

A felgombolyodás vizsgálata irányított mutációk segítségével

1. Bevezetés
 2. Elmélet
 1. Reakcióséma és a látszólagos energiakülönbségek
 2. A valódi energiakülönbségek
 3. A globális energiák és az egyedi kölcsönhatások viszonya
 4. Φ értékek
 5. Kétszeres mutációk ciklusai
 6. A felgombolyodás elemzése mutánsok segítségével
 7. A látszólagos energiák mérése
 3. Barnáz
 1. Egyensúlyi kísérletek barnázzal
 2. Kinetikai kísérletek barnázzal
 3. A barnáz felgombolyodása
 4. Értékelés
-

Bevezetés

- "Protein engineering" (fehérjetervezés): hatékony eszköz
 - ◆ viszonylag könnyen megvalósítható (gensebésetben rutinfeladat)
 - ◆ szerkezet–funkció, szerkezet–stabilitás, stb. vizsgálatok
- Felgombolyodásnál
 - ◆ mutánsokat készítünk
 - ◆ ezek felgombolyodását mérjük
 - ◆ mindegyik mutáció az adott pozícióban zajló események próbája
 - ◆ szerkezeti információt ad
 - ◆ energetikai információt ad

Stratégia

1. A térszerkezet alapos vizsgálatával kiválasztjuk azokat az oldalláncokat, amelyek a stabilitásban fontos szerepet játszhatnak
2. Ezeket irányított mutagenezissel módosítjuk
3. Egyensúlyi és kinetikus felgombolyodási kísérleteket végzünk
4. A mért paraméterek alapján felvázoljuk a mutáns és a vad típusú fehérje ún. *szabadentalpia–profilját*
5. Elkészítjük az energiakülönbségek diagramját
6. Levonjuk a következtetéseket az egyes kölcsönhatásokról

A mutációk kiválasztása

- specifikus kölcsönhatást szüntessenek meg
- a szerkezetet a lehető legkevésbé zavarják meg
- térképezzék fel az összes fontos régiót

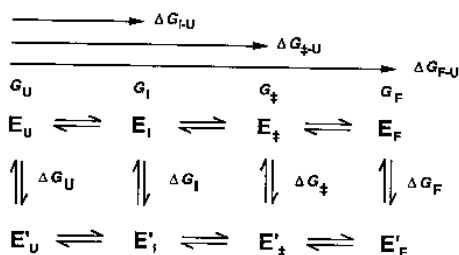
Kerülendő:

- komplex mutációk, melyek több kölcsönhatást befolyásolnak (nehéz értelmezni)
 - "**bomlasztó**", a térszerkezet átrendeződéséhez vezető mutációk (nehéz értelmezni, felgombolyodás útvonalát is befolyásolhatják):
 - ◆ nagy csoport bevitele
 - ◆ új kölcsönhatásokat létesíteni képes csoport bevitele
 - ◆ ellentétes töltésű párral rendelkező eltemetett töltés eltávolítása
 - ◆ nagyméretű csoport eltávolítása
-

Elmélet

Reakcióséma és a látszólagos energiakülönbségek

Egy intermediert (I) és egy átmeneti állapotot (ts, transition state) feltételezve:



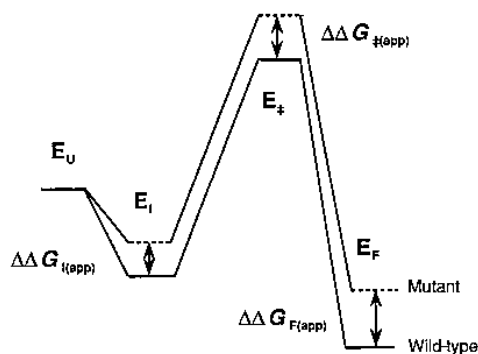
U: legombolyodott, I: intermedier, ++: átmeneti állapot, F: felgombolyodott, vesszős: mutáns

Kísérletileg az ún. **látszólagos stabilizációs energiákat** határozhatjuk meg (szabadentalpia-különbségek változása a mutáció hatására):

$$\begin{aligned}
 \Delta\Delta G_{F-U} &= \Delta G_{F-U} - \Delta G'_{F-U} \\
 \Delta\Delta G_{ts-U} &= \Delta G_{ts-U} - \Delta G'_{ts-U} \\
 \Delta\Delta G_{I-U} &= \Delta G_{I-U} - \Delta G'_{I-U}
 \end{aligned}$$

(Pl. a natív állapot esetében a denaturált állapothoz viszonyított szabadentalpia eltérése a vad és a mutáns között.)

(Az "energia" alatt itt most mindig szabadentalpiát értünk!)



(az U állapotot referenciának vettük, ezért a vad és a mutáns diagramja úgy van egybecsúsztatva, hogy az U szintjeik egybeessenek)

A valódi energiakülönbségek

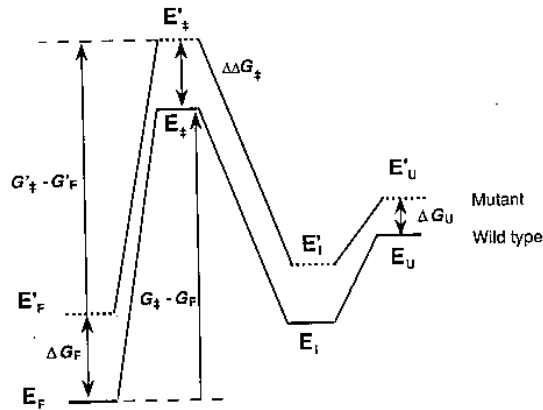
Ami érdekel minket: az egyes állapotok szabadentalpiájának változása a mutáció hatására (ΔG_F , ΔG_{ts} , ΔG_I , ΔG_U , vagyis a **valódi energiakülönbségek**).

