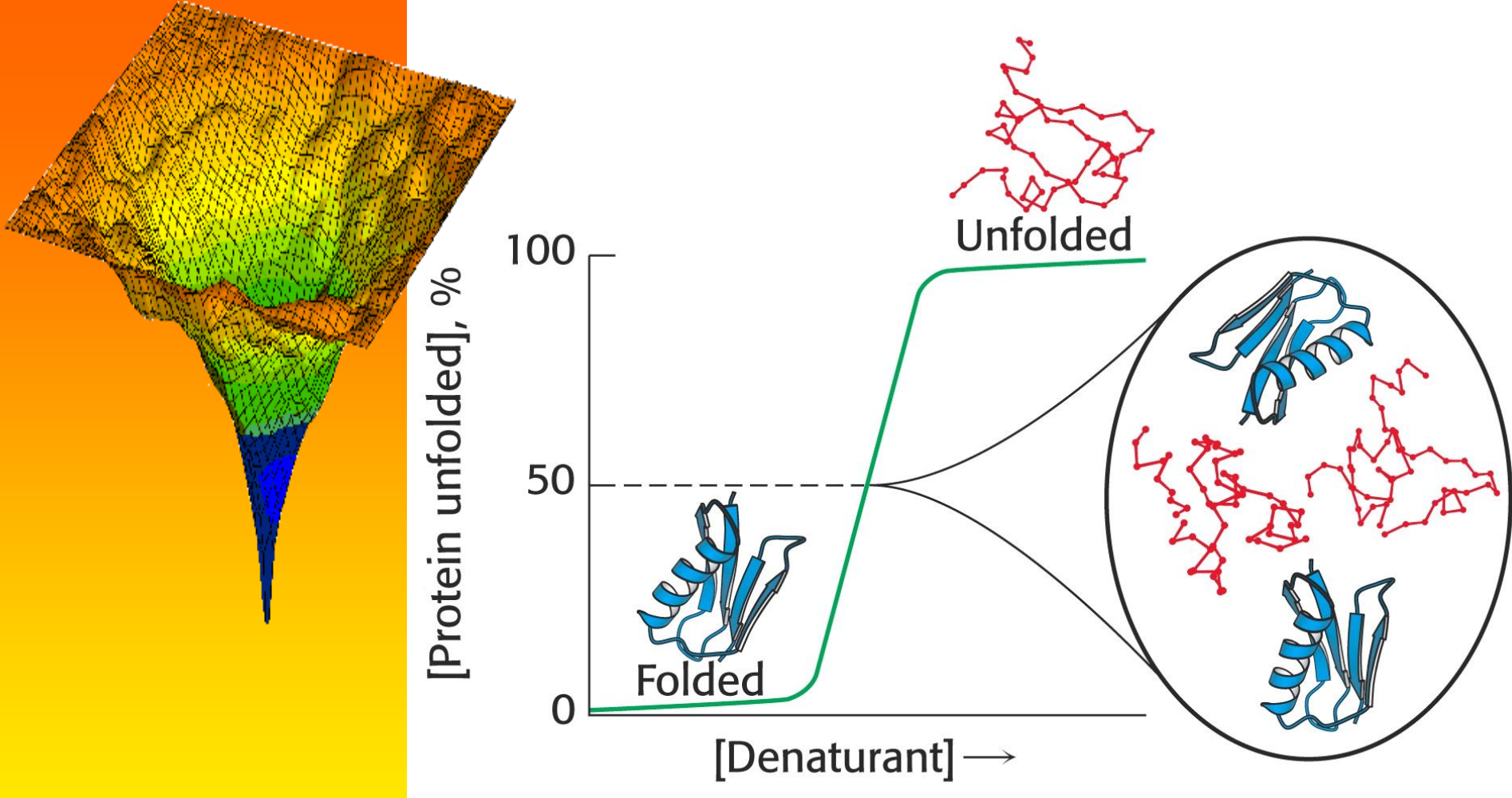
1972 Nobel-díj

Ribonukleáz feltekeredése



A ribonukleáz renaturálódása





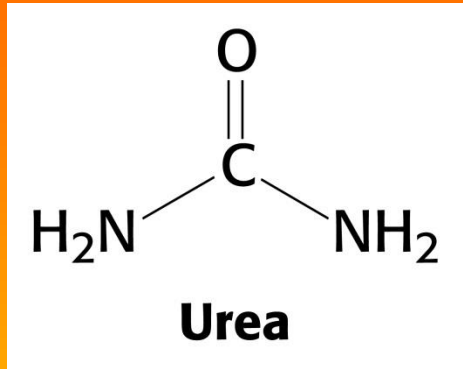
definíció: 50%-os feltekeredés:

amikor a molekulák fele feltekeredett, ám a másik fele kitekeredett marad.

