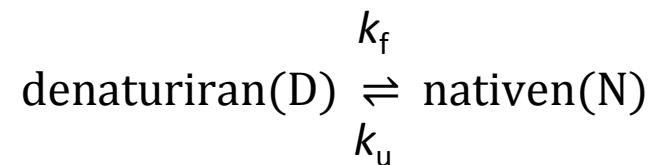
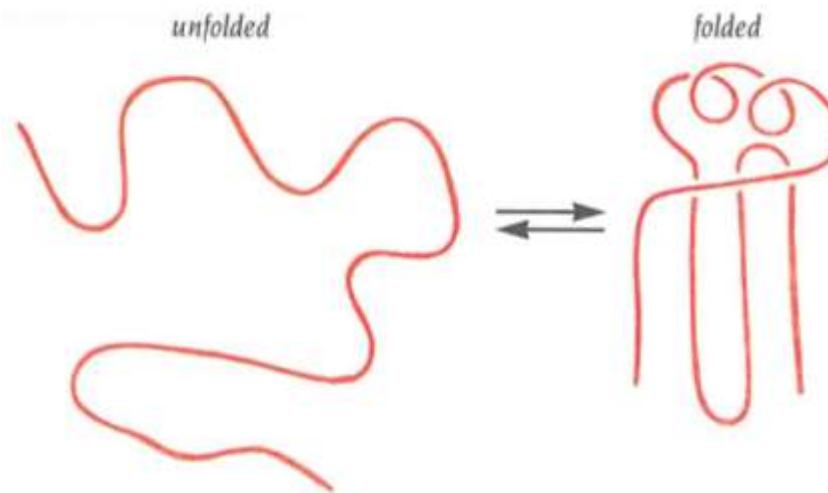


# Zvijanje proteinov

Zvijanje proteinov je proces, pri katerem iz razvite (denaturirane) oblike nastane zvita, funkcionalna oblika.

najenostavnejši  
model zvijanja



$$K = \frac{[N]}{[D]} = \frac{[k_f]}{[k_u]}$$

Zvijanje proteina je spontan proces, če je  $\Delta G < 0$ .

Pri 25 °C

$$\Delta G^0 = \Delta H^0 - T\Delta S^0$$



tvorba intramolekulskeih kontaktov/vezi

izguba entropije zaradi urejenosti

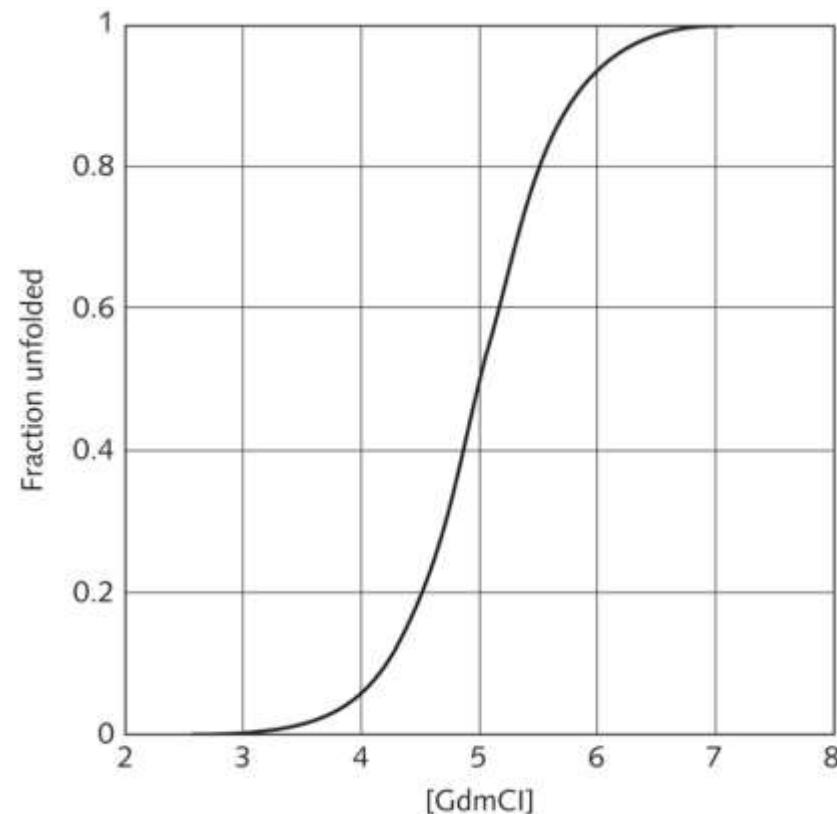
# Zvijanje proteinov

Proste energije zvijanja ( $\Delta G^0$ ) nekaterih pogostejših proteinov:

protein	$\Delta G^0$ (kJ/mol)	$\Delta H^0$ (kJ/mol)	$T\Delta S^0$ (kJ/mol)
inhibitor kimotripsina 2	-27,7	-135	-107,3
eglin C	-36,9	-115	-78,1
RNaza T1	-37,5	-281	-243,6
citokrom C	-37,1	-89	-51,9
barnaza	-48,9	-307	-258,2
lizocim	-57,8	-242	-184,3
kimotripsin	-45,7	-268	-222,4
tendamistat	-37,5	-70	-32,5

## Zvijanje proteinov

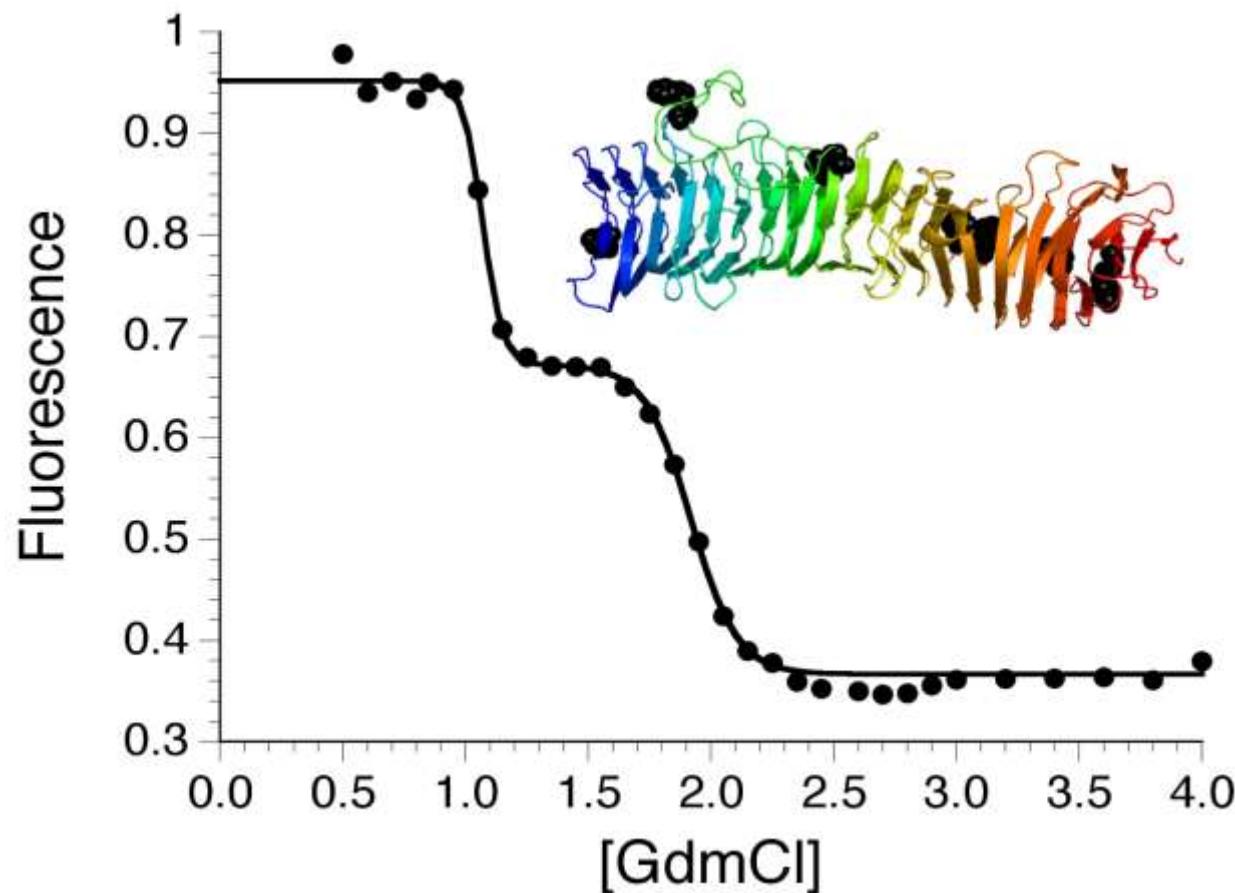
Za številne proteine velja, da se zvijajo/razvijajo v enem koraku, brez vmesnih stabilnih intermedirov. Eksperimentalno ponavadi študiramo denaturacijo proteina s spremnjanjem koncentracije denaturanta (GdmCl, urea), pH ali temperature. Signal, ki ga spremljamo, je lahko CD, intrinzična fluorescencija, FRET, ...



## Zvijanje proteinov

Nekateri proteini se razvijejo v več korakih – dobimo večfazni diagram.

Primer: razvijanje virulenčnega faktorja pertaktina iz *Bordetelle pertusis*.



# Faze zvijanja proteinov

Zvijanje proteinov poteka po vnaprej določenih poteh, ki so se razvile tekom evolucije, ne pa z naključnim iskanjem po konformacijskem prostoru.

Levinthalov paradoks: če bi vsak ostanek imel na voljo le 2 konformaciji, bi peptid s 100 ostanki zavzel  $10^{30}$  različnih konformacij → če bi naključno iskal nativno konformacijo, bi potreboval 10 miljard let.

Zvijanje proteinov iz denaturirane v nativno obliko poteče v treh fazah:

## 1. Hitri kolaps strukture in nastanek sekundarne strukture ( $< ms$ )

Gonilna sila naj bi bile *hidrofobne interakcije*. Nastane **razrahljeni klobčič** (angl. *molten globule*).

## 2. Nastanek terciarne strukture ( $ms \text{ do } s$ )

## 3. Pakiranje terciarne strukture (‘kristalizacija’) v nativno obliko ( $\leq s$ )

## Zgodnji dogodki zvijanja

Kompaktnost strukture proteina lahko merimo z *radijem giracije*, tj. koren povprečnih kvadratov oddaljenosti posameznih centrov mas od središča molekule:

$$R_G = \sqrt{\frac{\sum_i m_i (x_i^2 + y_i^2 + z_i^2)}{\sum_i m_i}}$$

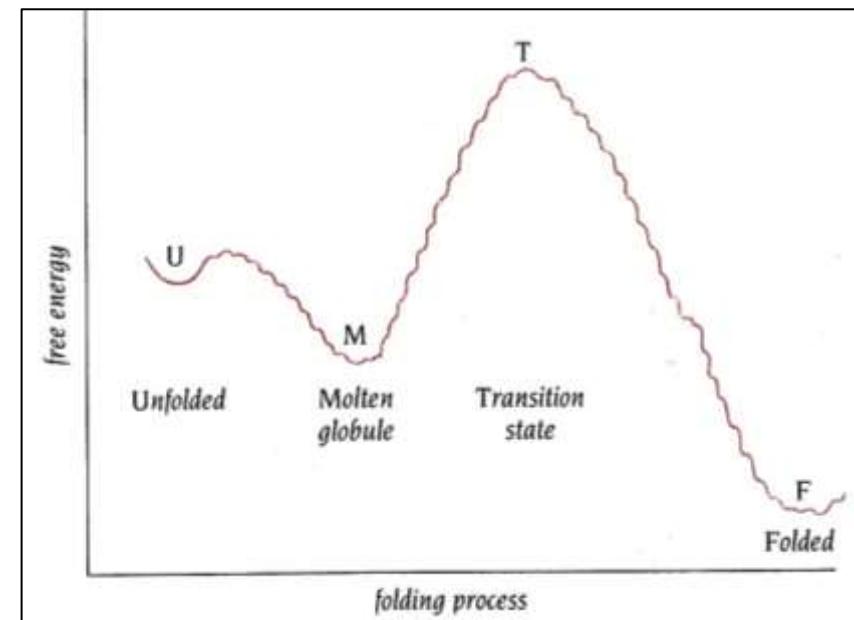
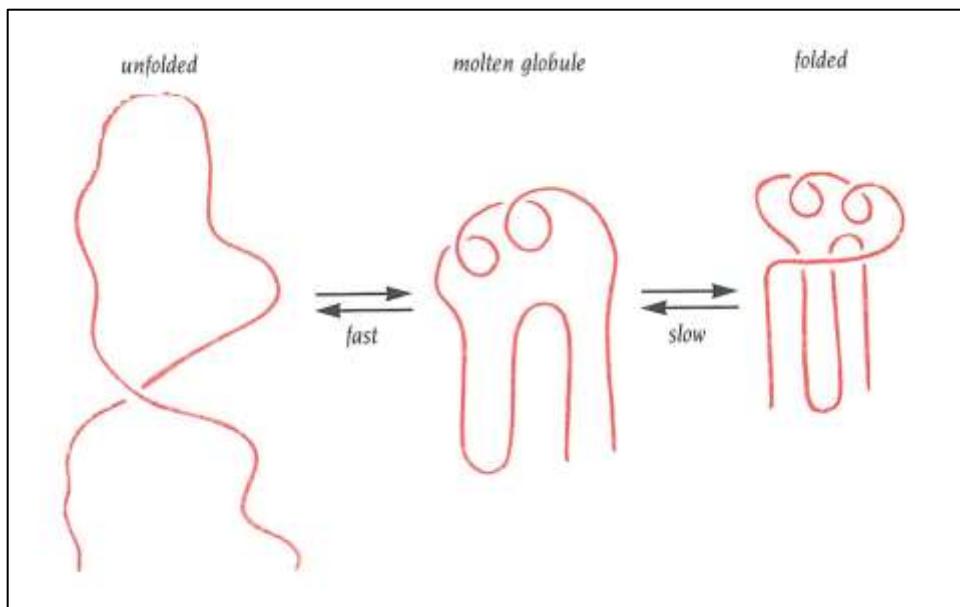
protein	$R_G$ (nativen)	$R_G$ (denat.)	razmerje
SH3 domena kinaze PI3	18,6	27,5	0,7
citokrom C	17,8	32,6	0,5
lizocim	20,5	34,6	0,6
TIM	29,7	49,7	0,6

Pri hitrem kolapsu molekule nastane struktura, ki ima  $R_G$  okoli 10% višji kot nativna oblika proteina – **razrahljani klobčič**.

# Razrahljani klobčič

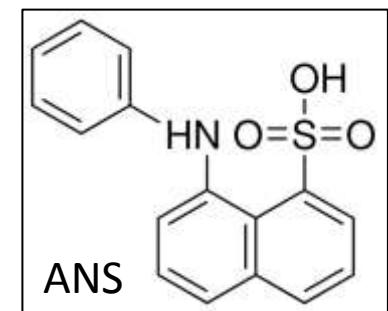
Razrahljani klobčič je delno strukturirano stanje med nativno in denaturirano obliko. Lahko je relativno stabilen intermedijat zvijanja ali pa zgolj prehodno stanje.

Ima znaten delež sekundarne strukture nativnega stanja.

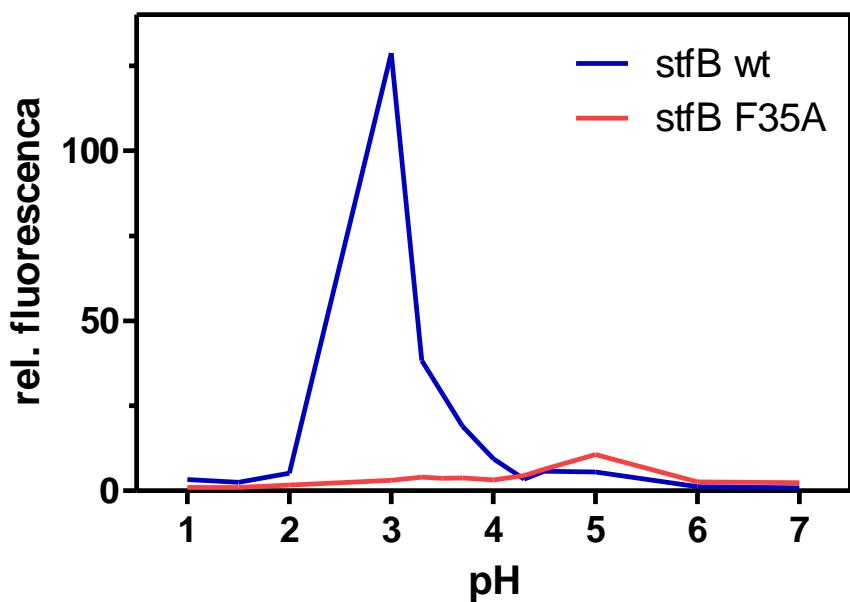
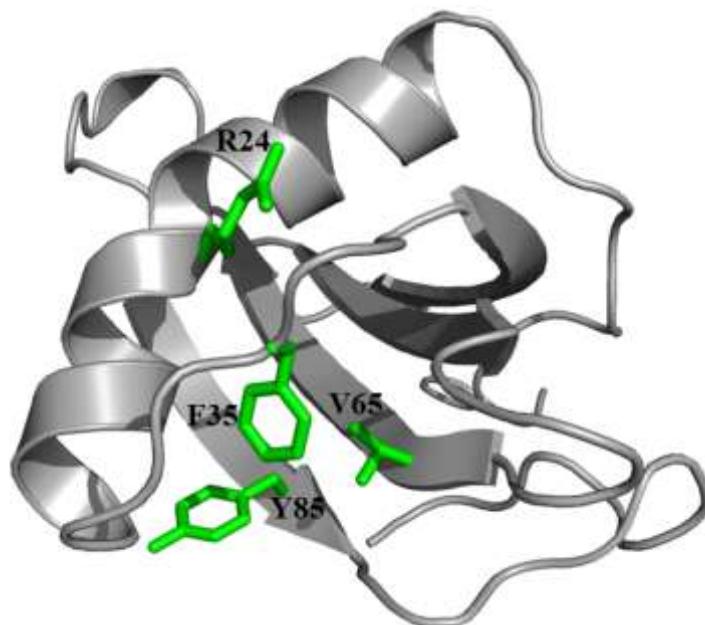


# Razrahljeni klobčič

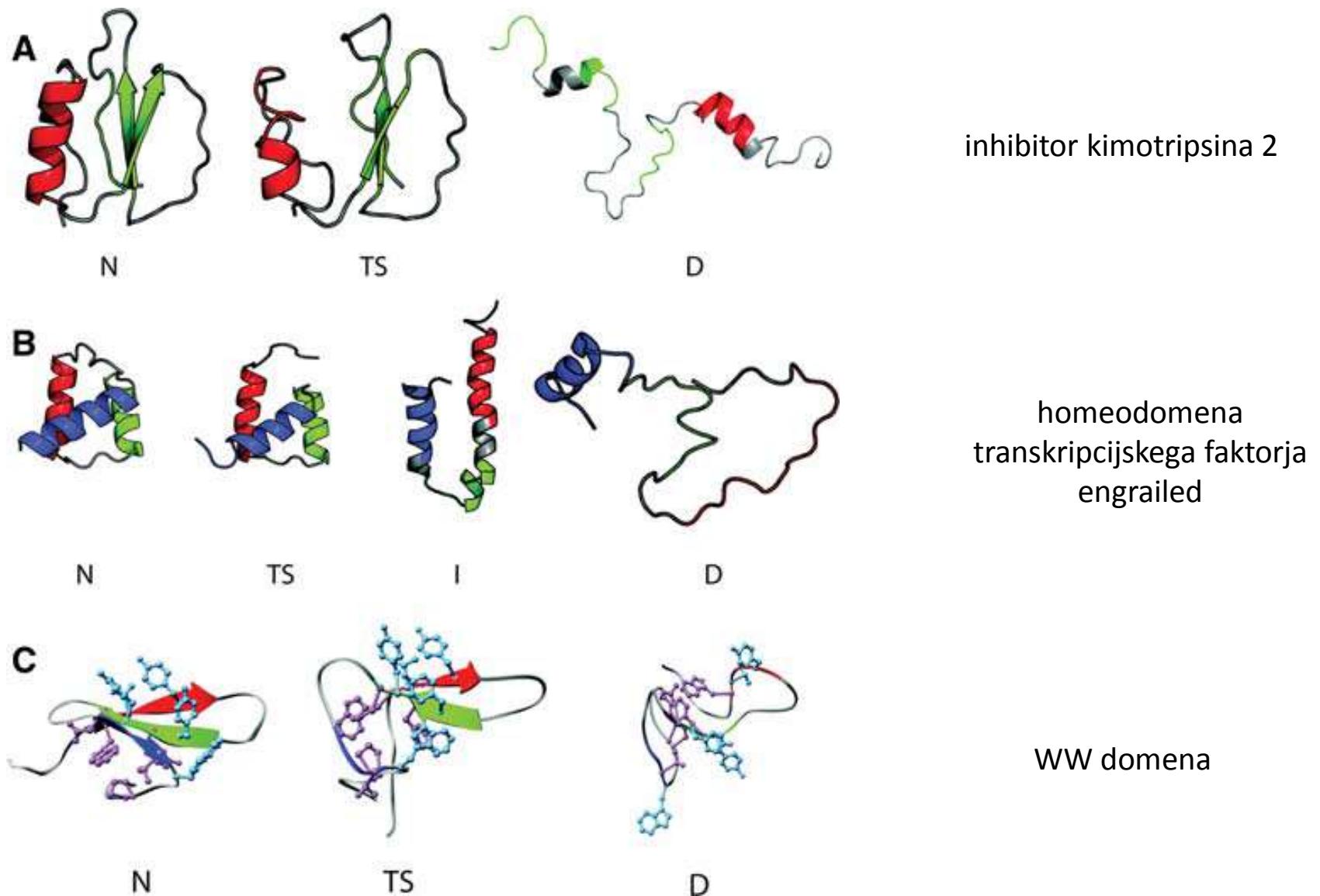
Glede na nativno obliko je struktura razrahljanega klobčiča bolj ohlapna. Na tej osnovi lahko stabilne razrahljane klobčiče eksperimentalno detektiramo z uporabo fluorescenčnega barvila 8-anilino-1-naftalensulfonata (ANS). Le-ta se veže v hidrofobno notranjost klobčiča, ob čemer se intenziteta njegove fluorescence močno poveča



Primer: vezava ANS na divji tip in mutant F35A stefina B.

