

"Olvadt gombócok" és más kompakt denaturált állapotok

1. Egy kis tudománytörténet
 2. Az "olvadt gombóc" modell
 3. Egyensúlyi köztitermékek
 4. Kinetikus köztitermékek
 5. Vitás kérdések
 6. Az olvadt gombócok élettani szerepe
-

Egy kis tudománytörténet

- 70-es évek eleje: Oleg Ptitsyn megjósol egy állapotot, ahol a másodlagos és harmadlagos szerkezetek már megvannak, de az oldalláncok nem illeszkednek szorosan
 - 1973–74 körül: első kísérleti jelek (szénsav anhidráz CD-spektruma)
 - 1977: Kuwajima részletesebb vizsgálatai alfa-laktalbuminnal: a hélixek előbb alakulnak ki, mint a szerkezet magasabb szintjei; úgy véli, a köztes állapot nem kompakt
 - 1978-tól: Ptitsyn és kutatócsoportja számos különféle módszerrel vizsgálja az alfa-laktalbumin savindukált intermedierjét. Kimutatják, hogy kompakt, de a hődenaturációja nem kooperatív, az oldalláncok szabadok: olvadt, globuláris állapot.
 - 1981: Ptitsynék fölfedezik az alfa-laktalbumin termikus intermedierjét
 - 1982: Shakhnovich, Finkelstein: az olvadt gombóc állapot elméleti modellje (folyadékállapothoz hasonlítja)
 - 1983: Ohgushi és Wada bevezetik a "molten globule" (olvadt gombóc) elnevezést
 - 1984: Ptitsyn csoportja kimutatja a szénsav anhidráz kinetikus intermedierjét, kimutatva, hogy ez fő tulajdonságaiban megegyezik az egyensúlyi olvadt gombóccal
 - 1987-től: a tudományos közösség kezdi elfogadni, hogy léteznek köztes állapotok
 - 1990-től: kételyek azt illetően, hogy az olvadt gombóc önálló termodinamikai állapot-e
 - 1993 körül: a kinetikus és egyensúlyi köztes állapotok összehasonlításai
 - 1993–95-től: olvadt gombóc élettani szerepének vizsgálatai
 - 1994–95: Pre-olvadt gombóc és nagy rendezettségű olvadt gombóc állapotok felfedezése
 - 1995-től: további kutatások: szerkezet, élettani szerep, felgombolyodásban játszott szerep
-



alfa-laktalbumin

Az "olvadt gombóc" modell

Ptitsyn (a keretmodell korai formája alapján) posztulálta olyan köztes állapot létezését, amely

- globuláris formába kondenzálódott
 - natívszerű másodlagos szerkezetet mutat
 - nemspecifikus hidrofób kölcsönhatások stabilizálják, a hidrofób oldalláncok főleg belül vannak
 - topológiája közel van a natív szerkezetéhez
 - "olvadt" jellegű, vagyis nincs merev harmadlagos szerkezete, az oldalláncok nem illeszkednek szorosan, a teljesen legombolyodott állapotba való átmenete nem kooperatív
-

Egyensúlyi köztitermékek

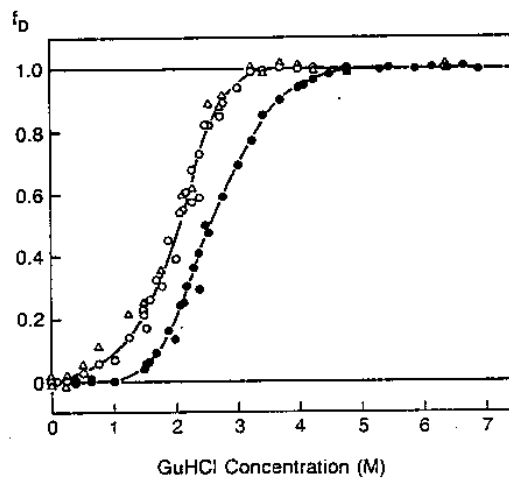
Híg denaturálószerben egyes fehérjék olyan, részlegesen denaturált állapotot vesznek fel, amely

- Kondenzált, Stokes-sugara egyenlő a natív fehérjéével vagy csak kicsit nagyobb
- jelentős másodlagos szerkezetet mutat (távoli UV CD mutatja), bár az ezt stabilizáló H-kötések gyengék
- a legtöbb oldallánc szabad, nem képez harmadlagos kontaktusokat
- a molekula "ragadós": sok hidrofób oldallánc érintkezik a vízzel
- ha enzimről van szó, ebben az állapotban az nem aktív
- a legombolyodott állapotba való átmenet nem vagy kevésbé kooperatív