(Pl. a natív állapot esetében az állapot szabadentalpiájának változása a mutáció hatására.)

Termodinamikai ciklusokban körbemenve az energiák előjeles összege zérus kell legyen, ezért a fentebbi séma alapján:

$$\begin{aligned}
 \Delta G_F &= \Delta\Delta G_{F-U} + \Delta G_U \\
 \Delta G_{ts} &= \Delta\Delta G_{ts-U} + \Delta G_U \\
 \Delta G_I &= \Delta\Delta G_{I-U} + \Delta G_U
 \end{aligned}$$

Tehát a látszólagos energiák a konstans ΔG_U taggal térnek el a valódiaktól.



(a valódi energiaviszonyok: az U állapotok nincsenek egybecsúsztatva. Vigyázat, itt a legombolyodott állapot bal oldalon van!)

ΔG_U : a legombolyodott állapot szabadentalpiájának megváltozása a mutáció hatására

- Az U állapotot referenciának véve a ΔG_U -t vehetjük mindig 0-nak
- vagy: feltéve, hogy az U szerkezet nélküli, "véletlen gombolyag", ΔG_U a szolvatációs energiából adódik (mérhető vagy a felszín alapján számítható)

Mivel a látszólagos energiák egy konstans taggal térnek el a valódiaktól, egyik állapotból a másikba lépve a látszólagos energiakülönbség változása megegyezik a valódi energiakülönbség-változással!

A globális energiák és az egyedi kölcsönhatások viszonya

A mért (látszólagos) $\Delta\Delta G$ -k a teljes molekulára vonatkozó, **globális** mennyiségek. Hogyan függenek össze az **egyedi** kölcsönhatások energiáival?

A globális G-hez (a molekula teljes szabadentalpiájához) való hozzájárulások két csoport (X és Y) kölcsönhatása esetén:

- X és Y kölcsönhatása egymással
- X és Y kölcsönhatása a fehérje többi részével (E-vel)
- X és Y kölcsönhatása az oldószerrel
- E kölcsönhatása az oldószerrel

Az egyik csoport kicserélésére (X \rightarrow Z) mindezek megváltoznak, továbbá

- a szerkezet átrendeződhet (reorg)

Ezek a mennyiségek pedig eltérőek az U és F állapotban.

Mindent összegezve a stabilizációs szabadentalpia megváltozása az X \rightarrow Z mutáció hatására:

$$\begin{aligned} \Delta\Delta G_{F-U} = & G_{F(X\cdots Y)} + G_{F(X\cdots E)} + G_{F(Y\cdots E)} - G'_{F(Z\cdots Y)} \\ & - G'_{F(Z\cdots E)} - G'_{F(Y\cdots E)} + G_{F(X\cdots H_2O)} + G_{F(Y\cdots H_2O)} \\ & + G_{F(E\cdots H_2O)} - G'_{F(Z\cdots H_2O)} - G'_{F(Y\cdots H_2O)} - G'_{F(E\cdots H_2O)} \\ & - G_{U(X\cdots H_2O)} - G_{U(Y\cdots H_2O)} - G_{U(E\cdots H_2O)} + G'_{U(Z\cdots H_2O)} \\ & + G'_{U(Y\cdots H_2O)} + G'_{U(E\cdots H_2O)} + G_{U(reorg)} - G_{F(reorg)} \end{aligned}$$

(legáltalánosabb eset)

Egyszerűsítések

A fenti egyenlet speciális esetekben egyszerűsíthető:

- **Nem bomlasztó mutáció** esetén: a ΔG_{reorg} tagok kiesnek, Y kölcsönhatásai E-vel és a vízzel ugyanazok a vad és mutáns fehérjében

- Deléción (csoport eltávolítása) a víz számára nem hozzáférhető helyen: oldószeres tagok nagy része kiesik, Z...Y kölcsönhatás kiesik
- Deléción a víz számára hozzáférhető helyen: az X...Y kölcsönhatást víz...Y váltja fel, Z...Y nincs
- Helyettesítés (az eredetivel megegyező méretű csoporttal)
- Izosztérikus helyettesítés (az eredetivel megegyező geometriájú csoporttal, pl. Val→Thr)

(3–4 tagú egyenletek)

ϕ értékek

ϕ : **RELATÍV DESTABILIZÁCIÓ**. Az S (tetszőleges) állapotra (S lehet az U, az I, a ts vagy az F):

$$\phi_S = \Delta\Delta G_{S-U} / \Delta\Delta G_{F-U}$$

0 és 1 közé esik. **Jelentése:** a mutáció mennyire destabilizálja az S állapotot, az F állapot destabilizációjához viszonyítva.