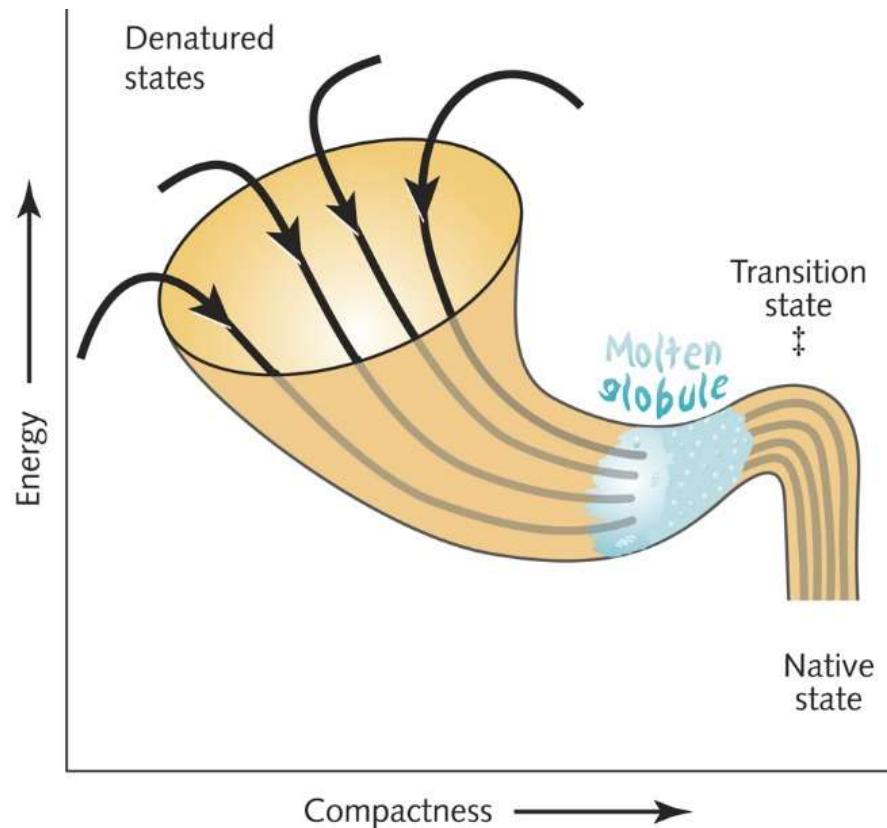


# Primeri prehodnih stanj (razrahljanih klobčičev)



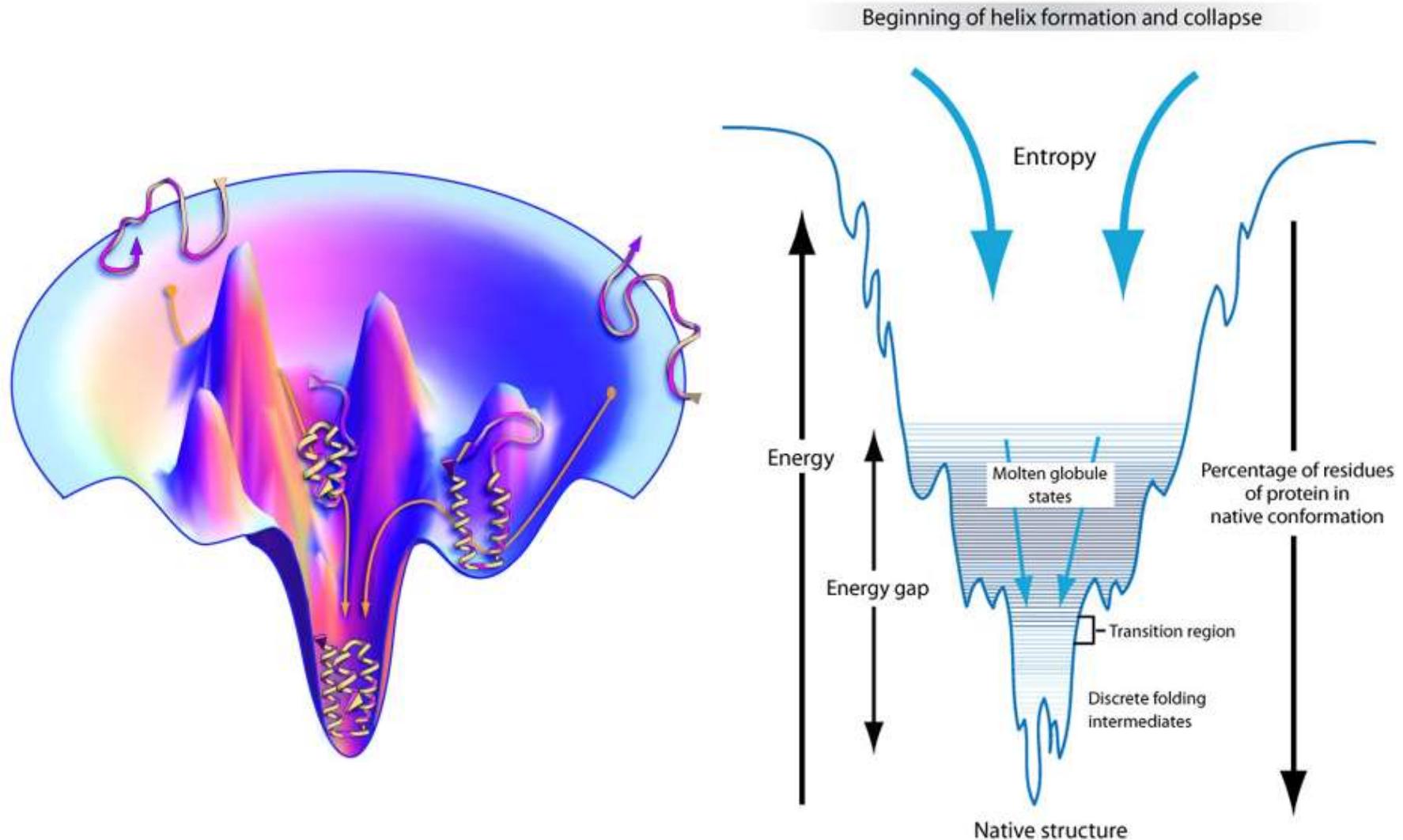
# Energetski diagram zvijanja

Energetski diagram celotnega procesa zvijanja proteina ponavadi ponazorimo v obliki lijaka.



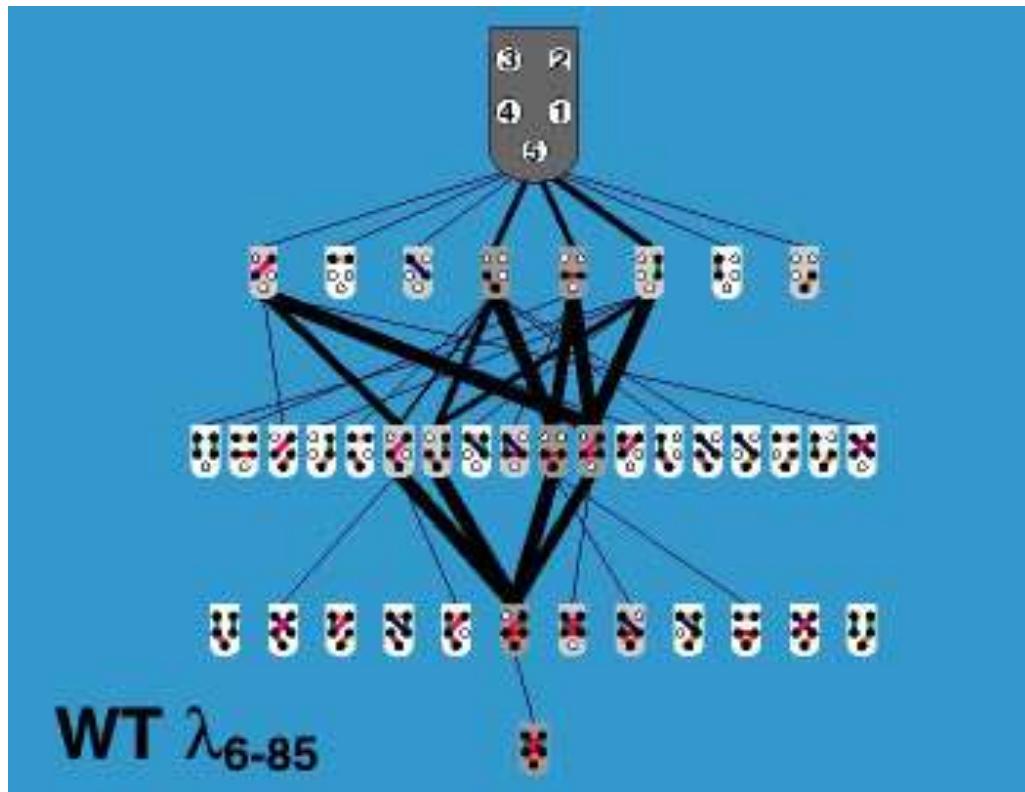
# Energetski diagram zvijanja

Energetski diagram celotnega procesa zvijanja proteina ponavadi ponazorimo v obliki lijaka.



## Hierarhičen model zvijanja

Zvijanje se začne z interakcijami med deli, ki so si blizu v primarni strukturi in marginalno stabilni. Te lokalne strukture dalje interagirajo z ostalimi segmenti, tako da kompleksnost interakcij narašča.



Hierarhičen model zvijanja λ  
represorja:

Črni krožci predstavljajo formirano viačnico, beli pa neformirano. Linije prikazujujo interakcije med viačnicami.

# Hitrost zvijanja proteinov

Hitrost zvijanja je navzgor omejena s hitrostjo nastanka posameznih elementov:

$\alpha$ -vijačnice nastanejo v času  $0,1 - 1 \mu\text{s}$

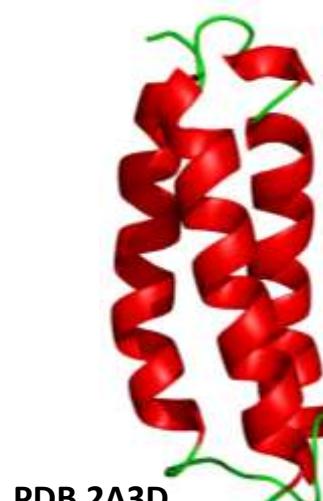
$\beta$ -lasnice nastanejo v času  $1 - 10 \mu\text{s}$

zanke nastanejo hitreje → ne omejujejo hitrosti zvijanja

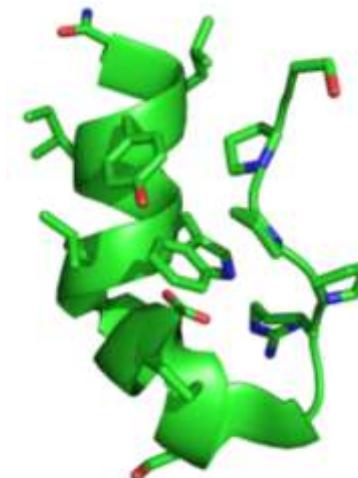
V splošnem je zgornja meja hitrosti  $N/50 \mu\text{s}$ , kjer je  $N$  št. ostankov v proteinu.



PDB 1PRB



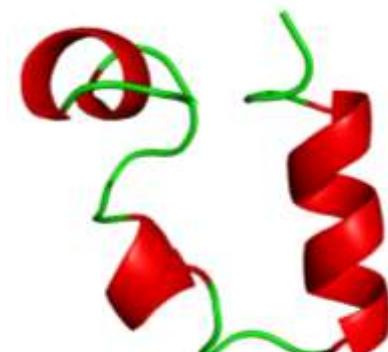
PDB 2A3D



albumin-vezavna domena  
(bakterijska)  
**čas zvijanja  $1 \mu\text{s}$**

dizajniran snop  
treh vijačnic  
**čas zvijanja  $3 \mu\text{s}$**

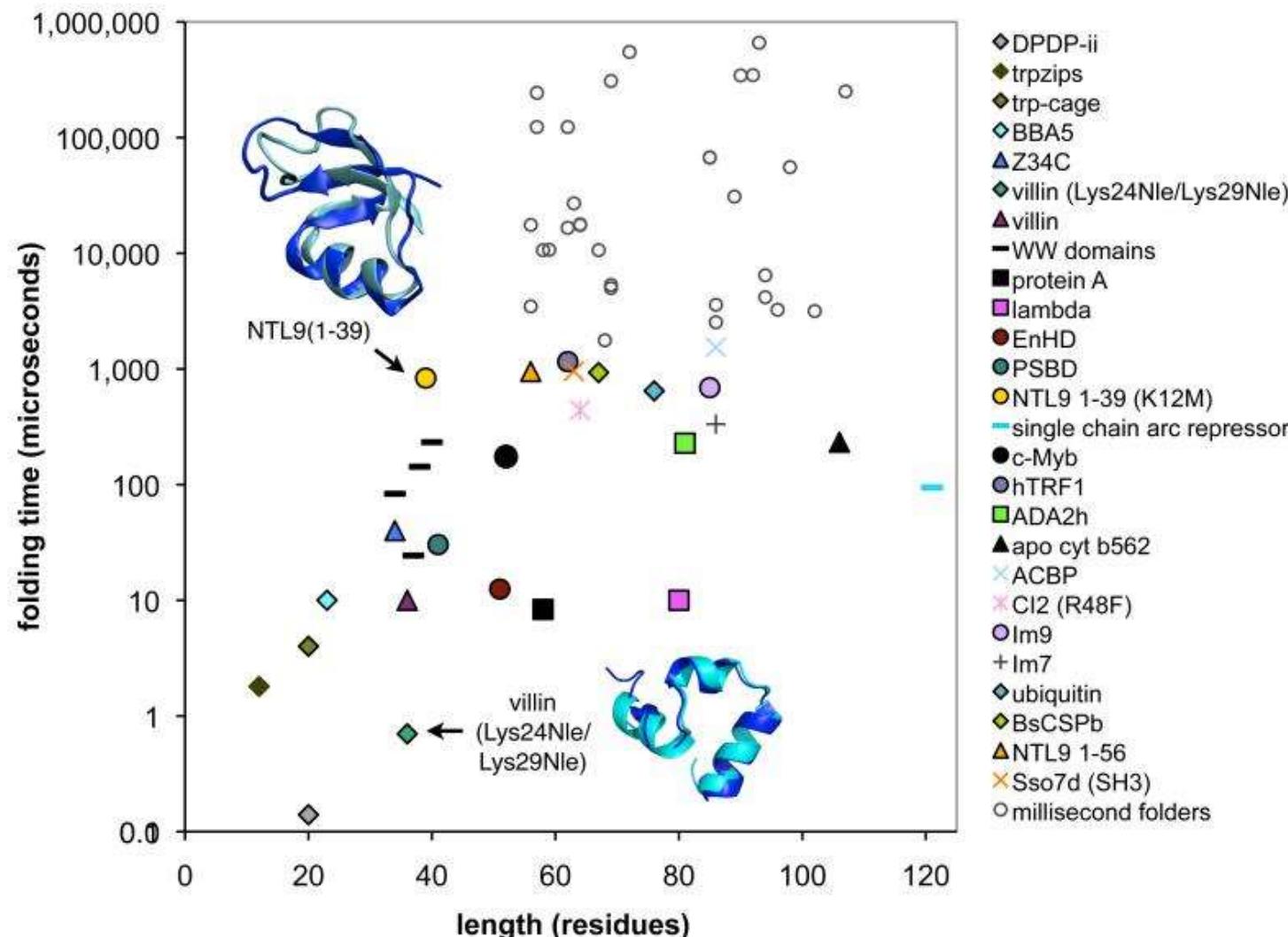
triptofanska  
kletka  
**čas zvijanja  $4,1 \mu\text{s}$**



poddomena glave  
vilina  
**čas zvijanja  $4,3 \mu\text{s}$**

# Hitrost zvijanja proteinov

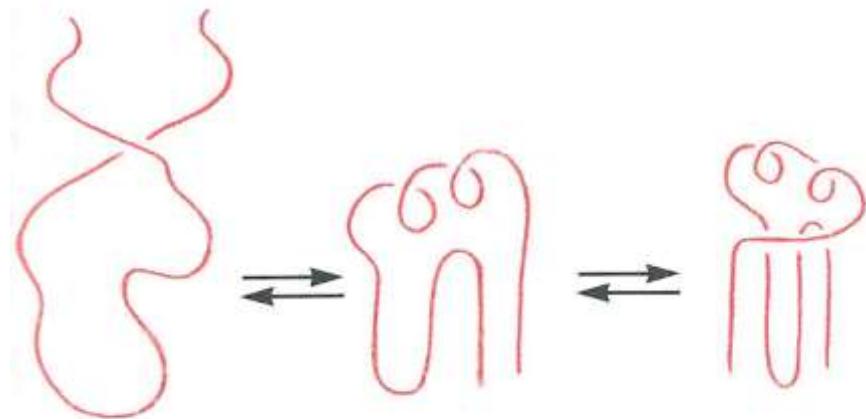
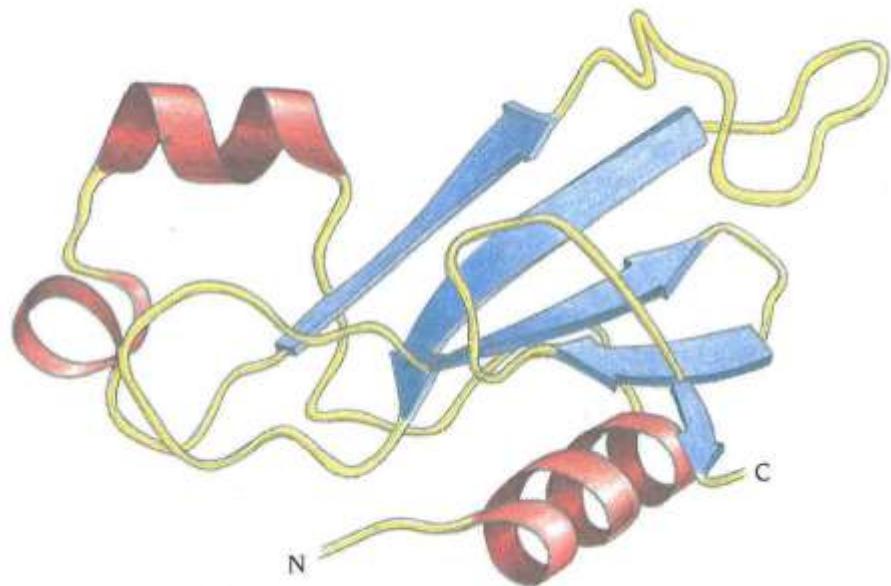
Primeri hitrosti zvijanja nekaterih proteinov:



## Alternativne poti zvijanja

Proteini se lahko iz denaturirane oblike v nativno zvijejo po eni ali več poteh.

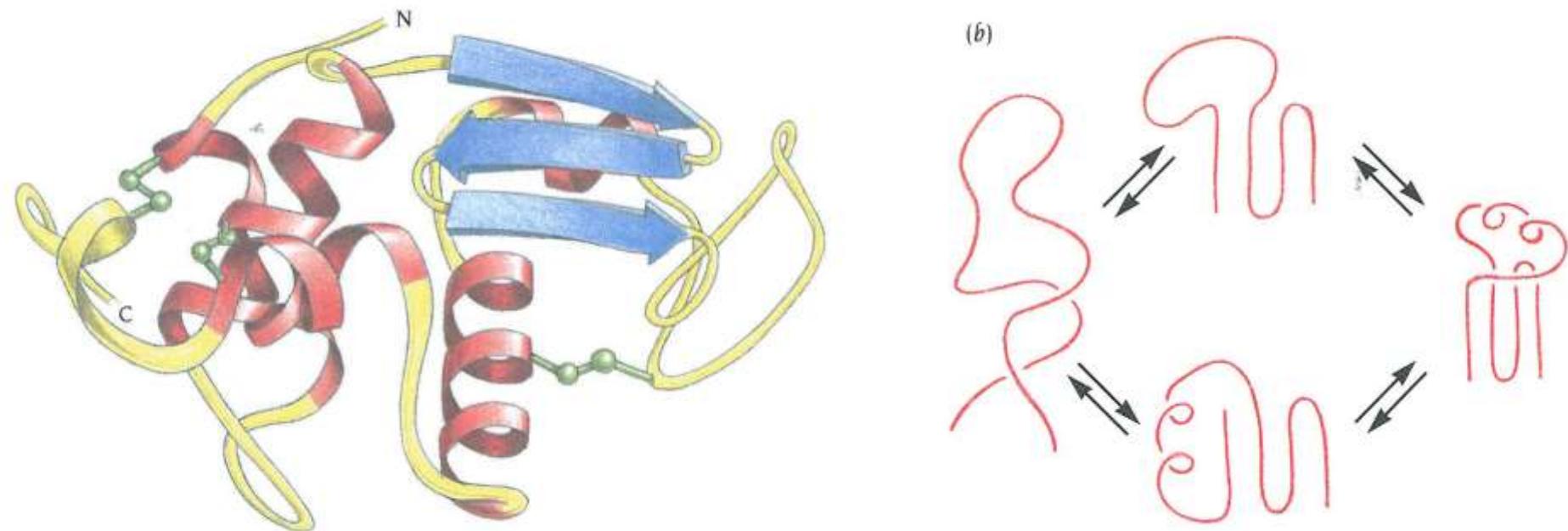
**Barnaza** se zvije po eni glavni poti – preko enega intermediata.



## Alternativne poti zvijanja

Proteini se lahko iz denaturirane oblike v nativno zvijejo po eni ali več poteh.