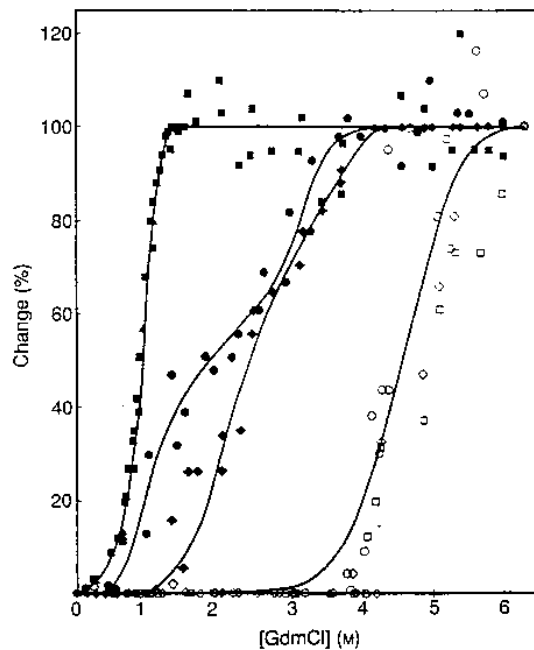
Kimutatás

Egyensúlyi denaturáció alapján

- Kétállapotú átmenetnek nem megfelelő görbe
- Különböző tulajdonságokat követve nem ugyanaz a középpont



alfa-laktalbumin denaturációja, közeli és távoli UV CD-vel nyomon követve



alfa1-antitripszin denaturációja, többféle módon nyomon követve

Savas intermedierek

- CD–vel mért optikai tulajdonságaik hasonlóak a denaturálószeres intermediéréhez, de
- nincs mellettük nagy hányadban natív vagy denaturált fehérje, ezért jól vizsgálhatóak
- pl. szénsav anhidráznál, alfa–laktalbuminnál

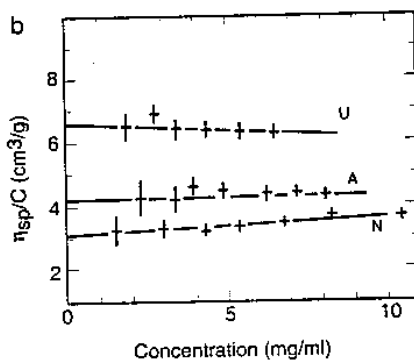
Termikus intermedierek

- Több fehérjénél kimutatták, hogy a hődenaturált állapot nem teljesen legombolyodott, hanem OG jellegű, jelentős másodlagos szerkezettel
- Denaturálószerrel újabb kooperatív átmenetre bírható
- Lehet, hogy a legtöbb fehérje ilyen

Kompaktság

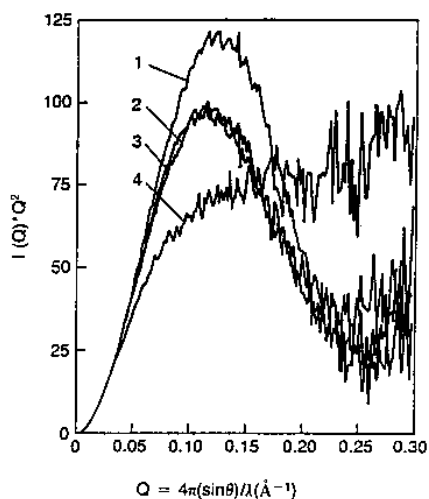
A méretre, kompaktságra lehet következtetni:

- Viszkozitásméréssel



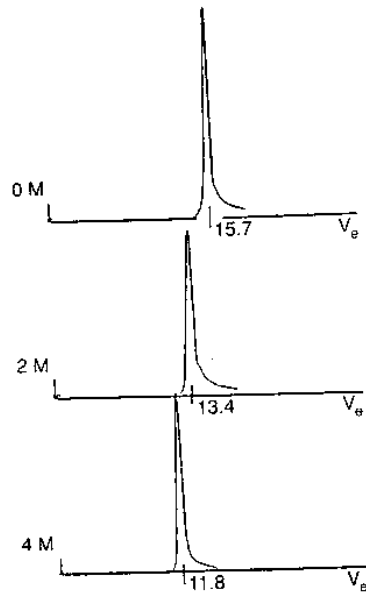
alfa–laktalbumin különböző állapotainak viszkozitása

- Röntgenszórásból



Citokróm c különféle állapotainak Kratky–plotja. 1: natív áll., 2,3: olvadt gombócok, 4: denaturált áll.

