**BIOCHEMIE HOOFDSTUK 2: De 3D structuur van eiwitten**

1. Overzicht van eiwitstructuur

* Eiwitstructuur
  + Conformatie eiwit = de ruimtelijke organisatie van alle atomen in een eiwit
  + Talrijke mogelijkheden, enkele domineren in biologische omstandigheden
  + Natievestructuur
    - = de natuurlijke conformatie
    - = eiwitten in een van hun functionele conformaties
  + Functionele conformatie
    - = thermodynamisch meest stabiel
    - Dwz laagste Gibbs vrije energie

1. De eiwitconformatie wordt grotendeels gestabiliseerd door zwakke interacties

* Stabiliteit
  + = de tendens om de natieve conformatie te behouden
* Eiwitstructuur: soorten bindingen
  + Interacties ondersteunen de 3D structuur
  + Covalente bindingen: S-S bindingen
    - => bijdrage stabilisatie in sommige proteïnen
    - Veel proteïnen hebben geen S-S bruggen
      * Reden: Omgeving in cel = hoge concentratie aan reductans
        + => sulfhydryl blijft in gereduceerde staat
      * Anderzijds: Omgeving buiten cel = meer oxidizing
        + => disulfide bindingen komen voor
    - Hoge EN: zeer sterk
  + Zwakke niet covalente bindingen: H-bruggen, ionaire & hydrofobe interacties
    - Functies
      * stabiliseren de natieve conformatie => blijft gevouwen
      * polypeptide vouwen in secundaire of tertaire structuur
    - Lage EN: zwakker dan covalente bindingen
      * MAAR door **groot aantal** belangrijker dan covalente voor stabilisatie structuur
      * Gevolg: conformatie met laagste vrije energie
        + = diegene met maximum aan zwakke interacties
    - Waterstofbruggen O-H
      * => kleine bijdrage
      * Tussen neutrale groepen of tussen peptide bindingen
      * Elke gevormde waterstofbrug betekent verbroken waterstofbrug in oorspronkelijke toestand => netto stabiliteit ~ 0
    - Ionaire interacties
      * => kleine bijdrage
      * Attractie of repulsie
      * Stabiliseren of destabiliseren
    - Hydrofobe interacties
      * => belangrijkste bijdrage aan structuur /stabilisatie conformatie
      * Water rond hydrofobe moleculen => optimale organisatie H bruggen => solvatatielaag van water rond molecule
        + Door de stijgende orde van watermoleculen => daling entropie
        + Doordat de apolaire groepen samen clusteren => contact met solvatatielaag kleiner => stijging entropie

Stijging entropie = drijvende F voor hydrofobe interacties in waterige oplossingen

* + - * Hydrofobe moleculen interageren met andere hydrofobe molec.
    - Van der Waals interacties
      * => ook een grote bijdrage
      * = interacties van e-wolken
      * = dipool-dipool interacties
        + Omvat: permanente dipolen, transiente dipolen door fluctuaties e-wolk & dipolen geïnduceerd door interactie met ander atoom dat een permanente of transiente dipool heeft
      * Tussen elke 2 atomen dicht bij elkaar
  + 2 belangrijke regels stabiliteit structuur
    - 1) Hydrofobe AZ residu’s clusteren dus meestal in binnenste van eiwit
      * Weg van het water
    - 2) maximaal aantal H bruggen & ionaire interacties (zwakke bindingen)

1. 2 De peptidebinding is rigide en vlak

* De peptidebinding
  + De α carbons zijn gescheiden door 3 covalente bindingen: Cα-C-N-Cα
  + Carbonyl O (partieel negatief) en amide N (partieel positief)
    - => ‘delen’ elektronen door resonantie
    - => ontstaat elektrische dipool
  + Geen vrije rotatie rond Cα-C-N-Cα bindingen
    - Reden: door de partiële dubbele covalente binding
    - Gevolg:
      * Peptidebinding (6 atomen) liggen in een vlak
      * Zorgt voor beperking in mogelijke conformaties
  + Wel vrije rotatie rond N-Cα (phi, φ) en Cα-C (psi, ψ)

