

A felgombolyodás problémája

1. A probléma
2. A fehérjék stabil konformációs állapotai
3. A felgombolyodás általános tulajdonságai
4. A felgombolyodás modelljei
5. A felgombolyodás nyomon követésének technikái
6. A felgombolyodás kinetikai jellemzői
7. Az "új szemlélet"

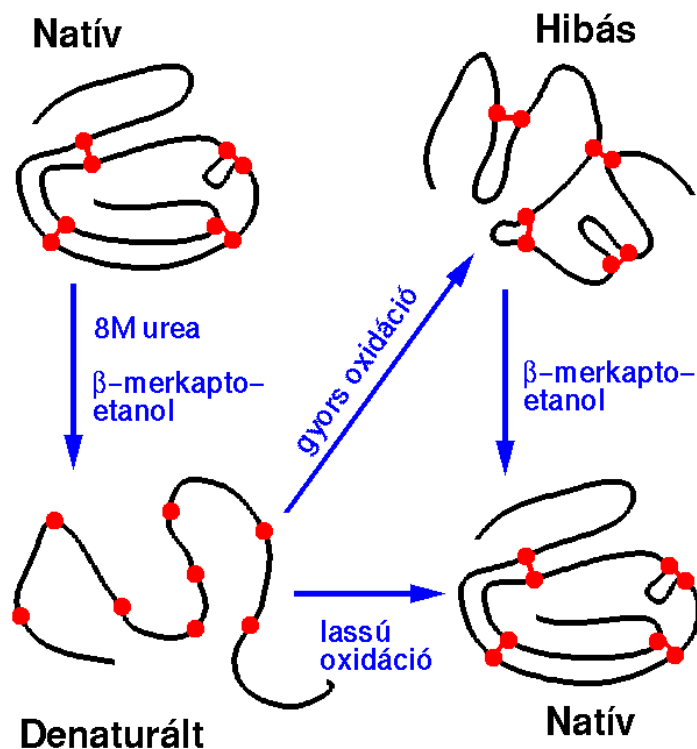
A felgombolyodási probléma

Centrális dogma:

DNS \rightarrow RNS \rightarrow polipeptidlánc \rightarrow ? \rightarrow ? működőképes konformáció

(genetikai kód második fele)

Anfinsen kísérlete (1961)



- Ribonukleáz enzim, benne 8 cisztein, 4 diszulfidhíd
- Diszulfidhidakat béta-merkaptó-**etanol**lal redukáljuk és a fehérjét 8M ureával denaturáljuk \rightarrow rendezetlen szerkezet, hiányzó aktivitás
- Levegőn állni hagyjuk \rightarrow lassú oxidáció \rightarrow néhány óra alatt a szerkezet helyreáll, az enzim aktívvá válik
- Oxidálószerrel gyors oxidáció \rightarrow diszulfidhidak rossz párosításban állnak helyre \rightarrow sem a szerkezet, sem az aktivitás nem áll helyre
- Ez a hibás szerkezet kevés redukálószer hozzáadására kijavítható

Következtetés: az aminosavsorrend tartalmazza a háromdimenziós szerkezet kialakulásához szükséges összes információt. A felgombolyodás *termodinamikai kontroll* alatt áll: a natív szerkezet a termodinamikailag legstabilisabb állapot.

Tehát: az elsődleges szerkezet meghatározza a 3D szerkezetet. De

HOGYAN?

Ez a felgombolyodási probléma.

Alproblémák:

- Milyen kinetikus folyamat vagy útvonal révén veszi fel a fehérje a natív, biológiailag aktív konformációt?
 - Mi a felgombolyodott konformációk stabilitásának fizikai alapja?
 - Az aminosavsorrend miért éppen azt a 3D szerkezetet és felgombolyodási mechanizmust határozza meg, amit, és miért nem valami más?
 - Ha adott egy fehérje aminosavsorrendje, hogyan lehet abból a háromdimenziós szerkezetet megjósolni?
-

Az első kérdés részkérdései:

- A felgombolyodás termodinamikai vagy kinetikai kontroll alatt áll? Hogyan képes a polipeptidlánc rövid idő alatt megtalálni a natív szerkezetet?
 - Mi indítja el a felgombolyodást, és mi az ehhez szükséges legrövidebb idő?
 - Milyen útvonalon történik a felgombolyodás? Milyen a köztitermékek szerkezete?
 - Az *in vitro* kísérletek alapján felismert szabályszerűségek érvényesek-e *in vivo* is?
-

A felgombolyodási probléma jelentősége

- **Elméleti jelentőség:** A molekuláris biológia és a fehérjebiofizika egyik legizgalmasabb, legtöbb fejtörést okozó problémája. Számos sejtbiológiai folyamattal nagyon szorosan összefügg.
 - ◆ A genetikai kód második fele
 - ◆ A fehérjék bioszintézise és degradációja
 - ◆ Hősokk
 - **Biotechnológiai jelentőség:**
 - ◆ A baktériumban túlexpresszióval termeltetett idegen fehérjék legtöbbször ún. *inklúziós testekké* tapadnak össze. Ezekből kell a fehérjéket *renaturálni*.
 - **Orvosi jelentőség:** "felgombolyodási betegségek": Mutáció hatására vagy nem megfelelő körülmények között egyes fehérjék rosszul gombolyodnak fel, aggregálódnak.
 - ◆ Prionbetegségek: Amiloid lerakódások keletkezése szivacsos agysorvadásban (kergermarhakór, Creutzfeld–Jakob)
 - ◆ Amiloid rostok Alzheimer–kórban
-

A Levinthal–paradoxon: termodinamikai vagy kinetikai kontroll?

