

Fehérje kölcsönhatások vizsgálata NMR spektroszkópiával



Tőke Orsolya (MTA TTK SZKI)
Oláh Judit (MTA TTK EI)
Ovádi Judit (MTA TTK EI)*



MEDinPROT Konferencia, 2015. november 14.



NMR SPEKTROSKÓPIA



Ovádi Judit, Ph.D., D.Sc.
MTA TTK EI

- neurológiai betegségek pathomechanizmusa
- ultrastruktúrák szerkezeti és funkcionális vizsgálata molekuláris és sejt szinten



400 ezer Ft
gépíró támogatás



Tőke Orsolya, Ph.D.
MTA TTK SZKI

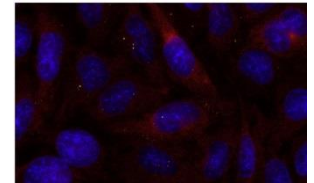
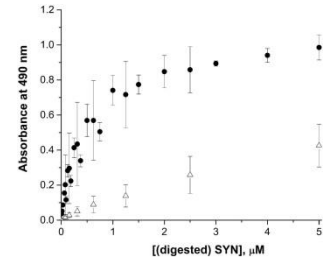
- fehérje-ligandum, fehérje/peptid-membrán kölcsönhatások
- belső molekuláris mozgások NMR spektroszkópiai és biofizikai vizsgálata

ALFA-SZINUKLEIN-TPPP/p25 kölcsönhatás

**INTRACELLULÁRIS LIPIDKÖTŐ FEHÉRJÉK
ligandumkötésének mechanizmusa**

I. ALFA-SZINUKLEIN-TPPP/p25 kölcsönhatás

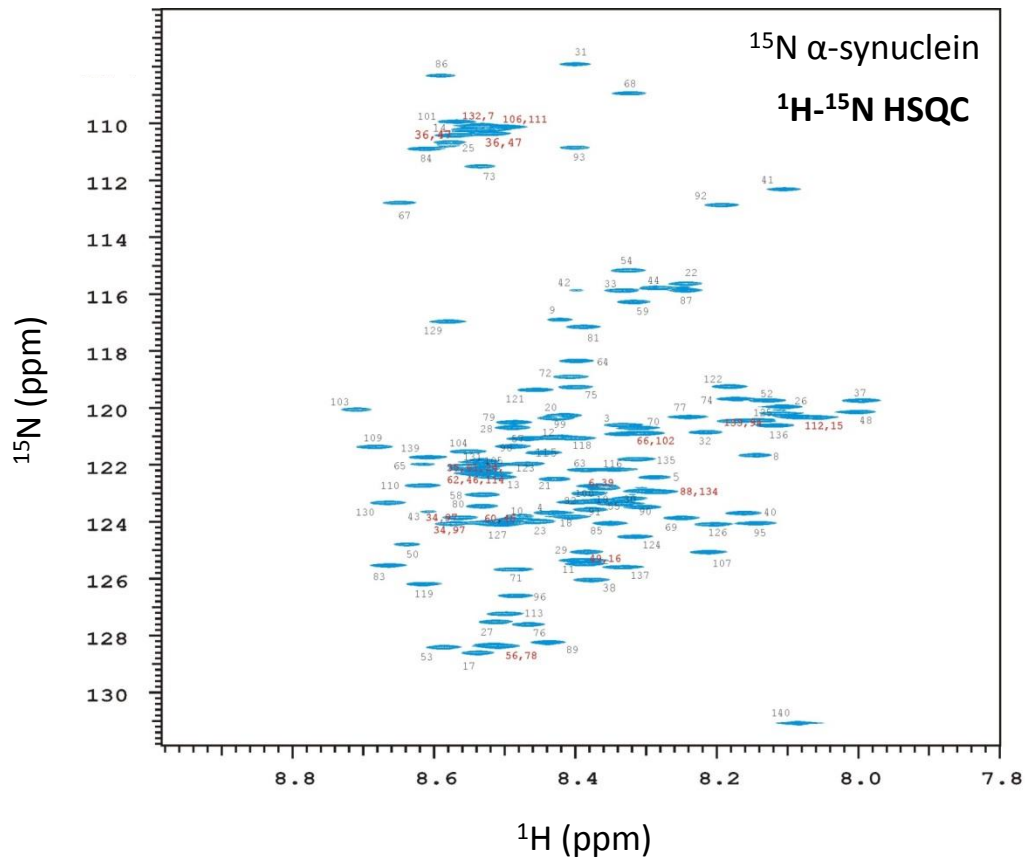
- TPPP/p25 (tubulin polymerization promoting protein):
patológiás körülmények között kölcsönhat az alfa-szinukleinnel,
ami zárványtestek képződéséhez vezet.
- Humán agyszövetben a két fehérje kolokalizációt mutat,
amely karakterisztikus a Parkinson-kórra és más synucleinopátiákra.