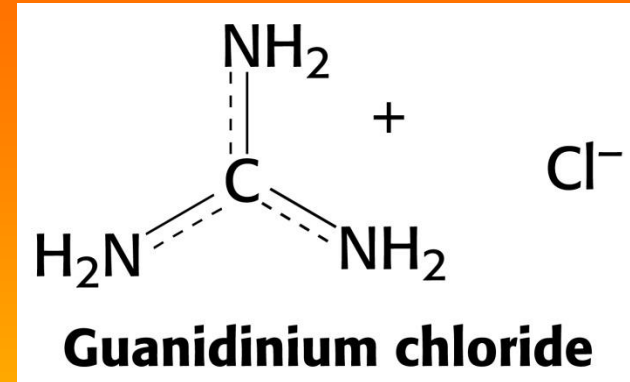
memo: nincs félig feltekeredés!!!

Kaotróp molekulák

LiClO_4
4,5 mol

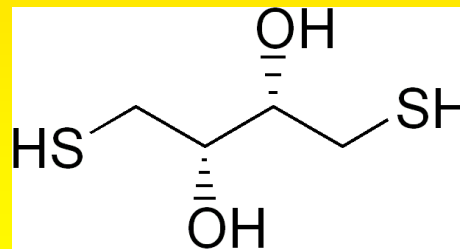
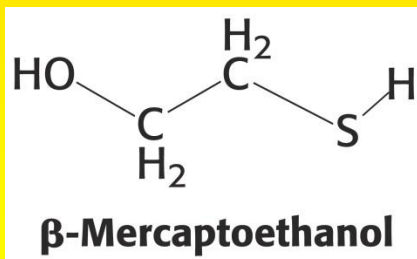


6–8 mol



6 mol

Diszulfidhidak elbontása



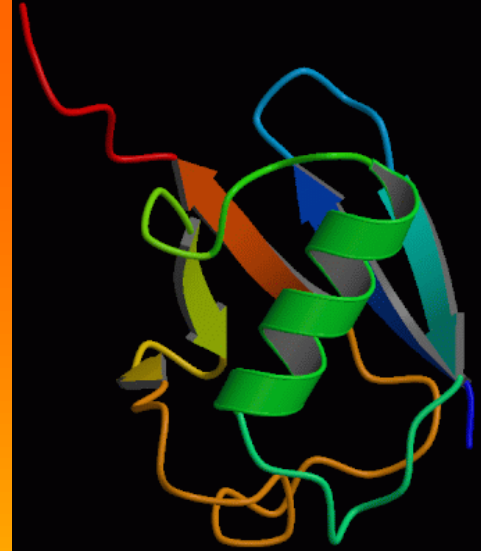
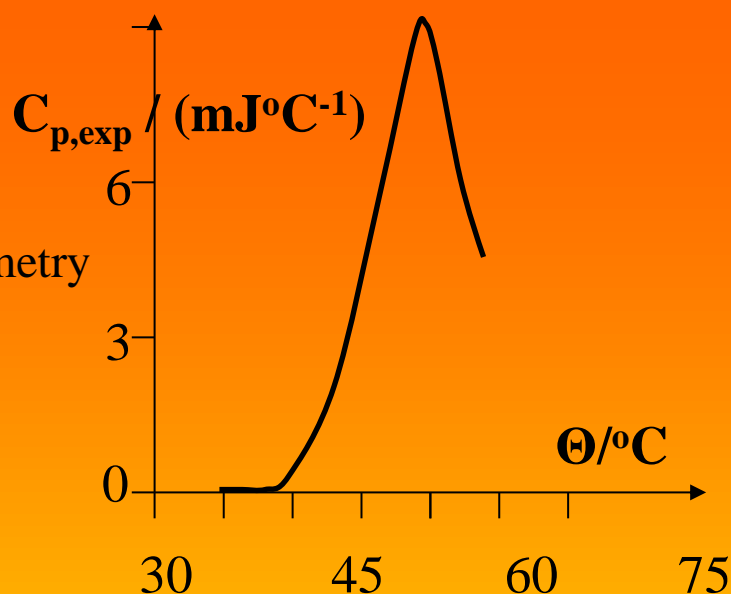
DTT, ditiotreitól