2. Secundaire structuur proteïne

* Secundaire structuur
  + = de lokale ruimtelijke organisatie van ‘ruggengraat’ C-keten in eiwitsegment
  + Types: α-helix, β plaat, β sheet, β bocht

2.1 De α helix is een veelvoorkomende secundaire structuur

* De α helix
  + = de eenvoudigste organisatie polypeptide
    - Met de maximale aantal interne H-bindingen
  + = spiraalvormige keten van AZ/ wikkeling van AZ rond een imaginaire as
  + Soorten bindingen: Waterstofbruggen & peptidebindingen
  + Bouw
    - Imaginaire as: rechtsdraaiend
      * Rechtsdraaiend stabieler als links
    - R groepen vd AZ aan buitenkant
  + Wordt gemakkelijkste gevormd van alle conformaties
    - Reden: optimaal gebruik van interne **H-bruggen**
    - => H-brug tussen H vh N-atoom v/e peptidebinding en het O atoom vd carbonyl
      * In de helix: elke peptidebinding draagt bij in deze H binding
    - => H bruggen met water/solvent op het einde v/e α helix segment
    - => enorme **stabilisatie α helix**
  + Niet alle AZ even geschikt voor α-helix (e.g. proline)
    - Beperking op α-helix door vb: Proline
      * => R groep is een ring & geen rotatie rond N-Ca
      * => introduceert een destabiliserende knik in a-helix
  + R-groep kan helix stabiliseren of destabiliseren
    - Vb Glu na elkaar => neg. R groepen afstoten => destabiliserend
    - Oplossing: Draaiing van een α-helix zorgt ervoor dat kritieke interacties die zich voordoen tussen de R groep en de R groep 3 AZ verder, zich aan de weerszijden van de keten plaatsvinden
      * Voorstellen via projectie: Helical wheel
        + Pos. AZ staan 3 residuen weg van de neg. AZ

Vb: polair + , hydrofoob, hydrofoob, polair –

* + - * + Dus door volgorde vd R groepen te kiezen kan de helix een polaire en apolaire kant krijgen
  + α-Helix heeft netto δ+ en δ-: helix dipool

2.2 In de β conformatie zijn polypeptiden georganiseerd in lagen

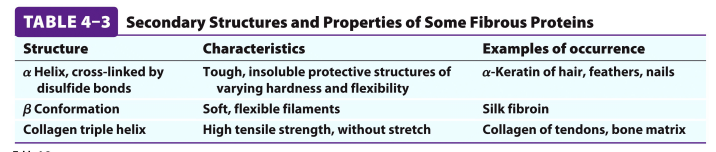
* β streng / β conformatie
  + = de C-ruggengraat die zigzagstructuur vormt
  + Oorzaak zigzag: door de vlakken gevormd door de peptidebindingen in een streng
* β plaat
  + = de β strengen zij-aan zij vormen een vlakke β plaat/sheet
  + Segmenten meestal opeenvolgend in AZ keten
    - H-bruggen tussen aanpalende segmenten vd plaat (niet via restgroep)
      * Zorgen voor stabilisatie
    - Aanpalende segmenten ku antiparallel of parallel zijn
      * Parallel: dezelfde N-C oriëntatie & H brug schuin & bocht mogelijk
      * Antiparallel: tegengestelde N-C oriëntatie & H bruggen op 1 lijn
    - R-groepen alterneren boven/onder vlak
      * Gevolg: polair & apolaire structuur

2.3 β Bochten zijn veelvoorkomend in eiwitten

* β Bochten
  + Globulaire proteïnen hebben zeer compacte structuur
    - => sommige AZ vormen scherpe loops/bochten
  + = haarspeldbochten/ knikken in de structuur
  + Tussen α-helices en segmenten van β-platen
  + 180º draaiing over 4 AZ met H-brug tussen AZ1 en AZ4
    - => H brug stabilisatie
  + Vaak met Pro (Type I), Gly (Type II)
    - Reden Gly: klein & compact => weinig sterische hinder
    - Reden Pro: is zelf al geknikt & neemt makkelijk cis conf aan => cis is makkelijk voor snelle bocht