Szunyogh, S., Oláh, J., Szénási, T., Szabó, A., Ovádi, J.
(2015) *Biochim. Biophys. Acta* 1852:2653-2661.

Cél: kontaktfelzín jellemzése, lehetséges konformációs állapot(ok) azonosítása

I. ALFA-SZINUKLEIN-TPPP/p25 kölcsönhatás

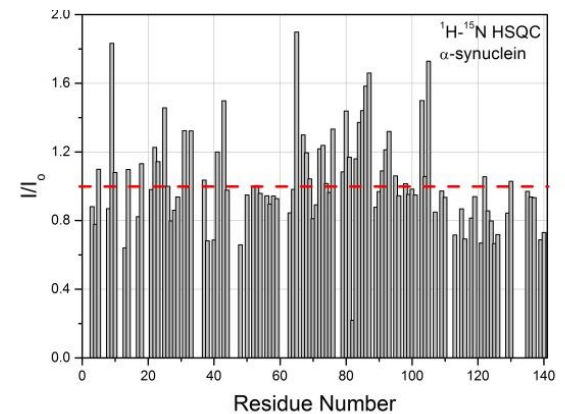


10 mM K-foszfát, 100 mM Na-foszfát, 0.02% NaN₃, pH=7.34, 10 °C

○ α-synuclein
rezonanciajeleinek
asszignációja

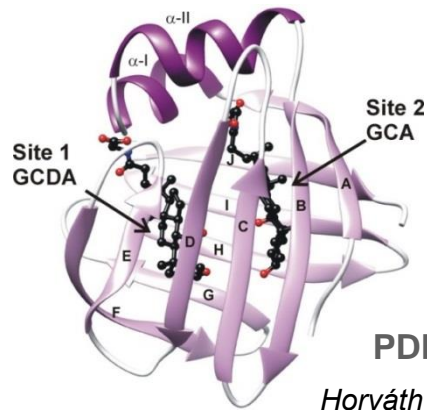
○ kísérleti
körülmények
optimalása

p25 hozzáadását követő relatív intenzitás változás



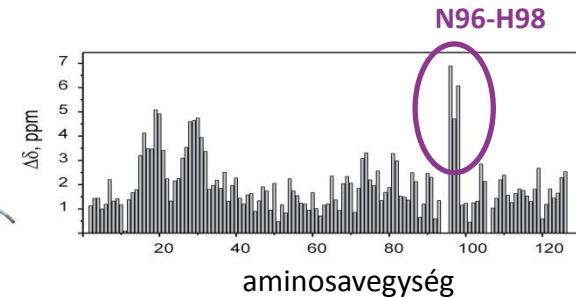
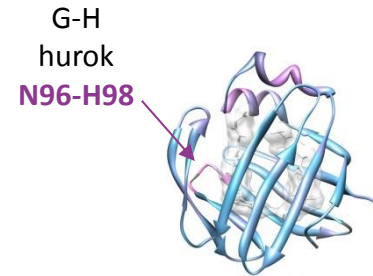
II. INTRACELLULÁRIS LIPIDKÖTŐ FEHÉRJÉK ligandumkötésének mechanizmusa

HUMÁN EPESAV-KÖTŐ FEHÉRJE (hI-BABP)

