

Egy antifungális diszulfid fehérje
szerkezeti dinamikája és
hideg/meleg kitekeredése
(*avagy PAF, a hűvös sárkány*)

Batta Gyula

Debreceni Egyetem

Szerkezeti Biológiai és Molekuláris Felismerési

Műhely

structbiol.unideb.hu

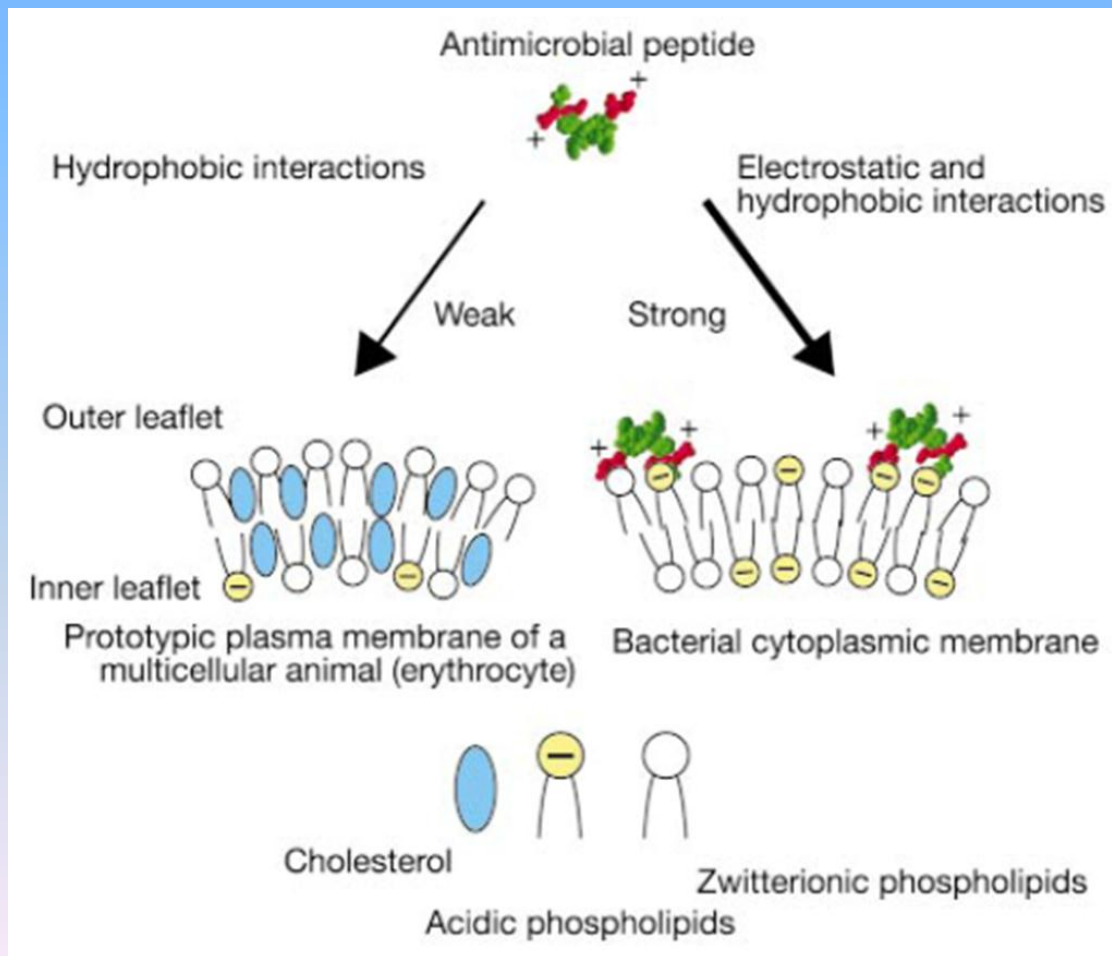
(a Magyar Tudomány Ünnepe, 2012. nov. 8)

Program

- antimikrobiális peptidek
- a PAF térszerkezete (NMR)
- diszulfid híd mintázat
- belső dinamika
- hőmérsékleti kitekeredés

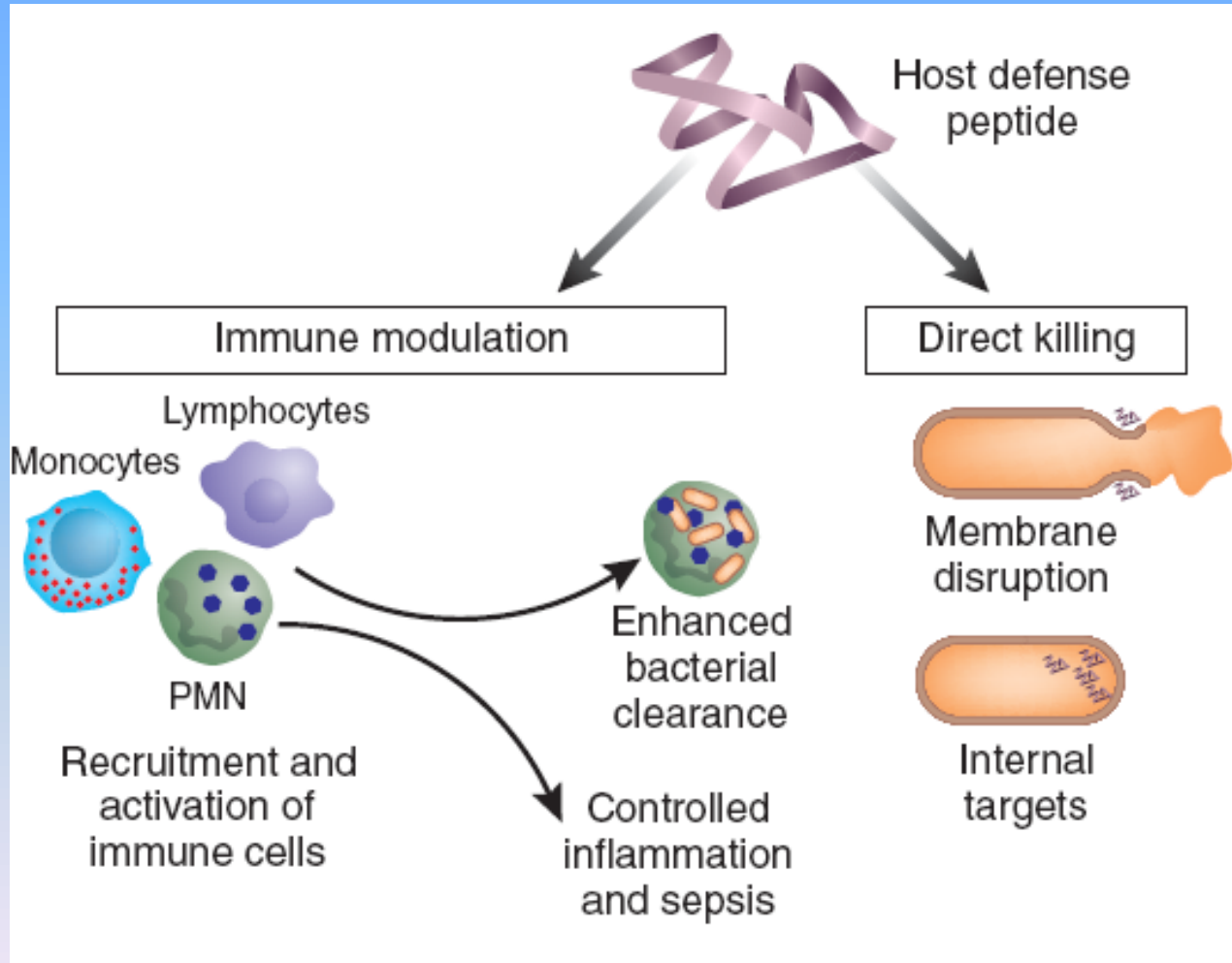
Az antimikrobiális peptidek (AMP) új, fertőzés-elleni terápiás stratégiát kínálnak

Robert E W Hancock & Hans-Georg Sahl
NATURE BIOTECHNOLOGY 24 (12) 2006. 1551

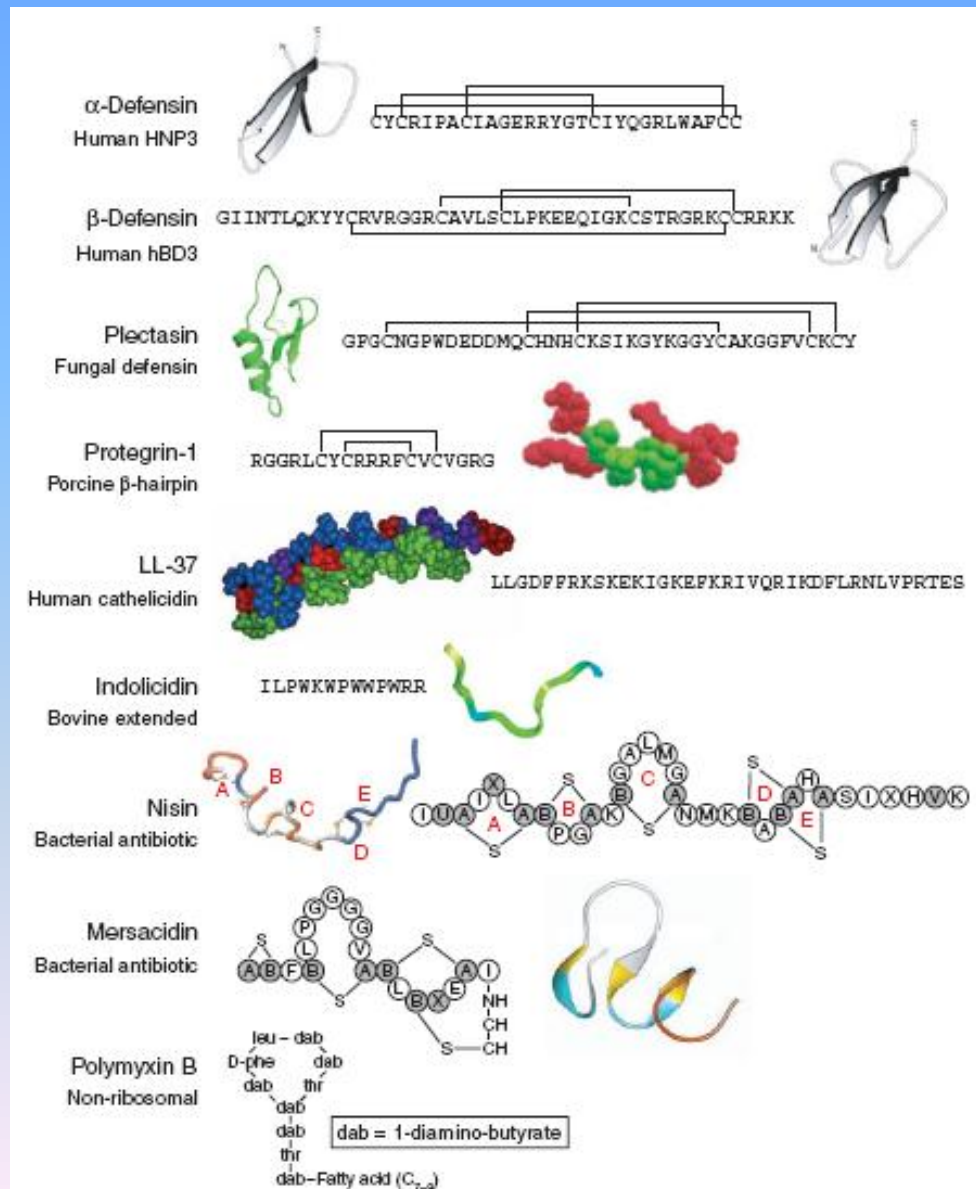


Baktérium:
töltött membrán célpont

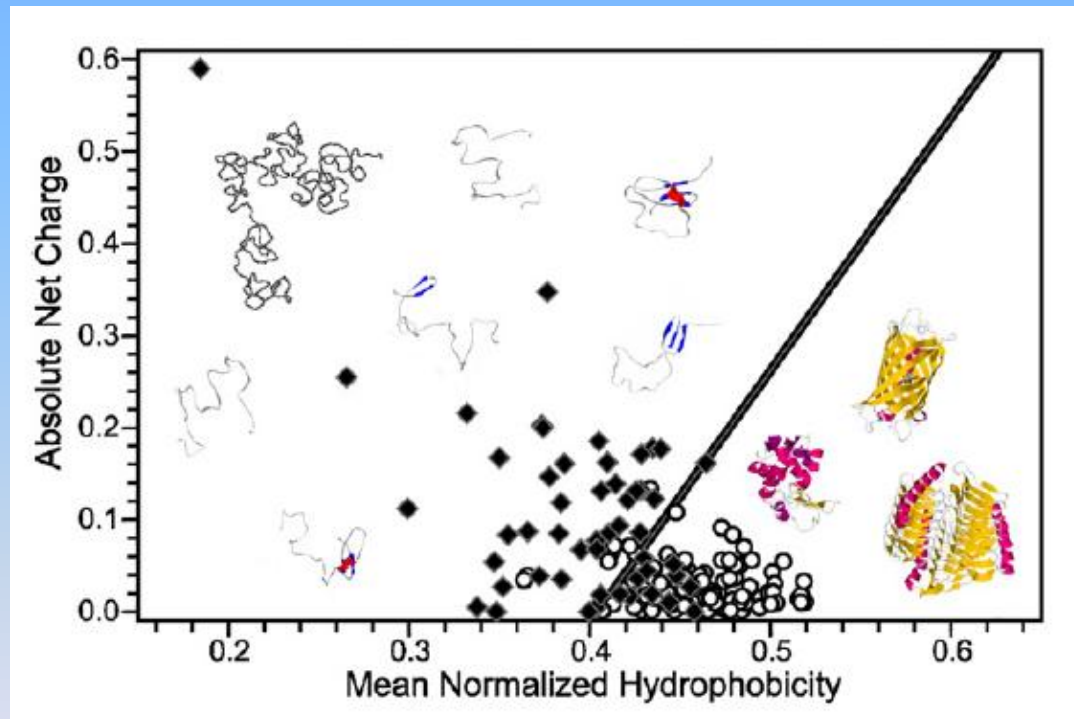
A gazdaszervezetet védő peptidek működése



Mintegy ezer AMP változat ismert



Az AMP-k pozitívan töltöttek (PAF: Lys=25%)
(de sok bennük az apoláros csoport is)
a rendezetlen és a globuláris fehérjék határmezsgyéjén várhatók



Vladimir N. Uversky : Intern. J. Biochemistry & Cell Biology 43 (2011) 1090– 1103

Miért éppen a PAF?

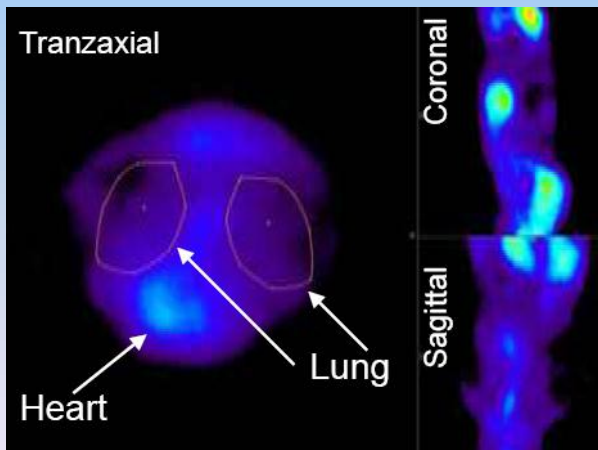
Penicillium chrysogenum termeli.

Antifungális aktivitás μM koncentrációban.

Aspergillosis elleni terápia?

Rendkívüli stabilitás (évekig, oldatban).