- Anfinsen kísérlete → a natív térszerkezet a polipeptidlánc szabadentalpia–minimumának felel meg, azaz termodinamikailag az a legstabilabb állapot az adott körülmények között. Tehát a felgombolyodás *termodinamikai kontroll* alatt áll.
 - *Hogyan találja meg a lánc az energiaminimumot?*
 - ◆ Minden peptidegységnek kb. 10 különböző konformációja van
 - ◆ Tehát egy 100 aminosavból álló láncnak 10^{100} különböző konformációja van.
 - ◆ Egyik aminosavkonformáció a másikba legalább 10^{-13} másodperc alatt alakul át, a teljes láncre vonatkoztatva 10^{-11} mp alatt.
 - ◆ Tehát a natív konformáció megtalálásához kb. 10^{89} másodpercre, azaz kb. 10^{81} évre van szükség.
 - ◆ A valóságban 1 másodpercen belül felgombolyodik.
 - A gyors felgombolyodás csak úgy lehetséges, ha a konformációs tér nem férhető hozzá teljes egészében a lánc számára, hanem a folyamat egy *útvonalon* halad, *kinetikai kontroll* alatt áll.
 - Ez a **Levinthal–paradoxon** (Levinthal 1968): az Anfinsen–kísérlet szerint termodinamikai kontroll van, az állapotszámlálás szerint kinetikai kontroll. Most akkor melyik?
 - A paradoxon feloldása: lásd később.
-

A fehérjék stabil konformációs állapotai

- A **legombolyodott (denaturált)** állapot. Jele: **U** (unfolded) vagy **D** (denatured)
 - A **felgombolyodott (natív, általában biológiailag aktív)** állapot. Jele: **F** (folded) vagy **N** (natív).
 - A **köztes állapotok (közti-termékek, intermedierek)**. Jelük: **I** (intermediate)
-

A legombolyodott (denaturált) állapot

- Ideális esetben: **véletlen elrendeződésű lánc (random coil)**
 - ◆ minden torziós szög független a szekvenciában távolabbi torziós szögektől
 - ◆ minden konformációnak kb. azonos a szabadentalpiája
 - ◆ kivéve, ahol a lánc átfedné önmagát (kizárttérfogat–effektus)
 - ◆ 100 aminosav $\rightarrow 10^{100}$ konformáció. Ha egy oldatban 10 mg fehérje van, ez kb. 10^{18} db molekula. Tehát: várhatóan mindegyik molekula más–más konformációban van.
 - ◆ Erős denaturálószerekben (6M GdmHCl, 8M urea) a fehérjék jó közelítéssel valóban véletlen elrendeződésűek (hidrodinamikai tul. szerint)
 - Enyhébb denaturálószer, ill. pH– vagy hőmérsékleti szélsőségek: a szerkezet **kevésbé random**, s valamivel kompaktabb.
 - ◆ Lokális hidrofób oldallánc–csoportosulások
 - ◆ egy kevés hélix tartalom (főleg alkoholos oldatban)
 - Termodinamikailag a legombolyodott állapot egységes: nem tartalmazhat kooperatívan felgombolyodott részstruktúrákat.
-

A teljesen felgombolyodott, natív állapot

- Alapegység a **domén**
 - ◆ Számos esetben kimutatták, hogy az izolált domének önállóan képesek felgombolyodni.
 - ◆ Azonban az izolált domének többnyire nem olyan stabilak, mint a teljes fehérje (pl. foszfoglicerát kináz)
 - ◆ Az izolált doménekből általában nem rakódik össze a funkcióképes fehérje
 - **Szubdomének** (doménnél kisebb töredékek): egyes esetekben szintén képesek önálló felgombolyodásra, más esetekben nem.
 - Doménméret felső határa kb. 200 aminosav. Ennél nagyobb feltehetően nem gombolyodna fel.
 - A szerkezet **állandósága**:
 - ◆ A különböző kristályformákból röntgendiffrakcióval és az oldatból NMR–rel nyert 3D szerkezetek lényegében mindig azonosak
 - ◆ A szerkezet kisebb–nagyobb mértékben flexibilis (Brown–mozgás, kis fehérjék néhány óránként vagy naponként teljesen le is gombolyodnak), de közel marad az átlagszerkezethez.
-

A köztes állapotok

Másképpen: **kompakt denaturált állapotok**. Csak akkor figyelhetők meg, ha elég sok molekula veszi fel ezeket, tehát ha eléggé stabilak.

- Híg denaturálószerben vagy szerves oldószerben
- A leginkább vizsgált: **"olvadt gombóc"** (molten globule) állapot
 - ◆ kompakt
 - ◆ nagy konformációs fluktuációk, különösen az oldalláncoknál
 - ◆ laza, nonspecifikus hidrofób kölcsönhatások
 - ◆ rendezetlen, fluktuáló harmadlagos szerkezet
 - ◆ ellenben a natívhoz hasonló másodlagos szerkezet
 - ◆ számos fehérjében kimutatták (pl. alfa–laktalbumin, mioglobin)
- **"Pre–olvadt–gombóc"** (pre–molten–globule):
 - ◆ kevésbé kompakt, sokkal lazább
 - ◆ van másodlagos szerkezet, de nem mindig hasonlít a natívhoz
 - ◆ néhány fehérjénél kimutatták (citokróm c, triptofán szintáz)
- **"Nagy rendezettségű" olvadtt gombóc**:
 - ◆ a natív harmadlagos szerkezet egy része megvan
 - ◆ kevésbé fluktuál

- ◆ néhány fehérjénél találták (ubiquitin, antitest)
- Vitatott, hogy a köztes állapotok rajta vannak-e a felgombolyodás útvonalán, vagy "útelágazások" eredményei.

A felgombolyodás általános tulajdonságai

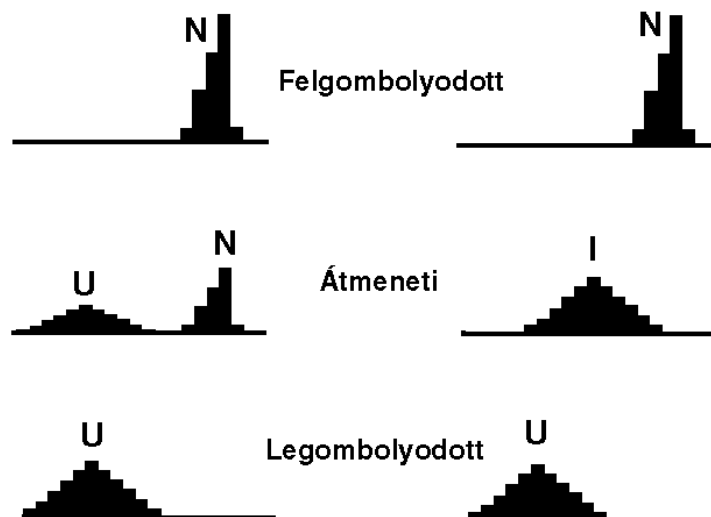
- A natív állapot többnyire reverzibilisen legombolyítható:
 - ◆ denaturálószer hozzáadásával
 - ◆ melegítéssel vagy hűtéssel
 - ◆ pH változtatásával (savanyítás, lúgosítás)
 - ◆ nagy nyomással
 - ◆ a diszulfidkötések elhasításával
- Kicsi, egydoménes fehérjék esetében többnyire:



kétállapotú átmenet (N natív, D denaturált áll.)