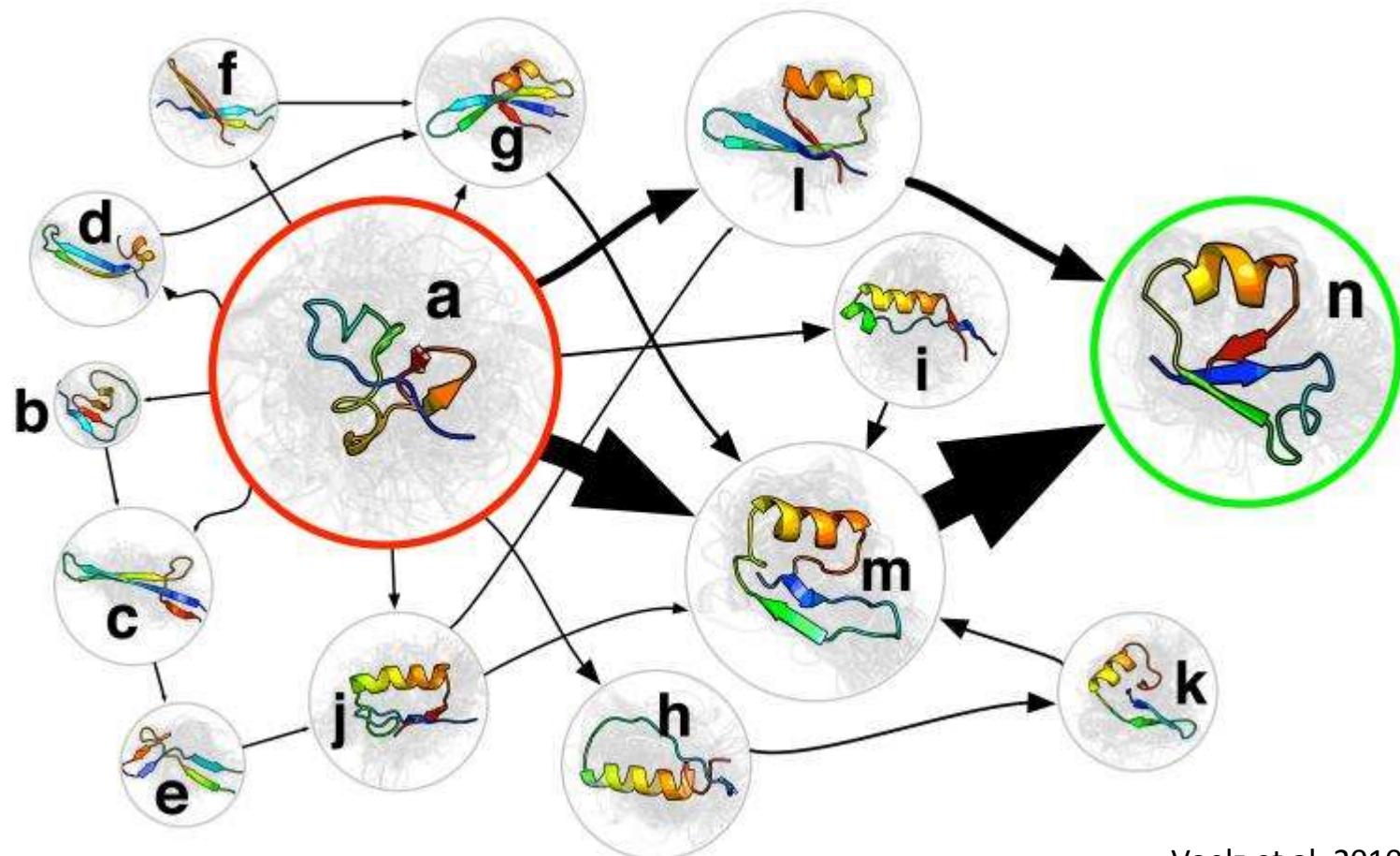
**Lizocim** se zvije po vsaj dveh različnih poteh.



# Alternativne poti zvijanja

Proteini se lahko iz denaturirane oblike v nativno zvijejo po eni ali več poteh. Na mikroskopskem nivoju zasedejo proteini med zvijanjem mnogo različnih metastabilnih konformacij.

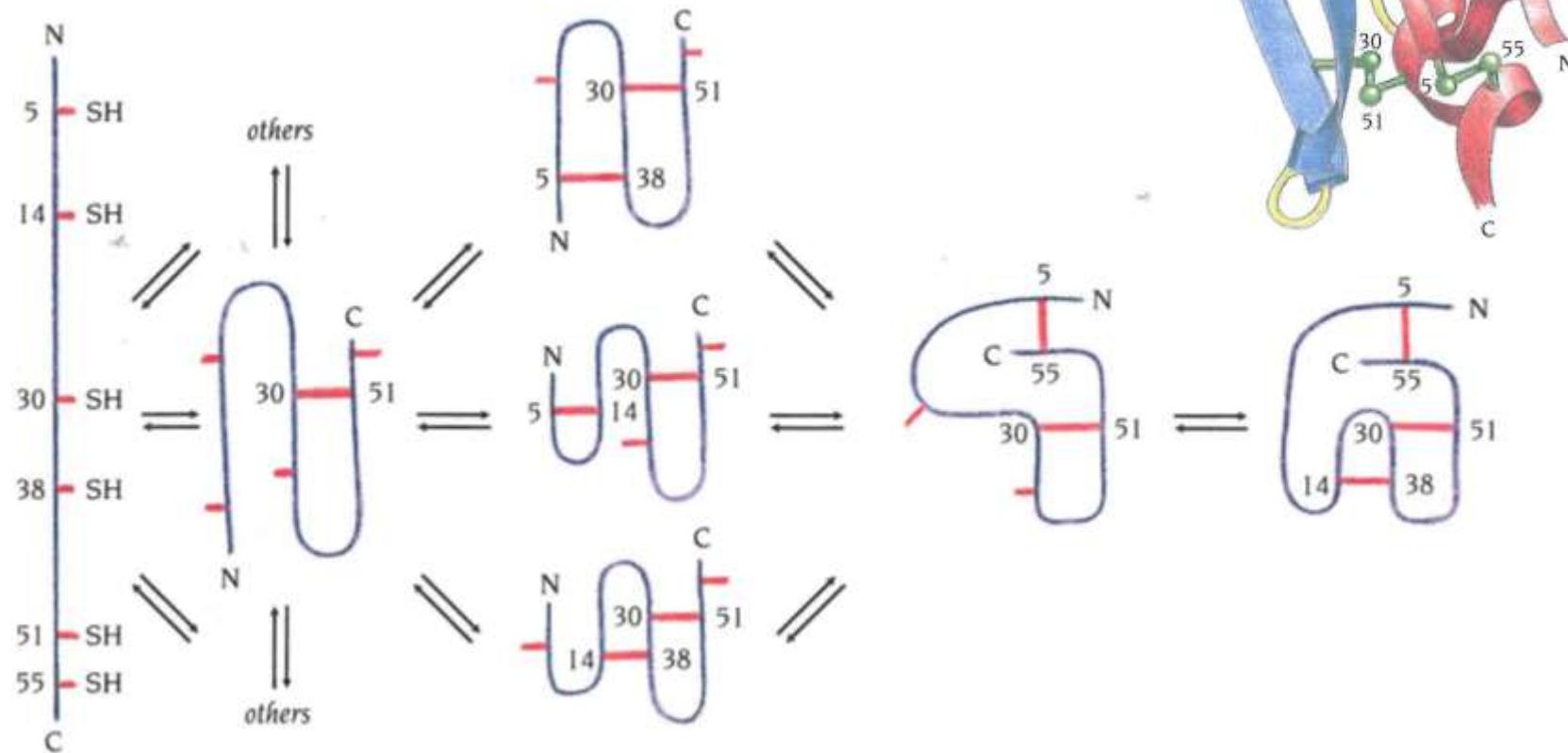
Primer: 14 najbolj stabilnih intermediatov pri *ab initio* zvijanju proteina NTL9



# Tvorba disulfidov

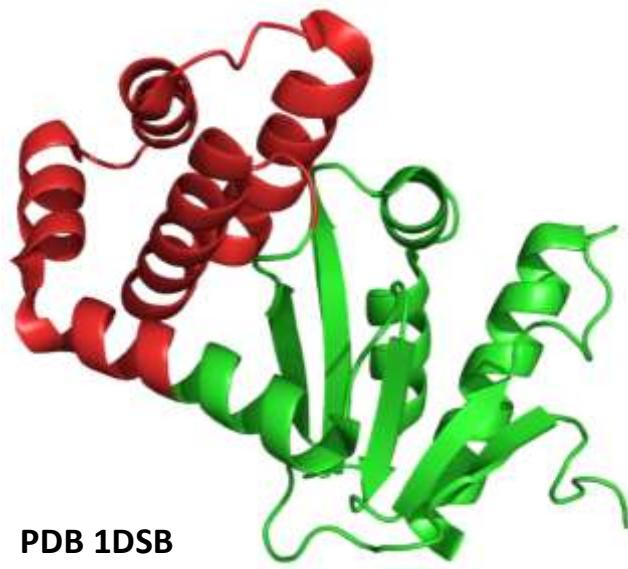
Tvorba nekaterih struktur omejuje hitrost zvijanja proteinov. Mednje spada tvorba disulfidov.

Primer: zvijanje BPTI vključuje zaporedno formacijo treh disulfidnih vezi.

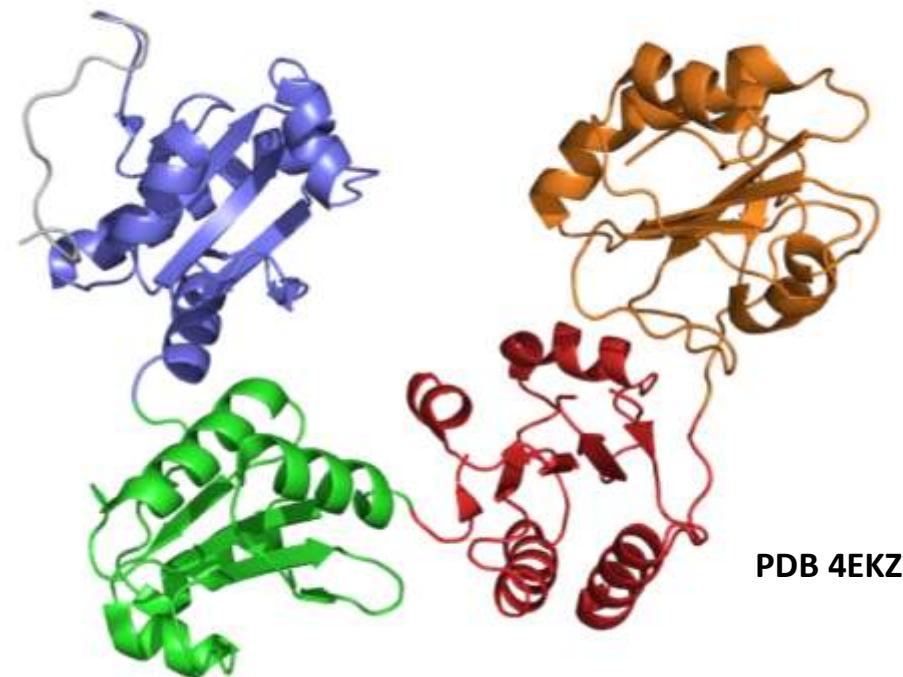


# Tvorba disulfidov

Tvorba nekaterih struktur omejuje hitrost zvijanja proteinov. Mednje spada tvorba disulfidov. *In vivo* preurejanje disulfidov katalizirajo **protein disulfid izomeraze**.



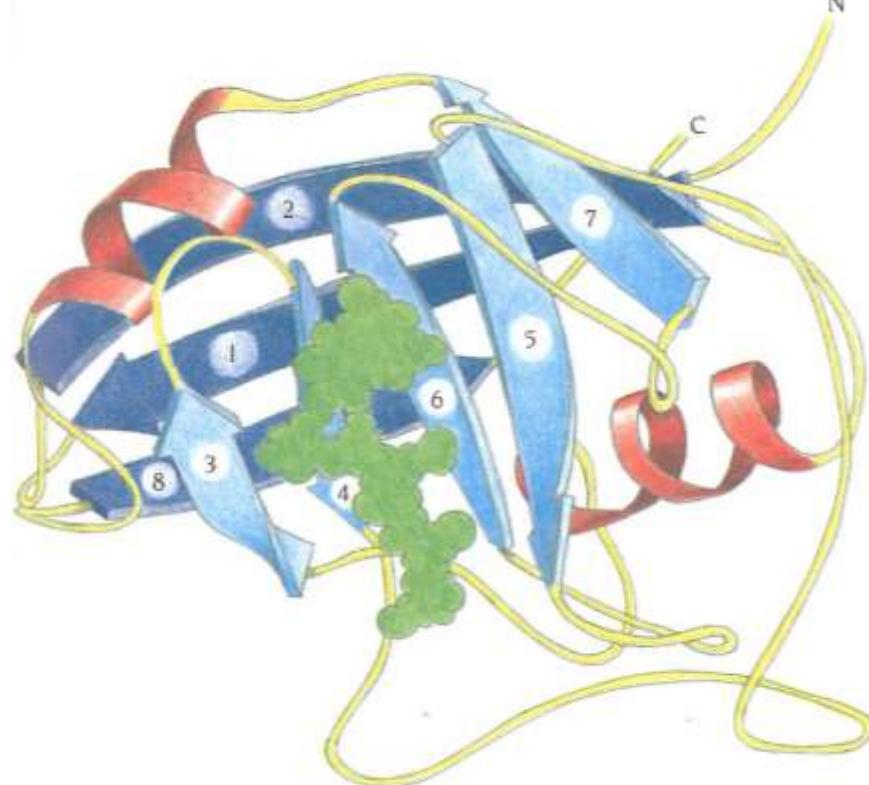
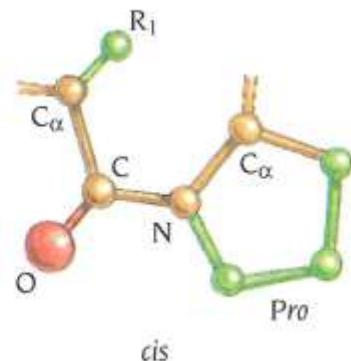
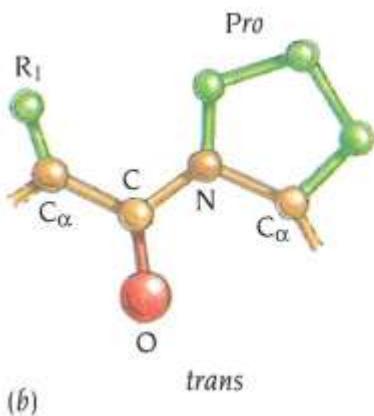
DsbA, protein disulfid izomeraza iz *E. coli*  
ena tioredoksiinska domena (zelena)



človeška protein disulfid izomeraza  
dve tioredoksiinski domeni  
(modra in oranžna)

# Izomerizacija prolinov

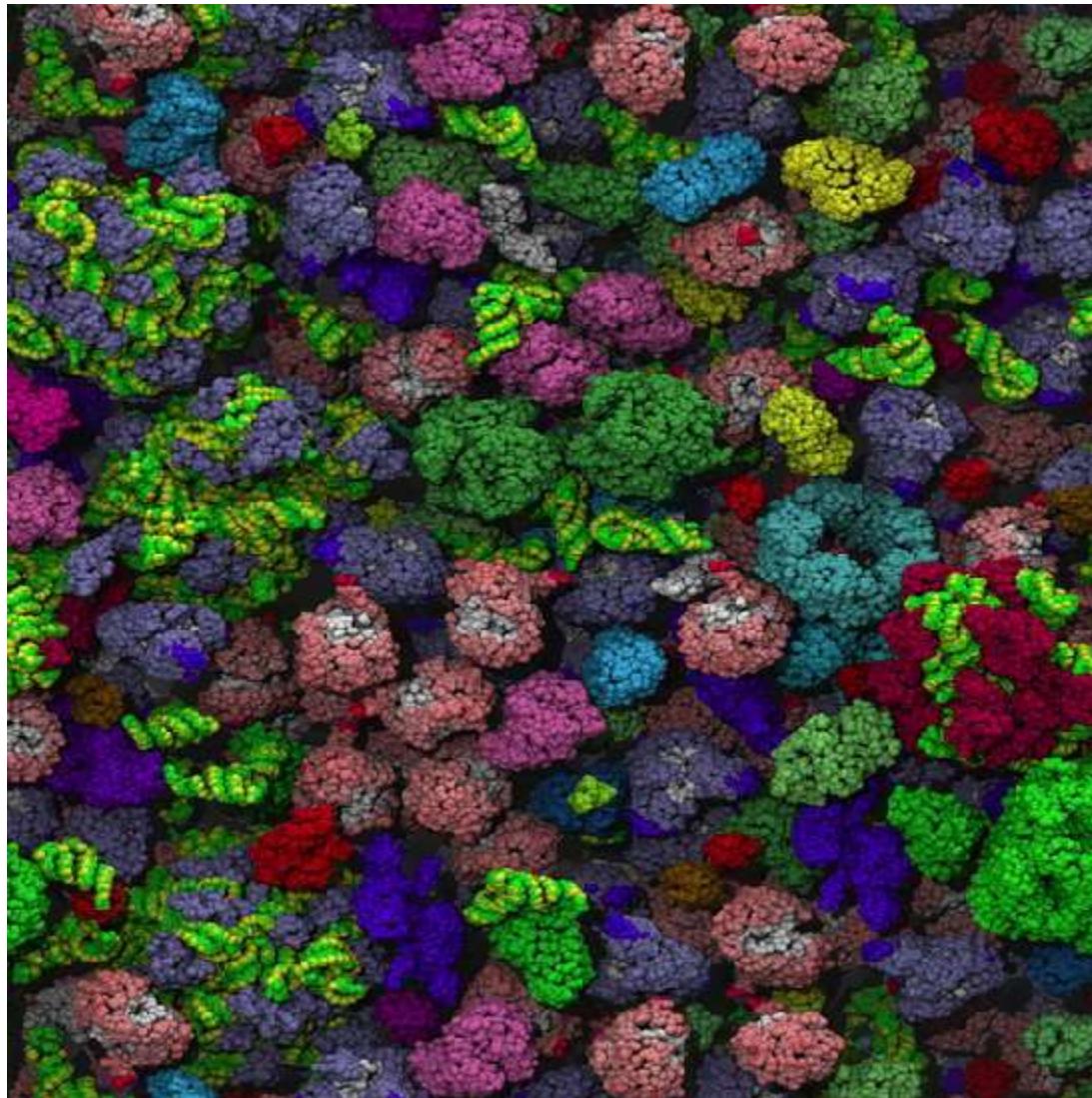
Ena izmed počasnih stopenj zvijanja je tudi izomerizacija prolinov. *Cis*-prolini so redkejši (4x manj stabilni od *trans* oblike), a jih včasih najdemo v ostrih zavojih verige. *Cis-trans* izomerizacija je počasen proces, *in vivo* pa ga pospešijo **peptidil prolij izomeraze**.



človeška peptidil prolij izomeraza  
ciklofilin

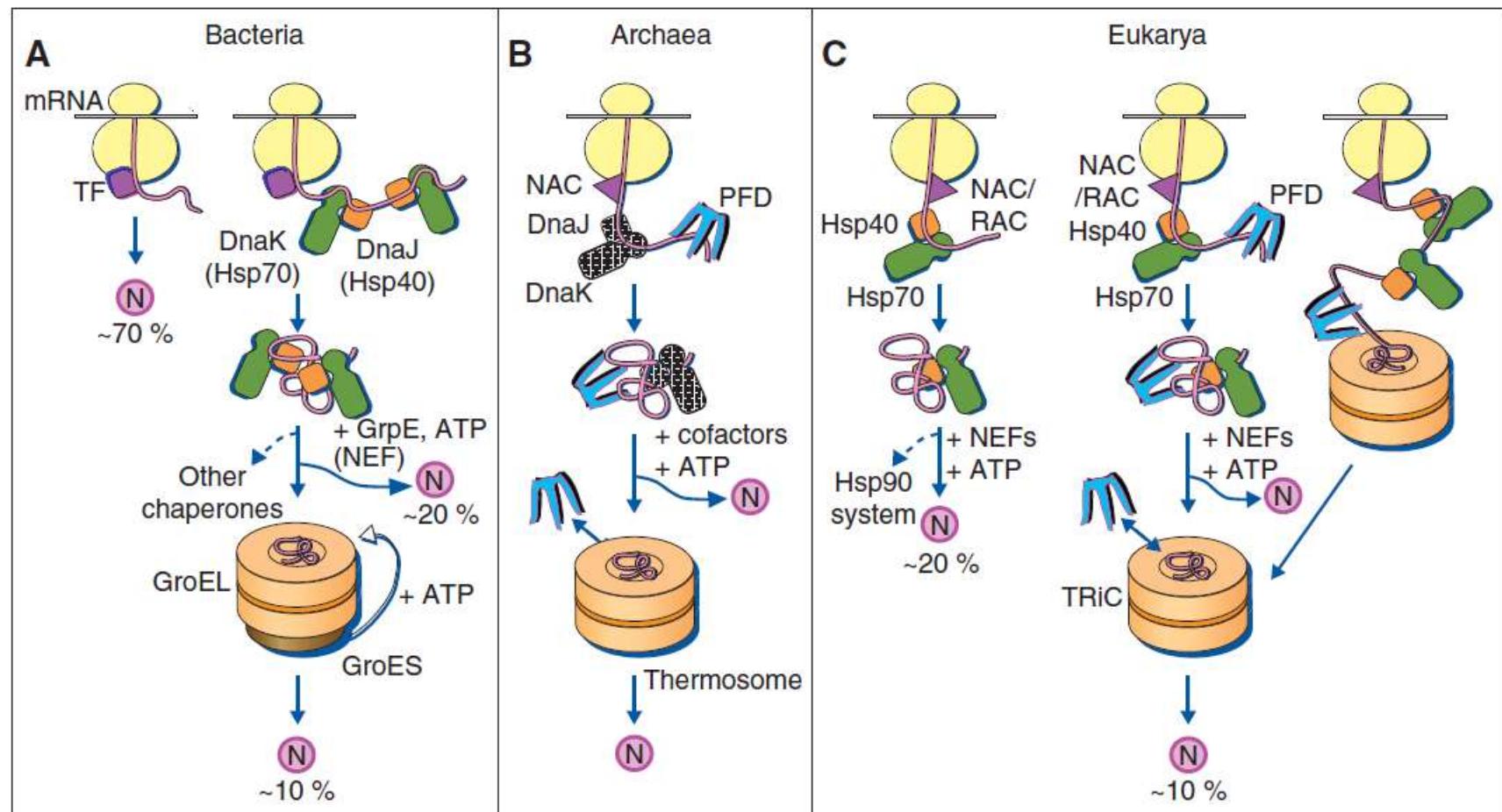
## Zvijanje v celici

V nasprotju z *in vitro* poskusi je koncentracija molekul v celicah bistveno večja.



# Šaperoni

Šaperoni so molekule, ki katalizirajo zvijanje proteinov in preprečujejo agregacijo nepravilno zvitih intermediatov. Mnoge so odkrili, ker se njihovo izražanje poviša pri toplotnem stresu, zato jih pogosto imenujemo tudi **proteini toplotnega šoka**. Šaperonini so vrsta šaperonov v obliki dvojnega obroča, ki vežejo nepravilno zvite proteine v svoji notranjosti in katalizirajo njihovo zvijanje v nativno obliko.

