

# Hő- és kémiai denaturáció a humán epesav-kötő fehérjében



*Tőke Orsolya\* (MTA TTK SZKI)  
Biczók László (MTA TTK AKI)  
Kovács Mihály (ELTE TTK Biokémia Tanszék)*

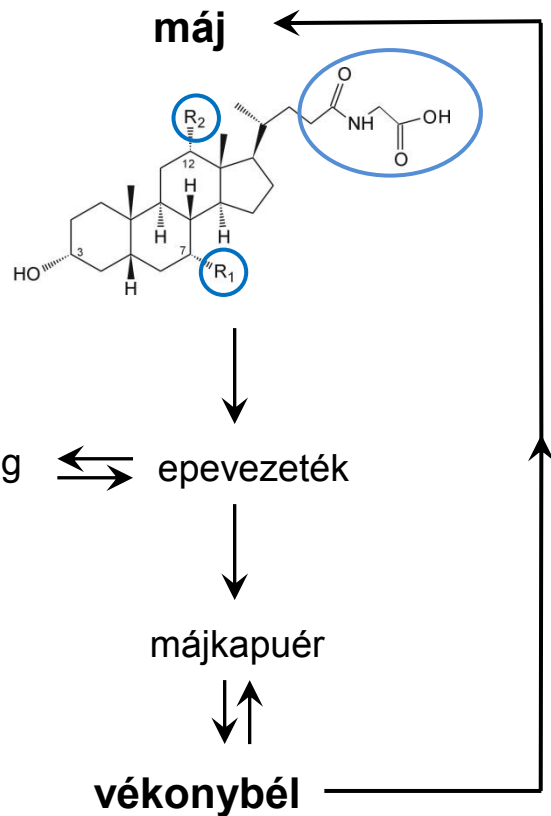


*MEDinPROT Konferencia, 2015. november 14.*



# EPESAVAK

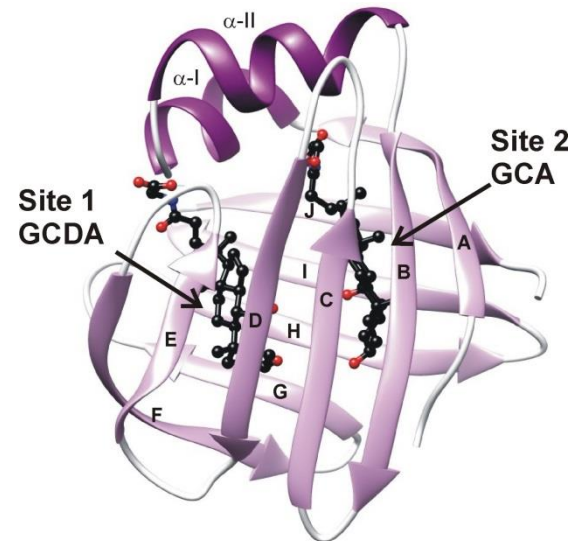
- zsírszerű anyagok felszívódásának elősegítése
- anyagcsere folyamatok szabályozása
- magas koncentrációban apoptotikus hatás



## ENTEROHEPATIKUS KÖRFORGÁS

# EPESAV-KÖTŐ FEHÉRJE (humán I-BABP)

- 14.2 kDa
- 10 antiparallel  $\beta$ -szál
- hélix-hurok-hélix motívum
- kötőüreg:  $\sim 1000 \text{ \AA}^3$  a „hordó” belsejében
- két kötőhely
- pozitív kooperativitás
- kötőhely szelektivitás



PDB: 2MM3

*Horváth et al. (2015), submitted*

# SZINERGIA

**lokális  
letekeredési  
folyamatok  
fontossága**

- ❑ epesavak intracelluláris transzportja
  - ligandumkötődést kísérő disorder-order átment
  - interakció a sejtmembránnal
- ❑ farnezoid X receptor transzkripció aktivitásának stimulálása
  - nukleáris transzlokáció