Emlősökre veszélytelen.

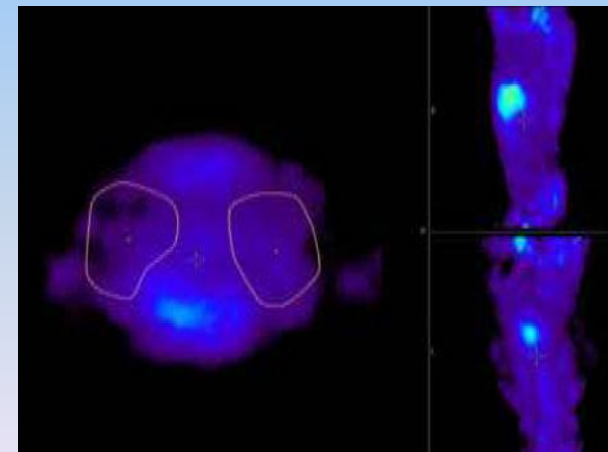


Mini PET

Palicz Zoltán

Szentesi Péter

Csernoch László



(Egészséges kontroll, nincs PAF)

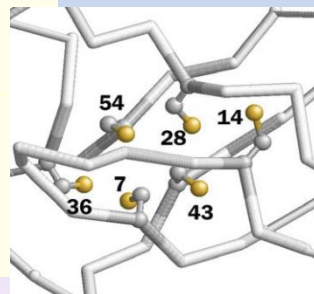
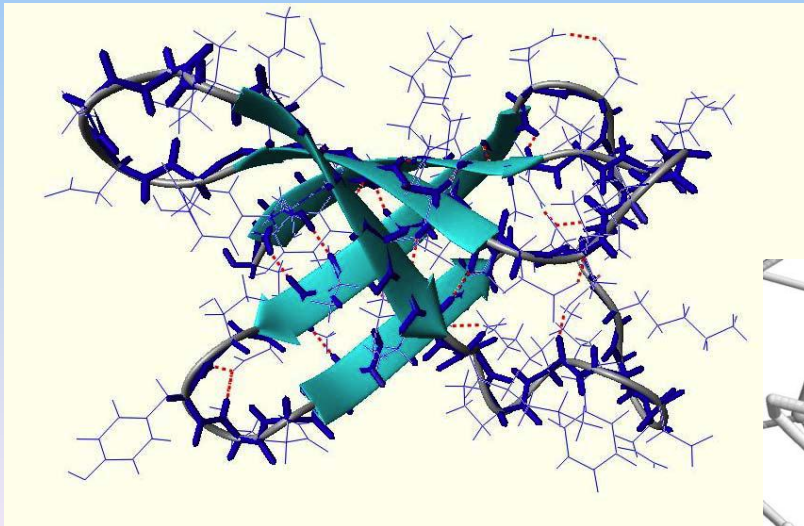
Egészséges kontroll, van PAF

A *Penicillium chrysogenum* antifungális fehérje (PAF, pdb kód: 2kcn)

szignál-szekvencia pro-szekvencia
MQITTVALFLFAAMGGVATPIESVSNLDARAEAGVL

érett fehérje

1 AKYTGKCTKSKNECKYKNDAGKDTFIKCPKFDNKKCTKDNNKCTVDTYNNAVD**CD** 55

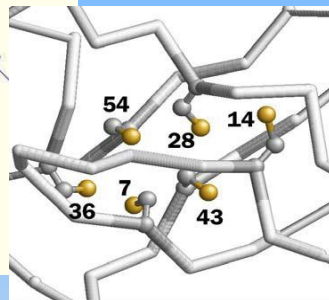
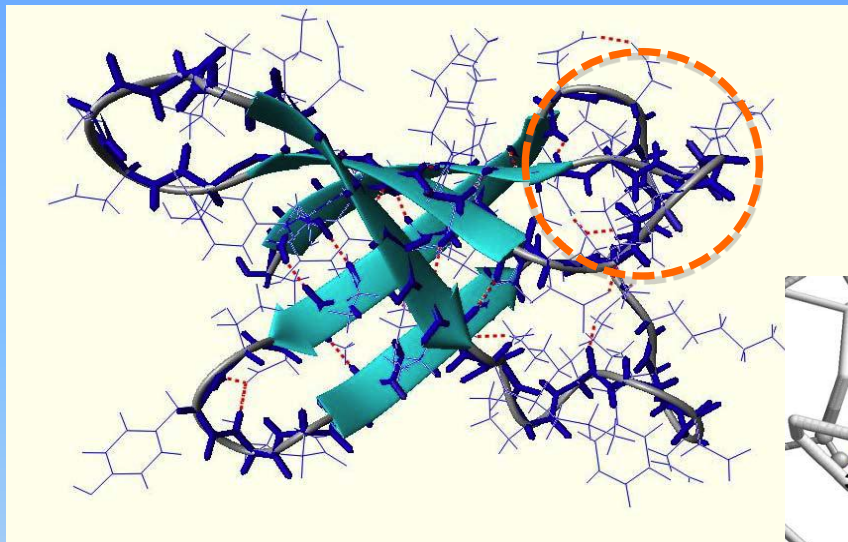


- szekretált protein
- 5 antiparallel β -szál
- 6 cisztein (3 S-S híd)

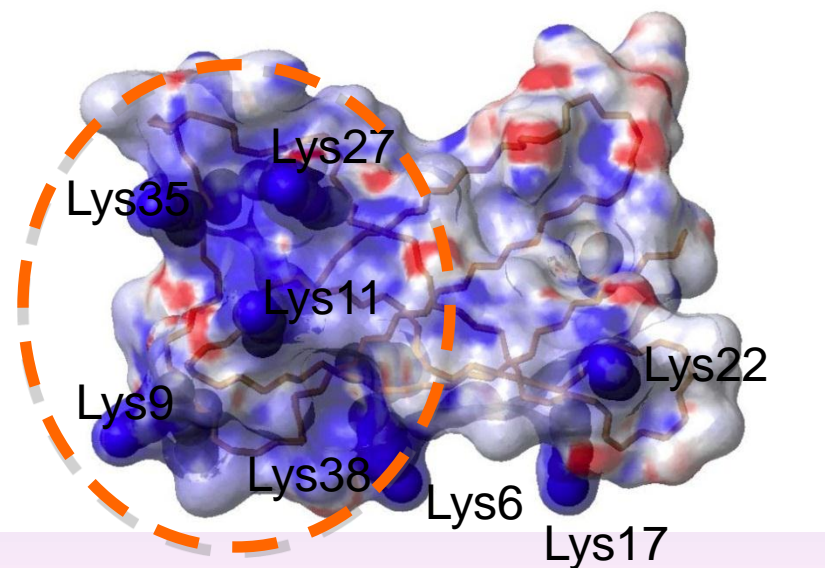
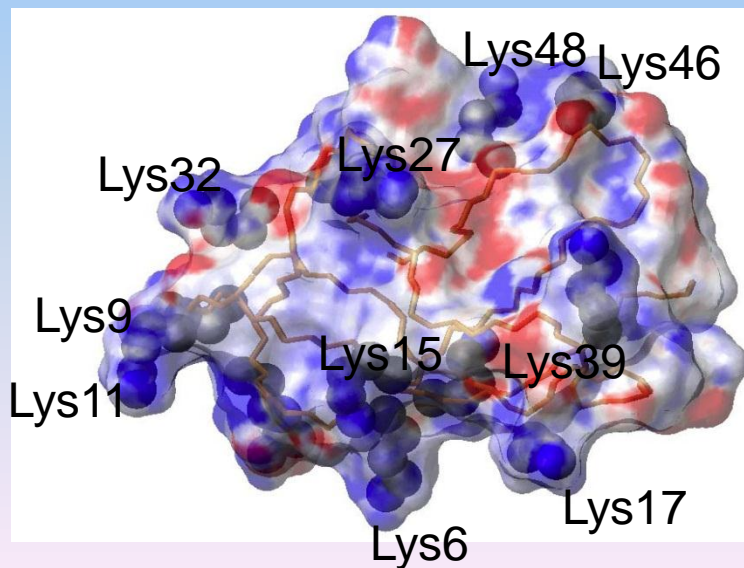
feltekeredett, rendkívül stabil

- 13 lizin, pozitív össztöltés
- interakciók a hurkokban

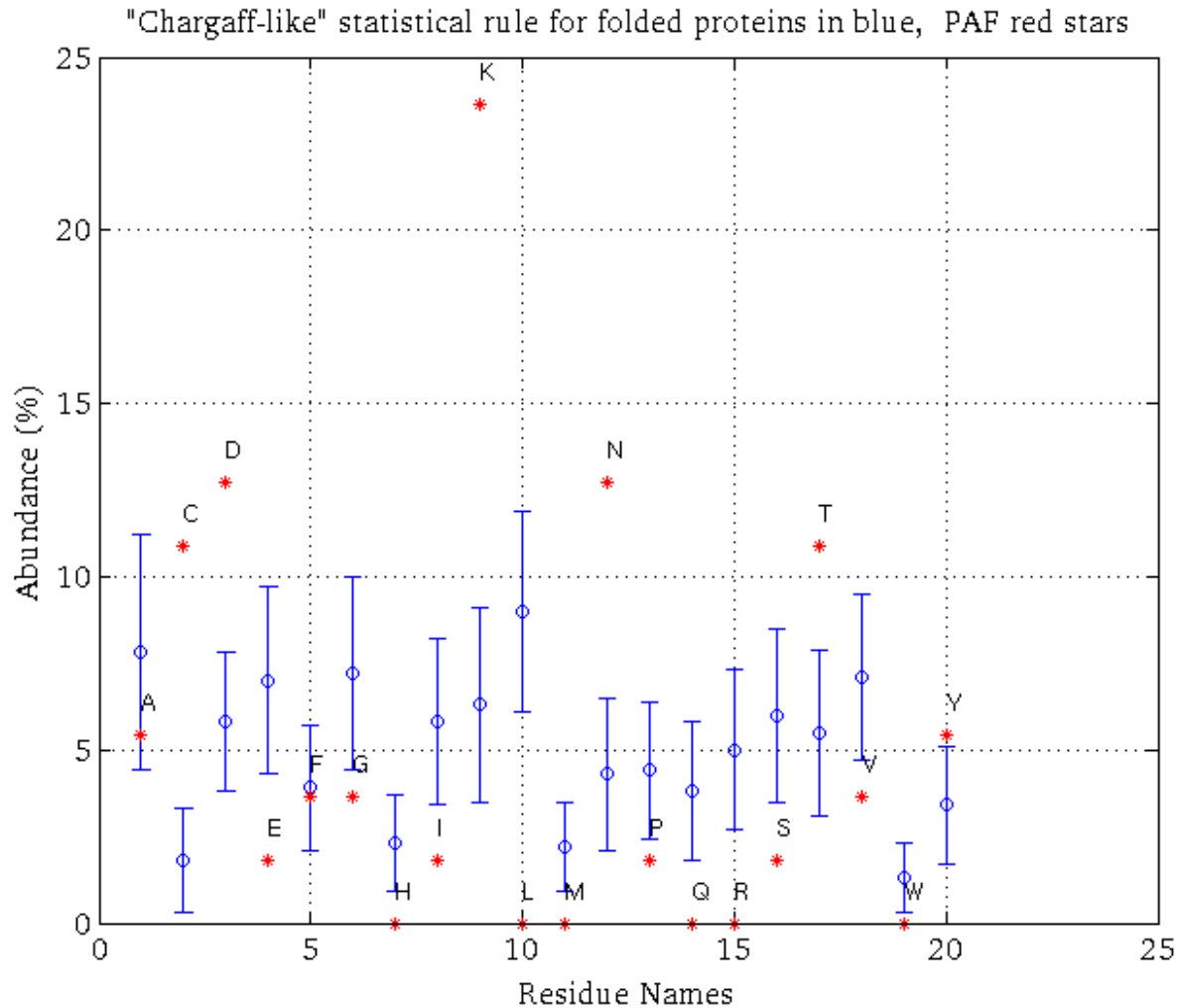
A PAF *in-vitro*, oldatbeli szerkezete (NMR)



- erősen konzervált, lizinben gazdag (13) kationos felület
- „flexibilis” hurkok



A fehérjékre vonatkozó „Chargaff –szerű” szabály (Mittal, 2010) szerint a diszulfid hidak nélküli (redukált) PAF nem tekeredhet fel

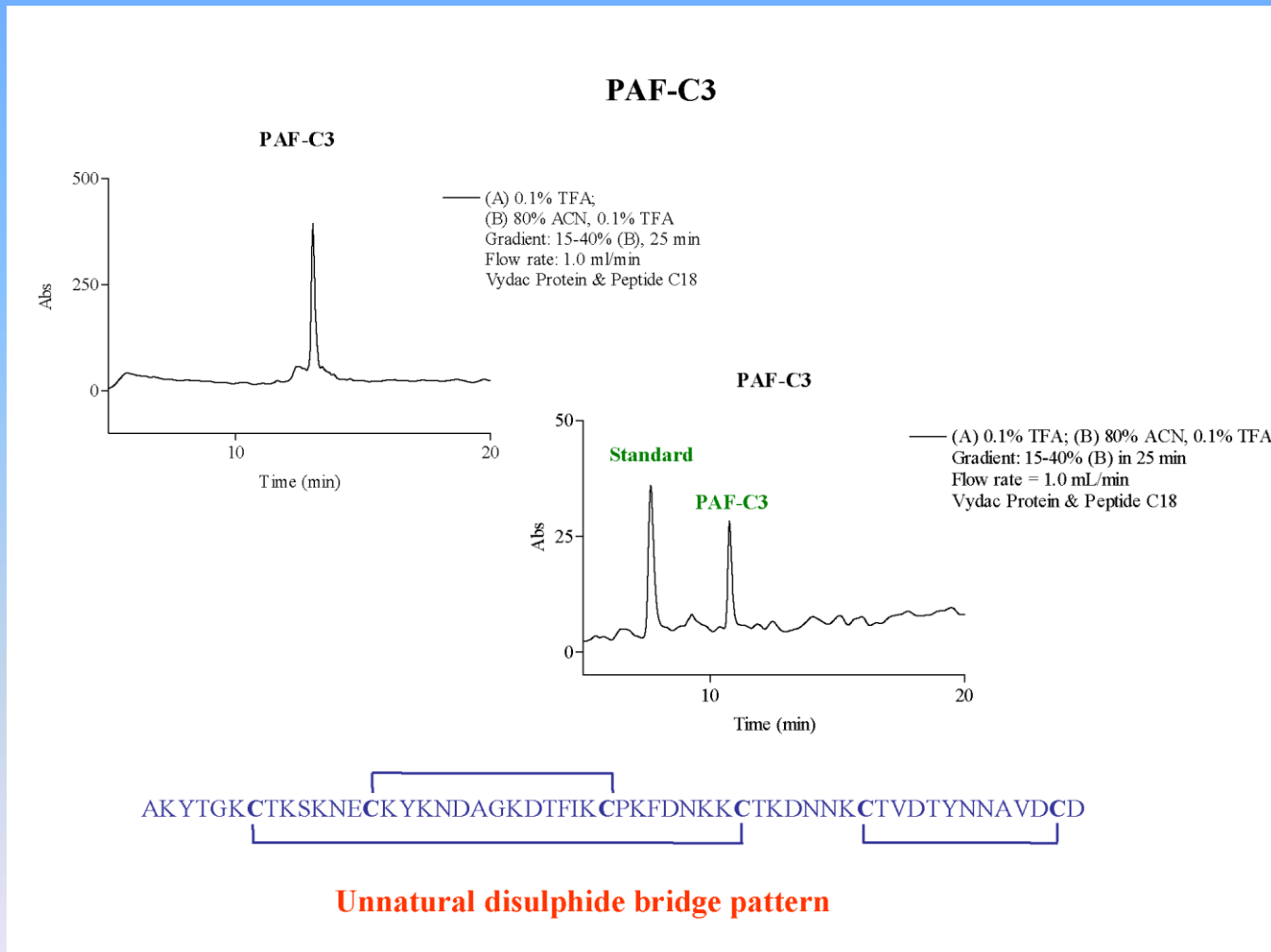


A diszulfid mintázat meghatározása a PAF esetében

1. Az S-S kötések száma könnyen megadható tömegspektrometriával (minden S-S kötés csökkenti ($\Delta M=2$) a móltömeget).
2. Cys ^{13}C - β NMR kémiai eltolódások jellemzők az oxidált állapotra.
3. A PAF rendkívül stabil, nehezen emészthető, MS kritikus (Kele Z.).
4. A hidrofób magban a hasonló C β -C β távolságok (NMR, NOE) megengednek konkurrens mintázatokat.
5. Új NMR korlátok (^{13}C adatok, RDC, S^2) és a molekula-dinamika kombinációja segíthet (Gáspári Z.). Cys ^2H - β jelzés, „egzakt” NOE ?
6. Szeleno-cisztein mutáció (a ^{77}Se NMR-aktív) rekombináns technológiával vagy szintézissel (Váradi Gy.) nem könnyű.

