

A rácsmo­dell. Szabadenergia–felületek.

1. A spinüveg–mo­dell
 2. A rácsmo­del­lek típusai
 3. A rácsmo­del­lek előnye­i és hátrányai
 4. A rácsmo­del­lek ele­m­ze­se
 5. Egyszerű rácsmo­del­lek
 6. Rácsmo­del­lek natív állapota­i
 7. Oldalláncok
 8. Rácsmo­del­lek felgombolyí­ta­sa
 9. Szabadenergia–felületek
 10. A rácsmo­del­lek kö­vet­ke­z­te­te­sei
-

A spinüveg–mo­dell

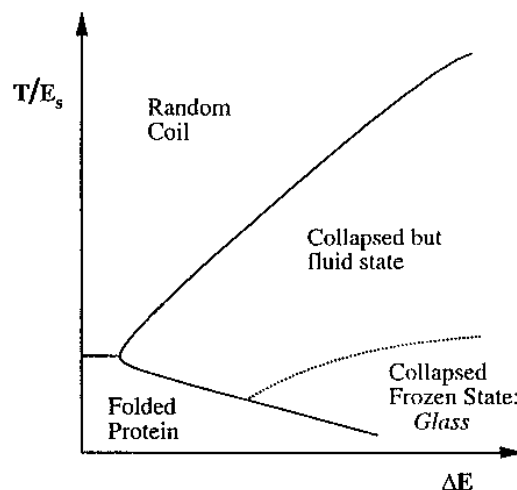
(Bryngelson és Wolynes 1987)

- Megfigye­lés: a fehé­rjék bonyolultan visel­ke­dnek:
 - ◆ Egyes fehé­rjék fá­zis­átalaku­lás–sze­rűen, éles átme­netben gombolyodnak fel, mások köztes állapota­kkal (félregombolyodott állapota­k, olvad­ta­k gombócok).
 - ◆ A felgombolyodás kinetika­ja kom­plex, multiexponen­ciális, időben sok nagyságren­det ölel fel. A lassú felgombolyodás sok lokális energiame­nimum jelenléte­re utal.
 - ◆ Előfordul irreverzibilis denaturáció, a fehé­rjék "öregede­se".
- Minde­z em­lé­ke­z­tet az **üvegek** tulajdonsága­ira
- **Spinüveg**: Mágneses spinekből álló rendszer, véletlensze­rűen elosztott ferromágneses (spineket párhuzamosan beállítani igye­kvő) és antiferromágneses (spineket ellentéte­sen beállítani igye­kvő) kölcsönhatásokkal
- A spinüvegek jellemzői:
 - ◆ Bonyolult, sok lokális minimummal rendelke­ző energiafüggvény
 - ◆ *Frusztráció*: A kölcsönhatások csatoltsága miatt nem lehet mindegyik kölcsönhatást egyszerre kielégíteni. (Pl. három spinből álló rendszer, mindegyik pár között antiferromágneses kapcsolattal.)
 - ◆ **Üvegátme­netek**. A hőmérséklet csökkenésekor a rendszer valamelyik lokális energiame­nimumba befagy. Hogy melyikbe, az a rendszer előtörténetétől, ill. részben a véletlentől függ.
- Bryngelson és Wolynes mo­dellje: A fehé­rje energiafüggvénye (egyszerűsített mo­delle­re értelmezve):

$$E = -\sum_i \epsilon_i(\alpha_i) - \sum_i J_{i,i+1}(\alpha_i, \alpha_{i+1}) - \sum_{i,j} K_{i,j}(\alpha_i, \alpha_j, r_i, r_j).$$

ahol $\epsilon_i(\alpha_i)$ az alfa állapotban lévő, i -edik aminosav saját energiája, $J_{i,i+1}(\alpha_i, \alpha_{i+1})$ két szomszédos aminosav kölcsönhatása (lokális kölcsönhatás), $K_{i,j}(\alpha_i, \alpha_j, r_i, r_j)$ a távol lévő i . és j . aminosav (nemlokális) kölcsönhatása, amely a helykoordinátáiktól is függ. Ez matematikailag egy spinüveg energiafüggvénye.

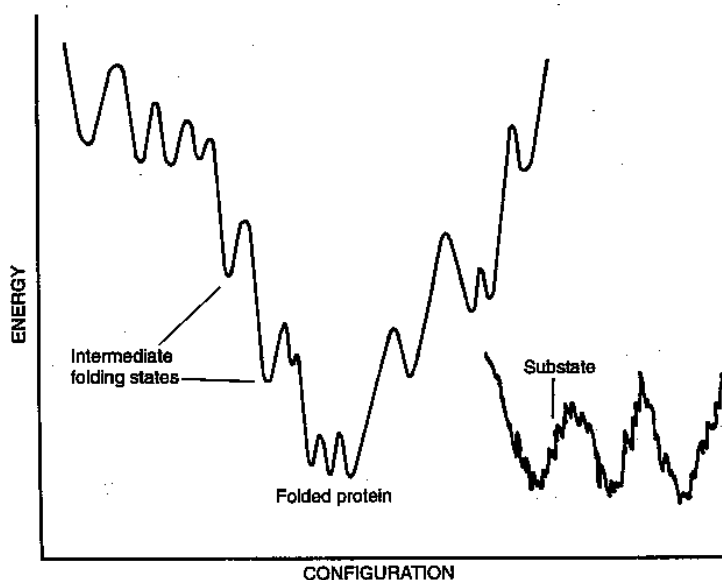
- Az ele­m­ze­sből adódik a **fehé­rjék fá­zis­diagramja**:



ΔE : az energiafelület hegehupássága, T : hőmérséklet, E_s : stabilitási hézag: a natívközeli és attól távoli állapotok közötti energiakülönbség

A fázisdiagramon szerepel a teljesen legombolyodott állapot (random coil), a felgombolyodott állapot, valamint az összeesett, de képlékeny állapot (egyfajta olvadt gombóc). Alacsony hőmérsékleten, nagy hegehupásság esetén fellép egy negyedik állapot: üvegszerűen befagyott állapot.