3. Tertiaire en quaternaire eiwitstructuur

* Tertiaire structuur
  + = 3D organisatie van alle atomen in een enkel eiwit (subeenheid)
* Quaternaire structuur
  + = 3D organisatie van subeenheden (2 of meer)
  + Multimeer = veel subeenheden = multisubeenheid
  + Oligomeer = multimeer met enkele/ klein aantal subeenheden
* 2 groepen
  + Organisatie door zwakke bindingen en covalente bindingen S-S
  + Globulaire proteïnen
    - = polypeptideketens gevouwen in sferische vorm
    - Bevatten gemengde secundaire structuren
    - Functie: als enzymen en regulatorische eiwitten
  + Fibrillaire proteïnen
    - = polypeptideketens georganiseerd in langwerpige en vezelvormige strengen of sheets
    - Bevatten meestal 1 type secundaire structuur
    - Functie: structuur
* Tabel: fibrillaire proteïnen A-keratine, collageen, zijde
  + Illustreert de relatie tussen proteïnen structuur en biologische functie
  + Algemene functie: sterkte of flexibiliteit geven aan structuur
  + Kenmerk: allemaal onoplosbaar in water



3.1 Fibrillaire eiwitten zijn aangepast voor structuurfuncties

**α Keratine**

* A-keratine
  + = fibrillair eiwit
  + = Hoofdbestanddeel haar, wol, nagels, hoorn, buitenste huidlaag
  + = deel van intermediate filament proteïne familie IF
  + Functie: sterkte / stevigheid voorzien
  + Bouw
    - 1) a-keratine helix die rechtsdraaiend is (2°)
    - 2) a-helices georganiseerd als coiled coil (3° structuur)
      * = 2 parallele strengen van a-keratine, die om elkaar zijn gewonden
      * = linksdraaiend
      * Zorgt voor de sterkte / stevigheid
      * De oppervlakte waar de 2 a-helices elkaar raken
        + Bestaan uit hydrofobe AZ waarvan hun R groepen a-a interacties aangaan
        + => dichte stapeling vd polypeptide keten
    - 3) Vele coiled coils assembleren tot supramoleculaire complexen (4°)
      * Vb: fibrillen, filamenten
      * Stabilisatie door S-S bindingen
  + Haarbehandeling: permanent krullen
    - Principe
      * Verhitten: A-helices in a-keratine => volledig gestrekt
      * Koelen: A- helices zullen spontaan teruggaan naar a-helix
    - Werkwijze
      * 1) oplossing van reducing agent toevoegen samen met warmte
        + Reducing agent

=> cleaves the cross-links door reductie S-S bindingen

=> vorming van 2 Cys residus

* + - * + De warmte/moist

=> breekt de H bruggen

=> zorgt voor ontvouwing a-helix

* + - * 2) reducing agent verwijderen & oxidizing agent toevoegen
        + Oxidizing agent