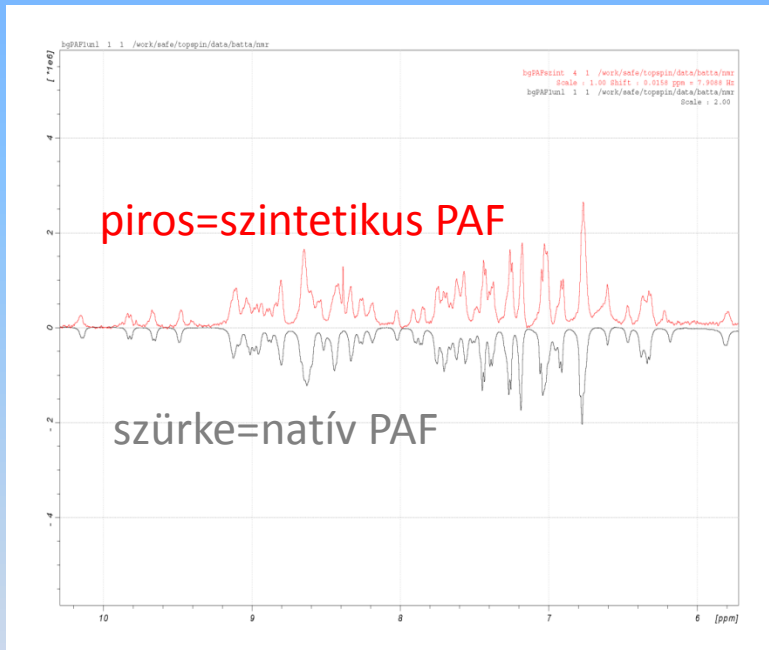
A PAF szerkezetigazoló kémiai szintézise

(Váradi Györgyi és Tóth Gábor)

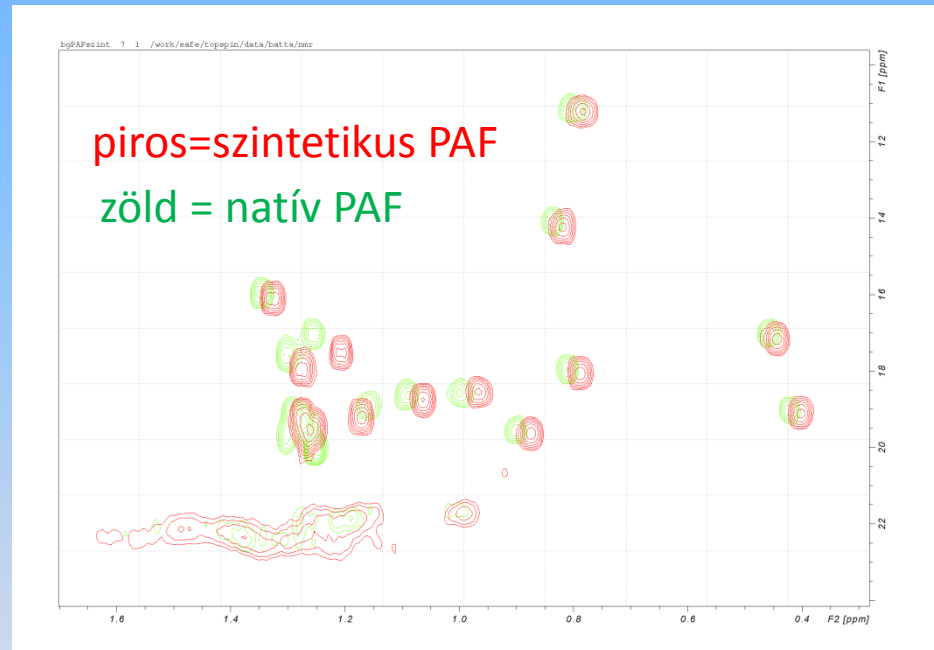


A konkurrens „abbacc” mintázat megvalósult, de nem azonos a PAF-al.

A lineáris PAF sikeres szintézise után oxidatív feltekeredés > natív PAF

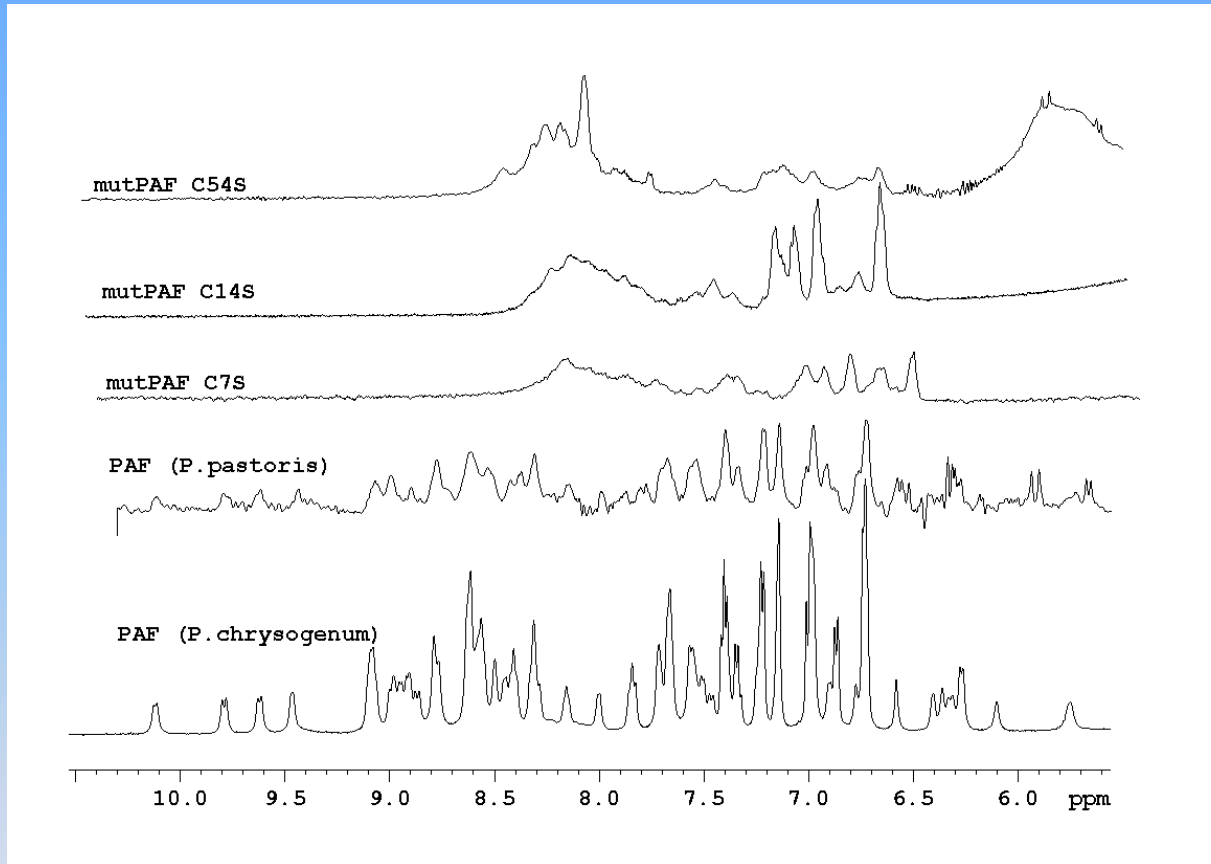


¹H-NMR spektrumok, amid NH régió



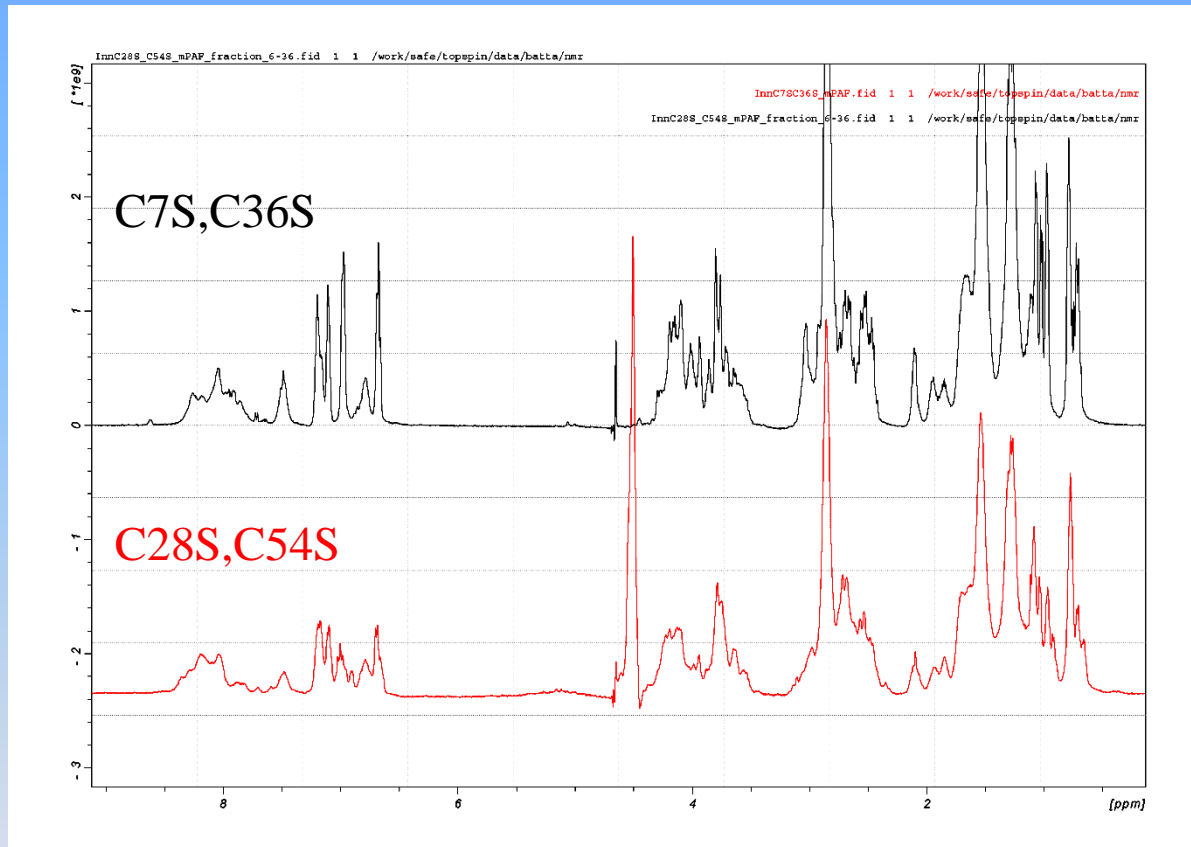
¹³C-HSQC NMR spektrumok, Me régió

Egyszeres cisztein mutánsok (*P. pastoris*: C7S, C14S, C54S)



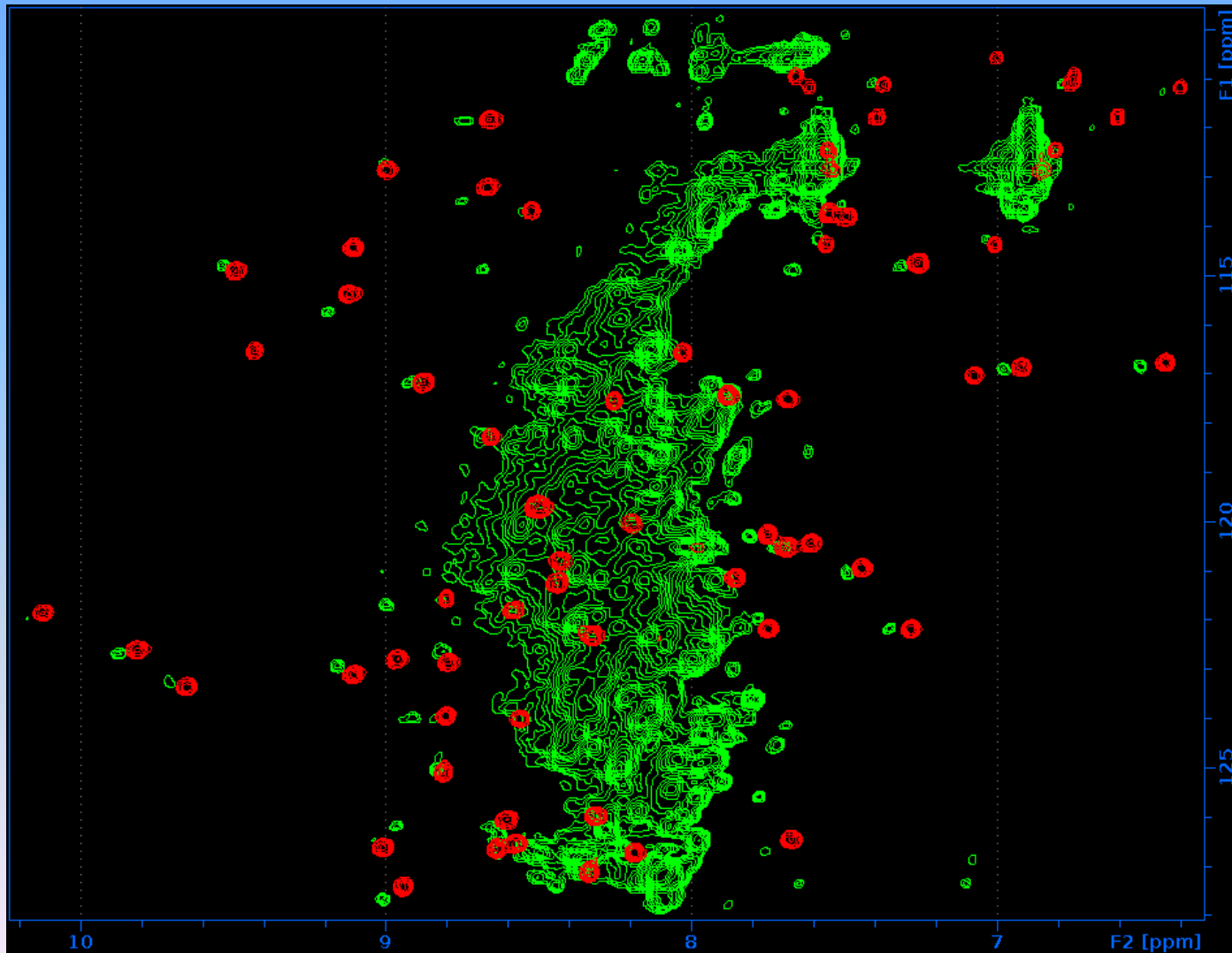
A *P. pastoris* PAF azonos a natív PAF-al
azonban a C-mutánsok nincsenek feltekeredve, többnyire dimerek:
csak a C54S aktív (~ 50%) monomer-dimer keverék (MS).

