

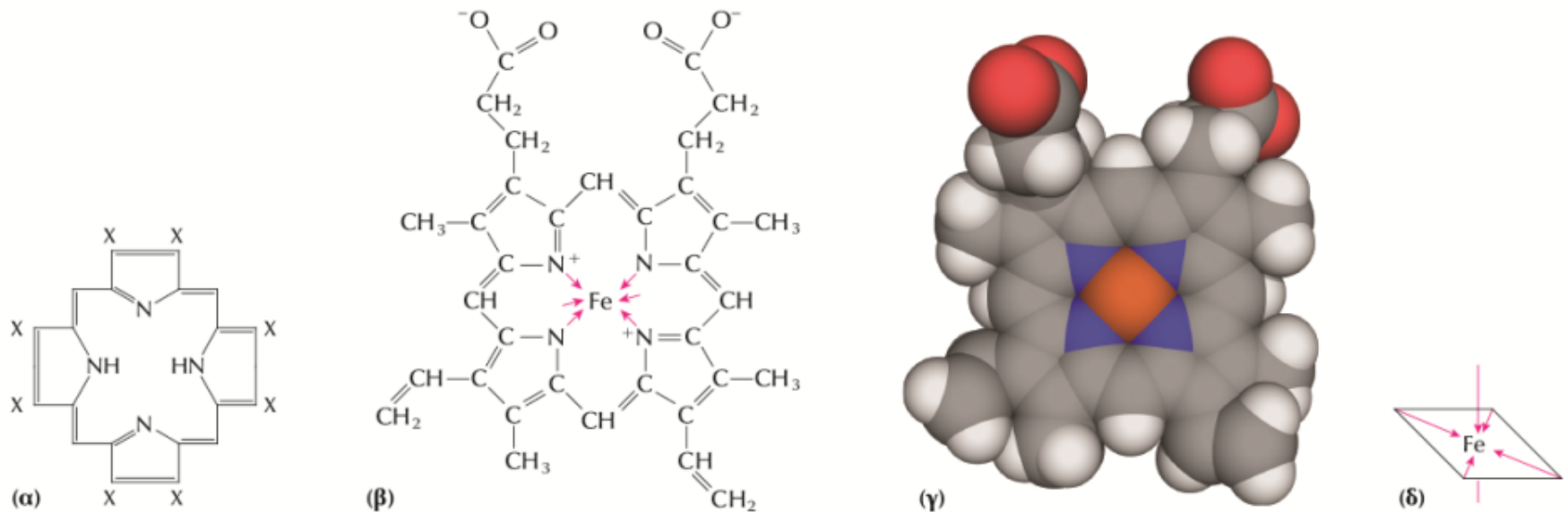
Λειτουργία των Πρωτεϊνών

Πρόσδεμα (ligand): κάθε μόριο που προσδένεται σε πρωτεΐνη *αντιστρεπτά* (μη ομοιοπολικά)
Θέση Πρόσδεσης (binding site): συγκεκριμένη θέση στην πρωτεΐνη

Επαγόμενη προσαρμογή τα προσδέματα επιφέρουν αλλαγές της διαμόρφωσης που μπορεί να είναι από μικρές μέχρι σημαντικές με μεγάλη κίνηση ολόκληρων τμημάτων της πρωτεΐνης

οι αντίστοιχοι όροι στα *ένζυμα* καλούνται **υποστρώμα** & **καταλυτικό ή ενεργό κέντρο**

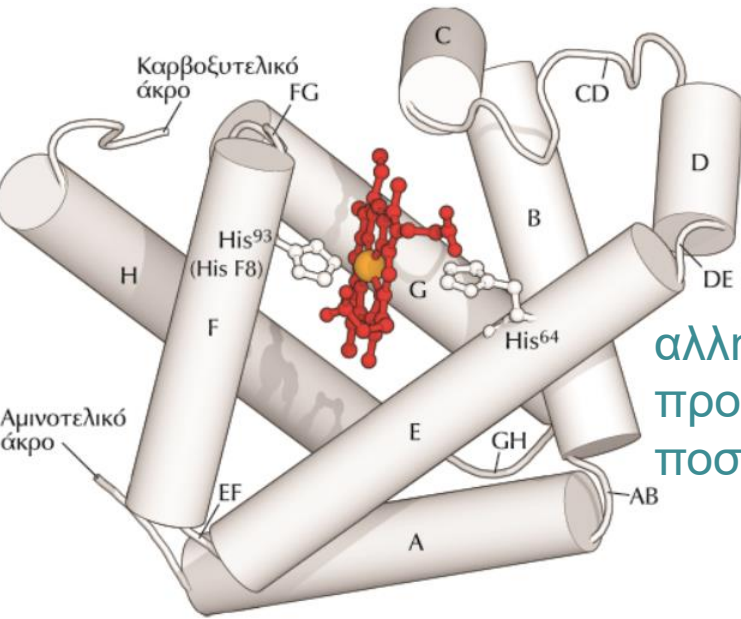
το οξυγόνο (Πρόσδεμα) προσδένεται σε μία προσθετική ομάδα αίμης (Θέση Πρόσδεσης)



ΕΙΚΟΝΑ 5-1 Αίμη. Η ομάδα της αίμης υπάρχει στη μυοσφαιρίνη, στην αιμοσφαιρίνη και σε πολλές άλλες πρωτεΐνες που αναφέρονται ως **πρωτεΐνες της αίμης**. Η αίμη αποτελείται από την πρωτοπορφυρίνη IX, μια περίπλοκη οργανική δακτυλιοειδή δομή, στην οποία προσδένεται ένα άτομο σιδήρου σε δισθενή κατάσταση (Fe^{2+}). (α) Οι πορφυρίνες, όπως η πρωτοπορφυρίνη IX, αποτελούνται από τέσσερις δακτυλίους πυρρόλης οι οποίοι συνδέονται με «γέφυρες» μεθινίου με υποκαταστάσεις σε μια ή περισσότερες από τις θέσεις που ορίζονται ως X. (β, γ) Δύο αναπαραστάσεις της αίμης. Το άτομο σιδήρου της αίμης έχει έξι δεσμούς συντονισμού: τέσσερις στο επίπεδο του δακτυλιοειδούς συστήματος της πορφυρίνης, συνδεδεμένους με την πορφυρίνη, και (δ) δύο κάθετους στο επίπεδο της πορφυρίνης. [Πηγή: Προέλευση αίμης: PDB ID 1CCR, H. Ochi et al., *J. Mol. Biol.* 166:407, 1983].

Σφαιρίνες οικογένεια πρωτεϊνών που προσδένονται σε οξυγόνο

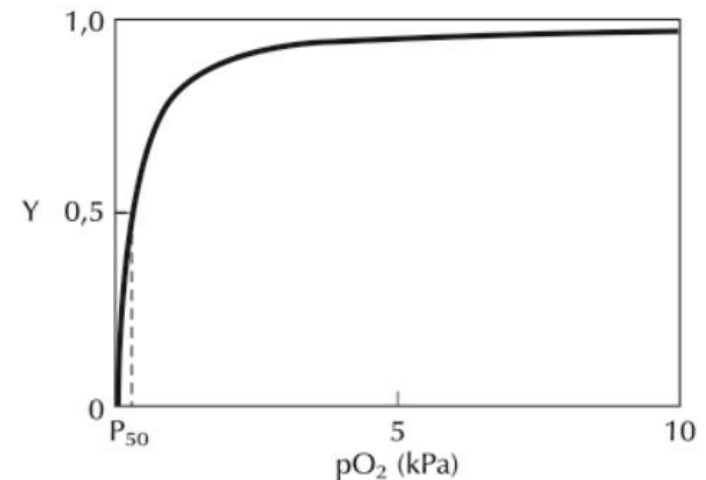
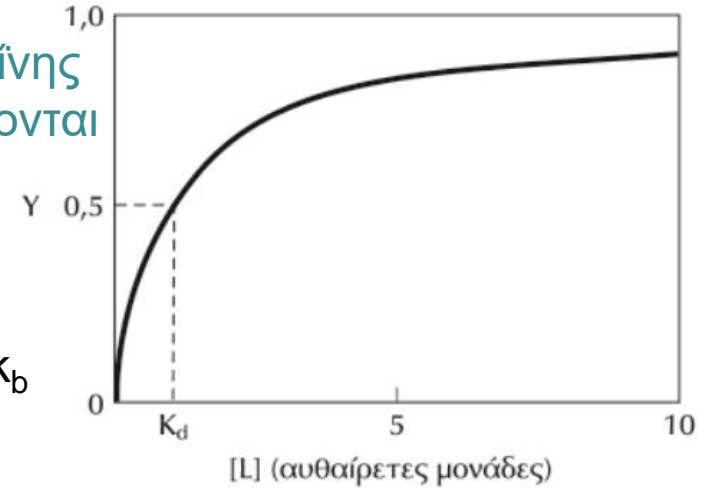
Δεσμεύουν οξυγόνο στα άτομα σιδήρου



αιμοσφαιρίνη (ΑΣ) και μυοσφαιρίνη (ΜΣ) έχουν πανομοιότυπες δομές και δεσμεύουν οξυγόνο

η ΜΣ δεσμεύει ένα μόριο οξυγόνου

αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης προσδέματος περιγράφονται ποσοτικά



Λόγος γ : δεσμευμένες θέσεις πρόσδεσης / συνολικές θέσεις πρόσδεσης = $\gamma = \frac{[PL]}{[P] + [PL]}$

