

Prolinizomerizáció. A diszulfidhidak képződése.

1. Prolinizomerizáció

- ◆ A prolin cisz és transz állapota
- ◆ A prolinizomerizációs hipotézis
- ◆ A prolinizomerizáció próbái
- ◆ Mutációs kísérletek
- ◆ Nagyobb fehérjék
- ◆ A prolinizomerizáció katalízise in vivo

2. A diszulfidhidak képződése

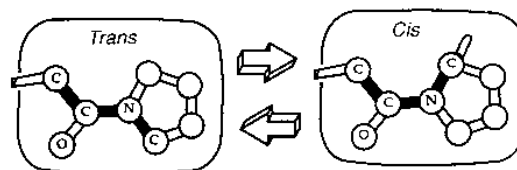
- ◆ A diszulfidhidak kémiája
- ◆ Diszulfidreagens
- ◆ A felgombolyodás elemzése diszulfidhidas intermedierek révén
- ◆ Az intermedierek csapdába ejtése
- ◆ A csapdába ejtett intermedierek jellemzése
- ◆ Diszulfidhidak révén feltérképezett felgombolyodási útvonalak
- ◆ A kinetikus intermedierek szerepének és fontosságának meghatározása
- ◆ Protein diszulfid izomeráz

Prolinizomerizáció

- Felgombolyodás kinetikája ált. többfázisú
 - ◆ gyors fázis: 1 ms – 1 s
 - ◆ lassú fázis: 10 s – 1000 s
- A lassú fázis adja az amplitúdó nagy részét pl.: RNáz A, RNáz T1, tioredoxin, triptofán szintáz
- A gyors fázis dominál, de lassú is van: lizozim, Staphylococcus nukleáz, citokróm c, ubiquitin, BPTI, barnáz
- A lassú fázisok háttérben gyakran *prolinizomerizáció* áll.

A prolin cisz és transz állapota

- A peptidkötés lehet *transz* ($\omega=180$ fok) v. *cisz* ($\omega=0$ fok)
- Nem Pro aminosavak: cisz állapot nagyon kedvezőtlen, ezért az egyensúlyi állandó $[transz]/[cisz]$ értéke 100–1000 körüli
- Pro-nál:



nincs akkora eltérés, ezért az egyensúlyi áll. kb.

$$[cisz]/[transz] = 0,4$$

azaz kb. 30% cisz, 70% transz.

- Pro-izomereket csak NMR-rel lehet kimutatni, optikailag nem.
- Kis peptideken vizsgálták, izomerizáció lassú (300 s időállandó körül)
- Fehérjékben: a natív szerkezetben a Pro-k meghatározott izomerizációs állapotban vannak
- Cisz-Pro-t tartalmazó fehérjéknél a felgombolyodás lassú fázisa dominál

A prolinizomerizációs hipotézis

Brandts, Halvorson és Brennan 1975:

- A natív állapotban mindegyik prolinnak meghatározott izomerizációs állapotban kell lennie
- A legombolyodott állapotban mindegyik prolin a 0,4-es egyensúlyi állandó szerint viselkedik, ezért sok nemnatív izomer van
- Azok a legombolyodott molekulák, amelyekben mindegyik Pro a natívnek megfelelő izomerizációs állapotban van, gyorsan felgombolyodnak, a többiek lassan

Újabb kiegészítés: Natívszerű állapotban is lehetnek nemnatív Pro-izomerek (sőt, ált. ilyenek vannak)

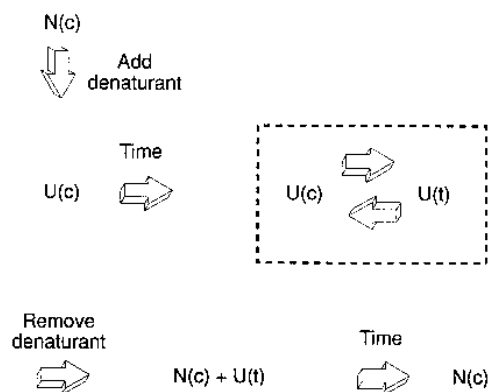
A prolinizomerizáció próbái

A kettősugrasi próbák

(double-jump assays)

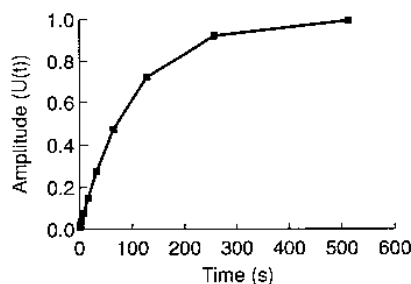
Kettős ugrás: ugrások a *denaturálószer-koncentrációban*. Két változat:

1. Lassan felgombolyodó denaturált formák kimutatására:



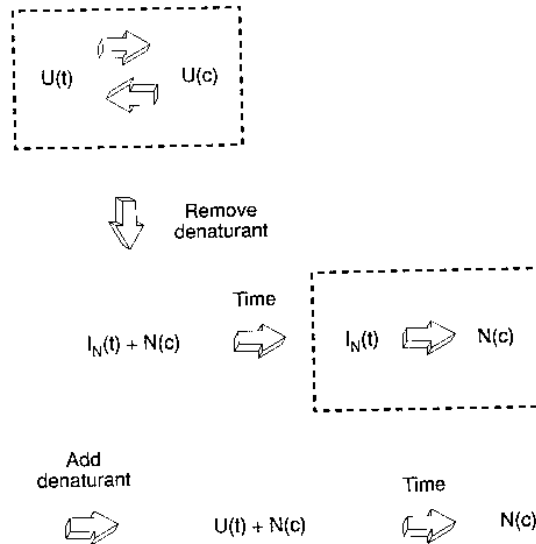
(Tegyük fel: a natív formában 1 db cisz-Pro van.)

- ◆ Natív állapotot ($N(c)$) tömény denaturálószerrel denaturáljuk (1. ugrás)
- ◆ Adott t inkubációs ideig hagyjuk a cisz és transz állapotok egyensúlyát beállni a legombolyodott állapotban ($U(c) \leftrightarrow U(t)$)
- ◆ Ekkor kihigítással eltávolítjuk a denaturálószeret (2. ugrás)
- ◆ Mérjük a natív állapot elérését; a lassú fázis amplitúdója arányos lesz az inkubálási idő alatt keletkezett $U(t)$ (lassan gombolyodó forma) mennyiségével
- ◆ Ábrázolás: lassú fázis amplitúdója az inkubációs idő függvényében
- ◆ Tipikus eredmény:

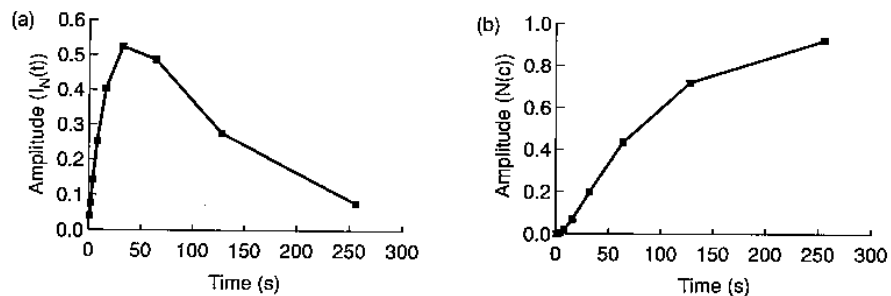


A kapott görbe jellemzői (időállandó, függés hőmérséklettől, pH-tól) ált. igen hasonlóak a modellpeptideken végzett prolinizomerizációs mérések eredményeivel

2. Natívszerű Pro–izomerizációs intermedierek kimutatására:



- ◆ Denaturált állapotból (izomerek egyensúlya) indulunk ki, denaturálószerben
- ◆ Kihigítással hirtelen eltávolítjuk a denaturálószeret (1. ugrás)
- ◆ Natív formák ($N(c)$) és natívszerű izomerek ($I_N(t)$) keletkeznek, utóbbiak lassan átmennek natívba. t inkubációs ideig hagyjuk zajlani
- ◆ Hirtelen hozzáadunk annyi denaturálószeret, hogy az instabilabb $I_N(t)$ izomerek (intermedierek) legombolyodjanak, de az $N(c)$ natívak megmaradjanak (2. ugrás)
 - ◇ Alternatív megoldás: annyi denaturálószeret adunk, hogy a natívak is legombolyodjanak
- ◆ A legombolyodás amplitúdója arányos lesz az inkubációs idő alatt megmaradt $I_N(t)$ mennyiségével
- ◆ Ábrázolás: a legombolyodás amplitúdója az inkubációs idő függvényében
 - ◇ Alternatív megoldásnál: a natív forma más időállandóval gombolyodik le, így annak az amplitúdója is meghatározható
- ◆ Tipikus eredmény:



Az intermedier tranziens módon halmozódik fel. Az időállandókat az intermedier szerkezete befolyásolja (eltérhet a modellpeptideken mérhetőtől)

Izomerspecifikus proteolízis

(Brandts és Lin 1979)

- Számos proteáz izomerspecifikus
- Pl. tripszin: Töltött oldallánc mellett hasít, de csak akkor, ha a következő kötés *transz*
- proteolízis sebessége arányos a *transz* állapot koncentrációjával, ill. kétfázisú a kinetika, és a lassú fázis amplitúdója a *cisz* állapot koncentrációjával arányos
- Pl. RNáz A:

–Lys91–Tyr92–Pro93–

kísérlet szerint: legombolyodott állapotban 33% cisz.

