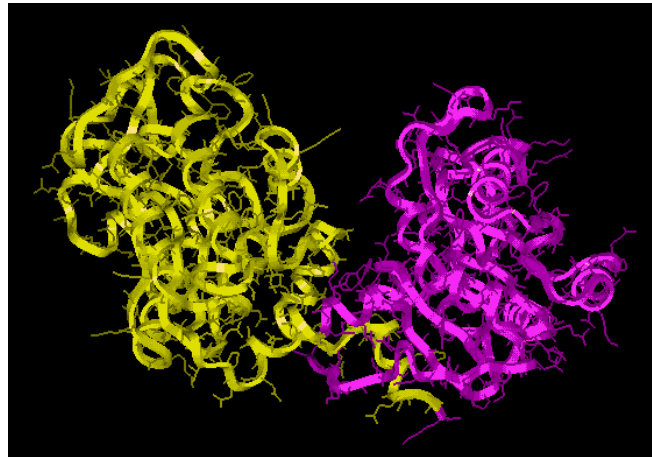


Több doménből, ill. több alegységből álló fehérjék összeszerelődése

1. A több doménből álló fehérjék felgombolyodása
 1. Domének
 2. Izolált domének felgombolyodása
 3. A doménpárosodás mint sebességmeghatározó lépés
 4. Versengés a felgombolyodás és az aggregáció között
 2. A több alegységből álló fehérjék összeszerelődése
 1. Többalegységes fehérjék
 2. A több alegység szerepe a funkció szempontjából
 3. Az alegységek közötti kölcsönhatások
 4. Az alegység–asszociáció tanulmányozásának módszerei
 5. Példák többalegységes fehérjék összeszerelődésére
 6. Versengő mellékreakciók
-

A több doménből álló fehérjék felgombolyodása

Domének



Többféle definíció:

- Stabil egység (limitált proteolízissal vagy génszűréssel elkülöníthető)
 - Termodinamikai egység (kooperatíván gombolyodik le és fel)
 - Felgombolyodási egység (függetlenül gombolyodik)
 - Szerkezeti egység (látszik a röntgenszerkezetben)
 - Genetikai egység (szekvencaösszehasonlítások alapján jósolható)
 - Evolúciós egység (exonoknak felel meg)
 - Funkcionális egység (meghatározott részfunkciója van, pl. NAD–kötés)
-

Izolált domének felgombolyodása

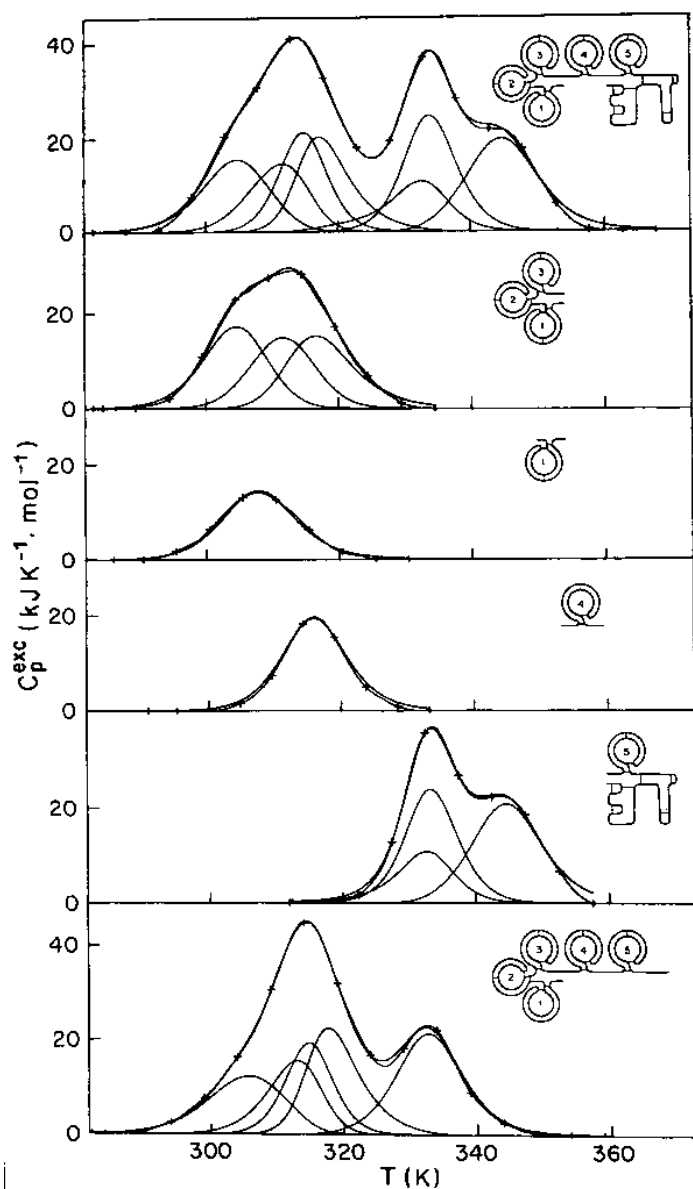
A polipeptidláncot a doménhatároknál szétvágva a domének izolálhatóak, ill. az egyes domének génszűrési úton külön–külön előállíthatóak.

Számos izolált doménről mutatták ki, hogy önállóan, reverzibilisen fel–/legombolyodik

(triptofán szintetáz, béta–laktamáz, aszpartokináz–homoszerin dehidrogenáz, plazminogén, PGK, stb.)