- Méretkizárásos kromatográfia (gélkromatográfia)



béta-laktamáz natív, olvadt gombóc és denaturált állapotának elúciós profilja

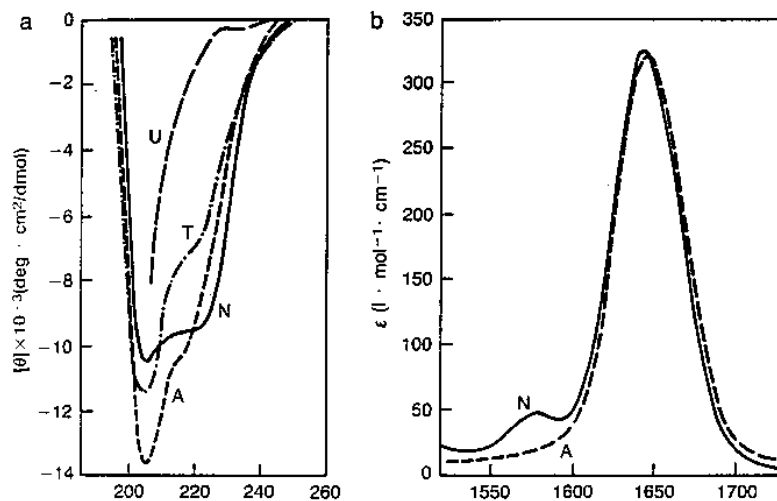
- szedimentációs sebesség
- diffúziós együttható (fényszórásból vagy polarizációs interferometriával)
- urea gradiens gélelektroforézis

Következtetés: az olvadt gombóc mérete (sugara) mintegy 10–20%–kal nagyobb a natív fehérjéénél

Másodlagos szerkezet

A másodlagos szerkezeti összetétel a távoli ultraibolya tartományban végzett cirkuláris dikroizmus méréssel határozható meg.

- Távoli UV CD jelentős másodlagos szerkezetet mutat



(a) alfa-laktalbumin távoli UV CD spektrumai. N: natív, A: savas OG, T: termikus OG (90 Celsius), U: denaturált.

(b) alfa-laktalbumin natív és savas OG állapotának infravörös spektruma

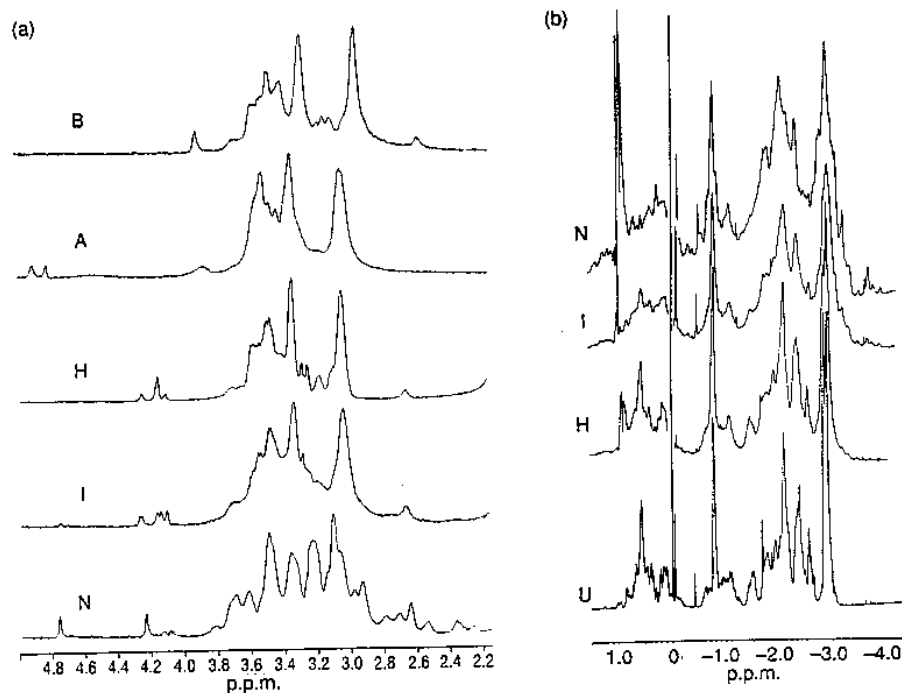
A CD spektrumoknál mutatkozó eltérés az OG és natív állapotok között főleg az aromás és diszulfid járulékokból adódik, hiszen az infravörös spektrum nem mutat különbséget.

- Egyes fehérjéknél van némi különbség a másodlagos szerkezetben az N és OG állapotok között

Harmadlagos szerkezet

Oldalláncok környezete, mozgási szabadsága

- NMR–spektrumból



béta–laktamáz különböző állapotainak NMR–spektrumai. (a) aromás régió, (b) alifás régió

Az alifás csoportok sokkal szabadabbak az OG–ben, mint a natívban, az aromásoknál megmaradt némi korlátozottság

- Közeli UV CD: nagymértékben csökkent a natívhoz képest. Nincs merev harmadlagos szerkezet
- NMR spin echo, fluoreszcencia polarizáció: ugyanezt adják