- $\phi=1$: az S állapotot ugyanúgy érinti a mutáció, mint az F-et. Tehát a mutáció által elvett kölcsönhatás S-ben is megvan.
 - ◆ (vagy: nincs meg, de ugyanakkora energiájú másik kölcsönhatás jön létre)
- $\phi=0$: az S állapotot nem érinti a mutáció. Tehát a mutáció által elvett kölcsönhatás S-ben nincs meg.
- $0 < \phi < 1$:
 - ◆ az S állapotban részlegesen van meg a kölcsönhatás, vagy
 - ◆ a molekulák egy részében megvan, más részében nincs

Feltevéssek

A bemutatott elemzés feltételei:

1. A mutáció nem változtatja meg a felgombolyodás útvonalát ($G_{ts, reorg}$ és $G_{I, reorg}$ elhanyagolható)
 2. A mutáció nem változtatja meg jelentősen sem a felgombolyodott, sem a legombolyodott állapot szerkezetét ($G_{F, reorg}$, $G_{U, reorg}$ elhanyagolható)
 3. A vizsgált csoport a felgombolyodás során nem létesít más csoportokkal más kölcsönhatásokat, mint a natív szerkezetben
 4. A legombolyodás ugyanazon az úton történik, mint a felgombolyodás, csak visszafelé [ez némely esetben igazolható]
-

Kétszeres mutációk ciklusai

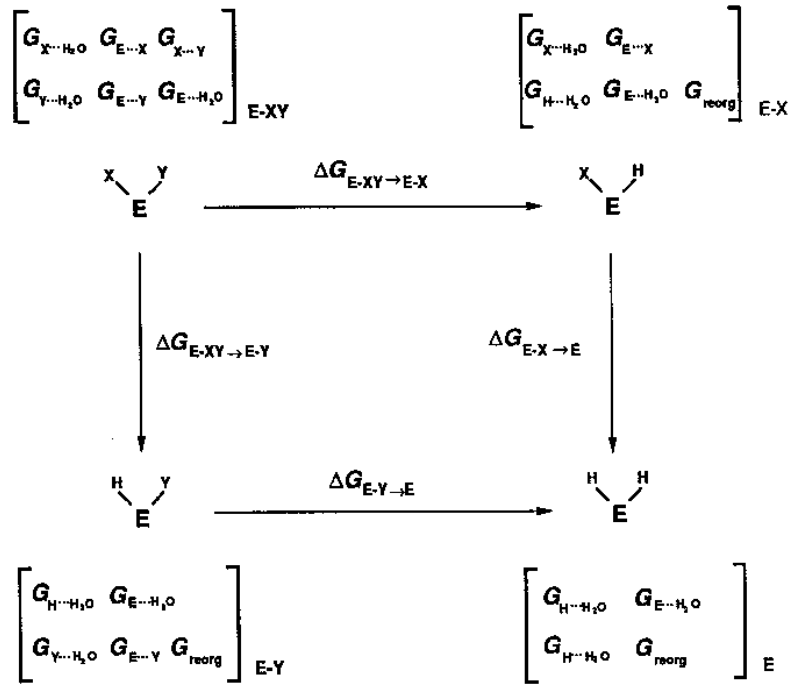
Az egyszeres mutációk problémái:

- Nem derül ki, ha a csoport a felgombolyodás során más csoporttal létesít kölcsönhatást, mint a natív állapotban
- A csoportok kölcsönhatása a fehérje többi részével bonyolítja az elemzést

*Hogyan vizsgálható közvetlenül két csoport kölcsönhatása? **Kettős mutációs ciklussal!***

Négy változatot vizsgálunk:

- vad típus E–XY
- egyszeres mutáns Y-ban: E–X
- egyszeres mutáns X-ben: E–Y
- kettős mutáns: E



(szögletes zárójelben az egyes állapotok szabadentalpiájában szerepet játszó tagok)

Kölcsönhatási energia ($\Delta\Delta G_{int}$): mennyivel módosul az egyik mutáció hatása, ha a másik mutáció is megvan:

$$\Delta\Delta G_{int} = \Delta G_{E \cdots XY \rightarrow E \cdots X} - \Delta G_{E \cdots Y \rightarrow E} = \Delta G_{E \cdots XY \rightarrow E \cdots Y} - \Delta G_{E \cdots X \rightarrow E}$$

Hogy adható meg a kölcsönhatási energiákkal?

Ha a mutáció nem bomlasztó, a reorganizációs tagok elhanyagolhatóak, más tagok kiesnek, így

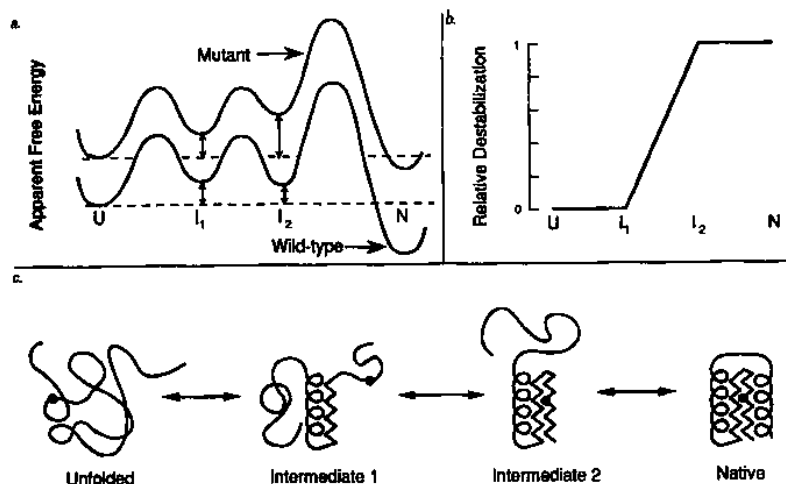
$$\Delta\Delta G_{int} = G_{X \cdots Y} - \Delta G_{X \cdots víz} - \Delta G_{Y \cdots víz}$$

tehát az $X \cdots Y$ kölcsönhatás és a szolvatációs tagok különbsége.