Dupla cisztein mutánsok az „abcabc” minta szerint *P. pastoris* [C7S,C36S; C14S,C43S; C28S,C54S]

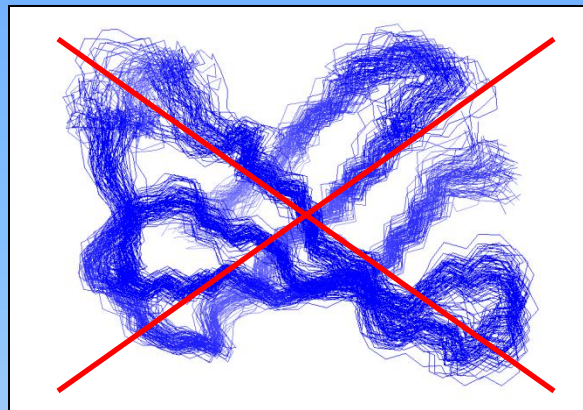


Az egy diszulfid híddal szegényített mutánsok sincsenek feltekeredve:
terv: oxidatív feltekeredés kikényszerítése

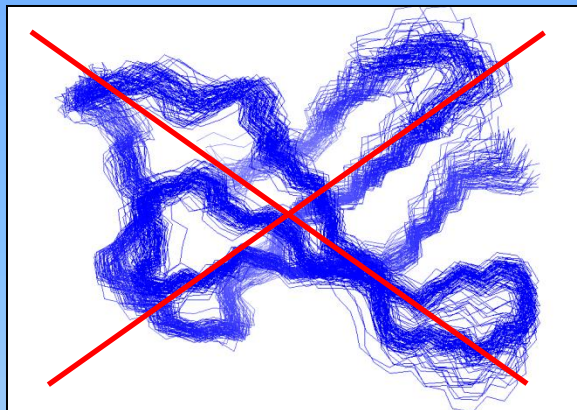
Az irreverzibilis PAF hőmérsékleti denaturáció (3h, 90°C) inaktív oligomereket (tetramerig) eredményez (MS, HSQC, DOSY)



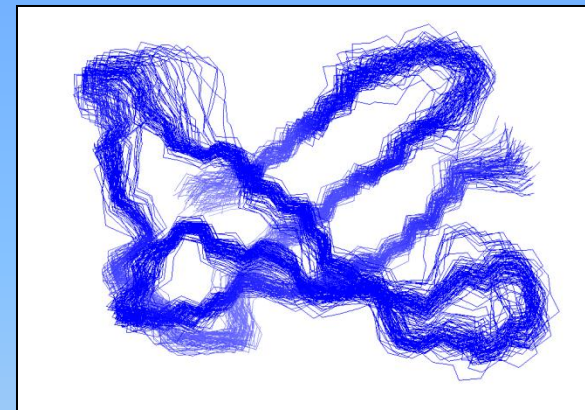
Az S^2 (dinamikai) rend paraméterek és az NMR korlátok (NOE, RDC, ^{13}C -shift, J) egyidejű alkalmazása (GROMACS molekula dinamika, Gáspári Z.)



Nincs S-S híd,



3 x S-S híd, abbacc,

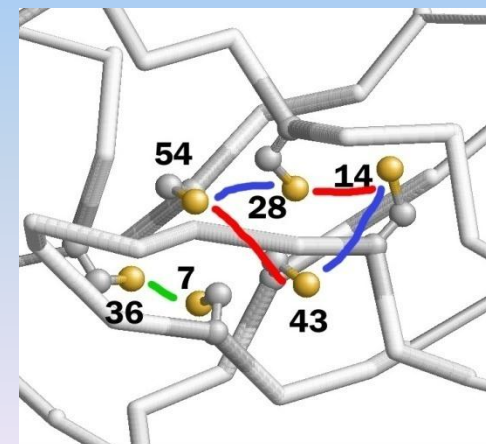


3 x S-S híd, abcabc,

Konkurrens diszulfid híd minták (5x3=15)

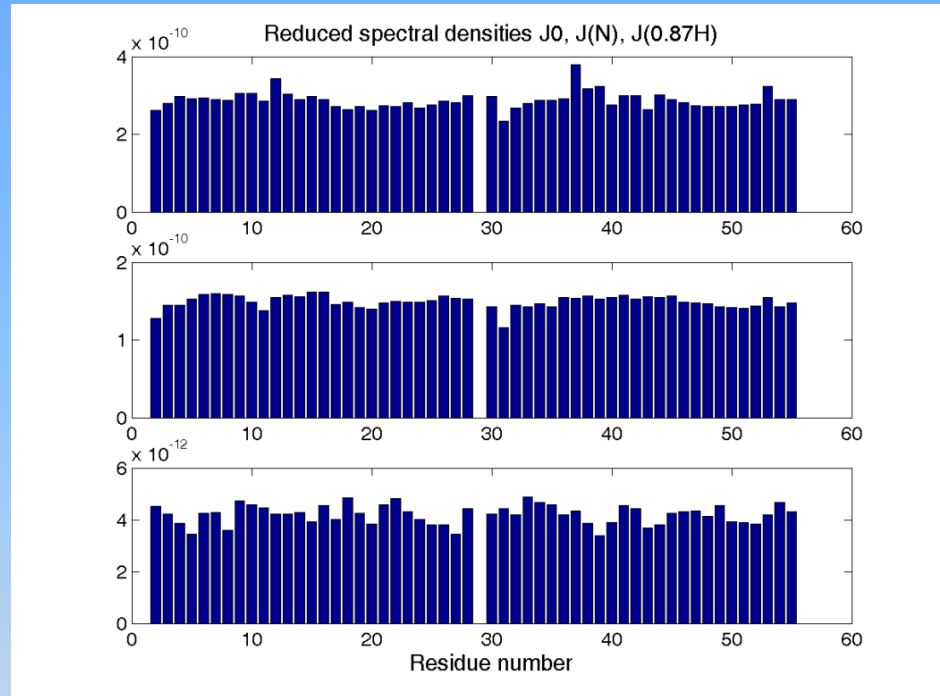
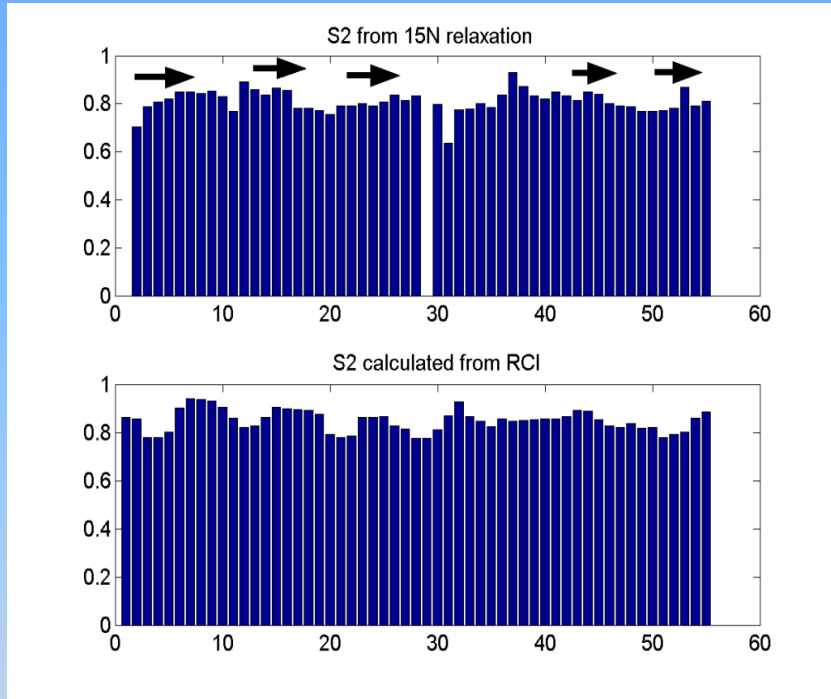
abcabc **abbacc** **abbcac**

7-36	7-36	7- 43
14-43	14-28	14- 28
28-54	43-54	36-54



A PAF NMR dinamikája

^{15}N (T_1, T_2, NOE) alapján monomer: $\tau_c = 3 \text{ ns}$



Kísérleti és várt rend paraméterek **Redukált spektrális sűrűségek**

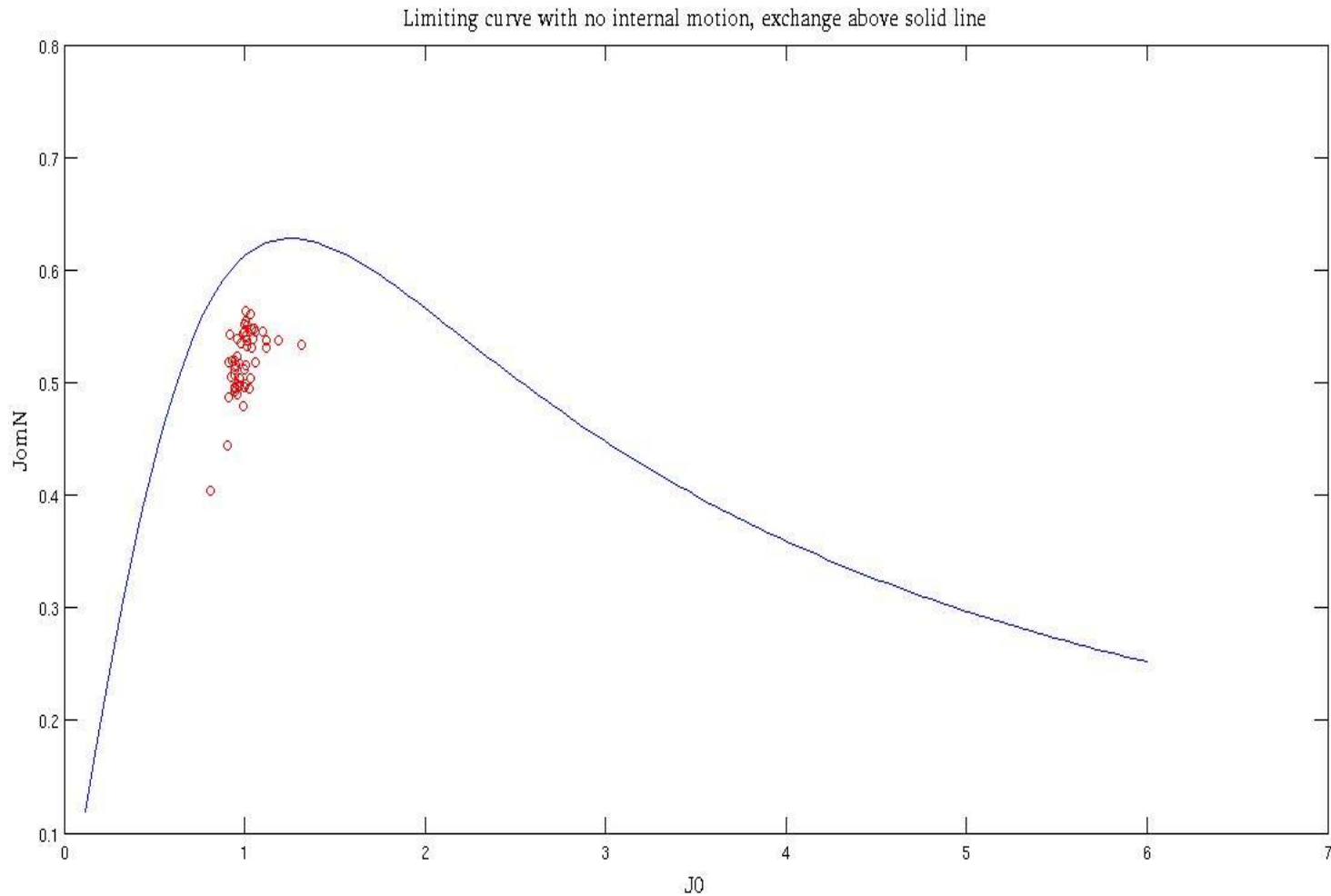
Kísérlet: $S^2 = 0.81 \pm 0.05$

Számított (RCI) $S^2 = 0.84 \pm 0.06$

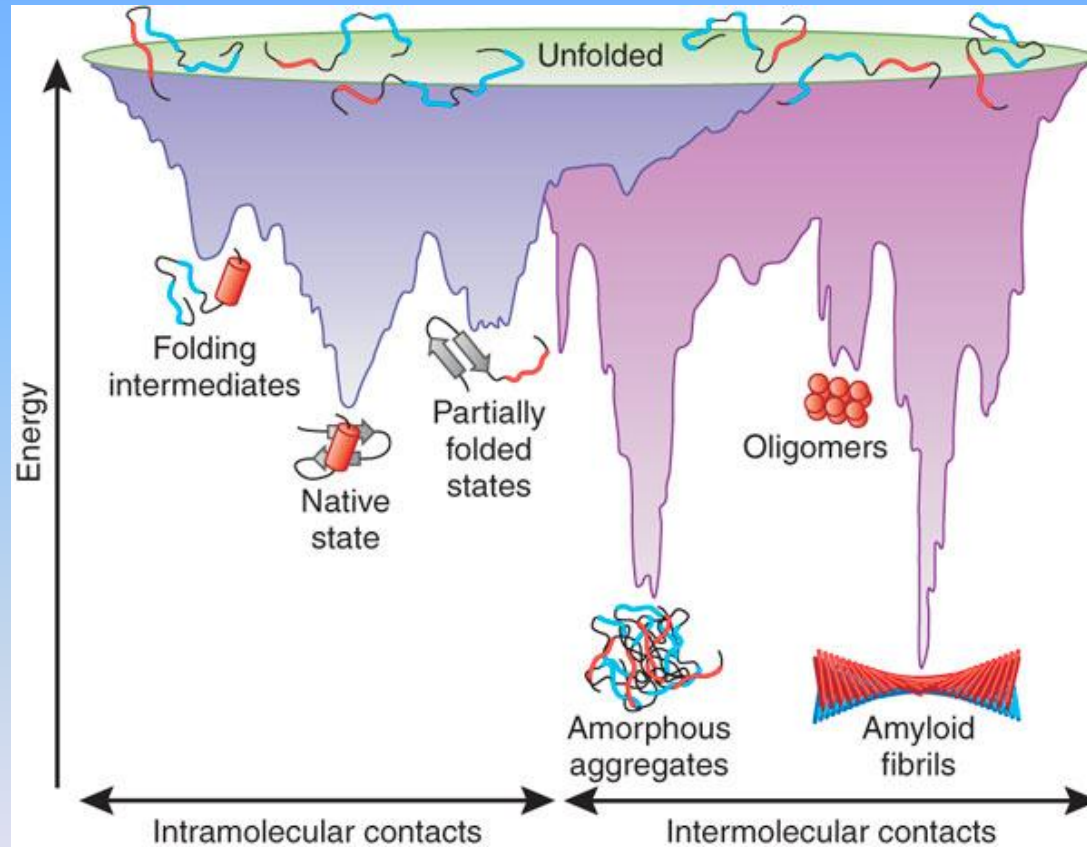
http://wishart.biology.ualberta.ca/rci/cgi-bin/rci_cgi_1_e.py

A redukált spektrális sűrűségek sem jeleznek cserét (31°C)

$$J_{\omega N} = f(J_o)$$



A konformációs (tor)túra lehetséges állomásai: (a natív (aktív?) szerkezet metastabilis!)