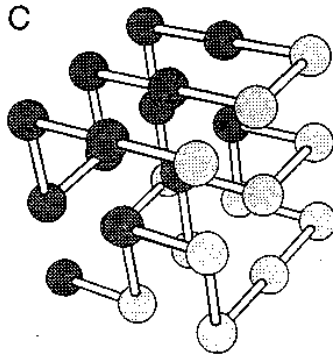
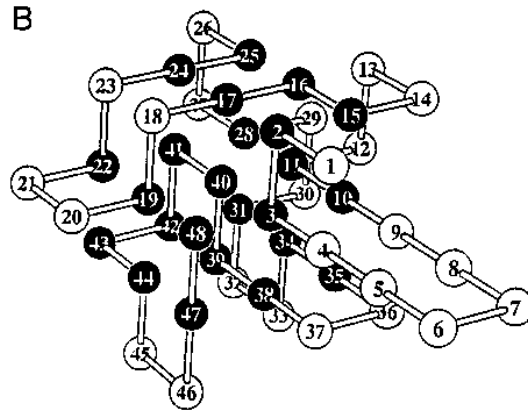
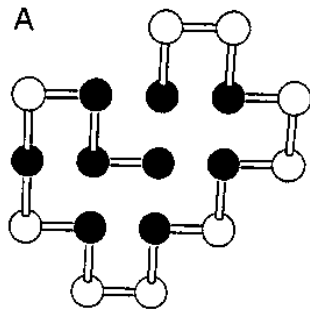
- Az üvegállapot kísérletek szerint számos fehérjénél fellép 200 K körüli hőmérsékleten (a konformációs fluktuációk jellege megváltozik).
- **Frusztráció a fehérjékben:** számos kölcsönhatásnak (hidrofób kontaktusok, hidrogénkötések, stb.) kellene egyszerre létrejönni, ami lehetetlen.
- **Minimális frusztráció elve** (Bryngelson és Wolynes): a natív állapot az, amelyik minimális mértékben frusztrált. A szekvenciaterben értelmezve: a minimálisan frusztrált szekvenciák képesek jóldefiniált natív szerkezetet felvenni.
- **Az energiafelület hegehupássága:** A fehérjék egyszerre mutatják az egyszerű rendszerek és a komplex, spinüveg-szerű rendszerek tulajdonságait. Magyarázat: a felgombolyodásképes fehérjék energiafelületén a lokális minimumok nem véletlenszerűen helyezkednek el, mint a spinüvegeknél általában, hanem egy **durva oldalú tölcséert** képeznek, amely viszonylag hatékonyan vezérli a rendszert a natív állapotnak megfelelő minimum felé.



- Ez a kép alapozta meg a felgombolyodás "új szemléletét", s ez inspirálta a 90-es évek elejétől a rácsmoделlek kifejlesztését.

A rácsmoделlek típusai

Rácsmoделl: "önelkerülő" gyöngysor, rácspontokon



A: 2D HP modell, B: 3D HP modell, C: Perturbált heteropolimer modell, kétbetűs kóddal

• **HP modell** (Hidrofób–Poláros) [Ken A. Dill és mások]

- ◆ *Kétféle aminosav*: Hidrofób és Poláros (kétbetűs kód)
- ◆ *2D és 3D modellek*. Eredményeik hasonlóak; a 2D modellek könnyebben számíthatóak. Hidrofób maggal rendelkező modell 2d-ben 16, 3D-ben 64 aminosavból készíthető.
- ◆ Egyparaméteres: *epsilon* kontaktenergia (a HH kontaktus energiája)
- ◆ A kontaktusok energiája:

$$(E_{HH}, E_{HP}, E_{PP}) = (-\epsilon, 0, 0)$$

• **Perturbált heteropolimer modellek** [Eugene I. Shakhnovich és mások]

- ◆ Erős vonzás a monomerek között, gyenge variációval
- ◆ Többnyire 27–mer, alapállapota 3x3x3-as kockán (103 346 lehetséges állapot)
- ◆ Két változat:
 - ◇ Független kontaktenergiák: $E(i,j) = B_{i,j}$
 - ◇ Kétbetűs kód: A,B. Ált. $E_{AB} > E_{AA}, E_{BB}$. (Ált. nem mag–felszín szeparációhoz, hanem jobb–bal elkülönüléshez vezet.)
- ◆ Bíráló Dilltől: nem elég jó modell (valódi fehérjékre nem teljesülnek a felsorolt tulajdonságok)



Ken Dill (UCSF)



Eugene Shakhnovich (Harvard)

A rácsmoellek előnyeik és hátrányai

Előnyök

- Szekvenciátér és konformációtér teljességében felderíthető
- Egzaktul kiszámítható mennyiségek! (Jobb az egyszerű, de egzaktul számolható moell, mint a bonyolult, de csak közelítőleg számítható.)
- Nem csak fehérjékre vonatkoztatható
- Használható analitikus elméletek tesztelésére (mint spinüveg–moell, átlagtér–elméletek)
- Használható konformációkereső algoritmusok tesztelésére

Hátrányok

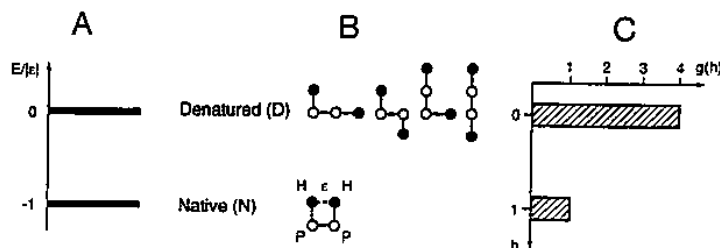
- Az atomi felbontás hiánya
- A szerkezeti és energetikai részletek nem pontosak
- A lánc sokszor irreálisan rövid

A rácsmoellek elemzése

- **Enumeráció:** a moell összes lehetséges állapotának előállítása, megszámlálása és jellemzése. Kisebb moelleknél járható.
- **Monte Carlo mintavétel:** Monte Carlo módszerrel (véletlenszerű generálás) véletlen állapotok előállítása, ebből statisztikai számítás. Nagyobb moelleknél. (Hibalehetőségek vannak, pl. rossz becslésekből.)
- **A natív állapot megkeresése:** Kisebb moelleknél az összes lehetséges állapot végigpróbálásával, nagyobbaknál becslés speciális algoritmusokkal. A HP moellek alapállapotának megkeresése ún. *NP–nehéz feladat* (a megoldáshoz szükséges idő a lánc hosszának nem polinomiális [hanem annál gyorsabban növekvő] függvénye).