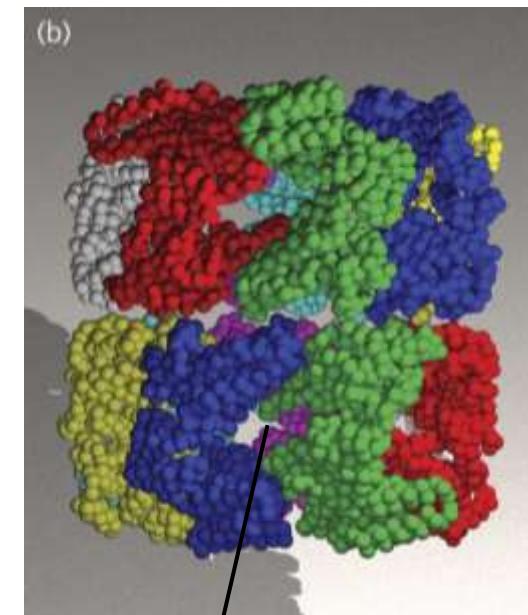
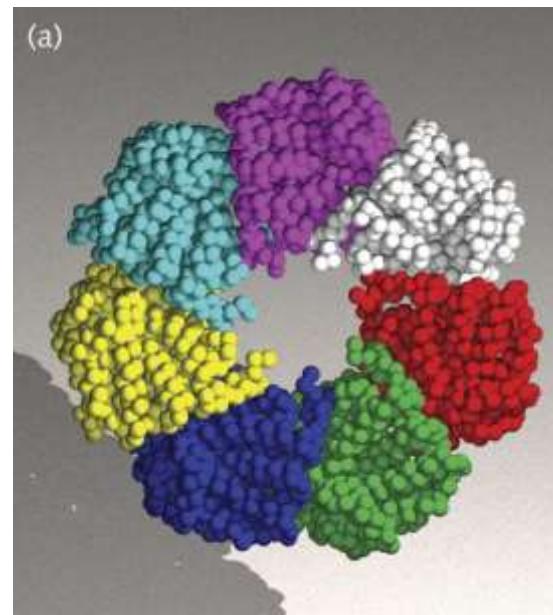
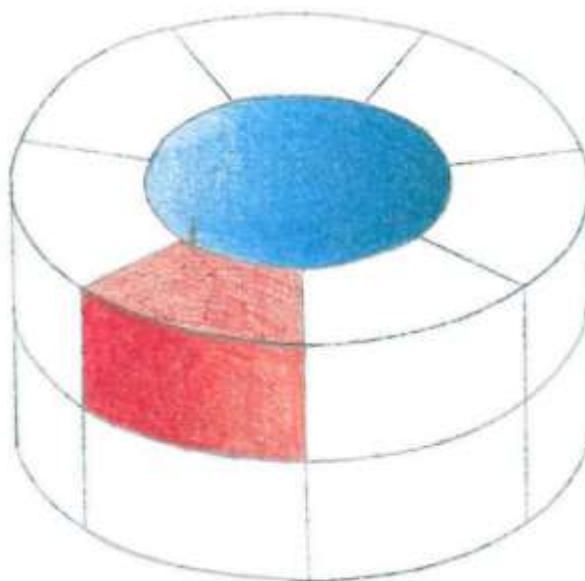


# Šaperoni

Šaperoni so molekule, ki katalizirajo zvijanje proteinov in preprečujejo agregacijo nepravilno zvitih intermediatov. Mnoge so odkrili, ker se njihovo izražanje poviša pri toplotnem stresu, zato jih pogosto imenujemo tudi **proteini toplotnega šoka**. Šaperonini so vrsta šaperonov v obliki dvojnega obroča, ki vežejo nepravilno zvite proteine v svoji notranjosti in katalizirajo njihovo zvijanje v nativno obliko.

V *E. coli* poznamo šaperoninski sistem, ki ga kodirata produkta *GroE* operona: GroEL in GroES.

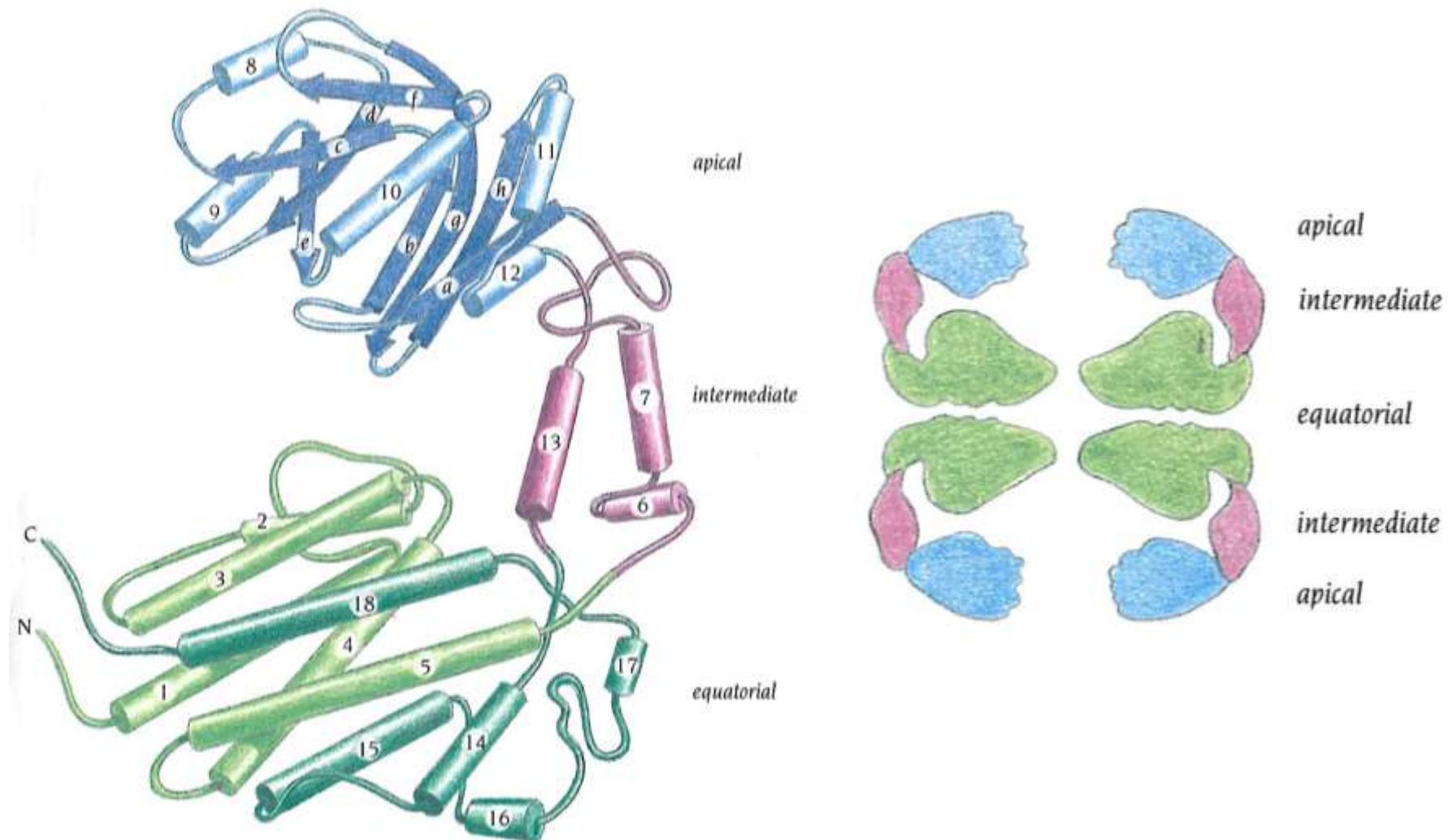
Mirujoči šaperonin je sestavljen iz 14 kopij GroEL organiziranih v dva obroča okoli osrednje votline.



# Šaperoni

V *E. coli* poznamo šaperonski sistem, ki ga kodirata produkta *GroE* operona: GroEL in GroES.

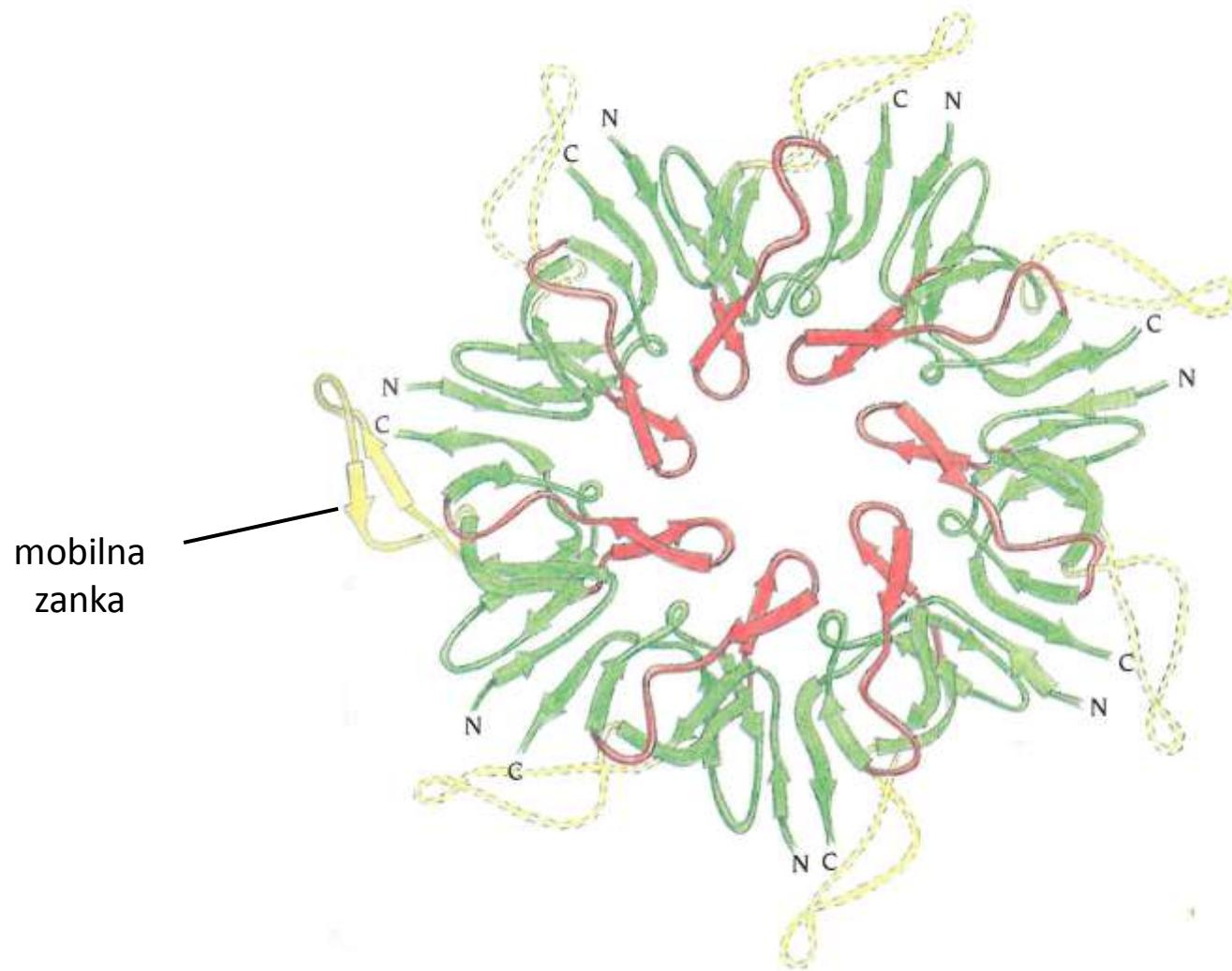
Vsi monomerji GroEL so zgrajeni iz treh domen ( $M_r$  58 kDa), obroča pa sta orientirani zrcalno eden na drugega.



# Šaperoni

V *E. coli* poznamo šaperonski sistem, ki ga kodirata produkta *GroE* operona: GroEL in GroES.

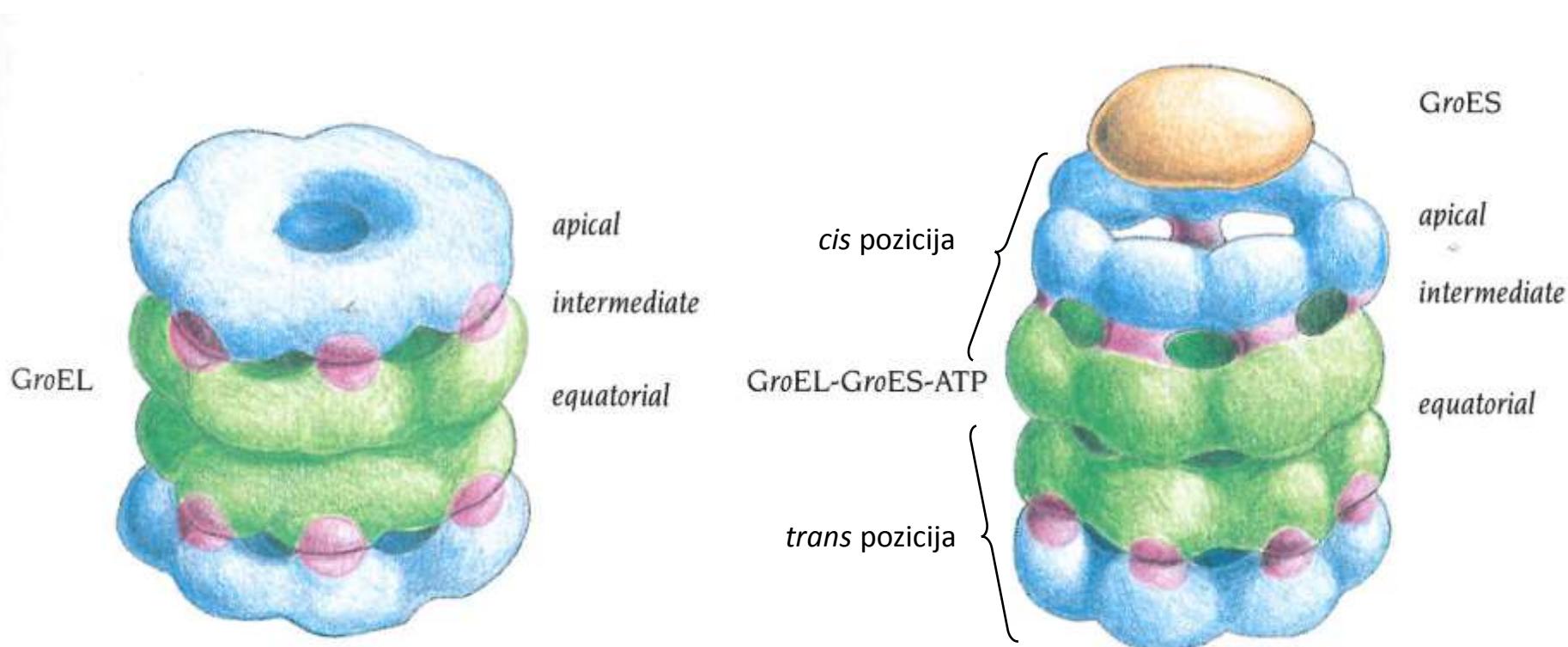
Molekule GroES (10 kDa) sestavljajo heptamer.



# Šaperoni

V *E. coli* poznamo šaperonski sistem, ki ga kodirata produkta GroE operona: GroEL in GroES.

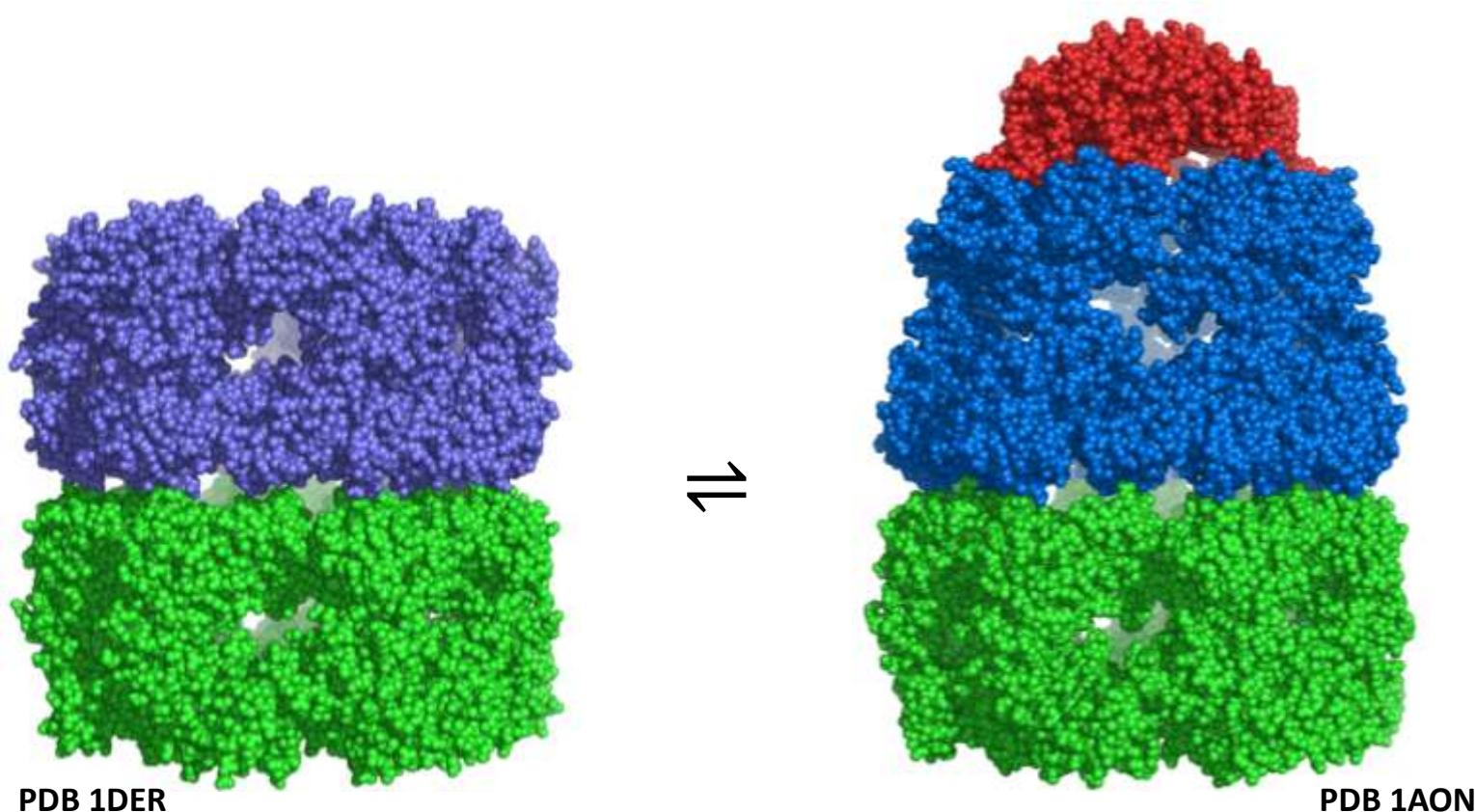
Ko se na GroEL veže GroES (prav tako iz sedmih podenot), pride do konformacijske spremembe v *cis* obroču, ki onemogoči vezavo GroES na drug konec GroEL. Vezava GroES poteče ob hidrolizi ATP v ADP. Podobno velja tudi za sproščanje GroES z GroEL.



# Šaperoni

V *E. coli* poznamo šaperonski sistem, ki ga kodirata produkta *GroE* operona: GroEL in GroES.

Konformacijsko sprememba v podenotah *cis* obroča of vezavi GroES:



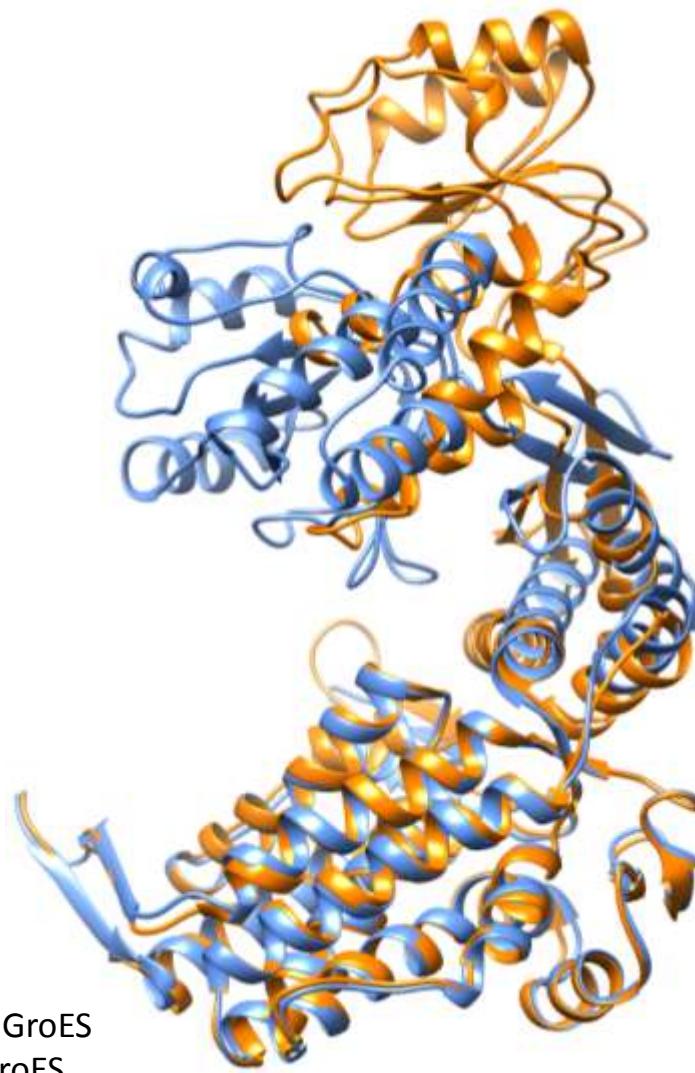
# Šaperoni

V *E. coli* poznamo šaperonski sistem, ki ga kodirata produkta *GroE* operona: GroEL in GroES.