F Ulrich Hartl & Manajit Hayer-Hartl : Nature Structural & Molecular Biology 16, 574 - 581 (2009)

„a fehérje sajátosságaihoz az energia tájkép is hozzá tartozik” J. Balbach, 2011

Fehérjék hideg (reverzibilis) kitekérése

Gyakorlati jelentőség:

biokémikusok,
spektroszkópusok
élelmiszeripar

Tudományos jelentőség:

termodinamika,
új molekuláris felismerési modellek

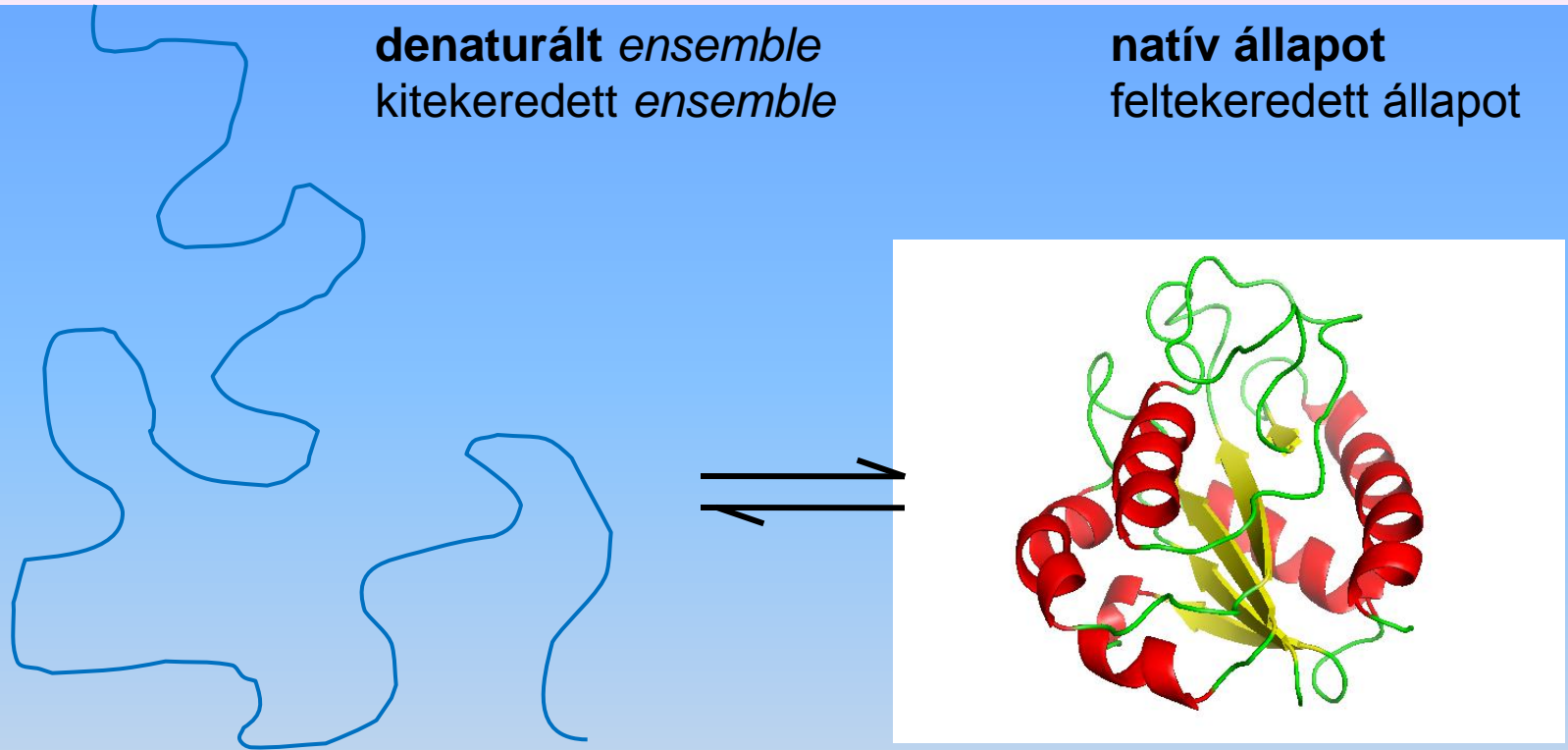
Privalov PL, Critical Reviews in Biochem. and Mol. Biol. 25, 281-305 (1990)

Cordes MH, Lectures, University of Arizona

Temussi PA, JACS, 2007/5374 2008/9963 2009/11662

Wand J, Nat. Struct. Mol. Biol. 2004/352

Natív és denaturált állapotok



sok különböző szerkezet fluktuál;
nem nagyon kompaktnak;
rendezetlenek, de nem is "random coil"



egyetlen szerkezet, vagy nagyon
hasonló szerkezetek ensemble-ja
kompakt

Sok fehérje esetén, **(de nem mindegyik)**, ez a folyamat megfordítható, és populált közbelső állapot nélkül valósul meg -> **"két-állapotú" feltekeredés**

A kitekeredés termodinamikája

A kitekeredés szabad energiája bonyolult módon függ a hőmérséklettől (T).

Az entalpia és az entrópia is hőmérsékletfüggő.

A hőmérsékletfüggést a hőkapacitással írjuk le (ΔC_p).

$$\Delta H_u = \Delta H_u^0 + \Delta C_p (T - T^0)$$
$$\Delta S_u = \Delta S_u^0 + \Delta C_p \ln (T / T^0)$$

entálpia és entrópia
hőmérséklet függőek

$$\Delta G_u = \Delta H_u^0 - T\Delta S_u^0 + \Delta C_p [T - T^0 - T \ln (T / T^0)]$$

beszámít a teljes szabad energiába (Gibbs potenciálba)

T^0 önkéntes referencia hőmérséklet, ΔH_u^0 és ΔS_u^0 az entalpia és entrópia ezen a hőmérsékleten

A kitekeredett fehérje mennyisége $f_u(T)$

ΔG_u a T függvényében

$$\Delta G_u = \Delta H_{u, T_m} (1 - T/T_m) + \Delta C_p [T - T_m - T \ln (T/T_m)]$$

$$K_u = \exp(-\Delta G_u/RT) = [U]/[F]$$

K_{eq} a kitekeredési reakcióra

A ki-és feltekeredett
frakciók cc. aránya

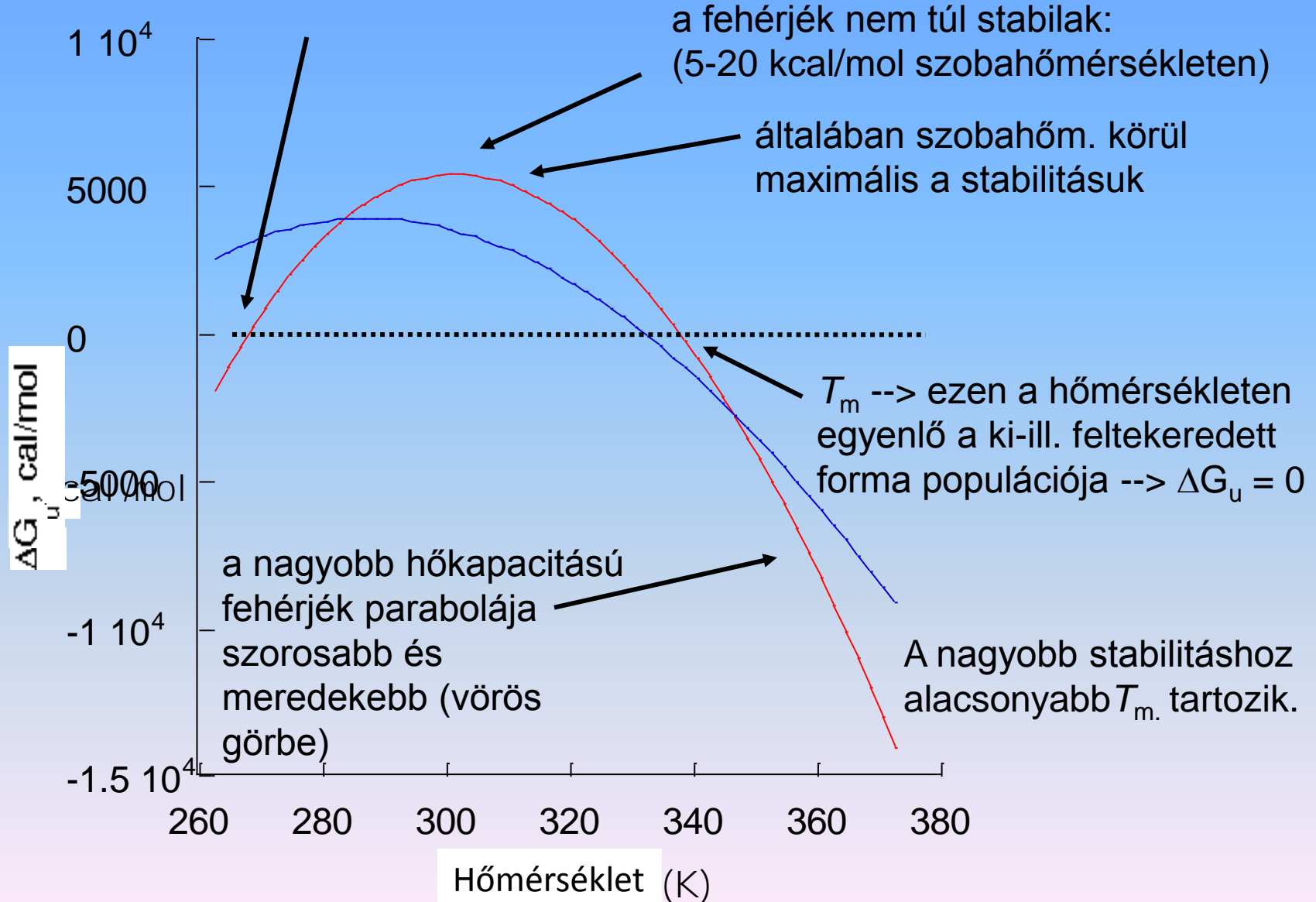
$$f_u = K_u / (1 + K_u)$$

Kitekeredett frakció

Egymásba ágyazott egyenletek

Fehérjék stabilitási görbéi

T_c --> hideg denaturálódási
hőmérséklet, általában fagyáspont alatt



A fehérjék hideg kitekeredésének magyarázata (Privalov)

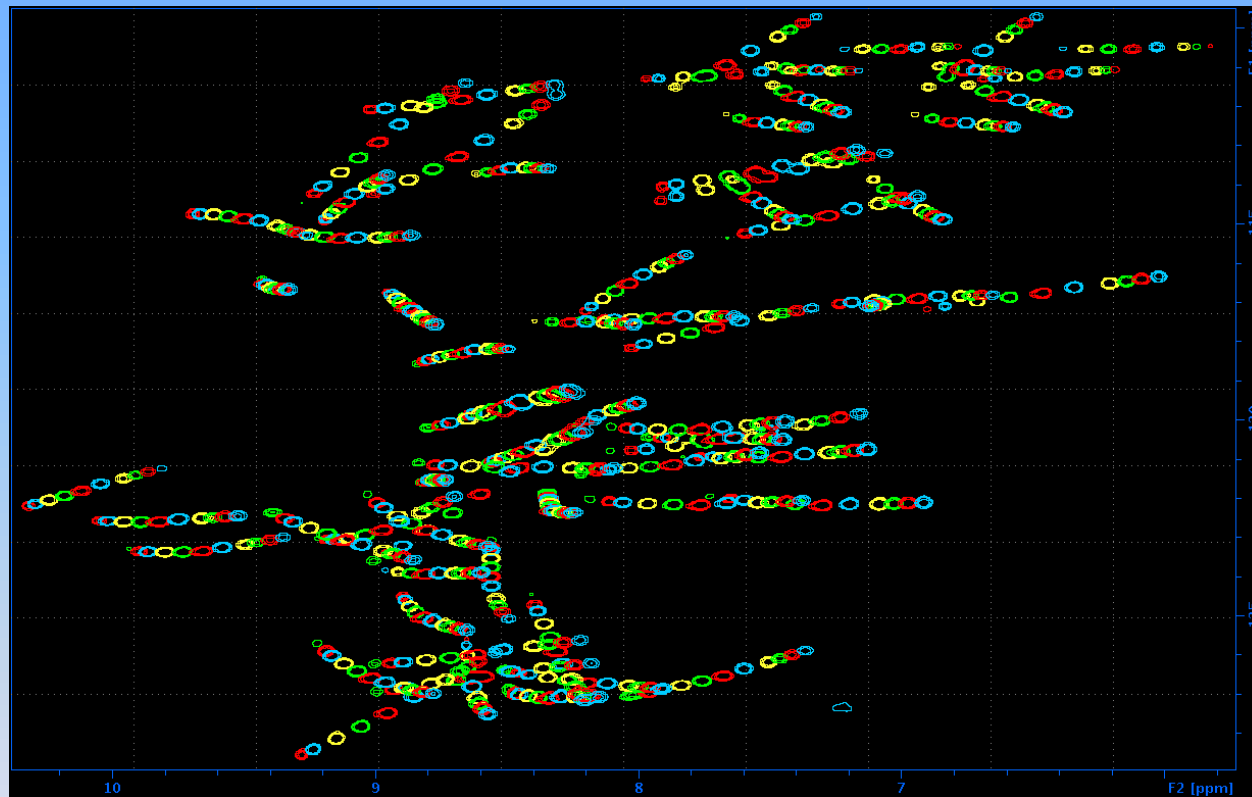
A fehérje apoláros csoportjainak erősen
hőmérsékletfüggő kölcsönhatása a vízzel.

Ezen csoportok hidratációja termodinamikailag
kedvező.

A hidratáció Gibbs szabad energiája negatív és a
hőmérséklet csökkenéssel növekvő mértékű.

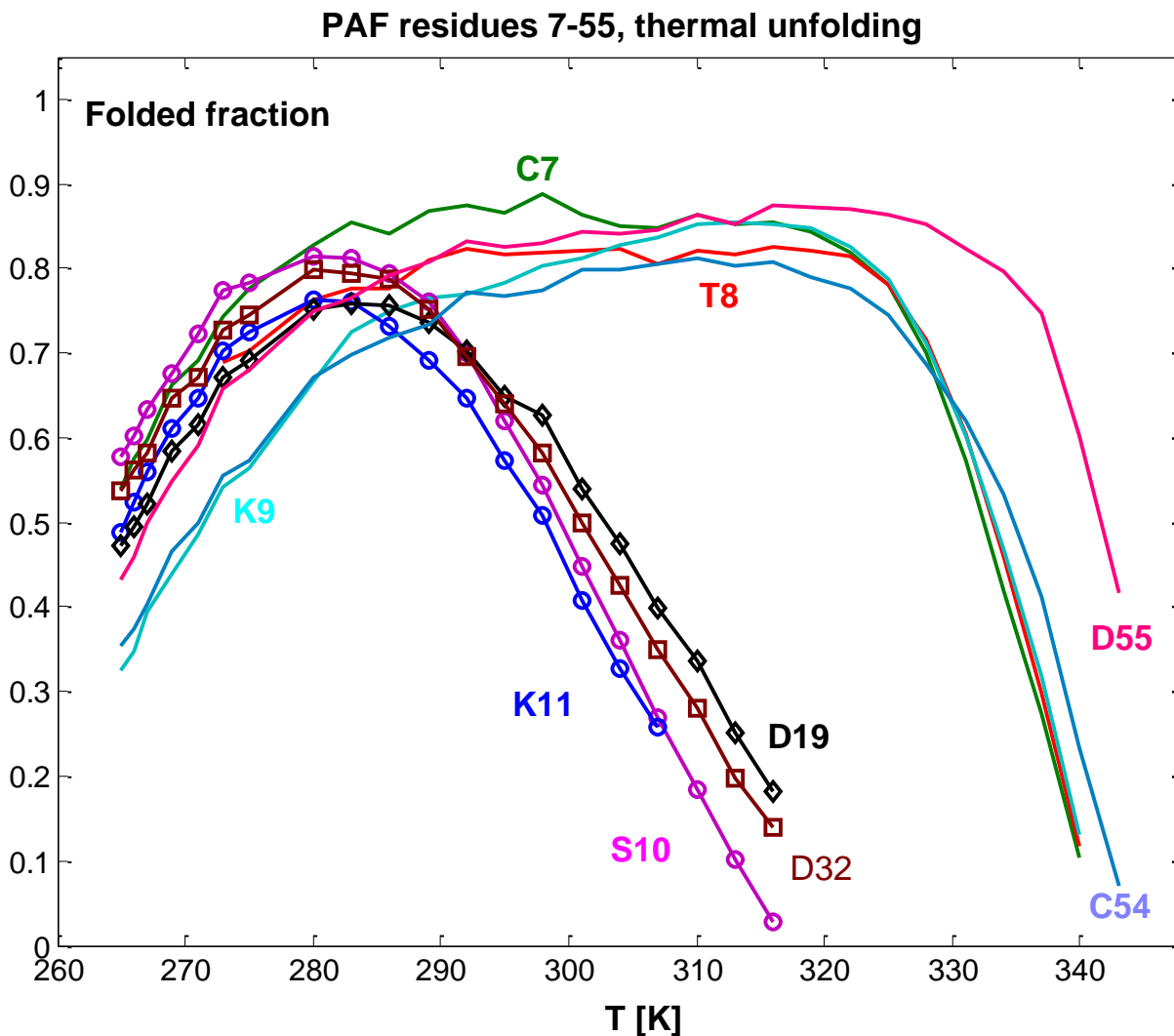
Alacsony hőmérsékleten a fehérje a belső apoláros
csoportokat a víz oldószer felé mozgatja.