Nagyléptékű fluktuációk

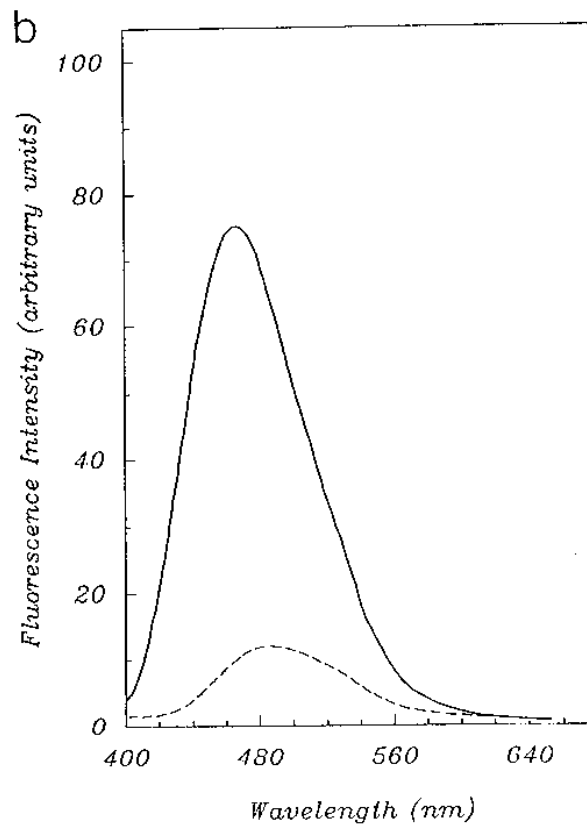
- Hidrogénkicserélődés sebessége nő
- Proteázokra való fogékonyság nő

Nagyban megnövekedett fluktuációkra utal

Hidrofób felületek

Vegyületek, melyek hidrofób felületekhez kötődnek:

- ANS (8–anilino–naftalin–1–szulfonát): kötődéskor nagymértékben megnő a fluoreszcenciája. Natív állapotban a szabad hidrofób foltokhoz kötődik. Az olvadt gombócokhoz nagymértékben kötődik



- 3-trifluorometil-3-m-[¹²⁵I]jódfenil-diazirin és [³H]diazofluorén (DAF): fotoaktiválható hidrofób reagensek. Nagymértékben kötődnek az olvadt gombócokhoz

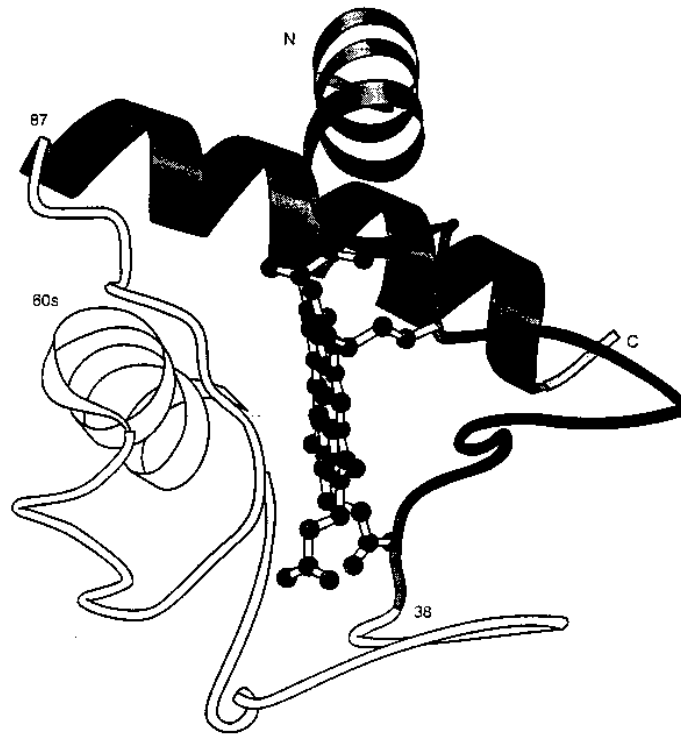
Az olvadt gombócoknak nagy hidrofób felületük miatt a membránokhoz is nagy az affinitásuk

Topológia

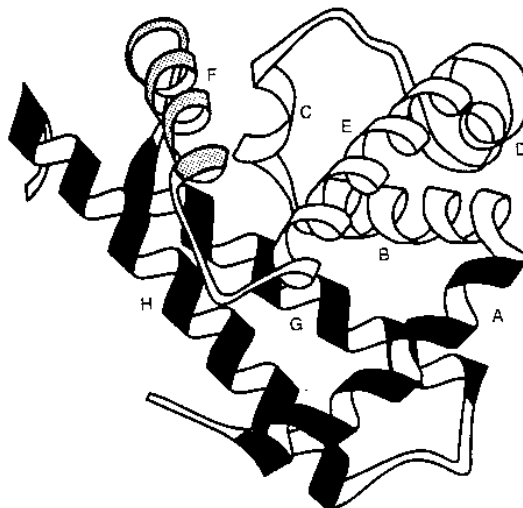
- Olvadt gombócról röntgenszerkezet nincs, NMR-spektrumok értelmezése nehéz
- pH-ugrásos hidrogénkicserélődéses kísérlet:
 - ◆ Savas olvadt gombóc állapotban nehézvízbe téve a fehérjét különféle időtartamokig hagyjuk menni a kicserélődést
 - ◆ A pH-t hirtelen megnöveljük, a fehérje natívvá válik
 - ◆ NMR-rel meghatározzuk a kicseréletlen protonok helyét