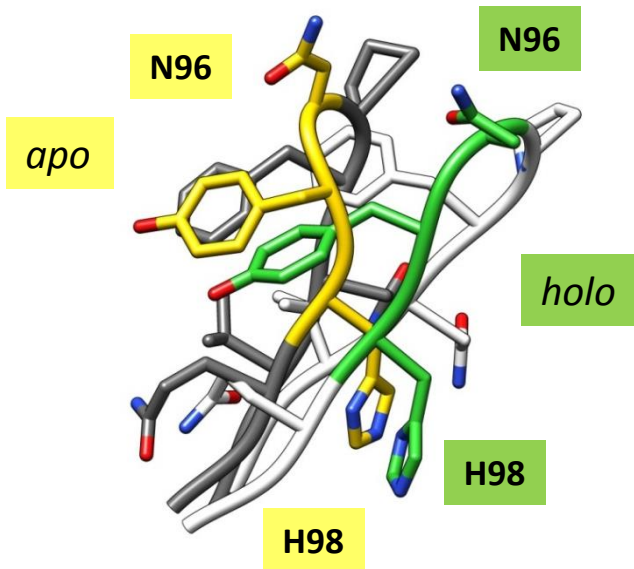


Horváth et al. (2015), submitted

Ligandumkötés hatására bekövetkező kombinált ^1H , ^{15}N kémiai eltolódás változás:

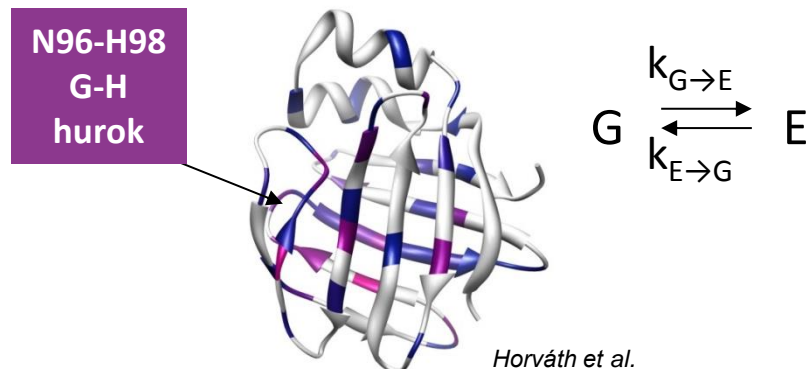


G-H régió térbeli átrendeződése



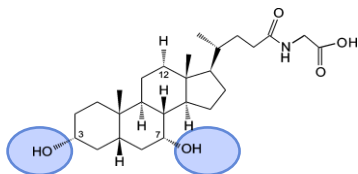
^{15}N NMR relaxációs diszperzió (R_{ex})

ms konformációs mozgás az apo fehérjében, amely ligandumkötés hatására megszűnik

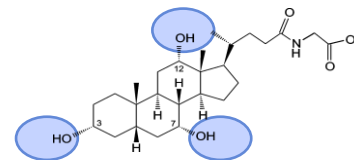
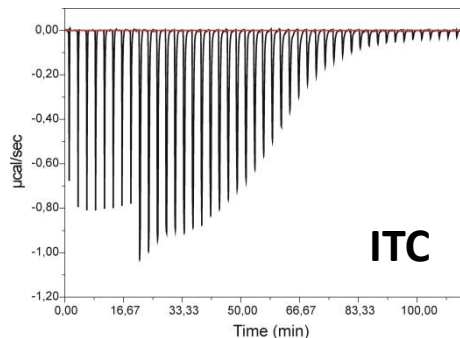


Horváth et al. (2012) *Biochemistry* 51:1848-1861. (2014) *Biochemistry* 53:5186-5198.

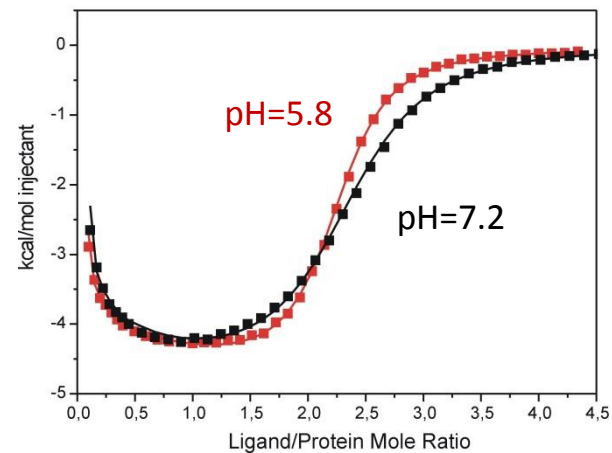
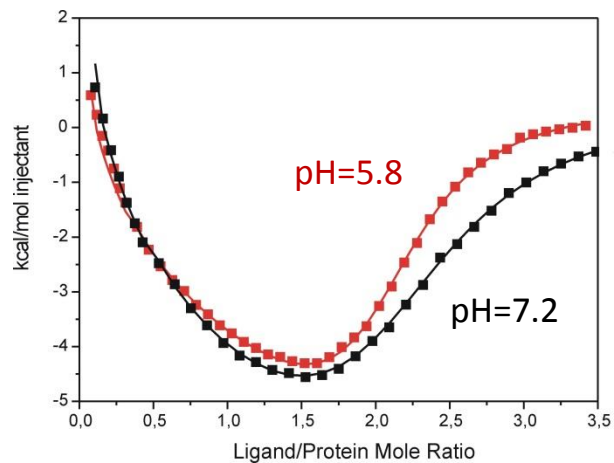
hI-BABP: LIGANDUM KÖTŐDÉS pH-FÜGGÉSE