^1H - ^{15}N NMR HSQC spektrumokban változó az NH jelek térfogata a 265-344 K hőmérséklet tartományban

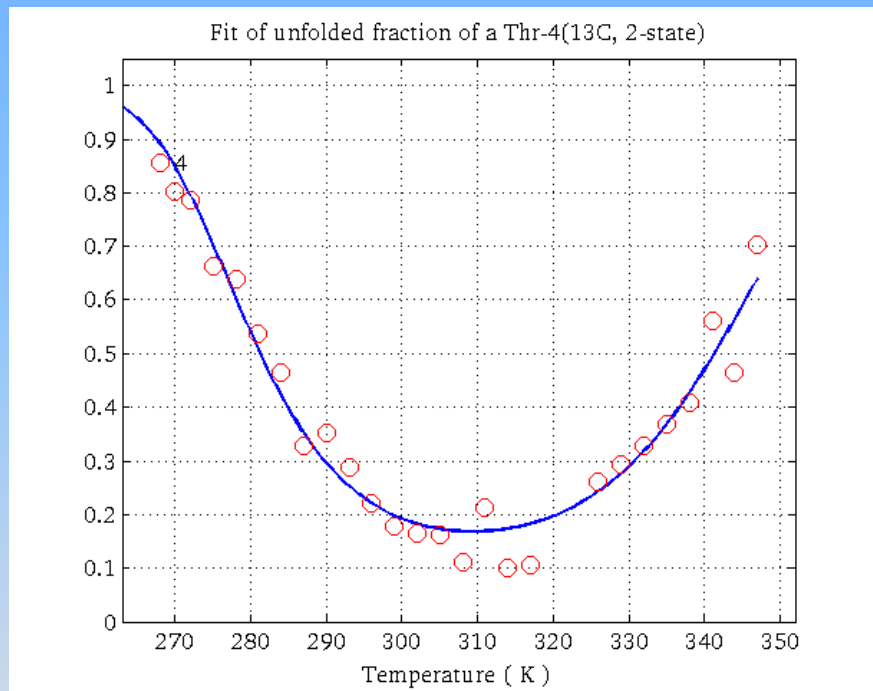


Hogyan adhat NMR „sötét anyagot” egy „sziklaszilárd” fehérje?

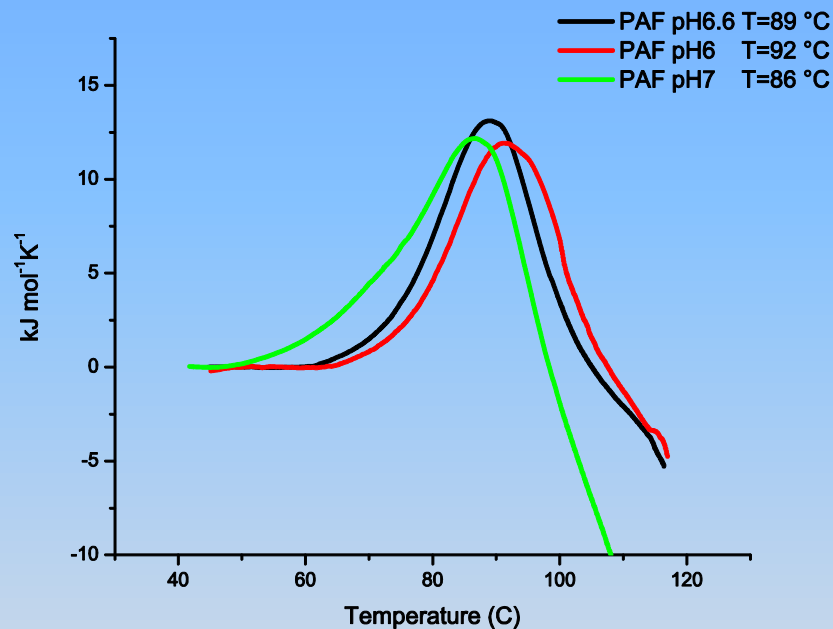
Néhány görbe, amely a *feltekeredett* forma populációját mutatja aminosavanként



Egyéb kísérleti technikák összhangban a ^{15}N -NMR-el



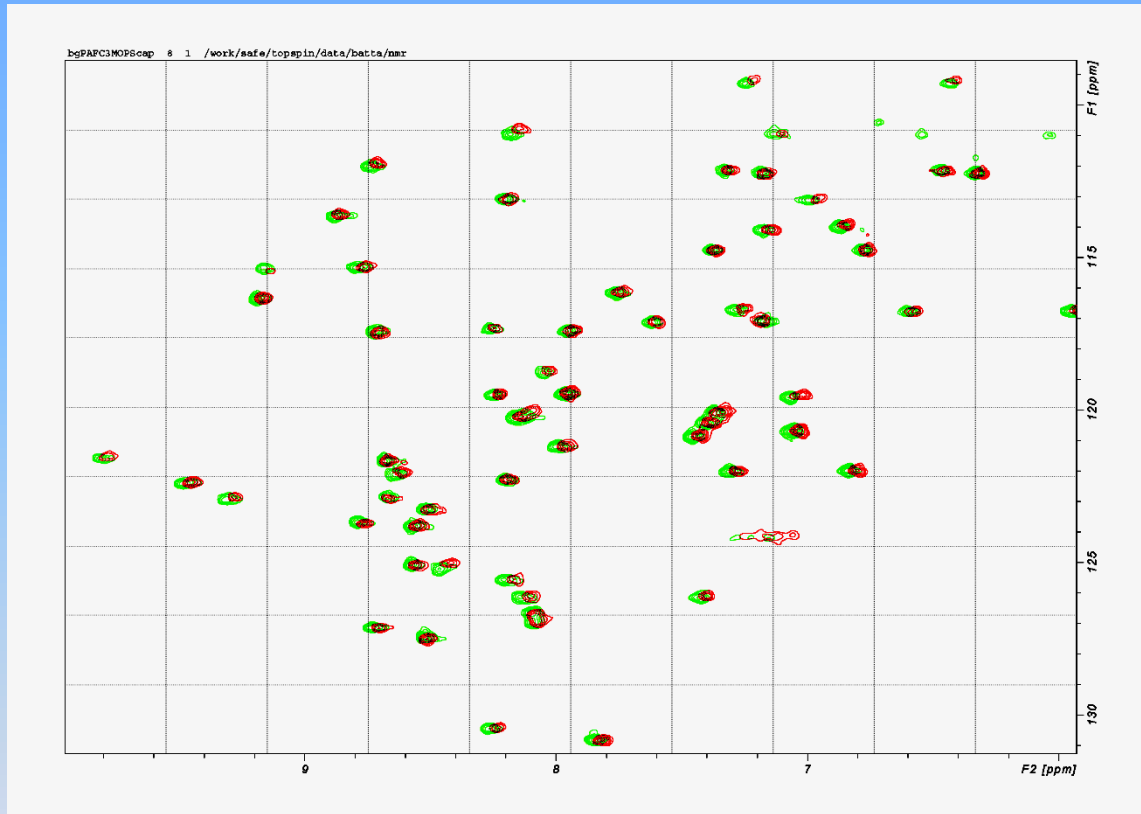
NMR ^{13}C -HSQC



DSC-kalorimetria

Túlhűtés (supercooling)

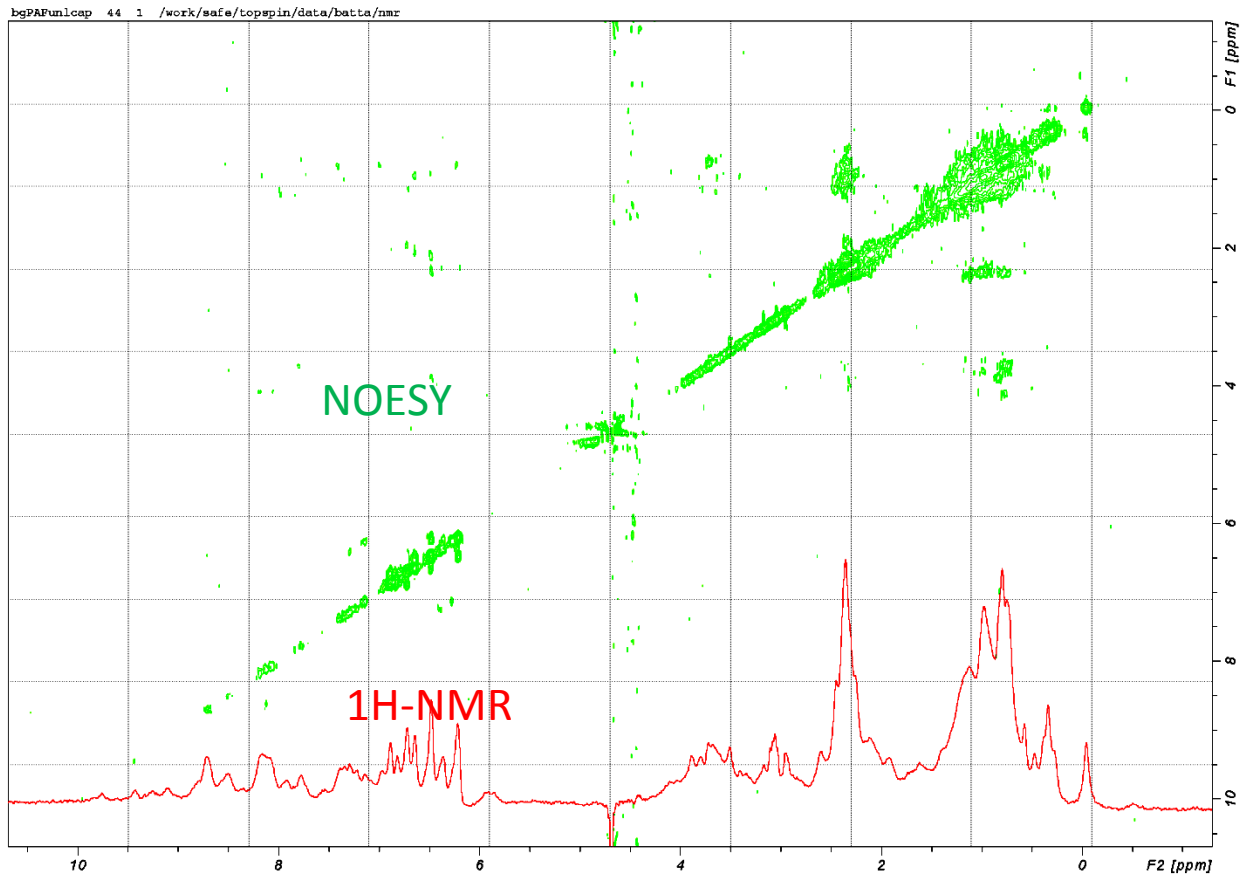
1 mm-es kapillárisokban -5 - 8°C-ig (puffer)



- ^{15}N -HSQC spektrum kollapszusa nem észlelhető
- a feltekeredett, natív forma populációja fokozatosan csökken
- rendezetlen szerkezethez vezető totális kitekeredés nincs



Túlhűtés (supercooling) 1 mm-es kapillárisokban - 15°C-ig (H₂O)



a teljes kitekeredést nem engedik a diszulfid hidak

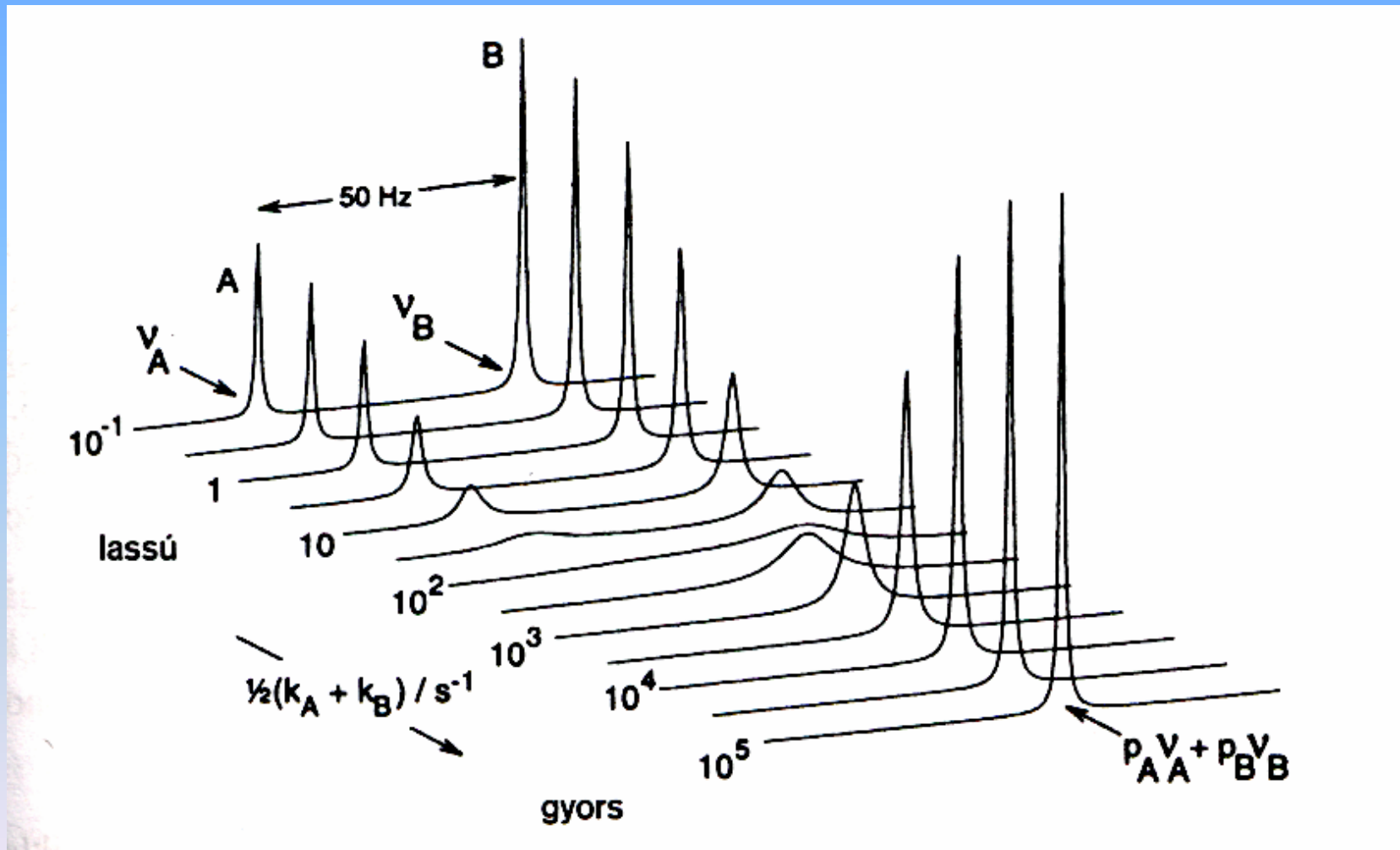
Hogyan magyarázhatók az NMR spektrumok?