Konformacijsko sprememba v podenotah *cis* obroča of vezavi GroES:

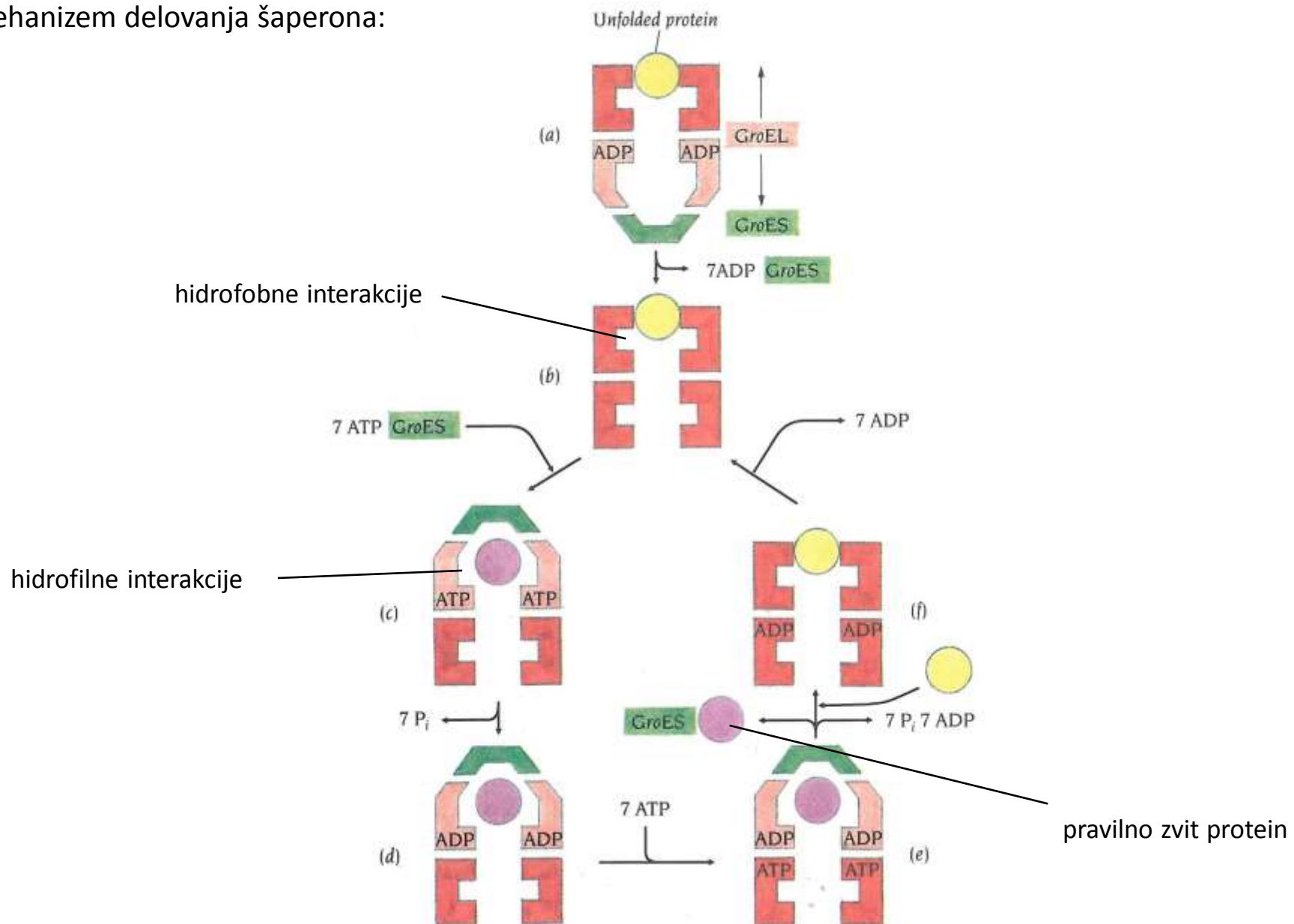
Konformacijska sprememba vsebuje premik apikalne domene za 90° glede na ekvatorialno domeno.

Sprememba ima funkcijске posledice – notranjost *cis* obroča se spremeni iz hidrofobne v hidrofilno – pomembno za zvijanje proteina, ki poteka le v obroču, kjer je vezan GroES.



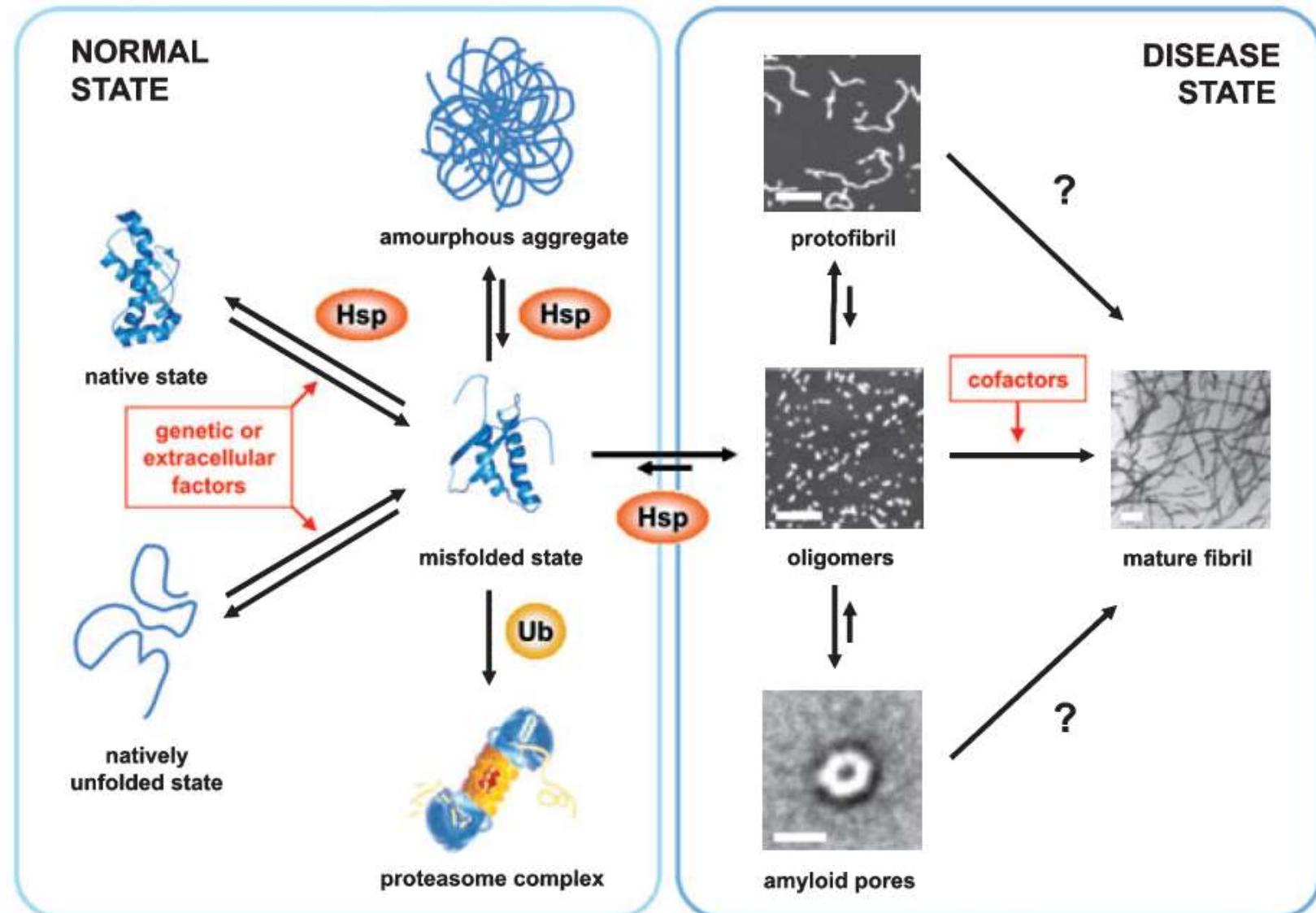
# Šaperoni

Mehanizem delovanja šaperona:

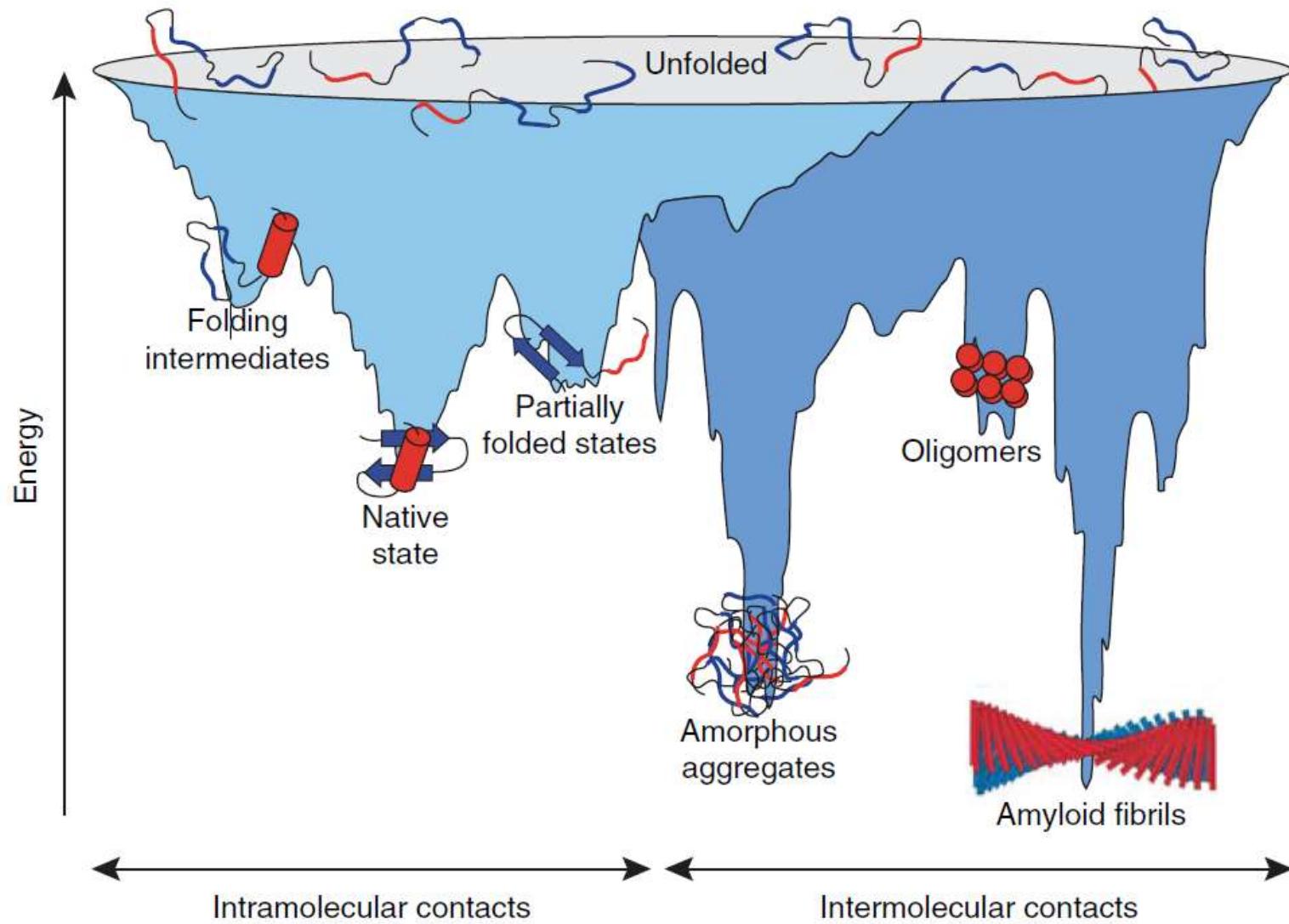


# Patološka agregacija proteinov

Agregacija proteinov je vzrok številnih bolezni.



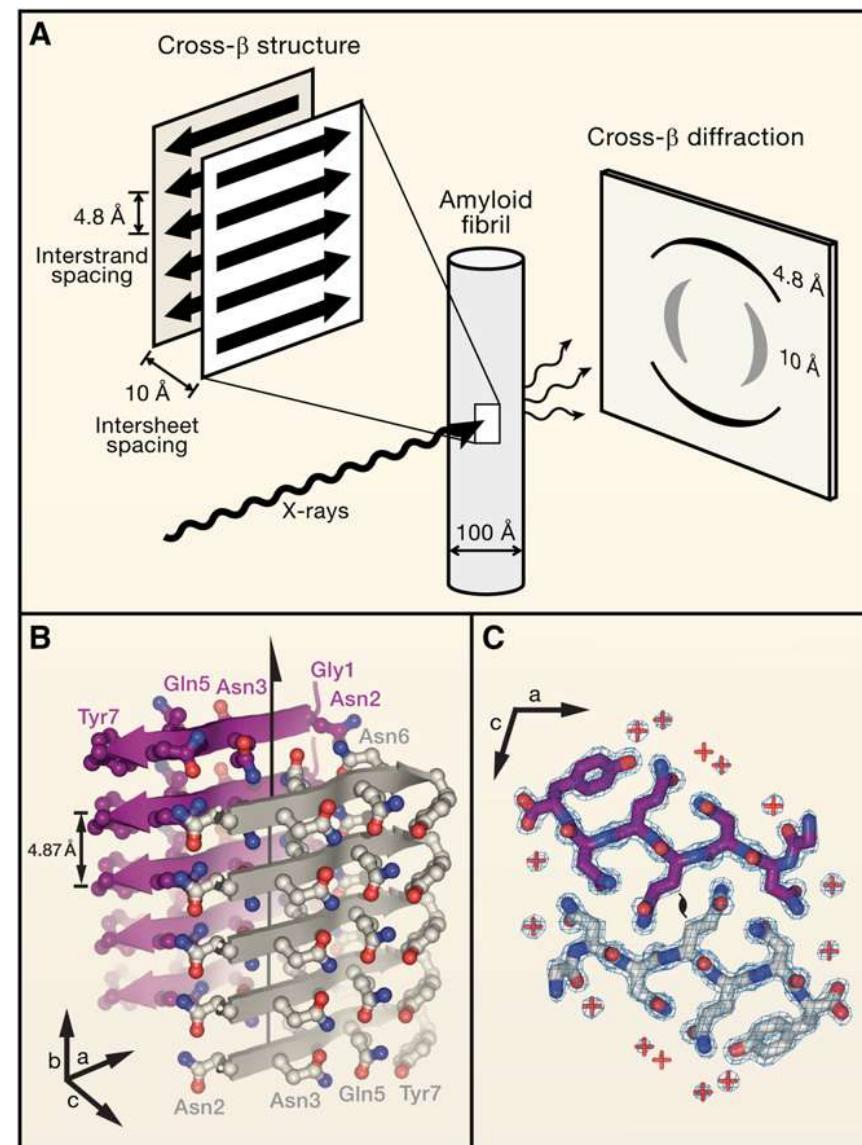
# Patološka agregacija proteinov



# Patološka agregacija proteinov

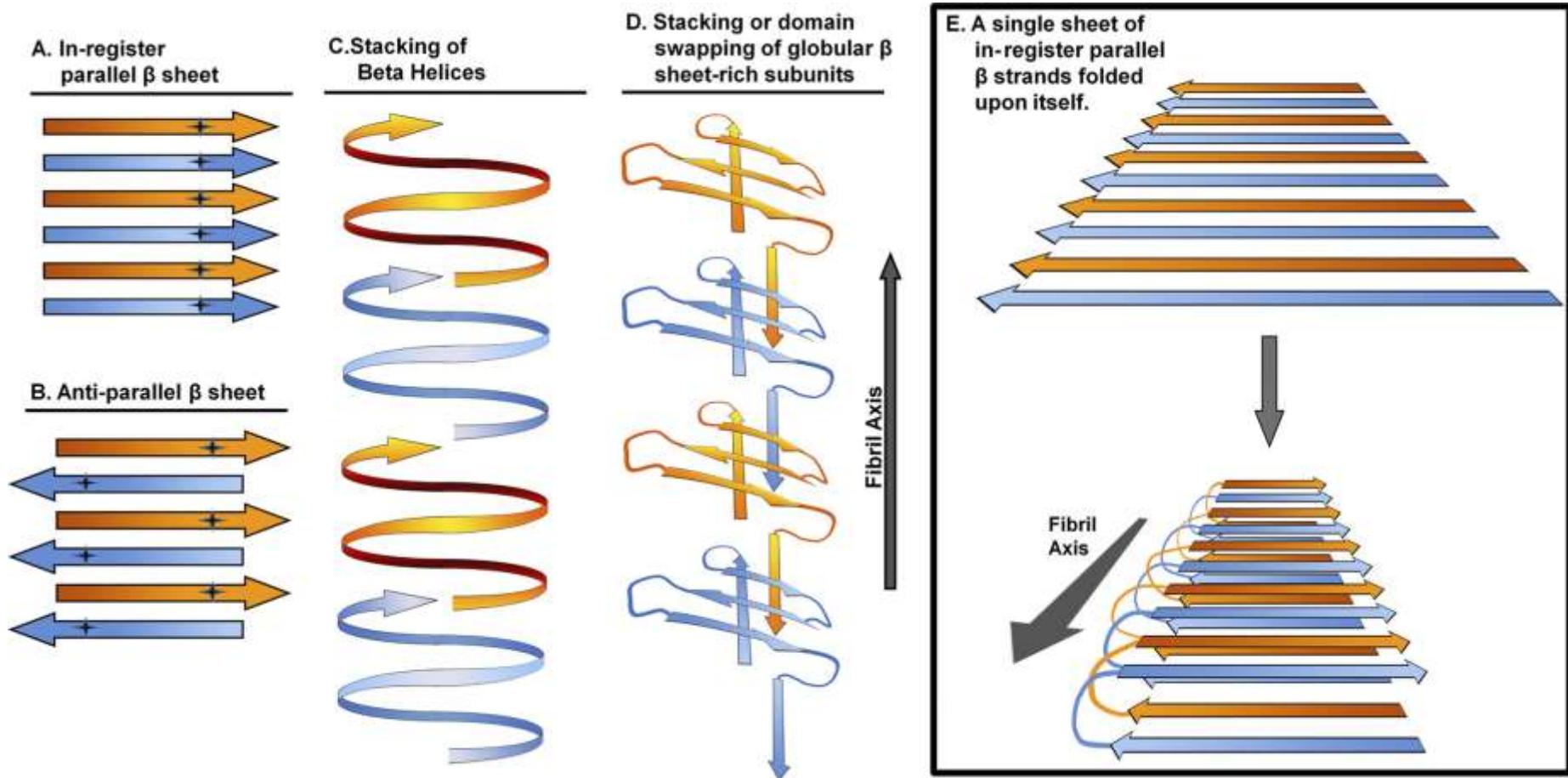
Skupna lastnost številnih nepovezanih patoloških stanj, povezanih z agregacijo proteinov (a zdaleč ne vseh!) je tvorba fibril sestavljenih iz  $\beta$  strukture – t.i. „cross  $\beta$ “ oz. amiloidna struktura.

Strukturo fibril se lahko preučuje z rentgensko difrakcijo (določi se strukturo urejenih delov strukture –  $\beta$  ploskev).



# Patološka agregacija proteinov

Za različne proteine so bile predpostavljene različne oblike  $\beta$  struktur. Amiloidom podobno zvitje lahko imajo tudi nepatološki proteini.



# Patološka agregacija proteinov

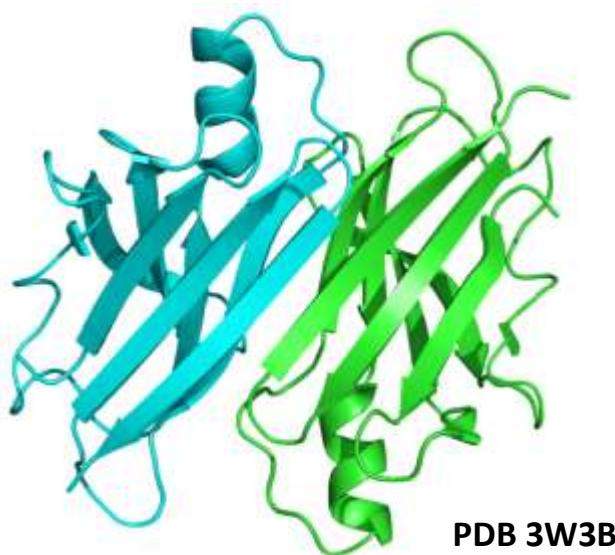
Agregacija proteinov je vzrok številnih bolezni.

<b>bolezen</b>	<b>povezan protein</b>
anemija srpastih celic	mutiran hemoglobin
klasične amiloidoze	lahke verige Ig, transtiretin, ....
pljučni emfizem	mutiran $\alpha$ 1-antitrypsin
Huntingtonova bolezen	patološka varianta huntingtina
Parkinsonova bolezen	$\alpha$ -sinuklein
Alzheimerjeva bolezen	amiloid $\beta$ , protein $\tau$
spongiformne encefalopatije	prionski protein

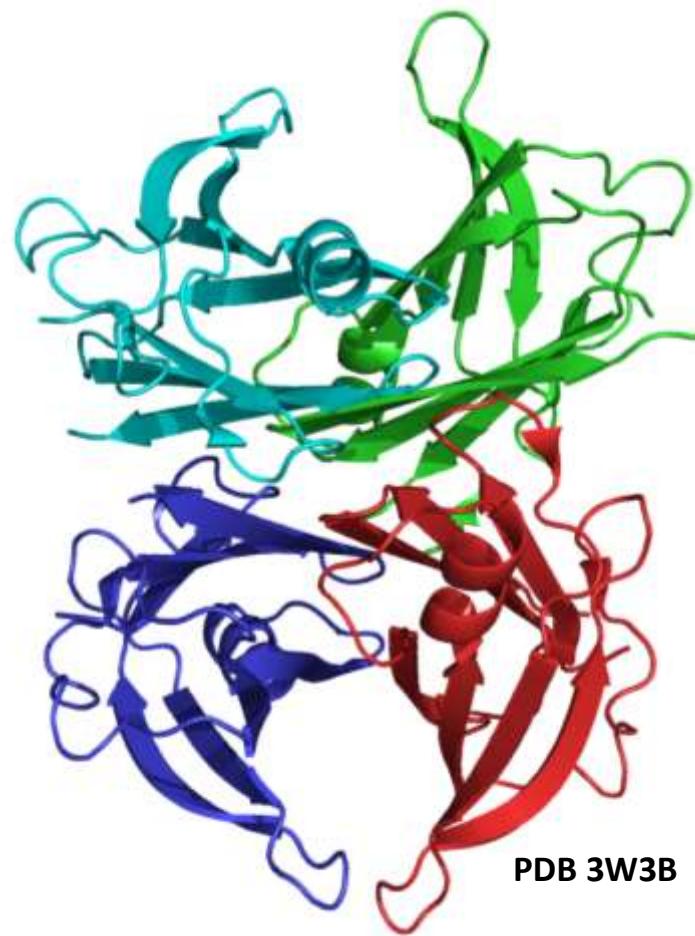
# Klasične amiloidoze

Zunajcelična akumulacija netopnih fibril premera 80-100 Å. Izraz *amiloid* izvira iz dejstva, da se fibrile barvajo z jodom (kot škrob). Fibrile bogate z  $\beta$  strukturami, pravokotnimi na os fibrile.