A domének termodinamikai stabilitása

Speciális esetekben igazolták, hogy a domének a fehérje többi részével együtt és anélkül is nagyjából azonos stabilitásúak (ez nem feltétlenül általánosítható)

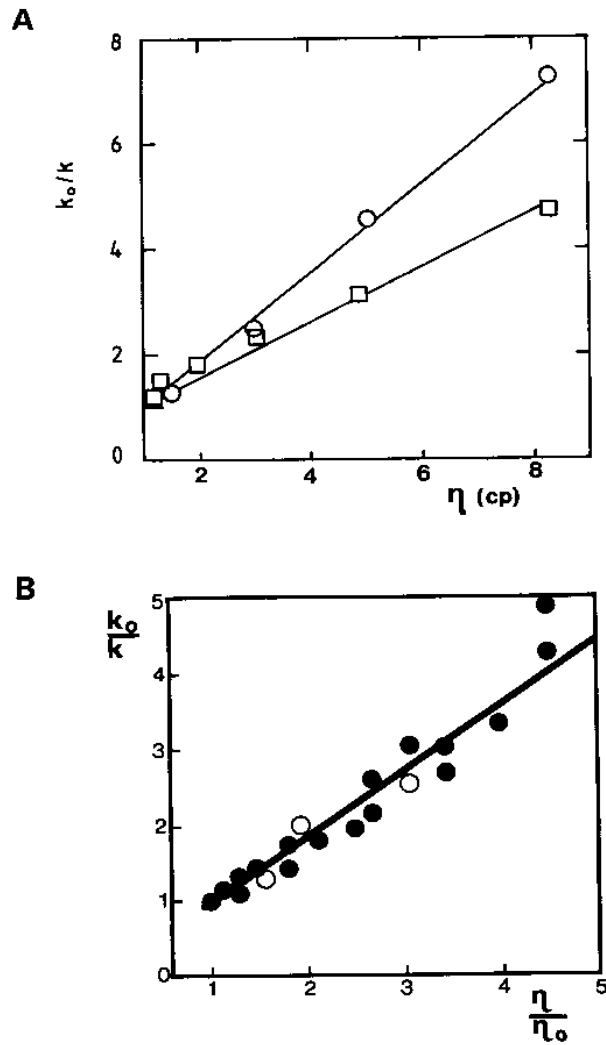


Plazminogén és különféle fragmentumainak kalorimetriás görbéi

A doménpárosodás mint sebességmeghatározó lépés

Számos jel szerint a többdoménes, egyláncú fehérjék felgombolyodásában a leglassúbb lépés a már felgombolyodott domének párosodása (asszociáció). Ennek 3 bizonyítéka:

1. Az enzimaktivitás csak a felgombolyodás legkésőbbi szakaszában jelenik meg. Az aktív hely általában a domének érintkezésénél van, az egyes domének hordozzák az egyes szubsztrátokat.
2. A felgombolyodás sebessége fordítottan arányos az oldat viszkozitásával



(A: Oktopin dehidrogenáz, B: AK-HDH felgombolyodási sebességének reciproka a viszkozitás függvényében.
Viszkozitásnövelők: glicerin, glükóz, szukróz

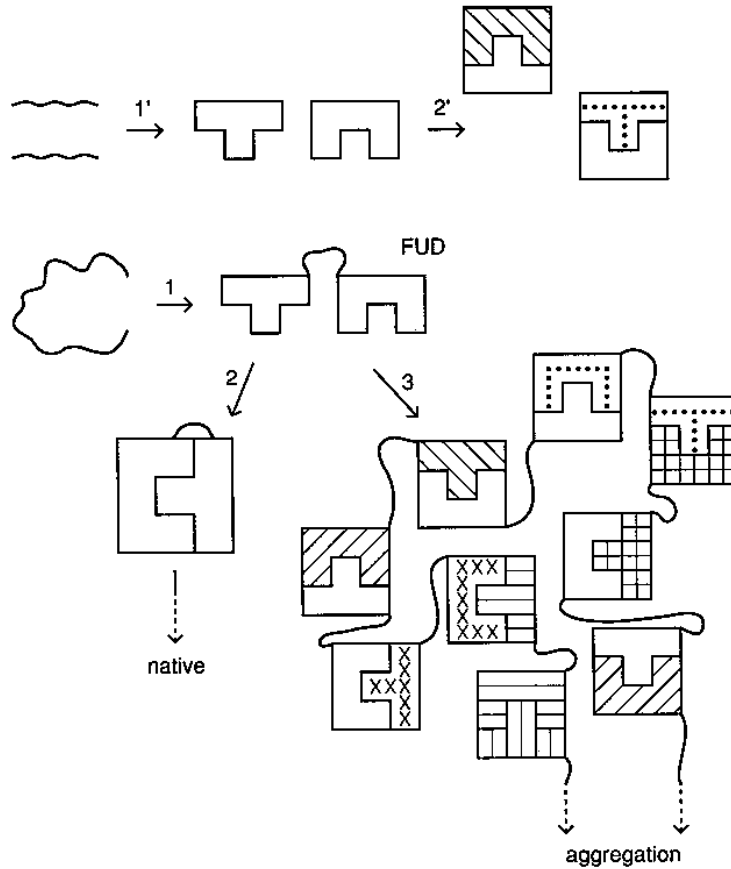
A viszkozitástól való függés nagyméretű egység elmozdulását feltételezi

- Az egyik doménben létrehozott, felgombolyodást lassító mutáció hatása kompenzálható a másik doménben létrehozott, önmagában szintén lassító mutációval