A köztes állapotok ezeknél nem figyelhetőek meg. *Kooperativitás* érvényesül: egy molekula vagy az N, vagy a D állapotban marad csak meg tartósan, minden egyéb állapotból vagy az egyikbe, vagy a másikba ugrik.

- Más fehérjéknél köztes állapotok is fellépnek
- A populációk eloszlása a felgombolyodottság mértékének függvényében:



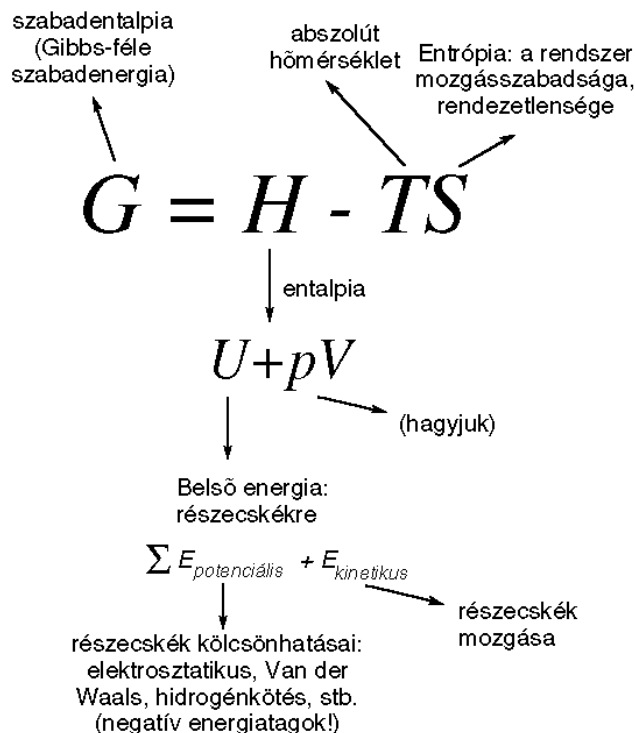
Bal oldal: egy kétállapotú, kooperatív átmenetet mutató fehérje populációeloszlásai (kicsi, egydoménes fehérjékre jellemző)

Jobb oldal: köztes állapottal rendelkező, nemkooperatív úton legombolyodó, hipotetikus fehérje populációeloszlásai

A felgombolyodott állapot stabilitása

Mennyiségek és értelmezésük

- *Állandó nyomás és hőmérséklet:* a rendszer egyensúlyi állapotát a **szabadentalpia** (G) minimuma adja.



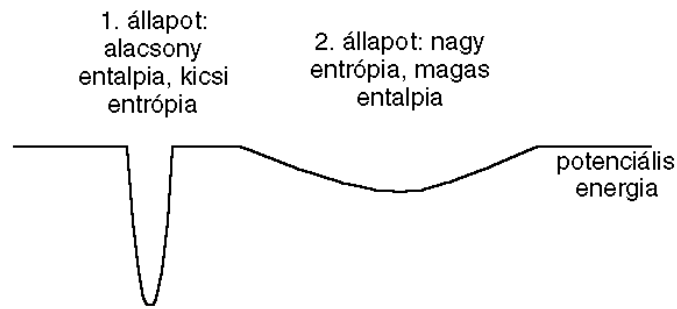
- Kedvező és ezért spontán módon végbemegy az a folyamat, melynek során G csökken. Kedvezőtlen, ezért spontán módon nem megy végbe az a folyamat, melynek során G növekedne.

A folyamat jellege	G változása	H változása	S változása	Értelmezés
Kedvező	-	-	kicsi	Kölcsönhatások jönnek létre, melyek csökkentik a belső energiát, ezáltal a szabadentalpiát
	-	kicsi	+	A rendszer mozgásszabadsága nő, így növekszik az entrópia és ezzel a szabadentalpia
Kedvezőtlen	+	+	kicsi	Kölcsönhatások szakadnak fel, melyek növelik a belső energiát, ezáltal a szabadentalpiát
	+	kicsi	-	A rendszer mozgásszabadsága csökken, így csökken az entrópia és ezzel a szabadentalpia

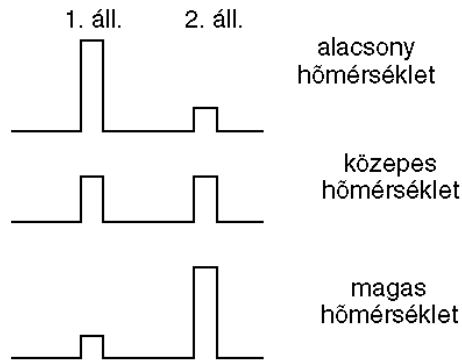
- Az entrópia és az entalpia általában egyirányba változik:
 - ◆ Ha kölcsönhatások jönnek létre, az entalpia csökken, s a mozgásszabadság csökken, így az entrópia is csökken
 - ◆ Ha kölcsönhatások szakadnak fel, az entalpia nő, s a mozgásszabadság nő, így az entrópia is nő
- Mi dönti el, hogy az entalpiacsökkentő vagy az entrópiánövelő folyamat valósul-e meg? A **hőmérséklet**, amely a szabadentalpia kifejezésében az entrópiát súlyozza.

Hőmérséklet	Kedvező folyamat	Hová törekszik a rendszer?
Alacsony	Entalpiacsökkenés: kölcsönhatások kialakulása (emiatt valószínűleg a mozgásszabadság csökkenése: entrópiacsökkenés)	Az alacsony entalpiájú állapotok felé (melyekben a mozgásszabadság valószínűleg korlátozott, az entrópia alacsony)
Magas	Entrópiánövekedés: a mozgásszabadság növekedése (emiatt valószínűleg kölcsönhatások felbomlása: entalpiánövekedés)	A magas entrópiájú állapotok felé (melyekben a kölcsönhatások valószínűleg felbomlanak, az entalpia magas)

- Példa: két állapottal rendelkező rendszer esetében:
 - ◆ 1. állapot: alacsony entalpia, alacsony entrópia (pl. fehérje natív állapota: sok kölcsönhatás, kicsi mozgásszabadság)
 - ◆ 2. állapot: magas entalpia, magas entrópia (pl. fehérje denaturált állapota: kevés kölcsönhatás, nagy mozgásszabadság [a lánc mozgásszabadságát a *konformációs entrópia* jellemzi])



