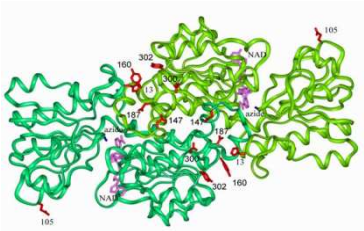


PROTEİN KİMYASI

Ders 2: PROTEİN KATLANMASI
(Protein folding/unfolding)

Yıldız Teknik Üniversitesi
Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü
2014

PROTEİN KATLANMASI (Protein folding/unfolding)

Fizolojik koşullar altında bir protein molekülü düzensizlik ve düzen arasında geçiş durumundadır. Bu **olaya katlanma/ açılma** denir.

PROTEİN KATLANMASININ ÖNEMİ

Amino Asit Dizi Bilgisi → **3D Protein Yapısı** ↔ **Protein Fonksiyonu**

Tüm biyolojik işlemler proteinin kendine özgü ve görev aldığı iş için uygun olan konformasayona katlanması ve bu konformasyonda kararlılığını koruyabilmesine (stabilite) bağlıdır.

Bir polipeptid zinciri katlanırken aynı zamanda kararlılığını da arttırır.

Protein katlanmasını yönlendiren kuvventler ile protein kararlılığını sağlayan kuvvetler aynıdır bu nedenler protein stabilite ve katlanma çalışmaları birbirinden ayrılmaz çalışmalardır.

Proteinlerin biyolojik olarak aktif oldukları yapılara nasıl katlandığı ve bu fonksiyonel aktif yapının nasıl korunduğunun bilinmesi neden önemlidir

G21 Bir proteinin fonksiyonu onun doğru yapılanmasıyla meydana gelir. Sinir sistemi hücresel bir ağdır ve bu hücrelerin kendilerine özgü fonksiyoları içeriğindeki proteinlerin özellikleri ve etkileşimleri sayesinde gerçekleşmektedir. Proteinler nörel aktivitenin bütün aşamalarında yer almaktadır. Hücre membranına kısmen ya da bütünüyle yerleşmiş proteinler diğer hücrelerle ve dış ortamla sinyal iletimi için iyon ve moleküllerin geçişini yönetmektedir. Bazı proteinler yaşamsal kimyasal işlemlerin katalizinden sorumlu enzimler olarak görev almaktadır. Proteinlerin bu oldukça farklı ve özel fonksiyonları bu moleküllerin sofistike herbirine özel yüzey yapısı, yapı (şekil), yük ve hidrofobisite farklılıklarından kaynaklanmaktadır. Protein yüzey patterni polipeptid zincirinin oluşturduğu molekülün kendine özgü 3 boyutlu yapısı sonucu oluşmaktadır.
GÜRKAN; 27.09.2013

PROTEİN KATLANMASI (Protein folding/unfolding)

PROTEİN KATLANMASININ ÖNEMİ

•Gen dizisi bilgisi ⇔ 3D protein yapısı

•Protein yapısının belirlenmesinde yeni algorimaların geliştirilmesini sağlayacaktır.

•Rasyonel protein dizaynı ile hedefe yönelik proteinlerin geliştirilebilmesini sağlayacaktır.

•Tıbbi bilimlerden malzeme bilimleri ve nanoteknolojiye kadar önemli bir anahtar noktadır

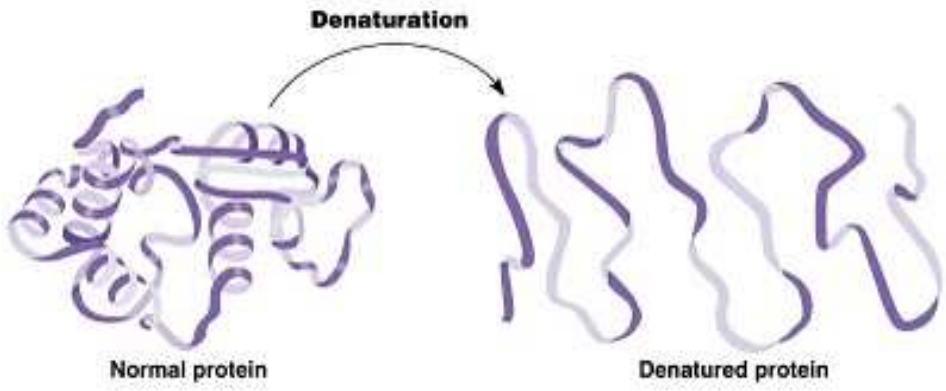
Protein katlanmalarındaki hatalar cystic fibrosis, Alzheimer diseases, Parkinson diseases, osteogenesis imperfecta, prion based diseases, amylodosis gibi hastalıklara nasıl neden olur?

Protein Katlanmasının anlaşılması bunlar gibi hastalıklara yeni tedavi yöntemlerinin geliştirmesinde yardımcı olabilecek mi?

Polipeptidler görevlerini gerçekleştirebildikleri doğal fizyolojik hallerine saniyeler bazında kısa sürelerde nasıl katlanırlar?

Katlanma proteinin doğal yapısına giderken tüm mümkün konformasyonların rastgele araştırıldığı bir işlem midir?

Protein denaturasyonu



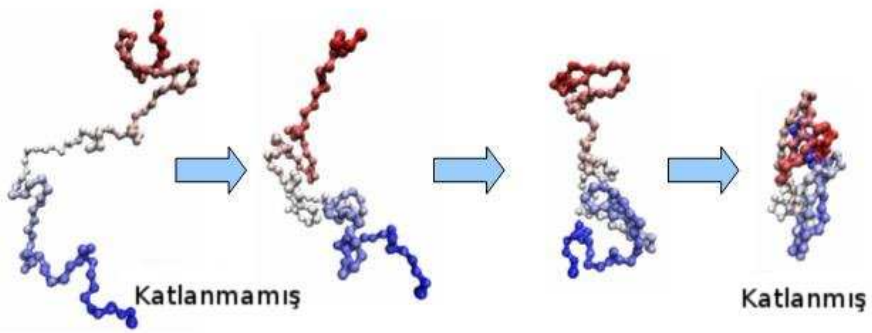
Proteinler ısı ile denature olurlar.

Isı hidrojen bağları gibi zayıf bağlara etki eder.

Proteinler en iyi fonksiyonlarını hücre içinde gösterirler ve bu şartlar değiştiğinde protein yapısında küçük ya da büyük ölçüde değişikler meydana gelir.

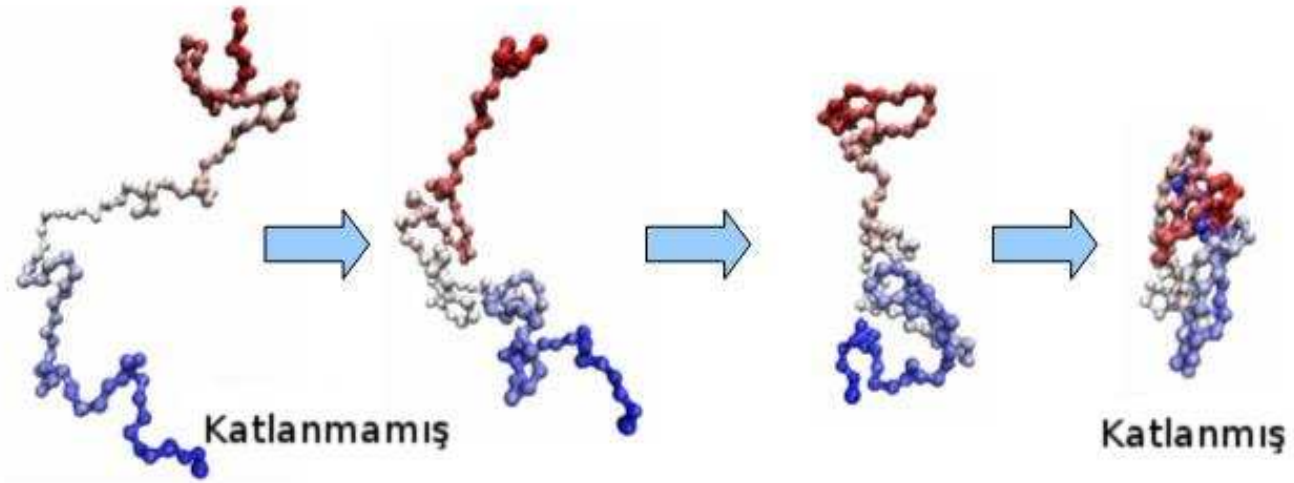
3 boyutlu yapıda meydana gelen değişiklikler proteinin fonksiyonunu kaybetmesine neden oluyorsa bu duruma **denaturasyon** denir.

Denature olmuş protein ≠ katlanmamış protein



Protein denaturasyonu

Protein katlanmasının bozulması koopertaif bir işlemdir.



Sıcaklık yavaş yavaş arttırıldığında ani bir yapı kaybına kadar protein konformasyonunu korur

Denaturasyon genellikle dar bir ısı aralığında gerçekleşir.
Yapıdaki bu ani değişiklik açılma olayının kooperatif bir işlem olduğunu gösterir.

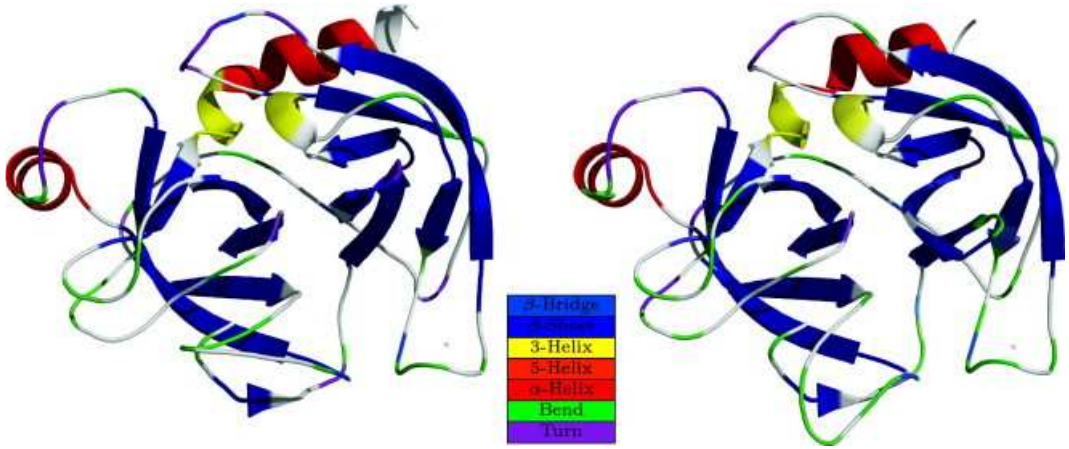
Proteinin bir kısmındaki yapı kaybı diğer kısımları da destabilize etmektedir.

Proteinler ısı ile denatüre olmakla beraber

100 °C lik kaynak sularda yaşayan termofilik bakterilerde olduğu gibi çok yüksek sıcaklıklara dayanabilen proteinler de mevcuttur.

Bu proteinlerin yapıları aynı görevi gören mezofilik homologlarından çok az farklıdır.

Bu küçük fark nasıl olur da bu büyük değişikliğe neden olmaktadır?



Denature Edici Faktörler

- Sıcaklık → H bağları
- Organik solventler
- Üre, GdnHCl
- Deterjanlar

} Hidrofobik etkileşimler

- pH değişikliği →

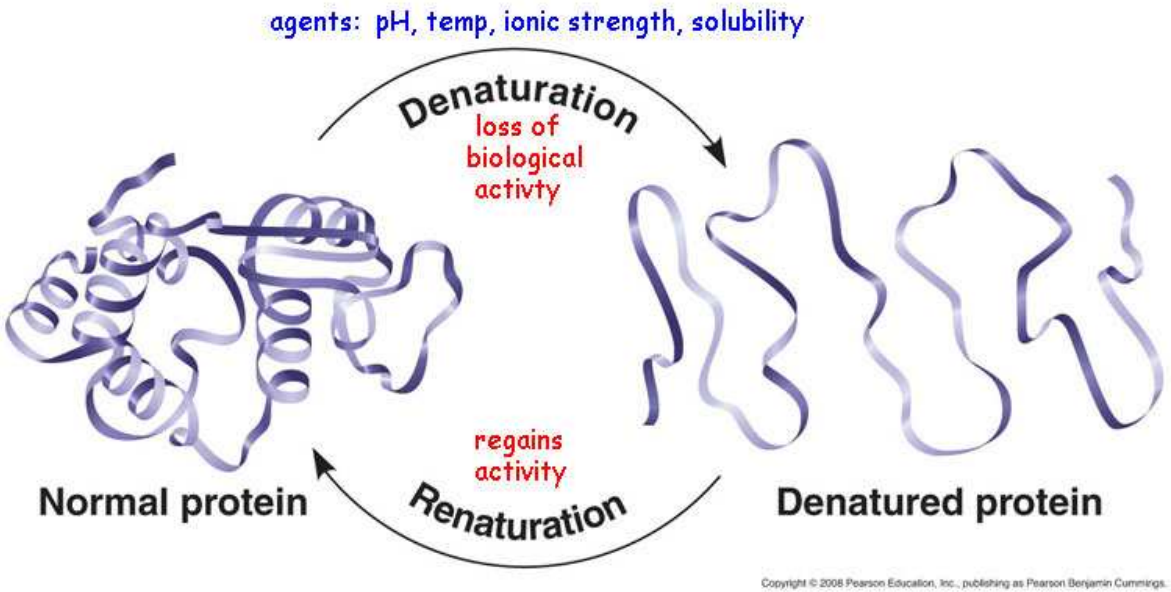
Net yükü değiştirirerek Elektrostatik etkileşimlere ve bazı H bağlarına etki eder

Protein Renaturasyonu

Bazı proteinlerin denaturasyonu geri dönüşümlüdür.