Ha a víz nem fér hozzá a mutált helyhez, akkor $\Delta\Delta G_{int} = G_{X \cdots Y}$! (maga a kölcsönhatási energia!)

- $\Delta\Delta G_{int}$ bármely S állapotra kiszámítható ($\Delta\Delta G_{S,int}$)
- **Relatív kölcsönhatási energia:** $\phi_{S,int} = \Delta\Delta G_{S,int} / \Delta\Delta G_{F,int}$: azt mondja meg, hogy az S állapotban milyen mértékben van meg az adott kölcsönhatás, a felgombolyodott állapothoz képest.
- kiterjeszhető magasabb dimenziókra: hármas mutáns ciklusok, stb. (kölcsönhatások kooperativitásának tesztelése)

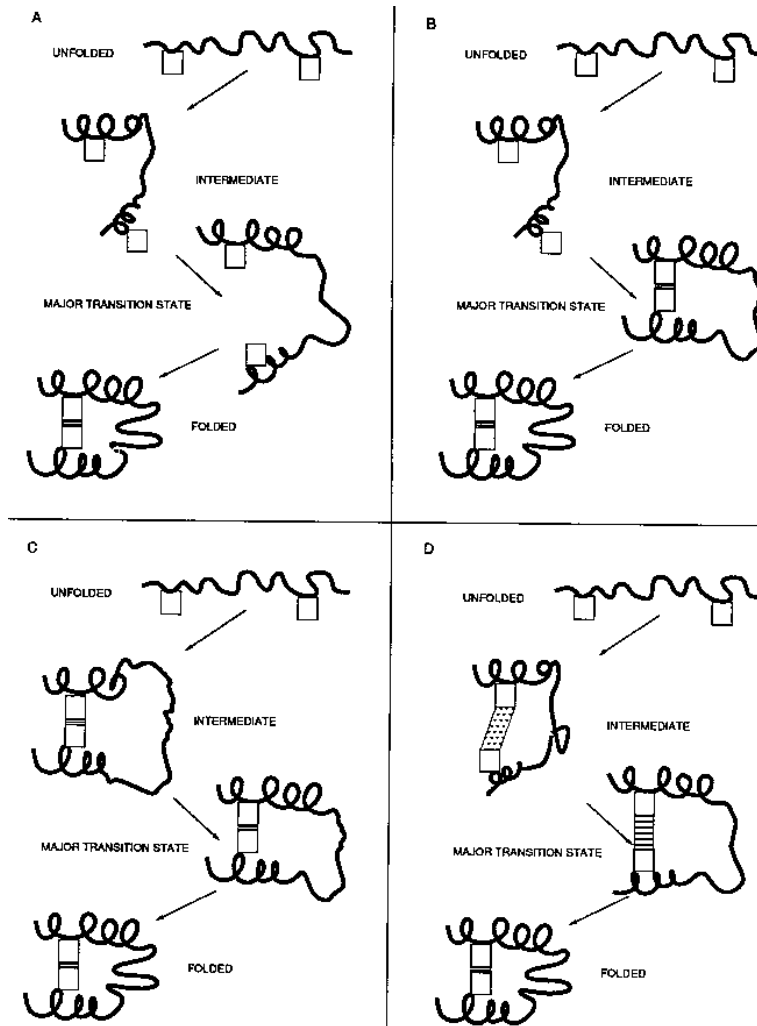
A felgombolyodás elemzése mutánsok segítségével



(a kölcsönhatás az U és I₁ állapotokban nincs meg, az I₂ és N állapotokban megvan)

- Elkészítjük a vad és a mutáns fehérje szabadentalpia–profilját (a)
- Kiszámítjuk az egyes állapotok Φ értékeit (b)
- A Φ –diagramból következtetünk a kölcsönhatás jelenlétére a felgombolyodás folyamatának egyes állomásain

Példák:

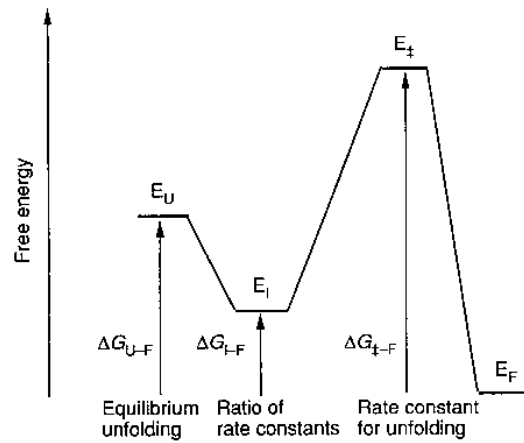


Lehetséges forgatókönyvek (mely fázisban jön létre a kölcsönhatás)

- (a) csak F–ben
- (b) ts–ben
- (c) már I–ben
- (d) I–ben gyengén, ts–ben erősebben, de teljesen csak F–ben

A látszólagos energiák mérése

Hogyan mérjük meg a $\Delta\Delta$ –mennyiségeket?



