

Нивои на структурна организација на протеини. Кватернерна структура

АДАПТИРАНО СПОРЕД

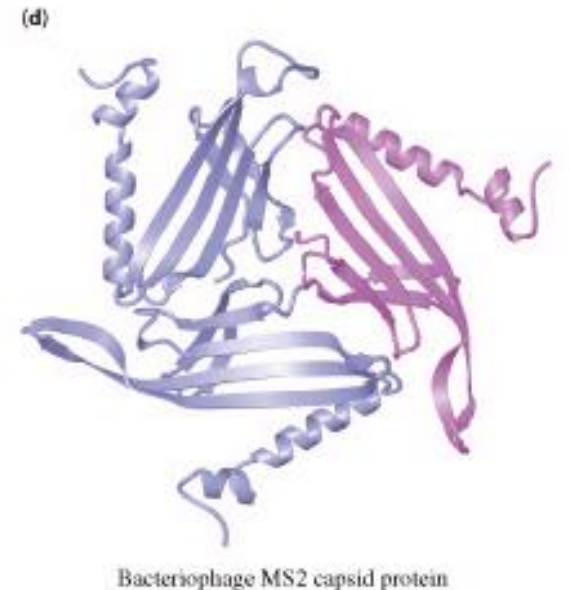
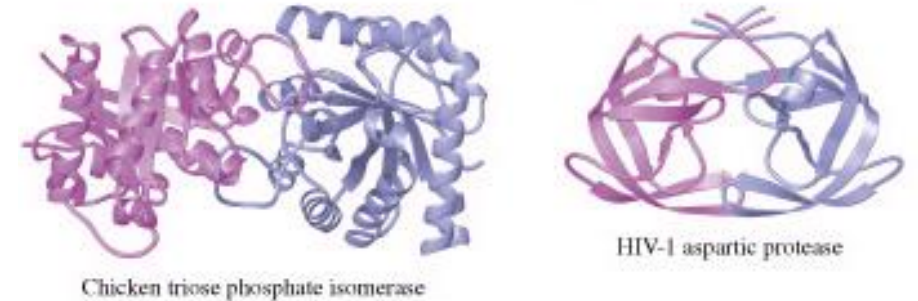
ЛЕНИНЏЕР ПРИНЦИПИ НА БИОХЕМИЈАТА , ДЕЈВИД НЕЛСОН, МАЈЛК КОКС

доц. д-р Наташа Ристовска, Институт за хемија, ПМФ-Скопје

Кватернерна структура

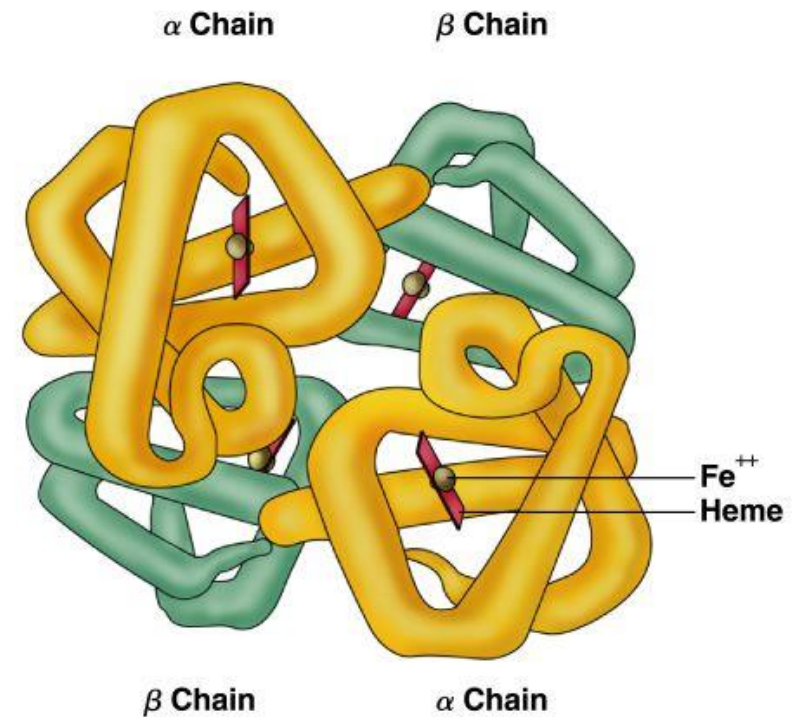
Класификација на протеини според кватернерна структура

- ▶ Кватернерната структура (4°) ја опишува организацијата на две или повеќе подединици (субединици) во протеинот.
- ▶ **Мономерни протеини**: изградени од една полипептидна низа.
- ▶ **Олигомерни протеини**: изградени од неколку полипептидни низи.
- ▶ **Мултимерни протеини**: изградени од повеќе полипептидни низи, наречени подединици (мономери).
- ▶ Мултимерите може да бидат: **хомомултимери** или **хетеромултимери**.



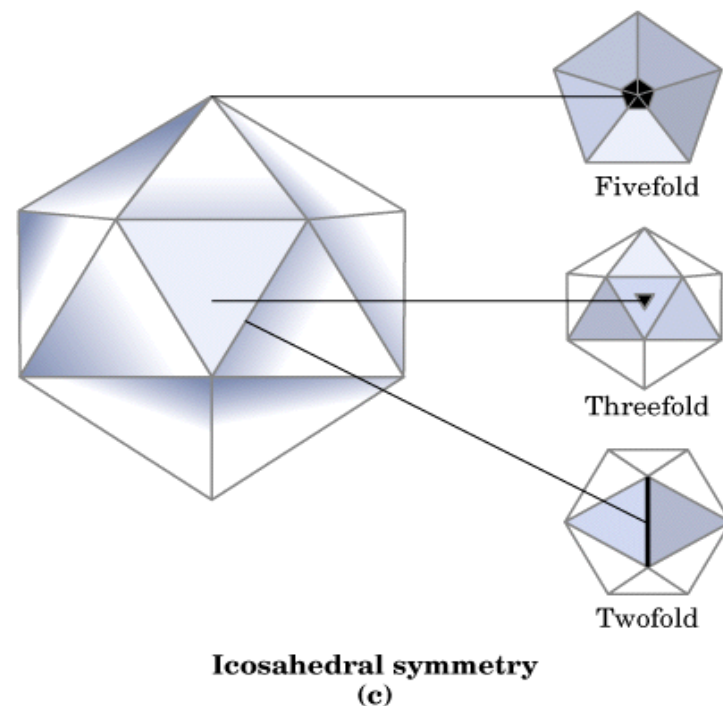
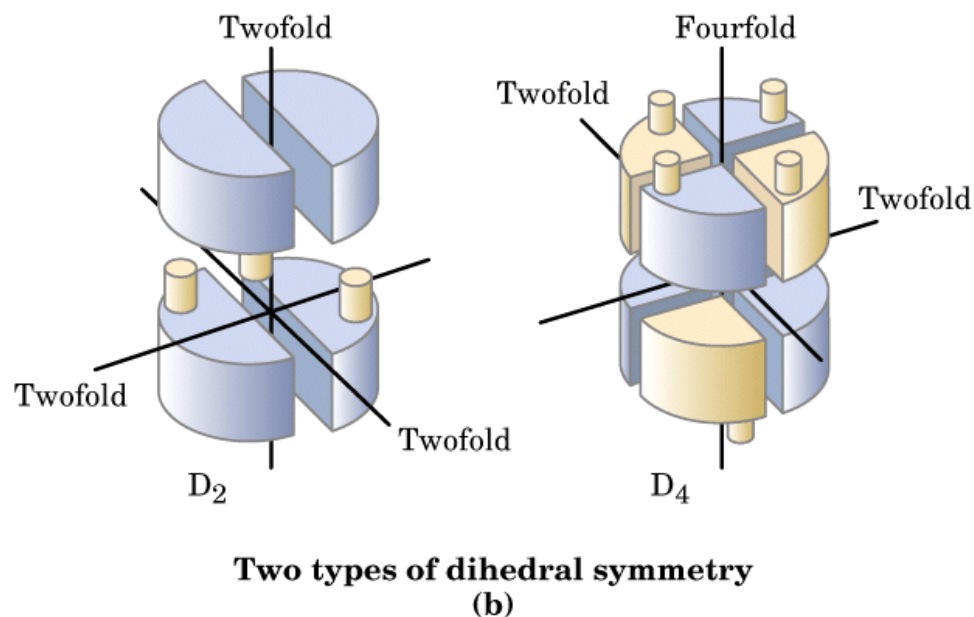
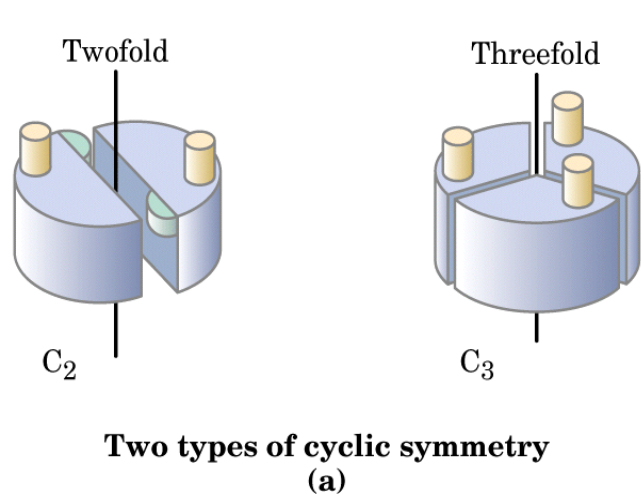
Протомери

- ▶ Секоја подединица има сопствена терцијарна структура (низите се означуваат со грчки букви α , β).
- ▶ Субединиците меѓусебе се сврзани нековалентно.
- ▶ Структурните единици на мултимерот кои се **идентични или неидентични подединици со периодични групи и симетричен распоред**, се нарекуваат **протомери** (пр димер $\alpha\beta$ -протомер).