- Nem mindig egyezik más mérési módszerek eredményeivel (pl. NMR), mert a szerkezet befolyásolja a kötés hozzáférhetőségét.
-

Mutációs kísérletek

- Több fehérjén: izocitokró-m-c, tioredoxin, RNáz T1, RNáz A
 - Ált. Pro kicserélése másra eltünteti a felgombolyodás lassú fázisait, de különféle bonyodalmak léphetnek fel
 - **Élesztő izocitokró-m-c:**
 - ◆ Két lassú felgombolyodási fázis: 1. 10 s, 2. 100–200 s
 - ◆ Két cisz–Pro: 76 és 30
 - ◆ Pro76 cseréje másra → 2. lassú fázis eltűnik
 - ◆ Pro30 cseréje másra: instabil fehérje
 - **RNáz A:**
 - ◆ 1 gyors és 2 lassú fázis
 - ◆ Két cisz–Pro: 93 és 114
 - ◆ Kettős mutáns (mindkét prolin kicserélve): egyfázisú felgombolyodás, bár lassabb, mint a vad típus gyors fázisa (a fehérje instabilabb)
 - ◆ Pro114 cseréje: lassú fázisok amplitúdója csökken
 - ◆ Pro93 cseréje: megmaradnak a lassú fázisok, igen komplex kinetika; valószínűleg cisz peptidnek kell kialakulnia
-

Nagyobb fehérjék

- 3–nál több Pro esetében a lassú fázisok dominálnak (akkor is, ha egyik sem cisz a natív állapotban)
 - 20 db Pro esetében az időállandó kb. 600 s
 - Minden 10 újabb Pro megtízszerezi az időállandót
-

A prolinizomerizáció katalízise in vivo

Peptidil–prolil cisz/transz izomerázok

Három család:

1. ciklofilinek
 - ◆ ciklosporin (immunoszuppresszáns szer) receptora (immunoszuppresszióknak nincs köze a Pro–izomerizációhoz)
 - ◆ kb. 17 kDa
 - ◆ aktivitása kevésbé függ a Pro előtti oldalláncától
 2. FKBP család
 - ◆ FK506 (szintén immunoszuppresszáns szer) binding protein
 - ◆ riboszómán is előfordul ilyesféle
 - ◆ 12–13 kDa
 - ◆ aktivitása erősen függ a Pro előtti oldalláncától
 3. parvulinok
 - Még több típus lehet
 - Nem tudjuk, mennyire fontosak in vivo. Élesztőben összeset kiütve semmi káros hatás.
 - Katalízis mechanizmusa: korábban SH–reakcióra gyanakodtak, de ez megdőlt. Vsz. a szubsztrát szerkezetét eltorzítja
 - De novo szintézisben szerepe lehet
 - Átstrukturálódásban szerepe lehet, pl. C típusú mannózkötő fehérje Ca–mentes (inaktív) alakjában a Pro191 transz, az aktivált, Ca–os alakjában cisz.
-

A diszulfidhidak képződése

Miért érdekes?

- Hogyan alakulnak ki a diszulfidhidak a felgombolyodás során?

- A diszulfidhidas intermedierek jól vizsgálhatók, kinetikai szerepük megbízhatóan azonosítható, a szerkezetről információt ad a diszulfidhidas elhelyezkedése. Tehát a felgombolyodásról sokat mond.

Felvethető kérdések:

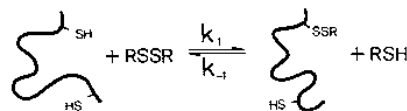
- A diszulfidhidas határozzák meg a szerkezetet vagy a szerkezet a diszulfidhidakat?
- Vannak-e a felgombolyodás folyamatában nemnatív diszulfidhidak, mi ezek szerepe?
- Egy vagy több felgombolyodási útvonal van?
- A felgombolyodás sebessége fehérjénként nagyon eltérő. Miért?
- In vivo ugyanúgy történik-e a felgombolyodás, mint in vitro?
- A felgombolyodást katalizáló enzimek (itt: diszulfid izomeráz) megváltoztatják-e a felgombolyodás mechanizmusát, vagy csak gyorsítják?

Vigyázat! Az eddigi vizsgálatok kis fehérjékkel történtek. Nagy fehérjékre nem feltétlenül általánosíthatóak.