Egyszerű rácsmoellek

Négytagú játékmóell



A: energiaszintek, B: állapotok, C: h kontaktushoz tartozó állapotok száma, $g(h)$

- Legegyszerűbb 2D HP rácsmoell, szekvencia: HPPH

- h db kontaktusnál az energia $-h$ epszilón
- Termodinamikai jellemzés:

Négytagú játékmmodell

Állapotösszeg:

$$Q = \sum_{h=0}^{h_N} g(h) e^{-\beta \epsilon h} = 4 + e^{-\epsilon/kT}$$

A natív állapot valószínűsége:

$$P_N(T) = \frac{e^{-h_N \epsilon/kT}}{Q} = \frac{e^{-\epsilon/kT}}{4 + e^{-\epsilon/kT}}$$

a denaturálté

$$P_D(T) = 1 - P_N(T) = \frac{4}{4 + e^{-\epsilon/kT}}$$

A felgombolyodás szabadenergiája:

$$\Delta G_{fold} = -kT \ln \left(\frac{P_N}{P_D} \right) = \epsilon + kT \ln 4$$

továbbá

$$\Delta H_{fold} = \epsilon, \quad \Delta S_{fold} = -k \ln 4.$$

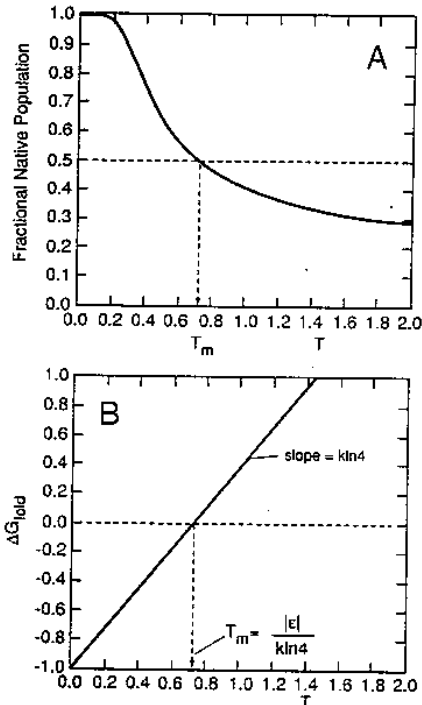
Az egy molekulára eső energia:

$$U \equiv \langle \epsilon h \rangle = \frac{1}{Q} \sum_{h=0}^{h_N} g(h) \epsilon h e^{-\beta \epsilon h} = \frac{\epsilon e^{-\epsilon/kT}}{4 + e^{-\epsilon/kT}}$$

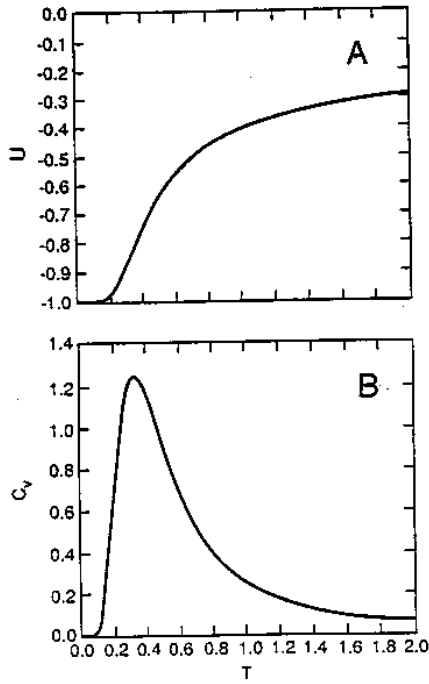
A hőkapacitás:

$$C_V \equiv \left(\frac{\partial U}{\partial T} \right)_V = \frac{\epsilon^2}{kT^2} (\langle h^2 \rangle - \langle h \rangle^2) = \frac{\epsilon^2}{kT^2} \frac{4e^{-\epsilon/kT}}{[4 + e^{-\epsilon/kT}]^2}$$

- A paraméterek hőmérsékletfüggése:

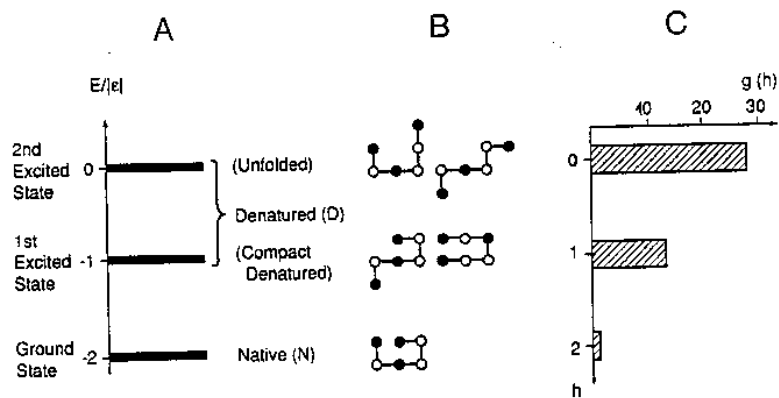


A: Natív populáció részaránya, B: deltaG felgombolyodási szabadentalpia. T_m olvadáspontnál a natívhányad 50%, a szabadentalpia nulla. A szabadentalpia-függvény lineáris (valódi fehérjéknél görbült)