GCDA



GCA

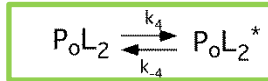
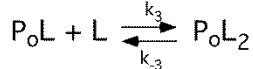
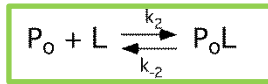
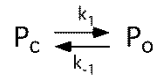


GCDA	K_{d1}^{obs} (μM)	K_{d2}^{obs} (μM)	ΔH_1^{obs} (kcal/mol)	ΔH_2^{obs} (kcal/mol)	n_{Hill}
pH=7.2	76±2	21±1	2.0±0.1	-12.1±0.1	1.3
pH=5.8	47±6	13.2±0.3	0.86 ±0.03	-9.9±0.1	1.3

GCA	K_{d1}^{obs} (μM)	K_{d2}^{obs} (μM)	ΔH_1^{obs} (kcal/mol)	ΔH_2^{obs} (kcal/mol)	n_{Hill}
pH=7.2	276±80	4.3±0.9	-0.3±0.9	-10.0±0.1	1.8
pH=5.8	105±30	2.4±0.4	-1.3±0.7	-9.3±0.7	1.7

hI-BABP: LIGANDUM KÖTŐDÉS pH-FÜGGÉSE

stopped-flow
fluoreszcencia
(Trp)



Tóke et al.,
Biochemistry,
2007, 46, 5427-5436.

GCDA

GCA

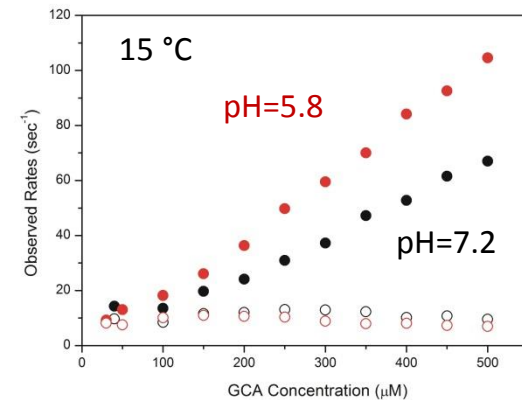
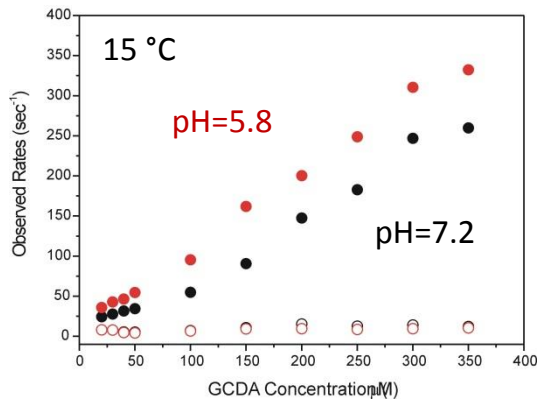
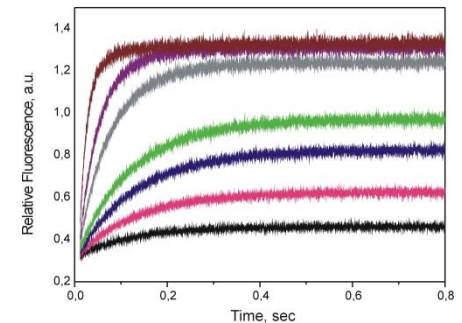
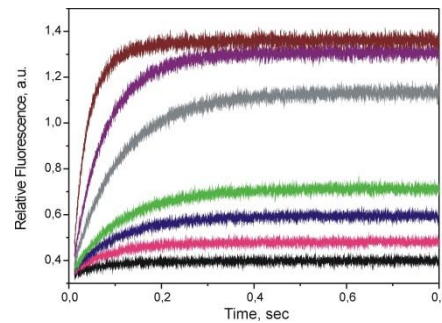
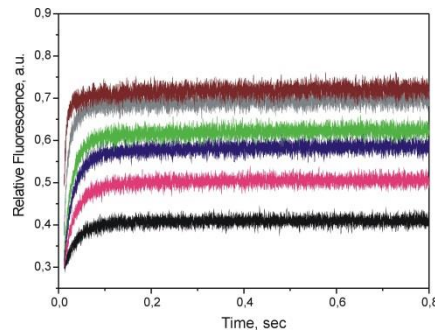
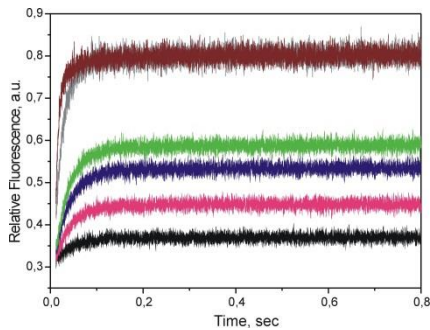
ligandum
koncentráció ↑