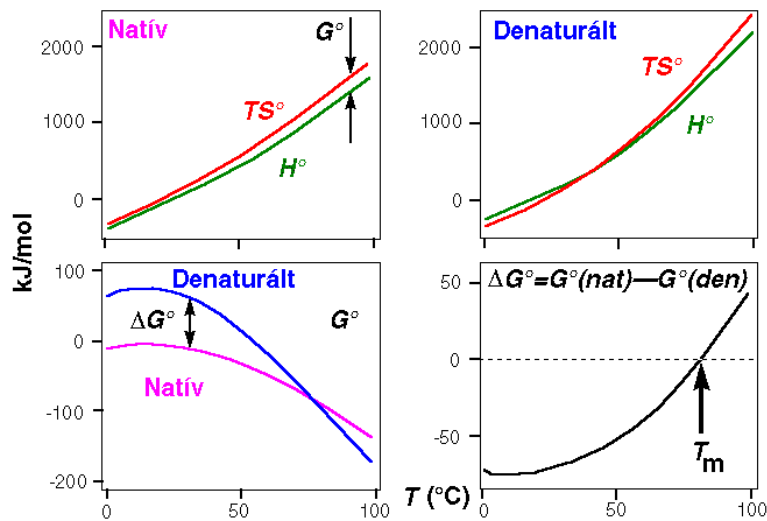
A részecskék számának eloszlása:



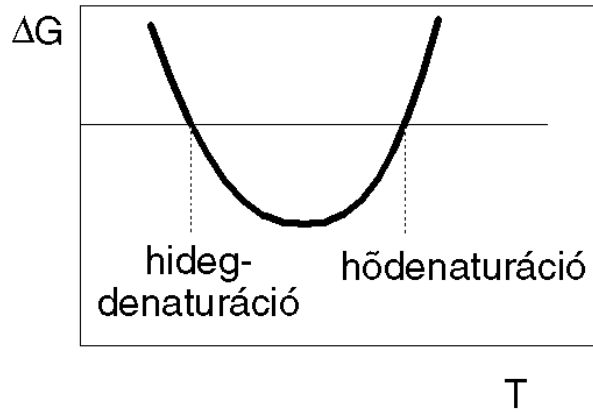
- A valóságban a helyzet bonyolultabb, mert denaturált állapotban az apoláros oldalláncok körül a víz rendezett, alacsony entrópiájú, a felgombolyodásnál ezek a vízmolekulák felszabadulnak, ami entrópiánövekedéssel jár. A konformációs entrópia csökkenése azonban jelentősebb ennél.

A fehérjék termodinamikai paramétereinek hőmérsékletfüggése

A lizozim termodinamikai paramétereit:



- A natív és a denaturált állapot közötti entalpia- és entrópiakülönbség erősen hőmérsékletfüggő, mert a két állapot hőkapacitása erősen eltér (a denaturálté sokkal nagyobb a nagyobb hidrofób felszín miatt)
- A natív állapot stabilitásának mértéke a natív és a denaturált állapot közötti szabadentalpia-különbség (ΔG).
- ΔG egy parabolyszerű görbe, amely két helyen metszi a vízszintes tengelyt:

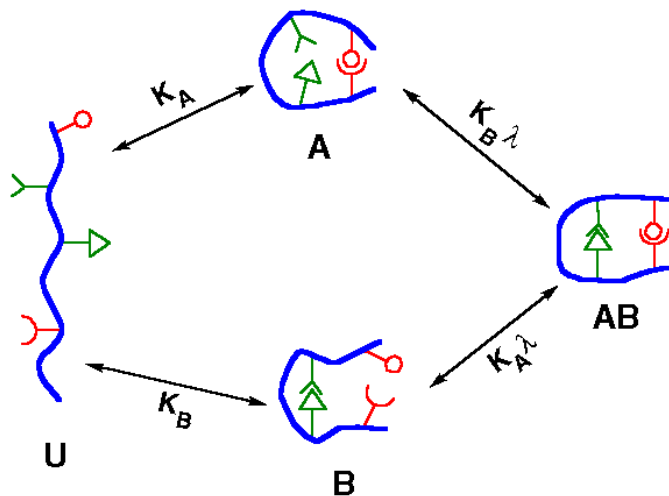


- deltaG–nek közepes hőmérsékleten van egy szélsőértéke. Itt maximális a stabilitás
- Az egyik metszéspont a hődenaturáció hőmérséklete (**olvadáspont**, T_m)
- A másik metszéspont a hidegdenaturáció hőmérséklete (gyakran 0 Celsius alá esik)
- deltaG 5–15 kcal/mol (20–60 kJ/mol) közé esik, tehát a fehérjék stabilitása kicsi. (Nagy számok kis különbsége)
- az N és U állapotok közötti egyensúlyi állandó 10^4 – 10^7 körüli.

A felgombolyodás kooperativitása

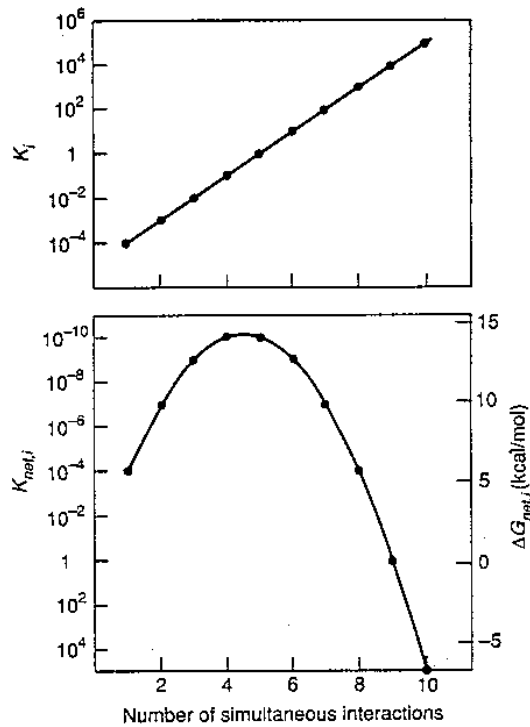
Mi az oka a kétállapotú átmenet kooperativitásának?

- A részlegesen felgombolyodott állapotokban olyan kedvezőtlen kölcsönhatások lehetnek, amelyek sem a natív, sem a denaturált állapotban nincsenek meg
- Az egyes kölcsönhatások kooperativitása



Két kölcsönhatás. Mindkettő erősíti a másikat egy *lambda* kooperativitási faktoral. Ok: közelebb hozza a kölcsönható partnereket, így kisebb lesz az entrópiaköltség.