Eredmények:

- ◆ A védettség tényezők sokkal kisebbek, mint a natív állapotban (10^8 helyett 100–1000 körüliek)
- ◆ Egyes régiók védettséget mutatnak:



Citokróom c, az OG állapotban védett régiók satírozva



Mioglobin, az OG állapotban védett régiók satírozva

- ◆ Olyan régiók mutatnak védettséget, amelyek a natív szerkezetben klasztereket képeznek → feltehetően az OG-ben is
- A távoli UV CD spektrumok nagyon hasonlóak → a védettséget nem mutató hélixeknek is meg kell lenniük, csak azok erősen fluktuálnak

Natívszerű-e a harmadlagos szerkezet?

- Deszpentapeptid–inzulin (egy öt aminosavnyi szakaszt töröltek az inzulinból): OG állapotának kétdimenziós NMR vizsgálatát elvégezték. Következtetések:
 - ◆ Megvannak a hélixek és a béta-szálak
 - ◆ Egymáshoz képest nagyjából úgy helyezkednek el, mint a natív szerkezetben
 - ◆ De erősen fluktuálnak (egymáshoz képest)
- Diszulfidhidas kísérletek: a diszulfidhidakat felbontva ugyanúgy képződnek-e újra az OG állapotban, ahogy a natívban kell?
 - ◆ alfa–laktalbumin: sokféle diszulfidvariáció
 - ◆ béta doménjétől megfosztott alfa–laktalbumin: dominánsan natívszerű diszulfidképződés
 - ◆ ellentmondó eredmények, vélemények

Fehérjék víz–alkohol keverékben

- Számos fehérje OG tulajdonságokat mutat víz–alkohol keverékben
- Jelentős másodlagos szerkezet
- Némelykor ott is hélixek vannak, ahol a natív szerkezetben nem (az alkohol helicitást indukál)
- Óvatosan kezelendők az eredmények, mert nem tudni, mennyire esik egybe az alkoholos OG 3D szerkezete a klasszikus OG–ével

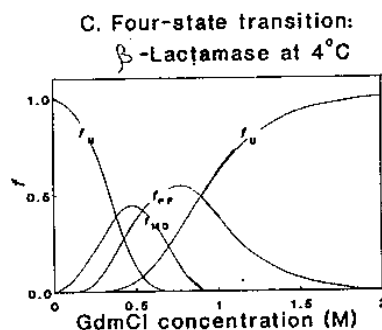
Pre-"olvadt gombóc" állapot

- béta–laktamáz egyensúlyi denaturációjában 4 Celsius–fokon két intermediert találtak



béta–laktamáz

- az egyik a szokásos OG
- a másik egy lazább szerkezet:



béta–laktamáz különféle állapotainak részarányai a denaturálószer–koncentráció függvényében

- ◆ jelentős másodlagos szerkezet, de nem annyi, mint az OG
- ◆ kompakt, de nem annyira, mint az OG
- ◆ köti az ANS–t, de nem annyira, mint az OG
- hasonlót találtak szén-sav anhidráznál
- felgombolyodásban korai intermedier lehet?

Nagy rendezettségű olvadt gombóc állapot

- Interleukin–4 savas állapota: CD és ANS–kötés szerint OG
- NMR–spektroszkópiából számolt rendezettségi paraméterek szerint csak az egyik hélix vége lazult fel, a hidrofób mag nagy része megmaradt:

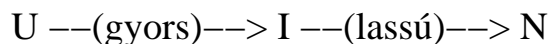


Interleukin-4, a felazult rész sárgával

- Több más fehérjénél kimutattak hasonlót (lólizozim, Staphylococcus nukleáz, apocitokrómok)
- Felvetették, hogy a felgombolyodásban késői intermedier lehet
- De: amely fehérjéknél ezt kimutatták, azoknál hagyományos OG állapotot nem találtak → ez talán csak egy másfajta OG

Kinetikus intermedierek

- Felgombolyítási kísérletek leggyakoribb eredménye: a távoli UV CD gyorsan kialakul, az aromás oldalláncok környezete és az enzimaktivitás jóval lassabban.
- Tehát: másodlagos szerkezettel rendelkező intermedier halmozódik fel (I)
- Az I a felgombolyodásban a fő energiagátat, a sebességmeghatározó lépést előzi meg:



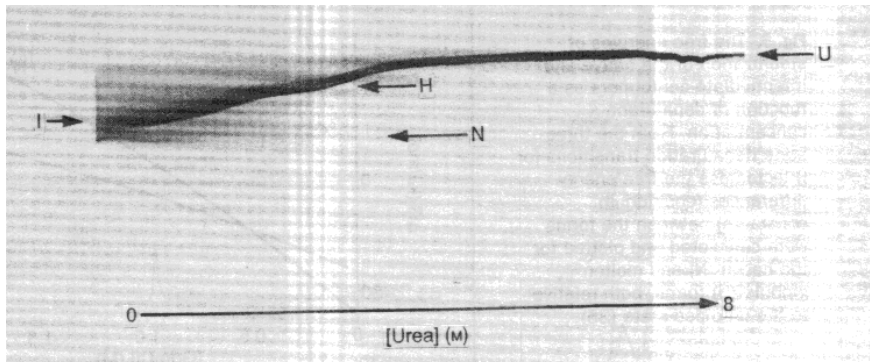
Az I intermedierről kiderült, hogy

- Kondenzálódott (kompakt)
- másodlagos szerkezete van
- kevés benne a kialakult harmadlagos kölcsönhatás
- "ragadós"
- ha enzimfehérjéről van szó, akkor inaktív
- ideiglenesen létezik, a felgombolyodás sebességmeghatározó lépése előtt

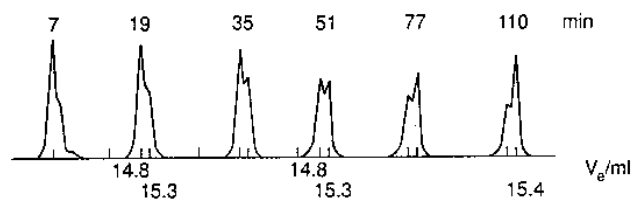
Vagyis: nagymértékben hasonlít az egyensúlyi OG-hoz (*tranzienst* vagy *kinetikus* OG). Egyes esetekben azonban vannak eltérések.

Kompaktság

- Viskozitásmérés, ureagradiens–elektroforézis, méretkizárásos kromatográfia → az I állapot kompakt, Stokes–sugara 10–15%–kal nagyobb a natív állapoténál
- Ureagradiens–gélelektroforézis:



- béta-laktamáz stabil OG állapotát vitték a géltre (H). U: legombolyodott, N: natív, I: kinetikus intermedier
- Méretkizárásos kromatográfia:

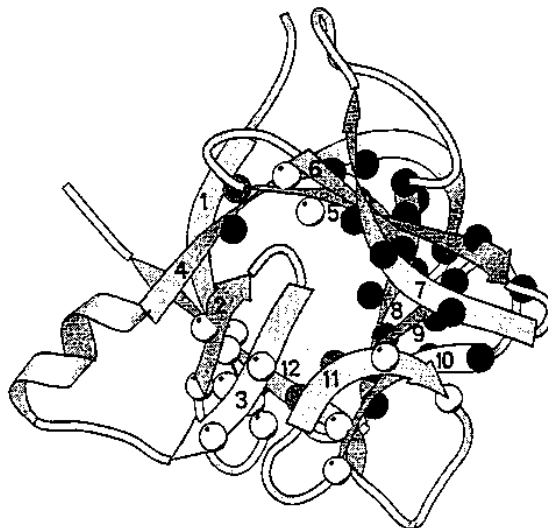


béta-laktamáz stabil OG állapotát natív pufferbe helyezve alacsony hőmérsékleten elindították a felgombolyodást, majd időnként kromatogramot vettek fel. A stabil OG állapot 13,4 ml-nél jönne le, ez nem jelenik meg, csak a 14,8-nál lejöő I és lassan a 15,3-nál lejöő N.

- Béta-laktamáznál és szénsav anhidráznál jól megkülönböztethető az I a stabil OG-tól. Kissé kompaktabb.

Másodlagos szerkezet

- Stopped-flow CD-mérések → natív másodlagos szerk. nagy része ms-os időskálán kialakul
- Alfa-laktalbumin: a stabil OG és az I távoli UV CD-spektruma azonosnak adódott
- Interleukin 1-béta (béta-fehérje):
 - ◆ távoli UV CD: natív másodlagos szerk. 1 s-on belül kialakul
 - ◆ pulse labelling hidrogénkicserélődés:



fekete pöttyök: 1 s alatt levédődnek, fehér pöttyök: csak 25 s után védődnek le

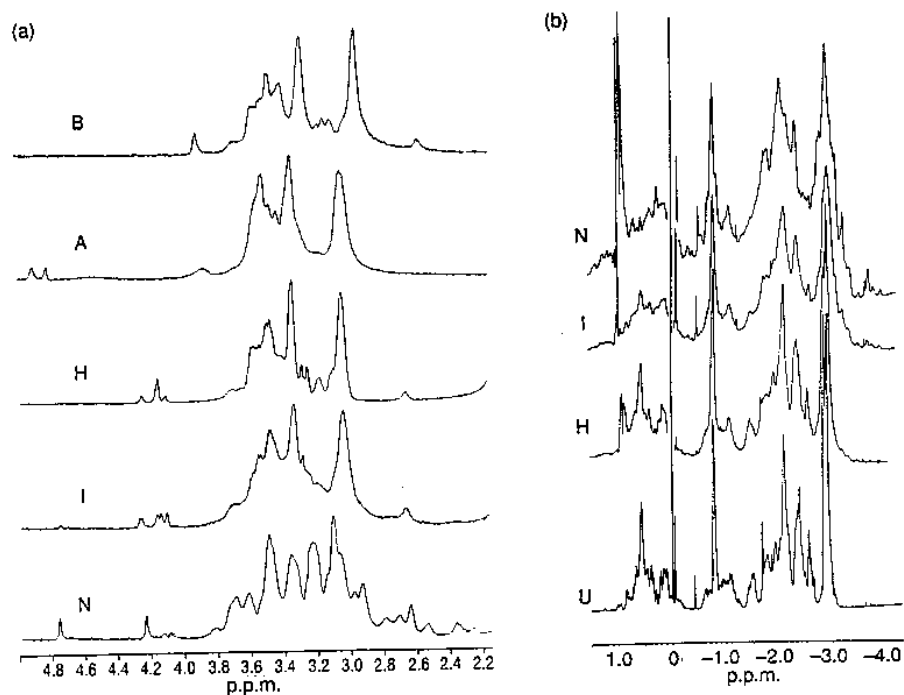
tehát: kialakul a másodlagos szerk., de a H-kötések még labilisak

- Összefoglalva: nagyon hasonló a stabil OG-hez

Harmadlagos szerkezet

Oldalláncok környezete és mozgékonyága

- NMR–spektrumok: gyakorlatilag megegyeznek az egyensúlyi OG–ével

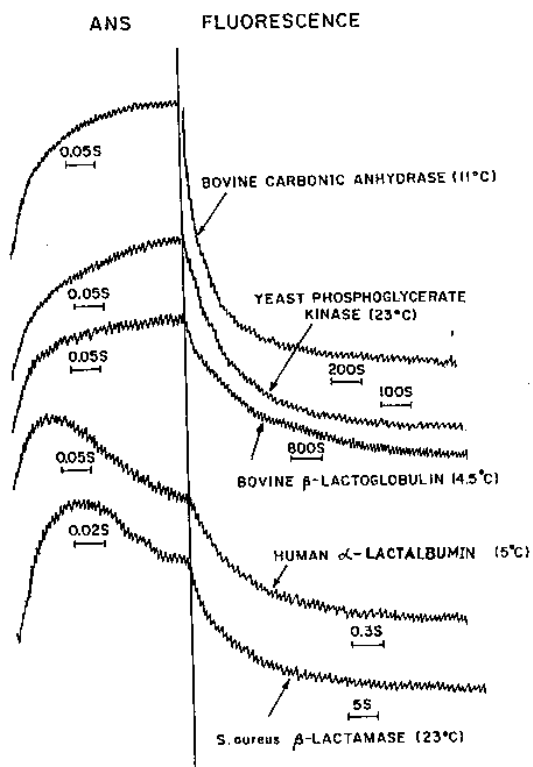


béta–laktamáz különböző állapotainak NMR–spektrumai. (a) aromás régió, (b) alifás régió

- közeli UV CD: ugyanez

Hidrofób felületek

- ANS–fluoreszcencia követése stopped–flow felgombolyításnál



Öt fehérje ANS–fluoreszcenciájának változása a felgombolyodás során (közben időskála–váltás)

- ANS–kötés előbb gyorsan nő, majd lassan csökken

Topológia

- Pulse labelling hidrogénkicserélődéses kísérletek szerint a kinetikus OG nagyon hasonló az egyensúlyi OG–hoz (citokróm c, apomioglobin)
- Irányított mutagenézissel végzett kísérletek ugyanezt adják

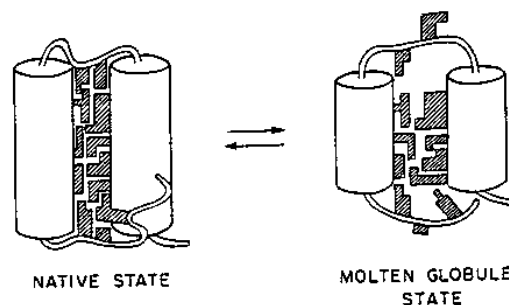
A "hirtelen megugrási" (burst) intermedier

- A felgombolyodás során néhány ms–en belül ("burst", megugrási szakasz) képződik egy intermedier, jelentős másodlagos szerkezettel (a natív 50–100%–a)
- ANS–kötésnek is van ugyanilyen gyors fázisú szakasza
- citokróm c hem csoportjának kioltása egy triptofán által, szintén a burst fázisban, arra utal, hogy a kompaktizálódás is bekövetkezik
- —> a "burst" intermedier is OG jellegű, de inkább a pre–OG–re hasonlít. Pre–OG a burst intermedier egyensúlyi megfelelője?

Vitás kérdések

Natívszerű–e az olvadt gombóc?