Létezik tehát egy állapot, melyben a domének már fel vannak gombolyodva, de még nem asszociálódtak. Ennek neve: **FUD (Folded but Unpaired Domains)**: felgombolyodott, de még nem párosodott domének

Általános reakcióséma:

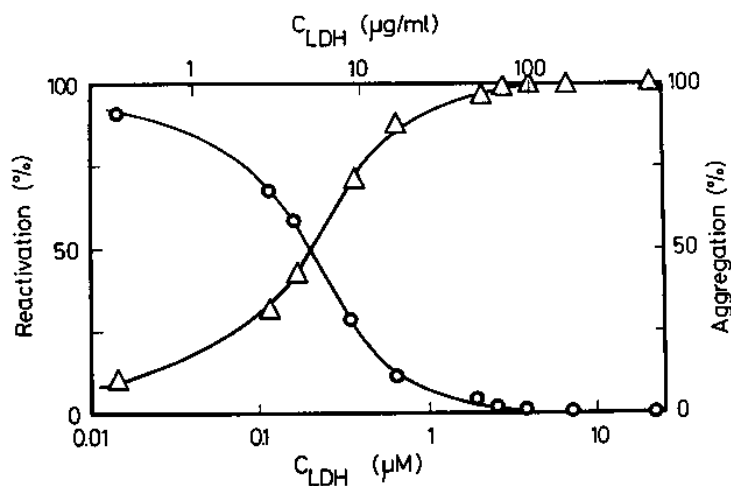
Legombolyodott áll. \rightarrow (domének gyors felgombolyodása) \rightarrow FUD \rightarrow (domének lassú párosodása) \rightarrow natív



Doménasszociációval járó folyamatok: 1': izolált domének felgombolyodása; 2': izolált domének asszociációja; 1: domének önálló felgombolyodása, FUD kialakulása; 2: a domének asszociációja, létrejön a natív szerkezet; 3: párosodás másik molekula doménjével --> aggregáció

Versengés a felgombolyodás és az aggregáció között

- A FUD intermedierben a domének kontaktfelzíne szabad --> más láncok komplementer felszíneihöz is kapcsolódhatnak --> **aggregáció!**
- Erősen koncentrációfüggő:



Laktát dehidrogenáz aggregációja (háromszög) és felgombolyodása (kör) a fehérjekoncentráció függvényében

Az aggregációban valóban a FUD intermedier vesz részt. Ennek bizonyítékai:

1. Az aggregáció akkor a legerőteljesebb, ha részlegesen felgombolyodott molekulák nagy számban vannak jelen
2. Az aggregáció *specifikus*. Más fehérjék jelenléte nem befolyásolja (még hasonló fehérjéké sem)

A több alegységből álló fehérjék összeszerelődése

Kérdések:

- Mennyiben befolyásolja az alegységek szerkezetét, stabilitását a többi alegység jelenléte?
- A felgombolyodási folyamat melyik fázisában történik az alegységek asszociációja?
- Teljesen kész, merev szerkezetű alegységek asszociálódnak, vagy inkább két olajcsepp egybeolvadásához hasonló az asszociáció? Utóbbi esetben mi biztosítja a specificitást?
- Egy "olvadt gombóc" jellegű intermedier mutathat-e specificitást?

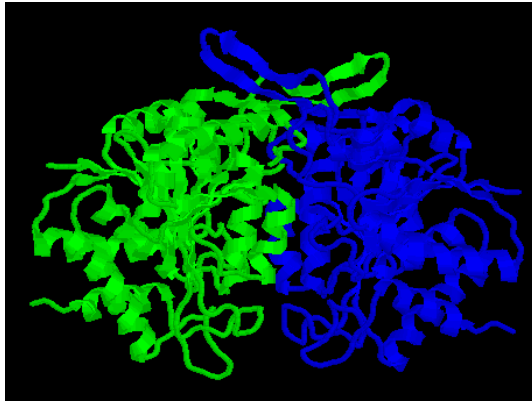
Többalegységes fehérjék

- $M_r=30\ 000$ molekulatömeg alatt többnyire monomer, $M_r=50\ 000$ fölött többnyire oligomer fehérjék
- (Kivételek: pl. izoleucin-tRNS szintetáz ($M_r=114\ 000$) monomer; inzulin ($M_r=5700$) és MetJ represszor ($M_r=12\ 000$) dimerek)

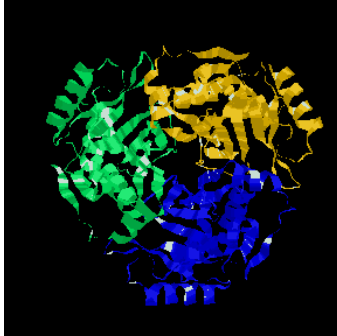
Néhány negyedleges szerkezet:

Negyedleges szerkezet	Példa
Homooligomerek	
a_2	Kreatin kináz
a_3	Kloramfenikol acetiltranszferáz
a_4	Laktát dehidrogenáz
a_6	Glutamát dehidrogenáz
a_8	Izocitrát dehidrogenáz
a_{12}	Glutamin szintetáz
a_{14}	GroEL chaperonin
a_{24}	Apoferitin
Heterooligomerek	
ab	Laktóz szintáz
ab_5	Koleratoxin
a_2b_2	Triptofán szintáz
a_6b_6	Aszpartát karbamoiltranszferáz
a_8b_8	Rubisco
abc	Troponin
$a_4b_4c_4d_4$	Foszforiláz kináz
$a_2bb'c$	RNS polimeráz
a_3b_3cde	F1 ATPáz

