

Rendezett és rendezetlen fehérjeszerkezetek összehasonlítása spektroszkópai módszerekkel

1. Célkitűzések

A projekt célja a nemrégiben az érdeklődés fókuszába került rendezetlen fehérjék (intrinsically unordered protein, IUP) szerkezetének vizsgálata és a rendezett fehérjék viselkedésével való összehasonlítása volt, különböző fizikai és kémiai körülmények között. A fizikai paraméterek tekintetében a nagy nyomás jelentett specialitást. Széles hőmérsékleti és nyomástartományban, ill. különböző kémiai ágensek, kozmotróp anyagok jelenlétében vizsgáltuk, hogy a rendezetlen fehérjékben tudunk-e rendezett szerkezetet indukálni lokálisan vagy akár globálisan. A már rendezett fehérjék esetén a rendezett szerkezet stabilitásának vizsgálata, a p-T fázisdiagram széles hőmérsékleti és nagy nyomástartományban való meghatározása volt a feladat.

2. Eredmények

2.1 Mintakészítés

A kutatás első fázisában a legnagyobb kihívást az elsődleges modellfehérjeként szolgáló titin PEVK különböző fragmentumainak biotechnológiai kifejezése és tisztítása jelentette. A korábbi "egyedi-molekula mérésekkel" szemben az infravörös spektroszkópia ugyanis jelentős mennyiségű (néhány mg) fehérjét igényel. Ez megkövetelte az expresszási eljárás optimalizálását, sőt az egyik esetben (polyE) még a gént is optimalizáltuk az *E. coliban* a fehérjeszintézist lassító ritka kodonok elkerülésére.

A polyE fragmentumot és a PEVK egy hosszabb fragmentumát (PEVK I) állítottuk elő az infravörös mérésekhez megfelelő mennyiségben.

2.2. Rendezetlen fehérjék.

2.2.1. Titin:

2.2.1.1. PolyE fragmentum

Ezen a fragmentumon kezdtük el az infravörös spektroszkópai méréseket. Az infravörös spektrumok kiértékelése visszaigazolta a polipeptid lánc random szerkezetét fiziológias pH-n normál körülmények között (atmoszferikus nyomáson és szobahőmérsékleten). A rendelkezésre álló nyomáscellában 1,6 GPa (16 kbar) nyomásig illetve 0-100 °C hőmérsékletig vettük fel a fázisdiagramot, de kooperatív szerkezetátalakulást nem tapasztaltunk. Méréseinket megismételtük a fehérje izoelektromos pontjához közeli pD3-as ill. attól távoli pD10,5-es értékeken, ahol ugyanilyen eredményre jutottunk. (1)

Bár ugrásszerű fázisátalakulás nem volt detektálható egyik esetben sem, a folytonos spektrális változások a polipeptid lánc szerkezeti paramétereinek eltolódását mutatják mind a hőmérséklet, mind pedig a nyomás növelése esetén.

Mivel a fehérjék kalciumkötő zsebében tipikusan jelen van glutaminsav, amely a PEVK egyik fő alkotóeleme, felmerült, hogy kalcium hozzáadása a Ca^{2+} -kötő zsebez hasonló szerkezetet indukál. Kísérleteinkben megnövelt Ca^{2+} koncentrációt alkalmazva (3M CaCl) sem találtunk olyan spektrális változást, amely egyértelműen konformációs változást mutatna, bár a glutaminsav oldalláncok Ca^{2+} -kötésre érzékeny aszimmetrikus COO^- rezgése a Ca^{2+} ún. „kétfogú” kötődését jelezte. Ez azonban nem indukált olyan másodlagos szerkezetet, amelynek az infravörös spektruma az amid I sávban unikális jelet mutatott volna (publikáció előkészületben).

A polyE szekvencia egyik végén található cisztein aminosav felhasználásával fluoreszcensen jelöltük a polipeptid láncot, hogy a tirozinnal való FRET-en keresztül nézzük az esetleges Ca^{2+} hatására történő gombolyodást. Ilyen effektust nem tapasztaltunk.

