1. . 단백질폴딩의 정의

단백질폴딩이란? : 일 정 한 아 미 노 산 서열을 지닌 긴 폴리펩티드사슬 (1 차구조)이 생물학적 기능을 지닌 단단한 구형의 3 차구조를 형성하는 과정을 말한다. 단백질 폴딩의 문제는 일정 아미노산 서열이 특정 3 차구조(unique tertiary structure)를 결정하는 특이적 반응 (specificity)과 폴딩된 3 차 구조를 유지하는 힘(energy)으로 구분하여 고려해 볼 수 있다. (Packing 은 폴딩에 필수 불가결하지만 폴딩의 원인은 될 수 없음)

2. 단백질폴딩 연구의 필요성

(1) 생명현상을 물리 및 화학적 언어로 해석

(2) 단백질폴딩과 관련된 인체질환 규명과 치료

예)cystic fibrosis , ανισπψρτιτνα–1 결핍에 의한 호흡기종, familial hypercholesterolemia, 광우병 (인간의 CJD: Creutzfeldt-Jacob disease 와 유사)

: amyloid 형성에 의한 치매

(3) 단백질폴딩과 생명공학을 통한 재조합 단백질 생산

재조합단백질에 의한 응집체(inclusion body) 형성과 refolding 과정 중 응집(aggregation) 현상을 극복하기 위하여 in vivo 상태에서 수용성의 활성형 재조합 단백질을 생산하고 denaturation 한 후 refolding 시켜 활성형으로 전환시키는 방법을 이용하여 protein 을 생산한다. 또한 refolding yield 를 높이기 위해서 폴딩의 중간산물을 destabilize 하거나 제대로 폴딩된 것을 시스템에서 'pump-out' 시켜서 equilibrium shift 를 유도하는 전략(평형상태하에서 product 를 제거하여 정반응으로 계속 진행시켜서 지속적으로 refolding 된 protein 을 생산한다

✔응집체란 폴딩과정 중 부분적으로 접혀진 중간물질 분자들 사이에 노출된 소수성 부위들 간의 비공유성 결합에 의해 폴딩 과정이 off-pathway 로 진행되어 생긴 것을 말한다

(4) 단백질폴딩에 의한 생체기능 조절

단백질폴딩에 의한 생체기능 조절

Protein folding steps are explored for the execution of functions. 바이러스의 membrane fusion protein 과 plasma serpins 경우, Native form 이 metastable 한 trapped folding intermediate 로서 단백질이 기능을 발휘하는 단계가 보다 더 안정한 상태로 전환되는 폴딩의 마지막 단계를 이용하고 있다는 것이다.

현재 단백질폴딩 연구의 이슈들

- 폴딩경로는 하나인가 여럿인가?
- 폴딩과정을 유도하는 것은 주로 native interaction 인가?
- 아니면 non-native interaction 도 고려되어야 하는가?
- 폴딩과정에서 native interaction 은 언제 나타나는가?
- 단백질 2 차구조는 언제 형성되기 시작하며 언제 안정화되는가?
- 특정한 2 차구조가 다른 2 차구조보다 먼저 형성되는가?
- 폴딩반응에서 rate-limiting step (transition state)은 무엇인가?
- 세포내에서 단백질폴딩은 어떻게 조절되는가?

3. 단백질폴딩 과정에 대한 모델

1. Thermodynamic model (random search)

→ multiple pathway or no pathway

2. Kinetic model

→ discrete pathway

What is Levinthal paradox?

If 100 residues, 3 conformers per residue, 10^{-13} sec/ transition,

Total search time: 1.6 x 10^{27} years!

So, FOLDING CANNOT be a RANDOM SEARCH!

1. Framework model

→ secondary structure formation precedes collapse

folding by heirarchy

folding is driven by local interactions

2. Collapse model

→ Hydrophobic collapse (nonlocal interactions)

drives secondary structure formation

단백질폴딩의 핵심은 부분적으로 제대로 폴딩된 것을 유지시키면서 점차적으로 분자 전반에 걸쳐

안정화 되가는 것임.

(Q) 무엇이 제대로 된 것(intermediate)인지 아닌지를 구별하나?

; energy level 로 구별하며, 구조적으로는 native interactions 으로 구별할 수 있다.

1. Hydrophobic collapse (submilisecond event)

동시에 αξ(((((나 (((((((((같은 간단한 2 차구조가 생기는데, 이 때 생성된 2 차구조는

결합력이 약함 (non-native state)

↓

2. 2 차구조들의 합체 (coalesce)

3. 'Molten globule' 형성

(Native secondary structures w/o tertiary interactions)

안정한 2 차구조, 하지만 3 차구조는 고정안된 상태

compact 하지만 아직도 소수성이 큼

↓

4. Side-chain packing (stability maximization)

↓

intermediate 에 대한 연구 결과 : concept 3 의 반복

폴딩을 주도하는 힘은 'native interaction'임. 즉, folding intermediate 를 통해 부분적으로 안정된 'native interaction'이 분자전반에 걸쳐 점차적으로 안정화 되면서 이루어짐.