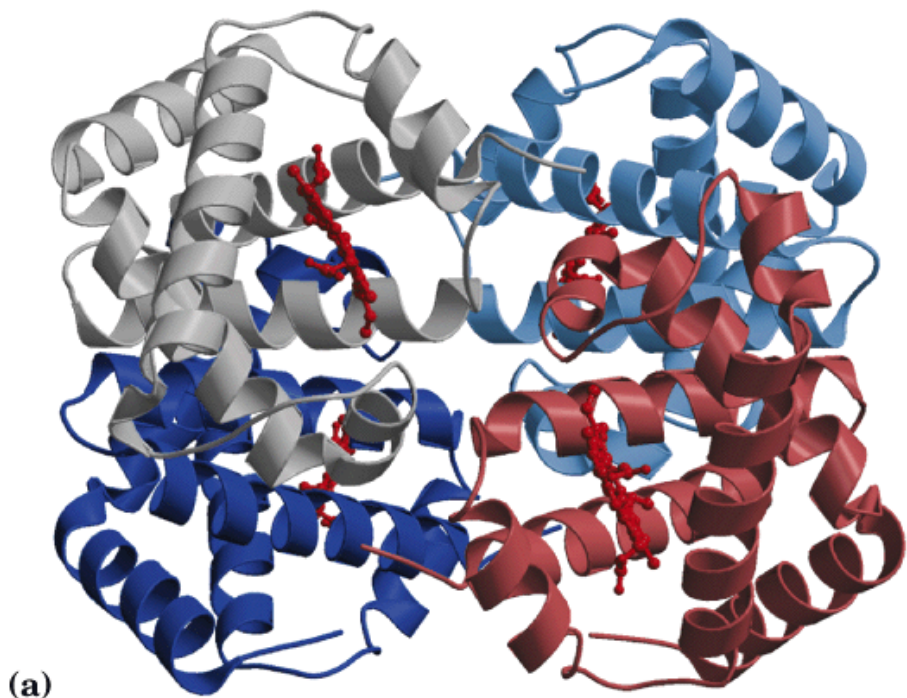
Сврзување на протомери

- ▶ Протомерите најчесто се сврзани со ротациона или спирална симетрија.
- ▶ Постојат повеќе форми на ротациона симетрија: циклична (една оска на ротација), диедарска, икосаедарска и др.



Хемоглобин – пример
за кватернерна
структура на протеини

Структура на хемоглобин



- ▶ Прв олигомерен протеин со решена 3D структура.
- ▶ Хемоглобинот (Hb) е изграден од протеински дел (**глобин**) и 4 простетични групи – **хем**.
- ▶ Глобинот содржи **4 полипептидни низи**: две α - (141) и две β -низи (146 аминокиселински остатоци). Хемоглобинот е тетрамер.
- ▶ Двете низи имаат слични тридимензионални структури поради сличните аминокиселински секвенци (**совпаѓање на 27 позиции**).
- ▶ Подединците се распоредени во симетрични парови. Хемоглобинот е **димер од $\alpha\beta$ -протомери**, со циклична C_2 симетрија.

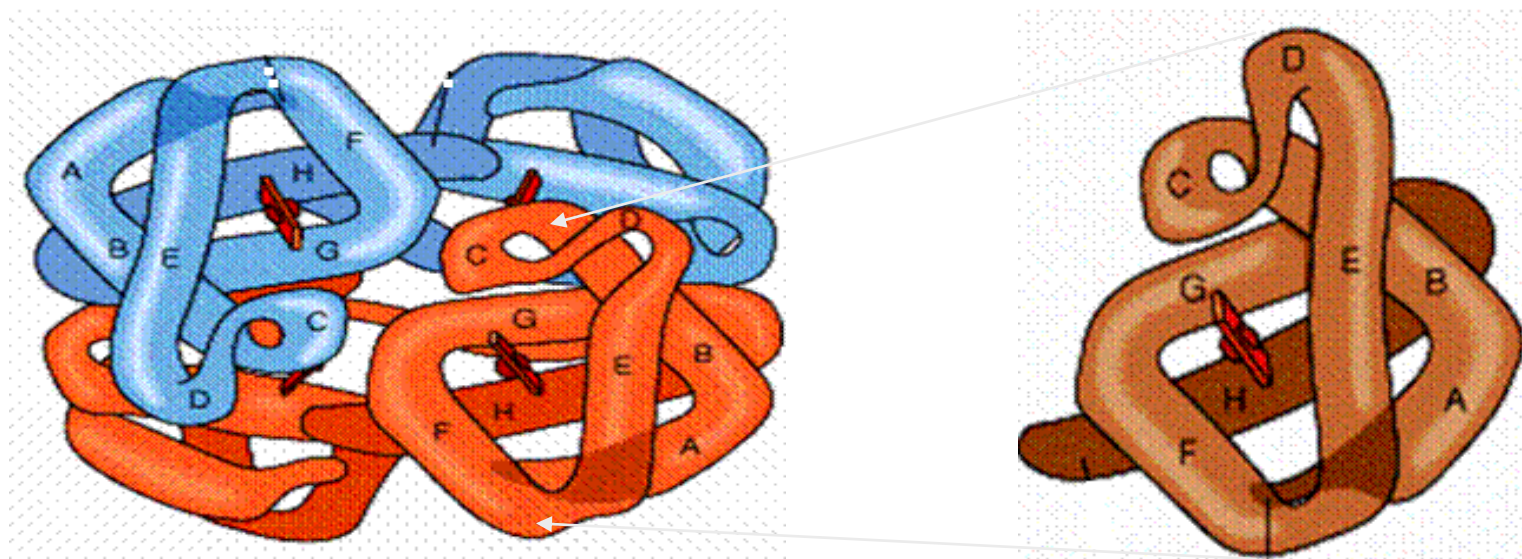
Функција на хемоглобин



(a) 2 μm

- ▶ Од матичните клетки – хемцитобласти се формираат еритроцити (биконкавни дискови со дијаметар од 6 до 9 μm.
- ▶ Главна функција е да го пренесуваат хемоглобинот растворен во цитосолот (до 34%)
- ▶ Хемоглобинот има повеќе подединици и места за сврзување на кислородот од миоглобинот.
- ▶ Хемоглобинот има функција **да го сврзува и транспортира кислородот**.
- ▶ Хемоглобинот **ги пренесува** двата крајни продукти на клеточна респирација **H⁺ и CO₂**.

Сличност со структурата на миоглобин



- ▶ Тридимензионалните структури на двете подединици на хемоглобин и полипептидната низа на миоглобин се многу слични: изградени се од 8 алфа спирали и непротеински дел - хем.
- ▶ Сите три полипептиди се членови на глобинското семејство.
- ▶ Покажуваат сличност во 27 позиции.



	Mb	Hb α	Hb β
NA1	1V	1V	1V
	—	—	H
	L	L	L
A1	---S	S	T---
	E	P	P
	G	A	E
	E	D	E
	W	K	K
	Q	T	S
	L	N	A
	V	V	V
	L	K	T
	H	A	A
	V	A	L
	W	W	W
	A	G	G
	K	K	K
	V	V	V
A16	---E	G	---
	A	A	—
B1	--20D	20H	N---
	V	A	20V
	A	G	D
	G	E	E
	H	Y	V
	G	G	G
	Q	A	G
	D	E	E
	I	A	A
	L	L	L
	I	E	G
	R	R	R
	L	M	L
	F	F	V
B16	---S	S	V---
	:	:	:
	:	:	:

	Mb	Hb α	Hb β
	K	A	A
	K	H	H
	K	V	L
80G	D	D	D
	H	D	80N
	H	M	L
	E	P	K
	A	N	G
	E	A	T
F1	---L	80L	F---
	K	S	A
	P	A	T
	L	L	L
	A	S	S
	Q	D	E
	S	L	L
Proximal His F8	H	H	H
F9	---A	A	C---
	T	H	D
	K	K	K
	H	L	L
	K	R	H
	I	V	V
G1	--100P	D	100P
	I	P	E
	K	V	N
	Y	N	F
	L	F	R
	E	K	L
	F	100L	L
	I	S	G
	S	H	N
	A	C	V
	I	L	V
	:	:	:
	:	:	:

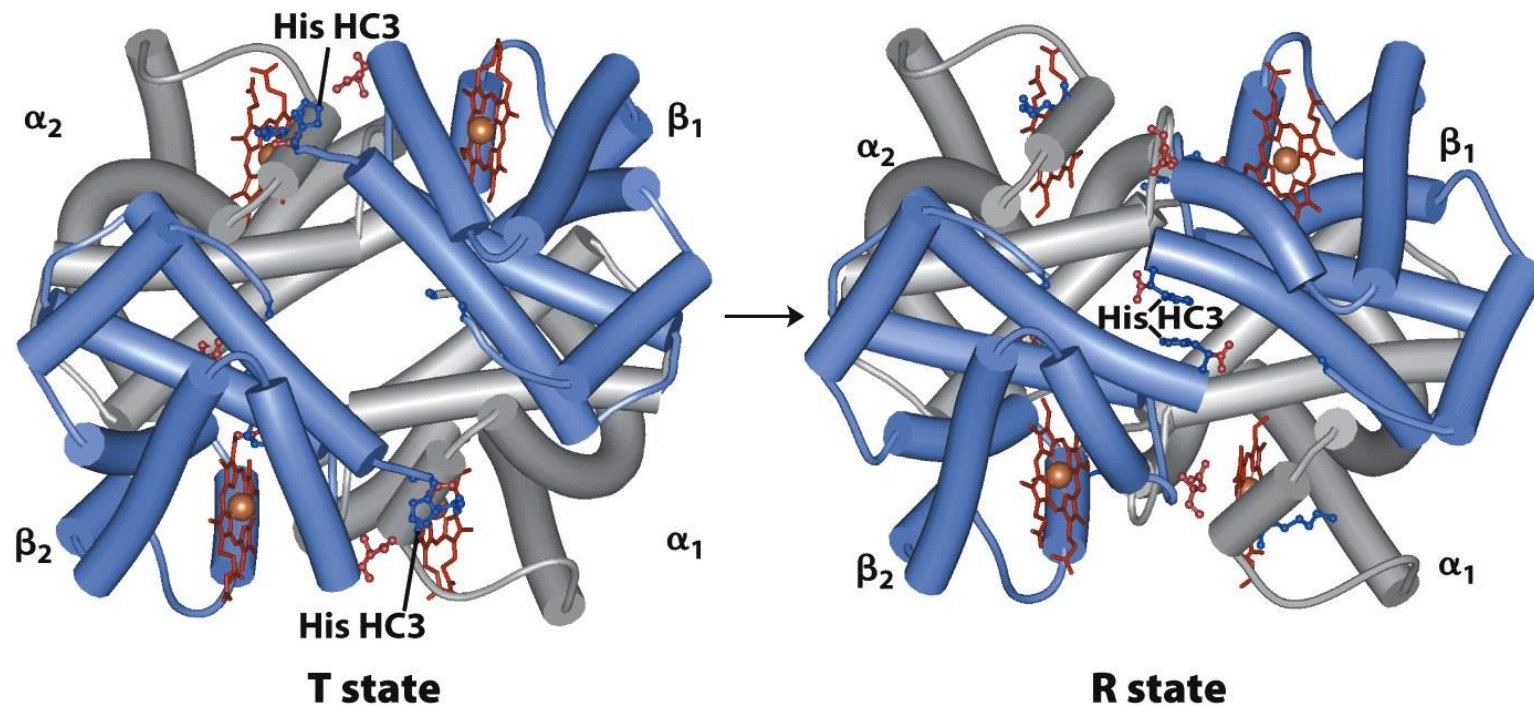
	:	:	:
C1	---H	F	Y---
	P	P	P
	E	T	W
	T	T	T
40L	E	40K	Q
	E	T	40R
C7	---K	Y	F---
	F	F	F
	D	P	E
	R	H	S
	F	F	F
	K	—	G
	H	D	D
	L	L	L
	K	S	S
D1	---T	H	T---
	E	—	P
	A	—	D
	E	—	A
	M	—	V
	K	—	M
D7	---A	G	G---
E1	---S	S	N---
	E	A	P
60D	L	Q	K
	L	V	60V
	K	K	K
	K	G	A
Distal His E7	H	H	H
	G	G	G
	V	60K	K
	V	K	K
	V	V	V
	L	A	L
	T	D	G
	A	A	A
	L	L	F
	G	T	S
	A	N	D
	I	A	G

	:	:	:
	H	V	C
	V	T	V
	L	L	L
	H	A	A
	S	A	H
G19	---R	H	H---
	H	L	F
120P	P	P	G
	G	A	120K
	D	E	E
	F	F	F
H1	---G	T	T---
	A	P	P
	D	120A	P
	A	V	V
	Q	H	Q
	G	A	A
	A	S	A
	M	L	Y
	N	D	Q
	K	K	K
	A	F	V
	L	L	V
	E	A	A
	L	S	G
	F	V	V
	R	S	A
140K	D	T	N
	I	L	L
	A	T	A
H21	---A	S	H---
	K	K	K
	Y	140Y	Y
	K	141R	146H
	E		
H26	---L		
	G		
	Y		
	Q		

H b α and Hb β only

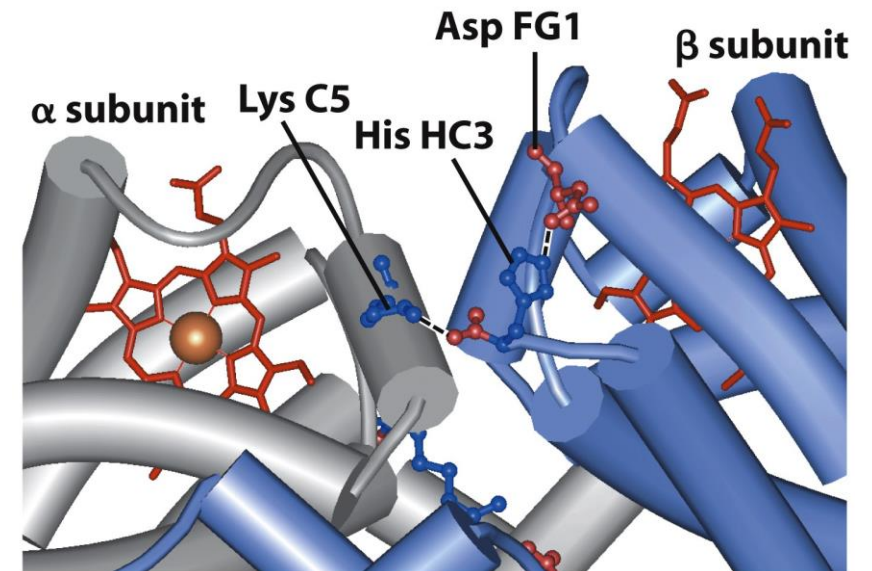
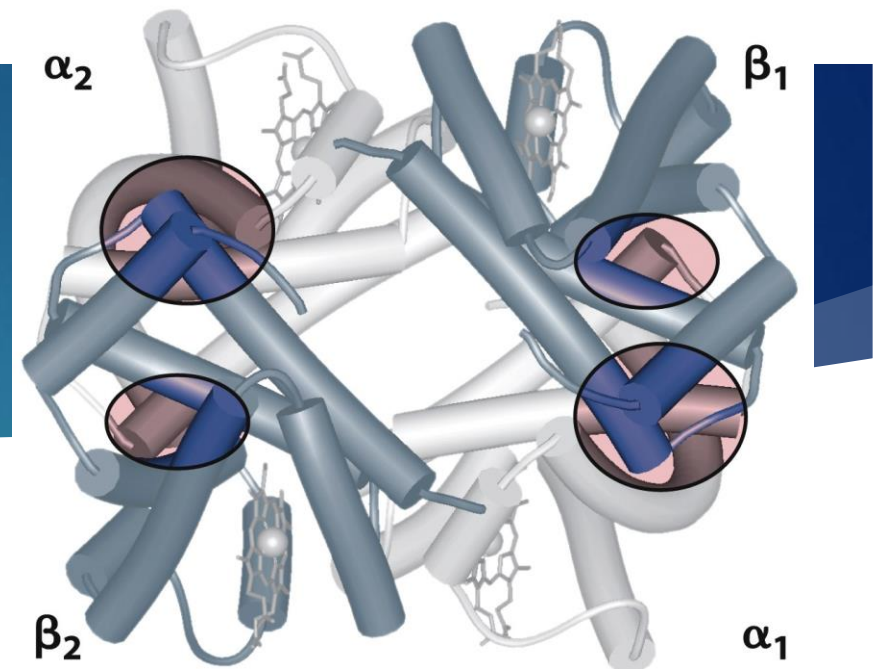
Структурни промени на Hb при сврзување на O₂

- Хемоглобинот сврзува кислород во двете конформации: R (relaxed) - опуштена и T (tense) - напрегната состојба.