Primer: serumski protein transtiretin (homotetramer z maso 55 kDa)



dimer transtiretina

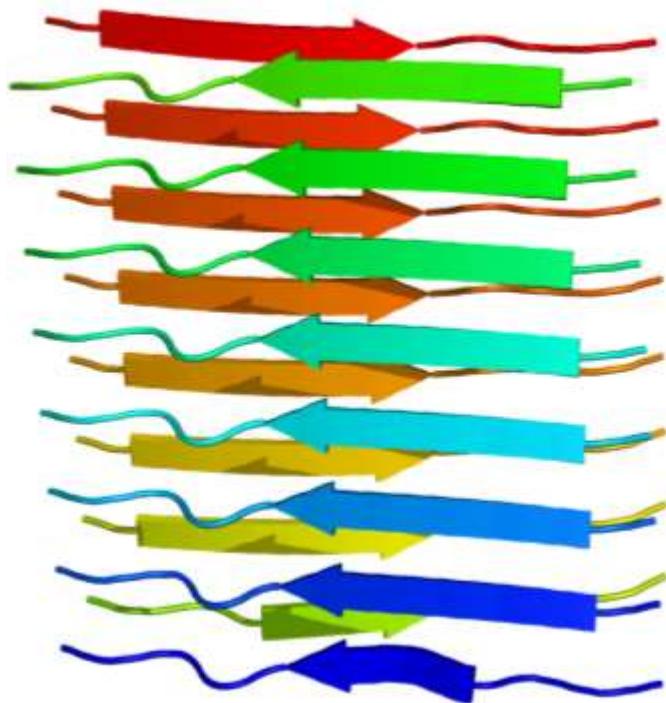


tetramer transtiretina

# Klasične amiloidoze

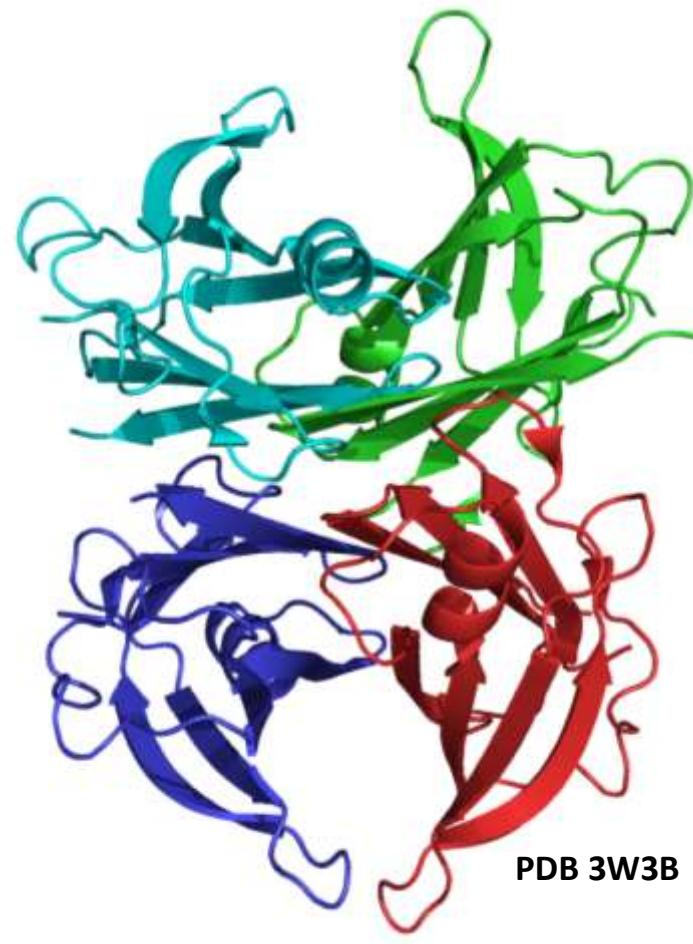
Zunajcelična akumulacija netopnih fibril premera 80-100 Å. Izraz *amiloid* izvira iz dejstva, da se fibrile barvajo z jodom (kot škrob). Fibrile bogate z  $\beta$  strukturami, pravokotnimi na os fibrile.

Primer: serumski protein transtiretin (homotetramer z maso 55 kDa)



PDB 2M5N

fibrila transtiretina

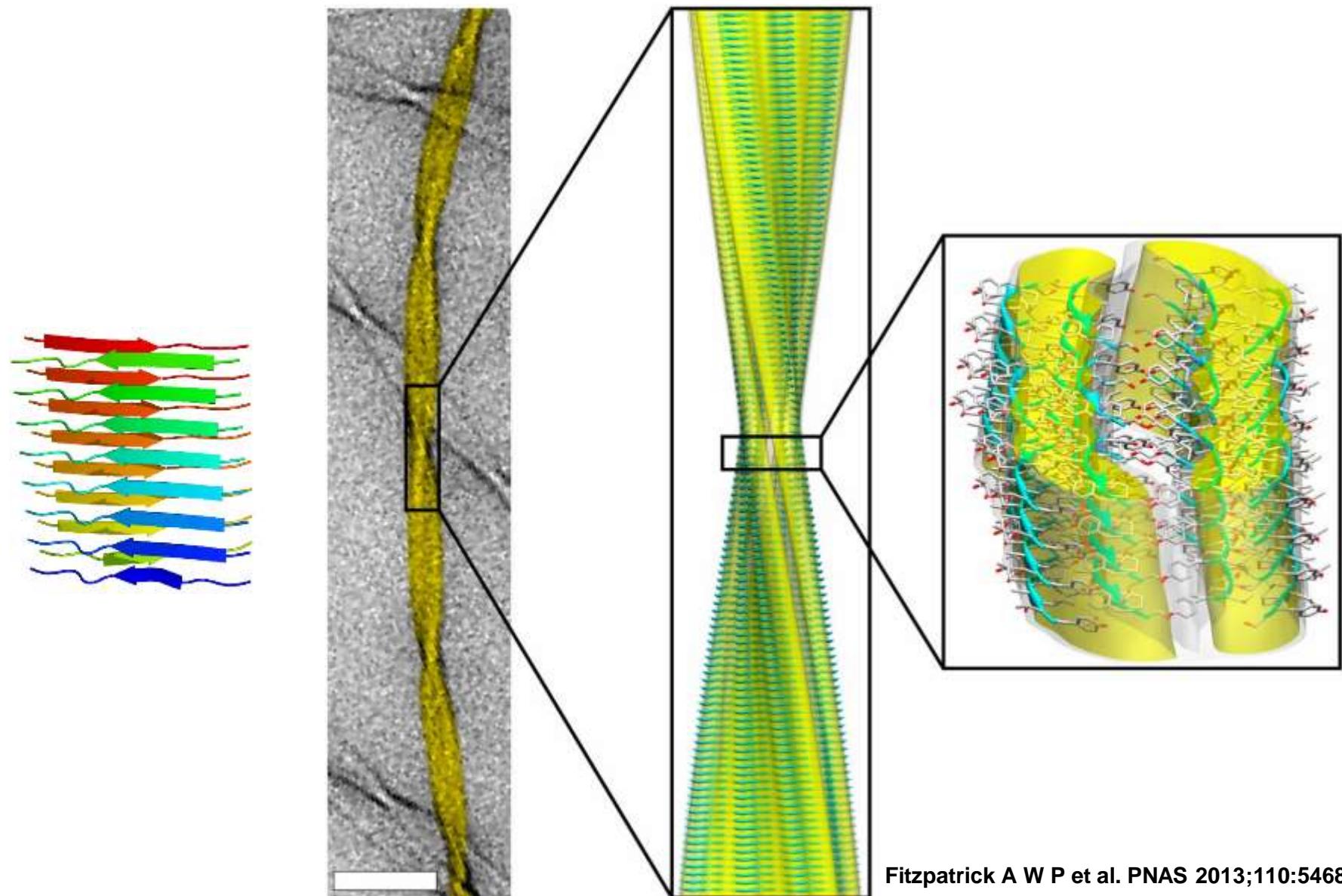


PDB 3W3B

tetramer transtiretina

# Klasične amiloidoze

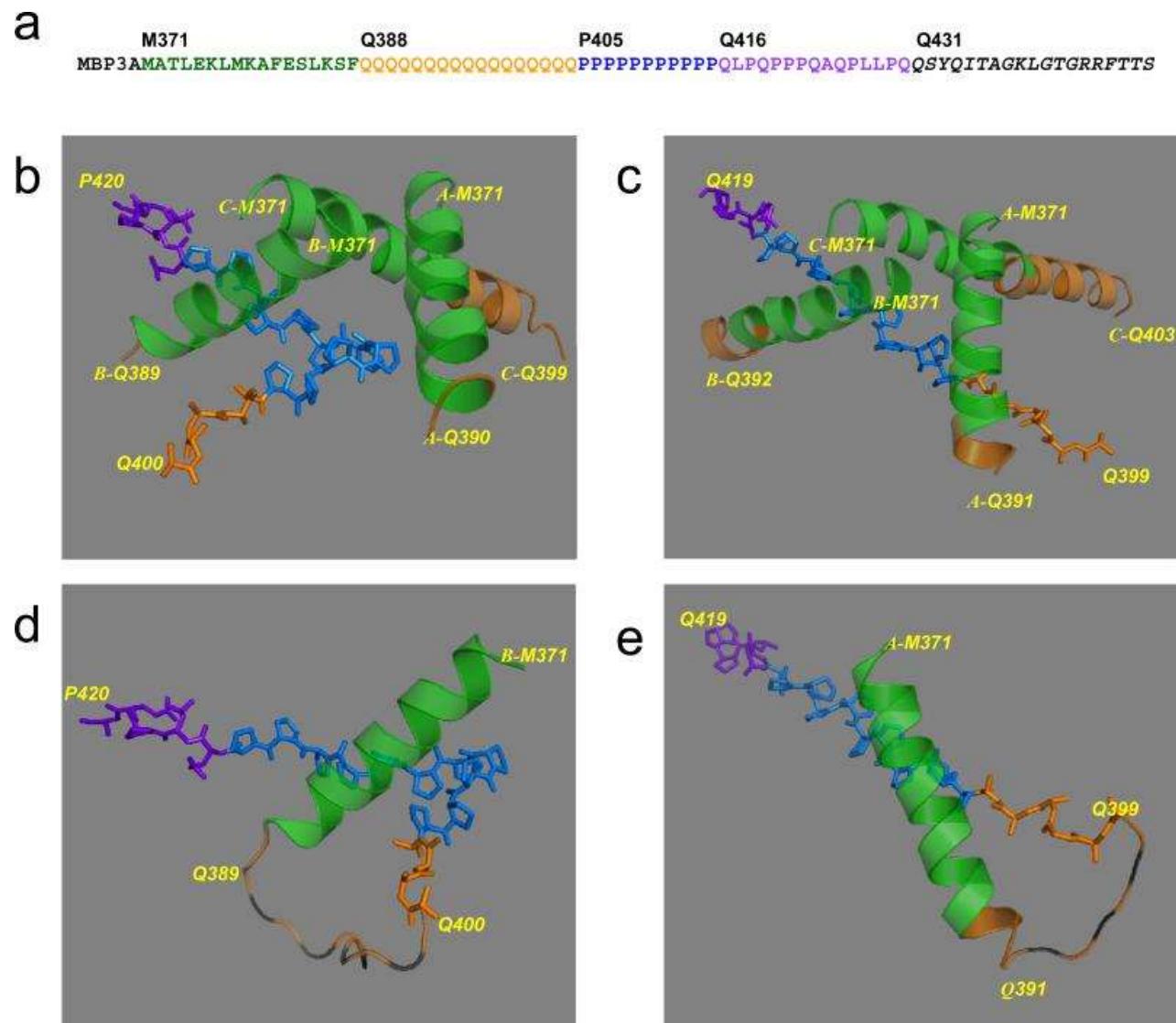
Primer: serumski protein transtiretin (homotetramer z maso 55 kDa)



# Huntingtonova bolezen

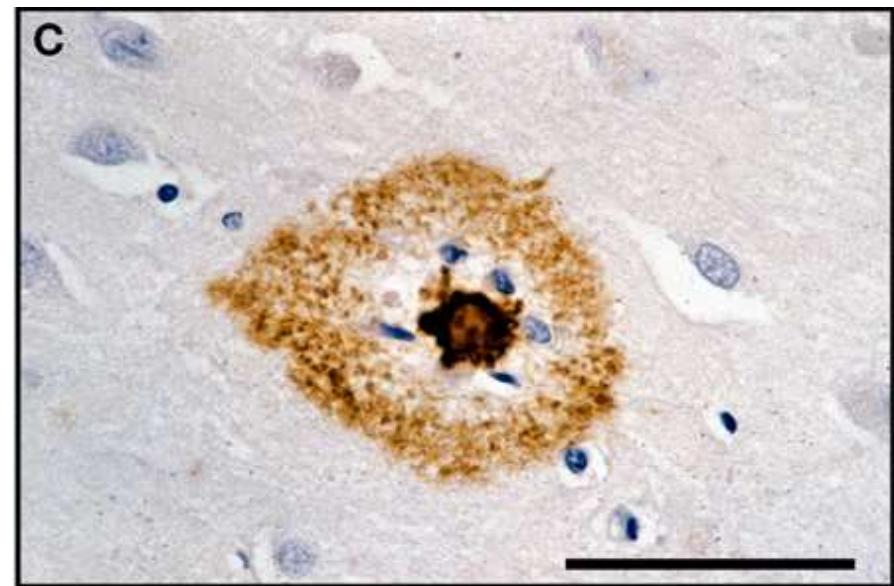
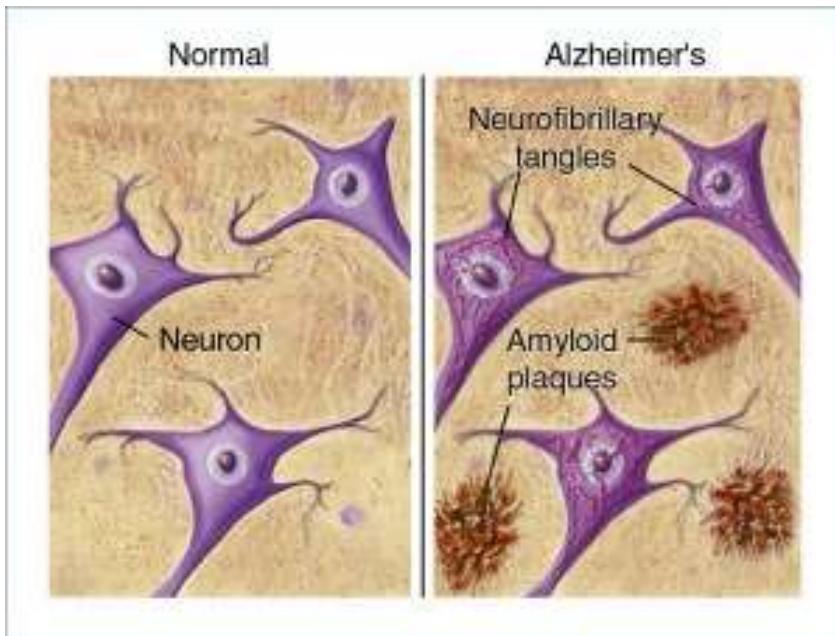
Huntingtonova bolezen je nevrodegenerativna bolezen, ki je posledica mutacij v proteinu huntingtin – 350 kDa citoplazemski protein. Bolezen je autosomna dominantna – je primer poliQ bolezni.

PoliQ regija je podvržena polimorfizmu, zaradi katerega se št. Q ponovitev med ljudmi močno razlikuje. Če jih je manj kot 27, protein ni podvržen agregaciji. Z večanjem števila ostankov tveganje za bolezen narašča.



# Alzheimerjeva bolezen

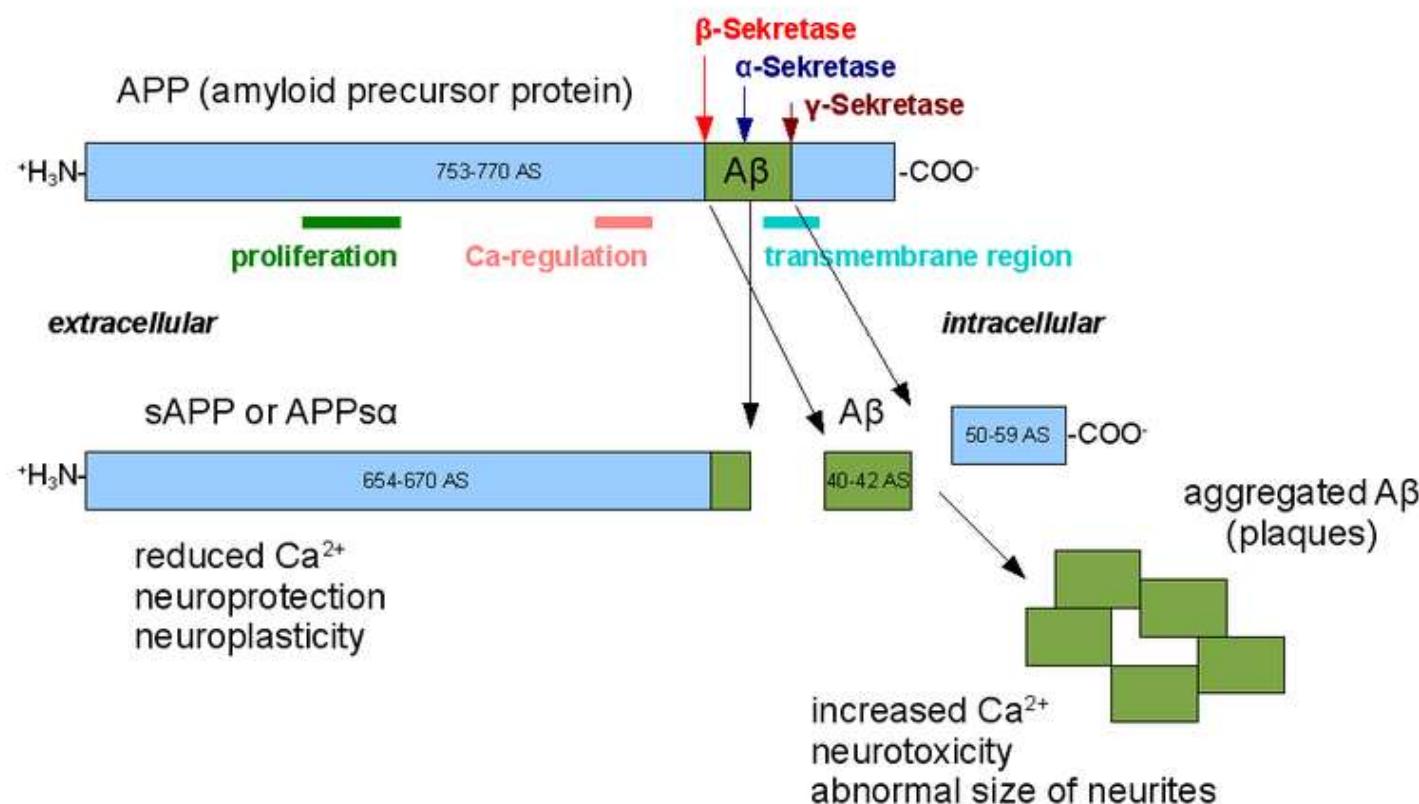
Nevrodegenerativna bolezen, pogosta pri starejših ljudeh. Povezana je s tvorbo dveh struktur – **senilnih plakov** – zunajcelični depoziti **amiloida  $\beta$**  – N-končnega fragmenta **amiloidnega prekurzorskega proteina** (ponavadi ostanki 1-40 ali 1-42) (receptor na površini nevronov) in nevrfibrilarnih pentelj – vlaken v nevronih, zgrajenih iz **proteina  $\tau$**  (stabilizira mikrotubule).



# Alzheimerjeva bolezen

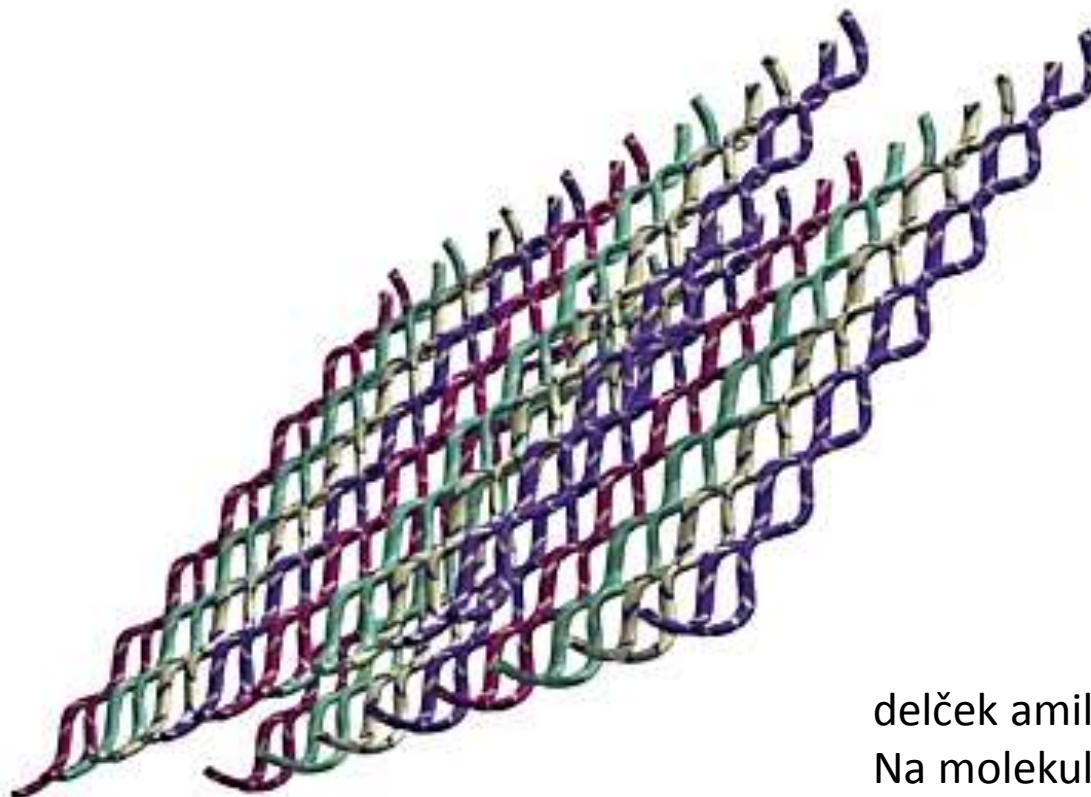
Nevrodegenerativna bolezen, pogosta pri starejših ljudeh. Povezana je s tvorbo dveh struktur – **senilnih plakov** – zunajcelični depoziti **amiloida  $\beta$**  – N-končnega fragmenta **amiloidnega prekurzorskega proteina** (dolg 40 ali 42 ostankov) (receptor na površini nevronov) in nevrobibrilarnih pentelj – vlaken v nevronih, zgrajenih iz **proteina  $\tau$**  (stabilizira mikrotubule).