Több kölcsönhatás esetén: Példa:



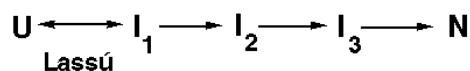
- ◆ 10 kölcsönhatás van, a legombolyodott állapotban mindegyikre $K=10^{-4}$
- ◆ A kooperativitás $\lambda=10$ együtthatóval érvényesül
- ◆ Emiatt ha n kölcsönhatás már megvan, akkor az $n+1$. $K \cdot \lambda^n$ egyensúlyi állandóval jön létre (felső grafikon)
- ◆ Alsó grafikon: A legombolyodott állapot és az n kölcsönhatást tartalmazó állapot közötti egyensúlyi állandó. Eleinte csökken, majd nőni kezd. 10 kölcsönhatásnál az állapot stabilizálódik.
- ◆ Tehát sok gyenge kölcsönhatás a kooperativitás miatt stabilizálja egymást.

A felgombolyodás modelljei

• "Nukleáció és gyors növekedés" (Wetlauffer 1973)

A sebességhatározó lépés egy "folding mag" keletkezése. Ha ez megvan, a felgombolyodás már erre építkezve gyorsan végbemegy. (Téves.)

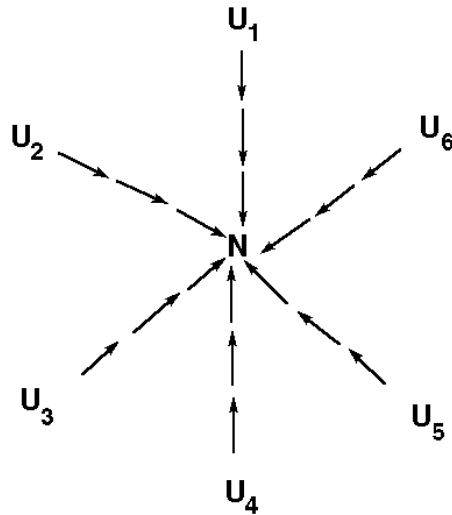
Kinetikai séma:



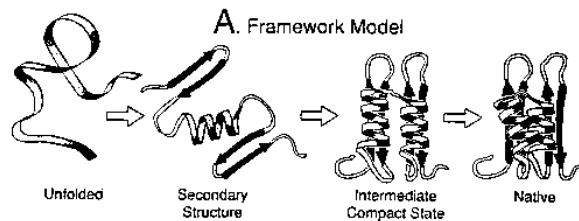
• "Puzzle játék" (jigsaw puzzle, Harrison és Durbin 1985)

Mivel a denaturált állapotban minden molekula konformációja más, mindegyik más útvonalon gombolyodik fel. Ahogyan egy puzzle-t is sokféle sorrendben lehet összerakni.

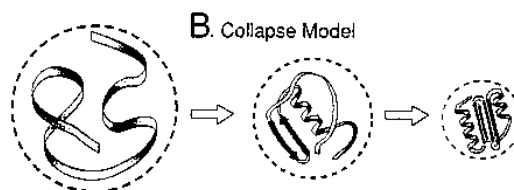
Kinetikai séma:



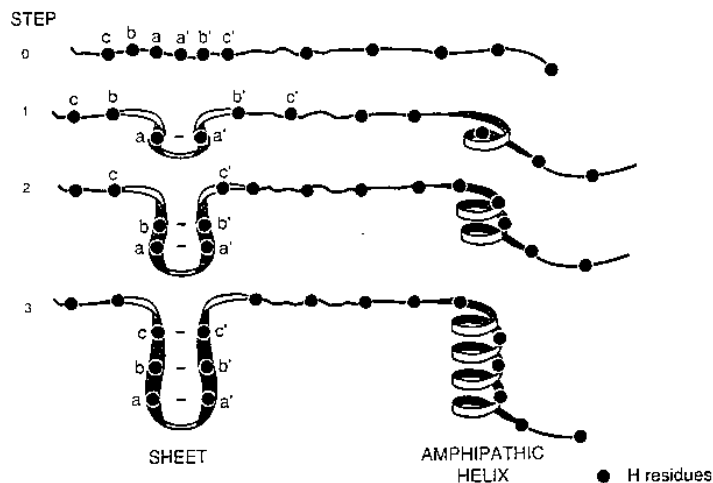
- **"Diffúzió–kollízió–adhézió"** (Karplus és Weaver 1976)
A legombolyodott fehérjében időnként natívszerű mikrodomének (pl. hélixrészlet) jelennek meg, miközben a lánc részei diffúziós mozgást végeznek. Ha a mikrodomének összetalálkoznak, összetapadnak és stabilizálják egymást.
- **Hierarchikus modellek:**
Felgombolyodás a szerkezeti hierarchia szerint. Mag, másodlagos szerkezet, szupermásodlagos, domén, monomer, oligomer.
- **Moduláris modellek**
Szubdomének mint modulok önállóan felgombolyodnak, majd asszociálódnak
- **"Keretmodell"** (framework model, Baldwin 1989)
A másodlagos szerkezeti elemek korán létrejönnek (ez a felgombolyodás első lépése) és meglehetősen stabilak. Később jön létre a harmadlagos szerkezet. (Ez egy hierarchikus modell.)



- **"Hidrofób kollapszus"** (Dill 1985)
Az első lépés a lánc összeesése a hidrofób kölcsönhatás miatt. A másodlagos szerkezet csak ezután vagy ezzel egyidőben jön létre.



- **"Hidrofób cipzár"** (Dill 1993)
A hidrofób kölcsönhatás cipzárszerű viselkedése segíti a másodlagos szerkezeti elemek létrejöttét.



A felgombolyodás nyomon követésének technikái

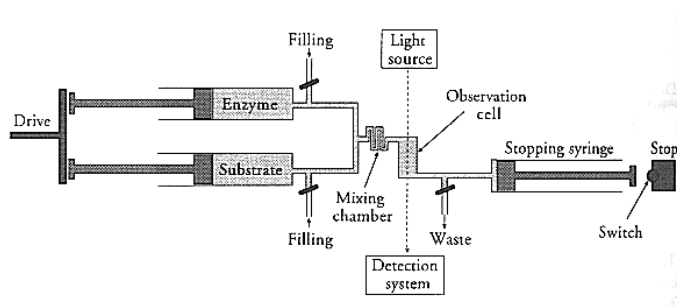
Általában: a fehérjét denaturáló közegből gyorsan olyan környezetbe visszük, amely a natív állapotnak kedvez. Pl.