A polyE számos prolin aminosavat tartalmaz, ezért felmerült, hogy esetleg poliprolin hélix típusú szerkezetek alakulhatnak ki benne. Ennek eldöntésére az infravörös spektroszkópiában szokásos D_2O -s oldat helyett H_2O -s oldatban végeztük az infravörös méréseket. Az 1458 cm^{-1} -es sáv, ami a poliprolin hélixre jellemző vibrációt mutatta volna, nem volt megfigyelhető. Ez azt mutatja, hogy a szekvenciában levő viszonylag rövid poliprolin szekvenciák nem elegendőek a poliprolin hélix kialakulásához.

2.2.1.2. Titin PEVK I szegmens

A titin rendezetlen PEVK régiójának mintegy harmadát tartalmazó PEVK I szegmensének fázisdiagramját a 0-1 GPa (0-10 kbar) tartományban és 25- 75 °C tartományban vettük fel. Az infravörös spektrumok analízise alapján hőmérséklet vagy nyomásindukált szerkezeteket nem detektáltunk.

A PEVK I szegmens tartalmaz egy triptofán aminosavat, ami lehetővé tette ennek a polipeptidnek a fluoreszcens vizsgálatát. A triptofán spektruma minden vizsgált hőmérsékleten (25-90°C) a vizes környezetre jellemző volt. (1)

A strukturális változások indukálására több kísérletet is tettünk: CaCl (0-2M) hozzáadásával nem változott a triptofán környezete. Ugyanígy TFE hozzáadása (30%-ig) sem hozott ugrásszerű változást. Fiziológias NaCl valamint 0,2 M CaCl együttes adása mellett a triptofán jel hőmérsékletfüggése ugyanolyan volt, mint amit a rendezetlen szerkezetű polipeptid lánc triptofánja mutat a hőmérséklet hatására, ami azt jelzi, hogy a triptofán környezetében nem indukálódott olyan szerkezet, amely annak polaritását megváltoztatta volna. (1)

2.2.1.3. Titin, rövid polipeptid láncok: PEVK11 és PEVK21.

A hosszabb PEVK fragmentumok tanulmányozása mellett lehetőségünk nyílt a PEVK egyes rövidebb (11 ill. 21 aminosavat tartalmazó) peptidjeinek infravörös spektroszkópiai vizsgálatára. Ezek a rövid láncok szintetizálva álltak rendelkezésre.

A 0-100°C hőmérséklettartományban végzett infravörös mérések során a konformáció-érzékeny amid I rezgés hőmérséklet függvényében történő eltolódásának meredeksége ($\partial\nu/\partial T$) eltér a korábban mért nagyobb fragmentumok (pl. a polyE) esetén mért értéktől. Ez arra utal, hogy a peptid szakasz flexibilitása kisebb, mint a nagyobb fragmentumoké, ami alátámaszthatja lokálisan stabil szerkezet kialakulását. (publikáció előkészületben)

2.2.2. Az Rv3221c „rendezetlen fehérje”?

A vizsgált rendezetlen fehérjék körét is kiterjesztettük. Az Rv3221c jelű, a *Mycobacterium tuberculosis* baktériumban előforduló fehérje irodalmi adatok szerint a rendezetlen fehérjék családjába (IUP =intrinsically unordered proteins) tartozik. Nemrégiben egy érdekes publikáció jelent meg arról, hogy az Rv3221c fiziológias körülmények között rendezetlen szerkezetű, de magasabb hőmérsékleten rendezett struktúrát vesz fel. Ez a meglepő eredmény a p-T fázisdiagramon normál esetben a fiziológias állapot környékén található elliptikus natív régió eltolódására utalt. A cikk szerzőitől sikerült hozzájutni a fehérjéhez, és a vizsgálatokat az irodalmilag leírt hőmérsékletfüggés mellett a nyomásfüggésre is kiterjeszteni. Méréseink azonban meglepő módon azt mutatták, hogy a fehérje rendelkezik feltekeredett szerkezettel fiziológias hőmérséklet- és nyomástartományban. Megállapítottuk, hogy a fehérje másodlagos szerkezetében béta lemezes struktúra dominál. Ez megegyezik az általunk végzett számítógépes homológia modellezéssel kapott eredményekkel. Magas hőmérsékleten viszont a fehérje (az irodalomban leírtakkal ellentétben) nem feltekeredik, hanem elveszti a meglévő másodlagos szerkezetét. Ugyancsak denaturáció mérhető nagy nyomáson is, 30 °C-on 530