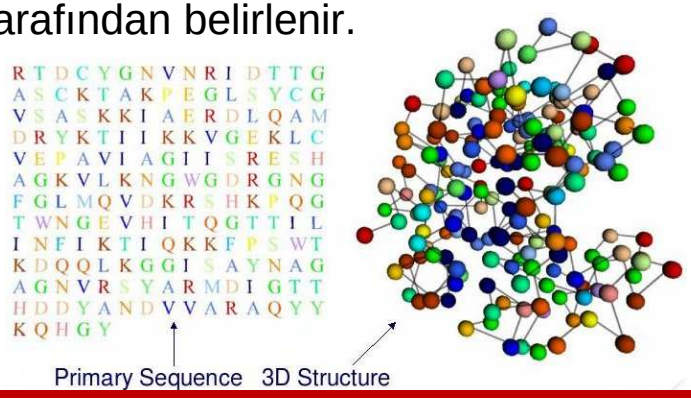
Çeşitli faktörlerle denature edilen proteinler denaturasyon nedeni ortadan kaldırıldığında tekrar doğal yapısı ve fonksiyonuna geri dönerler.

Bu işleme **Renaturasyon** adı verilir



Amino Asit Dizisi Proteinlerin 3D Yapısını Belirler

Proteinler kovalent yapılı tekrarlanmayan düz polimerlerdir. Kovalent yapı birbiri ile bağlantı kuran amino asitler tarafından belirlenir.



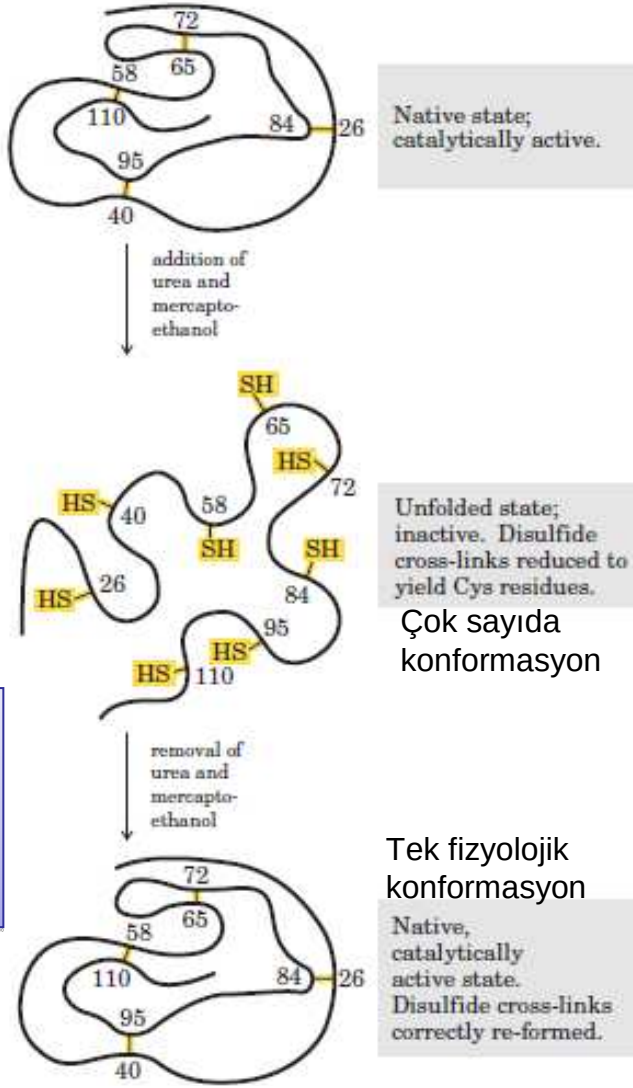
Anfinsen'in Deneyi

Ribonükleaz 124 aa lik 4 disülfid köprüsü içeren bir enzimdir.

Ribonükleaz ⟶ rastgele moleküller
β-met+ 8M üre enzim aktivitesi yok

Ribonükleaz ⟶ sistein reoksidasyonu
8M üre
rastgele 4 disülfid köprüsü oluşturarak çeçitli moleküller oluşturur. (105 farklı eşleşme gerçekleşebilir.

Ribonükleaz ⟶ doğal ribonükleaz



Çok sayıda konformasyon

Tek fizyolojik konformasyon

Levinthal Paradoksu

Fizyolojik koşullarda proteinler minimum serbest enerjili tek bir doğal yapıya katlanırlar.
Amio asit dizisi birkaç sn ya da daha az bir süre içinde bu kendilerine özel yapıya katlanır.

Herbir amino asitin ortalama 3 konformasyonu olduğunu düşünsek,

100 aa lik bir polipeptid için yaklaşık, (3^{100}),10^{47} farklı konformasyon var demektir.

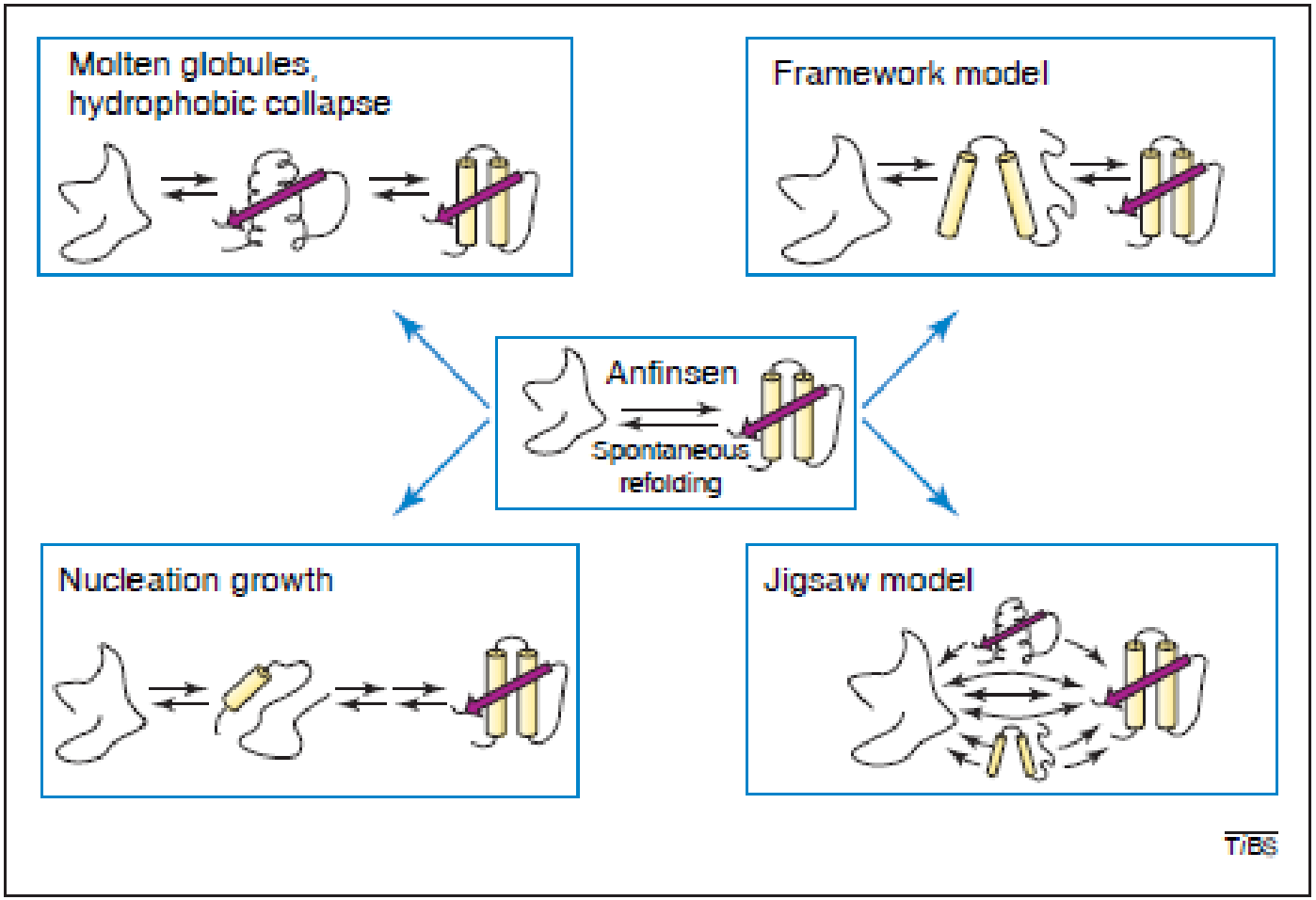
Protein kendiliğinden rastgele bir proses ile bir bağ etrafında meydana gelebilecek tüm konformasyonları deneyerek doğru yapıya ulaşmaya çalışırsa ve

her bir olasılık yaklaşık 10^{-11} sn'de gerçekleşse

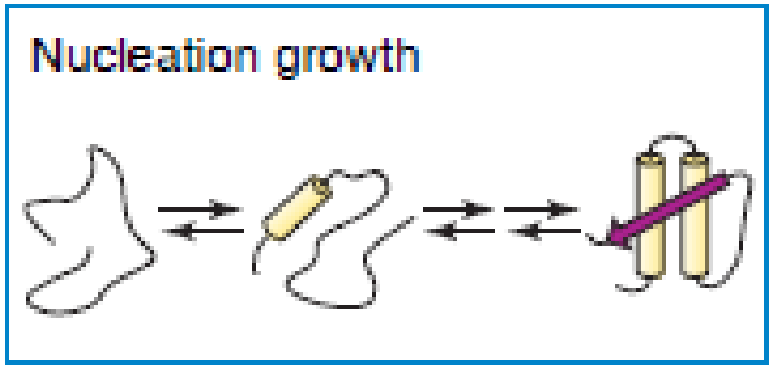
bu işemin yaklaşık 10^{29} yıl sürmesi gerekirdi.

Öylesye protein katlanması tüm olası konformasyonların sistematik bir şekilde tarandığı deneme yanılma ile gerçekleşen bir işlem değildir.
Spesifik bir folding pathway olmalıdır.

Katlanma Modelleri



Katlanma Modelleri



Wetlaufer 1973

(Nucleation/growth model)
Çekirdeklenme/büyüme modeli

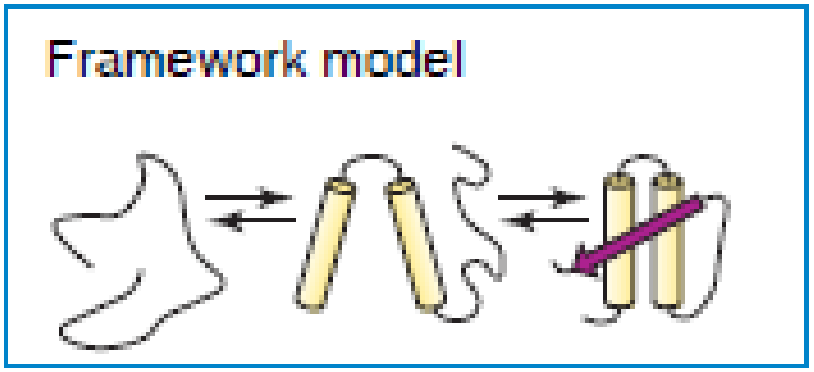
Levinthal Paradoxunu, katlanma işleminin hız sınırlayıcı adımını bir çekirdeklenme olayı (nucleation event) olarak varsayarak açıklamaya çalıştı.

Önce hızlıca bir çekirdek gelişir ardından katlanma işleminin diğer kısımları tamamlanır.

Kararsız mikrodomainler (sekonder ve hdrofobik yapılar) hızlıca birbri ile çarpışır. Çarpışma mikrodomainlerin daha büyük yapılar olşuturmasını sağlar.

Ancak bu açıklama yapılan deneylerde gözlemlenen ara formları açıklamaya yeterli gelmemişti.

Katlanma Modelleri



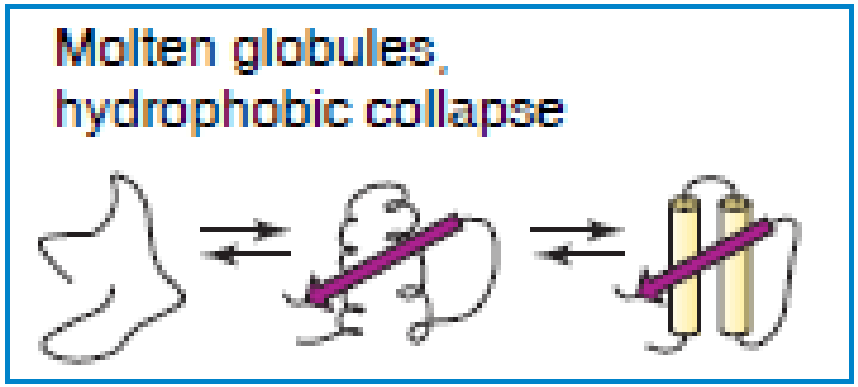
Baldwin 1989

Frame work model

Folding işlemi sekonder yapı elementlerinin oluşması ile başlayan hiyerarşik bir prosestir.

Hız sınırlayıcı aşama altyapıların birleşmesidir.