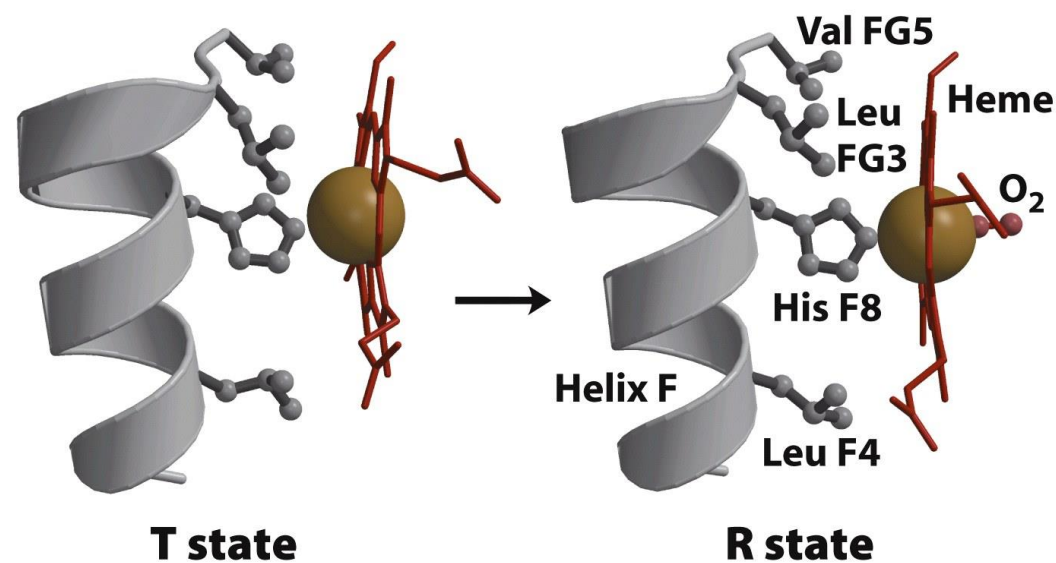
T конформација на хемоглобин

- ▶ При отсуство на O_2 постабилна е T конформацијата (деоксихемоглобин), која е стабилизирана со интеракции меѓу јонски парови на $\alpha_1\beta_2$ и $\alpha_2\beta_1$.
- ▶ T состојбата на деоксихемоглобин е стабилизирана со интеракциите меѓу His HC3 и Asp FG1 од β подединицата, како и Lys C5 од α подединицата и карбоксилната група на His H3 која е C-крај на подединицата β .

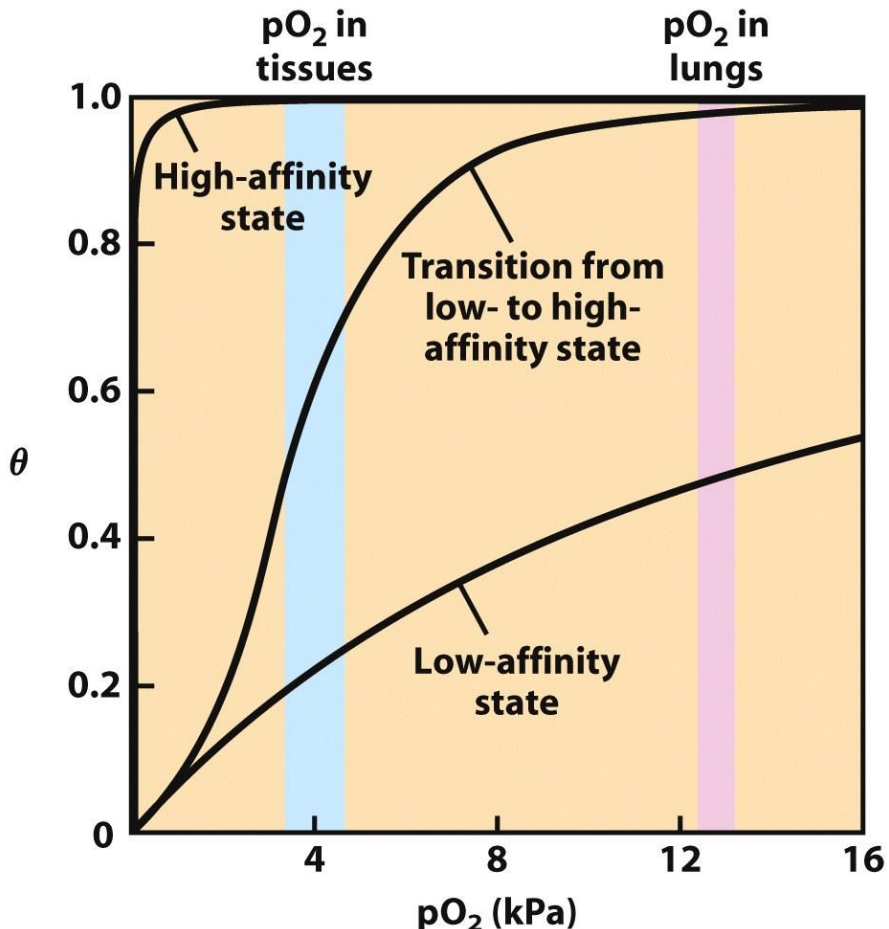


Структурни промени на хемоглобин

- ▶ При сврзување на O_2 во Т конформацијата на Hb се раскинуваат некои од врските меѓу јонските парови, што предизвикува промена во R конформација (промена на положбата на His HC3 и стеснување на џебот меѓу β подединиците).
- ▶ Според Макс Перутц преминот $T \rightarrow R$ е поттикнат од промената на положбите на аминокиселинските остатоци околу хемот.
- ▶ Во R состојба, хемот завзема попланарна конформација, се менува местоположбата на проксималниот His и сврзаниот F хеликс.
- ▶ Лигандот (O_2) има поголем афинитет за сврзување со R конформацијата.



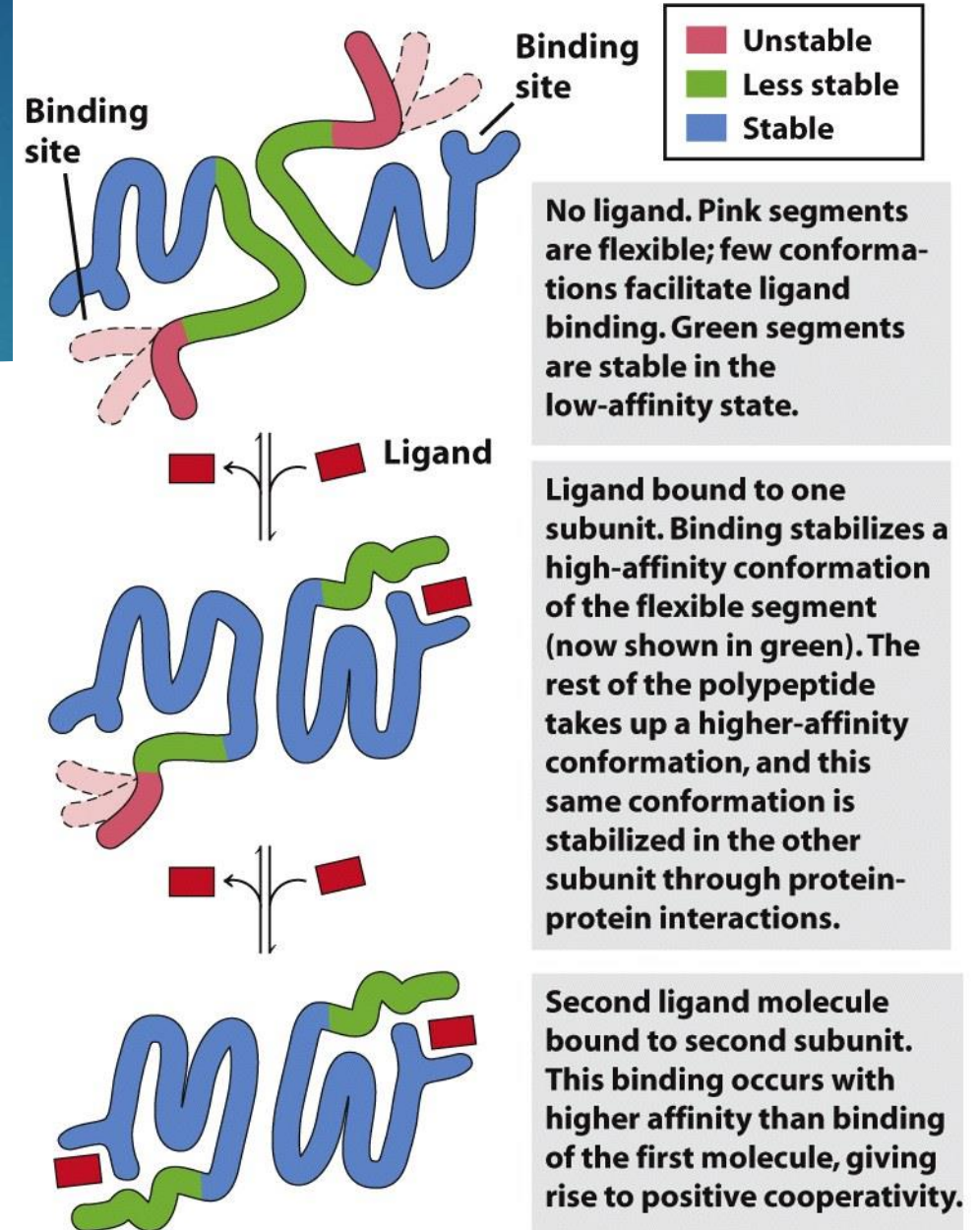
Кооперативно сврзување на O_2



- ▶ Протеинот со висок афинитет за сврзување на O_2 во белите дробови нема да испушти многу од сврзаниот кислород во ткивата.
- ▶ Протеинот со доволно низок афинитет на сврзување на O_2 за да го испушти во ткивата, не сврзува многу кислород во белите дробови.
- ▶ Решение: **Хемоглобинот покажува хибридна S-крива или сигмоидна крива.**
- ▶ Се добива како **последица на кооперативно сврзување**: сврзувањето на O_2 за одделна подединица на Hb го менува афинитетот за сврзување кај соседните подединици.