- nemdenaturáló pufferrel kihigítjuk
- hidegdenaturált fehérjét hirtelen fölmelegítünk (T-ugrás)
- fotokémiai reakcióval indítunk

Ezután a felgombolyodás folyamatát követjük.

A felgombolyodás beindításának módszerei

- Keveréses módszerek
 - ◆ **Stopped-flow módszer** (enzimkinetikából ismert)



Itt a két hengerben nem szubsztrát és enzim, hanem fehérje és nemdenaturáló puffer van. A dugattyúkat benyomjuk —gyors összekeveredés. A megállító dugattyú ütközése állítja meg az áramlást és indítja el a mérést.

Holtidő: kb. 1 ms.

◆ Turbulens keverők

Pl. Berger-féle golyós keverő.

Holtidő: >100 mikrosec vagy több

◆ Folyamatos áramlású rendszerek. Holtidő: pár 10 mikrosec.

◆ "freejet" (szabad sugaras) módszer: lamináris áramlás kis nyíláson. Holtidő: pár 10 mikrosec.

- Nem keveréses módszerek

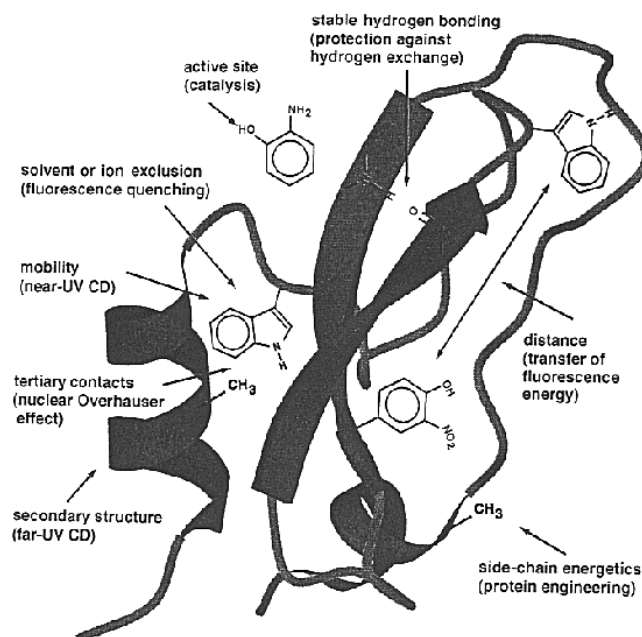
◆ Flash fotolízis: fotoreakció lézervillanással

◆ Fényindukált elektrontranszfer (redoxfehérjénél oxidált denaturált állapotban elektrontranszfer felgombolyodást indít)

Holtidő: < 1 mikrosec

◆ T-ugrás, gyors fűtéssel

A felgombolyodás követésének módszerei



Tulajdonság	Módszer	Felbontás	Mit mér?
A hidrofób mag szorossága	Belső fluoreszcencia	<1 ms	Főleg a triptofánok orientációja és környezete
	Ultraibolya elnyelés	ms	Főleg a tirozinok orientációja és környezete
	Külső (ANS) fluoreszcencia	ms	Hidrofób foltok és árkok képződése, felbomlása
	Fluoreszcencia quenching	ms	A triptofánok elszigeteltsége külső, hidrofil quencherektől
	Ciszteinil quenching	10 s	A ciszteinek védettsége hidrofil reagensektől
A molekula mérete	Fluoreszcencia anizotrópiája	ms	A triptofánok mozgékonyasága és kb. molekulaméret
	Fluoreszcenciás energiatranszfer	ms	Triptofán és egy kovalensen kapcsolt fluorofór távolsága
	Kisszögű röntgenszórás	<100 ms	Átlagos girációs sugár
	Kvázielasztikus fényszórás	1 s	Átlagos girációs sugár
Másodlagos szerkezet és tartós H-kötések	Cirkuláris dikroizmus távoli UV-ben	ms	Szekvenciára és populációra átlagolt gerinckonformáció
	"Pulse-labelling" NMR	5–10 ms	Hol vannak stabil amid és triptofán H-kötések
	"Pulse-labelling" tömegspektroszkópia	5–10 ms	Hidrogénkötések képződése diszkrét intermedierekben. Heterogén populációt felbontja!

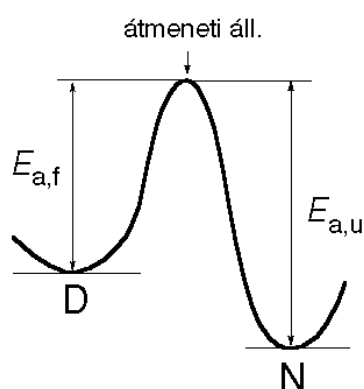
Harmadlagos	Biológiai aktivitás	ms–s	Natív szerkezet az aktív helyen
szerkezeti kontaktusok, natív szerkezet megléte	Megszakított felgombolyodás	10 ms	Diszkrét intermedierek legombolyodási sebessége (mint stabilitásuk mértéke)
	Cirkuláris dikroizmus közeli UV-ben	ms	Stabil kontaktusok aromás csoportok között, diszulfidhidak
	Valós idejű NMR	1 s	Specifikus kontaktusok oldalláncok között
	Mutációs vizsgálatok		Az egyes oldalláncok energijáruléka a diszkrét intermedierek stabilitásához

Az átmeneti állapotok jellemzése

- Átmeneti állapot: nagy energiájú, igen rövid élettartamú (ne keverjük össze a köztes állapottal), állapot, két stabil állapot közötti energiagát teteje.
- Jellemzése csak közvetett módszerekkel lehetséges:
Különbéféle tényezők hatását vizsgáljuk a felgombolyodás sebességére, ebből az átmeneti állapot tulajdonságaira következtethetünk. Pl.:
 - ◆ Hőmérséklet → termodinamika, aktiválási energia
 - ◆ Nyomás → relatív moláris térfogat
 - ◆ denaturálószeres → vízzel érintkező felszínek
 - ◆ ionerősség, pH → ionizálható csoportok járuléka
- Ezekből általános kép: az átmeneti állapot kompakt, de laza konformációk halmaza