Katlanma Modelleri



Dill, 1985

Hidrofobik kolaps model

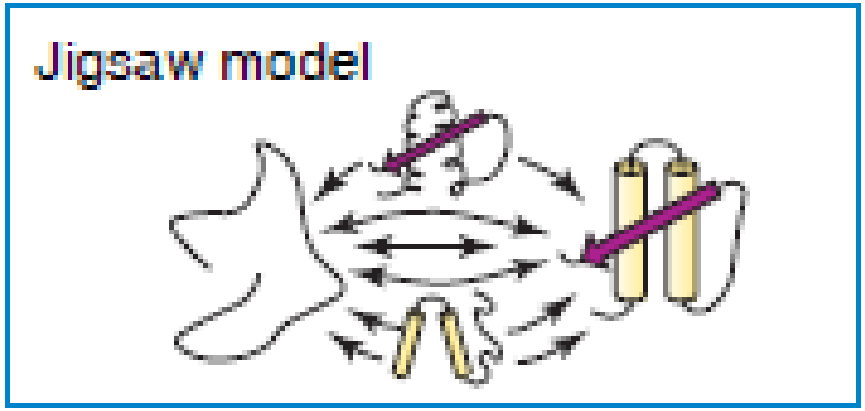
Hidrofobik etkilerin katlanma işlemini yürüten temel güçler olduğu üzerinde durur.

İşlem aa zincirinin hızlı bir kolapsı ile başlar, hidrofobik yan gruplar solventten kaçarak proteinin iç kısmını oluşturur.

Bu sırada ara formlar veya molten globule yapısı oluşur. (sekonder yapılar).

Protein doğal formuna bu kısıtlı sayıdaki araformlar arasında bir araştırma ile ulaşır.

Katlanma Modelleri



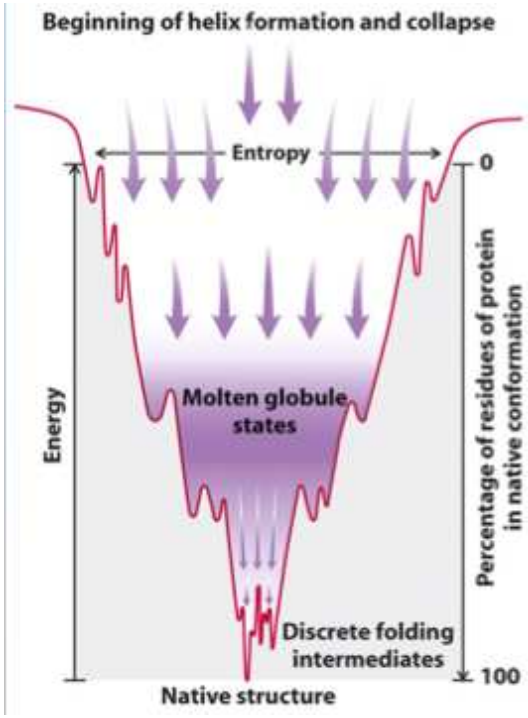
Protein katlanması için tek bir pathway olmamalıdır.

Her bir protein doğal yapısına ulaşması için farklı bir rota izleyebilir.

Bu düşünce 1990'larda populerite kazandı ve "energy landscape" görüşü olarak yayıldı.

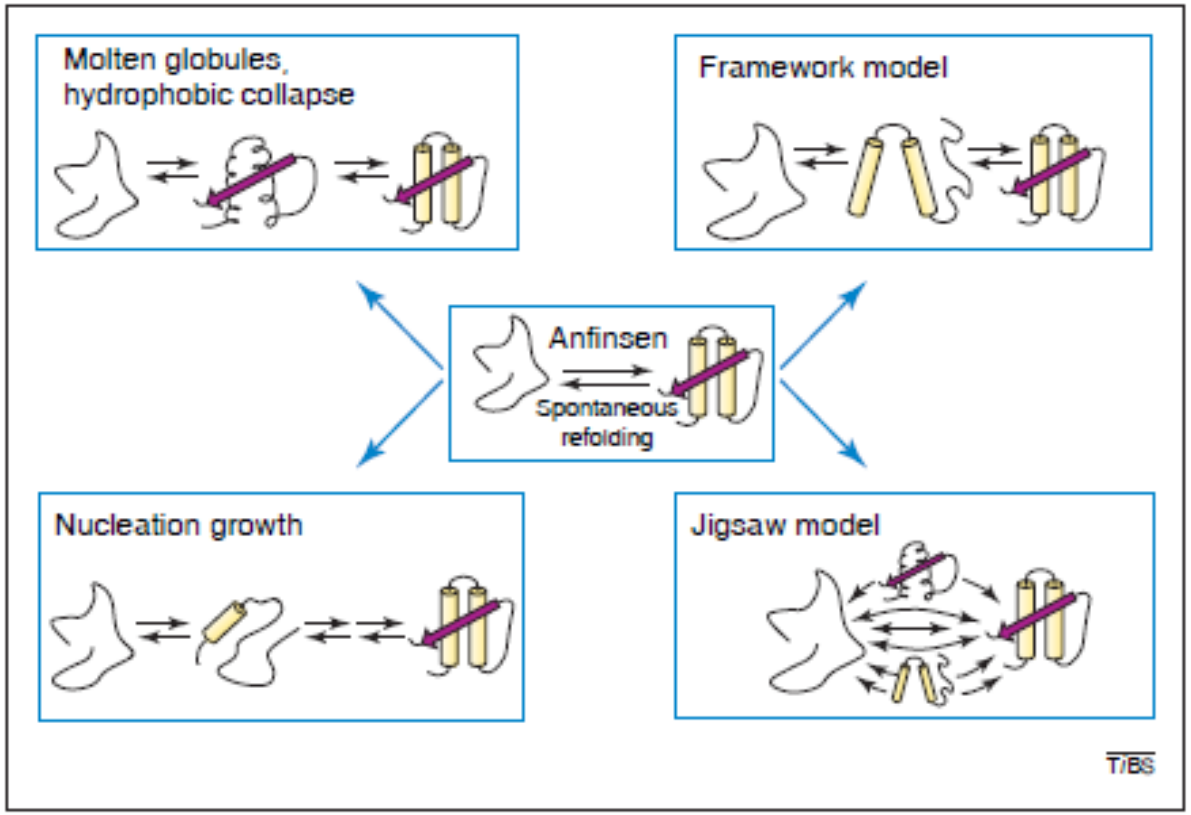
Harrison ve Durbin 1985

Jigsaw puzzle model "



Energy landscape görüşü bir proteinin enerji alanını bir bacaya benzetir. Native yapı minumumdadır ve her bir molekül yukarıdan aşağıya farklı mikroskopik rotalar takip eder.

Katlanma Modelleri



Protein katlanma mekanizmalarının araştırılması halen en ilgi çeken araştırma alanlarından biridir. Tamamen açıklanabilmiş olmasa da iki model genel kabul görmektedir:

HİYERARŞİK MODEL (FRAMEWORK MODEL)

ENERGY LANDSCAPE MODEL

Hiyerarşik Model

- İlk olarak <u>bölgesel sekonder yapılar</u> oluşur. Lokal yapılaşmalar sağlanır.

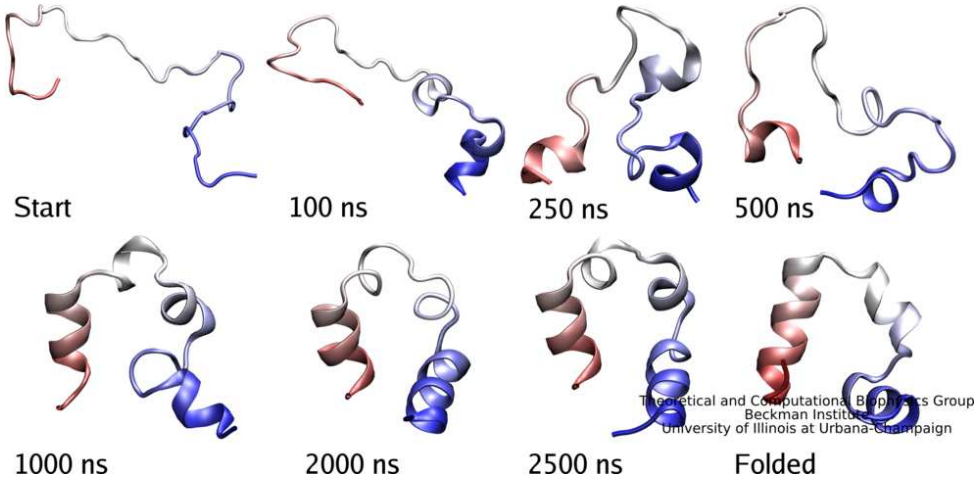
  Belli amino asitler alfa sarmal ve beta tabaka yapılarına hızlıca katlanır.

- Daha sonra uzun mesafe etkileşimler gerçekleşir.

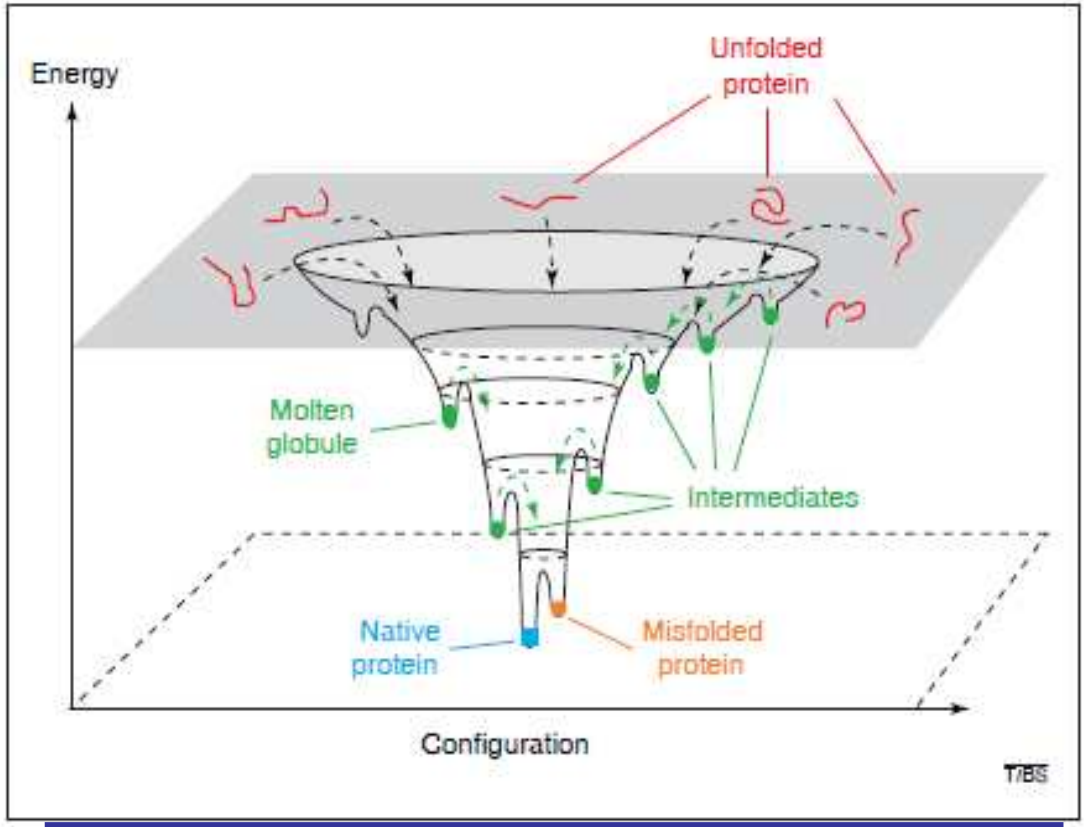
  İki alfa sarmal biraraya gelerek <u>süpersekonder</u> yapıları oluşturur.

- Hidrofobik bölgeler çözücüden kaçarak proteinin iç kısmını oluşturacak şekilde konumlanır. Böylece kısmi olarak katlanmış bir araform olan "molten globul" yapısı meydana gelir.

- İşlem <u>domainlerin</u> oluşumu ve <u>tüm polipeptid katlanması</u> sona erene kadar devam eder.



Enerji Landscape/ Folding Funnel



Potensiyel olarak doğal kararlı yapı ulaşan çok fazla rota olabilir.

Serbest enerji profilinde meydana gelebilecek küçük değişiklikler sonucu hangi yolun izlendiği hangi ara formların ve geçiş durumlarının oluştuğu değişebilir.

Termodinamik olarak katlanma işlemi bir serbest enerji bacası şeklindedir.

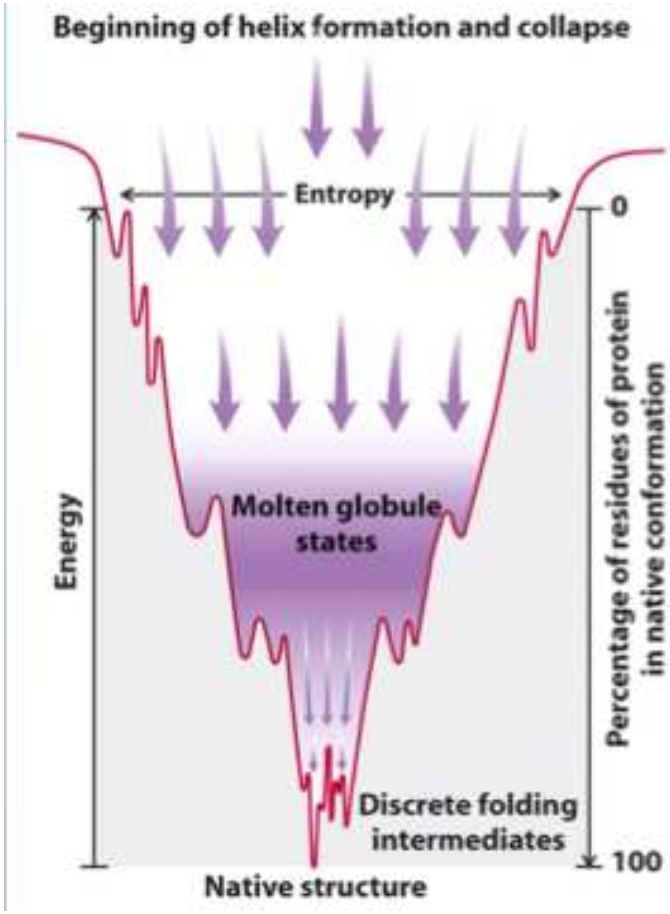
Katlanmamış yapılar **konformasyonal entropi** ve **serbest enerji** ile karakterize edilir.