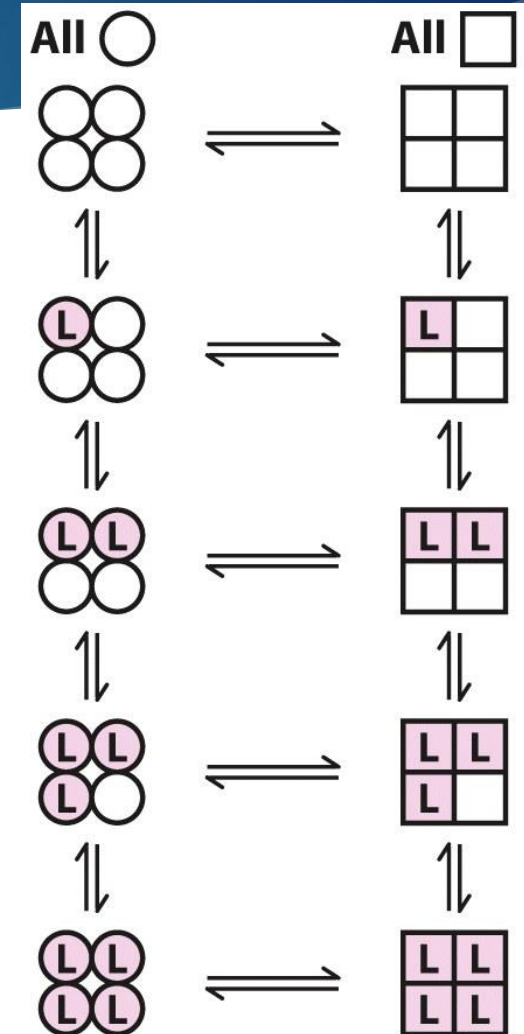
Алостерија

- ▶ Кооперативното сврзување на лигандот O_2 за мултимерниот протеин хемоглобин, претставува форма на алостеричко поврзување.
- ▶ **Сврзувањето на еден лиганд** (O_2 – хомотропен модулатор за активирање) **влијае врз афинитетот на останатите слободни места за сврзување.**

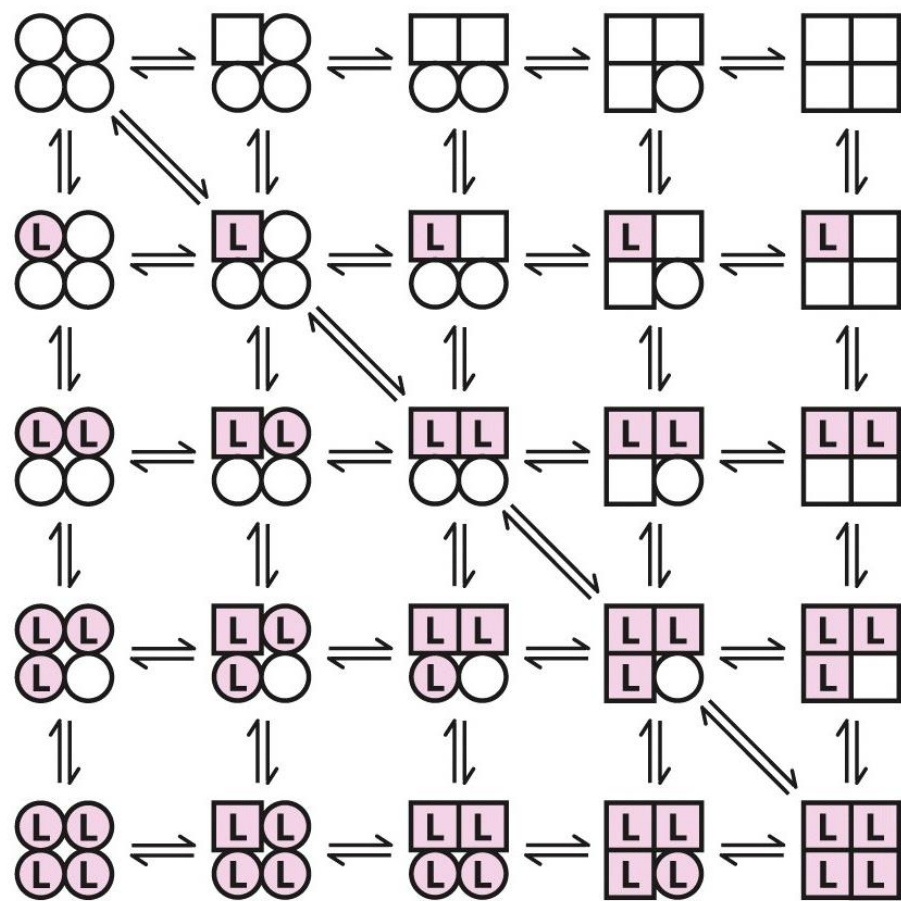


Механизам на кооперативно сврзување

- ▶ Механизмот за кооперативно сврзување на O_2 за хемоглобин се објаснува со помош на два модели:
 - ▶ MWC (Monod, Wyman, Changeux) – **усогласен модел**
 - ▶ **Последователен** (секвенцијален) модел.
- ▶ Според усогласениот модел:
 - ▶ Подединиците во протеинот се функционално идентични и немаат различни конформации.
 - ▶ Сите подединиците истовремено преминуваат од една во друга конформација (рамнотежа).
 - ▶ Лигандот се сврзува со различен афинитет за било која конформација, со што се олеснува преминот во конформација со повисок афинитет.



Последователен (секвенционен) модел



- ▶ Сврзувањето на лигандот може да предизвика промена на конформацијата на секоја поединечна подединица.
- ▶ Конформационата промена на една подединица предизвикува слична промена на соседната подединица.
- ▶ Постојат повеќе можни преодни состојби отколку кај усогласениот модел.
- ▶ Усогласениот модел е граничен случај на секвенцијалниот модел.

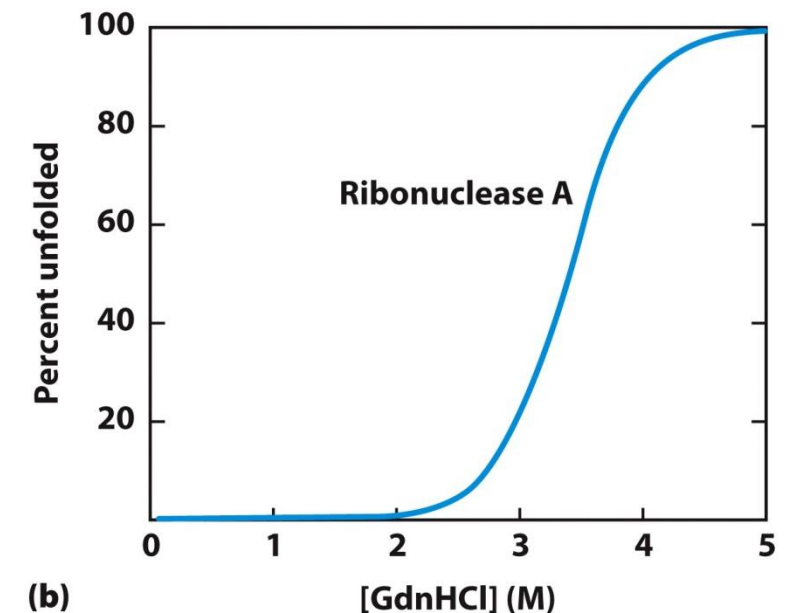
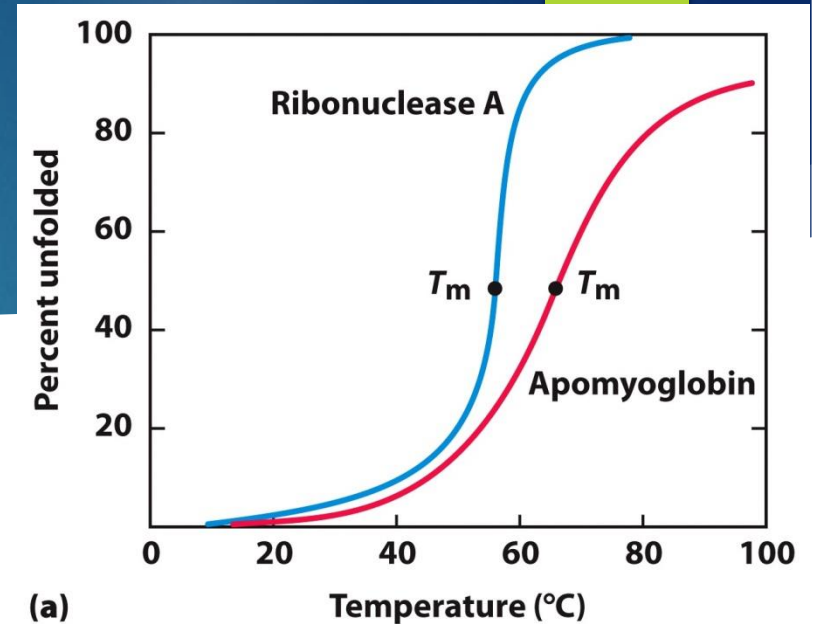
Денатурација и ренатурација на протеини