- Hagományos olvadtgombóc–modell (à la Ptitsyn):



- ◆ Lényegében megvan a lánc natív topológiája, csak az oldalláncok szoros illeszkedése hiányzik
- ◆ A szerkezetnek két szintje van: a lánc nagybani alakja és az oldalláncok pontos illeszkedése a harmadlagos szerkezetben
- Alternatív álláspont: nincs meg a natív topológia
 - ◆ Privalov 1997: Nem jó az olvadtgombóc–modell, mert
 - ◇ Termodinamikai mérések alapján állítható, hogy ami olvadt gombócnak látszik, az vagy rosszul felgombolyodott (nem natív topológiájú) fehérje, vagy pedig egy része (domén v. szubdomén) felgombolyodott, többi része rendezetlen
 - ◇ Ha már megvan az egész natív topológia, akkor az oldalláncoknak nagyon gyorsan össze kéne pakolódni
 - ◆ Creighton: a legtöbb olvadt gombócot meglévő natív diszulfidhidak mellett állították elő. Ha ezeket felbontjuk, nemigen alakul ki natív szerkezet
 - ◆ Dill: Elméleti modellek alapján: nem lehet, hogy az oldalláncok erősen mozognak, a gerinc meg nem; a kettő szorosan csatolt
 - ◆ Újabb cikkek: az aggregátumok könnyen összetéveszthetők OG állapottal

A Ptitsyn–modell mellett talán több kísérleti bizonyíték szól, de egyre többen hajlanak a Privalov–féle nézetre is. Úgy tűnik, sokféle olvadt gombóc van, nem olyan egyszerű a helyzet, mint korábban gondolták.

A felgombolyodás intermedierjei rajta vannak–e a felgombolyodás útvonalán, vagy kívül esnek rajta?

- A kinetikai kísérletek eredményeit többnyire jól lehet illeszteni az U=I=N (on-pathway) és I=U=N (off-pathway) modellre is
- On-pathway: I nagyobb koncentrációja gyorsítja a felgombolyodást
- Off-pathway: lassítja
- mindkettőre vannak példák

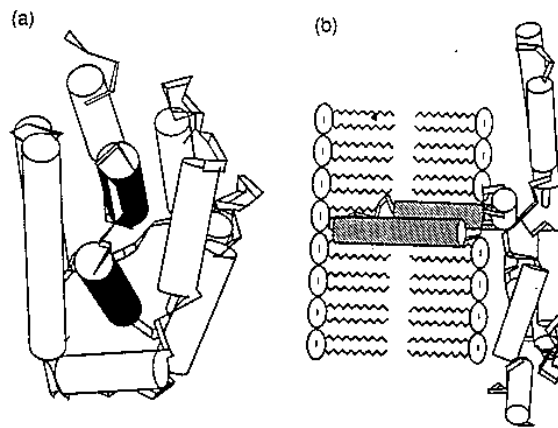
Az olvadt gombócok élettani szerepe

Fehérjetranszport membránon át

- Két szakasz: (1) a fehérje hozzátapad a membránhoz, (2) más fehérjék révén egy ATP-függő mechanizmus átviszi
- Kimutatták: hozzátapadás gyorsabb, ha OG állapotban adjuk a fehérjét
- Hozzátapadt állapotban érzékenyebb a proteázokra
- Számos fehérjénél, pl. mitokondriumba irányuló transzport

Membránba fűződés

- Pl. toxinok, melyek a sejtmembránba ágyazódnak, átérésztővé téve azt. Ilyen a **kolicin A**:



(a) a kolicin natív szerkezete, (b) a membránba ágyazódott szerkezete (valószínűsíthető)

- A belső két, hidrofób hélix kifordul.
- Kimutatták, hogy a kolicinnak van savas OG állapota, ez indukálódhat a membrán közelében, megkönnyítve az átalakulást. (A membrán felszínén töltések vannak, ezért ennek közelében a citoplazma pH-ja, ionerőssége eltérhet a távolabbi régiók pH-jától.)
- Sok más, hasonló fehérjénél

Kötődés chaperonokhoz

- Chaperonok részlegesen felgombolyodott fehérjét kötnek, számos kísérlet szerint valamiféle OG vagy pre-OG jellegű állapotot.
- Alfa-laktalbumin kötődik a GroEL chaperoninhoz, az OG-nél valamivel kevésbé kompakt állapotban

Egyéb

- Többalegységes fehérjék összeszerelődésénél (monomerek OG-ben lehetnek)
- Apoláros ligandumok szállítása: membrán közelében a fehérje OG-vé válik, és lelöki magáról az apoláros ligandumot
- Receptor-ligandum kapcsolódás: némi mozgékonyság kell hozzá
- Emésztődés a lizozómában, savas környezetben
- Ubiquitinfüggő folyamatok (pl. degradáció): az ubiquitin (egy 76 aminosavból álló, kis fehérje) kovalens kötődése a fehérjéhez OG állapotba viheti a fehérjét, ezáltal előkészíti lebontásra a proteaszóma (a sejt fehérjelebontó gépezete) számára