MPa-nál van az átmenet középpontja. Meghatároztuk a p-T fázisdiagramot, ami a hagyományos Hawley-féle elliptikus kontúrt követi. Rámutattunk, hogy a (CD spektroszkópián alapuló) hibás irodalmi következtetések oka a biotin kötődése volt, ami feltehetőleg befolyásolta a CD jelet, mint azt egy nemrégiben megjelent publikációban is leírták. (2)

2.2.3. PolyGlu és PolyAsp

A PEVK jelentős mennyiségű glutaminsavat tartalmaz (az aminosavak kb 1/4-e glutaminsav), ezért ennek modelljeként megvizsgáltuk az egyszerű poliglutaminsav polimert is, ami nagyobb mennyiségben állt rendelkezésre. Az infravörös spektrum itt is rendezetlen szerkezetet mutatott, ami nagy nyomás esetén nem változott jelentősen, de 80°C felett alacsony pD-n (pD4) aggregálódott. Hasonló eredményre jutottunk a poliaszparaginsav vizsgálatánál is. (publikáció előkészületben).

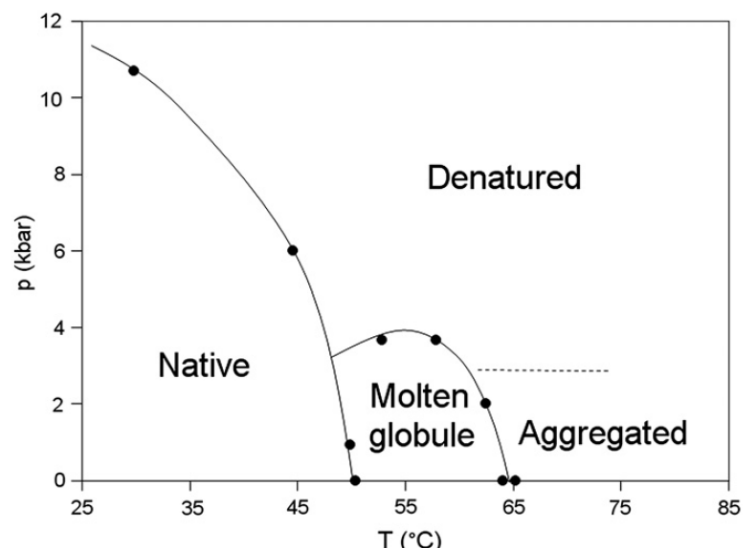
2.3. Rendezett fehérjék

2.3.1. Titin immunoglobulin domén

Összehasonlító jelleggel megvizsgáltuk a titin molekula egy másik tipikus építőelemét az I27-es immunoglobulin domént. Ez bár feltekeredett szerkezettel rendelkezik, mechanikai hatásra kitekerhető, mint az a társ pályázók (KM) korábbi egyedi molekula erőspektroszkópiai méréseiből kiderült. Meghatároztuk az I27 nyomás-hőmérséklet fázisdiagramját. Infravörös és fluoreszcens mérések kombinációjával bebizonyítottuk, hogy a fehérje 50 °C feletti hőmérsékleten (kb. 4 kbar nyomás alatt) egy molten globula szerkezetet vesz fel. Ha a fehérje ezen a szerkezeten keresztül lép át a hődenaturált állapotba (65°C-on), akkor bekövetkezik az aggregációja, amely irreverzibilis módon meghatározza a fehérje további szerkezetét. Amennyiben némileg megemelkedett nyomáson ($p > 3,7$ kbar) történik a denaturáció, a molten globula szerkezethez tartozó fázist kikerüljük és az aggregáció sem következik be.

A molten globula szerkezet igazolására a fluoreszcencia technikát is felhasználtunk. Erre az adott lehetőséget, hogy az I27 domén béta szendvics szerkezetének belsejében található egy triptofán, amely natív állapotban teljesen el van zárva az oldószertől. A triptofán emissziós spektrumának eltolódása egyértelműen jelezte az olvadt gombóc állapot kialakulását 50°C felett.