Денатурација на протеините

- ▶ Протеините се синтетизираат во рибозомите како линеарна аминокиселинска секвенца.
- ▶ За време на синтезата и по неа, полипептидната низа се свиткува (интеракции со околината и во пептидната низа) – нативна конформација.
- ▶ Промена на условите во однос на клетката предизвикуваат промени во протеинската структура.
- ▶ Ако со **промена на структурата дојде и до промена на функцијата** на протеинот, се случила негова денатурација.
- ▶ Манифестирање: **нецелосно одвиткување** на полипептидната низа и **добивање на случајни конформации.**

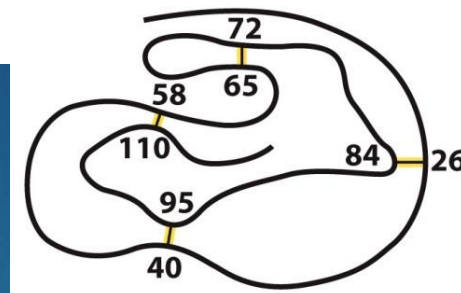
Фактори кои влијаат врз денатурација

- ▶ Зголемена температура - влијание врз водородни врски;
- ▶ Екстремни pH вредности - електростатско одбивање и раскинување на некои водородни врски;
- ▶ Органски растворувачи (алкохол, ацетон) и денатурирачки раствори (уреа, гванидин хидрохлорид, SDS) – раскинување на хидрофобни интеракции.



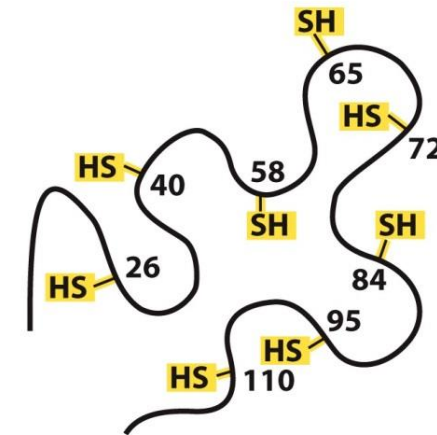
Ренатурација

- Ренатурација е процес на **повторно враќање на денатурираните протеини во нивната нативна структура и биолошка активност**, при вратени услови на стабилна нативна конформација.
- Експеримент: денатурација и ренатурација на рибонуклеаза А (Кристијан Афинсен 1950)
- Реагенсот за редукција (меркаптоетанол) ги раскинува дисулфидните врски до Cys остатоци.
- Уреата ги раскинува хидрофобните интеракции.
- Целиот полипептид преоѓа во одвиткана конформација.
- При отстранување на реагенсите повторно се свиткува во нативната форма и се враќа каталитичката активност.



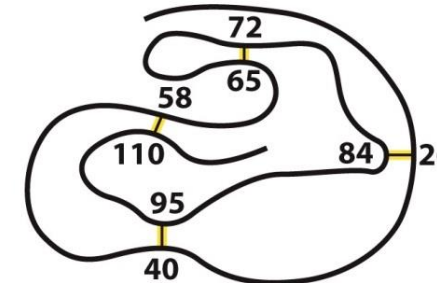
Native state;
catalytically active.

addition of urea and
mercaptoethanol



Unfolded state;
inactive. Disulfide
cross-links reduced to
yield Cys residues.

removal of urea and
mercaptoethanol

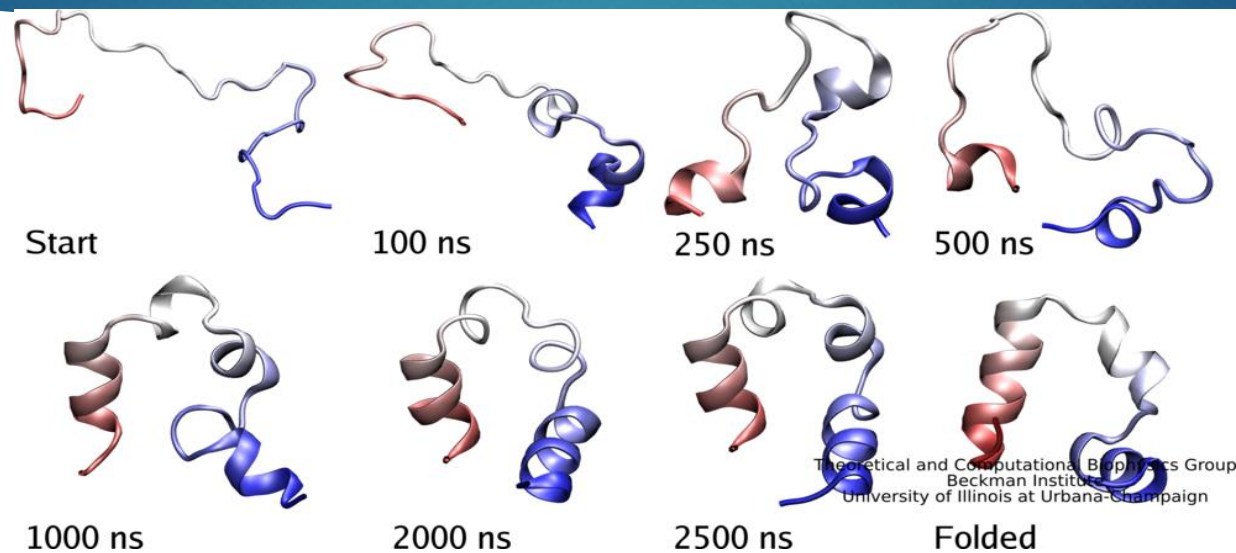


Native,
catalytically
active state.
Disulfide cross-links
correctly re-formed.

Свиткување на полипептидите

- ▶ Како полипептидот ја добива својата нативна конформација?
- ▶ E.coli може да синтетизира биолошки активен протеин од 100 аминокиселински остатоци на 37 °C, за време од 5 sec.
- ▶ **Левинталов парадокс:** Ако свиткувањето е случајно и секој од аминокиселинските остатоци може да завземе 10 конформации, тогаш полипептидот од 100 остатоци ќе има 10^{100} конформации за што се потребни 10^{77} години.
- ▶ Заклучок: **Свиткувањето не е случаен процес на проба и грешка, мора да постојат пократки патишта.**

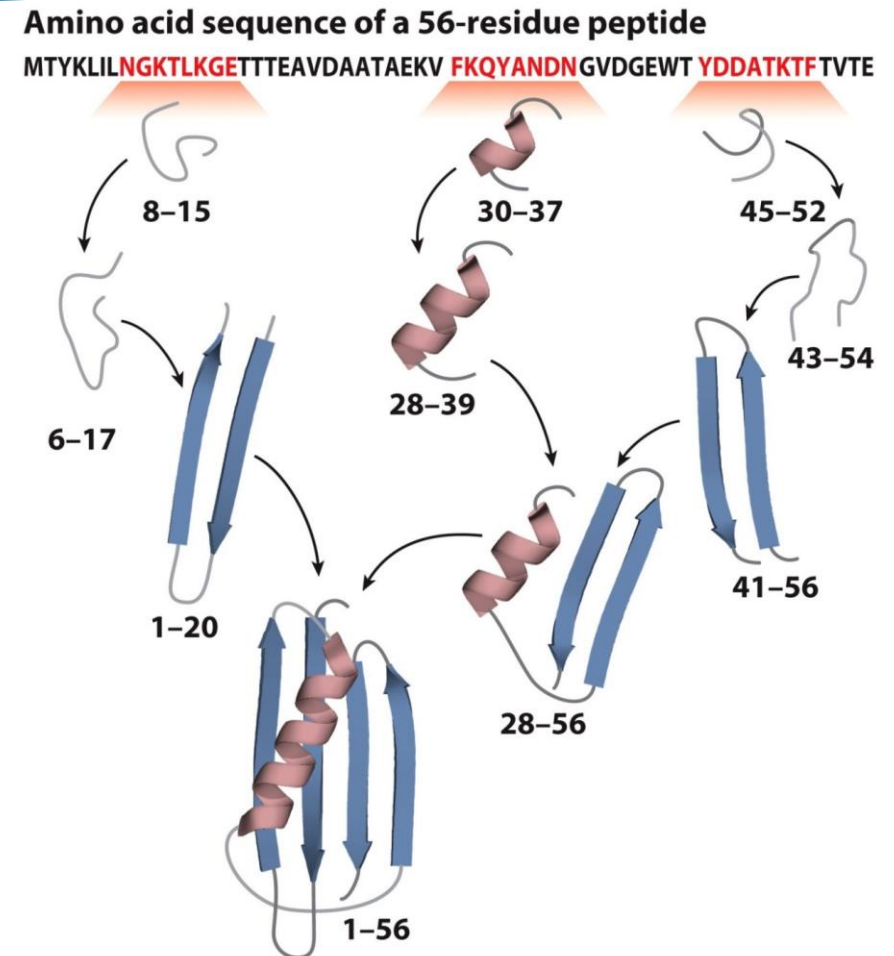
Модел на свиткување според хиерархија



- Формирање на локални секундарни структури (α -хеликси или β -слоеви); интеракции на поголеми растојанија и образување на суперсекундарни структури; формирање на домен.
- Пр. Симулација за свиткување на низа од 36 аминокиселински остатоци од протеинот вилин.