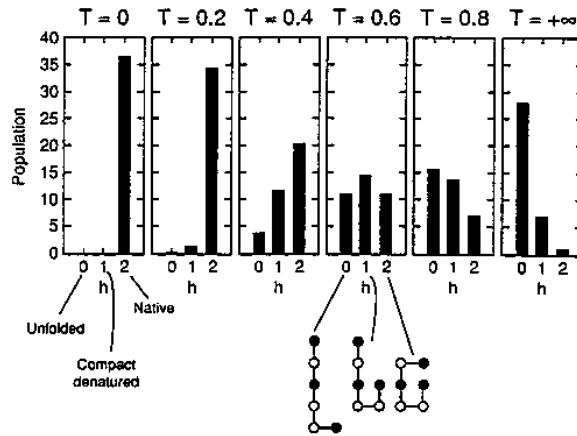
- A: energia, B: hőkapacitás. A hőkapacitás-görbe jellegzetes átmeneti csúcsot mutat
- Már ez a legegyszerűbb modell is mutatja a fehérjék egyes termodinamikai tulajdonságait

Hattagú játékmodell

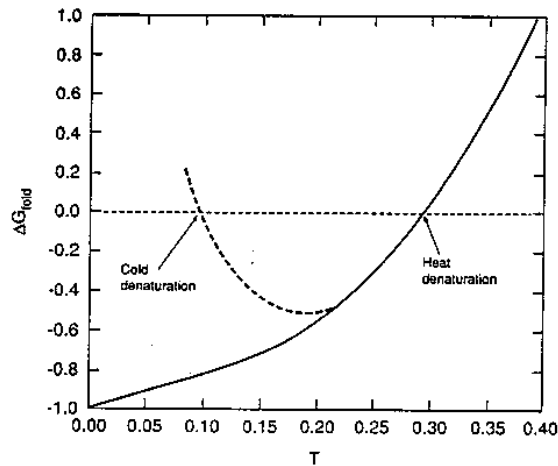


A: energiaszintek, B: néhány állapot (nem az összes!), C: állapotsűrűség-függvény

- Hattagú 2D HP modell, szekvencia: HPHPPH
- Termodinamikai elemzés: mint a négytagúnál
- Három energiaszint: három állapot
- Populációeloszlások a hőmérséklet függvényében:



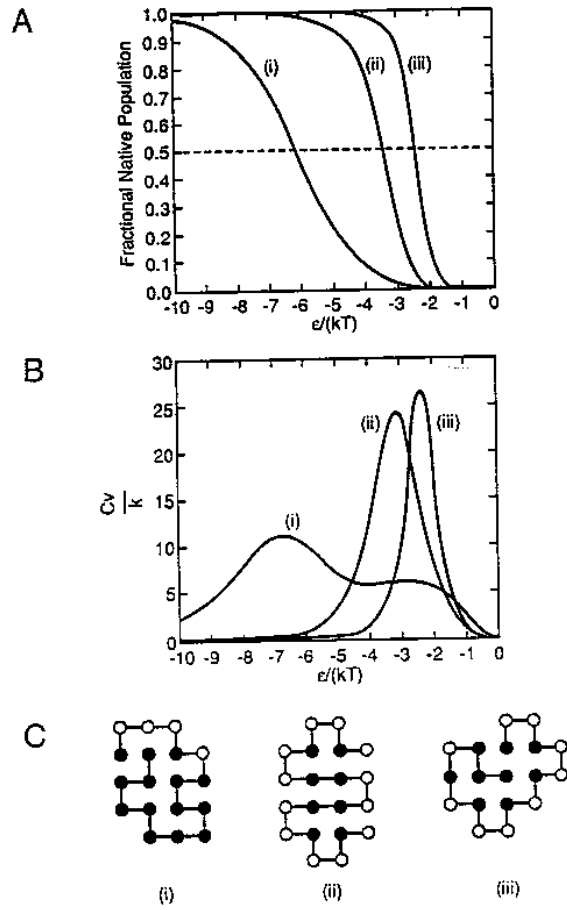
- A populáció a tisztán natív állapotból indulva a köztes állapoton át folyamatosan áttolódik a denaturált állapotra
- Felgombolyodási szabadentalpia a hőmérséklet függvényében:



- Az intermedier állapot miatt már nem lineáris, hanem görbül, mint a valódi fehérjéknél. Ha epszilont hőmérsékletfüggővé tesszük (a hőmérséklet csökkenésével csökken, akárcsak a hidrofób kölcsönhatás), a szaggatott vonallal jelzett görbét kapjuk. Ez mutatja a valódi fehérjékre jellemző, parabolászerű görbét, a hidegdenaturációval.
- Egy egyszerű hattagú modell már a fehérjék szabadentalpia-görbéjét is jól modellezi

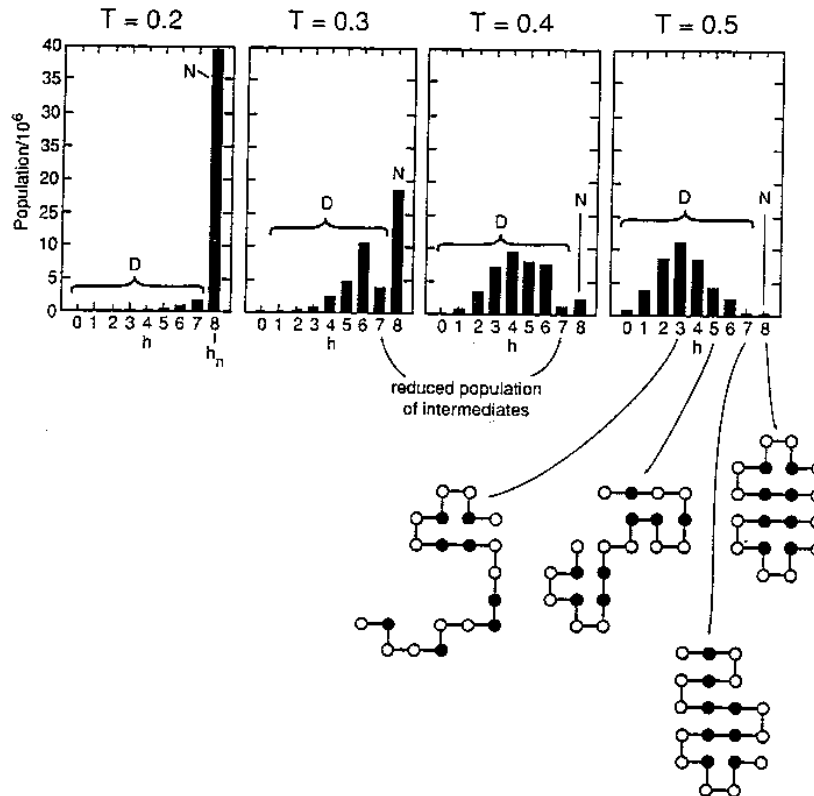
Húsztágú modellek

A szekvenciától függően sokféle viselkedés:



A: natív részarány, B: hőkapacitás, ϵ/kT függvényében, C: a modellek natív állapotai (legmélyebb energiaszint)

- ϵ a hidrofób kölcsönhatás erősségét jellemzi, ϵ/kT a denaturálószer-koncentrációnak feleltethető meg
- (ii) és (iii) fehérjék éles átmenetet mutatnak, (i) kétcsúcsú, széles átmenet: kétdoménés fehérje
- A (ii) modell populációeloszlása a hőmérséklet függvényében:

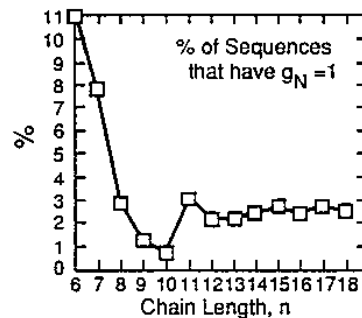


T=0,3-nál és T=0,4-nél a natív (N) és denaturált (D) populációk jelentősek, köztük jelentéktelenebb populáltságú köztes állapottal (az eloszlásnak minimuma van). Ez a **kétállapotú kooperativitás**.

- Egy húsztágú modell már kétállapotú kooperativitást képes mutatni, mint a valódi fehérjék
- A modell natív állapota egy béta-lemezt és két hélixet tartalmaz, hidrofób maggal, poláros felszínnel

Rácsmodellek natív állapotai

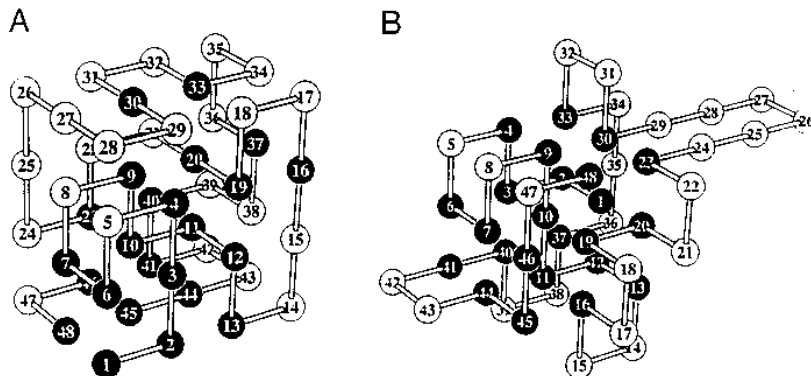
- Nem minden HP szekvenciának van egyetlen natív állapota (egyetlen natív állapot: $g_N=1$)
- Adott hosszúságú HP szekvenciák közül az egyetlen natív állapottal rendelkezők százalékos aránya:



A 10-nél hosszabb szekvenciáknak csak mintegy 2–3%–a rendelkezik egyetlen natív állapottal. Tehát igen speciális szekvenciákról van szó.

Egyetlen natív állapottal rendelkező szekvenciák tervezése

- Adott térszerkezethez könnyű olyan szekvenciát tervezni, amelynek a térszerkezet alacsony energiájú állapota
- Jóval nehezebb viszont biztosítani, hogy az adott szekvencia ne vehessen fel más, szintén alacsony vagy még alacsonyabb energiájú állapotot. Ez a *negatív tervezés*.
- Példa:



A: Shakhovichék tervezte szekvencia a képen látható térszerkezetre. Monte Carlo módszerrel dolgozva csak a maximálisan kompakt (kocka formájú) állapotokat vizsgálták

B: Dillék a saját kereső algoritmusukkal kimutatták, hogy az adott szekvenciának van egy még alacsonyabb energiájú állapota, ami viszont nem maximálisan kompakt

- 20 aminosav esetén az egyetlen natív állapotot könnyebb megvalósítani, mint 2-nél

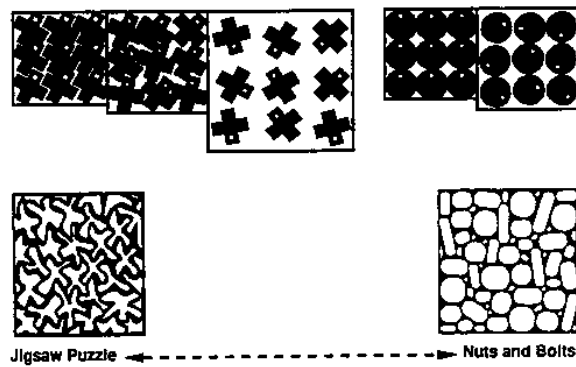
Oldalláncok

Mi az oldalláncok szerepe a natív szerkezet specificitásának meghatározásában?

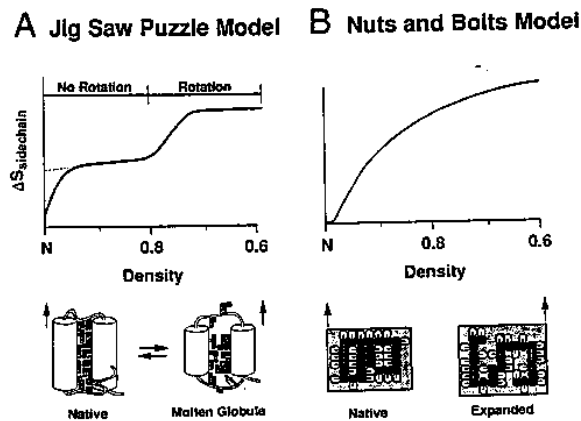
- **Puzzle-modell:** A natív térszerkezetet az tünteti ki, hogy az oldalláncok pontosan illeszkednek, mint egy puzzle darabjai. Az olvadt gömbök állapot lényege az, hogy már kész a szerkezet, csak még az oldalláncok összeilleszkedése