A fő konformer *közepes-lassú cserében* lehet az alternatív konformerekkel az NMR kémiai eltolódás különbség időskálán.

Néhány, alacsony populációjú, nem natív szerkezet létezhet egyszerre, azonban ezek nem átlagolódnak egyetlen, kitekeredett konformerré - ezért a detektálási küszöb alatt maradnak.

A kémiai eltolódások nem változnak ugrásszerűen a hőmérséklet függvényében (kísérleti tény). Nem lehet tiszta kéthelyű csere.

Konformációs csere tankönyvi példa (Hore, P.J.) (hirtelen kémiai eltolódás ugrás várható kéthelyű cserénél)



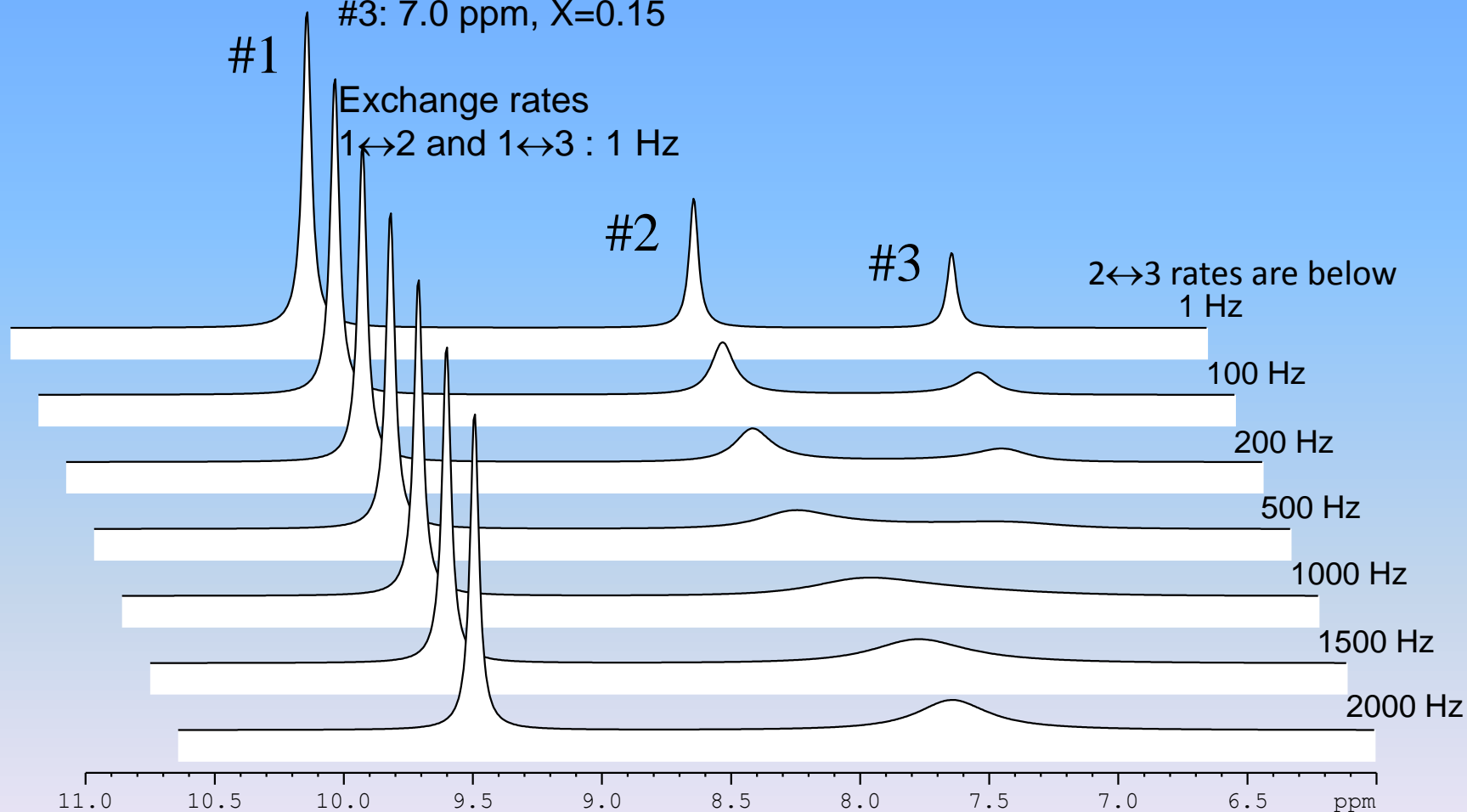
Három-helyű csere szimuláció: 1-x lassú, 2-3 változó