A diszulfidhidas kémia

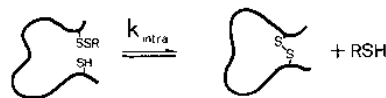
A reakció

- Két SH csoport (tiol) magától nem képez diszulfidhidat, csak ha megfelelő oxidálószer van jelen.
- Levegő oxigénje is elvégzi, de ez káros (nem kontrollálható, nemkívánatos melléktermékek, stb.), ezért a levegőt és egyéb oxidálószerket ki kell zárni
- Jobb: diszulfidreagens alkalmazása (RSSR), tiol–diszulfid cserés reakció
- Diszulfidhidas képződése fehérjében:
 1. lépés:



Vegyes diszulfid képződése

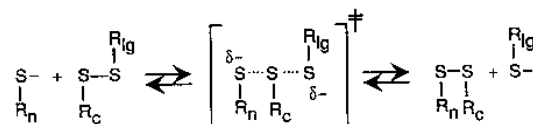
2. lépés:



Intramolekuláris lépés: egy második Cys tiolcsoportja reagál a vegyes diszulfiddal, így létrejön a diszulfidhidas

A második lépés sebessége (k_{intra}) elsősorban azon múlik, mennyire hajlamos a két Cys egymás közelébe jönni (konformáció)

- Mechanizmus:

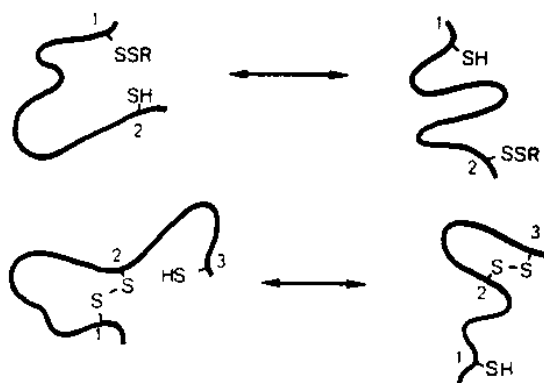


Lényeg: A tiolátion nukleofil támadása a diszulfidkötés egyik kénje ellen.

- ◆ Cys-SH pK_a-ja kb. 8,7, függ a környezettől. 8,7 körüli pH-t kell alkalmazni. Alacsony pH leállítja a diszulfidhidas képződését.
- ◆ Pozitív töltések a közelben gátolják, negatívak segítik a diszulfidhidas képződését

Egyéb intramolekuláris reakciók

- Vegyes diszulfid áthelyeződése a fehérjében
- Diszulfidhíd áthelyeződése a fehérjében (átrendeződés)

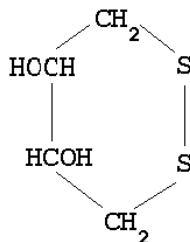


A diszulfidhíd kialakulásának valószínűsége

- A szerkezet befolyásolja
- legombolyodott láncban: a két Cys közötti aminosavak számától függ (m)
- nagy m -eknél $m^{-3/2}$ -nel arányos.
- Kis m -eknél páros m -re nagyobb, páratlanra kisebb, $m=0$ -ra nagyon kicsi (cisz peptidkötés kell hozzá)

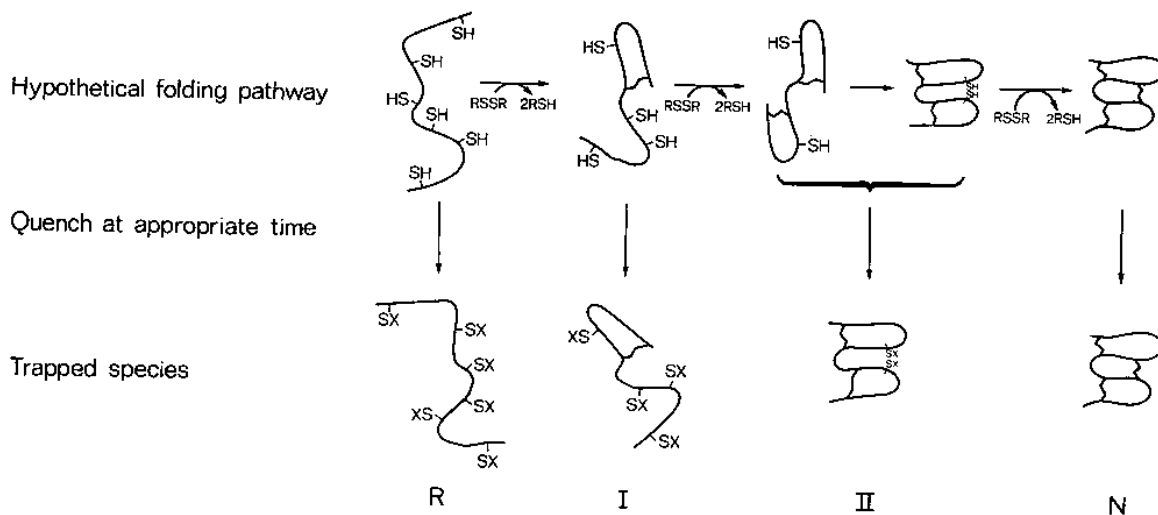
Diszulfidreagensek

- glutation (gamma-Glu--Cys--Gly tripeptid)
 - ◆ GSH tiolforma, GSSG diszulfidforma (intermolekuláris)
 - ◆ in vivo is ez a domináns
 - ◆ nem változtatja meg a fehérjekonformációt
 - ◆ egy negatív töltést hordoz (elemzéshez előnyös)
- Ditiotritol