- A felgombolyodott állapotra vonatkozó látszólagos energia egyensúlyi denaturációból származtatható (vadra és mutánsra)
- Az átmeneti állapotra vonatkozó látszólagos energiák a legombolyodás sebességi állandójából számíthatóak (mutánsra és vadra megmérve)
- Az intermedierekre vonatkozó látszólagos energiák a le- és felgombolyodás sebességi állandóinak hányadosából számíthatóak (mutánsra és vadra megmérve)

$$\Delta\Delta G_{U-ts} = RT \ln \frac{k_u}{k_u'} - \Delta\Delta G_{U-F}$$

$$\Delta\Delta G_{U-I} = RT \ln \frac{k_u k_{-u}'}{k_u' k_{-u}} - \Delta\Delta G_{U-F}$$

(k_u az F-I átmenet, k_{-u} az I-F átmenet sebességi állandója)

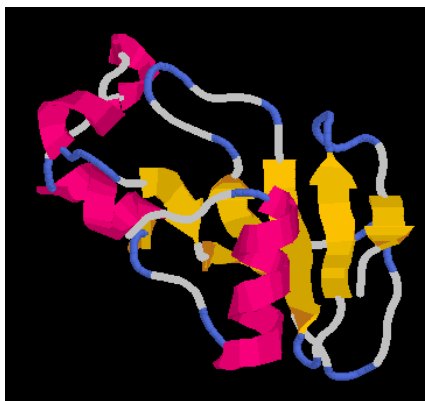
A ϕ értékek:

$$\phi = \frac{\Delta\Delta G_{I-U}}{\Delta\Delta G_{F-U}}$$

$$\phi_{ts} = \frac{\Delta\Delta G_{ts-U}}{\Delta\Delta G_{F-U}}$$

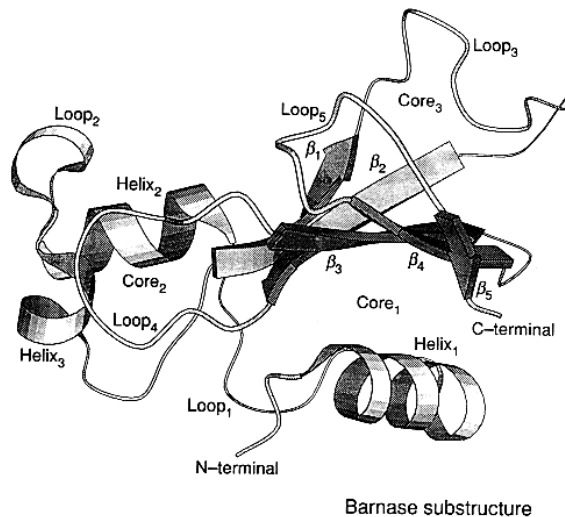
Barnáz

- *Bacillus amyloliquefaciens* ribonukleáz

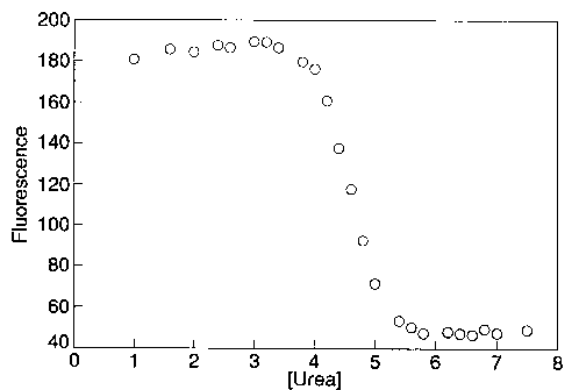


110 aminosav, 3 hélix, egy ötszálú antiparallel béta-lemez

- Részletes szerkezet:



- ◆ hélix₁ (leghosszabb): béta lemezzel core₁ hidrofób mag
- ◆ lemez másik oldalán loop₃ és loop₅ hurokrégiók a béta-lemezzel képezik a core₃ hidrofób magot
- ◆ hélix₂ és hélix₃ a lemez élével képezik a core₂ hidrofób magot
- ◆ aktív helyet a loop₃ és loop₅ közti hasadék képezi
- Jó tulajdonságai:
 - ◆ Denaturálószerrel és hővel reverzibilisen denaturálható
 - ◆ Egyensúlyi fel/legombolyodása kétállapotú



- ◆ Nincs benne cisz-prolin

Egyensúlyi kísérletek barnázzal

Az egyes kölcsönhatások szerepének feltérképezése: több mint 60 mutáns elemzésével (Alan Fersht és mtsai, Cambridge)

Elektrosztatikus kölcsönhatások

- Felszíni középtávúak (<10 angström): igen kicsi a járuléjuk.
- Rövidtávúak (<3,5 angström): csekély a járuléjuk: 0,3–1 kcal/mol
- Eltemetett ionpárok: egyik töltést eltávolítva nagy destabilizáció (3–4 kcal/mol)
- (magas hőmérsékleten nagyobb lehet a felszíni ionpárok stabilizáló hatása is! ld. termofil fehérjék)