=> maakt nieuwe S-S bindingen tssn de 2 cys

Maar ANDERE als ervoor

* + - * 3) haar wassen
        + H-bruggen fixen

=> polypeptide gaat spontaan terug naar a-helix

**Collageen**

* Collageen
  + = fibrillair eiwit (groep van eiwitten)
  + = gevonden in pezen, kraakbeen, hoornvlies, extracellulaire matrix
    - EM = substanties buiten de cel die macromoleculen zijn
      * Vb: hyaloronzuur
  + ~300.000 kDa
  + Functie: sterkte/ stevigheid voorzien
  + Bouw
    - 1) A-helix (2°)
      * Unieke secundaire structuur
      * = Verschillend van α helix
      * = linksdraaiend, 3 AZ /winding
    - 2) vorming coiled coil (3°)
      * = 3 α ketens (niet helices!!!) super twisted rond elkaar in rechtsdraaiende helix
      * = rechtsdraaiend
      * Zorgt voor stevigheid
        + Superhelix is sterker dan staal!
    - 3) Collageenfibril (4°)
      * = supramoleculaire verzameling uit triple helicale colaageenmoleculen (coiled coils)
      * A- ketens zijn cross-linking door ongewoonlijke types van covalente bindingen involving Lys, HyLys (hydroxylisine = post-translationele wijziging lysine) of His in X en Y posities
        + Deze links crëeert ongewone AZ residu’s zoals dehydrohydroxylysinonorleucine
  + Types vertebrate collageen
    - Bevat typisch: 35% Gly, 11% Ala, 21% Pro + 4-Hyp
  + AZ sequentie in collageen
    - Herhaling van “Gly-X-Y”, X = vaak Pro, Y = vaak 4-Hyp
    - Gly is essentieel
      * = compact eiwit
      * oorzaak genetische afwijkingen
    - 4-Hyp is een posttranslationeel eiwit
      * Door modificaties van proline naar hydroxyproline
        + Vb: hydroxylering
      * ~ vitamine C = ascorbaat
        + = veel voorkomend op schepen
        + => lang op oceaan => beperkt aan vers fruit => gebrek aan vitamine C => collageen wordt niet goed aangemaakt (deficientie collageen) => treedt scheurbuik op
    - Pro en 4-Hyp zorgen voor de scherpe twist in collageen helix

**Zijde**

* Zijde
  + = fibrillair eiwit
  + = geproduceerd door insecten en spinnen
  + Functie: flexibiliteit
    - Want sheets samengehouden door zwakke interacties ipv door sterke covalente bindingen zoals a-keratine
  + Bouw
    - Fibrillen opgebouwd uit β platen
      * Polypeptide keten zijn predominant in β platen
      * ⬄ glycogeen en a-keratine
    - Rijk aan Ala, Gly
      * => zorgt voor dichte packing b-sheets & interlocking R-groepen
  + Gestabiliseerd door
    - H-bindingen tssn alle peptidebindingen in plaat
    - H-bindingen vd R groepen tussen platen
    - Van der Waals krachten
* H-bruggen peptidebindingen sheets, van der Waals tussen sheets➞ flexibele weefsel lagen
  + B-plaat rekt niet uit, maar platen kunnen t.o.v. elkaar schuiven -> flexibel

3.2 Myoglobine leverde inzicht in de complexiteit van globulaireeiwitstructuren

**Myoglobine**

* Myoglobine
  + = globulair proteïne
  + = 1 ste eiwit waar de 3D structuur effectief bepaald van is
  + Functie: O-binding, O transport &O opslag in spieren
    - Laat zeezoogdieren toe lang onder water te blijven
  + Bouw / structuur
    - Doorbraak door John Kendrew: x-stralen diffractie
      * => hierdoor relatie tussen structuur & functie
    - Algemeen:
      * Myoglobine bestaat uit een enkele polypeptideketen van 153 AZ residus van gekende sequentie & uit 1 enkel ijzerbevattende groep: protoporphyrin / heme groep
      * Bestaat vooral uit a-helices
    - Tertiaire structuur (foto ppt)
      * Rode groep = heme = protoporfyrine
        + Rust in een holte

Hierdoor toegankelijkheid voor solventen beperkt

Gevolg: verhindering Fe2+ => Fe3+ oxidatie

Fe3+ bindt niet O2 dus zou probleem zijn

* + - * + Fe atoom in centrum vd heme heeft 2 bindingposities

1) binden met R groep van His residu

2) binden met O2 molecule

* + - * Ruggengraat = 8 a-helices onderbroken door bochten vb: B-bochten
        + Alle a-helices rechtsdraaiend
        + Meer dan 70% vd residus zitten in de 8 α-helices

3 vd 4 Pro residus zitten in a-helix => zorgen voor knikken => vouwen

* + - * Stabilisatie
        + Door hydrofobe residu’s/ R groepen binnen in eiwit, weg van H2O
        + Maximaal aantal H-bruggen
      * Zeer compacte molecule
        + Binnen maar plaats voor slechts 4 watermoleculen
        + Zwakke verbindingen door compactheid versterkt -> zo dicht op elkaar dat van der waals belangrijke stabilisatie leveren