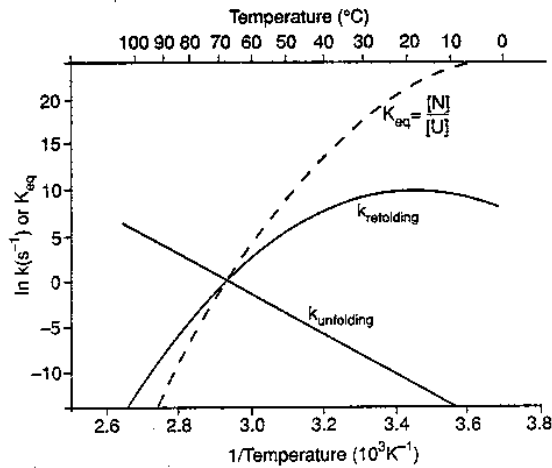
A felgombolyodás kinetikai jellemzői

- Két állapot esetén a felgombolyodás "reakcióegyenlete":
$$N \xrightleftharpoons[k_u]{k_f} D$$



k_f a felgombolyodás, k_u a legombolyodás sebességi állandója. A sebességi állandók kapcsolata az aktiválási energiákkal: $k_f = A_f e^{-E_{a,f}/RT}$, $k_u = A_u e^{-E_{a,u}/RT}$. Az egyensúlyi állandó: $K_{eq} = k_f/k_u$

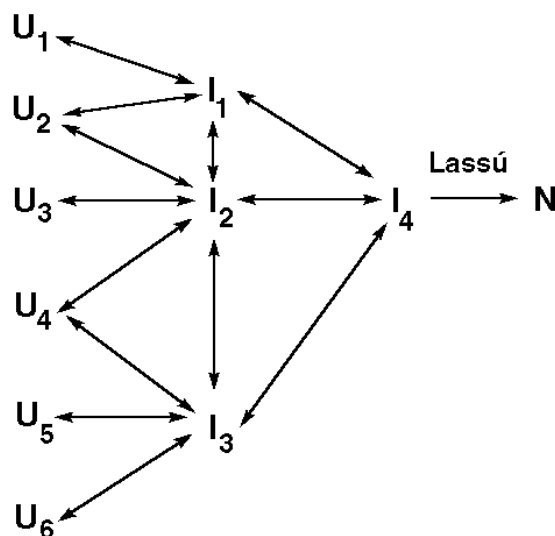
A sebességi és egyensúlyi állandók tipikus hőmérsékletfüggése (Arrhenius-ábrázolás és Van't Hoff-ábrázolás)



- Az $\ln K$ ábrázolva $1/T$ függvényében: **Van't Hoff-ábrázolás**. Meredekségéből a reakció entalpiája (ΔH) számítható ki.
- Az $\ln k$ ábrázolva $1/T$ függvényében: **Arrhenius-ábrázolás**. Meredekségéből a reakció aktiválási energiája számítható ki.
- A K_{eq} Van't Hoff-ábrázolása kismértékben görbült, ez ΔH hőmérsékletfüggéséből ered, ez pedig a natív és denaturált állapot közötti hőkapacitás-különbségből. Utóbbi abból adódik, hogy a felgombolyodás során hidrofób felszínek temetődnek el. (A hőkapacitás ugyanis arányos a szabadon lévő hidrofób felszínnek összfelületével.)
- k_f és k_u Arrhenius-ábrázolásából az átmeneti állapot milyenségére lehet következtetni:
 - ◆ $k_{unfolding}$ ($=k_u$) Arrhenius-ábrázolása lineáris \rightarrow a legombolyodás aktiválási energiája hőmérsékletfüggetlen, tehát az átmeneti állapot hőkapacitása megegyezik a natívéval. Ez azt jelenti, hogy az átmeneti állapotban ugyanakkora hidrofób felszín van szabadon, mint a natív állapotban.
 - ◆ $k_{refolding}$ ($=k_f$) Arrhenius-ábrázolása erősen görbült \rightarrow a felgombolyodás aktiválási energiája hőmérsékletfüggő, tehát az átmeneti állapot hőkapacitása eltér a denaturáltétól. Ez azt jelenti, hogy a denaturált állapotból az átmeneti állapotba kerülés során hidrofób felszínek temetődnek el.
 - ◆ Konklúzió: az átmeneti állapot sokkal inkább a natív állapothoz hasonlít, mint a denaturálthoz.
- (Csak véletlen, hogy a három görbe egy pontban metszi egymást)

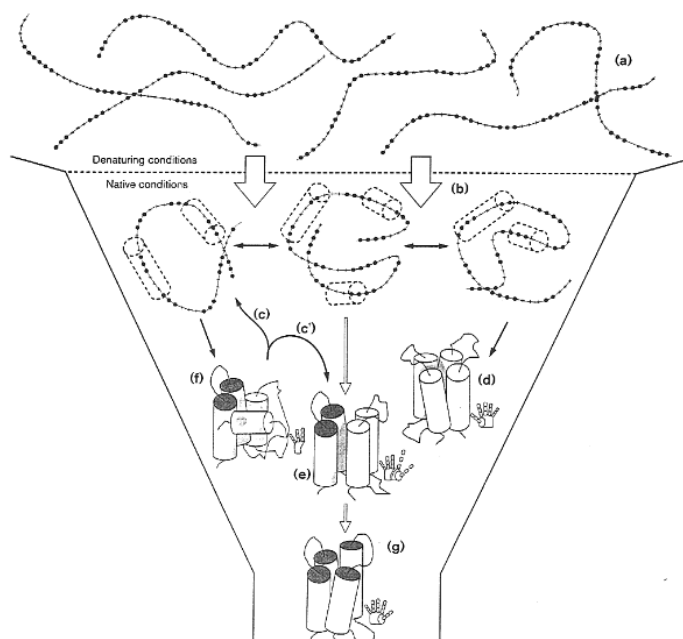
Kinetikai modellek

- A legombolyodás kinetikája ált. egyszerű: két állapot, egy sima sebességi állandó
- A felgombolyodás kinetikája ált. bonyolult
 - ◆ néhány kis fehérje esetében itt is jó a kétállapot-modell
 - ◆ de általában több kinetikai fázis:



A nemnatív állapotok heterogén populációt alkotnak

A felgombolyodás realiztikusabb sémája



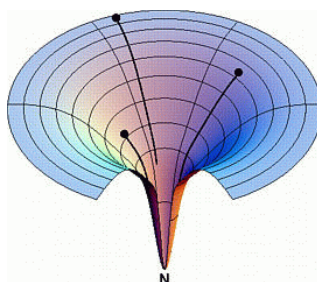
- (a) legombolyodott molekulák
- (b) hidrofób kollapszus, megjelenő másodlagos szerkezeti elemek, nukleációs helyek
- (g) a végcél: a natív fehérje, jobbkezes hélixköteg
- (f) rossz konnektivitású konformáció
- (d) rossz topológia: balkezes elrendeződés (hibás)
- (e) megfelelő elrendeződésű, de még laza állapot
- (c) a nem megfelelő köztitermék újból legombolyodhat
- (c') vagy átrendeződhet.