- ◆ DTT_{SH}^{SH} tiolforma, DTT_S^S diszulfidforma (intramolekuláris)
- ◆ lassan oxidál, csak a legkedvezőbb diszulfidhidakat hozza létre
- ◆ vegyes diszulfidos termék nem halmozódik fel
- Más-más kinetikai paraméterek nyerhetők a kétféle reagens alkalmazásával
- A fehérje oxidáltsági foka szabályozható a diszulfidreagens tiol/diszulfid arányának beállításával

A felgombolyodás elemzése diszulfidhidas intermedierek révén



- Teljesen redukált, legombolyodott fehérje felgombolyodását elindítjuk diszulfidreagensek jelenlétében
- Adott időpontokban leállítjuk ("kioltjuk") a diszulfidhidak képződését
- Az így csapdába ejtett formákat megvizsgáljuk (diszulfidhidak és konformáció szempontjából)

Az intermedierek csapdába ejtése

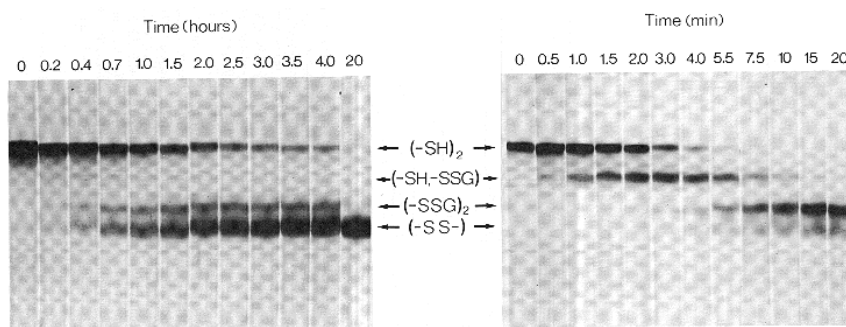
A diszulfidhidak képződése megállítható:

- Hirtelen lecsökkentjük a pH-t (pl. 2-re)
 - ◆ igen gyors, pillanatszerű hatás
 - ◆ nem áll le a diszulfidok képződése, csak jelentősen lelassul, elemzés végezhető, de sietni kell
 - ◆ előnye, hogy megfordítható: újból megemelve a pH-t a folyamat folytatódik
- Alkylálás jódetáttal vagy jódetamiddal
 - ◆ Irreverzibilis, nem kell sietni az elemzéssel
 - ◆ Lassabb reakció, közben szerkezeti változások történhetnek a fehérjében
 - ◆ Jódetát egy negatív töltést visz fel, jódetamid töltetlen. Ez elemzéshez előnyös

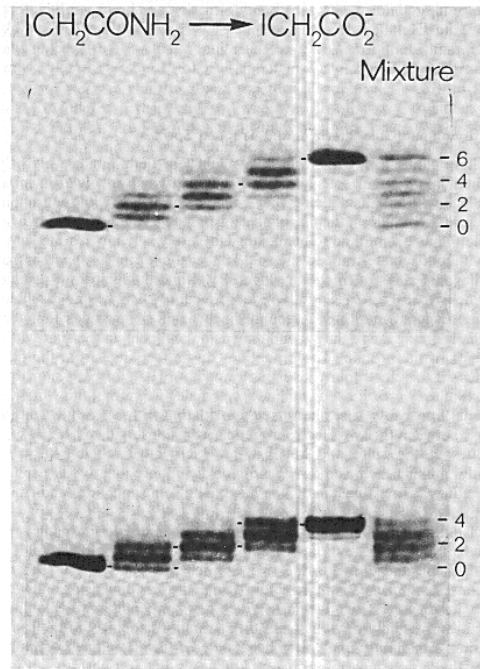
A csapdába ejtett intermedierek jellemzése

Hány diszulfidhid van és hol?