Protein dissection 방법에 의해 폴리펩타이드의 부분만을 가지고 폴딩해도 그 부분에 해당되는 native 구조를 형성할 수 있음: Oas & Kim (1988) Nature 336, 42-48 이후 다수의 논문

What is New View?

- Classic vs. New View of Protein Folding

pathway vs. landscape

state vs. ensemble

- Resolution to Levinthal paradox:

Collapse to compact state narrowed the search space

As internal free energy ↓,

conformational freedom (entropy) ↓.

So, there hasn't been any 'paradox.'

Resulted from misconception of framing the folding as playing golf

- Transition state:

Not a single structural state but an ensemble of various conformations.

New view: folding is parallel multi-pathway diffusion-like proces

4. 단백질폴딩 연구의 실험적 접근 방법

(1) 폴딩의 열역학적 분석

- Protein folding of small proteins is reversible, highly cooperative. → two-state model
- Stabilization free energy (△G): 5-15 kcal/mol

Proteins are marginally stable

because flexibility is essential for protein folding, function, and removal.

- Measuring the conformational stability of a protein:

Protein structure: a practical approach. chapter 13 (Pace et al.)

Urea-melt, Guanidine-melt , Temperature-melt

Fitting 에 필요한 수식들

- Test for a two-state

a) single probe 사용: biphasic -)νιαμοδ(ραλυδομ γνιδλοφ

b) two probes 사용: non-coinsident - κροωεμαρφ λεδομ

- Eq'm study 의 문제점

a) I 가 존재해도 two-state 로 분석되는 경우

I too low to detect – quantitative limit

I 의 구조가 N 이나 U 구조와 비슷할 때 – sensitive method 개발

CD 같은 spectroscopy 는 population 전체를 보기 때문에 서로 다른 부분 성질이

averaged no information

→개개 atom 에 대한 probe 가 필요.

b) eq'm intermediate – not necessarily on the pathway (U ⇄ N ⇄ I 경우)

(2) 폴딩의 동역학적 분석

Eq'm data 가 two state model 에 맞는 경우도 kinetic analysis 에 의해 I 존재가 밝혀짐 (monophasic vs. multiphasic) → ψδυτσ χιτενικ 는 folding mechanism 연구에 가장 sensitive 한 방법임.

- Kinetic Folding Intermediate 연구의 문제점

a) I: Intrisic instability, short-lived → have to be trapped, fast method

How to trap I

* low temperature
* disulfide intermediate
* amide hydrogen exchange & pulse-labeling

Fast method: stop-flow, temperature jump

b) kinetic data 로부터 mechanism 도출 – extremely difficult

c) 한 개 이상의 isomeric species 가 존재

proline isomerization 때문에 U_f & U_s 존재. 이러한 isomeric I 는 진정한 structural kinetic I 와 구분되어야 함.

****Kinetics of unfolding : single exponential**

Kinetics of folding : mutiple phases due to heterogeneity of unfolded species

(Q) equilibrium intermediate 이 kinetic intermediate 와 동일한가?

: 동일하다는 증거들이 축적됨. 폴딩문제를 보다 단순화함.

폴딩연구에 native amide proton exchange 적용할 수 있음.

Bai et al. (1995) Science 269, 192-197

(Q) What is the folding intermediate like?

:molten-globule: native secondary structure but without fixed tertiary interactions

(3) Detection and Characterization of Intermediates

선행조건: chemical heterogeneity (aggregates, incomplete unfolding, domain folding etc.) 문제를 해결

(a) Spectroscopy (CD, fluorescence, UV difference, Raman)

(b) NMR (chmical shift of His, amide proton exchange)

(c) Trapping I by blocking –SH group

(d) Differential labeling (extrinsic probes)

- 선행조건: labeling 이 구조나 folding process 에 영향을 주면 안됨.
- Folding 속도에 비해 labeling 이 rapid 해야 함.
- probes (spectroscopic, paramagnetic)

(이 방법은 potential 은 크지만 many controls 필요함. 왜냐하면 modification 은 거의 변화를 수반)

(e) Limited proteolysis : unfolding 된 부분은 프로테아제 공격받음

(f) Enzyme activity, ligand binding, antigenicity (mAb: most sensitive)

(g) 기타: Transverse Urea Gradient Gel Electrophoresis

주로 eq'm study, kinetics 도 가능

For rapid interconversion: single sharp zone

Longer interconversion: broadeded band

Slower interconversion: only the original form

Kinetics: 2 °C 에서 (속도를 늦춤) 30 분 간격으로 electrophoresis

▶ trapping I by blocking –SH group

전제: S-S bond 는 단백질 구조 형성시 두 개의 cysteine 이 가까이 존재해야 생김. S-S bond 형성이 folding 을 drive 하지는 않음.

Unfolding 또는 refolding 과정중에 I 를 trap 하여 정제하고, 각 species 에 대해 S-S bond 위치를 결정함.