Tölcsér: a folyamat során egyre csökken a hozzáférhető állapotok száma (entrópia)

Az "új szemlélet"

- A kismolekuláknál megszokott reakciókinetika fogalmi nehézkesen alkalmazhatóak a felgombolyodásra.
- Heterogén populációk vannak
- Nincs egyértelmű reakciókoordináta

Az új szemlélet kulcsfogalma: **energiafelület**



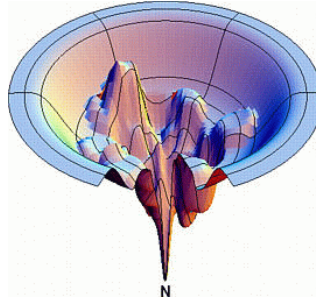
Felgombolyodási tölcser

- Szabadentalpia–felület
- Függőleges tengely: a molekula ún. *belső* szabadentalpiája. (az adott konformációhoz tartozó szabadentalpia, figyelembe véve az összes lehetséges oldószer–konfigurációt). Tehát a molekula konformációs entrópiája nincs benne.
- Vízszintes tengelyek: a fehérjéhez tartozó konformációs szabadsági fokok. (Pl. az összes lehetséges torziós szög a fehérjében). Tehát a felület minden egyes pontja a fehérje egy konformációjának felel meg.
- Sokdimenziós felület sokdimenziós hipertérben. A 3D ábrázolások csak szemléltetések

- Az egyes molekulák a legmélyebb pontot keresik, minden molekula más–más útvonalat bejárva, miközben a hőmozgás lökődí őket. A felület globális minimuma a fehérje natív állapotának felel meg, ide szánkázna le a molekulák a tölcser oldalán.

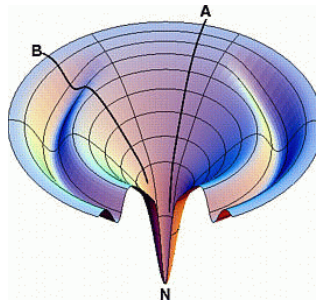
A fenti sima felület a legegyszerűbb, kétállapotú rendszernek felel meg.

Általános eset:



- bonyolult domborzat, dombok, gödrök, árkok, sok lokális minimum → bonyolult felgombolyodási kinetika

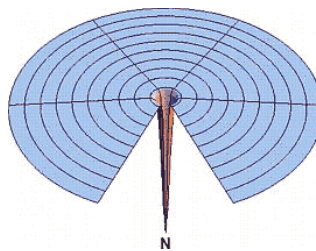
Két frakcióból álló sokaság a denaturált állapotban (lizozim ilyen):



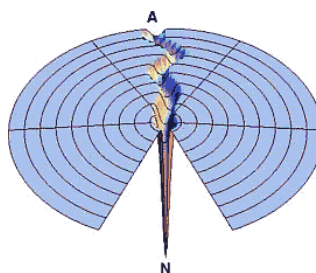
- lassan (B) és gyorsan (A) gombolyodó frakció

A Levinthal–paradoxon feloldása

Hibás kiindulópont:



Levinthal javaslata: útvonalak:



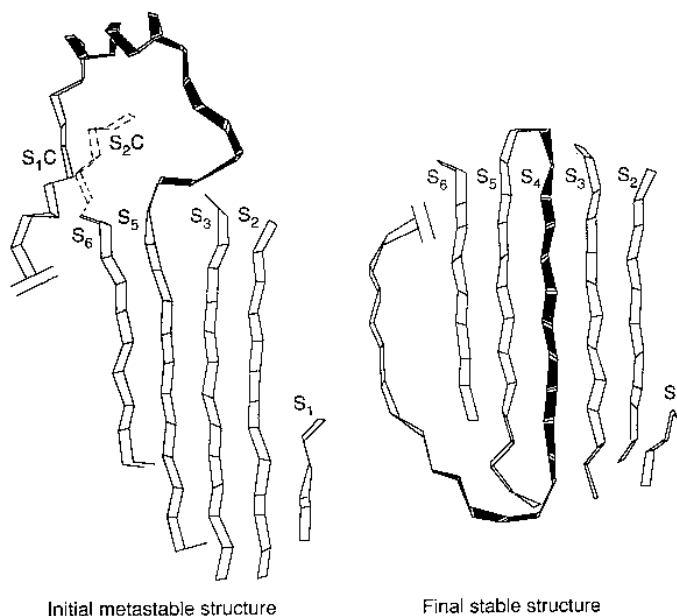
Valóság: **tölcsér!**

A felgombolyodás termodinamikai vagy kinetikai kontroll alatt áll?

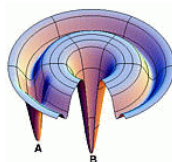
Válasz: A natív szerkezet termodinamikai kontroll alatt áll (a szabadentalpiafelület globális minimuma). Ezt az állapotot azonban a felgombolyodás során kinetikus kontroll alatt álló intermediereken keresztül éri el a fehérje.

Mindig a globális minimum-e a natív állapot?

Nem. Ellenpélda: plazminogén aktivátor inhibitor-1



- A biológiailag aktív forma instabil, pár óra alatt átalakul egy stabilabb állapotba
- Szerkezeti változás: a lánc egy része beépül a középső béta-lemezbe
- Energiafelülete efféle:



A régi és az új szemlélet összehasonlítása

	Régi szemlélet	Új szemlélet
Színpad	Útvonal	Energiafelület (tölcsér)
Szereplők	Jól elkülönülő, határozott szerkezetű, megjelölhető állapotok (pl. N, D, I ₁ , I ₂ , stb.)	A konformációk heterogén, dinamikus sokaságai
Történes	Egymás után, meghatározott sorrendben történő események sorozata	Sok párhuzamos szálon futó, diffúziószerű mikroszkopikus események
Kísérleti háttér	Hagyományos, optikai jelek változásain alapuló mérések	Modern módszerek (pulse-labelling NMR és tömegspektroszkópia, mutációs vizsgálatok, gyors, lézerindítású mérések)
Elméleti alap	Klasszikus kémiai reakciókinetika	Statisztikus fizika: spinüveg-modellek és rácsmoделlek