AFM (atomerő mikroszkópia) mérésekkel igazoltuk, hogy az I27 normál körülmények között nem aggregálódik, valamint azt, hogy a hődenaturáció során aggregált minta nem alkot amiloid szálakat. Ezek az AFM-es eredmények egybeestek az infravörös spektrumok analíziséből kapott információkkal és teljes mértékben megerősítették azokat. (1)



2.3.1. Egyes rendezetlen fehérjék a target fehérjéjükhöz történő kötődésük során vesznek fel jól definiált szerkezetet. A rendezetlen polipeptid láncoknak a rendezett szerkezetekkel való összehasonlítása során olyan rendezett fehérjéket is vizsgáltunk, melyek fontos szerepet játszanak bizonyos molekuláris felismerési folyamatokban. Erre ideálisnak tűnt egy, a munka

során szinte véletlenül a látókörünkbe került fehérje, amely az allergén reakciókban játszik szerepet. Az ilyen fehérjék gyakran tartalmaznak nagyobb rendezetlen szerkezeteket, melyek csak az antigénhez való kapcsolódáskor rendeződnek.

Az alma allergén fehérjéjén (Mald1) végzett méréseink a fehérje részlegesen rendezett struktúráját mutatták ki, amely főleg béta szerkezetet rejt magában. A szerkezet azonban különösen nyomás-érzékenynek bizonyult. A pH és az ionkoncentráció hatását vizsgáltuk a szerkezet nyomásstabilitására. Megállapítottuk, hogy a fehérje egy olyan unikális tulajdonsággal rendelkezik, hogy a nyomásdenaturáció után magas nyomáson is aggregálódik. Ez a viselkedés eddig semmilyen más fehérjénél nem volt megfigyelhető, és teljesen egyedinek számít. A jelenség okaként a viszonylag alacsony nyomáson történő denaturációt, és a fehérje túlnyomóan béta lemezes szerkezetét valószínűsítettük. Az alacsony nyomás (170-250 MPa a pH-tól, cukor és ionkoncentrációtól függően) még nem képes megakadályozni, hogy az éppen kitekeredő lánc intermolekuláris béta szerkezetű amorf aggregátumokat hozzon létre, és ezek annyira stabilak, hogy a minta további összenyomása sem disszociálja a kialakult aggregátumokat. (3)

2.3.2. A projekt egyik kérdése volt a Ca^{2+} indukált szerkezetek létrejötte és jellemzése. A Ca^{2+} -indukált szerkezetváltozások egyik ismert példája a parvalbumin, amely az EF-kar típusú Ca^{2+} -kötő fehérjék egyik ismert reprezentánsa. A Ca^{2+} -indukált szerkezetváltozások stabilitásának tanulmányozására ez ideálisnak látszott, mivel a PEVK fragmentumokban nem sikerült Ca^{2+} indukált szerkezetváltozásokat mérni. Bár a parvalbumint több szempontból széleskörűen jellemezték, a nyomás-hőmérséklet fázisdiagramját eddig még nem vizsgálták. A kutatási tervben leírt Ca^{2+} -indukált struktúrák nyomás és hőmérséklet stabilitásának tanulmányozására ez a fehérje több szempontból is alkalmas modellnek bizonyult. Infravörös méréseinkkel megmutattuk, hogy a fehérje ténylegesen rendeződik Ca^{2+} hatására, míg a Ca^{2+} hiányos fehérje szerkezete inkább az olvadt gombóc állapotra emlékeztet (4). Míg ez a szerkezet 2 kbar (200 MPa) hatására eltűnik, a Ca^{2+} kötött fehérje sokkal stabilabbnak mutatkozott. A nyomás nem okozott teljes kitekeredett állapotot szobahőmérsékleten, ill. 30°C-on. (A mérést a víz megfagyása limitálta 1 GPa körül). Az 500 MPa felett kialakult szerkezet az infravörös spektrum analízise alapján csak részlegesen kitekeredett volt. Kizárólag megemelt hőmérsékleten sikerült a teljes denaturált állapotot elérni (40° 1,14 GPa, ill. 55°C 890 MPa). A fázisdiagramon itt is megfigyelhető volt egy molten globula állapot alacsony nyomásértékek esetén. Ennek bizonyítására a fehérje intrinsic fluoreszcenciáját használtuk. A glutaminsav és aszparaginsav oldalláncok COO^- aszimmetrikus rezgései alapján lehetett a Ca^{2+} kötésre is következtetni a különböző fázisokban. Megállapítottuk, hogy a megfigyelt fehérjeszerkezetek (natív, molten globula, részlegesen denaturált, teljesen denaturált, aggregált) eltérő mértékben kötötték a Ca^{2+} -ot. valamint, hogy a Ca^{2+} -nak a nyomás ill. a hőmérséklet hatására történő elvesztése és a megfelelő fehérje-konformációs változások között szoros összefüggés található. (5)