Trap: by idoacetic acid, idoacetamide (Creighton), by acid (Kim)

Separation: HPLC (cf. chromatography, paper electrophoresis)

Identification: free-SH blocked by IAA → S-S reduced to –SH → εϖιταϖιρεδ ΑΑΙ

τνεχσερουλϕ /ω δελεβαλ →)γνιδλοφνυ ετελπμοχ(σισψλομρεητ → ΧΛΠΗ

▶ amide proton 의 순간표지 (pulse-labeling) 기술

❄폴리펩티드 전체에 걸쳐 분포되어 있는 amide 수소원자 (proton)는 수용액의 수소와 (수용액이 D_2O 일 경우는 중수소와) 교환될 수 있으며, 교환속도는 각각의 수소원자의 내부 수소결합 참여 여부 또는 수용액으로부터 제외되는 (solvent exclusion) 정도에 따라 결정된다.

실험방법을 간단히 살펴보면

(i) 단백질 3 차구조를 중수소로 구성된 denaturant 용액에 넣어 완전히 풀어지게 한 후 거의 모든 amide 수소원자를 중수소 원자로 교환시키고,

(ii) denaturant 를 완충용액으로 희석시켜 폴딩이 시작되게 한 후 (이때 완충용액은 H2O 로 만들되 pH 는 약산성이 되게 하여 폴딩은 계속되어도 표지반응은 거의 일어나지 않게 한다),

(iii) 여러 시간대(수 msec 수천 msec)에 걸친 시료에 대해 순간적으로 (보통 < 10 msec) 알카리 pH 에서 수소교환이 일어나게 하여 수소원자로 표지시킨 후,

(iv) pH 를 낮추어서 수소교환은 종료시키지만 폴딩은 계속되게 한다. 폴딩이 끝난 단백질은 2-D NMR 로 분석하여 각각의 수소원자에 대해 표지반응에 대한 protection rate 을 얻을 수 있다. 즉 어느 수소원자가 초기 폴딩단계에 참여하고 어느것이 후기에 참여하는지를 쉽게 추론할 수 있다.

*이와같은 두가지의 교환속도를 결정하는 요인은 단백질폴딩에 있어서도 중요한 요인이기 때문에 amide 수소원자의 순간표지기술은 폴딩연구에서 가장 중요한 기술로 간주되고있다.

*교환반응은 적절한 (알카리) 조건에서 폴딩속도보다 훨씬 빠르고 부분적 표지에 의해 폴딩이 저해받지 않으며 또한 산성 pH 에서는 교환속도가 상당히 느려져서 실질적으로 표지반응을 중단 시킬수 있는 장점이 있다.

제한점: 대상단백질이 산성에서도 폴딩이 되야 된다는 것이다.

5. 단백질 구조예측 (Empirical Method & Homology Scanning)

SWISS-PROT web site (http://expasy.hcuge.ch/sprot/sprot-top.html)

http://kr.expasy.org/에서 proteomics tools 이용

1) Residue propensity 이용

2) Homology-based 구조예측

Dalal et al., 1997. Nature Struct Biol 4, 548-552

아미노산서열의 50%가 동일한 두 개의 단백질이 전혀 다른 구조(four-helix bundle 과 β-sheet)를 형성할 수 있었는데, 이는 단백질서열의 모든 잔기들이 구조형성에 기여하고 있는 정도가 같지 않음을 단적으로 보여주는 예이며, 현존하는 Homology-based 구조예측 방법의 한계를 모여주고 있음.

3) Simulation

6. 세포내에서 단백질폴딩

Protein disulfide isomerase, Peptidyl prolyl isomerase : slow step 들을 촉진시킴

Chaperones : molecular chaperone 은 unfolded 혹은 부분적으로 폴딩된 단백질에 결합하여 aggregate(off-pathway) 로의 진행을 막는 단백질로서, hsp60 와 hap70 그룹에 속하는 heat shock protein 들이 대표적이다

7. 디자인 (폴딩 연구의 강력한 접근방법)

단백질 설계는 단백질 폴딩 기작 연구의 궁극적인 목표의 하나이다. 현재 폴딩 기작이 완전히 이해되지 않은 상태에서 단백질의 설계는 어려움이 많으나 오히려 간단한 motif 를 갖는 단백질의 설계를 통하여 폴딩기작에 대한 가설들을 테스트해보고, 또한 설계된 motif 들에 새로운 기능을 부여해 보려는 'de novo design'도 시도되어 왔다.

이러한 연구를 토대로 점차 복잡한 기능을 수행할 수 있는 설계가 가능해 지면 산업적 또는 의학적으로 유용한 단백질 생산에 크게 기여하게 될 것이다. 설계를 통해 만들어진 단백질은 크기나 안정성 또는 용해성에 있어서 기존의 단백질 보다 장점을 가질 것 이며 기존에 생체내에 존재하지 않는 유용한 기능을 갖는 단백질을 개발 할 수 있을 것이다.