Hidrogénkötések

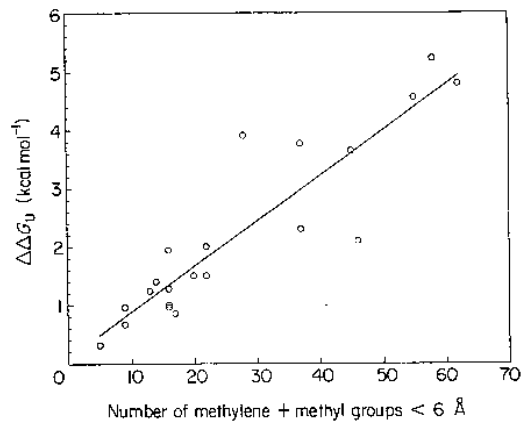
Háromféle mutáció:

- A hidrogénkötésben részt vevő csoport eltávolítása (pl. Ser→Ala, Tyr→Phe)
 - ◆ Felszínen: destabilizáció < 0,5 kcal/mol
 - ◆ Eltemetett, töltetlen csoportok között: destabilizáció 1–1,5 kcal/mol
 - ◆ Eltemetett, töltött csoportok között: destabilizáció 3–4 kcal/mol

- Nagyobb rész eltávolítása (pl. Asp, Gln, Asn → Ala):
más kölcsönhatásokat is befolyásol. Destabilizáció: 2–3 kcal/mol

Hidrofób kölcsönhatások

- Egy eltemetett metil(én)csoport eltávolítása átlag 1,5 kcal/mol destabilizációt okoz
- A destabilizáció arányos az eltávolított csoporttól 6 angströmmel nem messzebb lévő metil(én)csoportok számával:



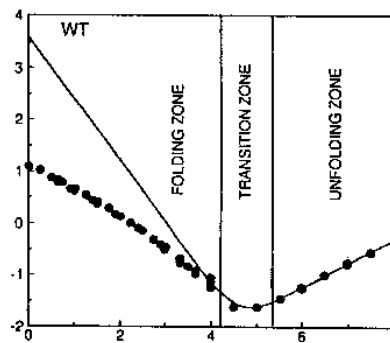
- A destabilizáció annál nagyobb, minél jobb az eredeti térkitöltés

A hidrofób kölcsönhatás adja a legnagyobb járulékokat, a hidrogénkötések és az elektrosztatikus kölcsönhatások viszont a natív szerkezet specificitásában játszanak nagy szerepet.

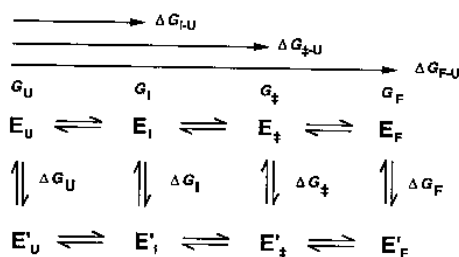
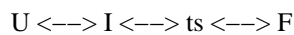
Kinetikai kísérletek barnázzal

- Felgombolyodás kétfázisú, lassú fázis prolinizomerizáció miatt

Chevron plot a gyorsabb fázis sebességi állandójából:



- Az adatok egy kinetikus intermediert tartalmazó reakció egyenleteire illeszthetők

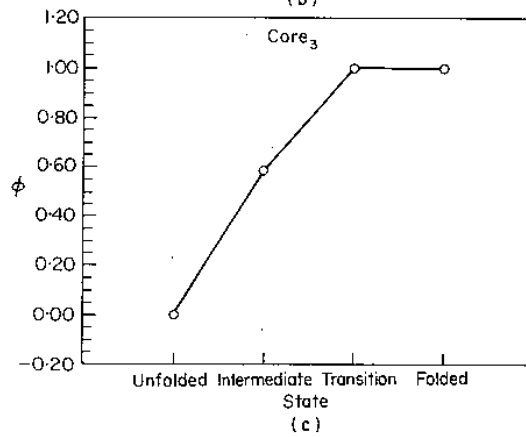
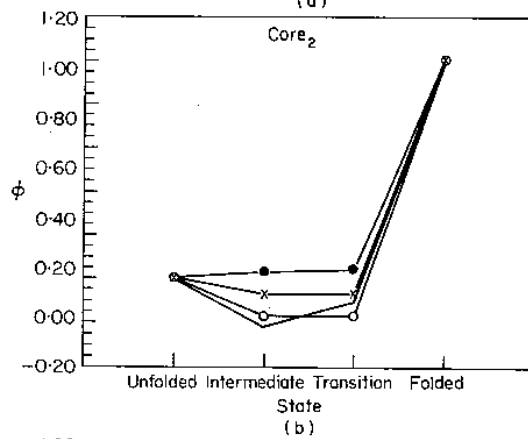
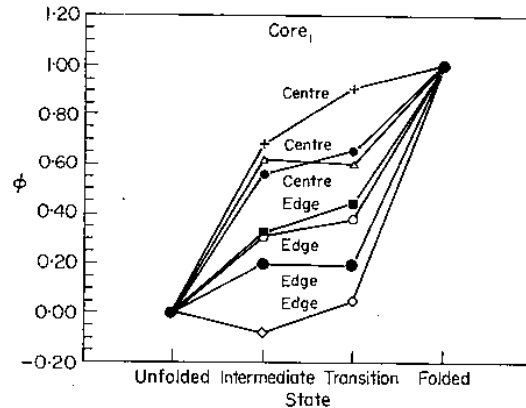