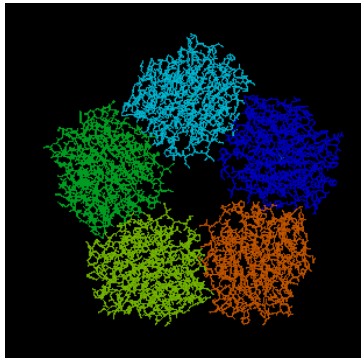
Általában szimmetrikus szerkezetek:



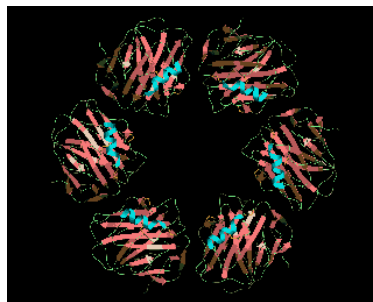
izopropil-malát dehidrogenáz (dimer)



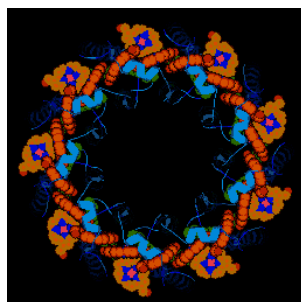
kloramfenikol acetiltranszferáz (trimer)



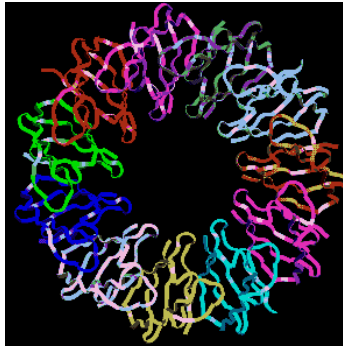
szérum amiloid P komponens



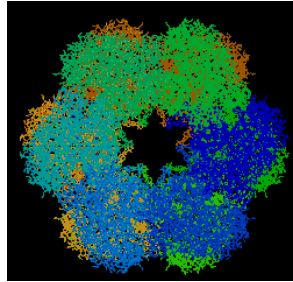
C-reaktív protein (hexamer)



LHC komplex (light harvesting complex) (nonamer)



TRAP (Trp attenuation protein) (undekamer, 11–mer)



glutamin szintetáz (dodekamer, 12–mer)

A negyedleges szerkezet és az élettani funkció összefüggése:

- *Szekretált fehérjék* (pl. tripszin, lizozim): ált. kicsi, egydoménes monomerek, diszulfidhidakkal → különféle környezetekben ellenálló
- *Vérplazma fehérjéi*: nagy monomerek (pl. szérumalbumin 65 kD) vagy ezek oligomerjei (alfa₂-makroglobulin, 4 alegység, 4x180 kD) → nem szűrődnek át az erek falán vagy a vesében
- *Intracelluláris fehérjék*: Ált. több alegység

A több alegység szerepe a funkció szempontjából

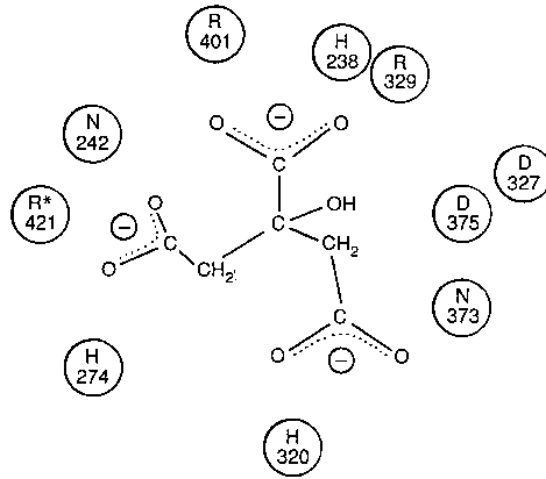
1. Az aktivitás szabályozása
2. Újfajta aktivitások létrehozása
3. Nagy szerkezetek képződése
4. A felgombolyodott láncok stabilizálása
5. Egyéb

Az aktivitás szabályozása

- Az alegységek között pozitív vagy negatív kooperativitás lehet
 - ◆ Hemoglobin (oxigénkötése)
 - ◆ foszfofruktokináz
 - ◆ aszpartát karbamoiltransferáz
- szigmoid alakú függés a szubsztrátkoncentrációtól
 - ◆ glutamát dehidrogenáz: negatív kooperáció a NAD-kötő helyek között
- Különböző ligandumok közötti kölcsönhatás → szabályozó funkciók (regulátor molekulák)
- A konformációváltozás ált. kimutatható

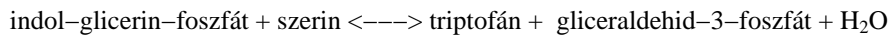
Újfajta aktivitások létrehozása

- Számos enzim aktív helye több alegység oldalláncaiból tevődik össze (pl. glutamin szintetáz, aszpartát aminotranszferáz, triózfoszfát izomeráz, citrát szintáz, gliceraldehid-3-foszfát dehidrogenáz)

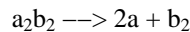


Citrát szintáz aktív helye. A *-gal jelölt oldallánc a másik alegységből van

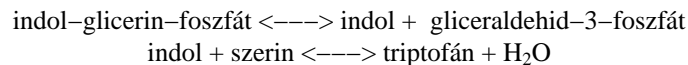
- Az alegység-asszociáció változtatható a specificitáson:
E. coli **triptofán szintáz**: triptofán bioszintézisének utolsó lépése:



Szerkezete: a_2b_2 . 1M KSCN jelenlétében disszociál:



Az a és b_2 egységek két félreakciót katalizálnak:



- ◆ Az a_2b_2 teljes enzim hatékonyabban katalizál és elnyomja a káros mellékreakciókat.
- ◆ Az indol az a alegység aktív helyéről "channeling" révén, egy "alagúton" jut el a b alegység aktív helyére
- **Laktóz szintáz**: A és B alegység (a B az alfa-laktalbumin):
 - ◆ B nélkül az A N-acetil-glükózaminból N-acetil-laktóزامint készít
 - ◆ B-vel glükózból laktózt
 - ◆ szabályozás: szülés után megnövekszik a B alegység szintje, így a tejcukor termelése

Nagy szerkezetek képződése

- GroEL chaperonin: gyűrű 14 alegységből, közepén lyukkal, mely befogad egy rosszul felgombolyodott fehérjét
- aktin \rightarrow aktinszál
- alfa- és béta-tubulin \rightarrow mikrotubulus
- flagellin \rightarrow bakteriális ostor

A felgombolyodott láncok stabilizálása

- Az asszociáció növeli az alegységek stabilitását (hidrofób foltokat, laza hurkokat eltüntet)
- Nehéz mérni a stabilizáció mértékét (disszociáló körülmények az alegységet is destabilizálják)
- Mérés: Mátrixhoz kötött fehérjéről a szabad alegységet ledisszociáltatjuk, a megmaradót visszagombolyítjuk, stabilitását mérjük

Egyéb szerepek

- A sejt ozmotikus nyomásának csökkentése
- A hibás felgombolyodás esélye kisebb, ha több, önálló alegységből épül fel a fehérje, mint ha egyetlen nagy láncból

Az alegységek közötti kölcsönhatások

- Ugyanazok, mint az alegységen belüliek (hidrofób, H-kötés, elektrosztatikus, Van der Waals)
- Asszociációs állandó (K): 10^5 – 10^{13} M⁻¹
Standard szabadentalpia (ΔG^0): -28 – -74 kJ/mol (mérésből)
- A mért ΔG^0 -ben benne van a translációs és rotációs szabadsági fokok elvesztéséből származó járulék is. Ennek értéke vitatott. Kétféle becslés:
 - ◆ Gázok statisztikus mechanikája alapján a "Sackur–Tetrode" egyenletből \rightarrow nagy entrópiaértékek (100 cal/M/K), nehéz magyarázni
 - ◆ Keverési entrópia (a disszociálódó alegységek elkeverednek az oldatban):

$$S_{\text{mix}} = k_B \ln x$$

ahol x a móltört, 1M referenciakonzentrációra (a víz koncentrációja 55M) számítva kb. 10 cal/M/K érték adódik.

Mérés: nehéz, értékek inkább a 10 cal/M/K-hoz közeliek. Mégis, elméleti alapon a Sackur–Tetrode módszert tartják többen helyesnek.

- Becslés: az asszociációkor eltemetett hidrofób felszínből: 100 négyzetangströmönként 10,5 kJ/mol szabadentalpia (konyhaszabály)

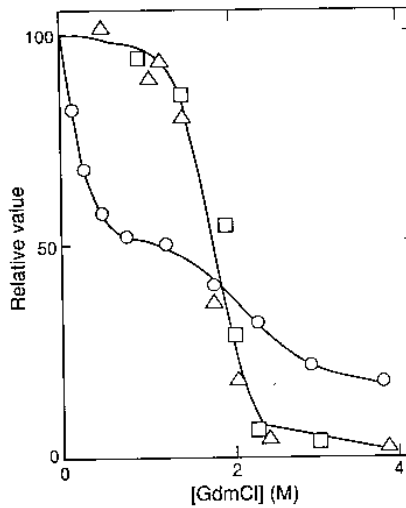
Az alegység–asszociáció tanulmányozásának módszerei

Két megközelítés:

- Olyan körülményeket teremtünk, ahol felgombolyodott, de disszociált monomerek vannak. Ezután visszaállítva az eredeti paramétereiket az asszociáció elkülönítve vizsgálható. (Ez sokszor nem járható út.)
- Disszociált és legombolyodott monomerekből indulunk ki, együttesen vizsgáljuk a monomerek felgombolyodását és asszociációját.

Disszociált natív (vagy kvázinatív) alegységek nyerése

- **Hígítás**
Akkor használható, ha nem túl erős az alegységek közötti kapcsolat (pl. piruvát karboxiláz, foszfofruktokináz)
- **Hidegdisszociáció**
Hidrofób kölcsönhatás meggyengülése miatt. Pl. élesztő gliceraldehid-3-foszfát dehidrogenáz (tetramer) 0 Celsius-fokon kvázinatív monomerekké esik szét (NAD-kötő képesség megmarad)
- **Kémiai módosítás**
Pl. lizinek töltésének megfordítása dibázikus sav anhidridjével való módosítással (reverzibilis!). Pl. élesztő zsírsav-szintetáznál (a_6b_6) bevált.
- **Ligandumindukált disszociáció**
Bizonyos speciális esetekben. Pl. glutamát dehidrogenáz (hexamer) GTP hatására szétesik; cAMP-függő protein kinázról cAMP hatására a katalitikus egység leválik
- **Enyhén denaturáló körülmények** (esetleg stabilizálószer egyidejű alkalmazásával)
 - ◆ Triptofán szintáz (a_2b_2) KSCN hatására
 - ◆ Laktát dehidrogenáz (tetramer) 1M glicin/H₃PO₄+EDTA, pH 2,3, plusz 1M Na₂SO₄ stabilizáló só hatására
 - ◆ Laktát dehidrogenáz 2M ureában v. 0,8–1,2M GdmCl-ben dimerekké esik szét
 - ◆ Glutamát dehidrogenáz (hexamer): 1–1,5M GdmCl-ben két natívszerű trimerre esik szét, 3M-nél ezek is szétesnek és legombolyodnak