Katlanma devam ederken bacanın daralması konformasyonların sayısının azaldığını göstermektedir.

Bacanın yanları boyunca görülen küçük basıklıklar yarı kararlı ara formları ifade etmektedir.

En altta katlanma ara formlarının tek bir doğal konformasyona indirgenir.

“Molten Globule” Yapısı



1983de Ohgushi ve Wada adlı araştırmacılar tüm globular proteinlerin denge durumunda aynı fiziksel özellikleri taşıyan bir arafoma sahip olduklarını gösterdi ve bunu “**molten globule**” yapısı olarak tanımladı.

"molten globule" aynı zamanda katlanma bacasının daralan bölgesinde yer alabilecek **native yapıdan daha yüksek enerjili** fakat **denature olmuş yapıdan daha düşük enerjili** **araformları** ifade etmekte de kullanılır.

1985de alfa lactalbumin proteini ile yapılan bir çalışmada molten globule yapısının protein katlanmasındaki geçiş formuyla identik olduğu gösterilince molten globule araştırmalrı tekrar ilgi odağı haline geldi ve birçok protein ile laktamaz, albumin, ribonüklez gibi birçok prtoeinle çalışmalar tekrarlandı.

“Molten Globule” Yapısı

<u>Molten globule yapısının karakteristik özellikleri</u>

•Önemli derecede sekonder yapılanma mevcuttur.

•Yan zincirlerin sıkıca paketlenmesiyle oluşan spesifik tersiyer yapılar yoktur.

•Native yapıdan %10-30 daha geniş dönüş çapına sahip kompakt bri yapsı vardır.

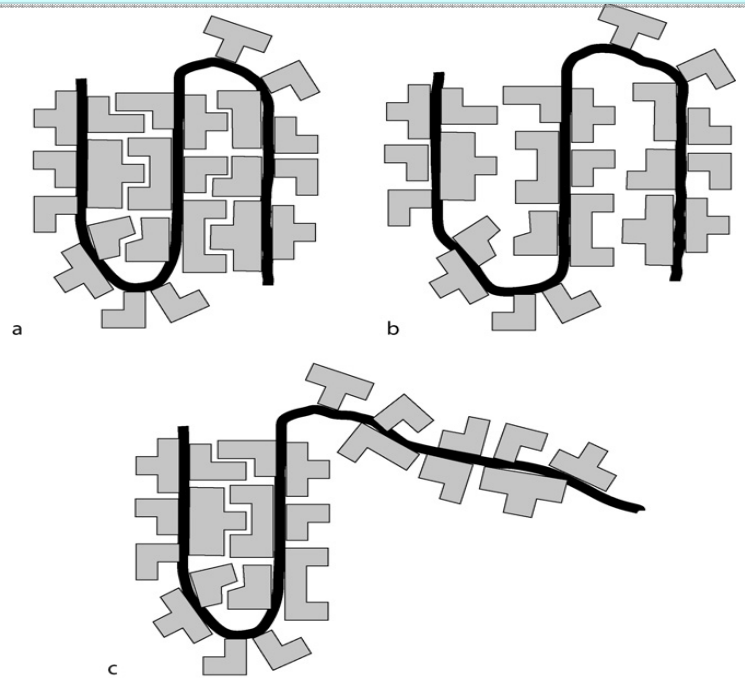
•Hidrofobik çekirdek sıkı paketlenmediğinden solvent accessible surface area (SASA) artmıştır.

“Molten Globule” Modelleri

stopped flow, circular dichroism, hydrogene exchange, **X-ray ve mutasyonal yaklaşımlar** vb yeni teknikler sayesinde

MG yapısının aslında daha önce **düşünüldüğünden daha heterojen** olduğu gösterilmiştir. Yapının bir kısmı daha organize ve doğal yapıya benzerken diğer bir kısmı daha az organize olmus durumdadır.

Bununla birlikte farklı proteinlerin moleten globule yapıları arasında oldukça çeşitli farklılıklar bulunabilir.



(a) Doğal yapıda protein, gömülü tüm yan zincirler birbiri ile tamamen uyumlu bir şekilde yanyana gelmiş

(b) Protein iskeletinin katlanması native yapıda olduğu gibi fakat yan zincirlerin paketlenmesi tam gerçekleşmemiş

(c) Molekülün yarısı spesifik yan zincir etkileşimleri mevcut olarak tam katlanmış, diğer yarısı ise tamemen katlanmamış durumda

Protein Katlanmasında Fiziksel Güçler ve Prensipler

- Linear poliprptid zinciri otonom olarak sıkı paketlenmiş 3 boyutlu yapısını organize eder.

Bu sıkı paketlemiş yapı
•polipeptid iskeletinin sınırlı esnek yapısı (peptid bağındaki kısmi çift bağdan dolayı) ve
•yan zincirlerin intermoleküler etkileşimleri ile belirlenir.

Amino asit zincirinde C, O, N ve H atomları aynı düzlemde yer alırken,

•Ardışık düzlemlerde peptid zincirinin kıvrımlarını (polipeptidin potansiyel konformasyonunu) fi ve psi açılarının farklı kombinasyonları belirler.

Globular proteinlerde

internal core→ hidrofobik amino asitler
van der Waals kuvvetleri

protein yüzeyi→ polar ve yüklü yan zincirlere sahip amino asitler

Protein Katlanmasında Fiziksel Güçler ve Prensipler

Doğal konformasyon enerji olarak kararlı olmalıdır.

Termodinamik bakış açısından bakıldığında bir protein molekülünün serbest enerjisi (ΔG) 4 temel faktörden etkilenmektedir.

1. Hidrofobik etkileşimler

2. Hidrojen bağlarının enerjisi

3. Elektrostatik etkileşimlerin enerjisi

4. Temel zincir ve yan zincirlerin kısıtlı haraketinden kaynaklanan konformasyonal entropy

Protein Katlanmasının Simulasyonu

Bilgisayar modelleri ve **simulasyonlar** protein katlanmasını anlamamızda önemli yöntemlerdir.

Bilgisayar Modelleri ⟷ Laboratuar Deneyleri

Bilgisayar Modellerindeki Kısıtlılık;

- **Küçük proteinlerin tipik katlanma hızı: nanosaniye- mikrosaniye**
- **Detaylı atomik simülasyonlar : mikrosaniye – saniye**

Bilgisayar modellemelerindeki bu kısıtlılıktan dolayı araştırıcılar doğru modellermelere gitmeye çalışırken **modelleri basitleştirmeye** ya da **özel örnekleme teknikleri** bulmaya çalışmaktadırlar.

http://www.youtube.com/watch?v=gFcp2Xpd29I

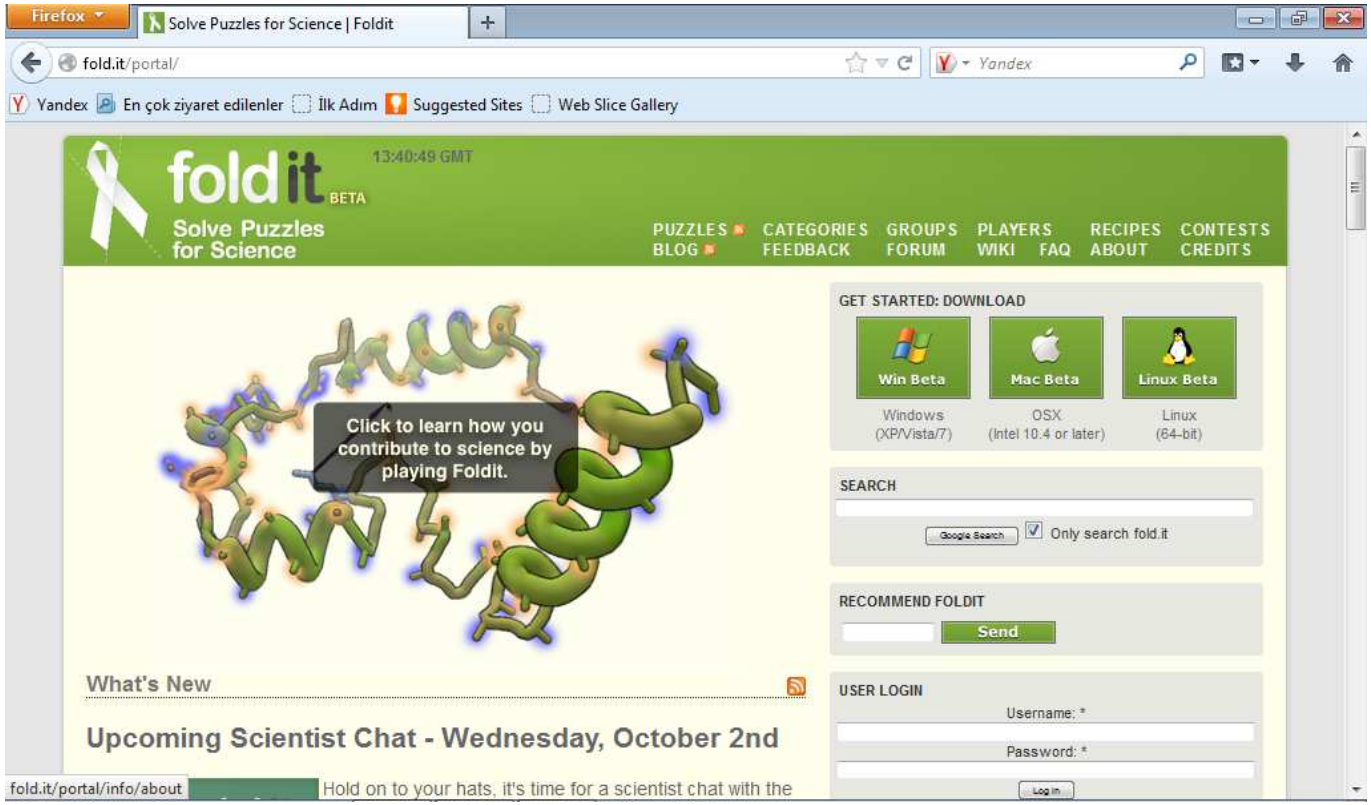
Protein Katlanmasının Simulasyonu

Foldit

Foldit*: Solve Puzzles for Science** ***fold.it

Protein katlanması hakkında online bir oyun

University of Washington's Center for Game Science ve UW Department of Biochemistrynin geliştirdiği projenin bir parçası



Protein Katlanma Çalışmalarında Kullanılan Deneysel Yöntemler

Floresan Spek. and CD
- Sekonder ve tersiyer yapı

Stopped Flow methods
- Katlanma kinetiği

H Exchange
- Tek residu düzeyinde katlanma özellikleri

NMR
- Katlanma aşamalarında H bağlarının lokasyonu ve kararlılığı

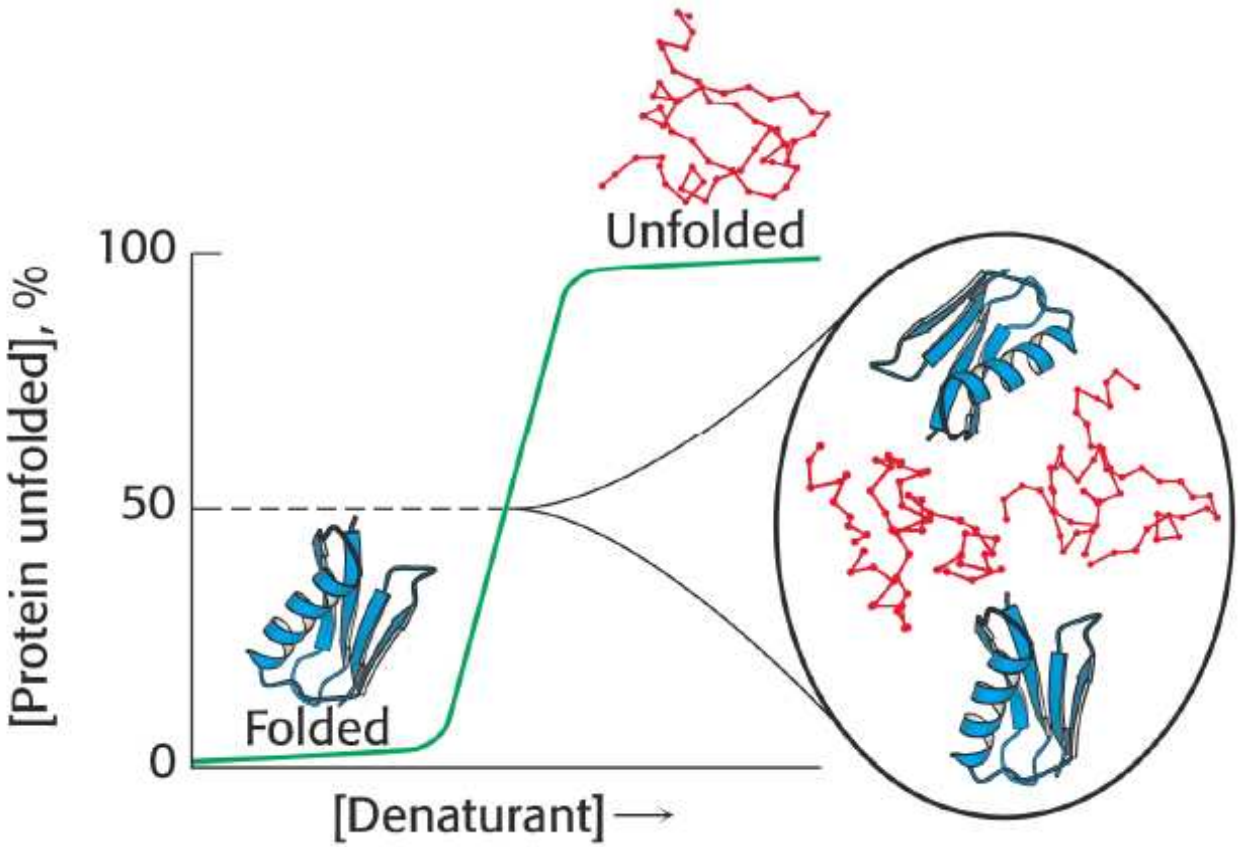
Protein Mühendisliği
- Tek residu düzeyinde katlanma özellikleri
- Ara formların araştırılması

Teorik Metodlar
Moleculer Dinamik
- Atomik çözünürlükte unfolding çalışmaları
- Küçük proteinlerin milisaniye düzeyinde katlanma çalışmaları

Katlanma Mekanizmalarının aydınlatılması / Geçiş Yapıları

Deneysel şartlarda "folding transition" katlanma işleminde geçiş yapılarını izlemek için sıcaklık ya da kimyasal denaturant gibi faktörlere karşı populasyondaki katlanmış fraksiyonu inceleriz.