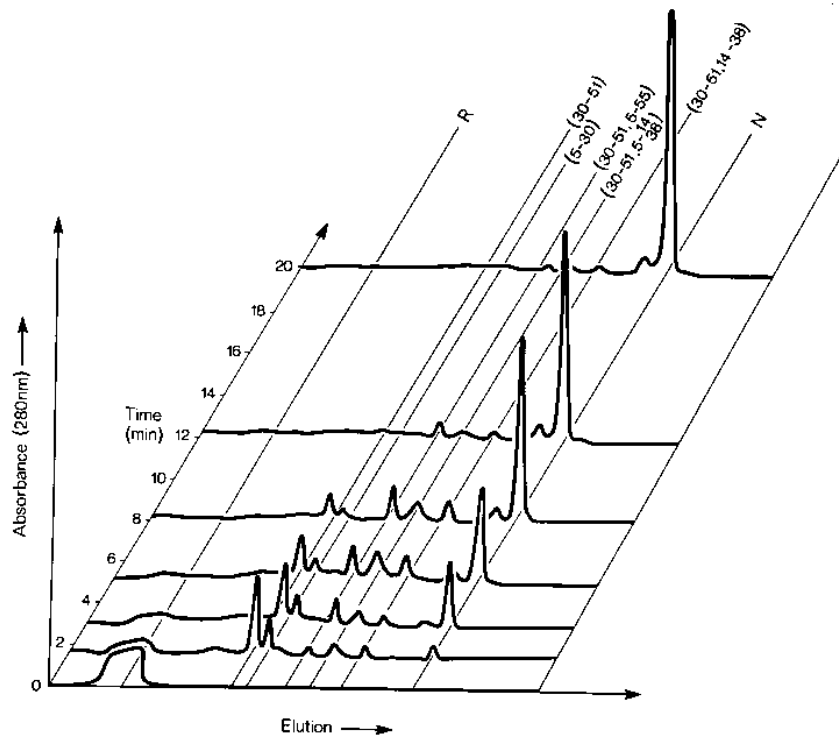
- Bármilyen elemzés végezhető, ami a diszulfidhidakat nem bántja. Savas pH-t kell fenntartani, semmi nukleofil vegyület.
- Poliakrilamid gélelektroforézis (PAGE): töltés és konformáció szerint is szeparál (hidrodinamikai térfogat)
 - ◆ Jódetamid (töltetlen) és jódetát (töltött) formák PAGE-jének összehasonlítása: diszulfidok száma kiszámítható
 - ◆ Redukált, vegyes diszulfidos és diszulfidhidas formák elkülöníthetők



- ◆ Jódetamid–jódetát keveréket alkalmazva, a keverékarányt változtatva megszámlálhatóak a szabad SH-csoportok (ill. redukció után alkalmazva a diszulfidhidak)

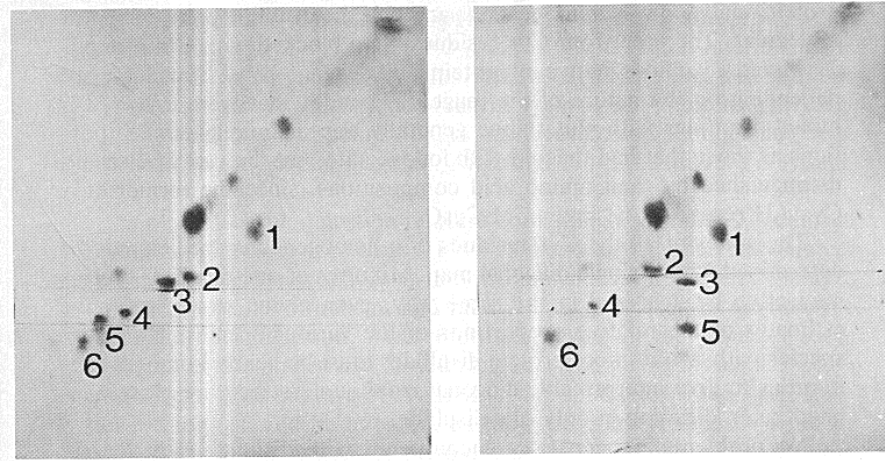


- Kromatográfia (pl. ioncserélő, HPLC-vel)



Tisztán elkülönülnek a különböző formák

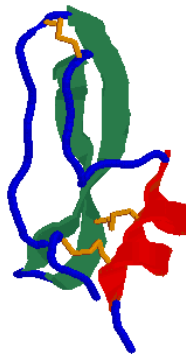
- Hol vannak a diszulfidhidak? Diagonális elektroforézis



- ◆ Pl. jóacetátos formával
- ◆ Proteázokkal darabokra hasogatjuk (pl. tripszin + kimotripszin)
- ◆ Előbb vízszintes irányban elektroforézis (papír)
- ◆ Perhangyasav gőzének kitéve a meglévő diszulfidhidak elhasadnak
- ◆ Elektroforézis újból, függőleges irányban
- ◆ Ami az első futtatásnál össze volt kötve diszulfidhíddal, az a második futtatásnál szétválak
- ◆ A fragmentumokat pl. aminosavösszetétel alapján azonosítjuk