$\text{CH}_3\text{CO}_3\text{H}$

Az Ubiquitin (76 as., 8,5kDa) termodenaturálása:

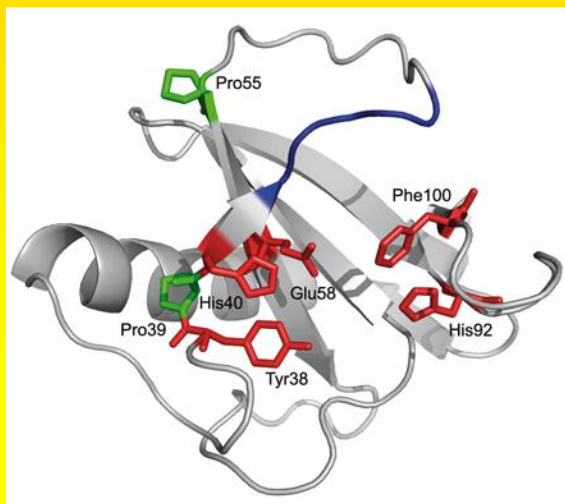
DSC: Differential Scanning Calorimetry

$$T_m \approx 55^\circ\text{C}$$

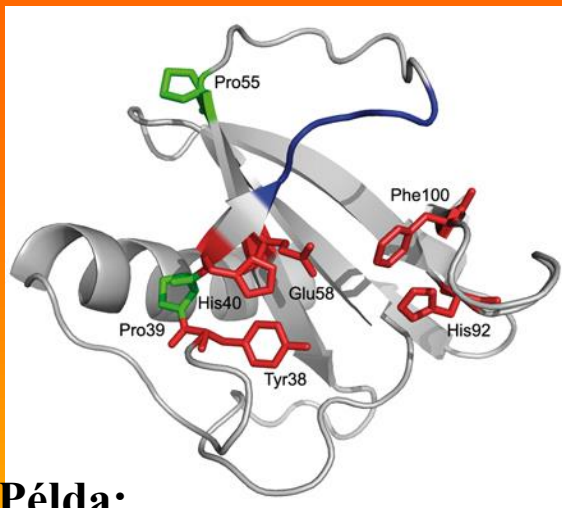


Az Ubiquitin DSC termogram görbéje alapján a fehérje 45 $^\circ\text{C}$ alatt megtartja natív téralkatát, aztán endotermikus konformáció változáson megy át.

T_m , olvadáspont (olvadási hőmérséklet, melting temperature) az a hőmérséklet ahol egy adott nyomáson a folyadék és a szilárd fázis egyensúlyban van.



Ribonukleáz T_1 $T_m = 320\text{K}$. $\text{pH}=7$ és $T=298\text{K}$ a fehérje letekeredéshez szükséges ΔG mindössze $22.5 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ ami alig több mint egy H-híd ($\Delta G \approx 20 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$). Hogy lehet ez, amikor ugyanez a fehérje tele van α -hélixsel és β -redővel, amely egy sor H-hidat tartalmaz?



Ribonukleáz T₁ T_m = 320K. pH=7 és T=298K a fehérje letekeredéshez szükséges ΔG mindössze 22.5 kJ.mol⁻¹ ami alig több mint egy H-híd ($\Delta G \approx 20$ kJmol⁻¹).

Kérdés: Hogy lehet ez, amikor ugyanez a fehérje tele van α -hélixsel és β -redővel, amely egy sor H-hidat tartalmaz?

Atkins de Paula 118

Példa:

Becsüljük meg a ΔH -t:

~ 4 menet hélix $\rightarrow 3.6 \cdot 4 \rightarrow \sim 15$ a.s $\rightarrow \sim 12$ H-híd $\rightarrow \sim 12 \cdot 2 = \mathbf{24}$ kcal.mol⁻¹

~ 3 hosszabb β -redő $\rightarrow 3 \cdot 8 \rightarrow \sim 24$ a.s $\rightarrow \sim 22$ H-híd $\rightarrow \sim 22 \cdot 2 = \mathbf{44}$ kcal.mol⁻¹

$$\Sigma \Delta H > \mathbf{68} \text{ kcal.mol}^{-1}$$

Becsüljük meg a ΔS -t:

1) Legyen a fehérje letekeredett állapotában minden as.-nek 3 lehetséges és egyforma valószínűséggel megjelenő bb. konformere. Ekkor $S = R \ln(3^{100})$.