LB=20 Hz

#1: 9.5 ppm, X=0.60

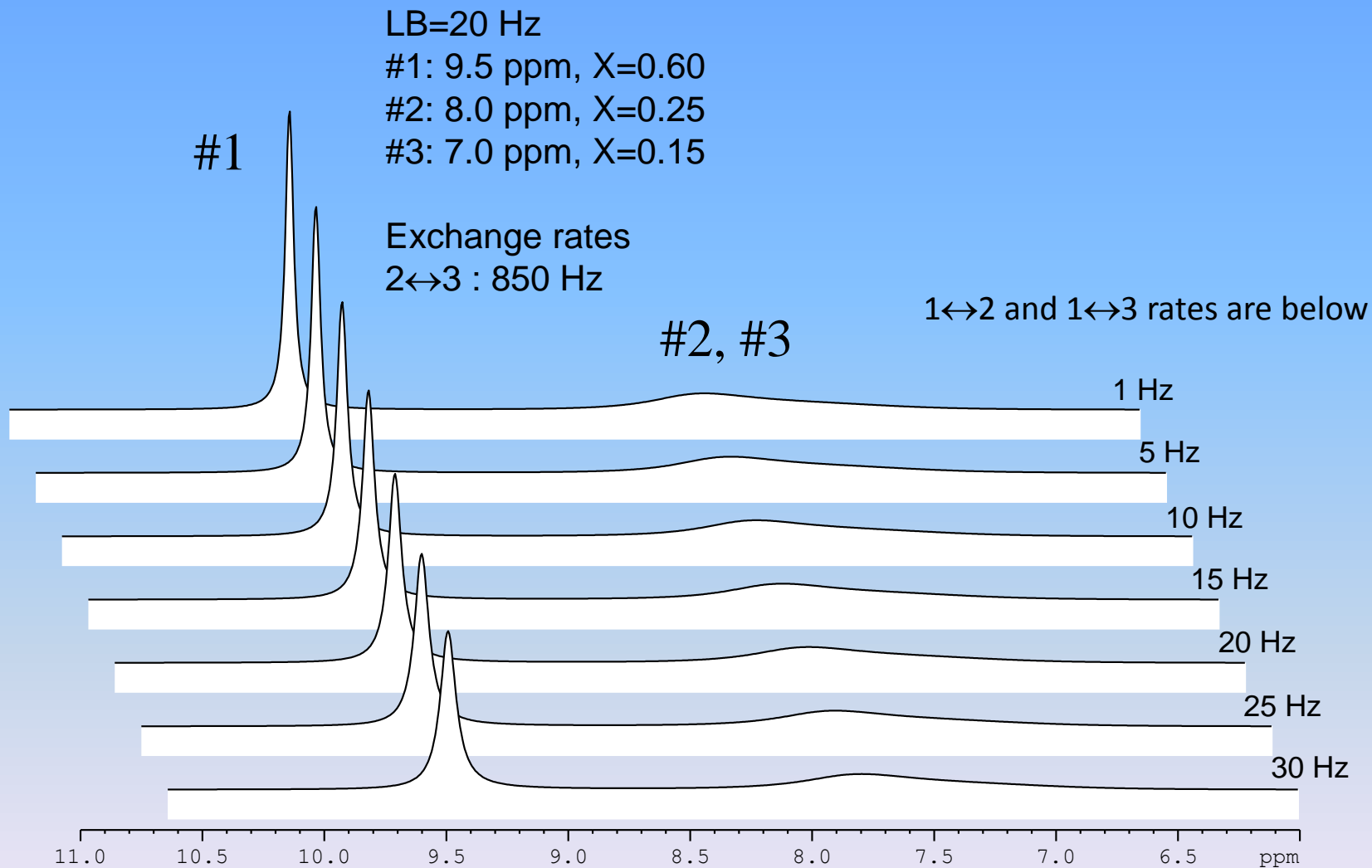
#2: 8.0 ppm, X=0.25

#3: 7.0 ppm, X=0.15

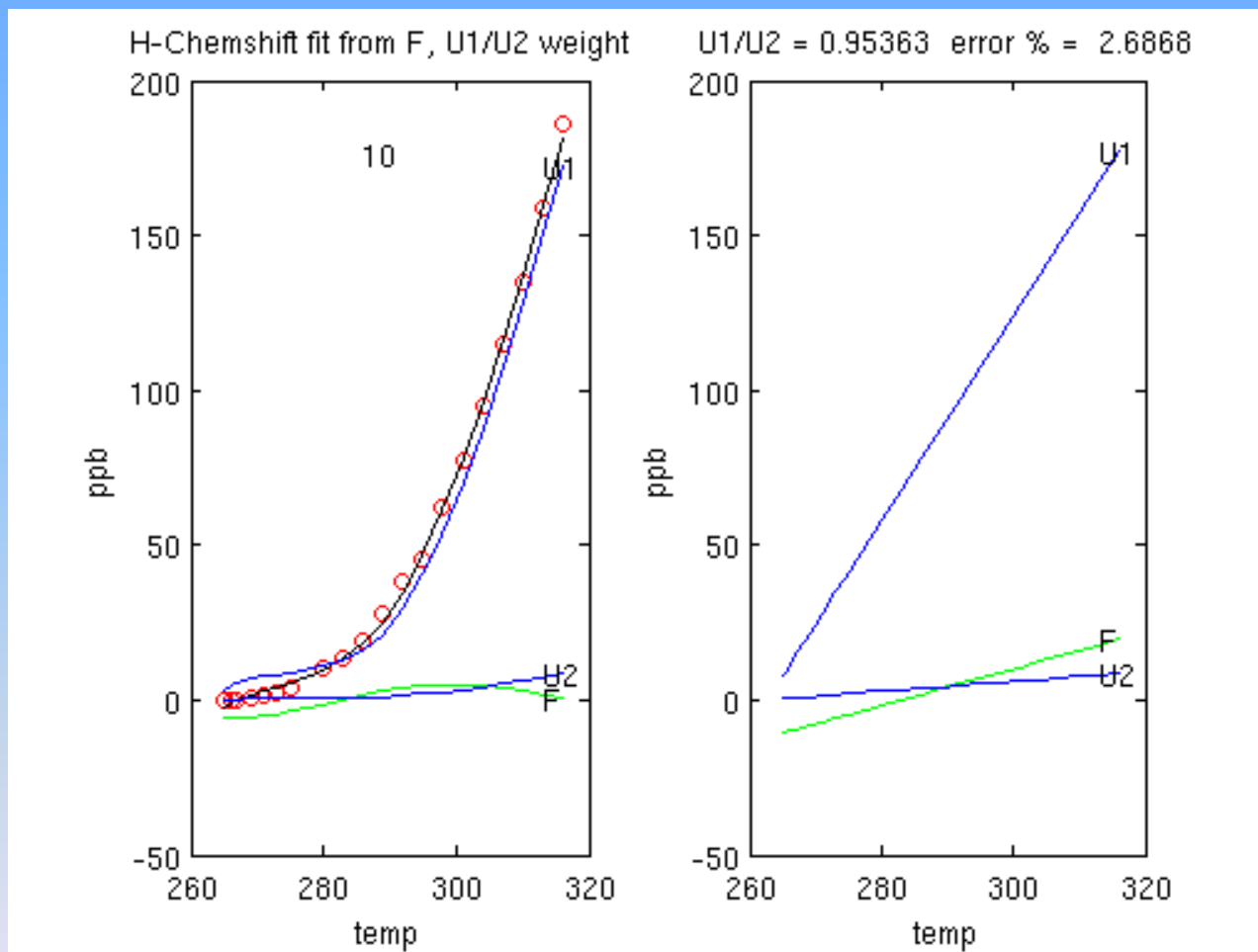


Bruker, J. Rohonczy

Három-helyű csere szimulációk: 1- x lassú, 2-3 közepes

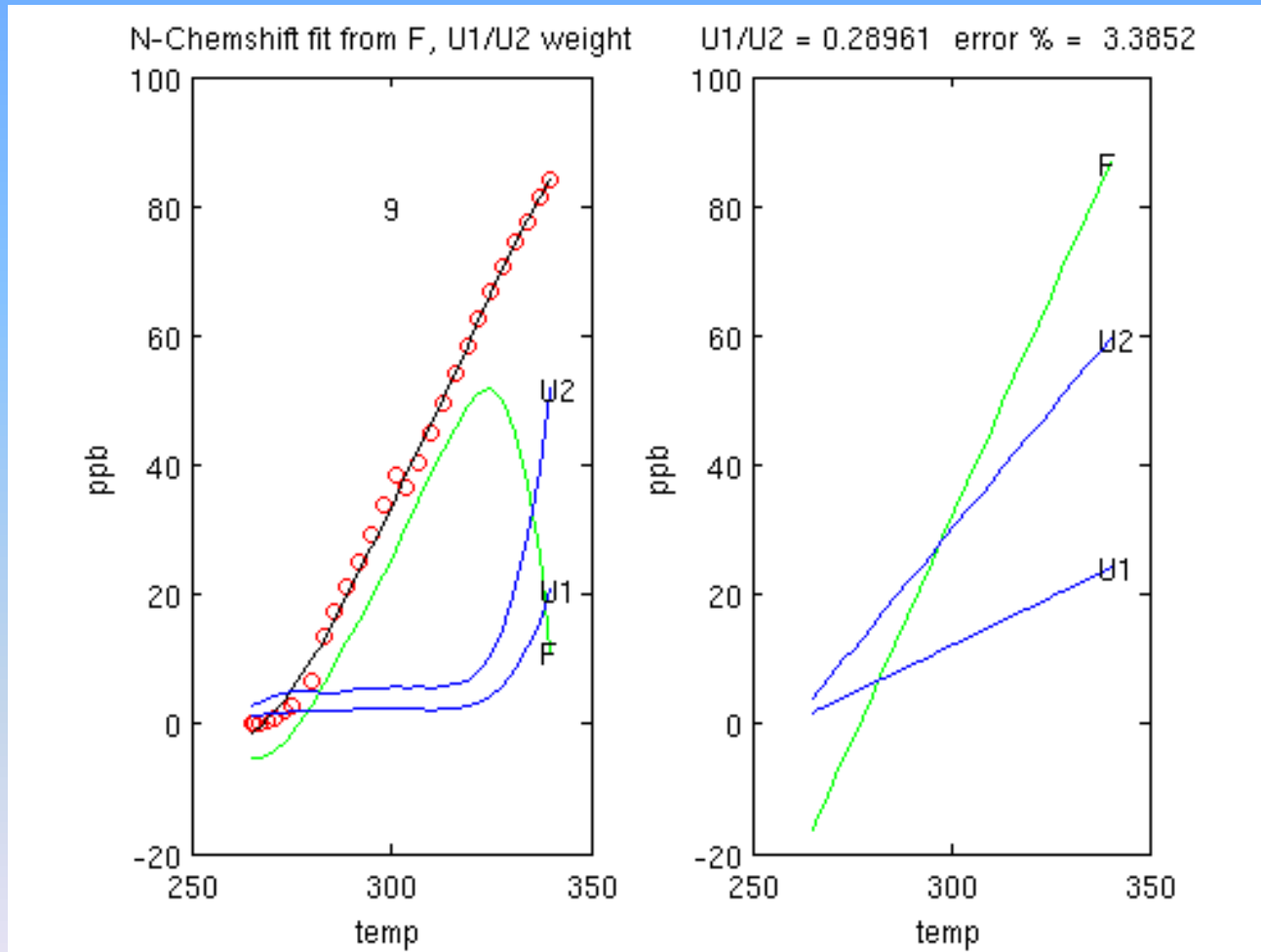


Az ^1H kémiai eltolódások hőmérséklet függésének illesztése 3-állapotú modellel



Illesztés (Ser-10): $U1/U2 = \text{const.}$

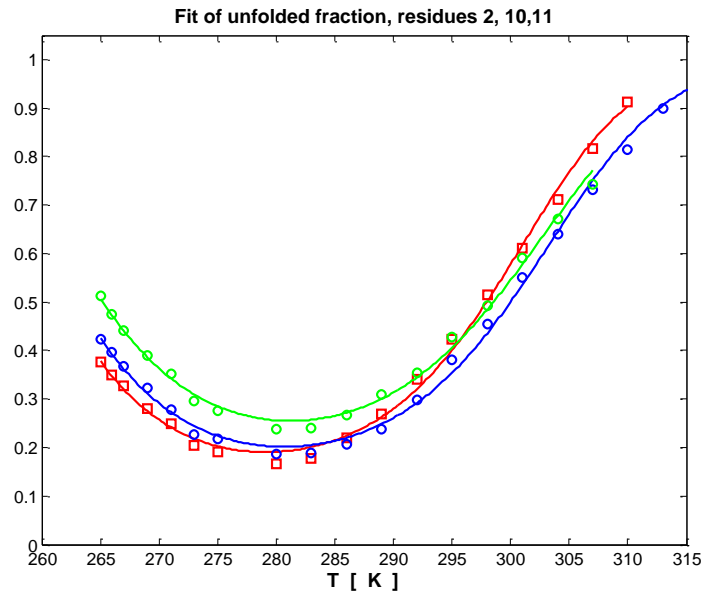
A ^{15}N kémiai eltolódások hőmérséklet függésének illesztése 3-állapotú modellel



Illesztés (Lys-9) : $U1/U2 = \text{const.}$

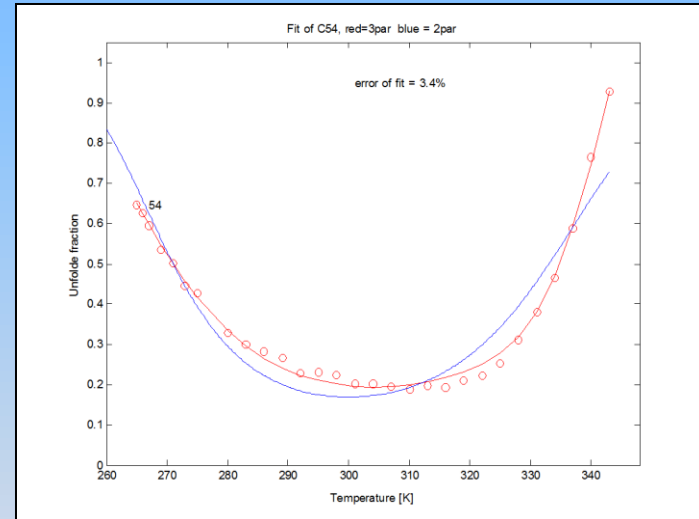
Kettő vagy háromállapotú kitekeredés ?

Kétállapotú modell pl.
K2, S10 and K11.



kétállapotú modell, $F \leftrightarrow U$

Háromállapotú modell pl. C54

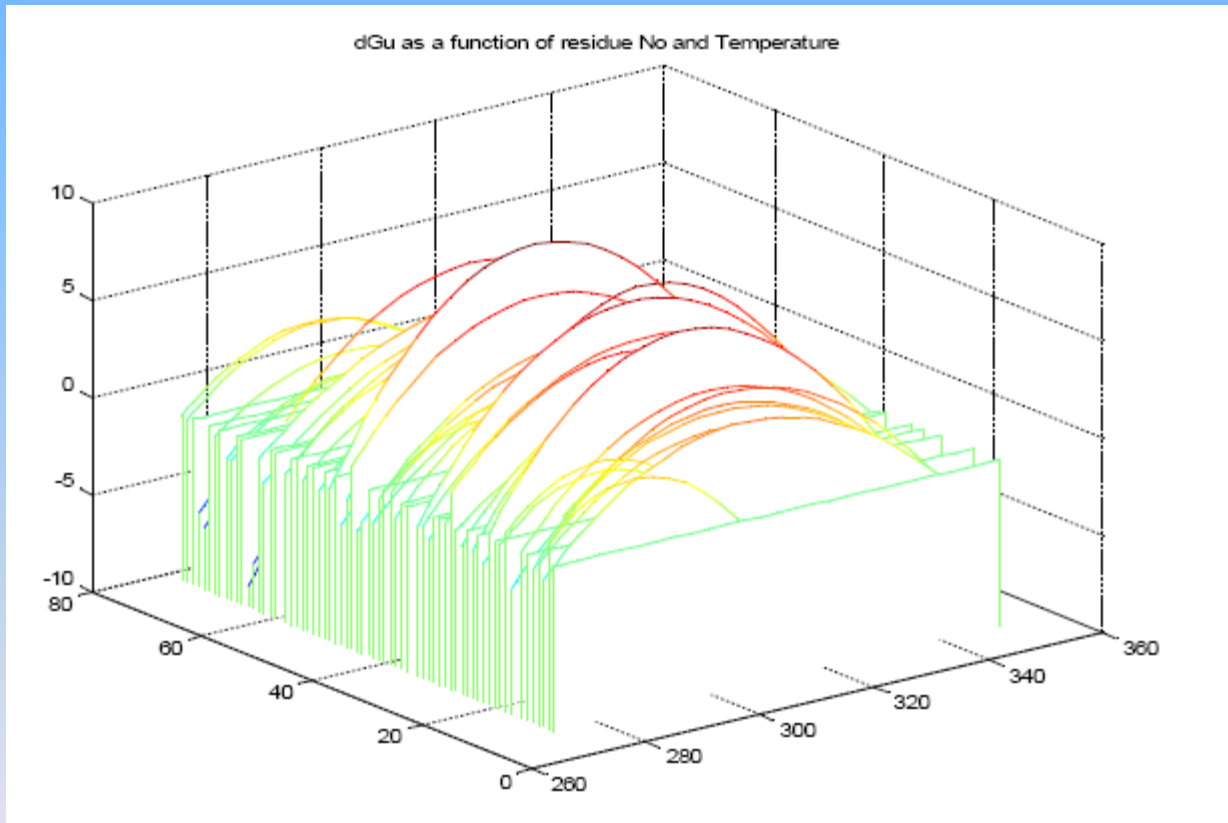


háromállapotú modellek: $F \leftrightarrow I \leftrightarrow U$

$F \leftrightarrow U1$

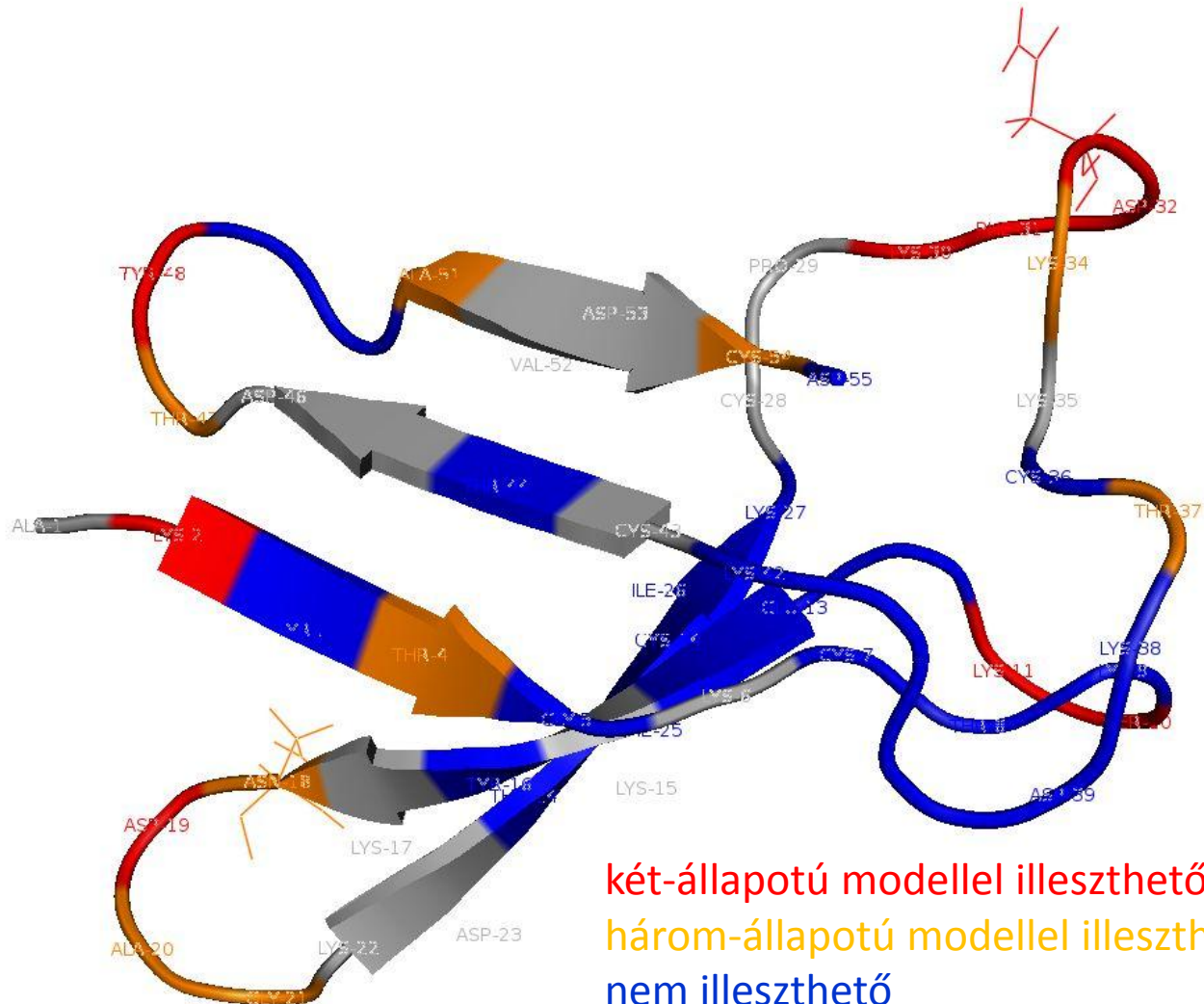
$F \leftrightarrow U2$

Gibbs szabad-energia változás (ΔG) = f (T) [kJ / M]



Két csoport azonosítható a maximális stabilitású hőmérséklet szerint
(kétállapotú modell szerint illesztve)

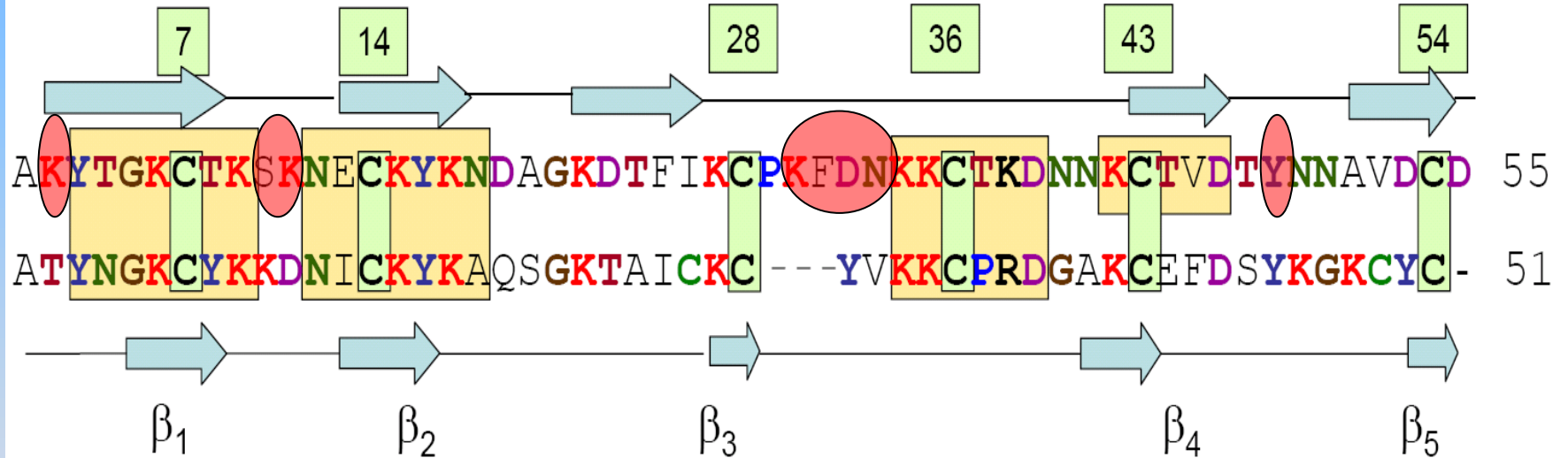
PAF kitekeredési régiók



két-állapotú modellel illeszthető
három-állapotú modellel illeszthető
nem illeszthető
nincs adat

Homológok: PAF és AFP

(„hőre érzékeny” egységeket piros pötty jelöli a PAF-ban)



Összegzés

1. Sok „feltekeredett” fehérje oldatfázisban reverzibilis, termikus egyensúlyban van a részlegesen kitekeredett konformerekkel.
2. A PAF esetében a totális hideg kitekeredés a diszulfid hidak miatt nem valósul meg.
3. A PAF korlátozott hideg kitekeredése az egész fehérjében szinkronizált, ellentétben a magas hőmérsékletűvel.
4. A PAF különböző régióinak termikus kitekeredését két és három állapotú modellekkel lehet leírni.
5. A PAF hőmérsékleti sokkra legérzékenyebb régiói nem konzerváltak és inkább a kétállapotú modellel követhetők.

Köszönet

Barna Teréz

Bodor Andrea (ELTE)

Fizil Ádám

Galgóczi László (Szeged)

Gáspári Zoltán (PPKE)

Gyémánt Gyöngyi

Kele Zoltán (Szeged)

Kövér Katalin

Leiter Éva

Florentine Marx (Innsbruck)

Nyitrai Mónika

Pócsi István

Tomori Valéria

Tóth Gábor (Szeged)

Váradi Györgyi (Szeged)

OTKA CK 77515

TÁMOP 421 B/09

Osztrák-Magyar Akció

Alapítvány OMAA 79u1