hiányzik

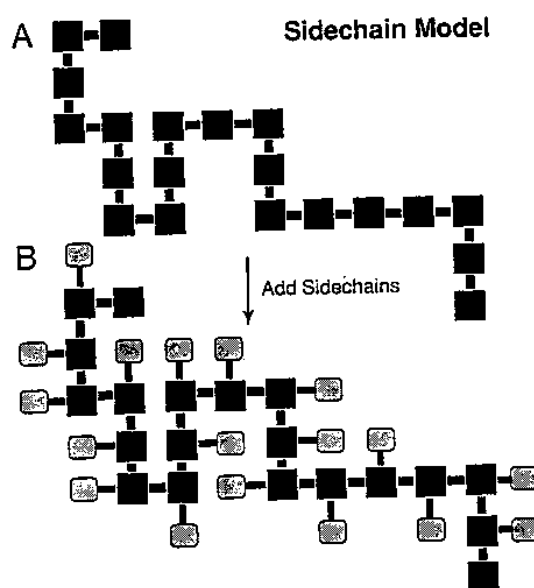
- **Csavarok és anyák modell:** Az oldalláncok nem kirakós játékok részeként illeszkednek, hanem úgy töltik ki a teret, mint egy dobozban egy rakás csavar és anya, vagyis nem specifikusan; átrendeződések lehetségesek
- Illusztráció:



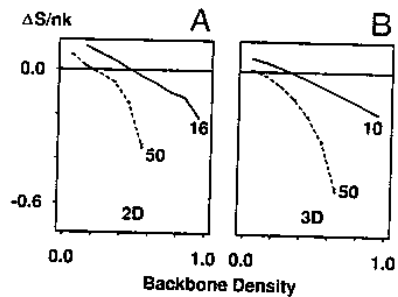
- *Melyik modell igaz?* Shakhnovichék szerint a puzzle, Dillék szerint a "csavarok és anyák"
- **Eldöntés:** Hogyan függ az oldalláncok entrópiájáruléka a kompaktságtól?
 - ♦ **Puzzle-modell:** A molekulát tágítva a szoros illeszkedés miatt jó ideig semmi sem történik, majd egy ponton ugrásszerűen megnő az oldalláncok rotációs szabadsága
 - ♦ **Csavarok és anyák:** Tágításkor folyamatosan nő az oldalláncok rotációs szabadsága, nincs ugrásszerű változás



- Kísérleti adatok mindkét modell mellett és ellen felhozhatóak
- Vizsgálat rácsmodellel: **oldalláncokkal bővített rácsmodell**



- Ezekkel dolgozva az oldalláncok entrópiájáruléka a kompaktság függvényében:

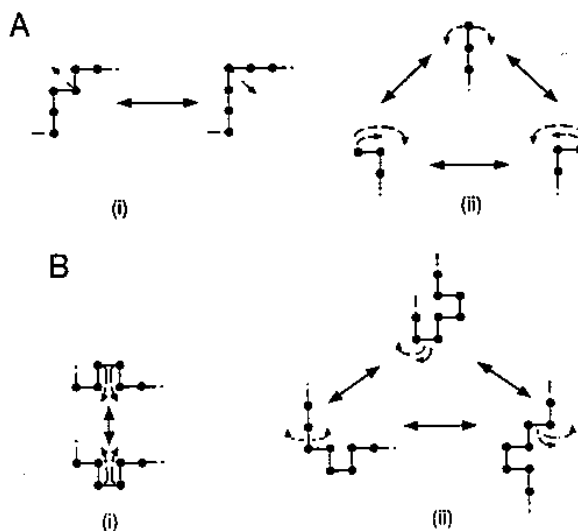


A: 16 és 50 tagú 2D HP modellek, B: 10 és 50 tagú 3D HP modellek

- **Eredmény:** A kompaktság növelésével rohamosan csökken az entrópia, befagynak az oldalláncok. Az oldalláncok és a gerinc szabadsági fokai erősen csatoltak; csak az oldalláncaiban megolvadt gombóc nem képzelhető el. Ez a "csavarok és anyák" modellt támasztja alá.

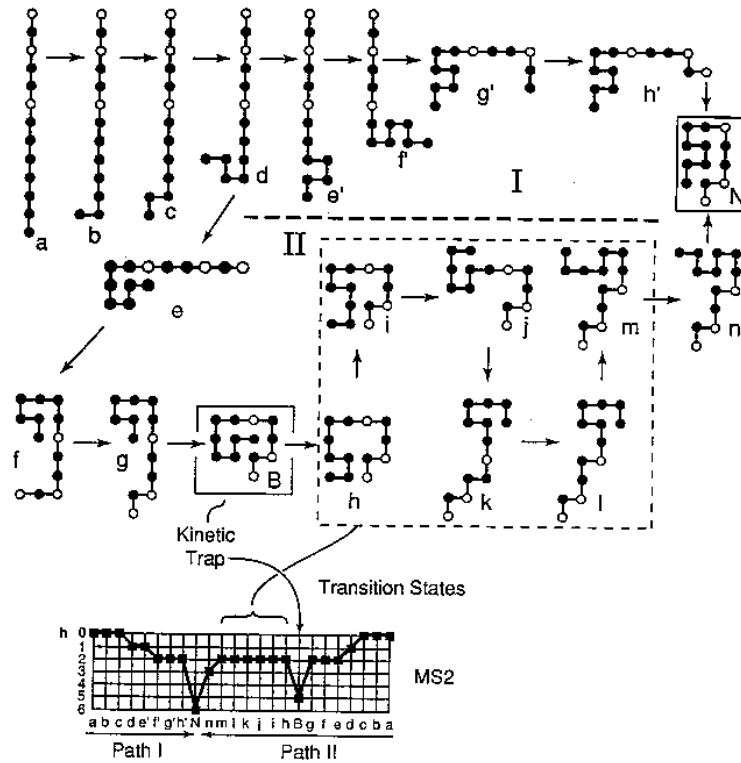
Rácsmodellek felgombolyítása

- Dinamika vizsgálatához (pl. Monte Carlo szimuláció) definiálnunk kell a konformációk közötti lehetséges átmenetek módozatait: **mozgáskészletek**.