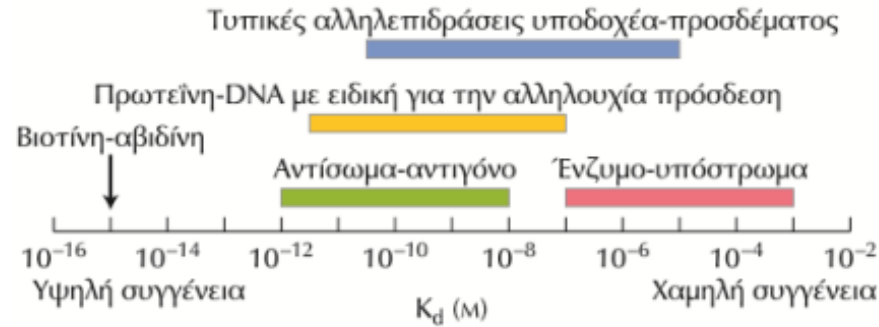
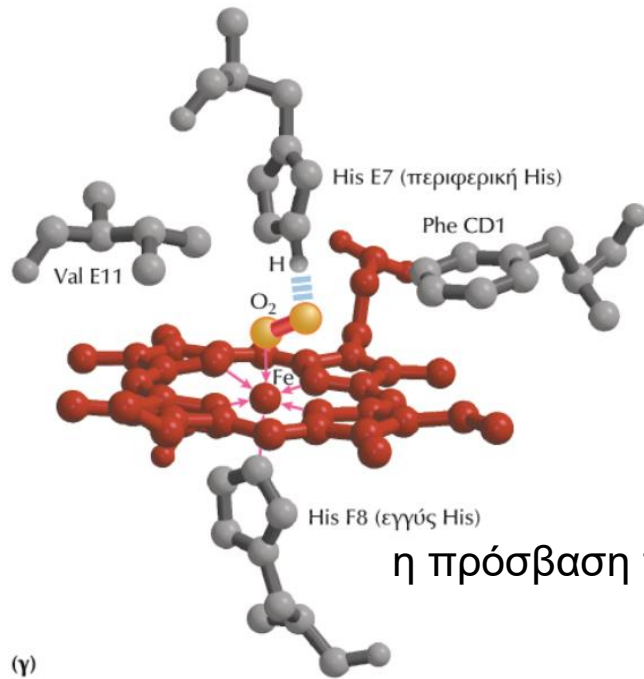
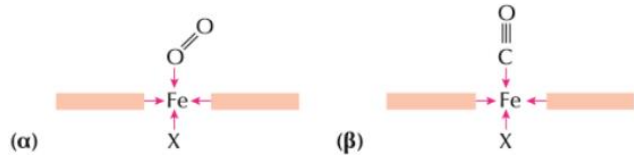
$K_d = 1/K_a = \frac{[P] \cdot [L]}{[PL]}$ σταθερά διάστασης (dissociation constant)

$$\gamma = \frac{[L]}{[L] + 1/K_a} = \frac{[L]}{[L] + K_d} \quad \text{με } \gamma=90\% \text{ το } [L]=9 \cdot K_d$$

$$\gamma = \frac{pO_2}{pO_2 + K_d} = \frac{pO_2}{pO_2 + P_{50}}$$

Αέρας με 20,9% O₂ έχει pO₂ = 760mm x 0.209 = 159 mmHg ή 159 torr ή 22kPa

Πρωτεΐνη	Πρόσδεμα	K_d (M) ^a
Αβιδίνη (ασπράδι αυγού)	Βιοτίνη	1×10^{-15}
Υποδοχέας ινσουλίνης (ανθρώπου)	Ινσουλίνη	1×10^{-10}
Ανοσοσφαιρίνη αντι-HIV (ανθρώπου) ^β	gp41 (επιφανειακή πρωτεΐνη HIV-1)	4×10^{-10}
Πρωτεΐνη που προσδένει νικέλιο (<i>E. coli</i>)	Ni^{2+}	1×10^{-7}
Καλμοδουλίνη (αρουραίος) ^γ	Ca^{2+}	3×10^{-6}
		2×10^{-5}



K_d χρησιμοποιείται ευρέως στη βιοχημεία για να κατανοήσουμε την πρόσδεση ουσιών / φαρμάκων με πρωτεΐνες στον οργανισμό

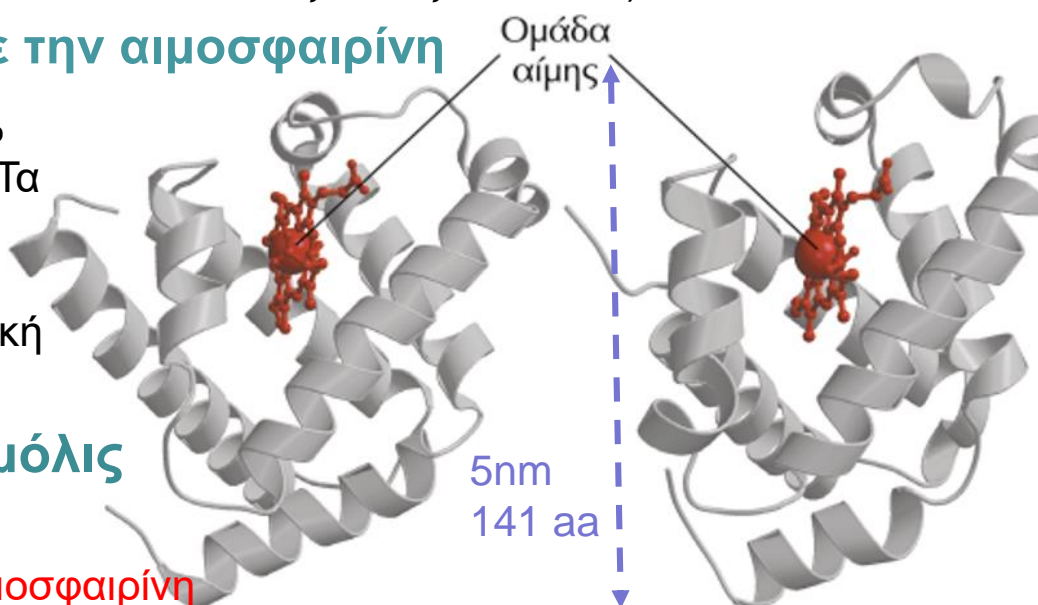
η πρόσβαση του O_2 ΜΣ εξαρτάται από την μοριακή κίνηση (αναπνοή) της ΜΣ

η δομή της πρωτεΐνης επηρεάζει τον τρόπο πρόσδεσης των πρωτεϊνών

ερυθροκύτταρα -διάμετρος 6,9 μm -αμφίκιcloι δίσκοι δίσκοι -αιμοσφαιρίνη 34% του βάρους
 -σχηματίζονται από πρόδρομα αρχέγονα κύτταρα **αιμοκυτταροβλάστες**
 -δεν έχουν πυρήνα & κυτταρικά οργανίδια (δεν πολλαπλασιάζονται ζουν 120 d)

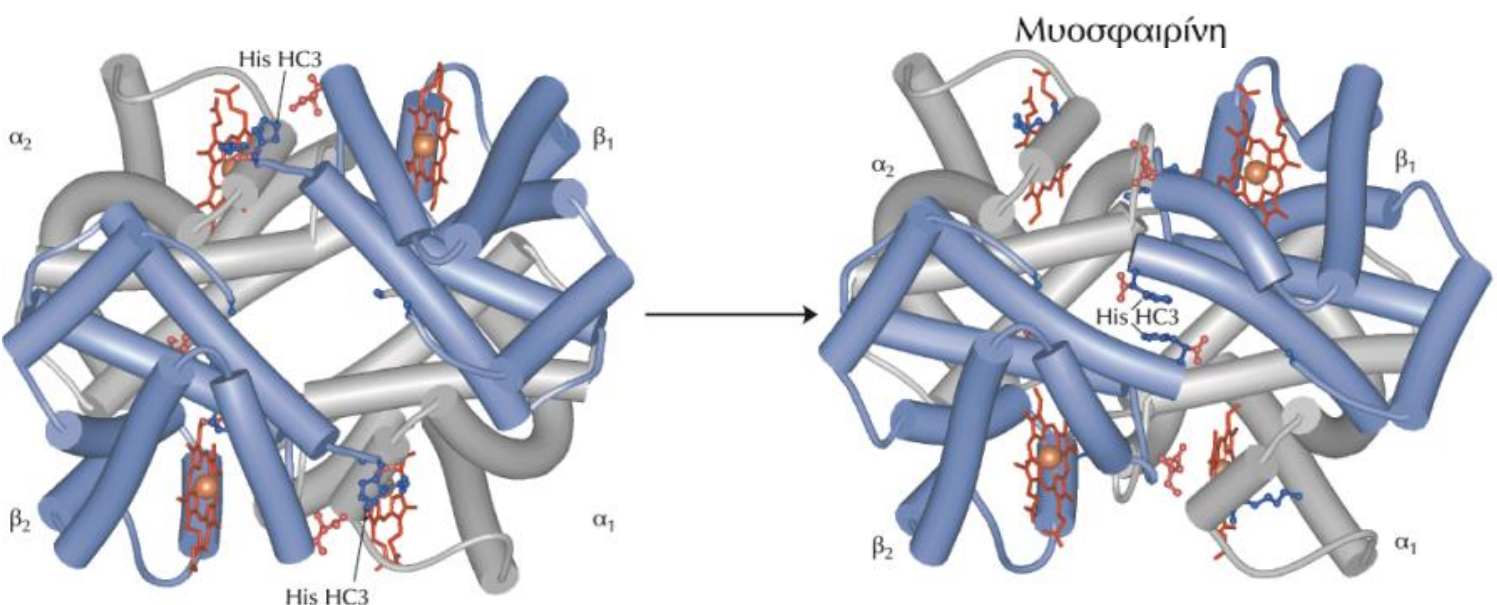
το οξυγόνο μεταφέρεται στο αίμα με την αιμοσφαιρίνη

αρτηριακό αίμα κορεσμένο με οξυγόνο **96%**
φλεβικό αίμα επιστρέφει με κορεσμό **64%**. Τα 100ml αίματος που διέρχονται στους ιστούς απελευθερώνουν το 1/3 του οξυγόνου.
 Μεταφέρουν 6,5 ml αερίου O₂ σε ατμοσφαιρική πίεση και στη θερμοκρασία του σώματος



ΑΣ υφίσταται μία δομική αλλαγή μόλις προσδεθεί το O₂

ΔΑΣ δεοξυαιμοσφαιρίνη με O₂ **ΟΣO₂** Οξυαιμοσφαιρίνη

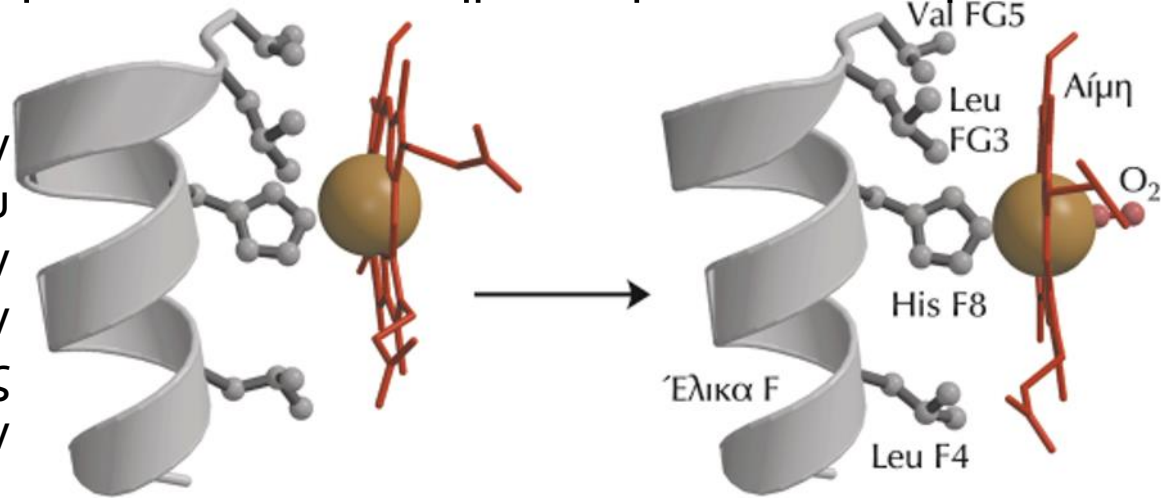


ΑΣ & ΜΣ
 μοιάζουν δομικά
 αλλά έχουν μόνο 27
 ταυτόσημα αα

Κατάσταση T T (tense) τεταμένη P (relax) χαλαρή **Κατάσταση R**

Προσθήκη O_2 «αφαιρεί» ηλεκτρόνια από τον σίδηρο και μειώνει τον όγκο του (εξωτερικά τροχιακά