Φ-elemzések: Több mint 40 mutáns segítségével elemezték a felgombolyodás folyamatát (Fersht). Ötféle mutáns:

- hélixekben (dupla mutációs ciklusok is)
- béta-szálakban
- béta-kanyarokban
- hidrofób magokban
- hurkokban

A barnáz felgombolyodása

Hidrofób magok

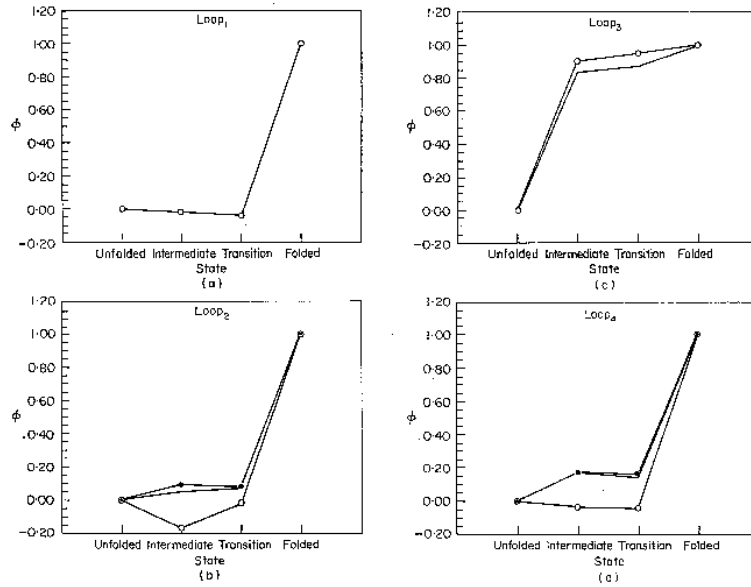




(bal: I áll., közép: ts áll., jobb: natív
szaggatott vonal: legombolyodott; vékony: részleges; vastag: felgombolyodott)

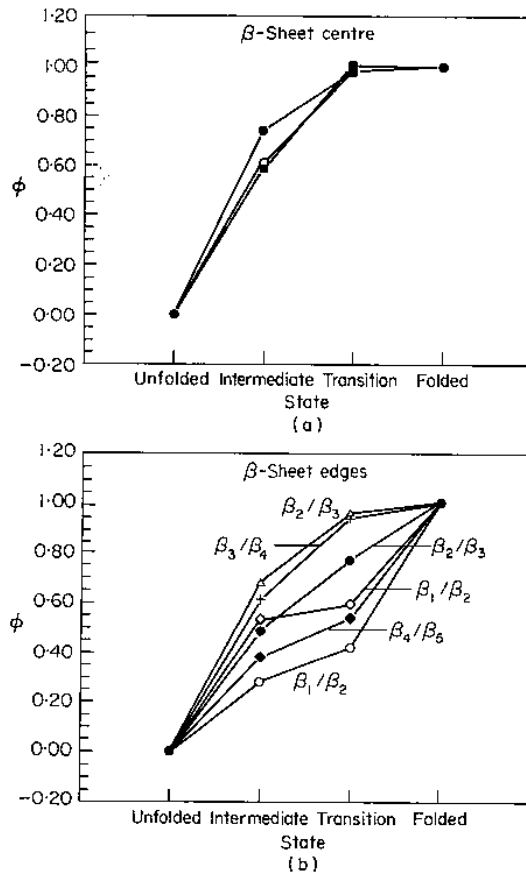
- A core₁ mag az I állapotban elkezd kialakulni, ts-ben megerősödik. A közepe előbb megjelenik és erősebb, mint a széle.
- A core₂ mag csak a ts állapot után alakul ki
- A core₃ mag az I állapotban elkezd kialakulni, ts-ben már kompakt