pH=7.2

pH=5.8

pH=7.2

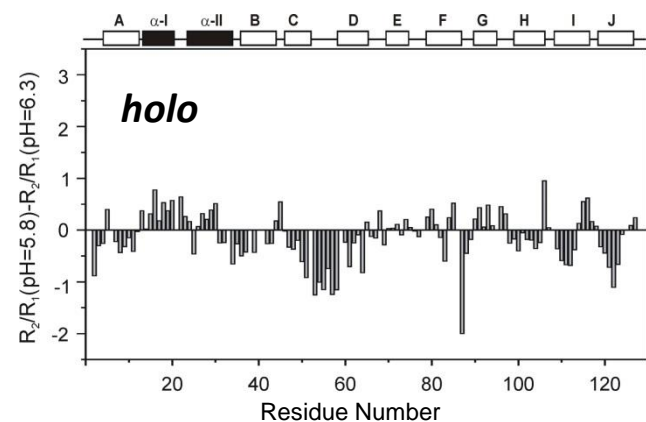
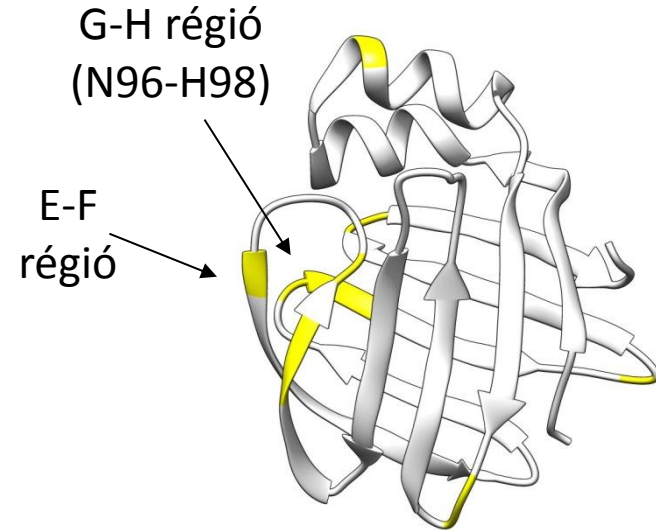
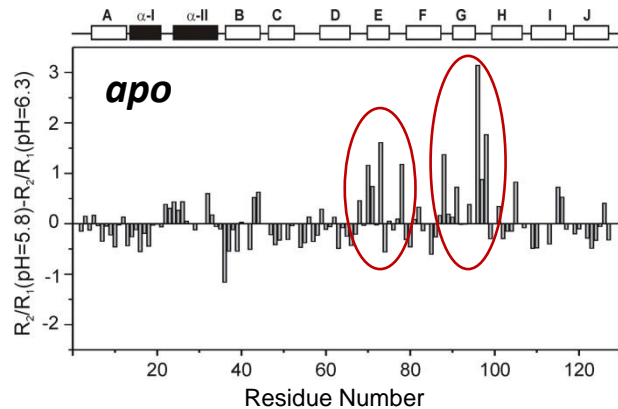
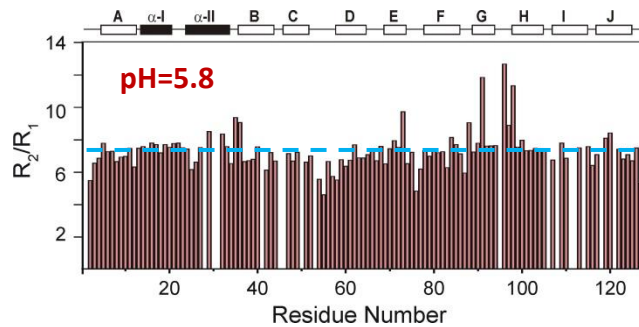
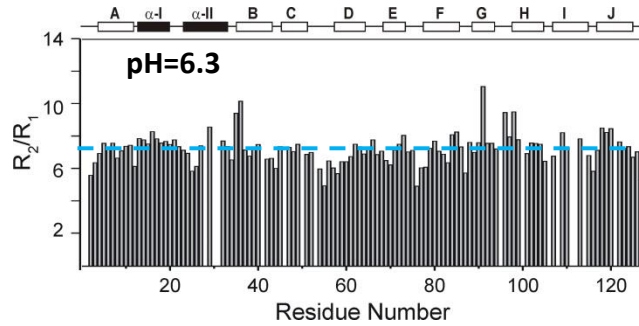
pH=5.8