Amiloid  $\beta$  peptid nastane po cepitvi APP z  $\beta$  in  $\gamma$ -sekretazama.  $\alpha$ -sekretaza cepi na poziciji med obema in ščiti pred Alzheimerjevo boleznijo.



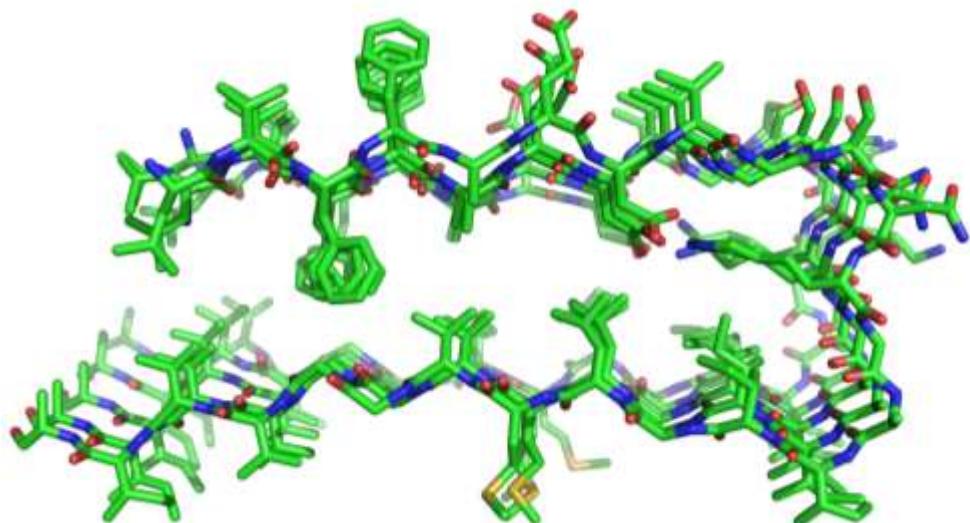
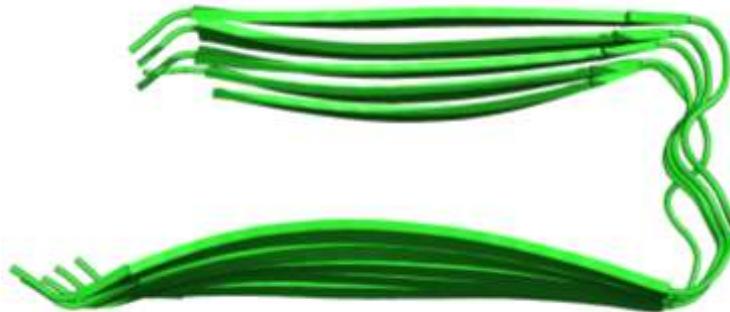
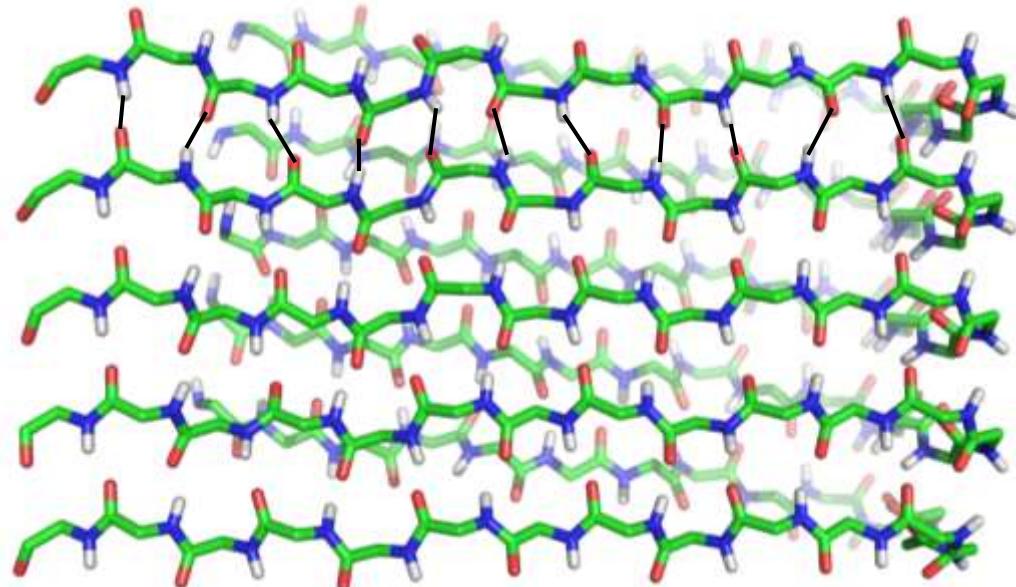
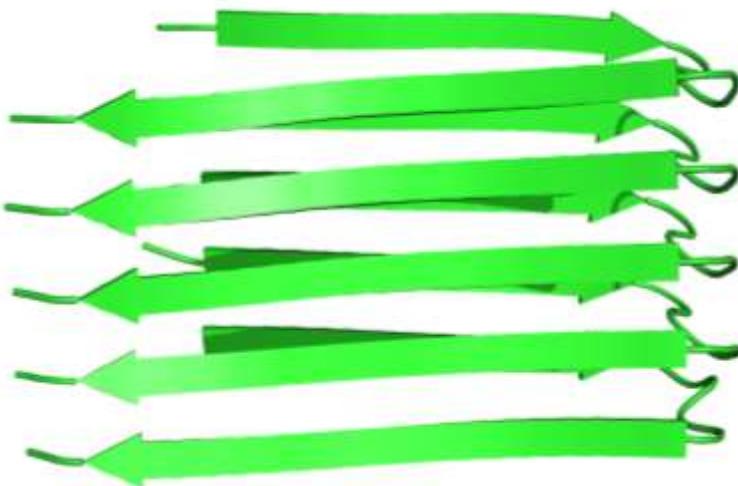
# Alzheimerjeva bolezen

Nevrodegenerativna bolezen, pogosta pri starejših ljudeh. Povezana je s tvorbo dveh struktur – **senilnih plakov** – zunajcelični depoziti **amiloida  $\beta$**  – N-končnega fragmenta **amiloidnega prekurzorskega proteina** (ponavadi ostanki 1-40 ali 1-42) (receptor na površini nevronov) in nevrfibrilarnih pentelj – vlaken v nevronih, zgrajenih iz **proteina  $\tau$**  (stabilizira mikrotubule).



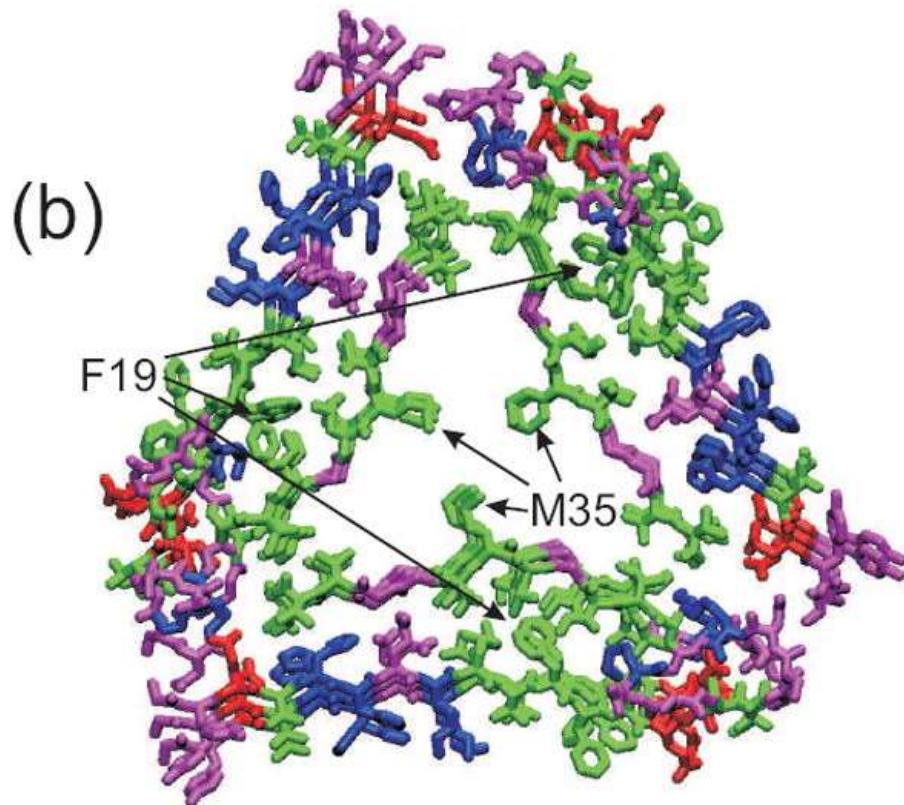
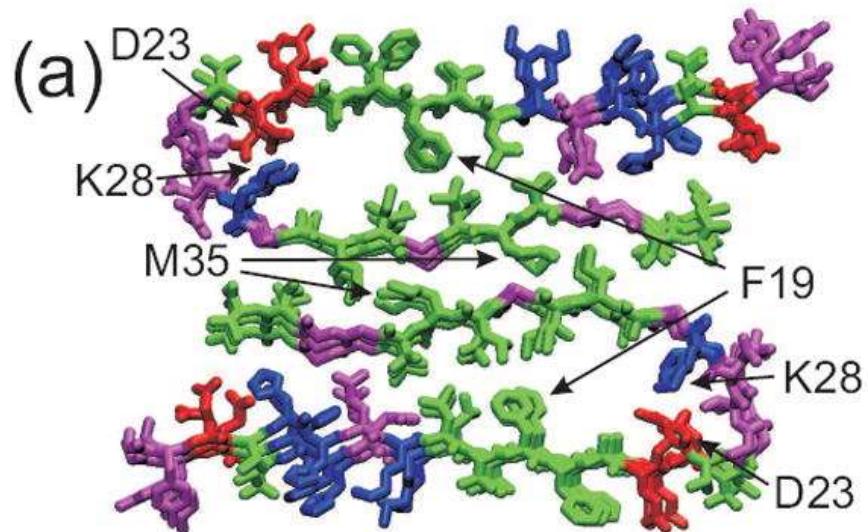
# Alzheimerjeva bolezen

Struktura cross- $\beta$  ploskve amiloida  $\beta$ .



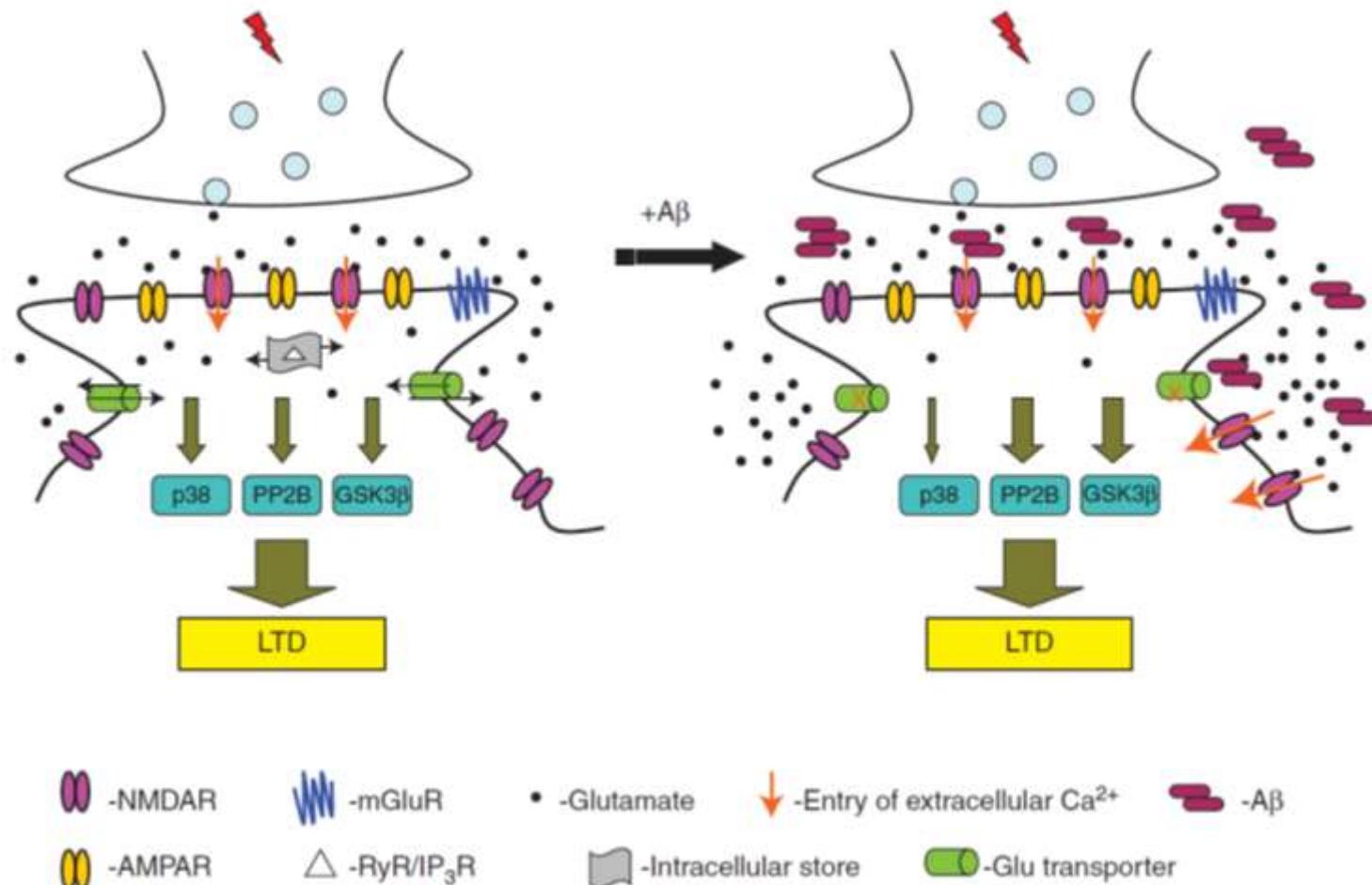
# Alzheimerjeva bolezen

Pri A $\beta$  je možna tvorba več morfološko različnih oblik fibril, odvisno od pogojev okolja.



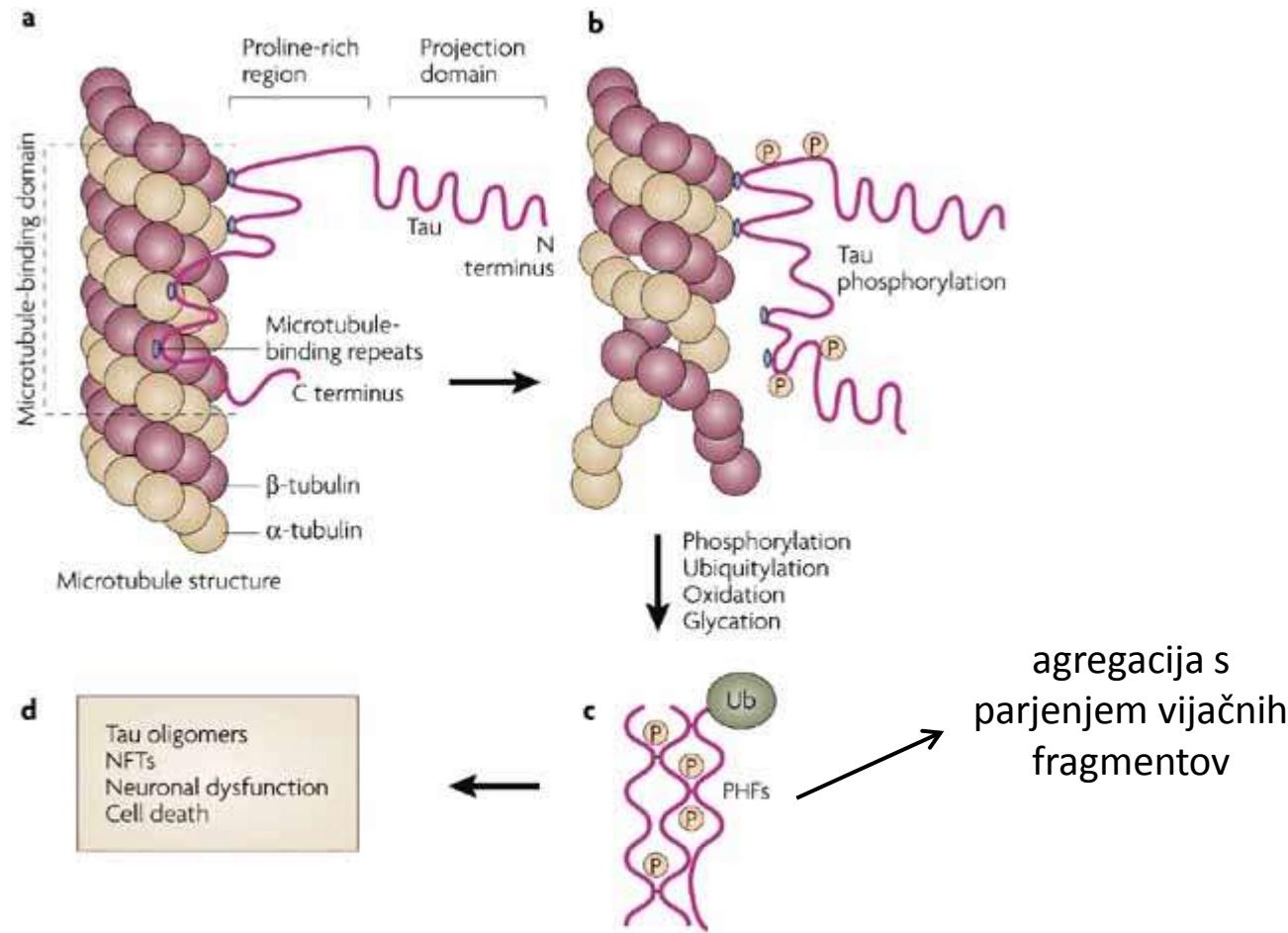
# Alzheimerjeva bolezen

Nevrotoksičnost amiloidnih fibiril – primarno nevrotoksični naj bi bili manjši fragmenti.



# Alzheimerjeva bolezen

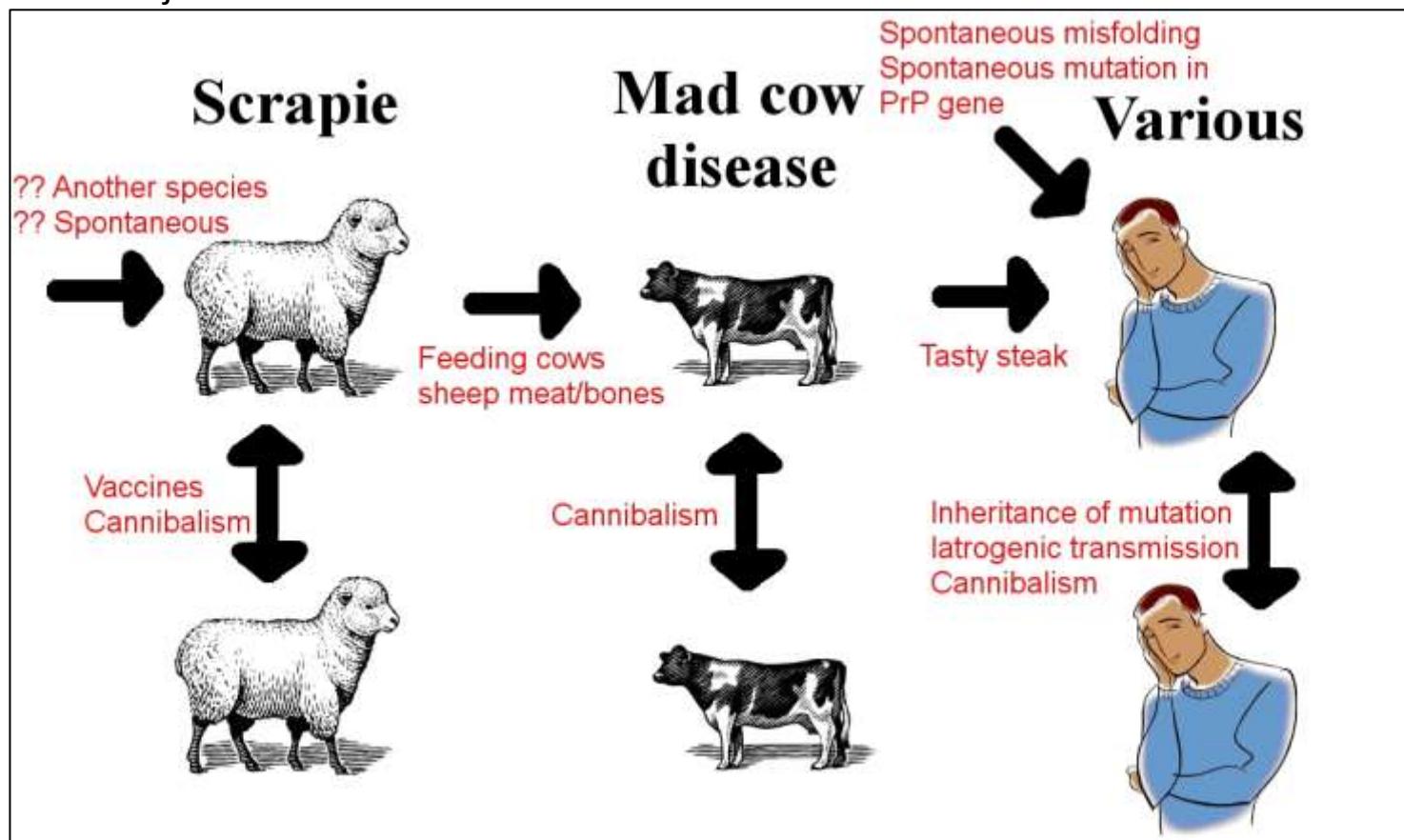
Regulacija in disregulacija proteina  $\tau$ :