Αυτό φέρνει αλλαγές στον δακτύλιο της **πορφυρίνης** που οδηγούν σε προσαρμογές των αλυσίδων $\alpha 1\beta 2$ και στην αλλαγή της τετατροταγής δομής διαμόρφωση των τεσσάρων μονάδων της αιμοσφαιρίνης

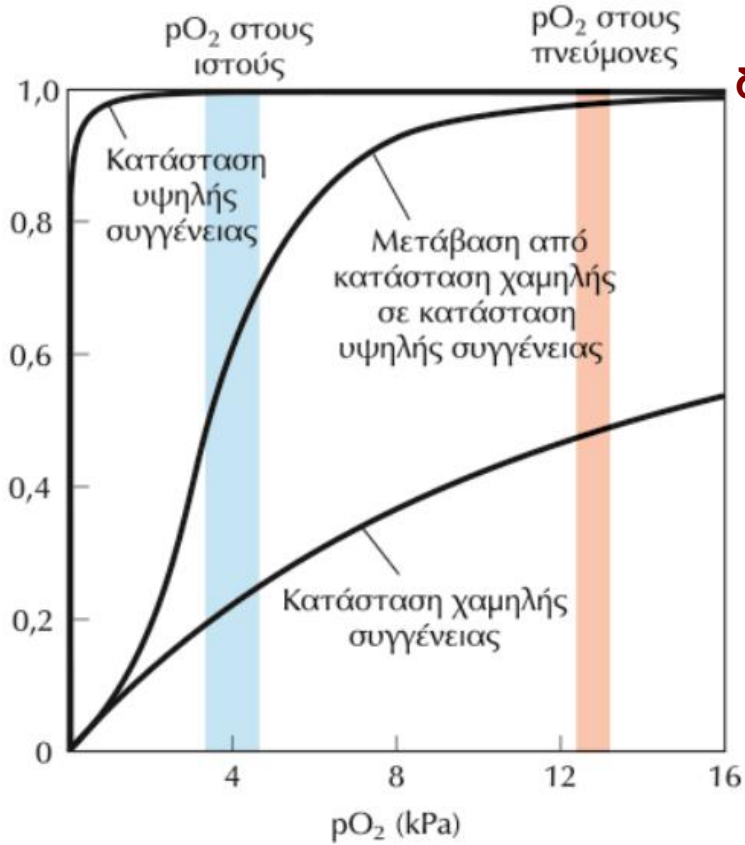


Κατάσταση T

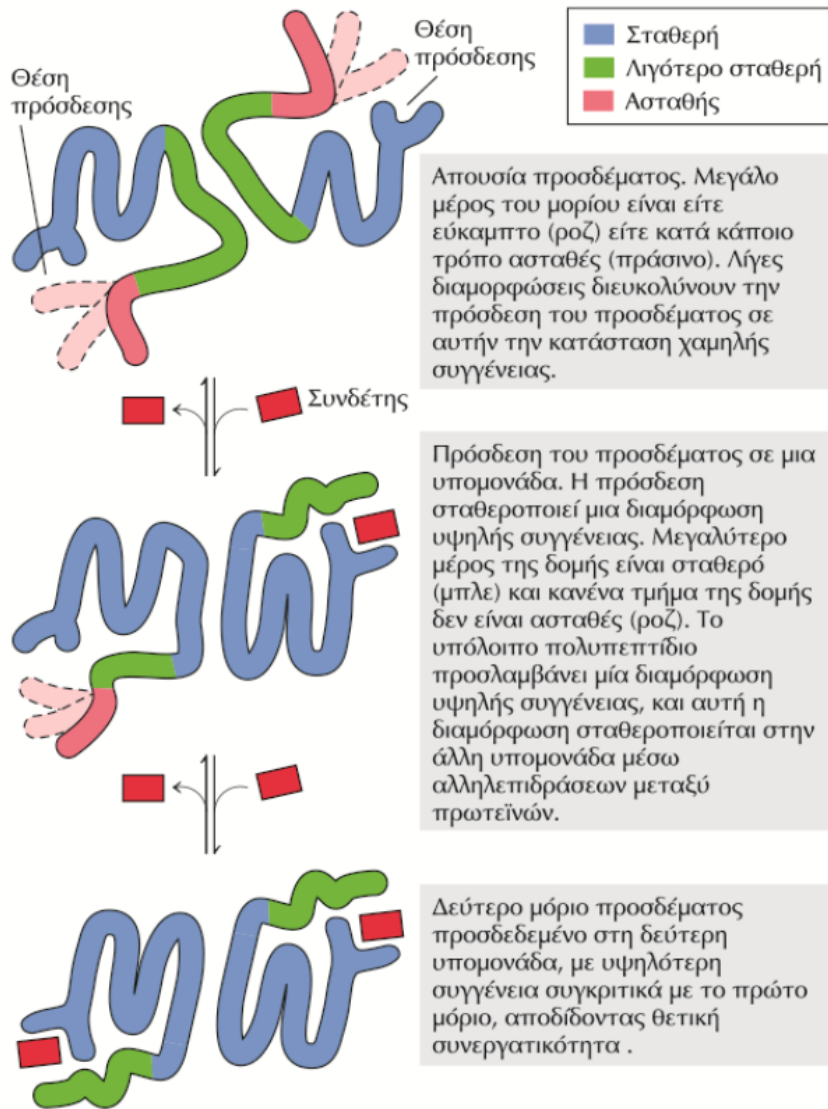
Κατάσταση R

δεοξυαιμοσφαιρίνη με O_2 οξυγόνο τότε **Οξυαιμοσφαιρίνη**
ΔΑΣ **ΟΑΣ**

ΑΣ είναι ένα παράδειγμα συνεργατικού μοντέλου πρόσδεσης (ρύθμισης)

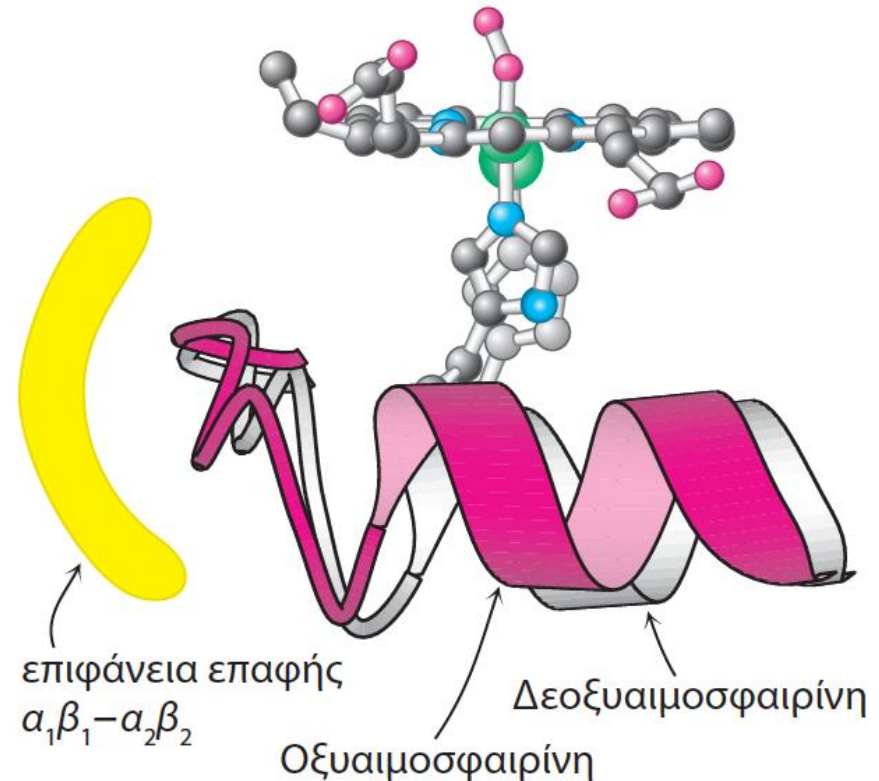


Στην κατάσταση υψηλής συγγένειας ενώ αρχικά φαίνεται να είναι πολύ αποτελεσματική δεν ισχύει διότι όταν υπάρχει ανάγκη από O_2 και το pO_2 είναι στα 4kPa πρωτεΐνη δεν θα μπορεί να «δώσει» (μεταφέρει) O_2 . Δίνω σημαίνει κλάσμα κορεσμού από 1 σε 0.8 (δίνω 20%). Η μετάβαση από υψηλή σε χαμηλή συγγένεια το επιτρέπει αυτό!