2.4. Kinetikai mérések

A kinetikai méréseket egy másik fehérjén végeztük, ugyanis a titin fragmentumokon nem volt rendeződés megfigyelhető. A T4 lizozim L99A mutánsa azonban olyan tulajdonsággal rendelkezik, ami ezekre a mérésekre kifejezetten alkalmassá teszi. A fehérje belsejében a mutáció következtében üreg keletkezett, amelynek jelenléte különösen érzékennyé teszi a molekulát a nyomással szemben. Ennek megfelelően a mutáns fehérje nyomásstabilitása jelentősen csökkent a vad típusúhoz képest (300 ill. 720 MPa). Méréseinkben a fehérje nyomáskezelés utáni refoldingja során kialakuló szerkezetek időbeli evolúcióját vizsgáltuk. Mértük a kialakuló szerkezet nyomásstabilitását egy második nyomásciklus során. A (részleges) refolding során a szerkezet kialakulására rendelkezésre álló időt variálva annak

kialakulásának kinetikájáról kaptunk információt. Megállapítottuk, hogy a visszatekeredés mellett aggregátumok is kialakulnak az első nyomásciklus során. Ezeknek két típusa létezik az egyik nyomásérzékeny, a másik nyomásstabil tulajdonságokkal rendelkezik. Ez azért is jelentős, mert korábbi irodalmi adatokból ismert, hogy az érett amiloid fibrillumok nyomásstabilak, míg az amorf aggregátumok nyomásérzékenyek. Eredményeink alapján valószínűsíthető az amorf aggregátumok nyomásstabilá váló átalakulása és ennek kinetikai paramétereit is meghatároztuk, elméleti modellel illesztettük. (Publikáció előkészületben.)

2.5. Folding energiatérkép vizsgálata.

A rendezett fehérjék esetén a foldingot jól szemlélteti a tölcser alakú energiatérkép. Rendezetlen fehérjék esetén azonban nincsen ilyen energiatérkép, ami kijelölne egy kitüntetett konformációt. Azonban a rendezetlen fehérjék kötődése esetén megjelenhetnek jól definiált állapotok, amelyet a rendezetlen fehérje és annak célfehérjéje együttesen határoz meg a kötéskör létrejövő kölcsönhatások alapján. Elméleti megfontolásokkal meghatároztunk egy olyan ún. „szupertölcser” (superfunnel) amely jól leírja a kölcsönható fehérjék együttes foldingját és jól alkalmazható a rendezetlen fehérjék esetén is (publikáció előkészületben).

Ide kapcsolódik a rendezetlenből rendezett szerkezetbe való átalakulás, a folding energiatérképének vizsgálata is (6). A foszfoglicerát kináz (PGK) esetén megvizsgáltuk a folding és a refolding kinetikáját a nyomás függvényében, és az eredményeinket matematikai modellel illetve igazoltuk egy folding intermedier állapot létrejöttét (7). A PGK aggregációjának ill. fibrillumképződésének vizsgálata során az oldatot a foldingra kedvezőtől az amiloid képződésre kedvező felé változtatva azt tapasztaltuk, hogy míg az energiatérképén a molten globula állapotból a natív állapotba való átmenet energiagátja növekedett, addig az amiloid kialakulásának energiagátja gyakorlatilag nem változott (8).

3. Összefoglalás:

A tervezett vizsgálatok nagy része megvalósult.