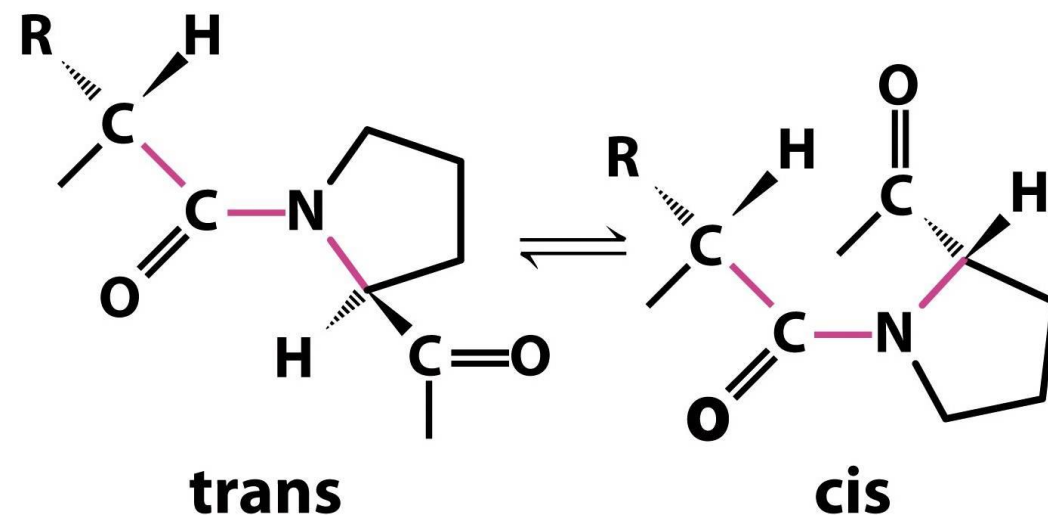
Модел на стопена глобула

- ▶ Формирање на **конформациона состојба со висока содржина на секундарни структури** – стопена глобула.
- ▶ Термодинамиката на протеинското свиткување е претставена со “**инка на слободна енергија**”:
- ▶ На почеток можни се голем број конформации на делумно свитканите полипептиди (голема ентропија).
- ▶ Со напредок на процесот се намалува бројот на делумно свиткани конформации (се намалува ентропијата), а се зголемува количеството протеин во нативна конформација (намалување на слободна енергија).



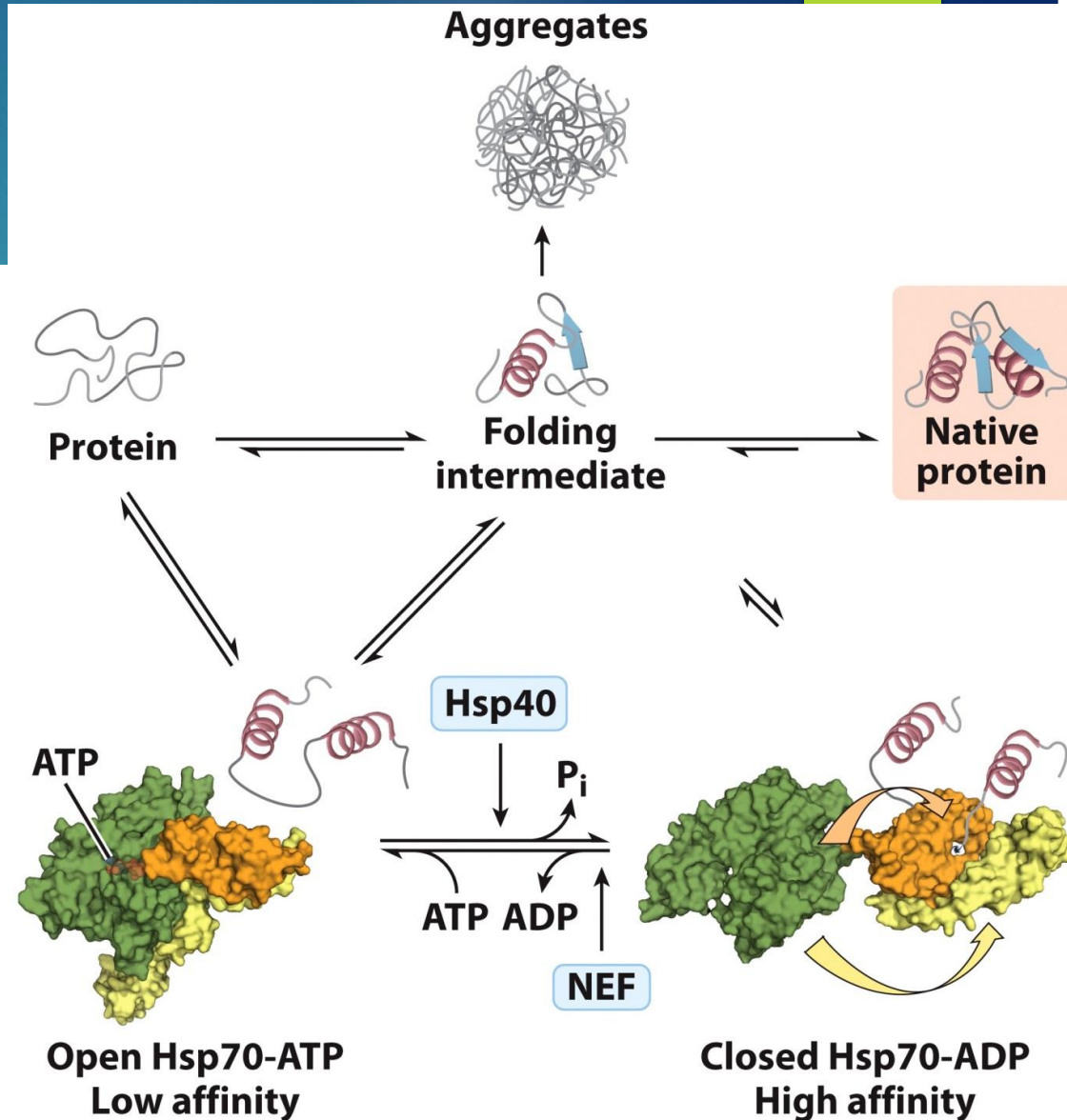
Молекули кои го помагаат свиткувањето

- ▶ Свиткувањето на протеините е помогнато од **молекулски хаперони и/или ензими**.
- ▶ Ензими кои учествуваат во механизмот на свиткување се:
- ▶ **Протеин дисулфид изомераза (PDI)** - внатрешна размена на дисулфидни врски до формирање на нативна конформација, и
- ▶ **Пептид пролил цис-транс изомераза (PPI)** – цис-транс изомерија на пептидна врска која содржи остатоци на Pro.