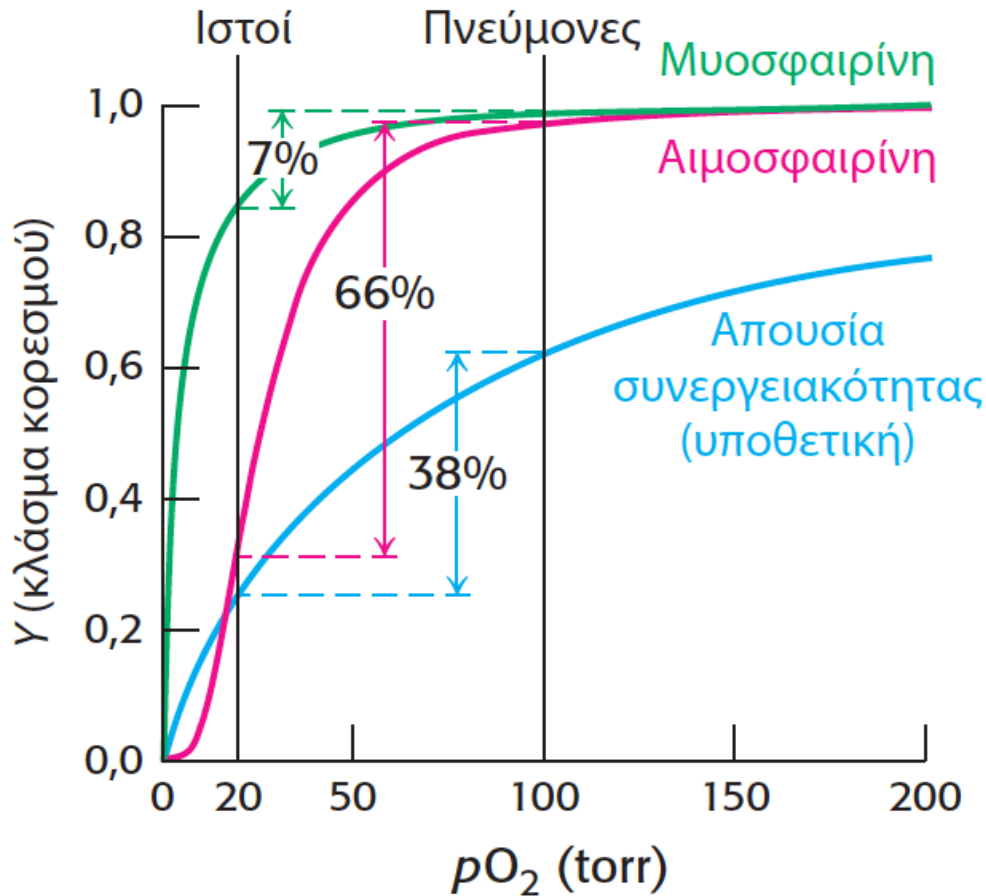
ΕΙΚΟΝΑ 5-13 Δομικές αλλαγές σε μια πολυμερή πρωτεΐνη η οποία πραγματοποιεί συνεργατική πρόσδεση ενός προσδέματος. Ένα μόριο πρωτεΐνης δεν εμφανίζει ομοιόμορφη δομική σταθερότητα. Στην εικόνα παρουσιάζεται μια υποθετική διμερής πρωτεΐνη με περιοχές υψηλής (μπλε), μέτριας (πράσινο) και χαμηλής (ροζ) σταθερότητας. Οι θέσεις πρόσδεσης του προσδέματος αποτελούνται από τμήματα υψηλής και χαμηλής σταθερότητας: έτσι η συγγένεια για το πρόσδεμα είναι σχετικά χαμηλή. Οι αλλαγές διαμόρφωσης που προκύπτουν κατά την πρόσδεση του προσδέματος μετατρέπουν την πρωτεΐνη από μία κατάσταση χαμηλής συγγένειας σε μία κατάσταση υψηλής συγγένειας, μία μορφή επαγόμενης προσαρμογής.

η συνεργατική πρόσδεση μπορεί όχι μόνο να επηρεάσει την ίδια την πρωτεΐνη αλλά μπορεί να επηρεάσει και τη διπλανή πρωτεΐνη με αυτό τον τρόπο οι τέσσερις αλυσίδες της ΑΣ μπορούν να επηρεάσουν η μία την άλλη και να προσδένουν ισχυρότερα ή ασθενέστερα το O_2



Αλλαγές στα αμινοξέα (μεταλλάξεις) της ΑΣ αλλάζουν όλα τα παραπάνω μπορούν να προκαλέσουν νόσο

Αιμοσφαιρίνη (ΑΣ) ένα παράδειγμα συνεργειακού μοντέλου ρύθμισης (συνδυασμός των δυο μοντέλων)

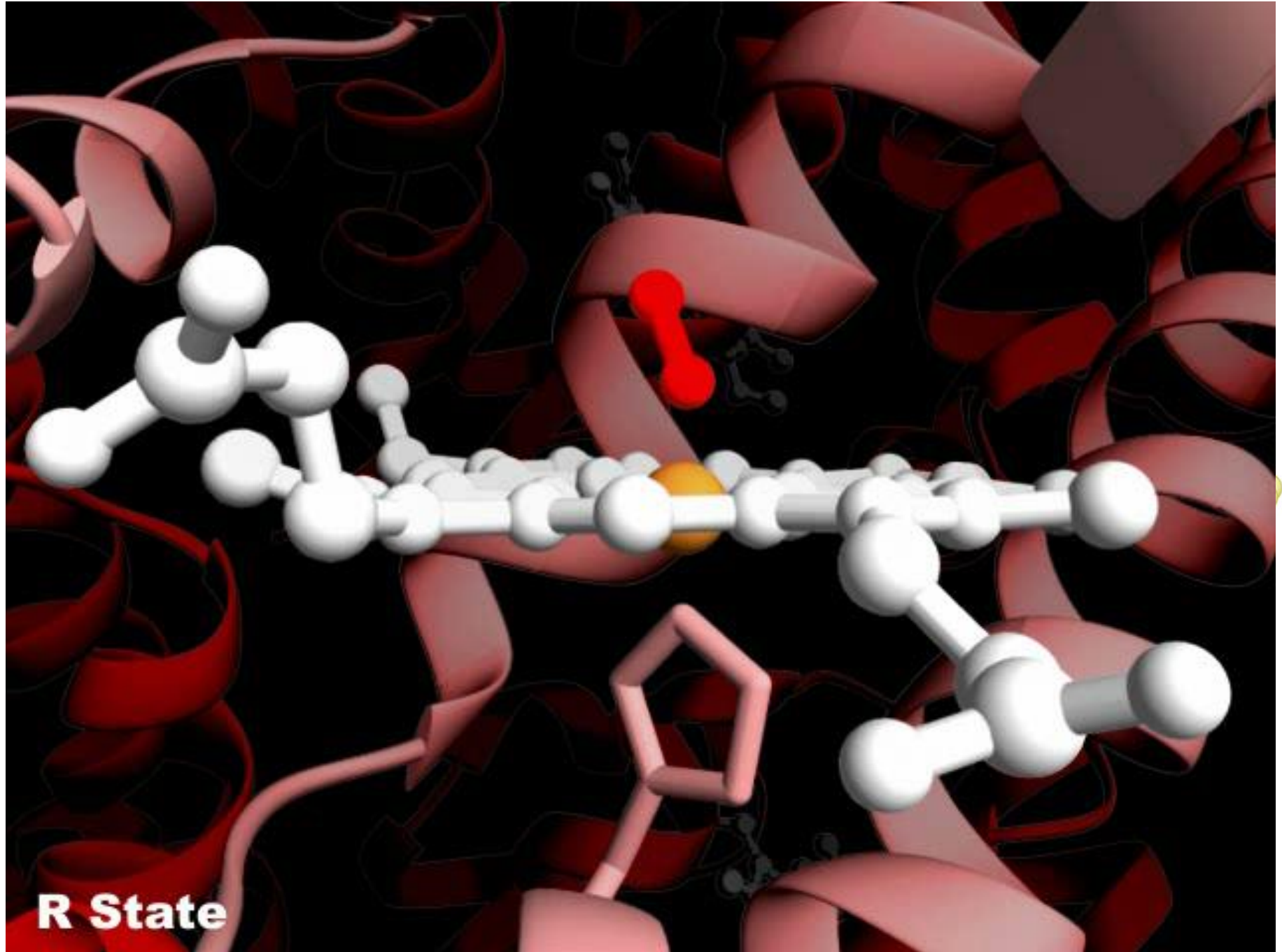


Στους πνεύμονες έχουμε pO₂ περίπου ίσο με 100 torr (συγκέντρωση)
Στους ιστούς έχουμε pO₂ περίπου ίσο με 20 torr (συγκέντρωση)

Σύμφωνα με τα παραπάνω και την K (σταθερά) της αντίδρασης, εάν έχουμε A δεοξυαιμοσφαιρίνη
O₂ οξυγόνο τότε
AO₂ Οξυαιμοσφαιρίνη
 $A + O_2 \leftrightarrow AO_2$
Όσο η αιμοσφαιρίνη κινείται προς τους ιστούς τόσο το O₂ μειώνεται τόσο η αντίδραση πάει προς τα αριστερά
Καλό σύστημα αλλά **όχι ικανοποιητικό**
αποδίδει μονό το 38% του οξυγόνου
(63%-25%=38%)

Αυτό που συμβαίνει είναι απόδοση 68%! Μπορεί να συμβεί όταν η K αλλάζει ανάλογα τις συνθήκες

Συγκριτικά με την ΜΣ μια πρωτεΐνη με πολύ ισχυρή πρόσδεση στο οξυγόνο η ΑΣ δίνει 10 φορές (1000%) περισσότερο από ότι θα μπορούσε να δώσει η ΜΣ (από 7% σε 66% κλάσμα κορεσμού) και 1.7 φορές περισσότερο από όσο μια μη συνεργειακή πρωτεΐνη (από 38% σε 66% κλάσμα κορεσμού)



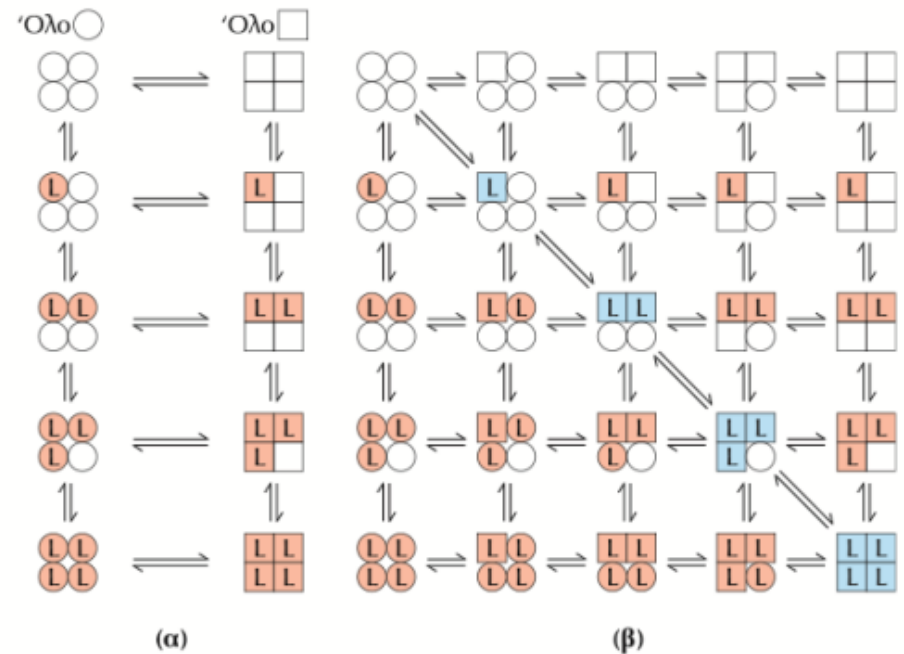
R State

and 1LFQ.pdb.]