Protein Katlanması Kooperative bir işlemdir.



Denaturantlar

- Sıcaklık
- Organik solventler
- Üre, GdnHCl, DTT, β-Met
- Deterjanlar
- pH

CD ya da floresan spectra gibi bir konformasyonal prob ile takip edilir.

Katlanma Mekanizmaları / Geçiş Yapıları

Katlanma işlemi kimyasal olarak denge durumunda olduğunda;

$$U \rightleftharpoons N$$

$$K_{eq} = [N] / [U] =$$

Denge sabiti

Native protein

Unfolded protein

Katlanmış ve katlanmamış populasyonlar arasındaki serbest enerji farkı (ΔG) :

$$\Delta G^0 = -RT \ln K_{eq}$$

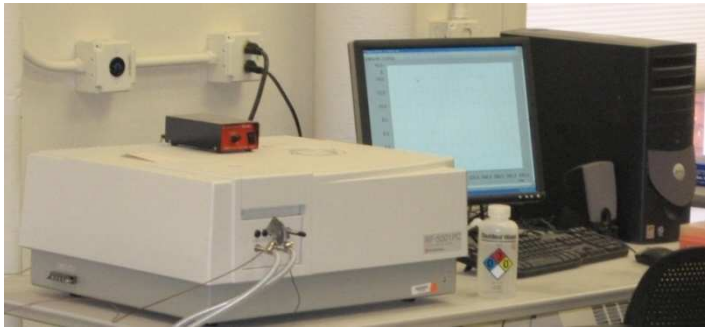
(R: gaz sabiti ; T: sıcaklık)

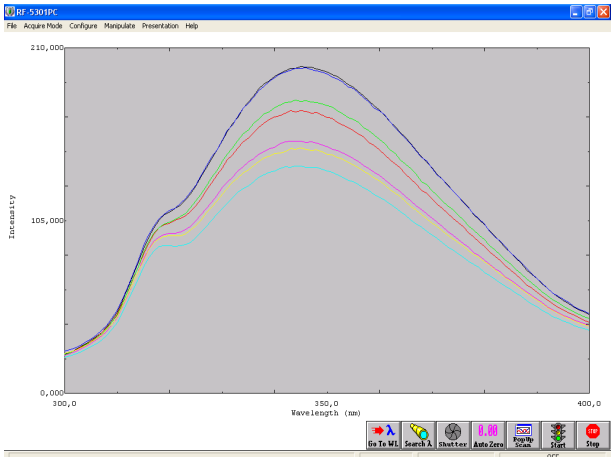
- Tipik bir protein için ΔG= -5 to -15 kcal /mol

- **Protein katlanması termodinamik olarak elverişli bi reaksiyondur**

Katlanma Mekanizmaları / Geçiş Yapıları

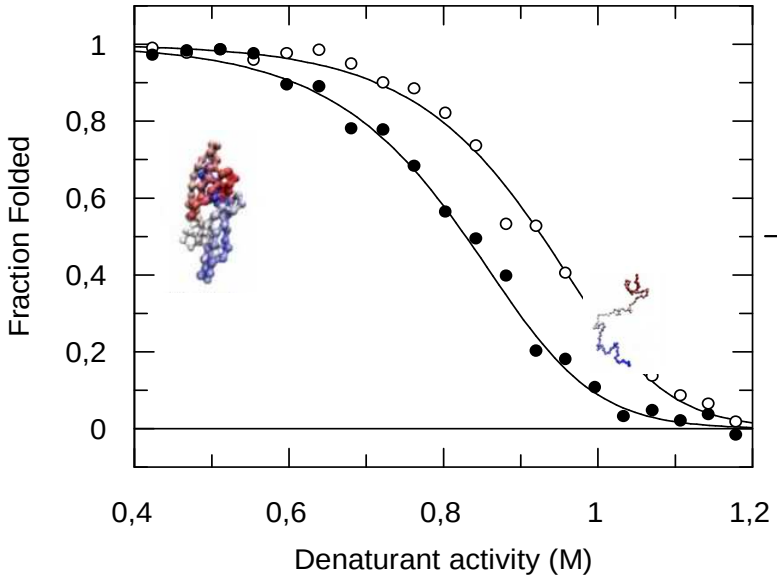
Stabilite ve katlanma mekanizmaları yaygın olarak GdnHCl ve üreye karşı denaturasyon ve renaturasyon eğrileri çizilerek yapılır





GRAFIT / EZFITT / PRISM gibi Kinetik Programlarda yerine koyup, uygun equationda Keq ve ΔG tespit edilir

Denaturant / Keq grafiği



Keq

Deneysel sonuç:
yapısal bir geçiş için Gibbs serbest enerji değişimine ulaştırır

ΔG=-RTlnKeq relationship

ΔG, Proteinin 2 farklı yapısal formu arasındaki serbest enerji değişimidir

Katlanma Mekanizmaları / Geçiş Yapıları

Protein katlanmaları ile ilgili çalışmaların çoğu **monomerik proteinler** üzerine yoğunlaşmıştır.

küçük basit yapılı

Çok zincirli / multimerik proteinler: } Oligomerik / multimerik yapıdadır

- kompleks yapılardır
- self-assembly prosesindeki etkinliği düşüktür.

biyoteknolojide kullanılan birçok protein
biyolojik sistemlerdeki birçok protein.

Monomerik proteinler → amino asit dizisi / sekonder ve tersiter yapı hakkında bilgi

Oligomerik proteinler → querterner yapı hakkında bilgi

Protein oligomerization: How and why

How do small single-domain proteins fold?
Sophie E Jackson

Multidomain ve multisubunit Proteinlerin Katlanması

Domain: polipeptid zincirinin kompakt global alt yapısıdır.
peptid zincirinin diğer bölgelerine göre kendi içinde daha fazla etkileşime sahiptir.

Domainler kendi kendine mi katlanır?

Triptofan sentaz, beta laktmaz ve bazı dehidrogenzlar gibi multidomain proteinlerde domainlerin **otonom** olarak katlandığı gösterilmiştir.

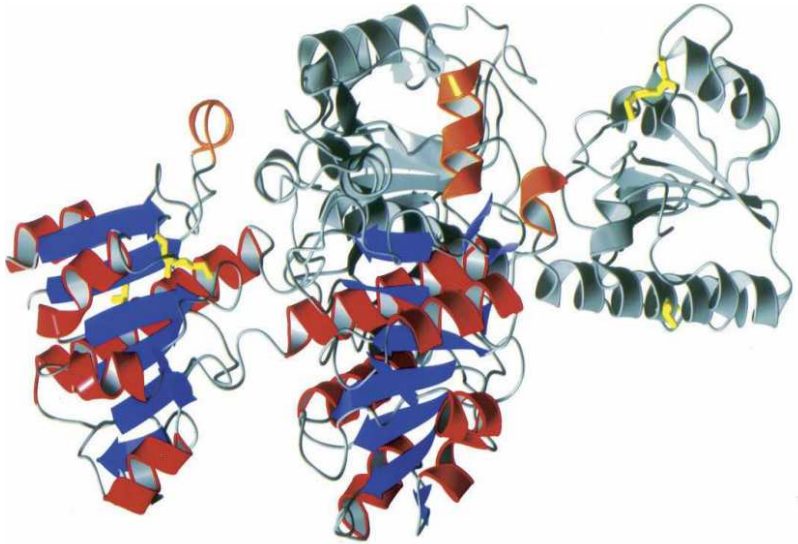
İzole dilmiş domainlerin katlanma hızı tam proteine entegre haldekiye aynı ya da daha yüksek olduğu tespit edilmiştir.

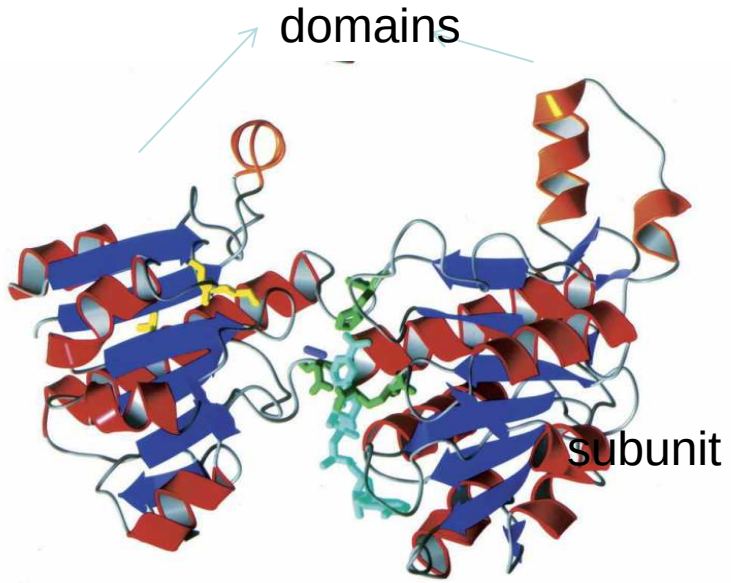
Bu da protein içinde iken diğer etkileşimlerden dolayı domainin katlanmasının yavaşladığını göstermektedir.

Multidomain proteinlerde hız sınırlayıcı aşama iki domain arasındaki arayüzün oluşumudur.

Multidomain ve multisubunit Proteinlerin Katlanması

Katlanma kinetiğine göre multidomain proteinler katlanırken;
-büyük değişikliklerin olduğu hızlı faz
- Küçük değişikliklerin olduğu yavaş faz





Unfolded protein → **Fast domain folding** → **Katlanmış fakat eşleşmemeiş domainlerin oluşması** → **Slow domain pairing** → **Native protein**

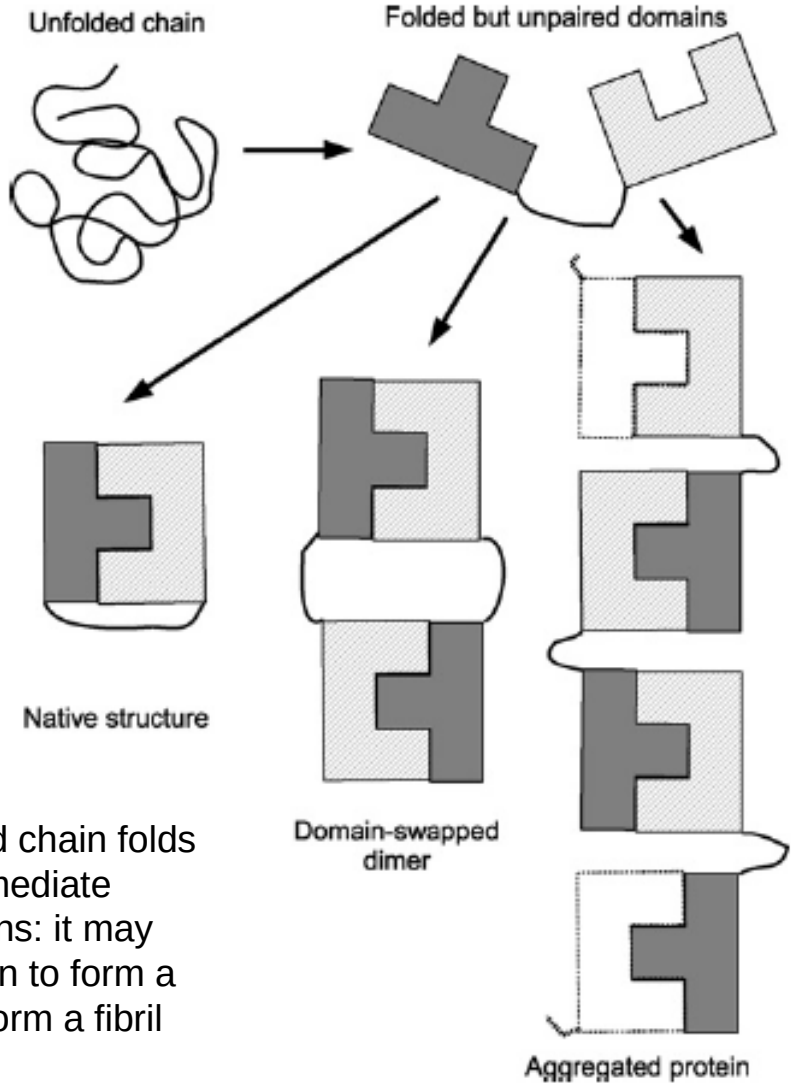
Herbir domain önce kendi içinde hızlıca katlanır,
ikinci fazda is diğer domainlerle biraraya gelme işlemi tamamlanır

Multidomain ve multisubunit Proteinlerin Katlanması

“Domain Swapping”
Katlanmış fakat eşlememiş domain araformları beli bir konsantrasyonu aşarsa domainler identik molekülün domainleri arasında intramoleküler değil intermoleküler etkileşim kurabilirler.