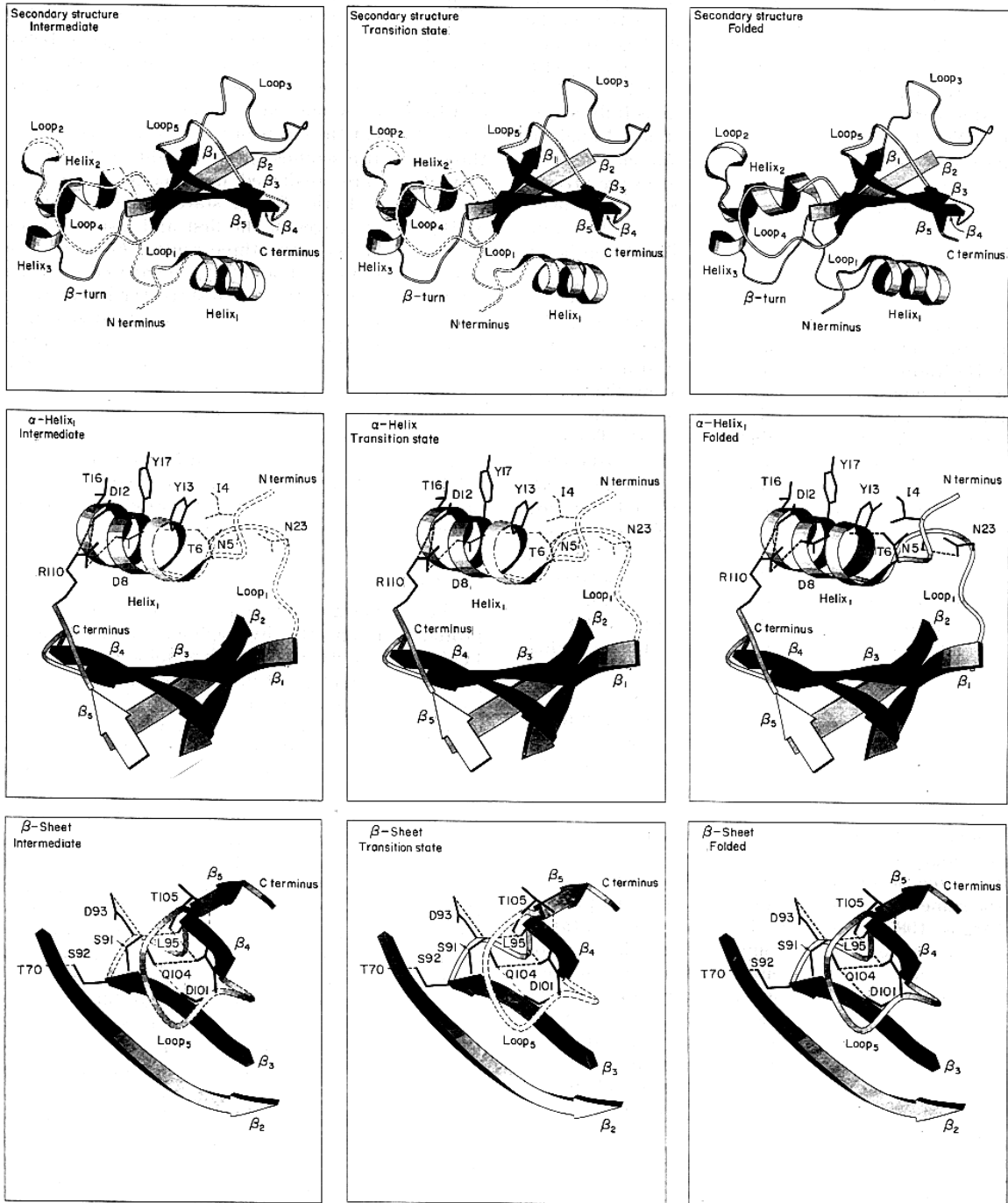
Hurkok:



- A loop₂, loop₄ és a loop₁ egy része csak a ts állapot után alakul ki
- A loop₃ (szubsztráktív) már az I állapotban kialakul, a loop₅ is részlegesen

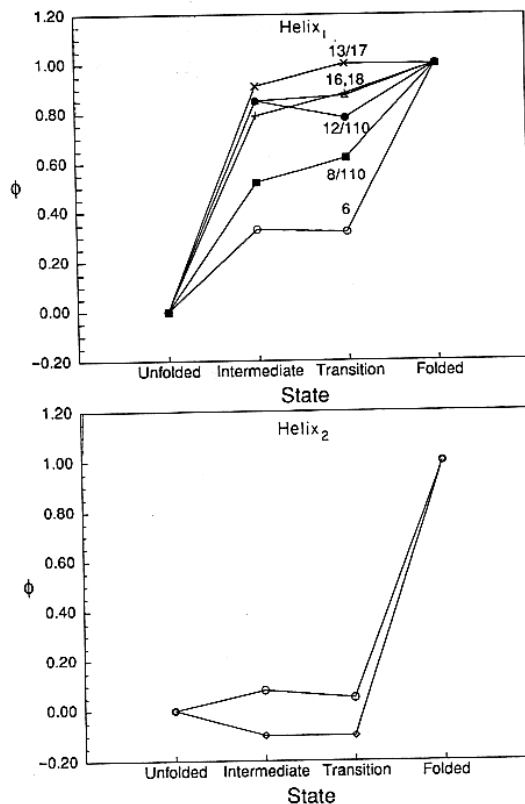
Béta-szerkezet





- A béta-lemez közepe az I állapotban lényegében kialakult, de a szélei gyengék

Hélixek



- A hélix₁ N-terminális egyharmada az I állapotban laza, a maradék kétharmad rész viszont már lényegében megvan
- A hélix₂ csak a ts állapot után alakul ki

Értékelés

- Mutánsok elemzésével meglepően pontos képet lehet kapni a felgombolyodás folyamatáról
- A mutációs elemzésből kapott eredményeket összehasonlították az NMR-rel követett hidrogénkicserélődési mérések eredményeivel
- Az egyezés jó
- A mutációs elemzés elsősorban az oldalláncokról ad információt
- A hidrogénkicserélődés elsősorban a gerincről ad információt
- Együttesen alkalmazandó, komplementer módszerek