Το **διαδοχικό (α)** μοντέλο έχει T και R καταστάσεις για κάθε τετραμερές

Το **συνδυαστικό (β)** μοντέλο προτείνει διαδοχικές αλλαγές

ΕΙΚΟΝΑ 5-15 Δύο γενικά μοντέλα για την αλληλομετατροπή μεταξύ αδρανούς/δραστικής μορφής στις πρωτεΐνες που πραγματοποιούν συνεργατική πρόσδεση του προσδέματος. Τα μοντέλα μπορεί να εφαρμοστούν σε κάθε πρωτεΐνη – συμπεριλαμβανομένου και οποιουδήποτε ενζύμου (Κεφάλαιο 6) – που πραγματοποιεί συνεργατική πρόσδεση. Ωστόσο, στην Εικόνα παρουσιάζονται τέσσερις υπομονάδες επειδή το μοντέλο αρχικά είχε προταθεί για την αιμοσφαιρίνη. (α) Στο συνδυαστικό μοντέλο ή μοντέλο «όλο ή τίποτα» (μοντέλο MWC) όλες οι υπομονάδες θεωρείται ότι έχουν την ίδια διαμόρφωση, είτε \square (χαμηλή συγγένεια, αδρανής), είτε \square (υψηλή συγγένεια, δραστική). Ανάλογα με την ισορροπία, K_{eq} , μεταξύ των μορφών \circ και \square , η πρόσδεση ενός ή περισσότερων μορίων προσδέματος (L) θα προωθήσει την ισορροπία προς τη μορφή \circ . Οι υπομονάδες που έχουν προσδέσει μόρια προσδέματος αποδίδονται σκιασμένες. (β) Στο διαδοχικό μοντέλο, κάθε ξεχωριστή υπομονάδα μπορεί να έχει είτε \circ είτε \square μορφή. Συνεπώς, ο αριθμός των πιθανών διαμορφώσεων είναι πολύ μεγάλος. Τις περισσότερες φορές, οι περισσότερες υπομονάδες βρίσκονται στην κατάσταση που έχει σκιαστεί με μπλε χρώμα.

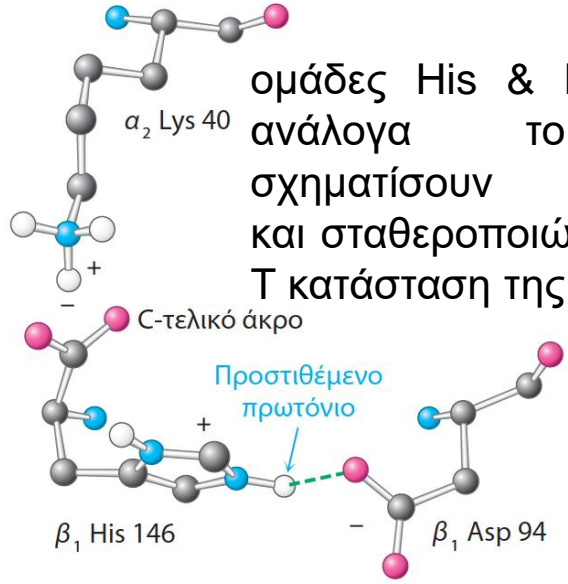
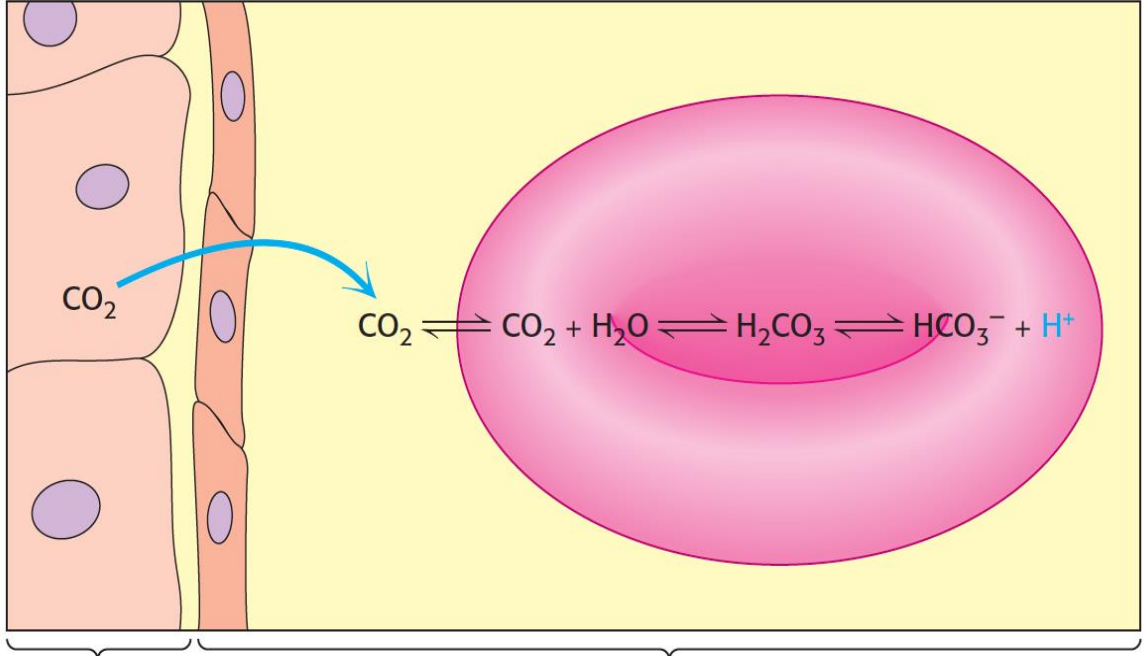
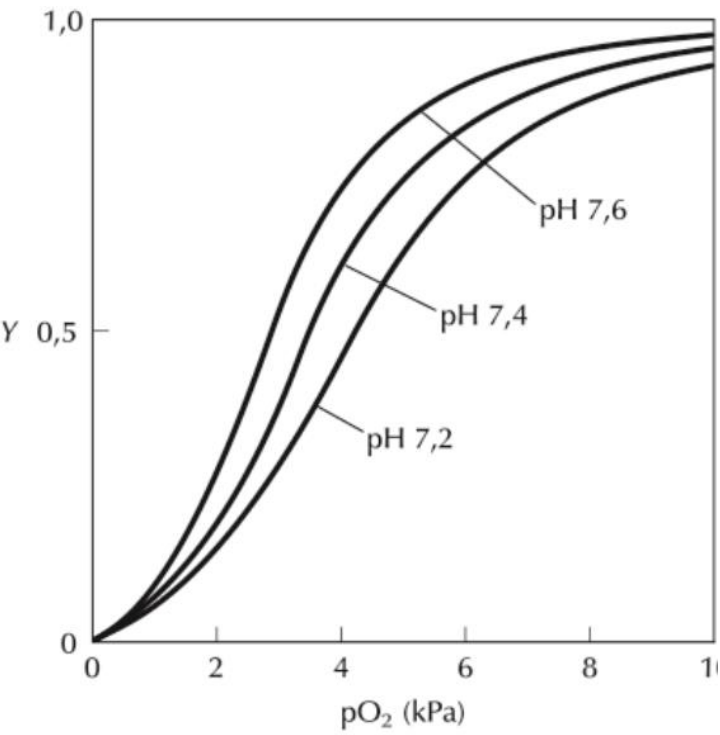


Η σημαντική διαφορά είναι ότι αντίθετα με το εναρμονισμένο μοντέλο εδώ η πρόσδεση του υποστρώματος σε ένα ενεργό κέντρο επηρεάζει (ελαττώνει) επηρεάζει τα γειτονικά ενεργά κέντρα (αρνητικά ή θετικά)

Κανένα μοντέλο δεν εξηγεί πλήρως τις ιδιότητες (καμπύλες δέσμησης) της ΑΣ

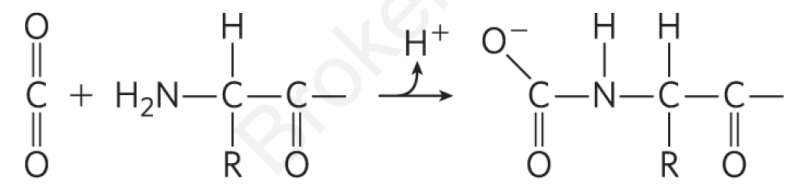
ΑΣ μεταφέρει και H⁺ και CO₂

Η ΑΣ μεταφέρει περίπου το 40% της συνολικής ποσότητας H⁺ και 20% του CO₂ τα υπόλοιπα μεταφέρονται από το ρυθμιστικό διάλυμα του HCO₃



ομάδες His & Lys που ανάλογα το pH σχηματίζουν δεσμό-H και σταθεροποιώντας την T κατάσταση της ΑΣ.

η επίδραση του pH και του CO₂ στην πρόσδεση και την απελευθέρωση του O₂ από την ΑΣ καλύτερη επίδραση **Borh** (*Borh effect*). Το CO₂ μπορεί να επιδρά με επιπλέον τρόπους στην ΑΣ