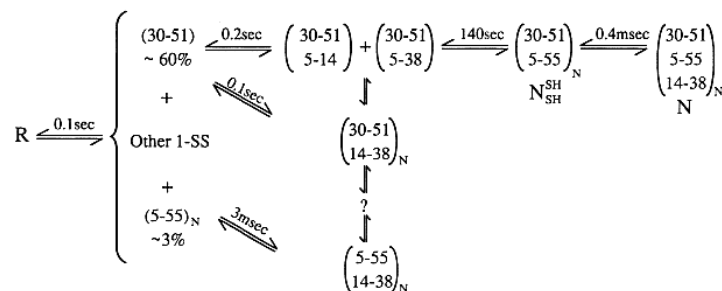
Diszulfidhidak révén feltérképezett felgombolyodási útvonalak

- Csak néhány fehérjére végezték el: BPTI (bovine pancreatic trypsin inhibitor: marha hasnyálmirigy tripszininhibitor), RNáz A, RNáz T1, alfa-laktalbumin, stb.
- BPTI



58 aminosav, egy béta lemez és egy hélix. Három diszulfidhíd: 14–38 felszíni, 30–51 és 5–55 eltemetett

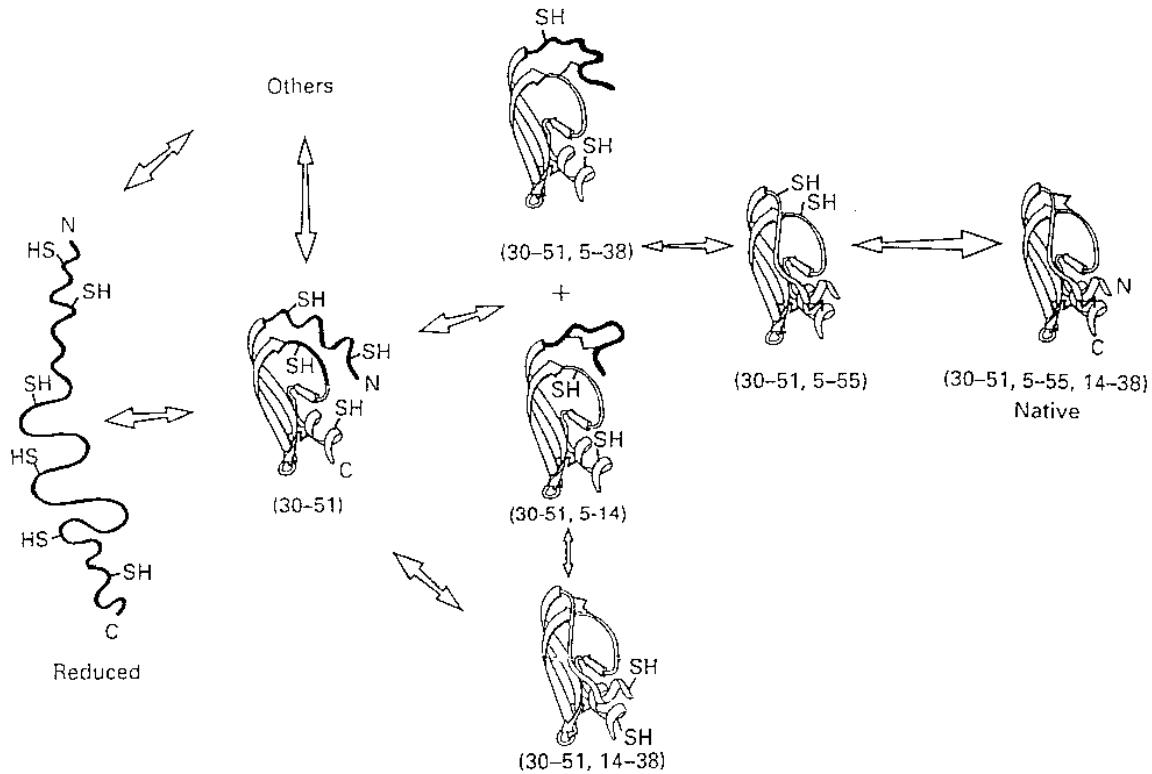
- Diszulfidos felgombolyodási kinetika:



- ◆ A redukált BPTI denaturálószer nélkül is csaknem teljesen legombolyodott
- ◆ A felgombolyodás során legalább 8 különböző diszulfidos forma lép fel (elvben 74 lehetne!)
- ◆ Komplex kinetika

- ◆ Két nemnatív diszulfidos forma: (30–51,5–14) és (30–51,5–38)
- ◆ Egy nagyon lassú szakasz: a (30–51,5–55) kialakulása a nemnatív formákból
- ◆ Egy zsákutca: (5–55,14–38)

Szerkezeti háttér (egyéb mérések segítségével)