Böylece monomerik değil dimerik moleküller oluşturabilirler.

Bu yanlış eşleşme aynı zamanda firbril ya da agregasyon oluşumuna neden olabilir.



The folding of a hypothetical two-domain protein. The unfolded chain folds into two domains that are not yet paired. The fate of this intermediate depends on the protein concentration and the solvent conditions: it may either form the native state; it may associate with another chain to form a domain-swapped dimer; or several chains may aggregate or form a fibril

Multidomain ve multisubunit Proteinlerin Katlanması

Büyük protein moleküllerinin çoğu altünitelerden oluşur.

Evrimsel olarakmultiremik protein oluşması bazı avantajlar getirmektedir;

•Altüniteler arasındaki koopertive sayesinde katalitik aktivitenin düzenlenmesi

•Büyük yapıların oluşmasında daha kolay hata kontrolü

•Stabilitenin artması

•Katlanma işleminin daha kolay düzenlenmesi

Multidomain ve multisubunit Proteinlerin Katlanması

Multisubunit proteinlerde biraraya gelme işlemi genellikle bir seri unimoleküler (izomerizasyon) ve bimoleküler (birleşme) aşama olarak tanımlanmaktadır.

4Mu → 4M → 2D' → 2D → T' → T

Katlanma ve biraraya gelme ayrı olaylar mıdır yoksa ortak işlemler midir?

Geleneksel görüşe göre;

Monomerler partnerleri ile biraraya gelmeden önce doğal yapıya yakın bir konformasyona katlanırlar.

Son yıllardaki sonuçlara göre ise;

Birçok proteinin katlanmamış olarak bulunduğu ancak DNA, RNA, membran ya da diğer bir proteine bağlandıktan sonra katlandığı tespit edilmiştir.

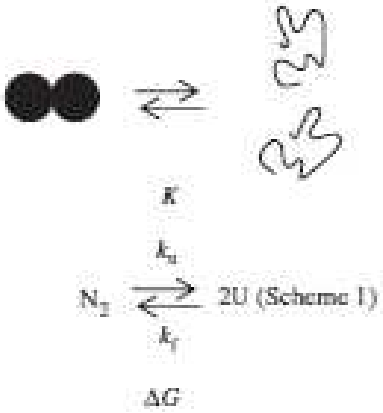
"Fly-Casting Effect"

Polipeptid zincirinin flexibilitesinin bağlanma mekanizmasında önemli bir rol oynadığı henüz yapılanmamış bir zincirin tam olarak katlanmış bir yapıya göre partnerini bulup bağlanmasının daha kolaydır

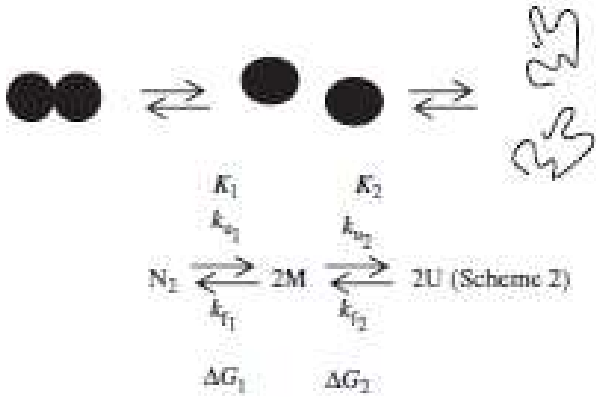
Dimerik Proteinlerin Katlanma Modelleri

En sık rastlanılan mekanizmalar

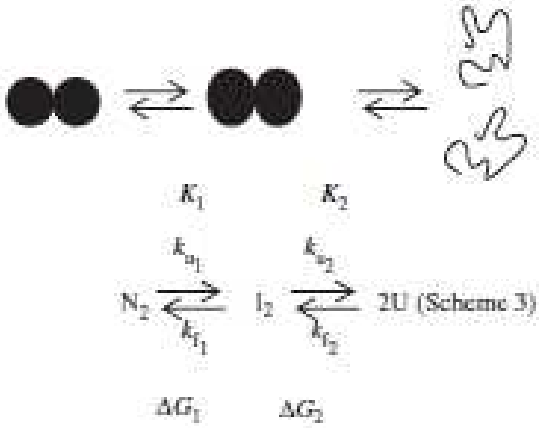
- **Two State Transition Model**



- **Monomerik Ara Formların Oluştuğu Three State Transition Model**



Dimerik Ara Formların Oluştuğu Three State Transition Model



N2 : native dimer
M: monomeric intermediate
I2: dimeric intermediate
U: unfolded monomer.

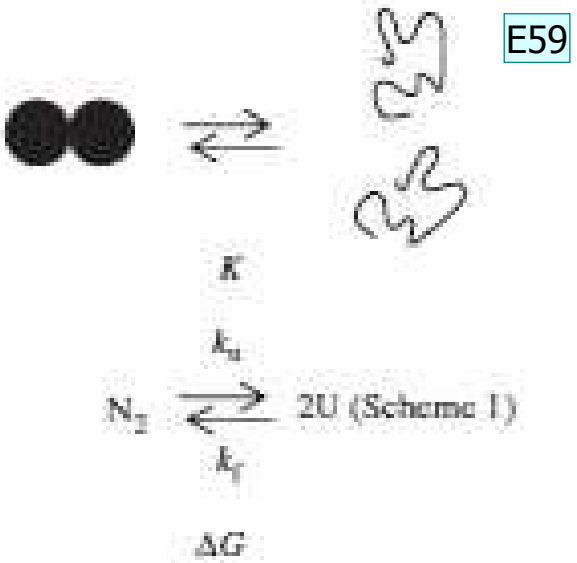
Dimerik Proteinlerin Katlanma Modelleri

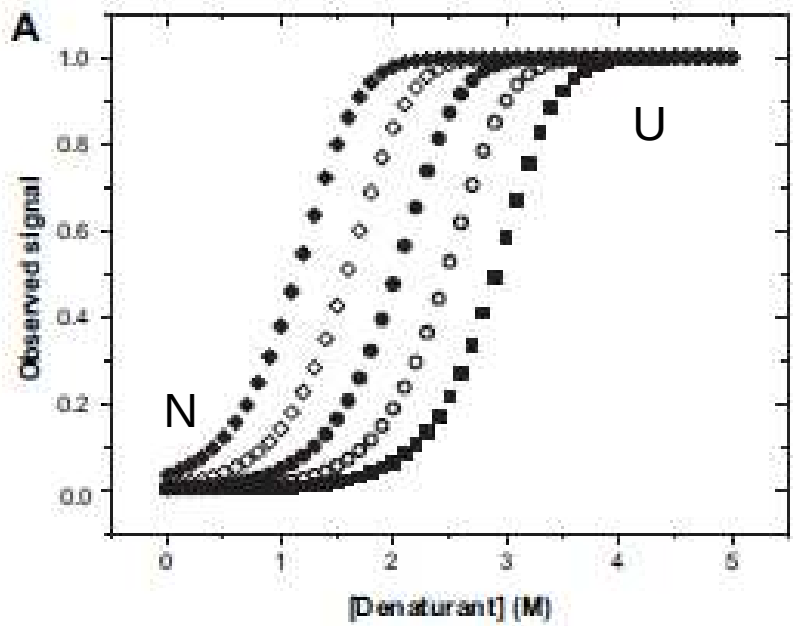
“Two-State” Katlanma Modeli

Dimerik bir protein için en basit katlanma modeli two state (denge-kinetik) geçişdir.

Bu mekanizma ile katlanan bir dimer genellikle 2 durum kinetiği ile katlanır. Katlanma ve biraraya gelme ortak bir işlemdir.

$$2U \underset{\text{unfolding}}{\overset{\text{folding}}{\rightleftharpoons}} 2M \underset{\text{dissociation}}{\overset{\text{association}}{\rightleftharpoons}} D$$

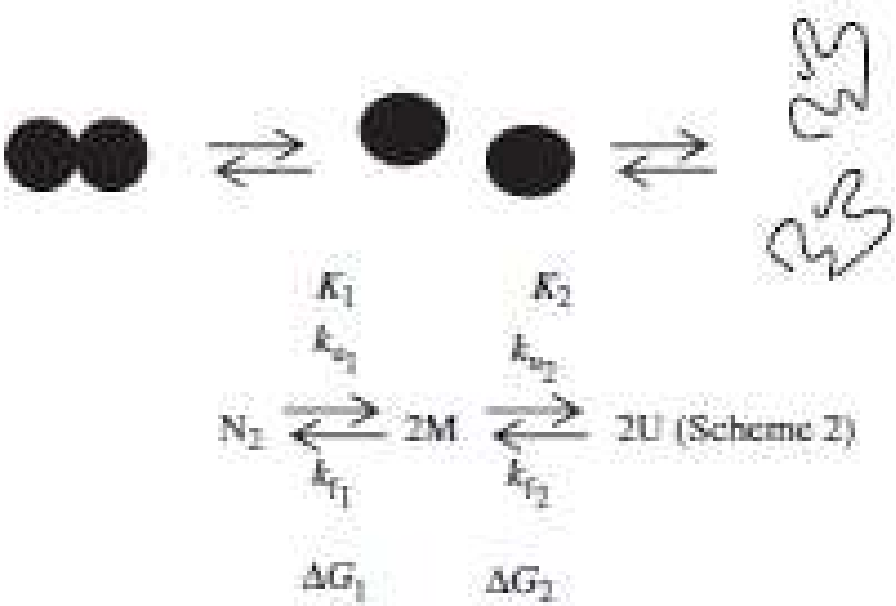


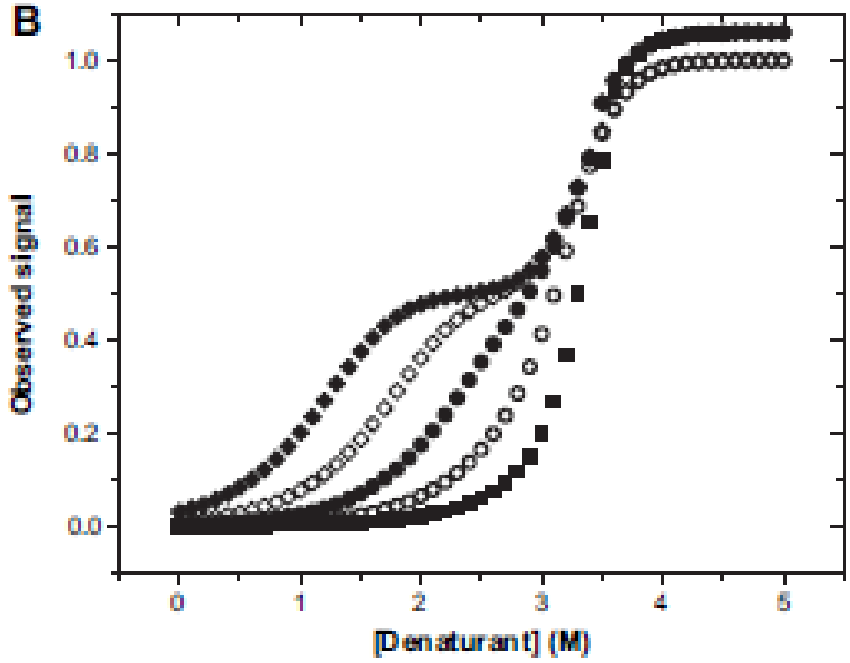


E59 GÜRKAN 22.07.2013
Scheme 1 is described by a single equilibrium constant (K) and
Gibbs free energy of unfolding (DG). The first order unfolding/dissociation rate constant
ku and the second order folding/association rate constant kf.
EmelLevent; 11.11.2013

Monomerik Ara Formların Oluştuğu Three State Transition Model

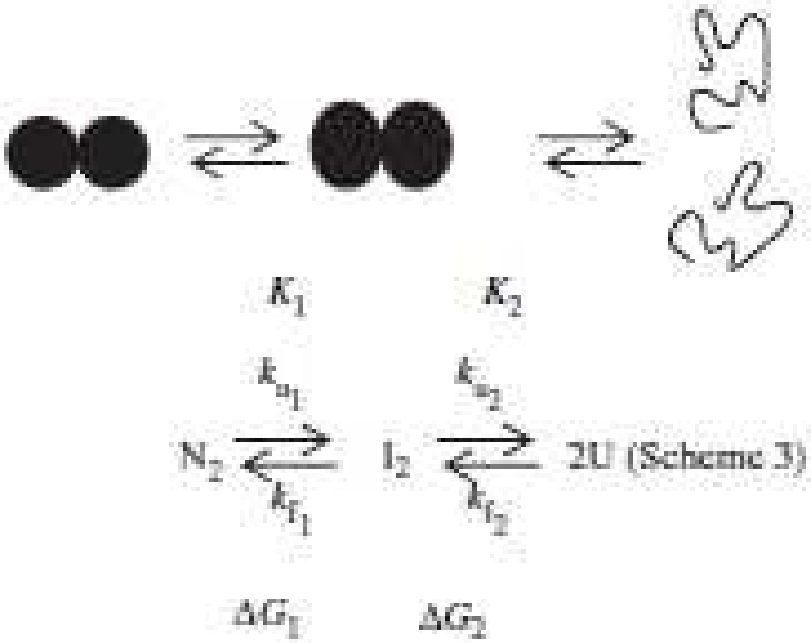
Three State Equilibrium gösteren bir dimer ise genellikle 3 durum kinetiği ile katlanır.