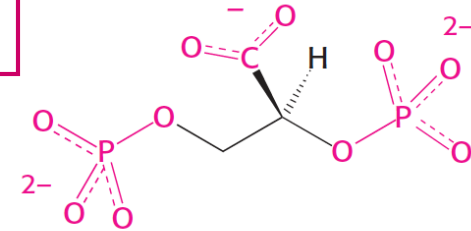
H⁺ & CO₂ προάγουν την απελευθέρωση O₂

Η 2,3 BPG σταθεροποιεί την κατάσταση T της ΑΣ

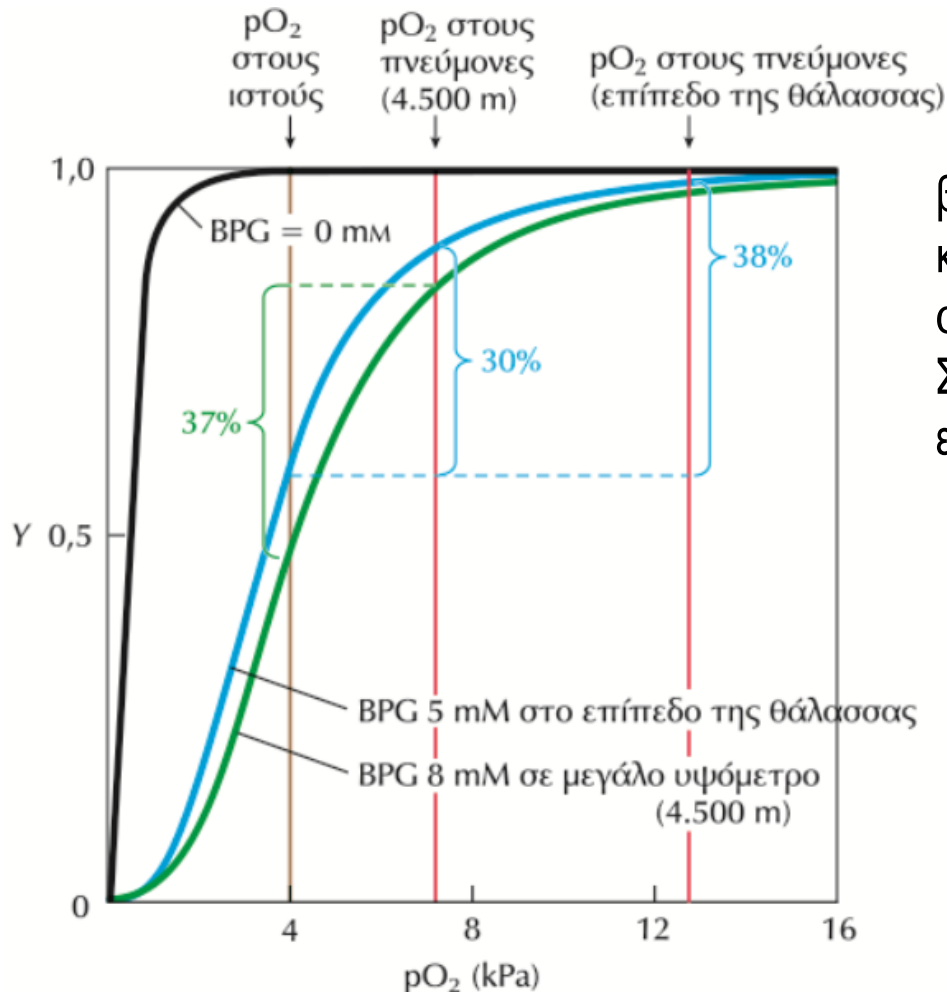
Η T δεν είναι αρκετά σταθερή και μετατρέπεται γρήγορα παρουσία O_2 σε R

Έτσι ΑΣ γίνεται ένας ισχυρός προσδέτης O_2 αλλά και μη ικανός μεταφορέας O_2

Η απομονωμένη και καθαρισμένη ΑΜ από αίμα βρέθηκε να έχει **πολύ μεγαλύτερη πρόσδεση** με το οξυγόνο (μορφή R)



2,3-διφωσφογλυκερικό (2,3-BPG)

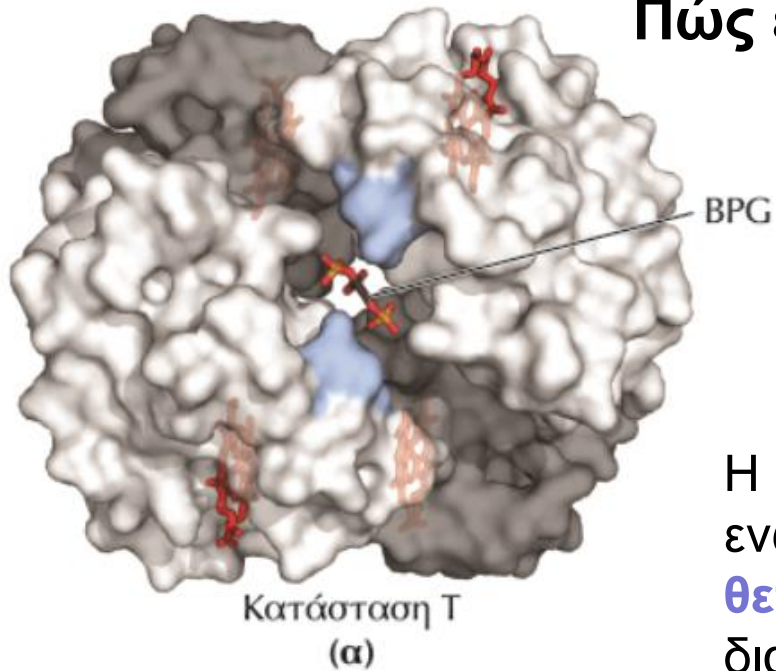


βρέθηκε όταν απομονώθηκε καθαρή ΑΣ βρίσκεται σε συγκέντρωση ~ 2,5mM ίδια με την ΑΜΦ.

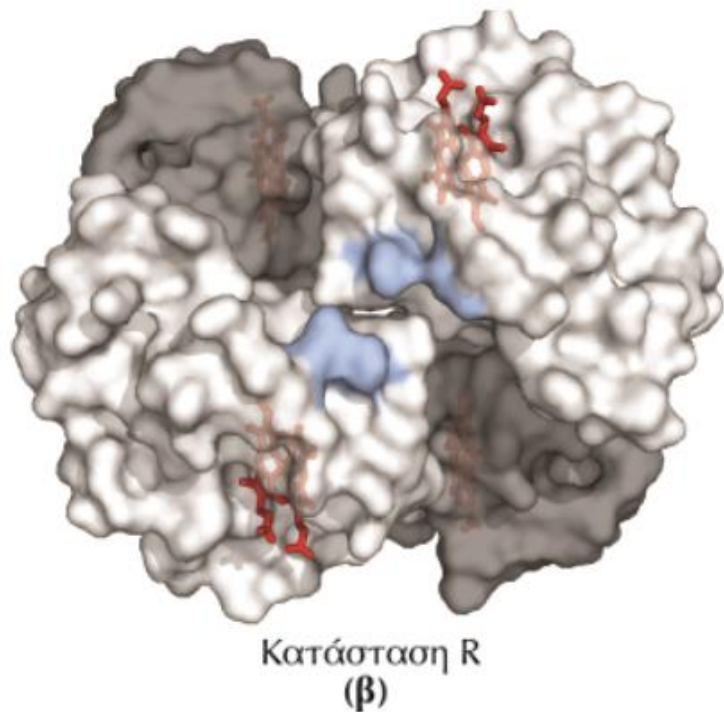
Στο αίμα του ανθρώπου είναι περίπου 5mM στο επίπεδο της θάλασσας & 8mM σε μεγάλο υψόμετρο

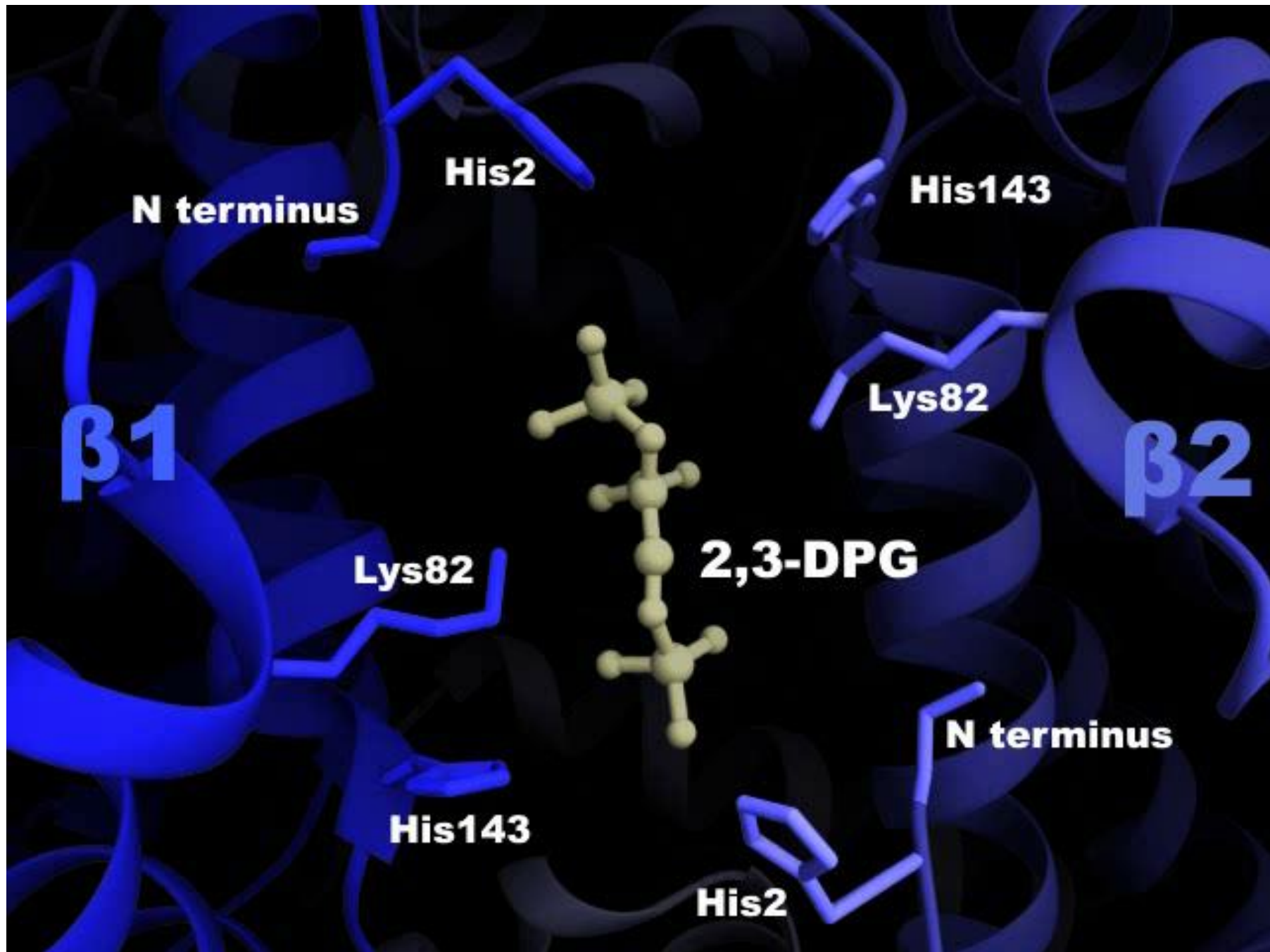
Χωρίς την BPG η ΑΣ θα ήταν ένας ισχυρός προσδέτης O_2 αλλά και εξαιρετικά **μη ικανός μεταφορέας O_2** (μόνο το 8% μεταφέρεται)

Πώς επηρεάζει η 2,3-BPG την ΑΣ;