2) Ha feltekeredik egy 5-ös peptid rész (pl. turn) és annak már csak 1 lehetséges konformere van, akkor $S = R \ln(3^95)$ már csak. (A változás $R \ln(3^5)$ ami szoba hőn (T=25°C) ~ 3.2 kcal.mol⁻¹.

3) Ha az egész feltekeredik akkor az $S \sim 20 \cdot 3.2 = \mathbf{64}$ kcal.mol⁻¹

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S = \mathbf{68} - \mathbf{64} = 4 \text{ kcal.mol}^{-1}$$

Eszközök és lehetőségek

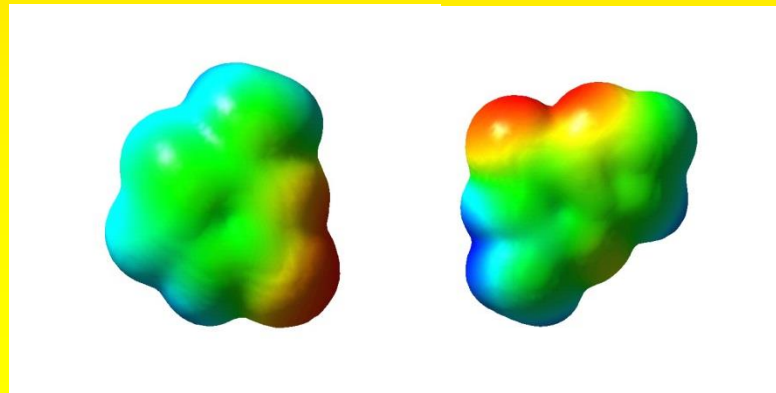
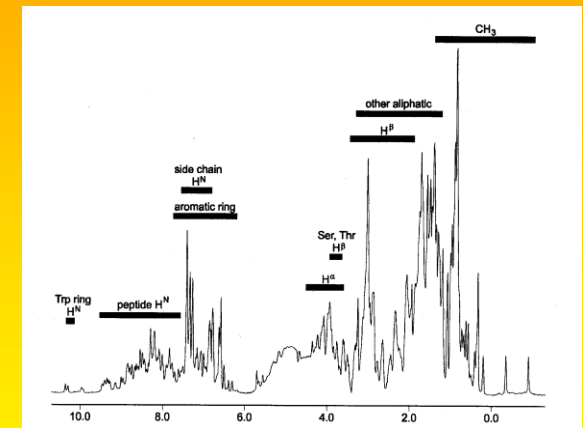
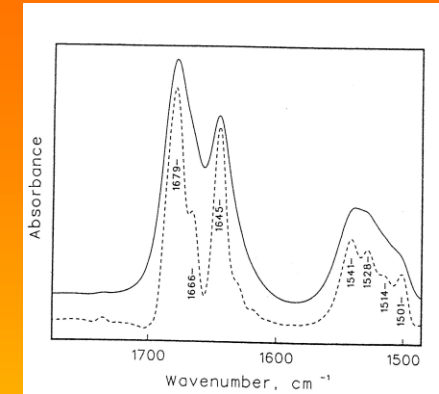
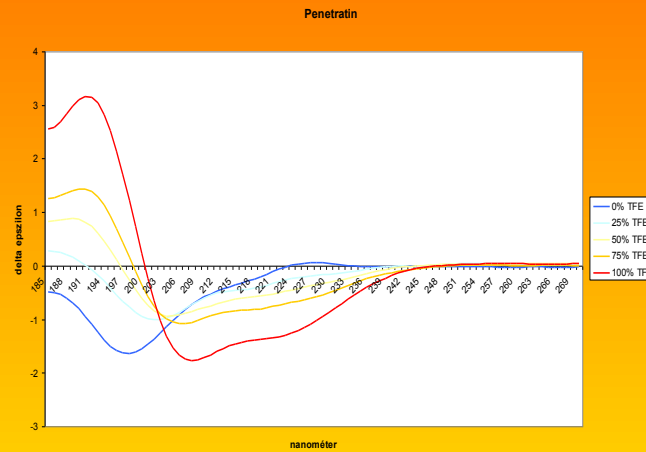
IR-