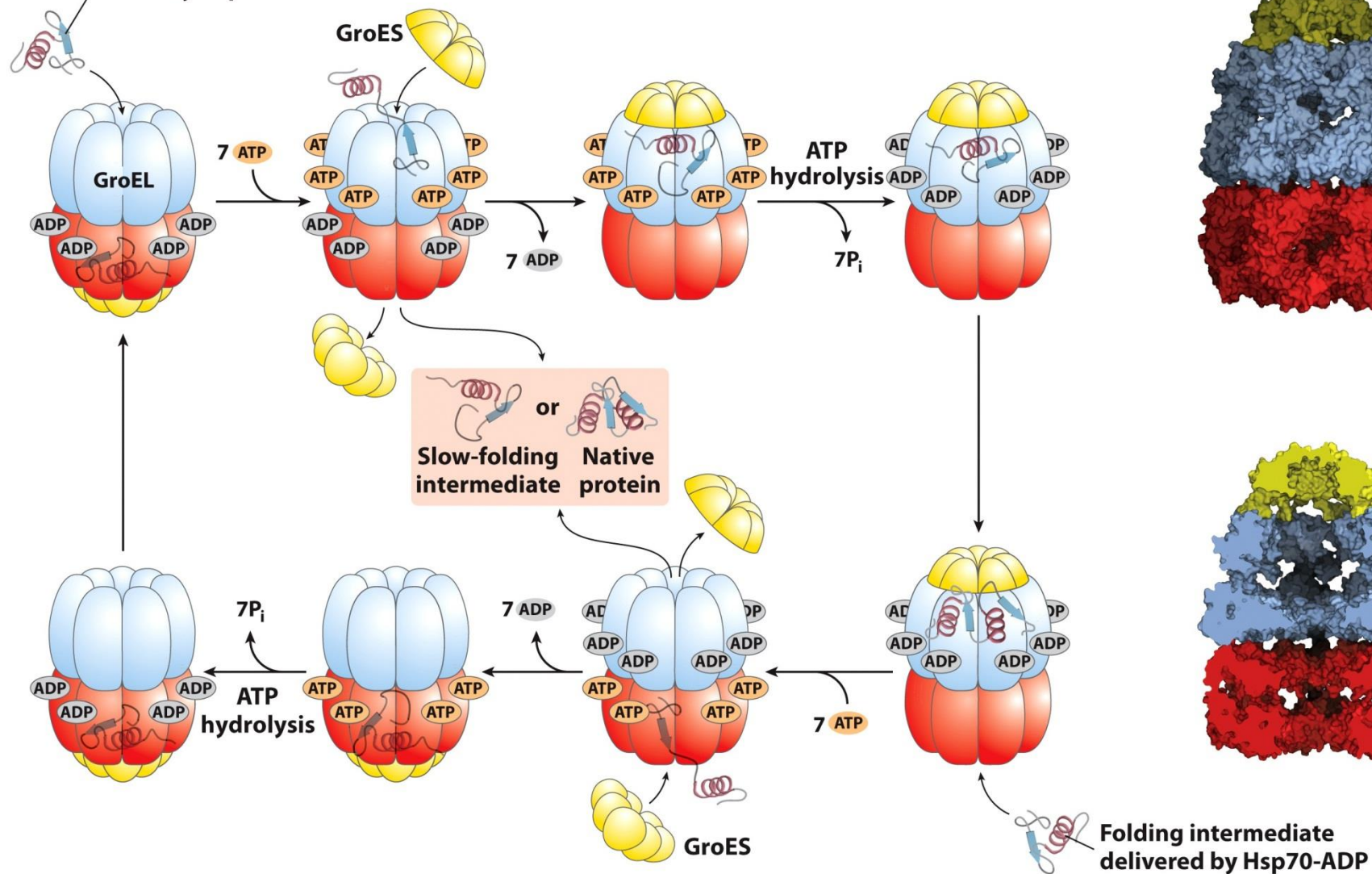


Хаперони

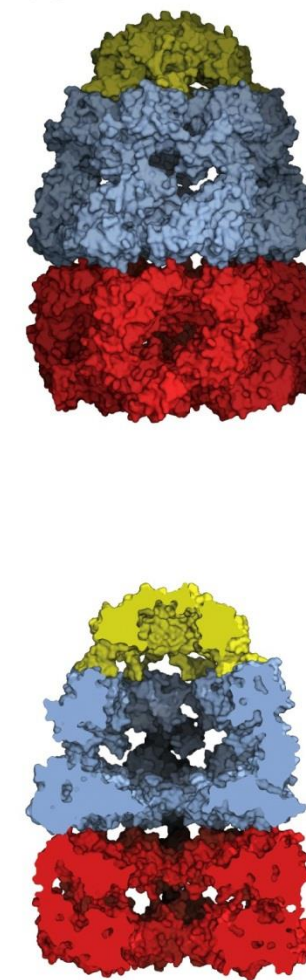
- ▶ За протеините во клетка кои не се свиткуваат спонтано, потребни се **молекуларни хаперони**.
- ▶ Хаперони се **протеини** кои стапуваат во интеракција со делумно свитканите или погрешно свитканите полипептиди, со што обезбедуваат услови и го олеснуваат патот за правилно свиткување.
- ▶ Проучени се две класи на хаперони:
- ▶ **Hsp (heat shock proteins) Hsp70, Hsp40.**
- ▶ **Хаперонини GroEL/GroES**



(a) Folding intermediate delivered by Hsp70-ADP



(b)

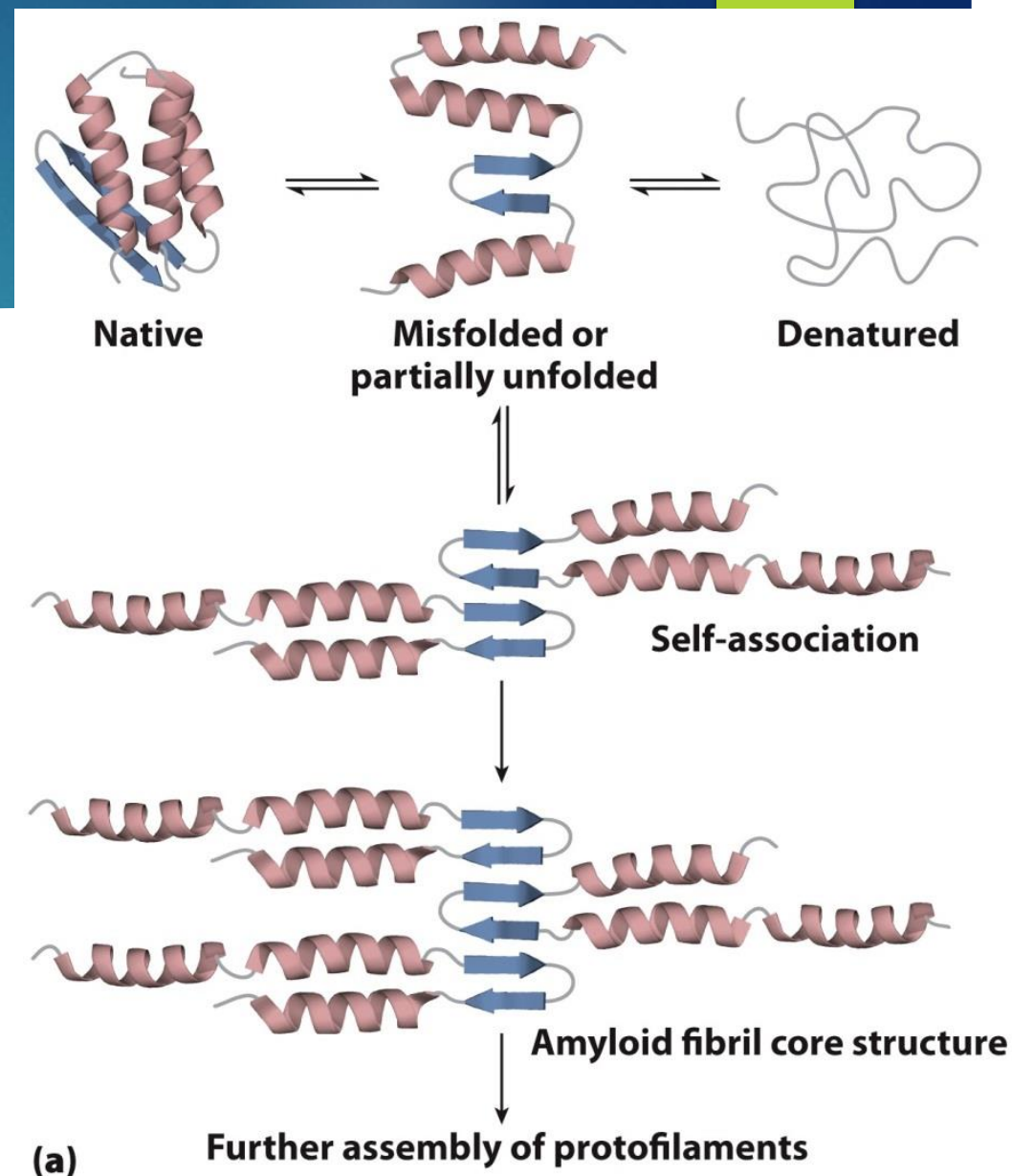


Хаперонины GroEL и GroES

Важност на тридимензионалната структура на протеините

Грешки при свиткувањето

- ▶ Доколку еден растворлив протеин се излачи во погрешно свиткана форма, се претвора во нерастворливо екстрацелуларно **амилоидно влакно**.
- ▶ Влакната се добро средени и не се разгранети, со дијаметар од 7 до 10 nm и голем дел на β набрани структури.
- ▶ β -низите се ориентирани нормално на оската на влакното.
- ▶ Потоа, другите делови од протеинот различно се свиткуваат и остануваат на надворешната страна од јадрото на β -плочата во влакното, кое расте и се зголемува.



Појава на сериозни заболувања

- ▶ Последица од грешки при свиткувањето на протеините:
- ▶ Четвртина од сите синтетизирани полипептиди може да бидат уништени,
- ▶ Појава на сериозни заболувања, како што се дијабетес тип 2, Алцхајмерова, Хантингтонова и Паркинсонова болест.
- ▶ Некои дегенеративни заболувања на мозокот кај цицачите завршуваат со смрт. Најпозната од овие болести е говедската спонгиформна енцефалопатија (BSE; од англ. bovine spongiform encephalopathy) - кравјо лудило.