Cél: folding/unfolding mechanizmusának jobb megértése



*Biczók László, D.Sc.  
MTA TTK AKI*

**TERMODINAMIKA**  
ITC, fluoreszcencia



*Tőke Orsolya, Ph.D.  
MTA TTK SZKI*

**SZERKEZET,  
DINAMIKA**  
NMR

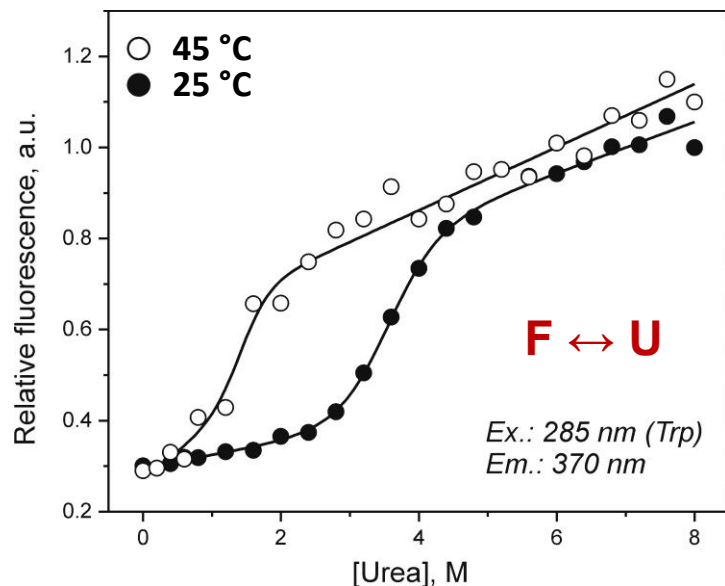


*Kovács Mihály,  
Ph.D., D. Sc., ELTE TTK*

**KINETIKA**  
stopped-flow  
fluoreszcencia

# KÉMIAI és HŐDENATURÁCIÓ

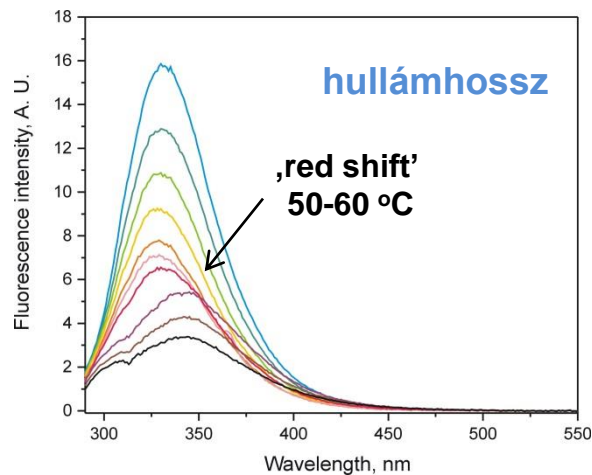
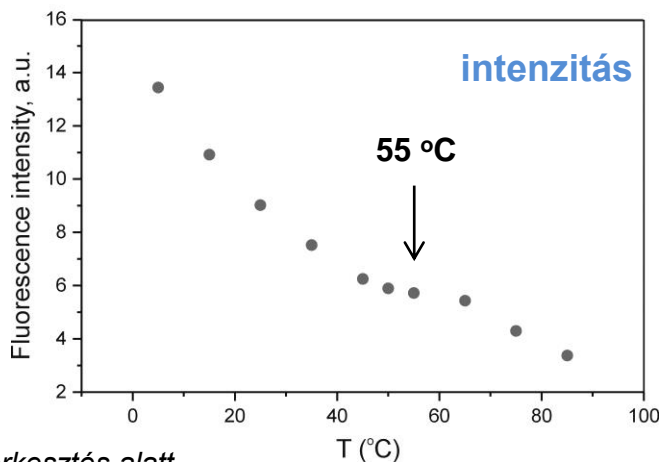
## FLUORESZCENCIA SPEKTROSZKÓPIÁS VIZSGÁLATA