CD (UV)

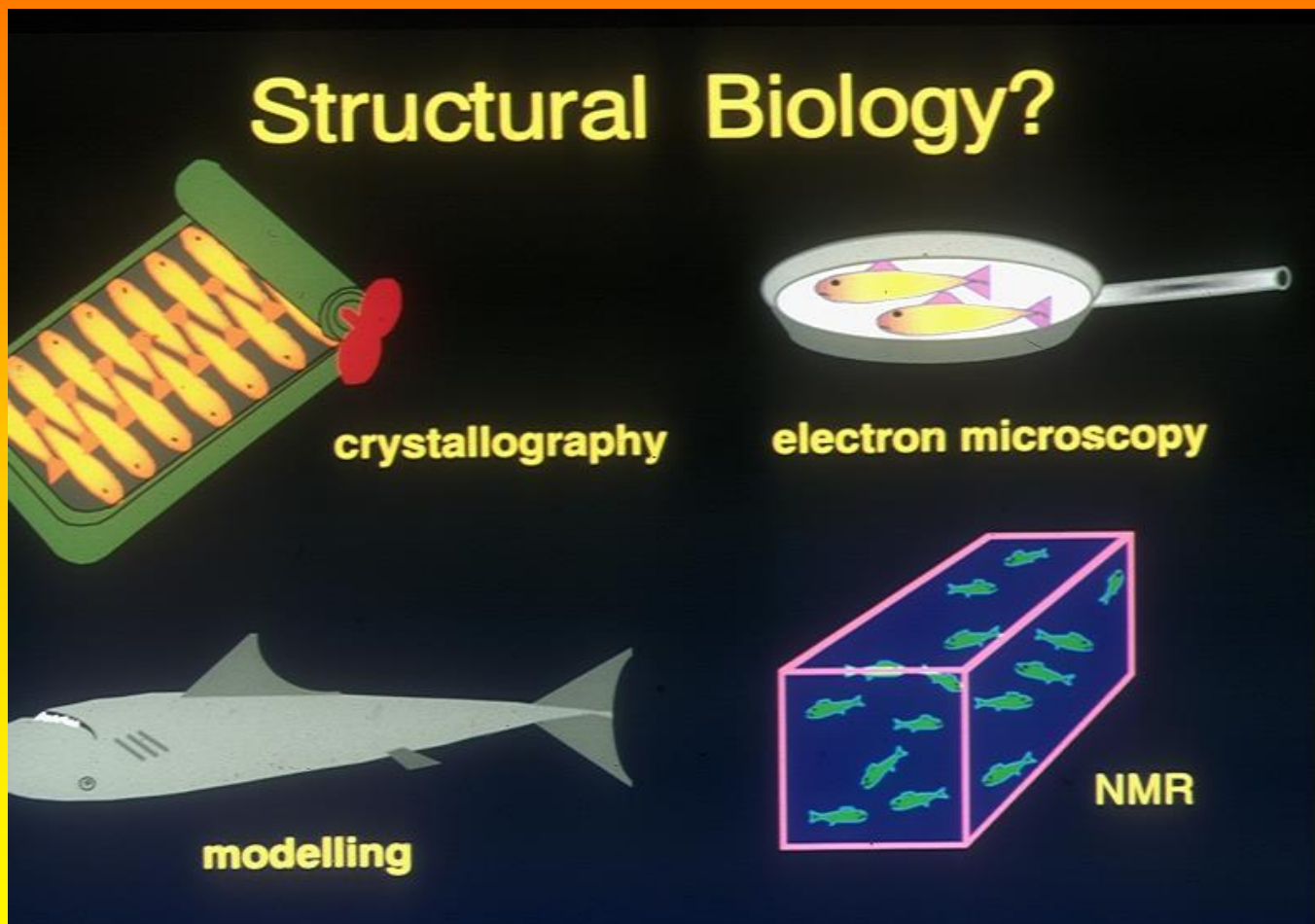
NMR-

Röntgen

In silico



A módszer okozta “tórzulások”



Hogyan ismerhető meg atomi szinten a peptid- és fehérjéterszerkezet?