hI-BABP: LIGANDUM KÖTŐDÉS pH-FÜGGÉSE

¹⁵N NMR
R₁, R₂
relaxációs
analízis

apo

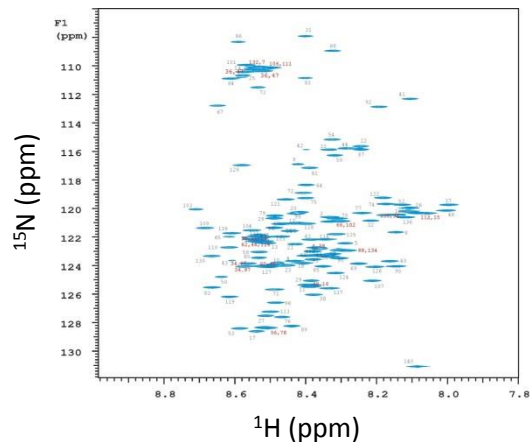


μs-ms fluktuáció hozzájárulása az R₂ relaxációhoz az *apo* fehérje EFGH régiójában a pH csökkenésével fokozódik

ÖSSZEFOGLALÁS

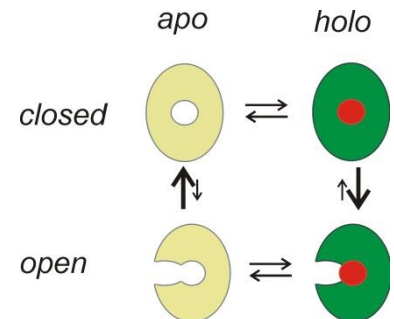
ALFA-SZINUKLEIN-TPPP/p25 kölcsönhatás

- ❑ α -szinuklein ^1H - ^{15}N rezonanciajeleinek hozzárendelése
- ❑ kémiai eltolódások és jelintenzitások monitorozása növekvő p25 koncentráció mellett
- ❑ kísérleti körülmények optimalizálása az interakciós határfelület NMR szerkezetvizsgálatához



HUMÁN I-BABP ligandumkötésének mechanizmusa

- ❑ A ^{15}N relaxációs sebességek μs -ms konformációs mozgás jelenlétére utaló R_2/R_1 hányadosa az EFGH portál régióban pH csökkenés hatására az *apo* fehérjében szignifikánsan emelkedik.
- ❑ Összhangban a korábban találtakkal a legintenzívebben az EFGH béta-szálakban jelen levő ms konformációs mozgás segíti a ligandumok kötőüregbe jutását. A nyitott és zárt konformációs állapot közötti egyensúlyt a pH csökkenése a kötődésnek kedvező nyitott állapot irányába tolja el.



KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS



MTA TTK Szerves Kémiai Intézet
MTA TTK Enzimológiai Intézet
MTA TTK Műszercentrum

Debreceni Egyetem

Nyitrai Mónika
Fizil Ádám
Batta Gyula

ELTE Biokémia Tanszék

Kovács Mihály

OTKA K 109035, Medinprot/MTA

Köszönöm a megtisztelő figyelmet!