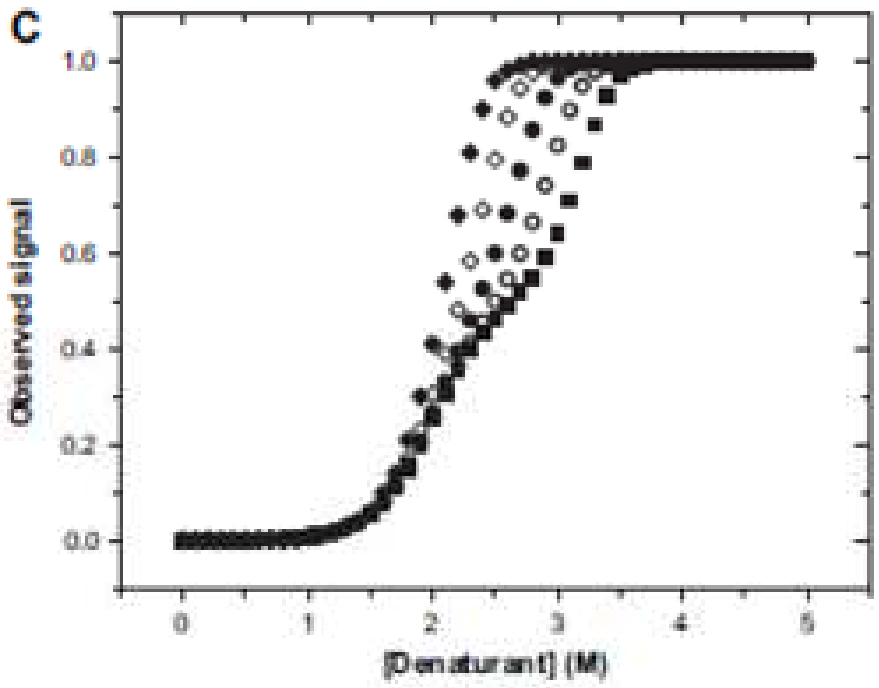


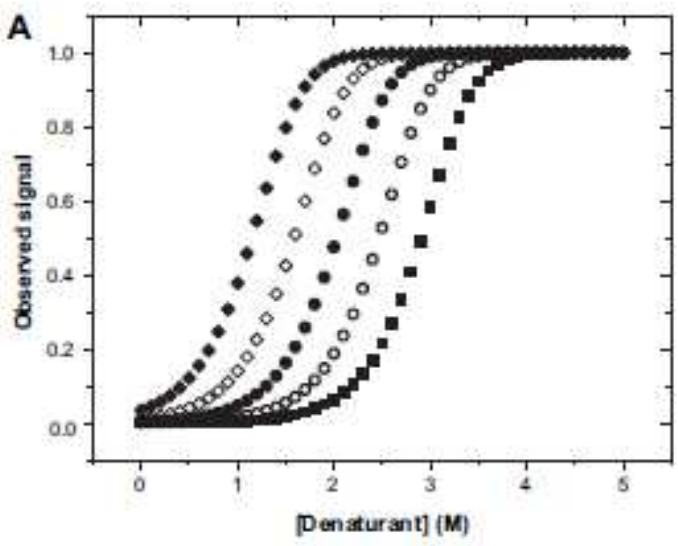


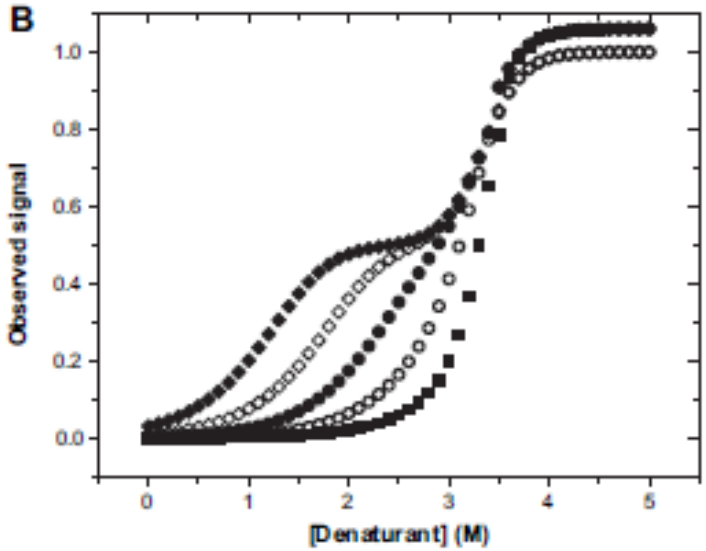
Dimerik Proteinlerin Katlanma Modelleri

Dimerik Ara Formların Oluştuğu Three State Transition Model









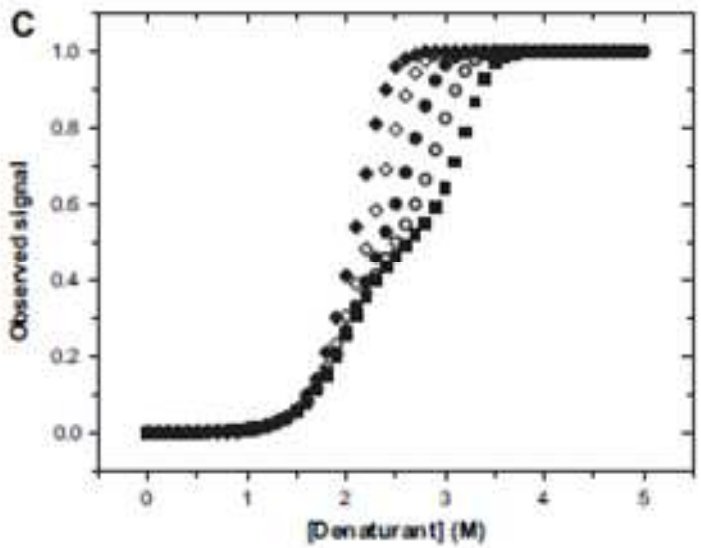


Fig. 2. Equilibrium folding transitions for a dimer following an (A) two-state, (B) threestate with a monomeric and (C) dimeric intermediate model.

The graphs were simulated at dimer concentrations of 0.1 mM (A), 1 mM (>), 10 mM (), 100 mM (B) and 1000 mM (-), using the equations in Tables 1 and 2.

The monomeric and dimeric intermediates are most apparent at low (B) and high (C) protein concentration, respectively.

The parameters used for generating the equilibrium curves for (A) the dimer

Hücre İçinde Protein Katlanması

Hücre içi ,

300 mg/ml protein konsantrasyonu olduğu kabul dedilen kalabalık bir ortamdır.

Temofilik arkea lar gibi mikroorganizmaların yaşadığı sıcaklık 80C'yi geçebilmektedir.

Katlanma işlemi ve buna göreceli olarak daha yavaş olan polipeptid sentezi işlemleri birbirinden ayrılamaz. Ribozomda senetezlenmekte olan zincir bir yandan da yanlış katlanmış araformların ve agregasyonların oluşumundan korunmalıdır.

Etkin ve doğru bir katlanma için hücreler polipeptid zincirinin doğal yapısına katlanmasını kontrol eden bir grup protein görevlendirmiştir.

Hücre İçinde Protein Katlanması

“Moleküler Şaperonlar”

proteinlerin doğru katlanma ve açılmalarına (folding/unfolding),

makromolekül yapının birleşme ve ayrılmasına (association/dissociation) rehberlik ederek araformlarda kalıcı yapıların oluşmasını engellerler.

Şaperon proteinler kısmen katlanmış ya da doğru katlanmamış polipeptidlerle etkileşime girererek bunların doğru katlanma yoluna girmesini ya da doğru katlanmanın gerçekleşmesi için uygun mikroçevreyi sağlarlar.

Bazı şaperonlar oligomerik proteinelrde dördüncül yapının biraraya gelmesinde görevlidir.

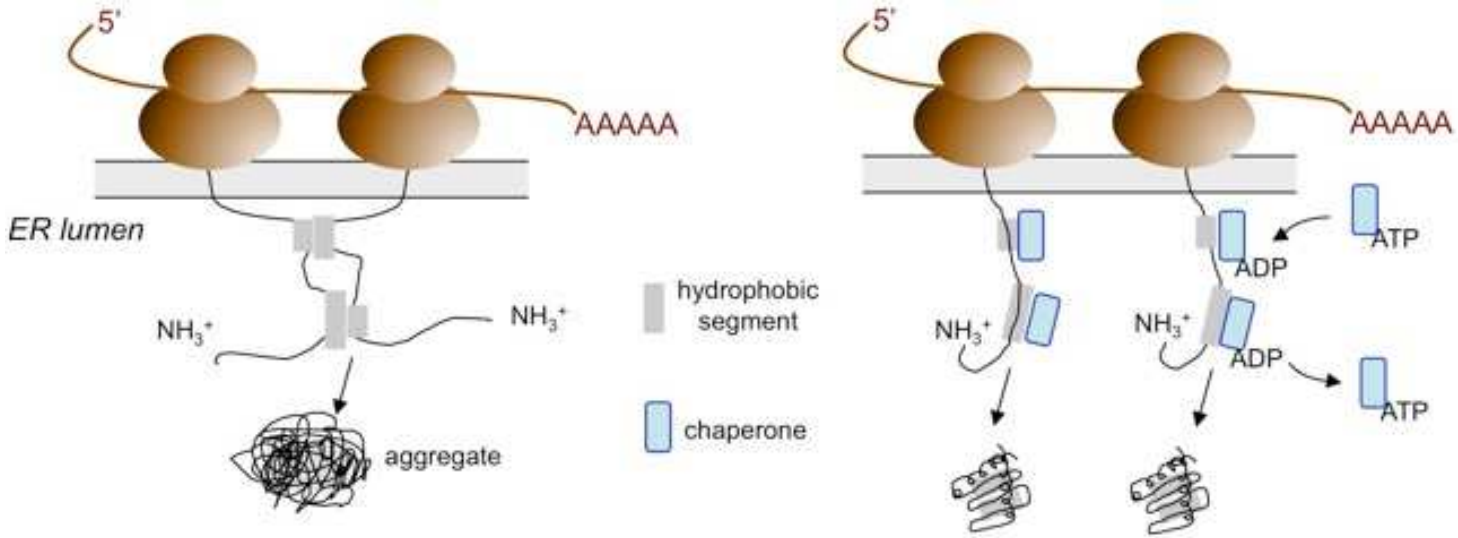
Şaperon moleküller hernekadar dengeli büyüme ortamlarında normal koşullarda ekprese olsa da, birçok şaperon protein ısı şoku gibi protienlerin yanlış katlanmasını arttıracak stres koşullarında upregule olduğundan “stres ya da heat shock” proteinleri olarak da sınıflandırılırlar.

Hücre İçinde Protein Katlanması

Moleküler Şaperonların işlevi hidrofobik domainlerin solvent ile olan ilişkisine dayanmaktadır.

Normalde hidrofobik çekirdek yapısında bulunması gereken bir yapı sovent ile temas haline ise moleküler şaperonlar tarafından tanınır.

Protein tanıma dizilerinin kompozisiyonlarında bazı farklılıklar olsa da tipik bir şaperonun hedefi yanlardan bazik amino asitler ile kuşatılmış, kısa, hidrofobik amino asit zincirleridir. Asidik residular bu tanıma bölgelerinde azdır.



Hücre İçinde Protein Katlanması

Ökaryotik hücrelerde şaperon sistemler prokaryotlara göre daha kompleks olsa da bu farklı hücre tiplerinde birçok homolog şaperon sınıfı tanımlanmıştır.

Hem ökaryot hem prokaryotlarda sitosolde ve aynı zamanda mitokondri ve kloroplasttarda ATP bağımlı olarak çalışırlar.

Baskın olarak görülen 5, geniş ölçüde korunmuş, moleküler şaperon ailesi mevcuttur:

→ Hsp100s, Hsp90s, Hsp70s, Hsp60s, and small heat shock proteins (sHsps).

Diğer şaperon sınıfı proteinler, Hsp40s, nucleotide exchange factors, ADP-destabilizing factors, gibi, şaperonlar için kofaktör olarak hareket ederler.

HOLDAZ grubu moleküler şaperonlar sadece stres koşullarında indüklenirken FOLDAZ grubu moleküler şaperonlar hem düzenli olarak hem de stres koşullarında eksprese olurlar.

Moleküler şaperonların özellikle 2 sınıfı üzerinde bilgilerimiz yoğunlaşmıştır.

Hsp70 ve Şaperonin Proteinler

Hsp70 şaperon proteinleri

Moleküler ağırlıkları 70000 Daltondur ve özellikle yüksek strese maruz kalmış Hücrelerde yaygın olarak bulunurlar. Bu yüzden de aynı zamanda Heat Shock Proteinleri olarak da bilinirler.