	[D] <sub>50%</sub> (M)	m (kcal/(mol M))	ΔG <sub>[urea]=0</sub> (kcal/mol)
25 °C	3.4 ± 0.2	-1.61 ± 0.01	5.7 ± 0.1
45 °C	1.6 ± 0.2	-2.77 ± 0.02	4.0 ± 0.2

$$F_{obs} = \frac{(a_f + b_f[urea]) + (a_u + b_u[urea]) \exp\left(-\frac{\Delta G_u^\circ(H_2O) + m[urea]}{RT}\right)}{1 + \exp\left(-\frac{\Delta G_u^\circ(H_2O) + m[urea]}{RT}\right)}$$

Santoro & Bolen, 1988

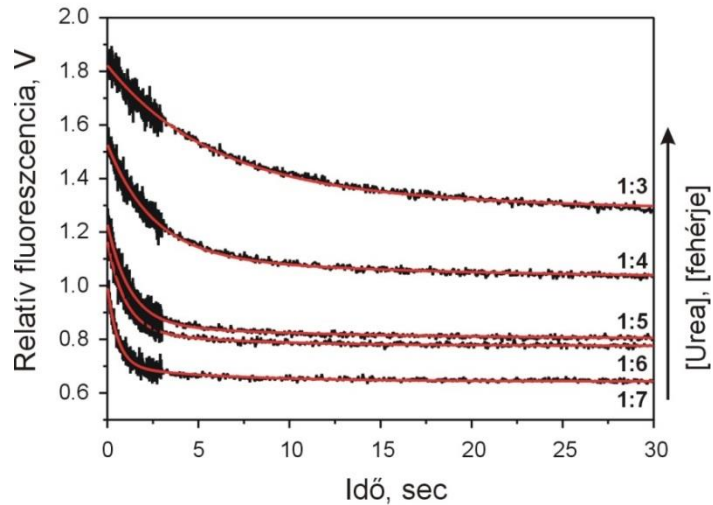


# FELTEKEREDÉS

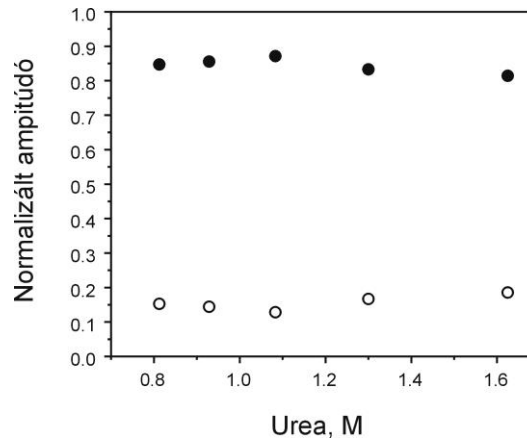
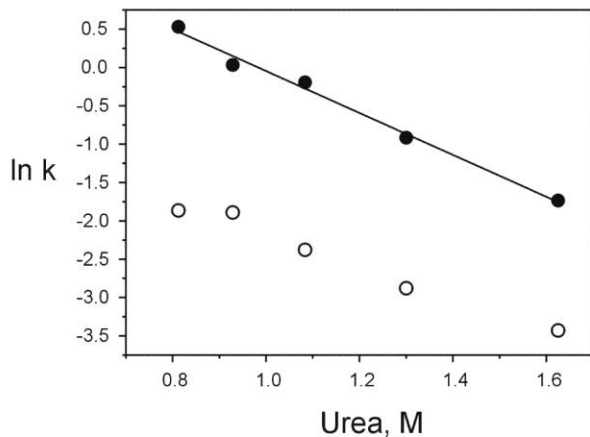
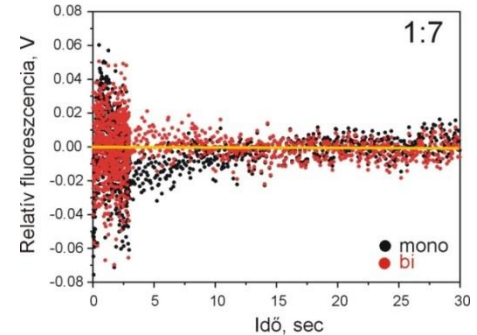
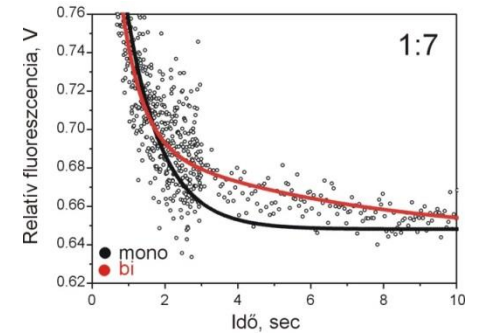
## STOPPED-FLOW FLUORESCENCIÁS VIZSGÁLATA