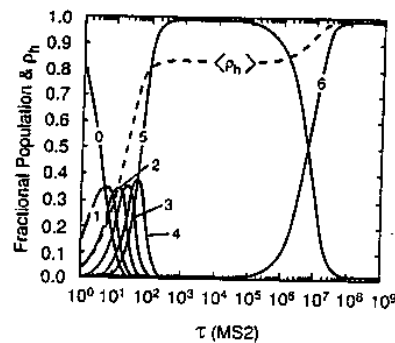


Kétféle Monte Carlo mozgáskészlet

- Ennek alapján egy 13 tagú 2D HP modell felgombolyodása:



- Két útvonal, egy gyors és egy lassú. A lassú útvonalon kinetikus csapda (lokális energiaminimum) van.
- Ez az egyszerű modell is komplex felgombolyodási kinetikát mutat (a lizozimhez hasonló)
- Monte Carlo szimulációval a populációk időfüggése:



A számok az adott állapotban meglévő HH kontaktusok számát jelentik. Szaggatott vonal: meglévő hidrofób kontaktusok részaránya a natívhoz képest.

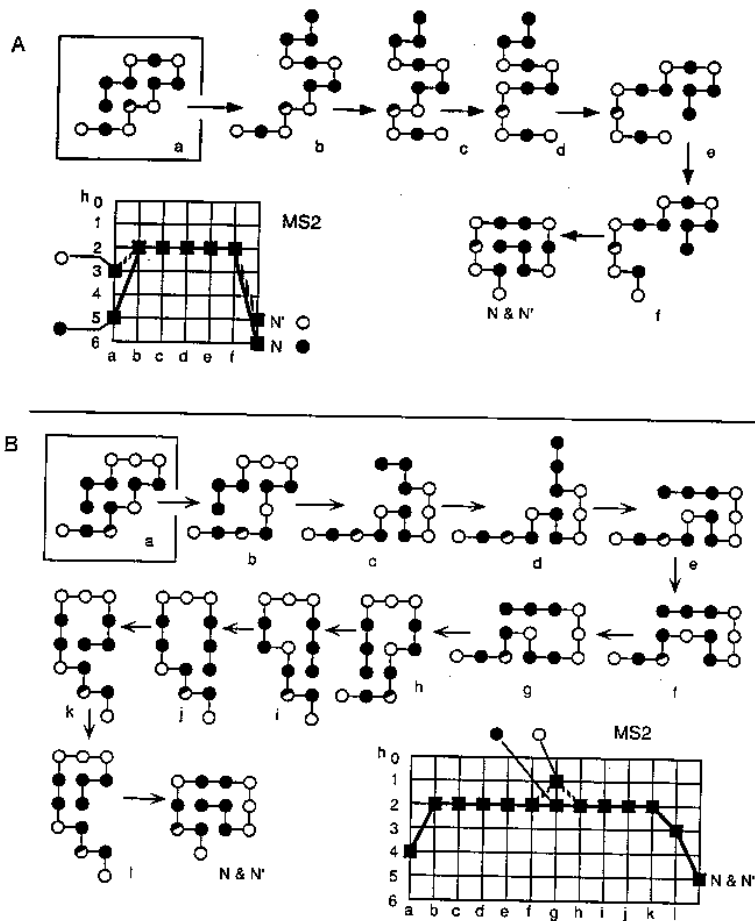
Gyors hidrofób kollapszus (5 kontaktus gyors kialakulása), majd 5 nagyságrenddel hosszab időskálán lassú átrendeződés a natív állapotba.

- Jól mutatja a valódi fehérjéknél megfigyelt sajátosságokat

Mutációk hatása a felgombolyodásra

Hogyan hat egy H→P mutáció a felgombolyodás sebességére?

Két azonos natív szerkezetű, csak egy elemben eltérő HP modellben mutációt végzünk (az eltérő elemtől távol):



- A: A mutáció gyorsítja a felgombolyodást, mert a felgombolyodás útvonalán a vad típusban fel kell szakítani egy HH kötést, a mutánsban viszont nem.
- B: A mutáció lassítja a felgombolyodást, mert a felgombolyodás útvonalán a vad típusban a H segít felbontani egy nemnatív HH kontaktust, a mutánsban a P ezt nem tudja megtenni, nő az energiagát nagysága.

Tehát ugyanolyan típusú mutáció lassíthatja vagy gyorsíthatja is a felgombolyodást, ahogy a valódi fehérjéknél is.

Szabadenergia-felületek

Rácsmodellek Monte Carlo szimulációiból számítható a szabadenergia:

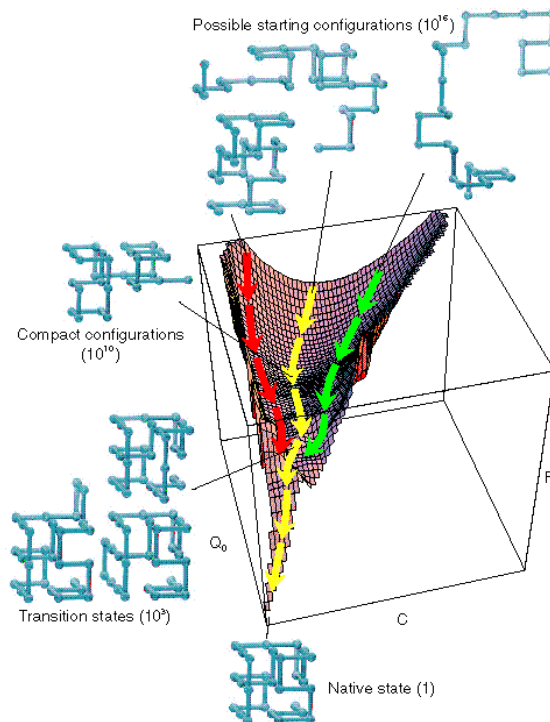
$$F = E - TS$$

ahol E az energia (a kontaktusok számából), S az entrópia (az adott energiájú állapotok számából számítható).