A rendezetlen fehérjét ugyan nem sikerült fizikai és kémiai környezet változásával globálisan rendezetté tenni, azonban így is sok értékes információt tudtunk meg ezeknek a különböző méretű rendezetlen fragmentumoknak a viselkedéséről széles környezeti paramétertartományban. Egyedül az izotópkicserélt peptidok szintetizálására nem került sor végül, mivel nem volt olyan partikuláris szekvencia, ami ígéretesnek mutatkozott volna strukturális változás tekintetében.

A rendezett fehérjéket illetően meghatároztunk számos nyomás-hőmérséklet fázisdiagramot (parvalbumin, Mal d 1, titin I27 domén) (9). Megállapítottuk, hogy az Rv3221c fehérjét hibásan sorolták a rendezetlen fehérjék közé, felderítettük ennek lehetséges okát is, és ugyancsak meghatároztuk a fázisdiagramot és a hozzá tartozó termodinamikai paramétereit.

A fentiek felül még megemlítem, hogy a kutatás során kifejlesztettünk új módszereket is, amelyek a további kutatásokban is hasznosak lehetnek (új belső nyomáskalibráns az infravörös nyomásméréshez, lipides lokalizáció ATR-re (10)). Ezek publikálása is előkészületben van.

4. Tudományos eredmények publikálása

A fent részletezett tudományos eredményeket összesen 8 referált folyóiratcikkben, egy könyvfejezetben (11) publikáltuk. Az eredményeket számos konferencián ismertettük, melyek közül az Amerikai Biofizikai Társaság, az EHPR (European High Pressure Research Group), a HPBB (High Pressure Bioscience Biotechnology) és az Európai Biofizikai Társaság konferenciáit emelném ki. A már publikált eredmények mellett öt másik publikáció van előkészületben.

Hivatkozások:

1. Somkuti, J., Mártonfalvi, Zs. Kellermayer, M.S.Z. Smeller, L.: Different pressure-temperature behavior of the structured and unstructured regions of titin, *BBA - Proteins and Proteomics* 1834 112-118., 2013
2. Somkuti, J., Jain, S., Ramachandran, S., and Smeller, L.: Folding-unfolding transitions of Rv3221c on the pressure-temperature plane, *High Pressure Research*, 33, 250-257, 2013
3. Somkuti J; Houska M; Smeller L: Pressure and temperature stability of the main apple allergen Mal d1, *Eur. Biophys. J.* 40 (2011) 143-151, 2011
4. Somkuti J; Bublin M; Breiteneder H; Smeller L: Parvalbumin: folding of an unstructured protein by Ca²⁺ and its pressure induced unfolding, 49th EHPRG konferencia absztrakt könyve, 2011
5. Somkuti J; Bublin M; Breiteneder H; Smeller L: Pressure-Temperature Stability, Ca²⁺ Binding, and Pressure- 2 Temperature Phase Diagram of Cod Parvalbumin: *Gad m 1, Biochemistry* 51 5903-5911, 2012
6. Gusztáv Schay, Levente Herényi, Judit Fidy, Szabolcs Osváth: Role of Domain Interactions in the Collective Motion of Phosphoglycerate Kinase, *Biophysical Journal* 104 (2013) 677-682.
7. Szabolcs Osváth, Luu Manh Quynh, László Smeller: Thermodynamics and Kinetics of the Pressure Unfolding of Phosphoglycerate Kinase, *Biochemistry* 48 (2009) 10146-10150.
8. Gergely Agócs, Bence T. Szabó, Gottfried Köhler, Szabolcs Osváth: Comparing the Folding and Misfolding Energy Landscapes of Phosphoglycerate Kinase, *Biophysical Journal* 102 (2010). 2828 - 2834.
9. Judit Somkuti, László Smeller: High pressure effects on allergen food proteins, *Biophysical Chemistry* 183 (2013) 19-29.
10. Somkuti Judit, Bozó Tamás, Imre Nikolett, Smeller László: Lipid réteghez kötött fehérjék vizsgálata FTIR spektroszkópiával, 43. Membrán-Transzport Konferencia Sümeg, 2013. május 21-24. abstract könyve 79. old.
11. László Smeller: Protein denaturation on p-T axes -thermodynamics and analysis, *High Pressure Bioscience - Basic Concepts, Applications and Frontiers (Series Title: Subcellular Biochemistry, Springer)*, 2014