3.3 Methoden voor de bepaling vd 3D structuur van eiwitten

* 3D structuur bepalen
  + Door de afstand tussen verschillende atomen te bestuderen
* X-straal diffractie
  + Principe: afstand tussen atomen in een kristal kan bepaald worden door de locatie en intensiteit te meten van spots, geproduceerd op een fotografische film door X-ray lamp, nadat het licht is gediffraft door de e- vd atomen
  + Stappenplan
    - 1) Zuiver eiwit => kristalliseren (trial en error)
      * In kristallen worden roosters gevormd => moleculen in 1 oriëntatie
    - 2) diffractiepatroon: diffractie bepalen in rooster
      * Kristal plaatsen in X-ray lamp tussen de X-ray bron en een detector
      * Monochromatisch licht laten invallen op kristalrooster => X-ray diffractie => genereert regulaire spots (reflecties)
        + Oplichtende en uitdovende vlekken/spots
        + Spots bepaald door 3D structuur
      * Resultaat: X-ray diffactiepatronen
    - 3) electron density map vh proteïne reconstrueren mbv het diffractiepatroon
      * Dit adhv fourrier transformaties
  + Problemen
    - Je moet kristallen kunnen vormen
    - Eiwit in niet-fysiologische toestand
      * Fysische omgeving in kristal is anders dan in levende cel of in oplossing
    - Statisch beeld => weinig info over beweging eiwit
    - Delen van eiwit te beweeglijk om te lokaliseren
  + Vb: myoglobinekristallen
* NMR
  + = nucleair magnetic resonance
  + Voordeel: gebaseerd op zuivere moleculen in oplossing
  + Principe:
    - Maakt gebruikt van hoekmoment nucleaire spin (kwantummechanica)
    - Slechts bepaalde atomen hebben nucleaire spin die een NMR signaal geven
      * H, C, N, F, P
    - Informatie over H, C, N, F, P => NRM spectrum
  + Stappenplan
    - 1) nucleaire spin => genereert magnetische dipool
    - 2) sterk magnetisch veld aanleggen in oplossing => dipolen oriënteren zich hiernaar
      * Parallel: laag energetische toestand
      * Antiparallel: hoog energetische toestand
    - 3) Korte puls van EM energie bij juiste frequentie (resonantiefrequentie) toevoegen aan in juiste hoeken aan de kernen die georiënteerd zijn
    - 4) Sommige energie geabsorbeerd door kern om van lage naar hoog energetische te gaan
      * => absorptiespectrum bevat dan info over nuclei en omgeving
  + Bij 2D NMR makkelijker te analyseren
    - Laat de meting van afstandsafhankelijke koppeling van nucleaire spin in nabije atomen door de ruimte toe
      * => De NOE
        + = nucleair overhauser effect
        + = de overdracht van [nucleaire spinpolarisatie](https://en.wikipedia.org/wiki/Spin_polarization) van de ene populatie van [spin-actieve](https://en.wikipedia.org/wiki/Spin_(physics)) kernen (bijvoorbeeld 1 H, 13 C, 15 N enz.) naar een andere via [cross-relaxatie](https://en.wikipedia.org/wiki/Relaxation_(NMR))