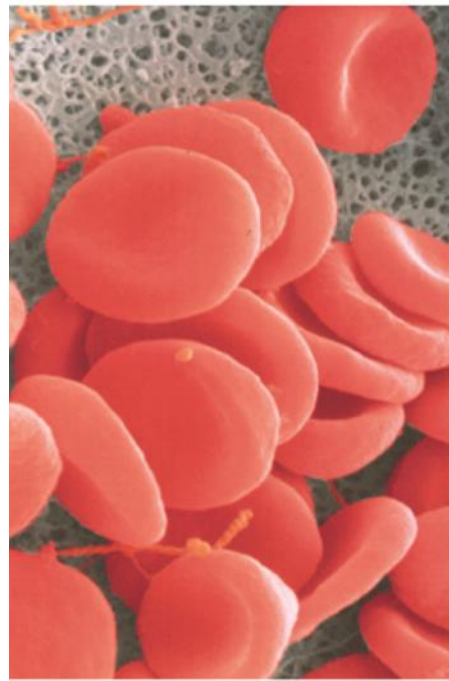


Η **BPG** (αλλοστερικός τροποποιητής) ενώνεται στο κέντρο του τετραμερούς με τις **θετικές (μπλε)** φορτισμένες ομάδες & την διατηρεί στην κατάσταση T
Μόλις ενωθεί το οξυγόνο καταρρέει η θήκη και απελευθερώνεται το BPG και διευκολύνεται η μετάπτωση από T σε R

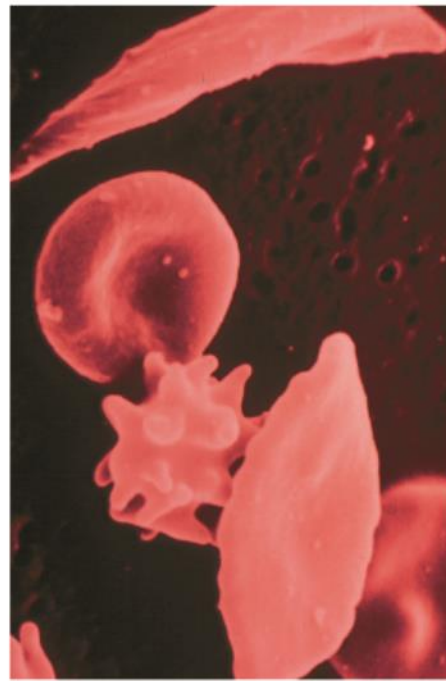




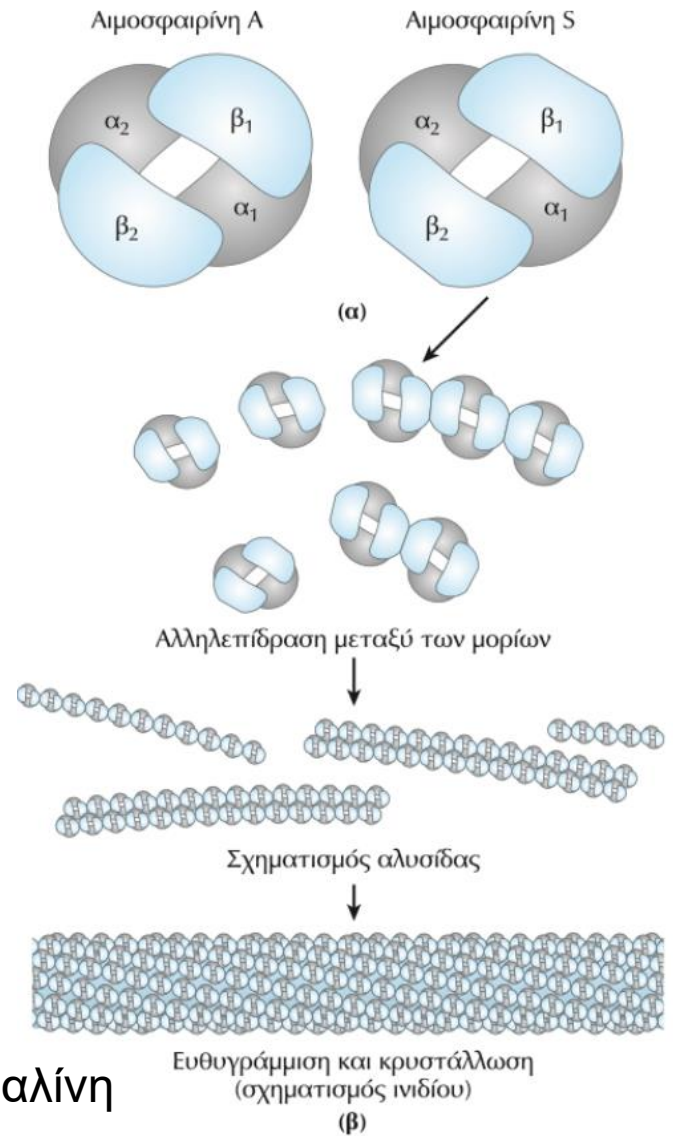
η δρεπανοκυτταρική αναιμία είναι μία μοριακή αιμοσφαιρινοπάθεια



(α) 2 μm



(β)



Το 1949 ο Linus Pauling πρότεινε ότι η δρεπανοκυτταρική αναιμία μπορεί να προκληθεί από παραλλαγή των αμινοξέων στην αλυσίδα της ΑΣ

Λόγο αντικατάστασης του γλουταμινικού (θέση 6) από βαλίνη

Η μεταλλαγμένη ΑΣ S δεν χάνει την ικανότητα της να δεσμεύει O_2 αλλά γίνεται περισσότερο υδρόφοβη. Ίνες αδιάλυτης ΑΣ εξέρχονται από διαρρηγμένο ερυθροκύτταρο

το ανοσοποιητικό σύστημα περιλαμβάνει μία εξειδικευμένη ομάδα κυττάρων και πρωτεϊνών

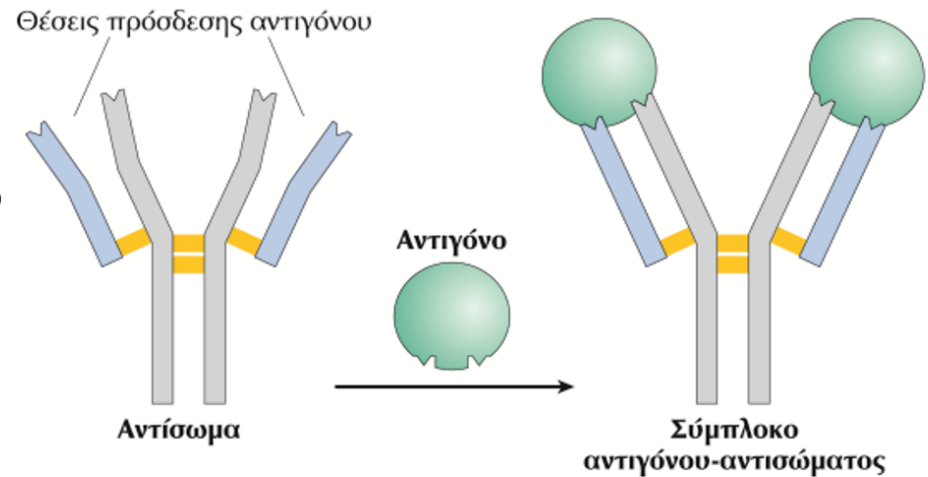
η ανοσία εξασφαλίζεται από **λευκοκύτταρα** μεταξύ άλλων **μακροφάγα** & **λεμφοκύτταρα** το

ανοσοποιητικό σύστημα περιλαμβάνει: το **χυμικό** και το **κυτταρικό**

το **χυμικό** σύστημα στρέφεται εναντίον των **βακτηρίων** και των **ιών**

το **κυτταρικό** σύστημα καταστρέφει κύτταρα που **ξενιστή** (μολυσμένα από ιούς), παράσιτα και ξένους ιστούς

Οι πρωτεΐνες στην καρδιά του **χυμικού** σύστημα είναι τα **αντισώματα** ή **ανοσοσφαιρίνες**

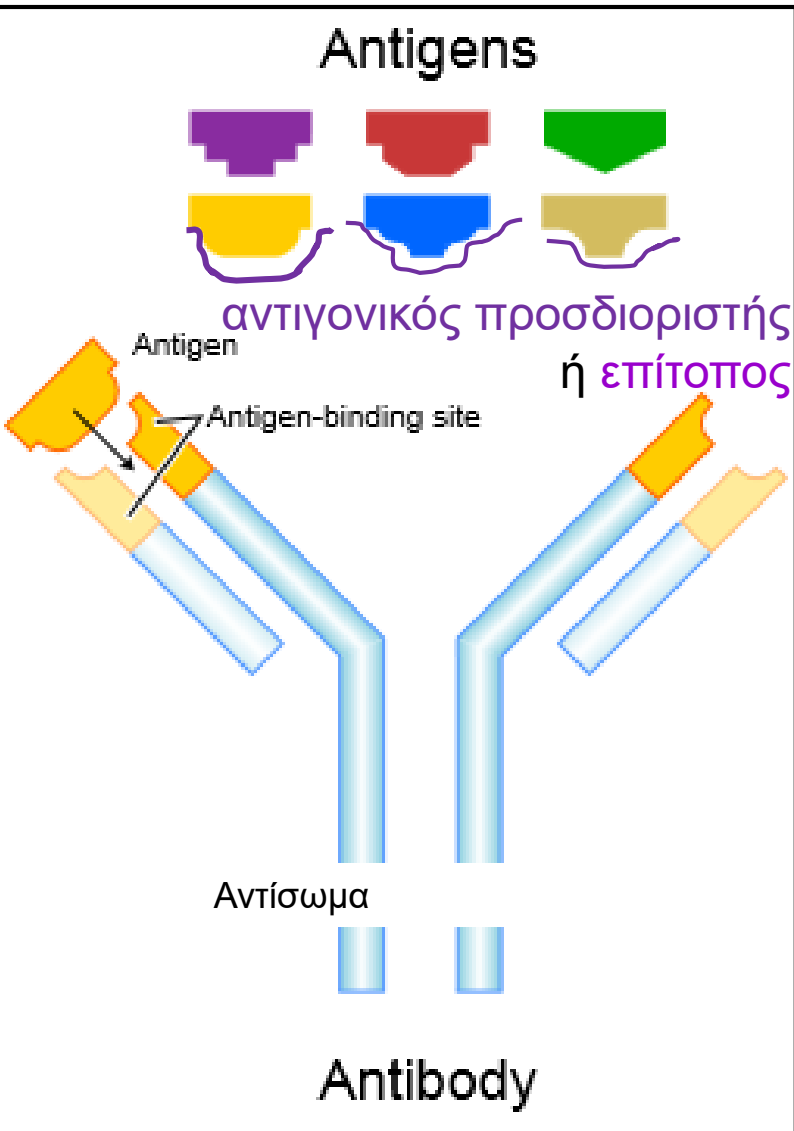


ΕΙΚΟΝΑ 5-22 Πρόσδεση μιας ανοσοσφαιρίνης IgG σ' ένα αντιγόνο. Προκειμένου να ταιριάξουν άριστα με το αντιγόνο, οι θέσεις πρόσδεσης μιας ανοσοσφαιρίνης IgG συχνά υφίστανται ελαφριές αλλαγές διαμόρφωσης. Η επαγόμενη προσαρμογή είναι κοινό χαρακτηριστικό πολλών αλληλεπιδράσεων πρωτεΐνης-προσδέματος.