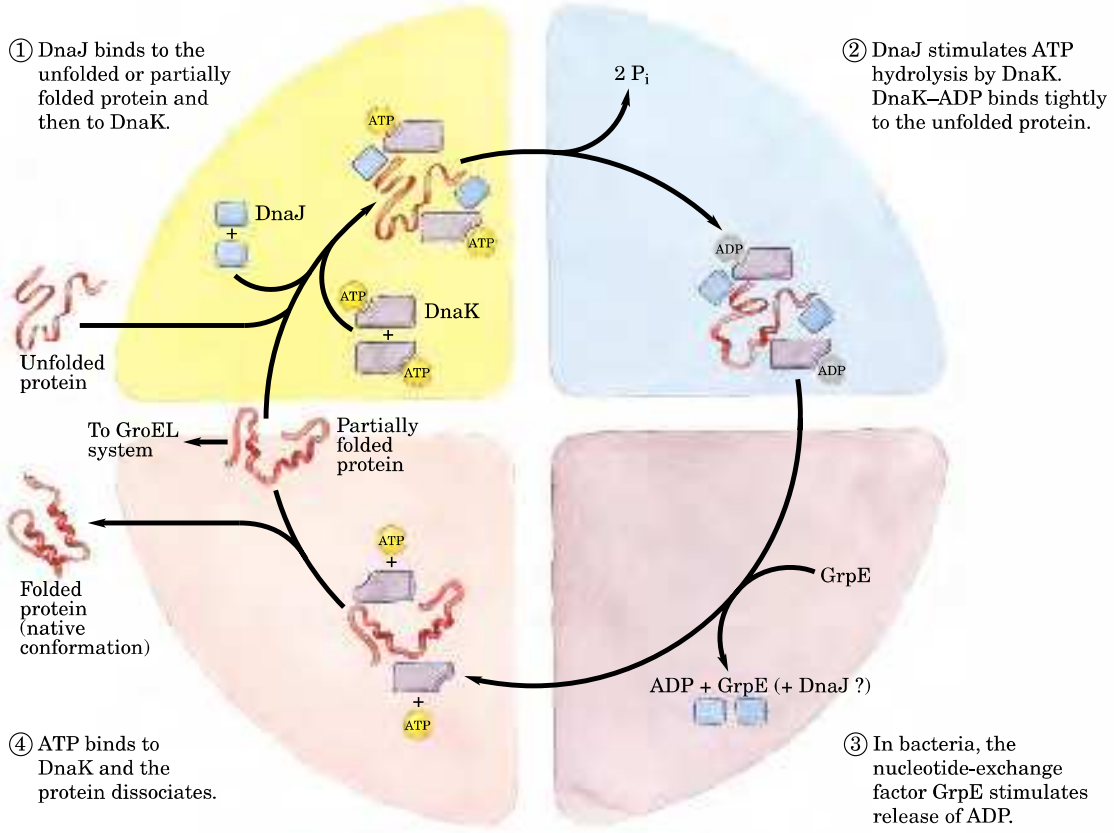
Hsp70 proteinleri katlanmamış polipeptidlerde hidrofobik residularca zengin bölgelere bağlanarak doğru katlanmaya yönlendirir ve hücre içinde istenmeyen agregasyonu önler.
Aynı zamanda sentezlenmekte olan polipeptidin sıcaklıkla denature olması da engellenir.

Hsp70 proteinlerinin bir diğer görevi membrandan çıkana kadar katlanmaması gereken proteinlerin katlanmasını bloke etmektir.

Hücre İçinde Protein Katlanması

Hsp70 proteinleri Hsp 40 gibi bazı diğer şaperonların ve ATP hidrolizinin olduğu bir döngüde polipeptidlere bağlanır ve ayrılır.

- DnaJ Katlanmamış ya da kısmen katlanmış proteine ve daha sonra DnaK'ya bağlan



-DnaK nın bağlanması ATP hidrolizini başlatır

-Nükleotid exchange faktör GrpE ADP nin ayrılmasını sitümüle eder

-ADP salınımıyl abirlikte önce DnaJ

-Daha sonra da DnaK salınırken

-En son hedef protein doğru katlanmış olarak sistemden ayrılır

Şaperonin (Hsp60) Proteinler

Kendi kendilerine katlanmayan bir grup hücresel proteinin katlanabilmesi için gerekli protein komplekslerini oluştururlar.

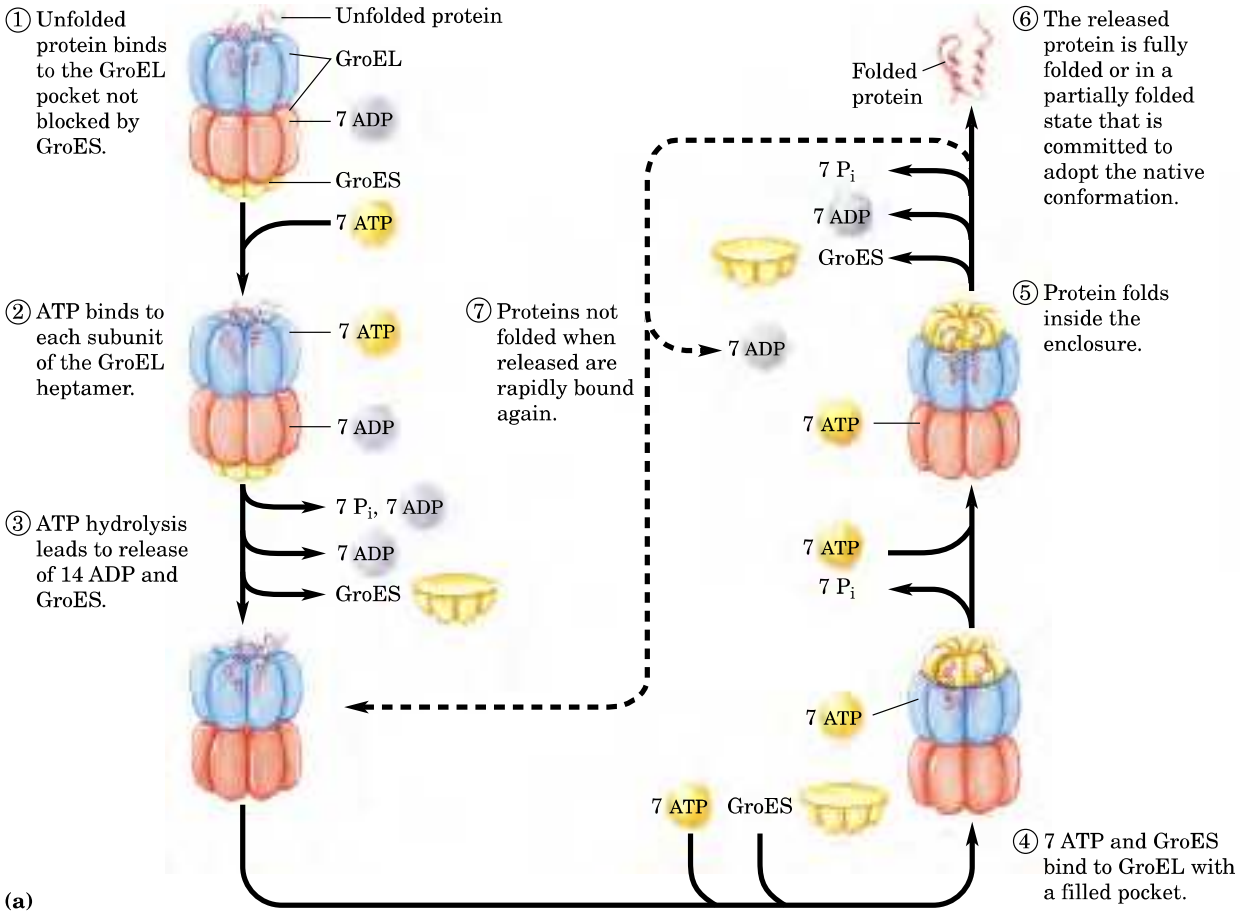
E. coli' deki hücresel proteinin yaklaşık %15inin GroEl/GroES denen şaperonin sistemini gerektirdiği bilinmektedir.

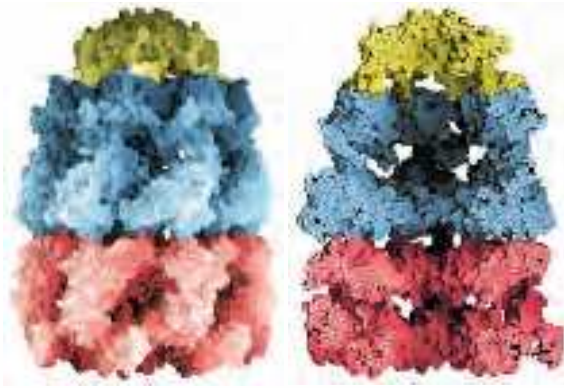
Bu oran normal şartlarda %15 iken ısı şoku gibi stres koşullarında 2 katına çıkabilmektedir.

GroEL/GroES proteinleri ilk kez bazı bakteriyel virüslerin büyümesi için gerekli proteinler olarak tanımlandığından "Growth Factor" den Gro adını almaktadır.

Katlanmamış proteinler GroEL kompleksiiçindeki ceplere bağlanır ve cepler GroES kapağı tarafından geçici olarak kapatılır.

GroEL , ATP hidrolizi ve GroES'in bağlanma ve ayrılmasına paralel olarak konformasyonel değişikliğe uğrar. Böylece bağlanan polipeptidin doğru katlanması teşvik edilir.





Moleküler Şaperonlar

Bazı proteinlerin katlanma yolu izomerizasyon reaksiyonlarını katalizleyen 2 enzime gerek duymaktadır.

Protein Disülfid İzomeraz (PDI) yaygın bir enzimdir. Doğal konformasyon bağları oluşana kadar disülfid bağlarının değişimini katalizler.

PDI'ın fonksiyonları arasında uygun disülfid bağına sahip olmayan katlanma aramoleküllerinin eliminasyonu da vardır.

Peptid Prolil cis-trans İzomeraz (PPI) enzimi ise prolin peptid bağlarının cis-trans izomerleri arasındaki dönüşümü katalizler.

Bu işelm prolin peptid bağı içeren proteinlerin katlanmasında bir hız sınırlayıcı aşamadır.

Yanlış Katlanma ve Agregasyon

Oldukça kalabalık olan hücre ortamında doğru katlanma ve transport şaperon, şaperonin ve kofaktörleri içeren kompleks bir sistemle gerçekleşmektedir.

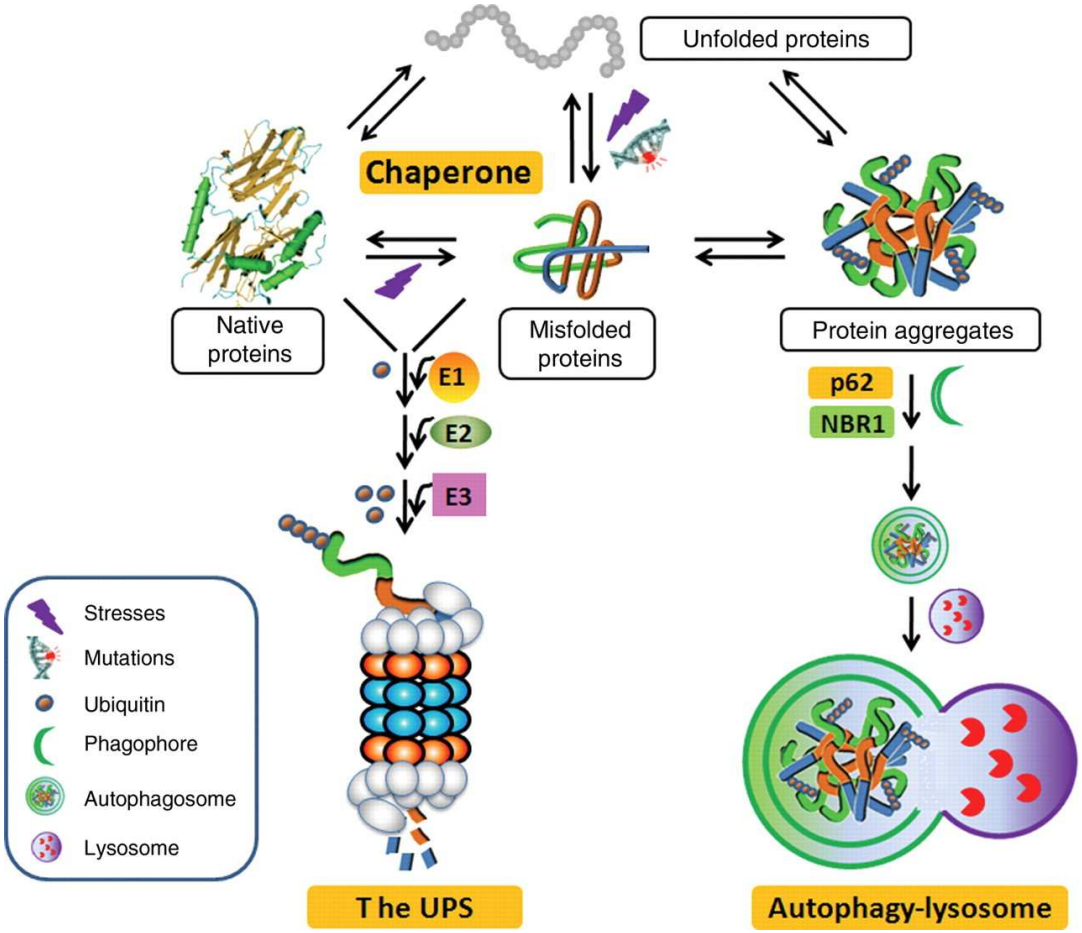
Spesifik bir proteinin doğal yapısını kazanamaması ve bu kontrol mekanizmasının işlevini gerçekleştirememesi "**protein yanlıl katlanma hastalıkları**" denilen patolojik bir duruma sebep olmaktadır.

Hücre içindeki **fonksiyonel protein miktarının azalması** normal hücre fonksiyonun kaybolmasına neden olarak cystic fibrosis, emphysema gibi hastalıklara neden olur.

Yanlış katlanma hastalıklarının meydana gelmesinin büyük bir nedeni ise **agregasyondur.** Hücre içinde genellikle fibriler agregatlar olarak biriken proteinler **amyloid fibriller** olarak tanımlanmaktadır.

Bu durumlarda genellikle şaperon prtoeinler etkili bir şekilde çalışamazken, **protein degradasyon sistem**i de yanlış katlanmış proteinleri elimine edememektedir.

Agregasyon ve amiloid fibril protein oluşumu **artmış ekspresyon seviyesi** ve protein yapısını destabilize edici **mutasyonlar** nedeniyle kaynaklanabilir.



Hücre İçinde Protein Katlanması

Amyloid proteinlerle ilişkili olduğu bilinen 20 insan nörodejenratif hastalığı bilinmektedir.

Alzheimer's, Parkinson's, and Huntington's disease , spongiform encephalopathies----------→ merkez sinir sistemini etkiler

type II diabetes----------→ Langerhans' adacıklarında birikme olursa