(kör: M_r fényszórással mérve; háromszög, négyzet: másodlagos és harmadlagos szerkezet CD-vel, ill. fluoreszcenciával mérve)

• **Nagy nyomás**

>1 kbar nyomás hatására az oligomerek gyakran szétesnek (pl. laktát dehidrogenáz), mert ezzel csökkenhet a térfogat (oldószer hozzáfér az eddig eltemetett részekhez)

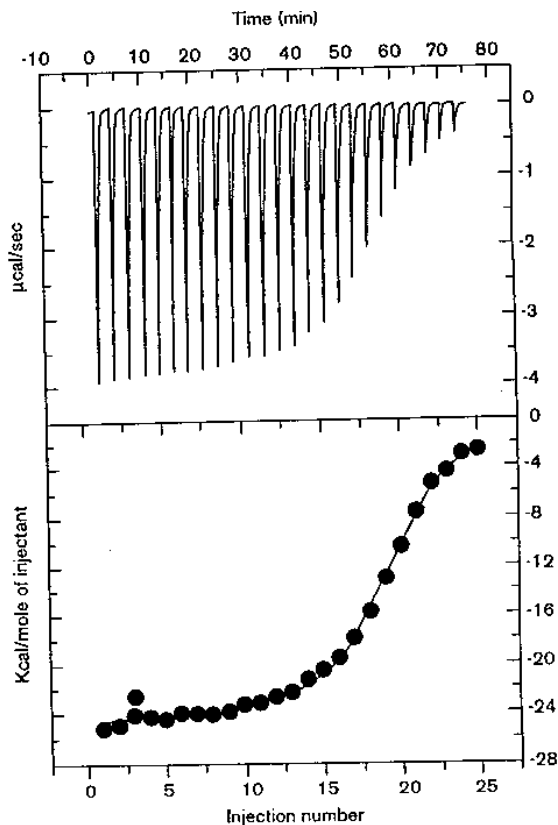
Az asszociáció nyomonkövetése: Biofizikai módszerek fehérje–fehérje kölcsönhatások mérésére

• **Surface Plasmon Resonance** (felületi plazmonrezonancia)

- ◆ A kötő alegységeket egy optikai chip felületén immobilizáljuk.
- ◆ A fölötte lévő pufferbe bevisszük a kötődő molekulát
- ◆ Kötéskor a tömegváltozás optikai változást okoz, ezt méri a műszer
- ◆ BIAcore: áramló puffer, Affinity Sensors: kevert puffer
- ◆ Alkalmas: kötődik/nem kötődik eldöntésére, kötési affinitás mérésére

• **Izotermikus titrációs kalorimetria**

- ◆ A kötő alegységek oldata van a mérőtérben
- ◆ Ehhez injektáljuk kis adagokban a másik alegység oldatát
- ◆ A műszer a felszabaduló hőt méri, a hőmérsékletet állandó értéken tartva



- ◆ Számítható: kötési entalpia, asszociációs állandó, entrópia
- ◆ Homooligomernél: üres pufferbe tömény fehérjeoldatot injektálgatunk, hígítási hőket mérve

• Fluoreszcencia

Ált. fluoreszcenciás rezonancia–energiatranszfer (FRET) segítségével mérhető a két alegység távolsága:

Ha egy fluorofor (donor) emissziós spektruma átfed egy közeli fluorofor (akceptor) abszorpciós spektrumával, közöttük rezonanciás energiatranszfer lép fel, melynek hatékonysága:

$$E = R_0^6 / (R^6 + R_0^6), \text{ ahol}$$

$$R_0 = 979(K^2QJn^{-4})^{1/6}, \text{ ahol}$$

- ◆ K a dipól–dipól orientációs tényező
- ◆ Q a donor kvantumhatásfoka transzfer hiányában
- ◆ J a spektrumok átfedési integrálja
- ◆ n az oldószer törésmutatója

Hátrány: ált. fluoroforokat kell bevinni, ezek nagyméretű csoportok, amelyek az asszociációt is befolyásolhatják!

• Tömegspektroszkópia

• Fényszórás

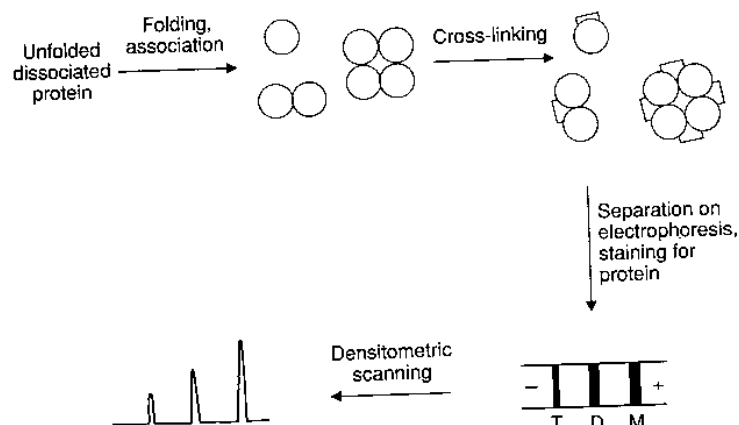
- ◆ Az átlagos részecskeméretet méri
- ◆ Disszociációnál jól használható, asszociációnál az aggregáció miatt kevésbé
- ◆ A turbiditás spektroszkópiával is mérhető (megfelelő korrekciók alkalmazásával)

• Gélszűrés HPLC–vel

(A HPLC elég gyors, 1 órán belül elvégezhető)

Az összeszerelődés időbeli nyomon követésének módszerei

• Keresztkötés és SDS–PAGE (nagyágyú!)