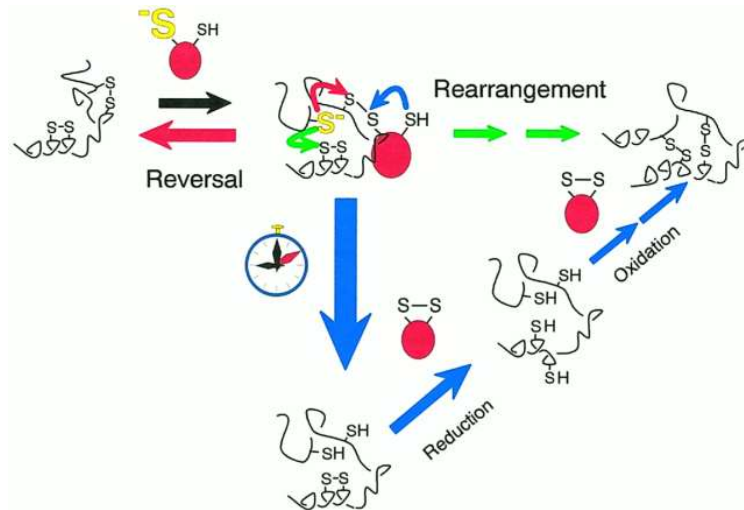
- Legkorábbi szakasz: véletlenszerű diszulfidhidak, a láncban vett távolságuknak megfelelő valószínűséggel
- A natív szerkezet felé haladás irányítja a diszulfidhidak kialakulását
- Bonyodalmak:
 - ◆ Kvázinatív szerkezetek
 - ◆ Kinetikus gátak
- Kvázinatív szerkezet: eltemetődött két Cys, anélkül, hogy köztük létrejött volna a diszulfidhid. Itt: (30–51,14–38): az 5 és 55 eltemetődött. Mivel eltemetődve nem tud oxidálódni, előbb részlegesen le kell gombolyodnia
- Kinetikus gátak: natív szerkezethez vezető, eltemetett diszulfidhid létrejötte nehéz, mert a kémiai reakció az eltemetődéshez és a natív szerkezet kialakulásához csatolt; nagy az energiagát. Itt: az 5–55 létrejötte a 30–51-es mellett
- A nemnatív formák szerepe?
 - ◆ Korábban bajnak gondolták, igyekeztek jelentéktelennek minősíteni
 - ◆ Ma tudjuk: a (30–51,5–14) és (30–51,5–38) formák részlegesen felgombolyodtak, a nemnatív diszulfidhidak a flexibilis részben jönnek létre
 - ◆ Szerepük döntő fontosságú: az 5–55 natív diszulfidhid ezekből jön létre *átrendeződéssel!*

A kinetikus intermedierek szerepének és fontosságának meghatározása

- BPTI: Weissman és Kim szerint a (30–51,14–38) intermedier a legfontosabb, mert nagy mennyiségben halmozódik fel. A két nemnatív intermedier lényegtelen melléktermék
- Creighton szerint: épp fordítva van! Két szempont:
 - ◆ A molekulák mekkora része megy át az adott formán?
 - ◆ Milyen mértékben lassul le a reakció, ha az adott forma nem jöhet létre?
- Kísérleti eredmény: ha a 14-et vagy a 38-at (nem mindkettőt) blokkoljuk vagy mutáljuk, akkor nem változik meg lényegesen a mechanizmus és az időskála
- A (30–51,14–38) csak azért halmozódik fel, mert stabil kvázinatív állapotban van, kinetikus csapdába ejtve
- Ezzel szemben a nemnatív formák szerepe döntő, bár kis mennyiségben jelennek meg

Protein diszulfid izomeráz

- Endoplazmatikus retikulumban (ER) található, ide kerülnek a membrán- és a szekretált fehérjék (ezekben van diszulfidhíd)
- GSH–GSSG arány itt 1:1 v. 3:1 körüli, oxidálóbb a citoplazmánál
- Tioredoxin doménekből áll, aktív hely: CGHC
- diszulfid-átrendeződéseket katalizál:



- kovalensen kötődik a fehérjéhez, majd háromféleképpen mehet tovább a folyamat:
 - ♦ **piros:** visszaalakulhat az eredeti diszulfidhíd
 - ♦ **zöld:** intramolekuláris átrendeződések: reaktívabb diszulfidok kevésbé reaktívakkal cserélődnek fel
 - ♦ **kék:** a PDI oxidálódva leválik, majd valahol másutt oxidál (egy idő múlva, ha a másik két útvonal nem megy, ez következik be, így nem maradhat rajta az enzim a fehérjén)
- Chaperon funkciója is van: aggregációt gátol (lefedve a hidrofób felszíneket)
- Antichaperon funkció: bizonyos körülmények között (redukáló közeg, kis koncentráció) aggregációt segít elő (ez in vivo reverzibilis lehet és pl. a degradációtól való védelmet szolgálhatja)