30  $\mu\text{M}$  apo humán I-BABP  
20 h inkubálás 6.5 M ureában

stopped-flow:  
változó térfogat arányok  
mellett hígítás urea-mentes  
pufferbe  
(20 °C, pH=7.2)  
ex. 285 nm (Trp)



$$F(t) = F_{\infty} + A_1 \exp(-k_1 t) + A_2 \exp(-k_2 t)$$

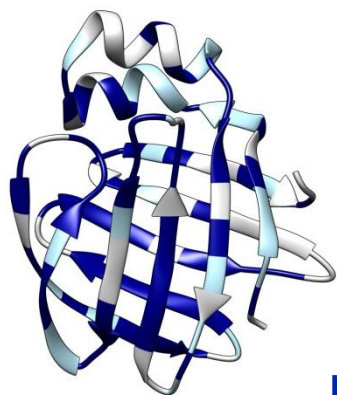
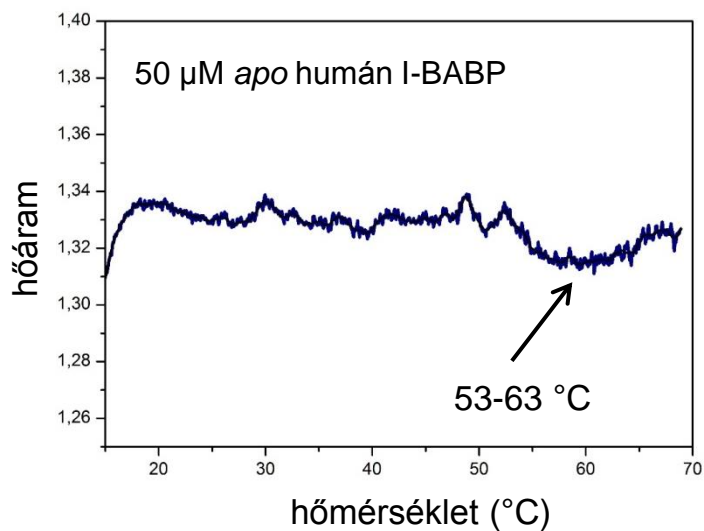


többállapotú folyamat

- Intermedier?