- ❑ Αντίσωμα (ή ανοσοσφαιρίνη, immunoglobulin = Ig): είναι μια πρωτεΐνη που συντίθεται από τα σπονδυλωτά ως απόκριση στην παρουσία μιας ξένης ουσίας που λέγεται αντιγόνο.
- ❑ Τα αντισώματα έχουν μεγάλη και ειδική συγγένεια για τα αντιγόνα που προκάλεσαν τη σύνθεσή τους.
- ❑ Η φυσιολογική λειτουργία των αντισωμάτων αφορά την προστασία του ζώου από λοιμώξεις
- ❑ Πρωτεΐνες, πολυσακχαρίτες και νουκλεϊκά οξέα ξένων οργανισμών μπορεί να δρουν ως αντιγόνα
- ❑ ο άνθρωπος είναι σε θέση να παράγει πάνω από 10^8 διαφορετικά αντισώματα το καθένα με διαφορετική ειδικότητα πρόσδεσης

Ανοσοσφαιρίνη G (IgG) είναι η κυρία τάξη αντισωμάτων και μία από τις πιο άφθονες πρωτεϊνών στον ορό του αίματος έχει 4 πολυπεπτιδικές αλυσίδες 2 μεγάλες γνωστές ως βαριές και 2 ελαφριές που συνδέεται με ομοιοπολικούς δισουλφιδικούς δεσμούς με MB 150.000

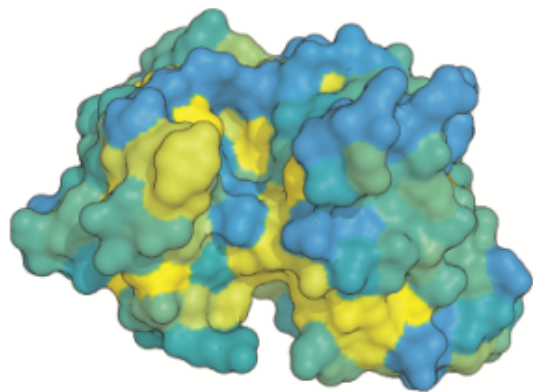
Η ειδική ομάδα ή η συστάδα αμινοξέων του αντιγόνου που αναγνωρίζεται από ένα αντίσωμα λέγεται αντιγονικός προσδιοριστής (antigenic determinant) ή επίτοπος (epitope)



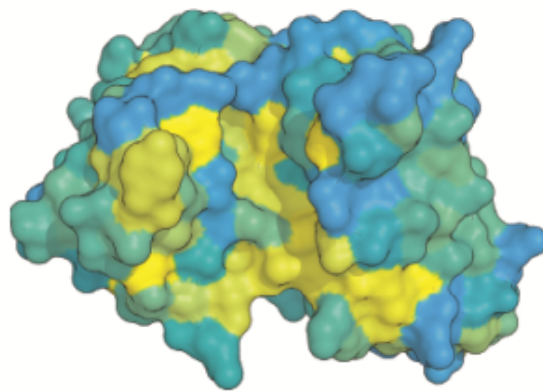
ειδικότητα πρόσδεσης ενός αντισώματος καθορίζεται από την αλληλουχία αμινοξέων στις μεταβλητές περιοχές βαρίων & ελαφριών αλυσίδων πολλά αμινοξέα αυτών των περιοχών είναι μεταβλητά.

Η ειδικότητα πρόσδεσης εξασφαλίζεται από τη χημική συμπληρωματικότητα μεταξύ αντιγόνου και της ειδικής θέσης πρόσδεσης πχ αρνητικά φορτισμένη ομάδα μπορεί να προσθέσει ένα αντιγόνο με θετικό φορτίο ένα υδρόφοβο με ένα αντίστοιχο υδρόφοβο

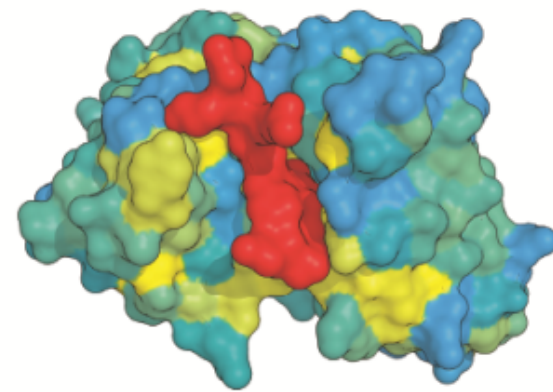
αντισώματα προσδένονται σφιχτά & ειδικά στα αντιγόνα



(α) Διαμόρφωση χωρίς προσδεμένο αντιγόνο



(β) Προσδεμένο αντιγόνο (κρυμμένο)



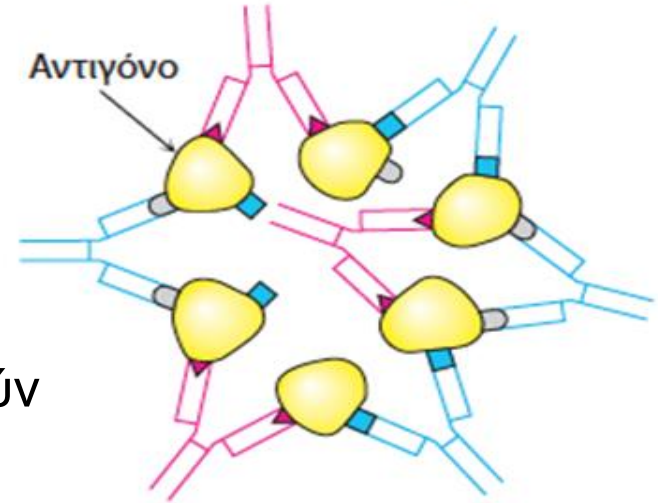
(γ) Προσδεμένο αντιγόνο (εμφανές)

ΕΙΚΟΝΑ 5-25 Επαγόμενη προσαρμογή στην πρόσδεση ενός αντιγόνου στην ανοσοσφαιρίνη IgG. Το μόριο στην εικόνα (το επιφανειακό περίγραμμα του έχει χρωματιστεί για να καταδειχθεί η υδροφοβικότητα) είναι το κλάσμα Fab μιας ανοσοσφαιρίνης IgG. Οι υδρόφοβες επιφάνειες είναι κίτρινες και οι υδρόφιλες επιφάνειες είναι μπλε, με αποχρώσεις του μπλε, του πράσινου και του κίτρινου στο ενδιάμεσο. (α) Άποψη του κλάσματος Fab απουσία αντιγόνου (ένα μικρό πεπτιδίο προερχόμενο από τον HIV), με θέα προς τη θέση δέσμευσης αντιγόνου. (β) Η ίδια άποψη, αλλά εδώ το κλάσμα Fab έχει προσδέσει το αντιγόνο. Το αντιγόνο έχει παραλειφθεί από την εικόνα ώστε να μην εμποδίζεται η θέα στην τροποποιημένη θέση πρόσδεσης. Παρατηρείστε τη διεύρυνση της υδροφοβικής θέσης πρόσδεσης και τη μετατόπιση αρκετών ομάδων. (γ) Ίδια άποψη όπως στο (β) αλλά με το αντιγόνο (κόκκινο) εμφανές στη θέση πρόσδεσης (κόκκινο). [Πηγές: (α) PDB ID 1GGC, R. L. Stanfield et al., *Structure* 1:83, 1993. (β, γ) PDB ID 1GGI, J. M. Rini et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6325, 1993].

την τυπική αλληλεπίδραση αντισώματος αντιγόνου είναι πολύ ισχυρή και χαρακτηρίζεται από πολύ χαμηλές Kd της τάξης του 10^{-10} όσο χαμηλότερη τιμή τόσο ισχυρότερη η πρόσδεση και αντικατοπτρίζει τις ποικίλες δυνάμεις ιοντικές υδρόφοβες, van der Waals, δεσμούς υδρογόνου που σταθεροποιούν την πρόσδεση

Μπορούν να παραχθούν ειδικά αντισώματα για συγκεκριμένες πρωτεΐνες

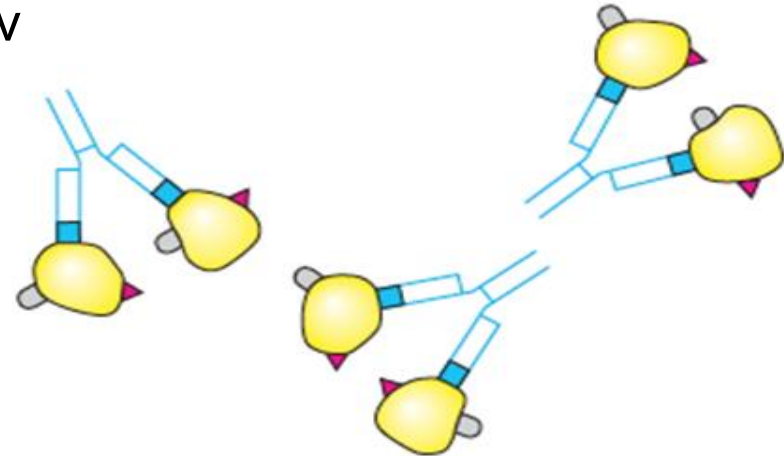
Πολυκλωνικά αντισώματα



τα **πολυκλωνικά** αντισώματα παράγονται από πολλά διαφορετικά β-λευκοκύτταρα που απαντούν σε ένα αντιγόνο και προσδένουν ειδικούς διαφορετικούς επίτοπους

τα **μονοκλωνικά** αντισώματα παράγονται από ένα πληθυσμό ταυτόσημων β-λεμφοκυττάρων

Μονοκλωνικά αντισώματα



Η ανοσοαποτύπωση επιτρέπει την ανίχνευση πρωτεϊνών που έχουν διαχωριστεί με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή

Πολύ μικρές ποσότητες μιας πρωτεΐνης που μας ενδιαφέρει σε ένα κύτταρο ή κυτταρικό υγρό μπορούν να ανιχνευθούν με μια τεχνική ανοσομέτρησης που λέγεται ανοσοαποτύπωση ή αποτύπωση Western (Western blotting)