A szabadenergiát megfelelő mennyiségek mint koordináták függvényében ábrázolva szemléletes felületek adódnak. Ilyen mennyiségek pl.:

- C: az összes kontaktusok száma
- Q₀: a natív kontaktusok száma (olyan kontaktus, ami a natív szerkezetben is megvan)

Egy 27 elemű rácsmodell szabadenergia-felülete

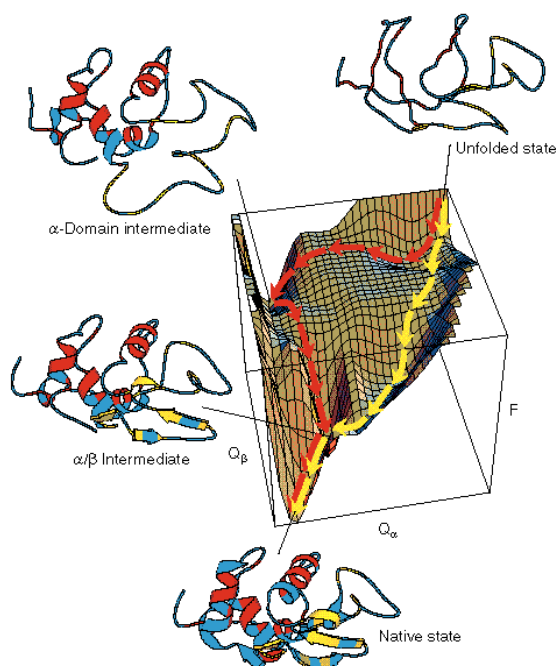


A szimuláció menete ezen a felületen szemléltethető:

- A szimuláció random szerkezetből indul (kevés kontaktus): hozzáférhető állapotok száma kb. 10^{16}
- Gyorsan összeesik egy kompakt szerkezetté, mely a lehetséges kontaktusok 60%–át tartalmazza, de a 60%–nak csak 25%–a natív kontaktus. A hozzáférhető állapotok száma kb. 10^{10} .
- Itt egy széles minimum van a szabadenergiában
- Ezután lassú folyamat következik: a lánc keresi a natív állapot felé vezető átmeneti állapotot
- Átmeneti állapotok száma 10^3
- Az átmeneti állapotból gyorsan betalál a natívba (1 állapot)
- Zöld, piros: lehetséges, különböző útvonalak. Sárga: átlag.

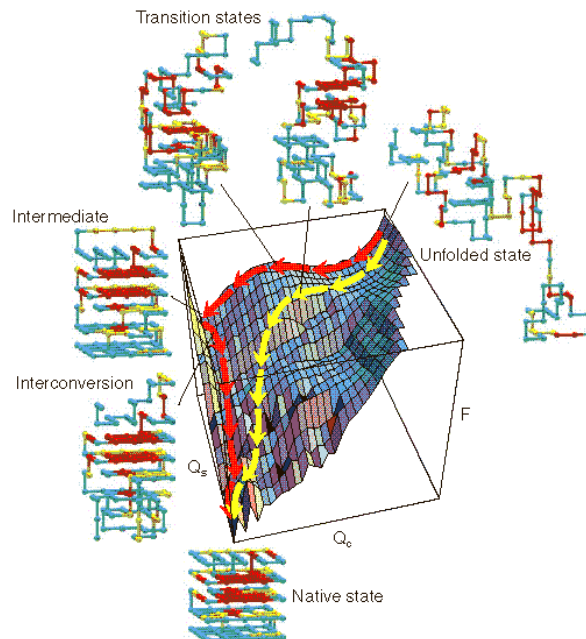
A lizozim szabadenergia–felülete

A lizozim felgombolyodásának menete kísérletből ismert. Ennek alapján szerkeszthető egy hipotetikus energiafelület, melynek koordinátái: Q_{alfa} és $Q_{\text{béta}}$: a natív kontaktusok száma az alfa, ill. béta doménben. A felület:



- A molekulák kb. 20%–a gyorsan felgombolyodik (sárga útvonal, <100 ms időállandó), natívszerű intermediérral
- A molekulák kb. 70%–a jóval lassabban gombolyodik fel (piros útvonal, kb. 400 ms időállandó), olyan intermediérral, amely csak az alfa doménben natívszerű
- A molekulák 10%–a nagyon lassan gombolyodik fel (prolinizomerizáció miatt, ezt nem jelöltük)
- Mindegyik út utolsó lépése a két, már kialakult domén asszociációja

Egy 125 elemű rácsmodell szabadenergia-felülete



- Két mennyiség mint koordináta: Q_c : a belső magban lévő natív kontaktusok (34 darab), Q_s : olyan kontaktusok, amelyek a legfontosabb intermediériben nincsenek benne (15 darab)
- A felgombolyodás menete:
 - ◆ Gyors összeesés, majd lassú keresés
 - ◆ A molekulák 15%–ában gyorsan kialakul a natív mag, majd közvetlenül a natív állapotba jut (sárga útvonal)
 - ◆ A molekulák 40%–a különféle nemnatív kontaktusokat létesít, így egy hosszú élettartamú intermediérré alakul ki (piros útvonal), melyben két szubdomén van, egyikben a natív 5x5x5-ös kocka felső három síkja megvan, a másik a többi részből áll. Mindkét szubdomén eléggé felgombolyodott, de a köztük lévő kapcsolatok nem jöttek létre.
 - ◆ A maradék 45%–ban szintén rosszul kezd felgombolyodni, de gyorsabban áthidalja a dolgot (ezt nem jelöltük)

A rácsmodellek következtetései

(Elsősorban Ken Dill munkái alapján)

- ◆ Bizonyos szekvenciájú rácsmodellek stabil, kompakt állapotokba esnek össze. Ezek számos tekintetben igen hasonlóak a fehérjékhez:
 - ◇ Kompakt, unikális natív szerkezet
 - ◇ Másodlagos és harmadlagos szerkezet
 - ◇ Apoláros mag, poláros felszín
 - ◇ Éles, szigmoidális, kooperatív átmenet
 - ◇ Kétállapotú kooperativitás
 - ◇ Kompakt, komplex denaturált állapotok
 - ◇ Többfázisú felgombolyodási kinetika
- ◆ Szabadenergiafelületek, kinetikus komplexitás jól modellezhető