# HŐDENATURÁCIÓ

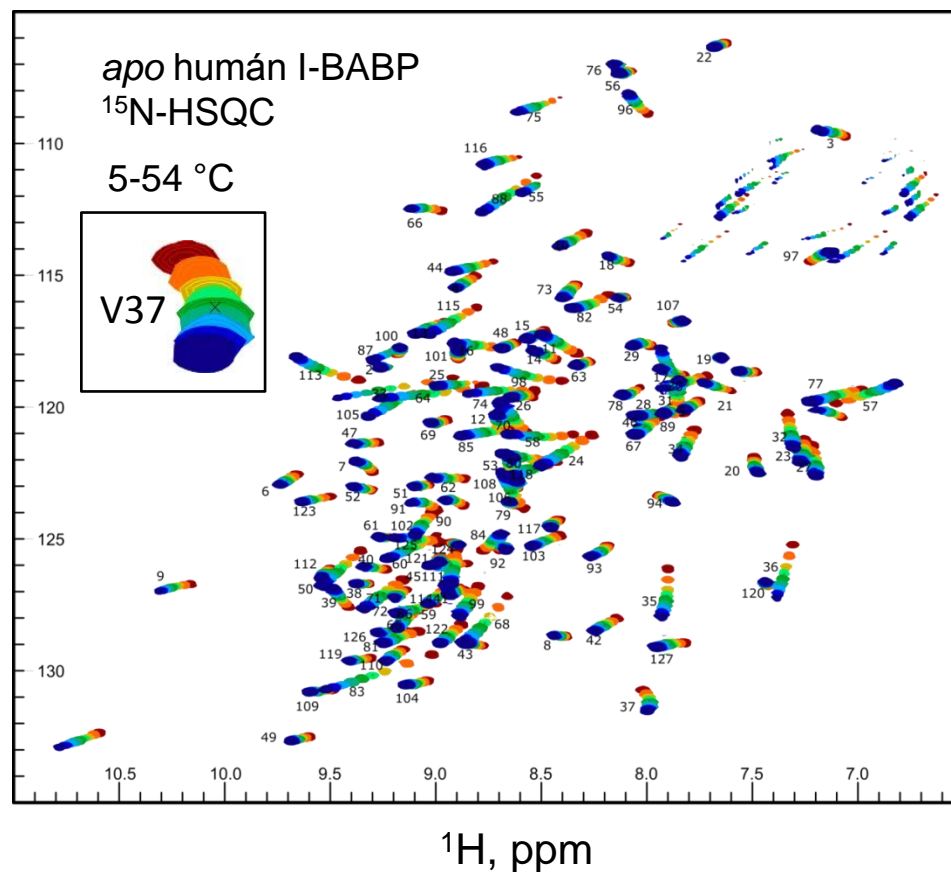
## DSC és NMR spektroszkópiás vizsgálata



nem lineáris (~70%)

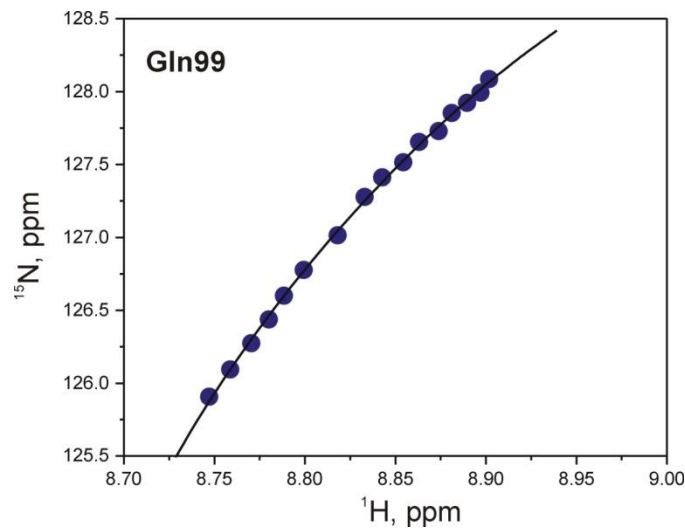
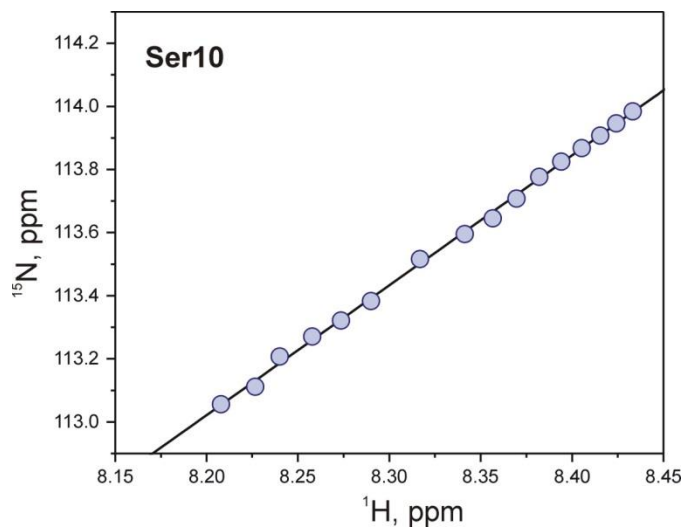
lineáris (~30%)