# Prioni

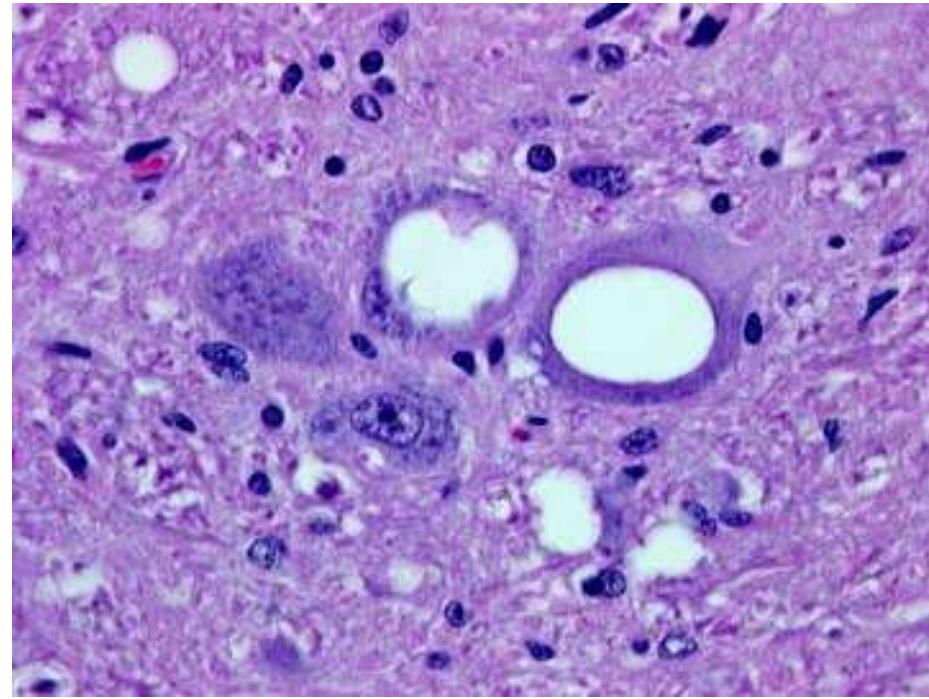
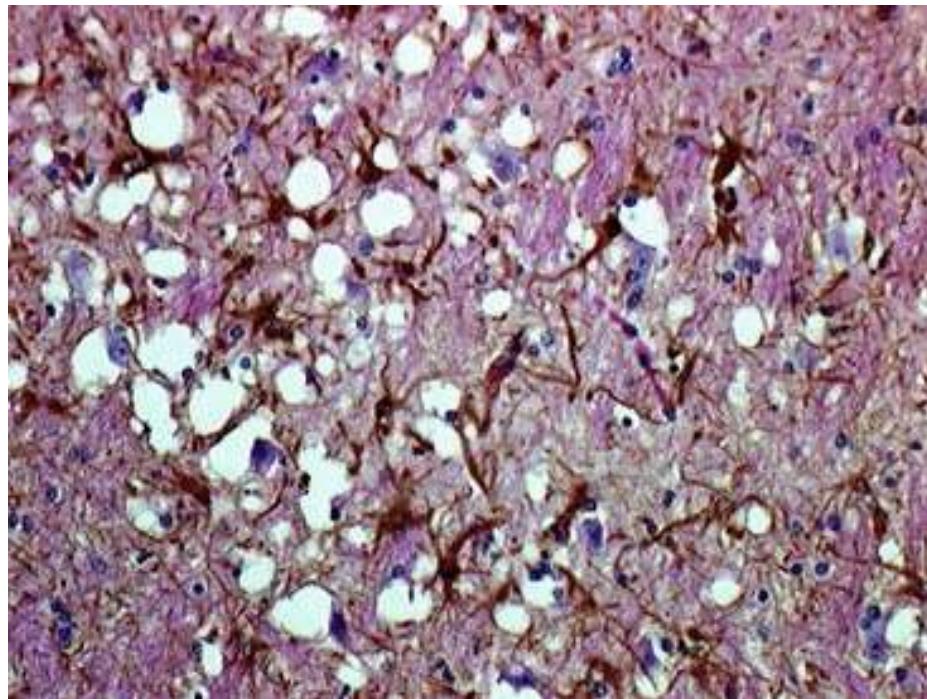
**Prion = Protein Infection** (1982, Stanley B. Prusiner)

Prioni so edini kužni delci, ki so sestavljeni pretežno oz. izključno iz proteinov (patogene oblike prionskega proteina **PrP**) in ne vsebujejo nukleinskih kislin. Prenašajo se lahko med različimi vrstami. Prioni povzročajo bolezni, ki jih imenujemo **transmisivne spongiformne encefalopatije**. Pri človeku je najpogostejša **Creutzfeldt-Jakobova bolezen (CJB)** – začne se z depresijo in težavami s spominom, nadaljuje z demenco, norostjo, nekontroliranim krčenjem mišic in konča s smrtjo znotraj 1 leta. Prisotni so tudi dedni faktorji.



# Prioni

## Spongiformno možgansko tkivo

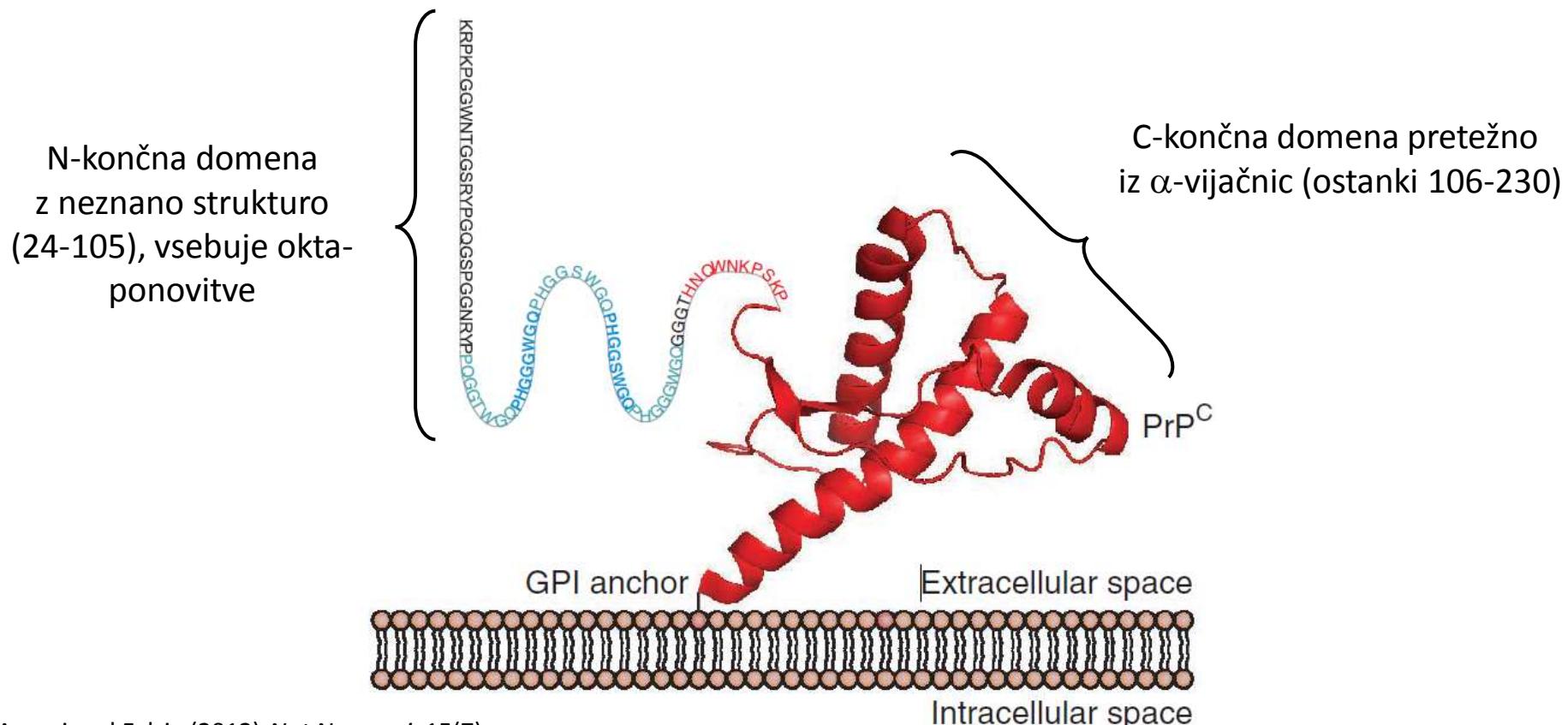


<http://mvc.bioweb.dcccd.edu/weblinks/scbse2b.htm>

# Prionski protein

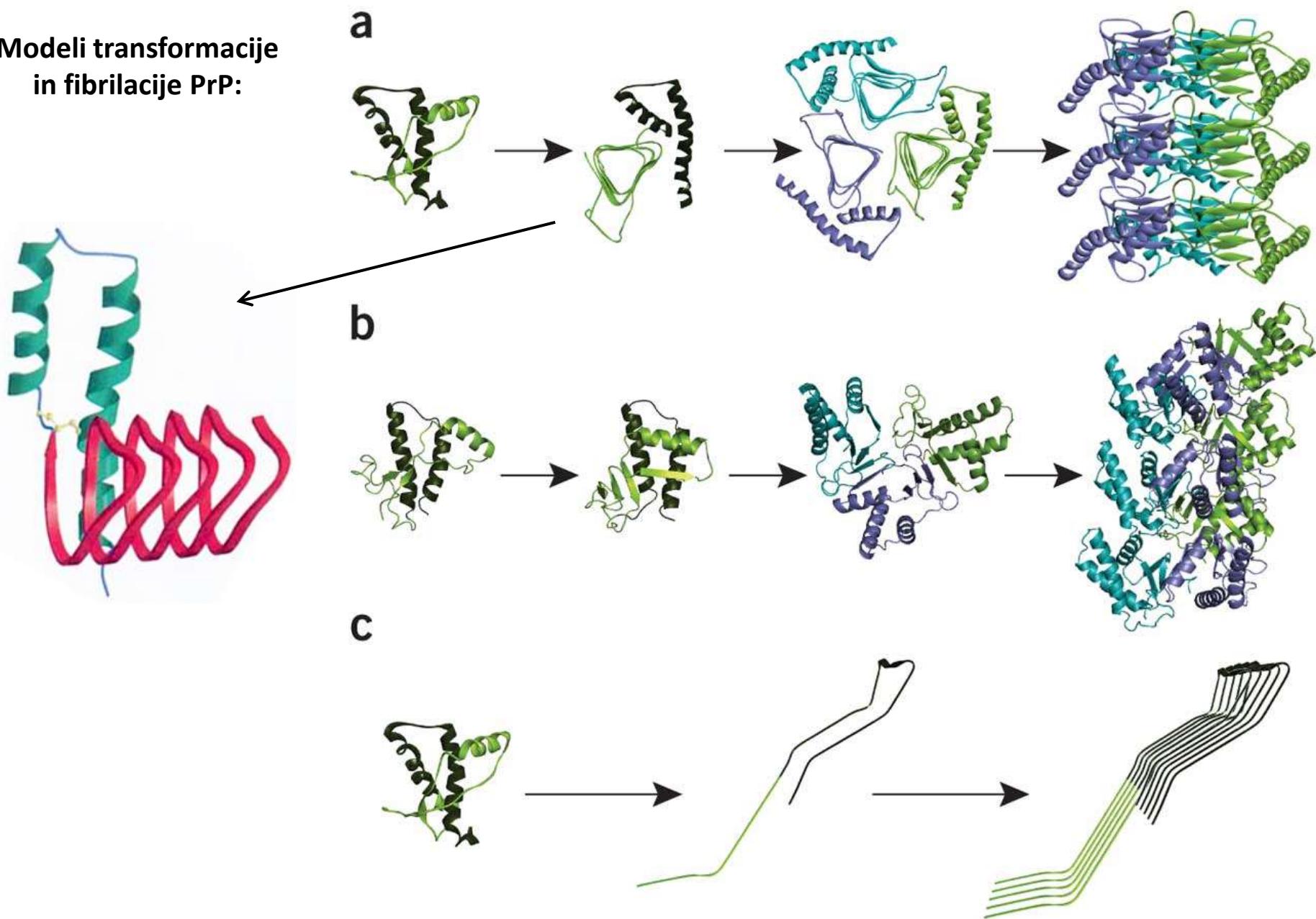
**Prionski protein Prp** je okoli 200 ak ostankov velik protein, ki je pripet na zunanjem membranu možganskih celic.

Normalna celična oblika **PrP<sup>C</sup>** ni nevarna, se pa iz neznanega razloga lahko pretvori v patološko obliko **PrP<sup>Sc</sup>** (vloga proteolize?).

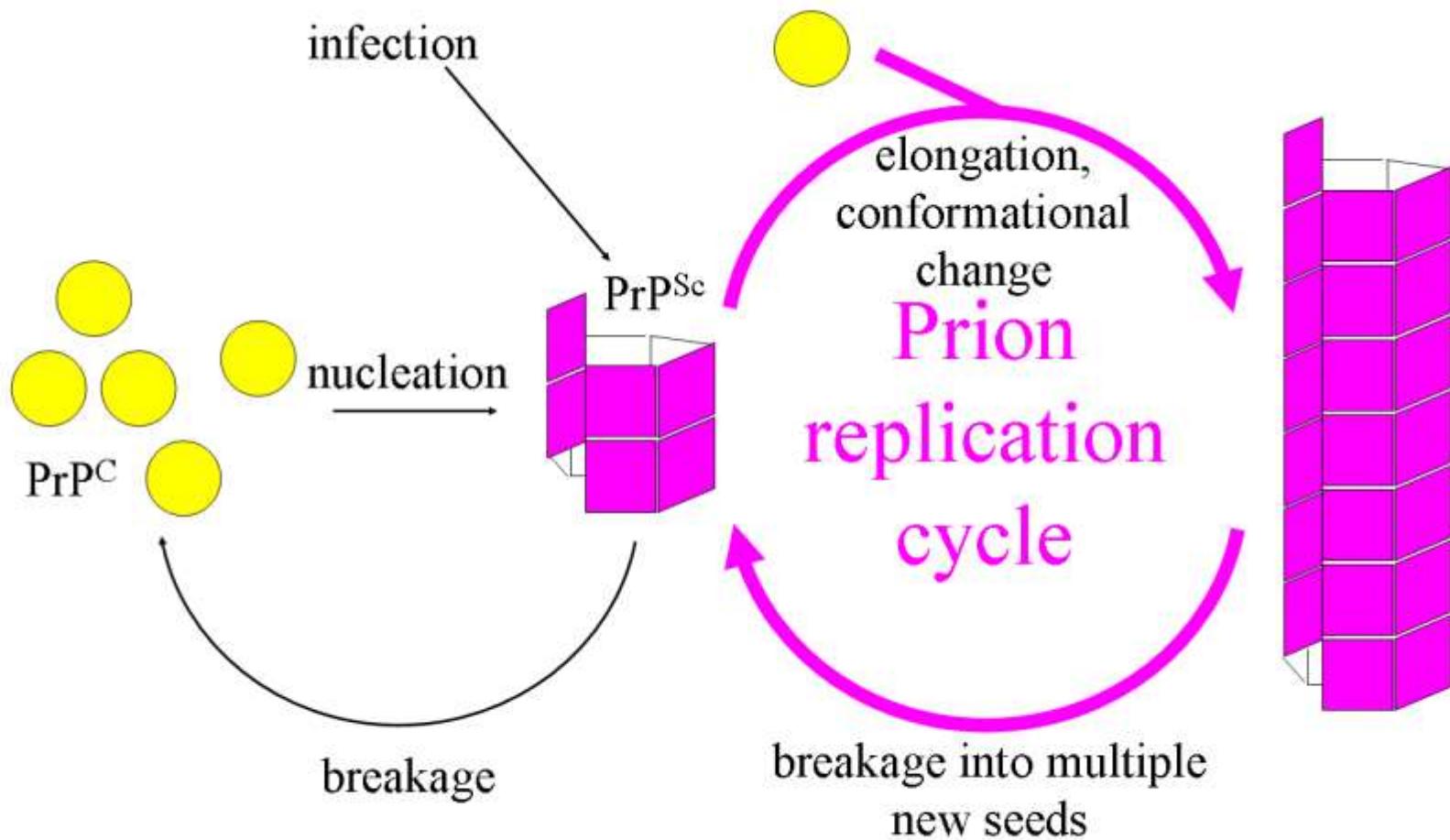


# Transformacija PrP

Modeli transformacije  
in fibrilacije PrP:

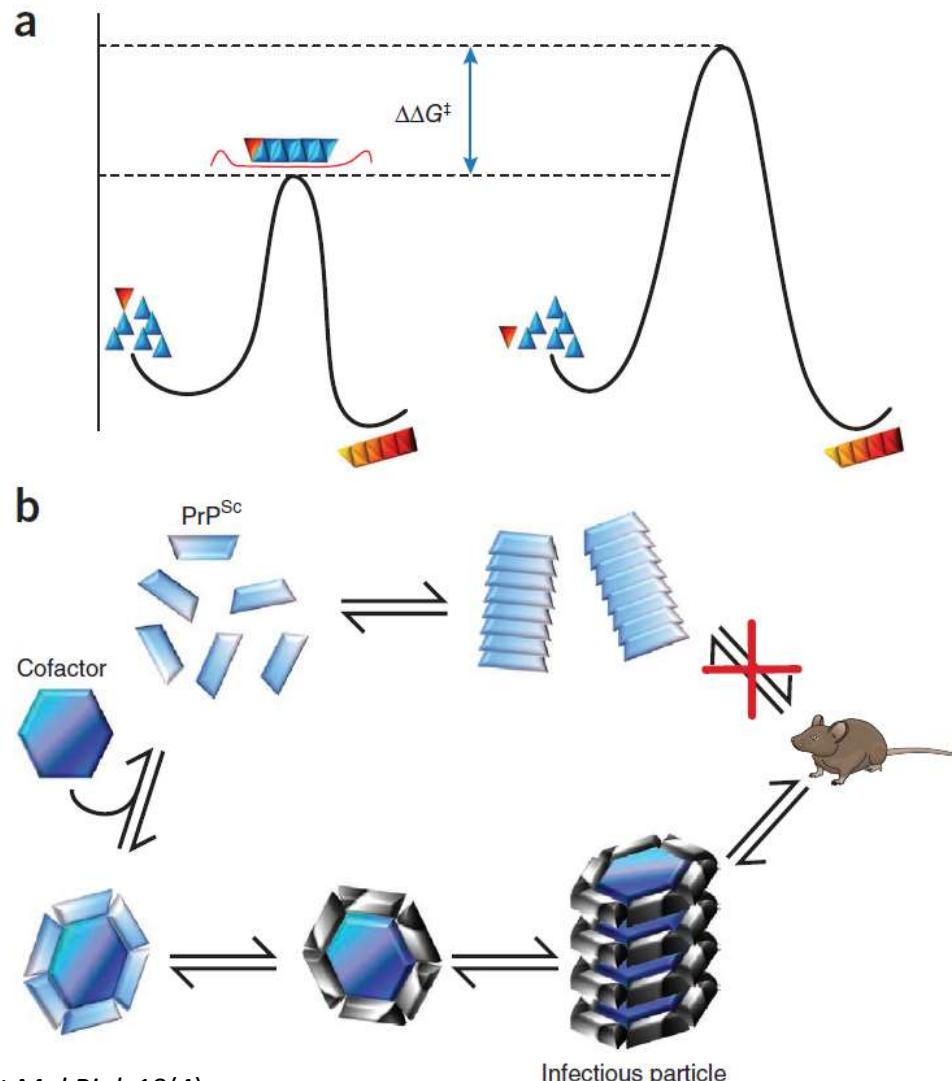


# Replikacijski cikel priona



# Potreba po kofaktorjih

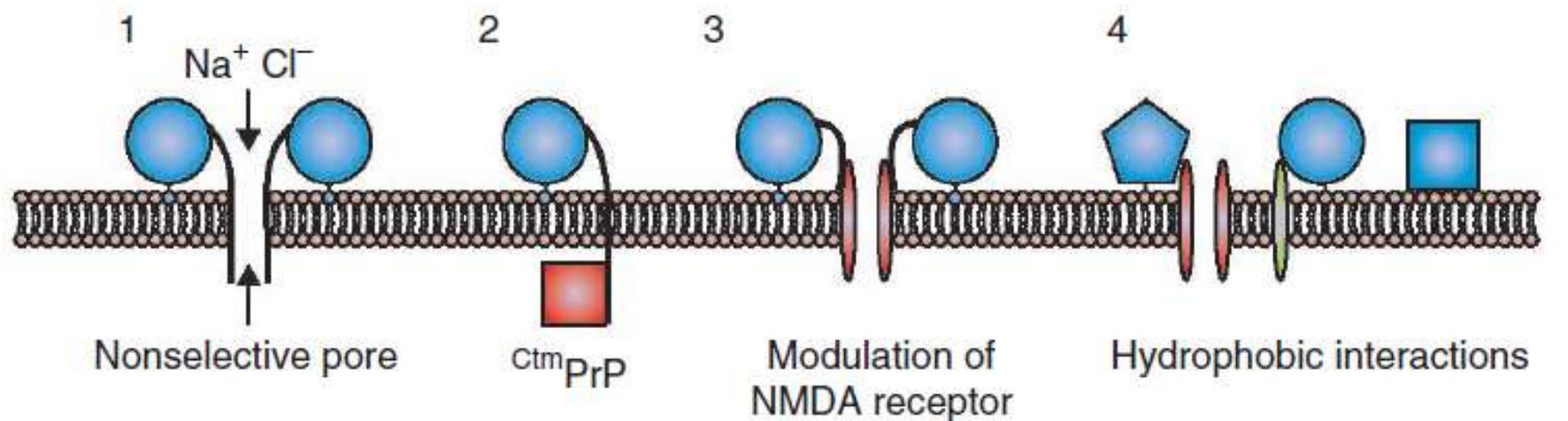
Dlje časa se že preučuje možnost, ali so za toksičnost in/ali propagacijo prionov potrebni še določeni neznani kofaktorji. Definitivnih dokazov ni.



# Toksičnost priona

Mehanizem toksičnosti ni poznan.

Ve se le, da mora za toksičnost biti PrP vezan na membrano preko GPI sidra.



tvorba por

interakcije s  
citosolnimi  
proteini

ekscitotoksičnost  
(odmrтje zaradi močne  
vzburjenosti)

porušenje integritete  
membrane