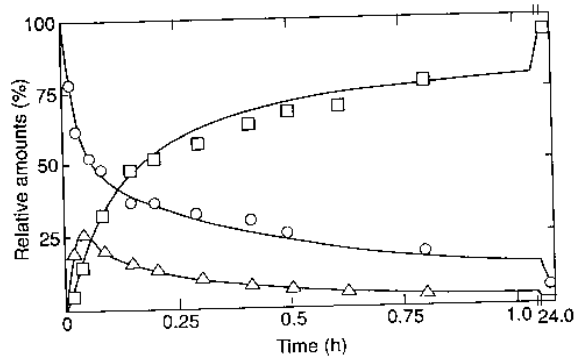
- ◆ A visszagombolyítás folyamatában bizonyos időpontokban mintát veszünk, azt gyorsan ható keresztkötő reagenssel elkeverjük, ez az oligomereket rögzíti
- ◆ SDS–PAGE (poliakrilamid gélelektroforézis SDS detergensben) elemzés szétválasztja a különböző tömegű molekulákat
- ◆ Legjobb keresztkötő reagens:

glutáraldehid: OHC-CH2-CH2-CH2-CHO

Lizineket köti össze

- ◆ Mindig ki kell kísérletezni, mi a legjobb glutáraldehid–koncentráció
- ◆ Hátrány: Néha nincs elég lizin megfelelő helyen

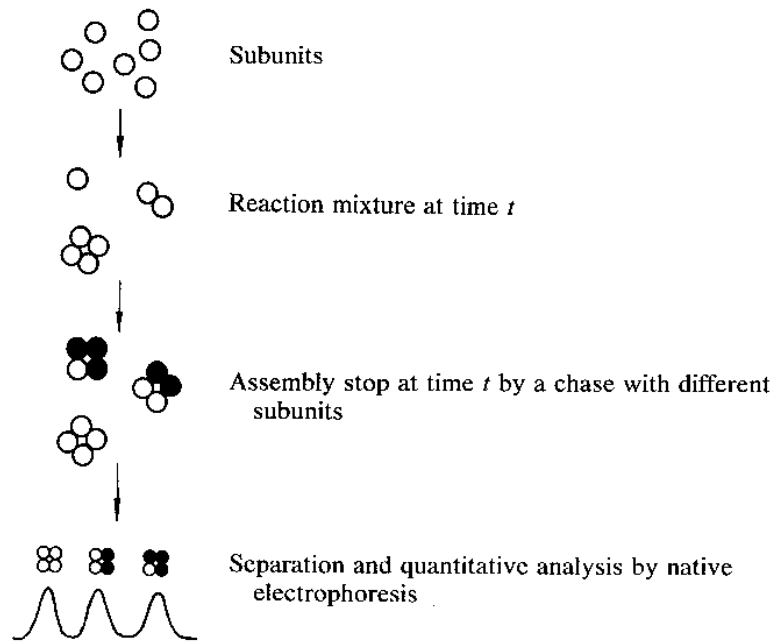
Eredmények élesztő foszfoglicerát mutáznál:



(kör: monomer, háromszög: dimer, négyzet: tetramer)

Csak dimer intermedier figyelhető meg.

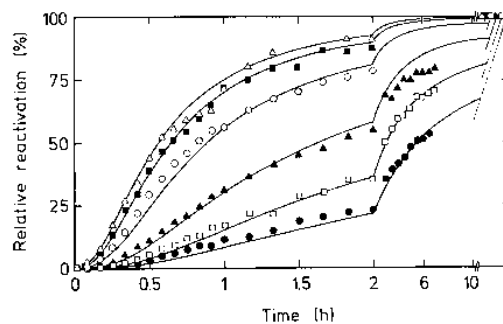
• **Hibridizáció izoenzimmel vagy módosított alegységekkel**



- ◆ A visszagombolyítás folyamatában adott időpontban nagy mennyiségben izoenzim-alegységeket vagy kémiaailag módosított alegységeket adunk az oldathoz
- ◆ Az idegen alegységek lekötik a még szabad molekulákat
- ◆ Natív gélelektroforézissel elemezzük az eloszlást
- ◆ Feltétel: az idegen alegység elektroforetikusan különbözzön a vizsgálttól
- ◆ Problémák: az idegen alegység lassú felgombolyodása, disszociáció, stb.
- ◆ alkalmazták pl. kreatin kináznál, aszpartát karbamoiltranszferáznál

• **Reaktiváció mérése**

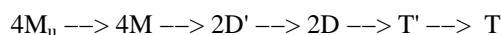
- ◆ Gyors aktivitásmérések alapján
- ◆ Fehérjekoncentráció függvényében
- ◆ Malát dehidrogenáznál:



(az egyes görbék más–más fehérjekoncentráció mellett készültek, a fehérjekoncentráció alulról fölfelé növekszik; a grafikonon 2 óránál időskála–váltás)

Az adatok elemzése

- Elvégezzük: Keresztkötés és SDS–PAGE, valamint reaktivációs mérések, sokféle fehérjekoncentráció mellett (kiegészítve spektroszkópiai mérésekkel)
- Az adatok alapján felállítható egy reakcióséma, a sebességi állandók kiszámíthatóak.
- A reakcióséma unimolekuláris (izomerizációs) és bimolekuláris (asszociációs) lépésekből áll. Pl. tetramernél:



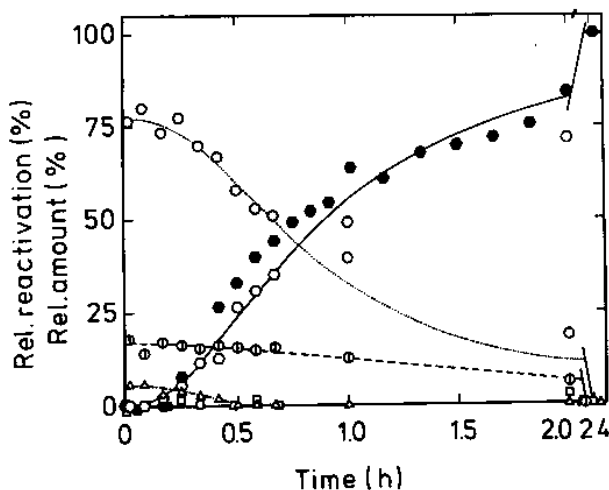
(M: monomer, D: dimer, T: tetramer)

- Rendszerint a reakcióegyenletek analitikus vagy numerikus megoldásával ellenőrizzük a modellt és a paraméterek helyességét, ill. számítjuk ki a sebességi állandókat.

Példák többalegységes fehérjék összeszerelődésére

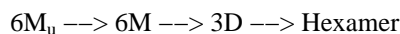
UDP–glükóz dehidrogenáz

Hexamer.



[Keresztkötésből hexamerek (hatszög), tetramerek (négyzet), trimerek (háromszög), dimerek (félkörök), monomerek (kör) mennyisége. Reaktiváció (teli hatszög).]

- Trimereket és pentamereket nem lehet megfigyelni
- Az aktivitás visszanyerése a hexamerképződéssel párhuzamos
- Reakcióséma:

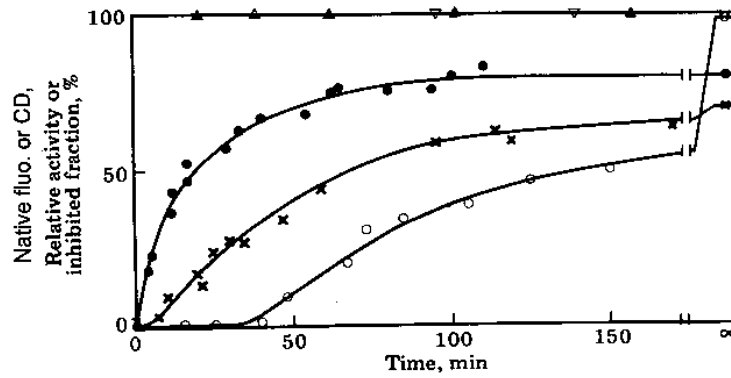


- Az első két lépés sebességi állandói: $k_1=4,5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ (elsőrendű) és $k_2=1,6 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (másodrendű)

Aszpartokináz–homoszerin dehidrogenáz (AK–HBH)

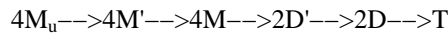
(E. coli)

- Tetramer
- Bifunkciós enzim, négy bifunkciós alegység
- Treonin bioszintézisének két korai lépését katalizálja
- Treonin allosztérikusan gátolja
- Mérések:



[háromszögek: CD, fluoreszcencia; teli kör: kináz aktivitás, X: dehidrogenáz aktivitás; üres kör: a kináz aktivitás allosztérikus gátlása treoninnal]

• Reakcióséma:



	4M _u	4M'	4M	2D'	2D	T
Kináz aktivitás	-	-	+	+	+	+
- gátolhatósága treoninnal	-	-	-	-	-	+
Dehidrogenáz aktivitás	-	-	-	+	+	+
- gátolhatósága treoninnal	-	-	-	-	+	+
Natív fluoreszcencia	-	+	+	+	+	+
Natív távoli UV CD	-	+	+	+	+	+

Versengő mellékreakciók

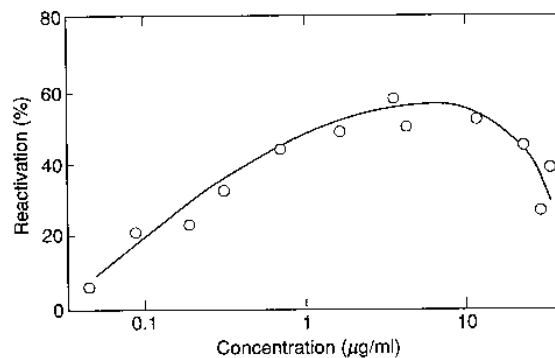
- **Alacsony fehérjekoncentrációnál:**

- ◆ az asszociációs lépések lelassulnak
- ◆ a nemasszociált alegységek hosszú ideig fennmaradnak
- ◆ csökkent stabilitásuk miatt veszélyeknek vannak kitéve: degradáció proteázszennyezés által, kémiai módosulás, edény falára tapadás, stb.

- **Magas fehérjekoncentrációnál:**

Aggregáció következhet be: valamelyik korai intermedier hidrofób felszínei révén (általában nonspecifikus) asszociáció

Tehát a közepes koncentrációk az ideálisak



Laktát dehidrogenáz reaktiválhatósága a fehérjekoncentráció függvényében

(alkalmazások: ld. következő előadás)