$^{15}\text{N}$ , ppm



# HŐDENATURÁCIÓ

## NMR SPEKTROSKÓPIÁS VIZSGÁLATA



$$\delta = x_a \delta_a + x_b \delta_b + x_c \delta_c$$

$$x_i = P(\Delta H^{a-b}, \Delta H^{b-c}, T_m^{a-b}, T_m^{b-c}, \Delta C_p^{a-b}, \Delta C_p^{b-c}, T)$$

**A ↔ B**

$$\Delta G^{a-b}(T) = \Delta H^{a-b}(T_m^{a-b}) \left[ 1 - \frac{T}{T_m^{a-b}} \right] - \Delta C_p^{a-b} [T_m^{a-b} - T \left( 1 - \ln \frac{T}{T_m^{a-b}} \right)]$$

$$RT \ln K^{a-b} = -\Delta G^{a-b}(T)$$

**B ↔ C**

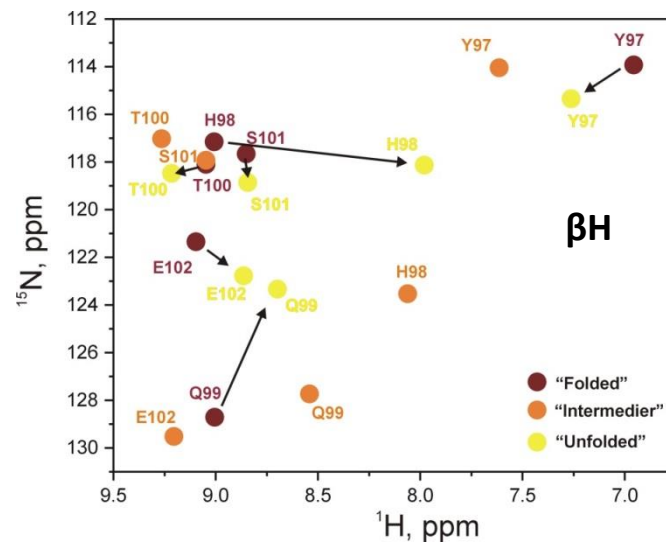
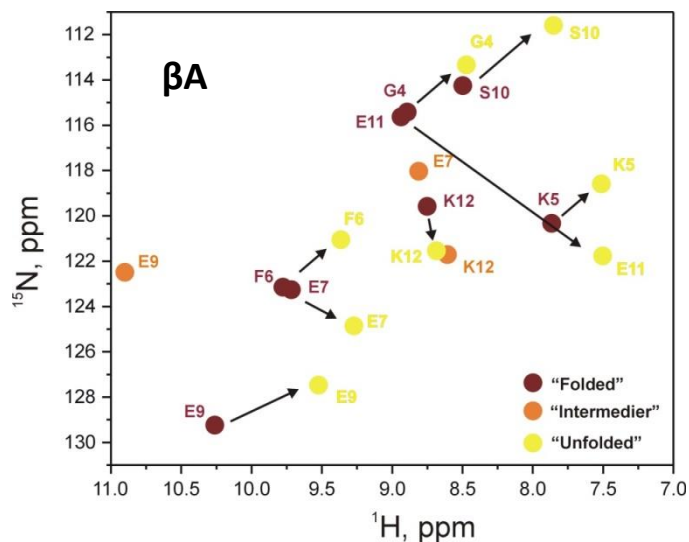
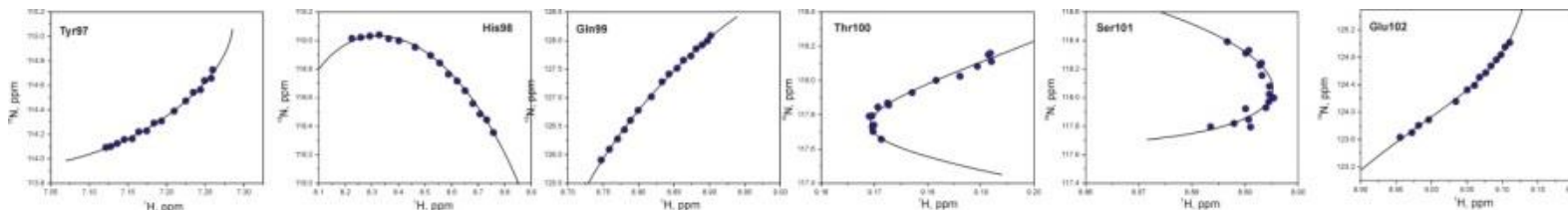
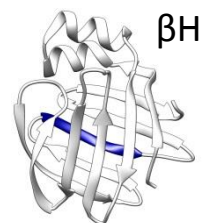
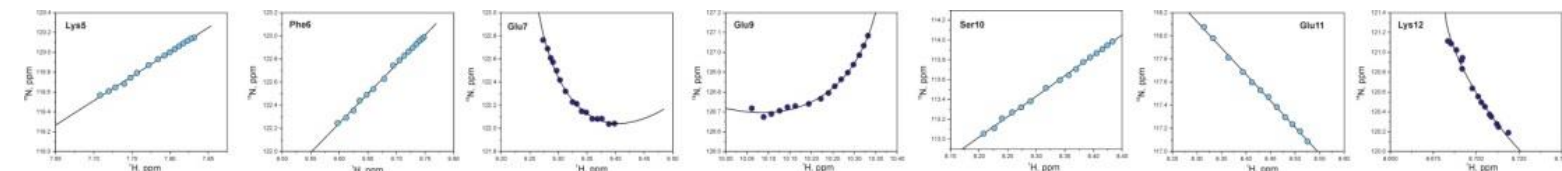
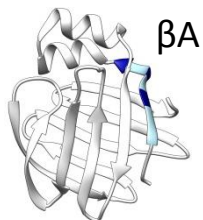
$$\Delta G^{b-c}(T) = \Delta H^{b-c}(T_m^{b-c}) \left[ 1 - \frac{T}{T_m^{b-c}} \right] - \Delta C_p^{b-c} [T_m^{b-c} - T \left( 1 - \ln \frac{T}{T_m^{b-c}} \right)]$$