3.4. Globulaire eiwitten opgebouwd uit verschillende tertiaire structuren

* Globulaire proteïnen sterke variatie in plooiing en vorm -> verschillende functies
  + Er zijn namelijk nog niveaus tssn 2° en 3° eiwitten
  + Wel gemeenschappelijk:
    - Steeds hydrofobe delen binnenin en hydrofiele naar buiten + maximale aantal H-bruggen
    - Zeer compact gevouwen
* 2 termen om onderdelen van eiwitten aan te duiden:
  + Motief / plooiing (fold) / super secundaire structuur
    - = een herkenbaar plooiingspatroon die bestaat uit 2 of meer elementen vd sec. structuur (a-ketens, b-platen etc)
    - Vaak voorkomende organisatie secundaire structuurelementen, e.g. β-α-β loop (zeer eenvoudig); β-barrel (zeer veel proteïnesegmenten samengevouwen)
  + Domein
    - = een deel v/e eiwit dat op zichzelf stabiel is of op zichzelf kan bewegen
    - E.g. 1 polypeptide georganiseerd in meerdere globulaire eenheden
    - Dikwijls verschillende functies
    - Scheiden vaak met behoud van functie
      * Hoe meer contact tussen domeinen hoe moeilijker te scheiden
    - Eiwitplooiing bepaald door fysicochemische beperkingen (‘rules’)

3.5 Eiwitmotieven zijn de basis voor structuurclassificatie proteïnen

* Classificatie proteïnen
* Proteïn Data Bank (PDB)
  + Meer dan 100 000 proteïnestructuren opgeslagen in PDB
  + Bevat info over proteine structuur, functie en evolutie
* SCOP database
  + = een andere databank die de info vd PDB heeft **georganiseerd** om het gemakkelijk toegankelijk te maken
  + = Structural classification of Proteins database
  + Informatie verdelen in 4 categorieën:
    - Verloopt via PDB identificatie: elk eiwit in database heeft een unieke identifier/code
    - 1) Proteïnenverwantschap
    - 2) Structurele klasse
      * Alle PDB structuren organiseren obv secundaire structuurelementen
      * allα, allβ, α/β (gemengd), α + β (zones)
    - 3) Proteïnetypes
      * Oplosbaar, membraan, fibrillair, ongestructureerde eiwitten
    - 4) Evolutionaire gebeurtenissen structurele
* Groeperen: Eiwitfamilies en superfamilies
  + Eiwitfamilie = proteïnen met grote gelijkenissen in 1° structuur en/of met dezelfde 3° structuur en functie
  + Superfamilie = 2 of meer families die kleine gelijkenissen hebben in AZ sequentie, maar gebruik maken van hetzelfde grote structureel motief & dezelfde functionaliteiten heeft

3.6 Sommige eiwitten zijn intrinsiek ongeordend

* Intrinsieke ongestructureerde eiwitten
  + Volledig eiwit of eiwitsegmenten zonder vaste 3D structuur (in oplossing)
    - Functioneren nog steeds
  + Intrinsieke eigenschap => functioneel
  + Andere eigenschappen dan gestructureerde eiwitten
    - Geen hydrofobe kern
    - Hoge densiteiten van geladen AZ residu’s: Lys, Arg, Glu
      * Ook Pro soms want die onderbreken sws ordening
  + Functies
    - Als spacers, linkers, scavengers
    - Scavenger = ionen en kleine moleculen binden in oplossingen & dienst doen als reservoirs of afvalopvang
  + Voordeel: ontbreken van geordende structuur => laat proteïne toe om met meerder partners te interageren => wikkelen zich om de partners
    - Vb: p53:
      * Functie: controle van de celverdeling
      * Gestructureerd centrum
      * Ongestructureerde segmenten
        + Interacties met zeer veel andere eiwitten
        + dynamische 3D structuur

~ bindingspartner in eiwitinteractie

* + - * Figuur ppt
        + Lineaire sequentie van p53 als color bar
        + Grafiek erover toont de PONDR score vs protein sequentie

PONDR = predictor of natural disorder regions

Voorspelt de kans dat een AZ residu in een disorder regio voorkomt

* + - * + Vb; score van 1.0 = 100% kans dat het proteine ongestructureerd is
        + => C en N terminus van p53 ongestructureerd
        + => C terminus kan binden aan andere eiwitten