$$RT \ln K^{b-c} = -\Delta G^{b-c}(T)$$



# HŐDENATURÁCIÓ

## NMR SPEKTROSKÓPIÁS VIZSGÁLATA





# ÖSSZEFOGLALÁS

		$\Delta H$ (kJ/mól)	$T_c$ (K)	$\Delta C_p$ (J/K)
2-state	<b>A ↔ C</b>	$30.5 \pm 9.1$	$328 \pm 3$	$55 \pm 73$
3-state	<b>A ↔ B</b>	$21.6 \pm 7.6$	$302 \pm 1$	$50 \pm 100$
	<b>B ↔ C</b>	$29.3 \pm 8.1$	$330 \pm 2$	$130 \pm 120$

25 °C	A (folded), %	B, %	C, %
2-state	$74.8 \pm 6.3$	-	$25.2 \pm 6.3$
3-state	$45.5 \pm 4.0$	$40.4 \pm 1.9$	$14.1 \pm 4.4$

- ❑ NMR: hőmérsékletválasz aminosav-egység szintű követése
- ❑ a renaturáció stopped-flow fluoreszcenciás vizsgálatával összhangban a hődenaturáció többállapotú folyamat
- ❑ DSC, NMR, és fluoreszcenciás mérések alapján konformációs átmenet megy végbe 55-60 °C körül
- ❑ NMR-rel észlelt folyamat azonban nem felel meg a teljes letekeredésnek  $\Delta H$  és kémiai eltolódás értékek reziduális szerkezetre utalnak
- ❑ 25 °C-on is jelentős fehérjepopuláció a magasabb energiájú (B, C) állapotban van

# KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS



**MTA TTK Szerves Kémiai Intézet**  
**MTA TTK Műszercentrum**

*Horváth Gergő*

**MTA TTK AKI**  
**Spektroszkópiai Kutatócsoport**

dr. Miskolczy Zsombor

**MTA TTK AKI**  
**Biológiai Nanokémia Kutatócsoport**

dr. Mihály Judith

**ELTE Kémiai Intézet**

dr. Majer Zsuzsa

OTKA K 109035, Medinprot/MTA, TTK\_all

*Köszönöm a megtisztelő figyelmet!*