4. Eiwitdenaturatie en plooiing

4.1 Proteostase

* Eiwit homeostase: proteostase
  + = het onderhoud van actieve set eiwitten
  + = omvat gecoördineerde processen/pathways voor synthese,afbraak, (her)plooiing
  + = omvat pathways/ingrijpingen op eiwit zodat het op peil wordt gehouden
    - Peil = **balans** tssn synthese, afbrraak, (her)plooiing
    - Afbraak gebeurt bij irreversibele unfolded eiwitten / onnodige eiwitten
  + => de balans maakt uit hoeveel native eiwit er is
  + Figuur: de pathways die bijdragen aan proteostase
    - 1) proteïnen w gesynthetiseerd op ribosoom
    - 2) verschillende pathways die bijdragen aan vouwen
      * A) vouwen in native proteïne
        + Spontaan of via chaperones
        + => Chaperones helpen ook het hervouwen van maar gedeeltelijk gevouwde proteïnen
        + => degradatie tot peptide fragmenten
        + => ontplooien => slechtgeplooide eiwitten
      * B) misgevormde proteïnen / gebrekkige eiwitten
        + Hebben exposed hydrofobische opp. => ‘sticky’
        + => hierdoor vorming van aggregaten

Indien ze controle chap & degradatie skippen

Accumulatie aggregaten => afwijkingen vb Parkinson, Alzheimer

* + - * + => of remodeling door chaperones
        + => of degradatie indien irreversibel ontvouwen tot peptide segmenten
      * C) Degradatie

4.2 De aminozuursequentie bepaald de tertiaire structuur

* AZseq bepaald de 3° structuur
  + AZ sequentie bevat alle informatie voor plooien van eiwit tot 3° structuur
  + **Ribonuclease experiment** (Anfinsen)
    - => Bewijst dat denaturatie reversibel is
      * Bep. proteïnen gedenatureerd door warmte, pH extremen of reagentia => zullen native structuur regainen als ze terug in condities worden gebracht waar de natieve struct. Stabiel is
        + = renaturation
      * Adhv dit, bewijst hij ook dat de AZ sequentie van polypeptiden alle info bevatten voor het plooien in native 3D proteïne !!!!!
    - Vb: Denaturatie- renaturatie van ribonuclease A
      * 1) native state: catalytically active
      * 2) Toevoegen urea en mercaptoethanol
        + => Ribonuclease A denatureert in een urea oplossing met een reducing agent/ mercaptoethanol in
        + => Mercapthoethanol

Cleaves 4 S-S bindingen in 8 Cys residus (**sterke**)

* + - * + => Urea (zout)

Doet hydrofobe interacties teniet (**zwakke inter**)

* + - * 3) unfolded state: catalytically inactive
      * 4) verwijderen van urea en mercapthoethanol
        + => S-S bindingen hervormd & hydrofobisch effect hersteld
        + => gedenatureerd ribonuclease gaat spontaan hervouwen in 3° native structuur
      * 5) native state: catalytically active
    - Opmerking: S-S binding faalt in aanwezigheid van urea
      * Indien mercaptoethanol verwijderen, maar urea aanwezig blijft
        + => Geen sterke bindingen maken S-S
        + Reden: zwakke interacties noodzakelijk voor positioneren -SH groepen

4.3 Verlies eiwitstructuur leidt tot verlies functie

* Denaturatie
  + = voldoende verlies van 3D structuur voor verlies van functie
  + Oorzaak: Proteïnen ontworpen om te functioneren in specifieke celmilieus
    - In andere omstandigheden brengen => wijzigingen
  + Niet noodzakelijk volledige ontplooiing
    - Meestal gedeeltelijk ontplooid
    - Peptidebindingen intact
* Denaturatie door verwarming
  + = meest voorkomende
  + Gevolg: heeft effect op zwakke bindingen (H-bruggen)
  + Grafiek
    - Tm = mid point vd temperatuur waarbij denaturatie gebeurt = smeltT
    - Indien T langzaam laten stijgen => proteïne structuur blijft intact tot een plots een abrupt verlies van structuur & functie (snelle denaturatie)
    - Gevolg: abruptheid wijst erop dat: ontvouwen = coöperatief proces
      * Dwz: verlies in 1 deel eiwit => destabiliseert ander deel
  + Hard: de covalente bindingen ku gebroken w ! (haar krullen)
* Denaturatie door extremen/wijzigingen in pH
  + Gevolg: wijzigingen netto ladingen en elektrostatische interacties
  + Mild: de covalente bindingen w niet gebroken!
* Denaturatie door ureum, detergenten of guanidine hydrochloride
  + Gevolg ureum & detergenten: verbreken hydrofobe interacties
  + Gevolg ureum: verbreken H-bruggen
  + Mild: de covalente bindingen w niet gebroken!
  + Dithiothreitol: verbreking (reductie) S-S
* Denaturatie door DDT/ dithiolthreitol
  + = redoxreagens
  + Hard: verbreking covalente (reductie) S-S

4.4 Sommige proteïnen ondergaan geassisteerde plooiing

* Chaperones
  + Niet alle proteïnen plooien spontaan wnnr ze gesynthetiseerd worden
    - Vouwen vaak geassisteerd door chaperones
  + = proteïnen die interageren met partieel gevouwen/misgevouwen polypeptides
    - => zorgen voor correct vouwen of maken een omgeving waarin vouwen correct kan
  + = ondersteunen/assisteren plooien van eiwitten
  + 2 families
    - heat shock protein70 (Hsp70)
    - chaperonines
* Hsp70
  + Moleculair gewicht ~ 70 kDa = 70.000
  + Sterk geconserveerd
  + Abundant in cellen die verhoogde T stress ervaren
  + Functie
    - Binden hydrofobe R op ongevouwen proteïnen om onjuiste aggregatie te vermijden
    - Verhinderen plooien van bep. eiwitten die eerst door membranen moeten worden getransporteerd
  + Werking
    - EN afkomstig van ATP hydrolyse voor binden en loskoppelen polypeptiden
    - 1) Binding ongevouwen polypept + Hsp70
      * => Kan een aggregaat verbreken of vorming aggregaat voorkomen
      * Hsp70 promoot dus niet actief het vouwen, maar voorkomt aggregaatvorming van ongevouwen proteïnen
    - 2) wnnr gebonden proteine is losgekoppeld
      * => kan om verder te vouwen naar native structuur
* Chaperonines
  + = proteïne complexen die nodig zijn voor het vouwen van cellulaire proteïnen die dit niet spontaan doen
  + Vb: GroEL/GroES
    - = de chaperonines/ proteine complexen van E.coli voor het vouwen onder normale condities
    - = bestaat uit een serie van multisubunit ringen die 2 kamers vormen georiënteerd rug tegen rug
      * Dwz: complex met veel subeenheden
    - Werking
      * 1) Ongevouwen proteïne eerst gebonden aan het geexposeerde hydrofobisch opp. aan de top van 1 GoEl kamer
        + => proteine gevangen door GroEs lid dat eropkomt
        + => proteïne zal in kamer opvouwen
      * 2) GroEl: conformatieveranderingen
        + => Zorgt voor binding en loslaten GroEs
        + => Hierdoor proteïne vrijkomen
    - Voordeel
      * Kamer voorkomt foute agreggaatvorming & beperkt ruimte die proteïne heeft om te vouwen
  + Proteindisulfideisomerase (PDI)
    - Folding pathways soms nood aan enzyme PDI
    - = enzyme dat de uitwisseling of verschuiving van S-S bindingen katalyseert tot de bindingen van de native conformatie zijn gevormd
    - Functie: PDI katalyseert isomerizatie reacties
  + Defecten in e.g. Alzheimer (amyloidosis) ; Creutzfeld Jacob (prion)
    - Misvouwen => leidt tot ontwikkeling ziekten
    - Alzheimer, Parkinson,…
      * Een oplosbaar proteine is gesecreteerd uit de cel in een misgevouwen staat en geconverteerd in een onoplosbaar extracellulair amyloid fiber
        + De verzameling ziekten hierdoor: amyloidoses
    - Creutzfeld Jacob
      * = hersenziekte: geheugenverlies,…
      * Prion
        + = eiwitdeeltjes die infectieziekten kunnen veroorzaken in hersenen