

Le- és feltekeredés a humán epesav-kötő fehérjében



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

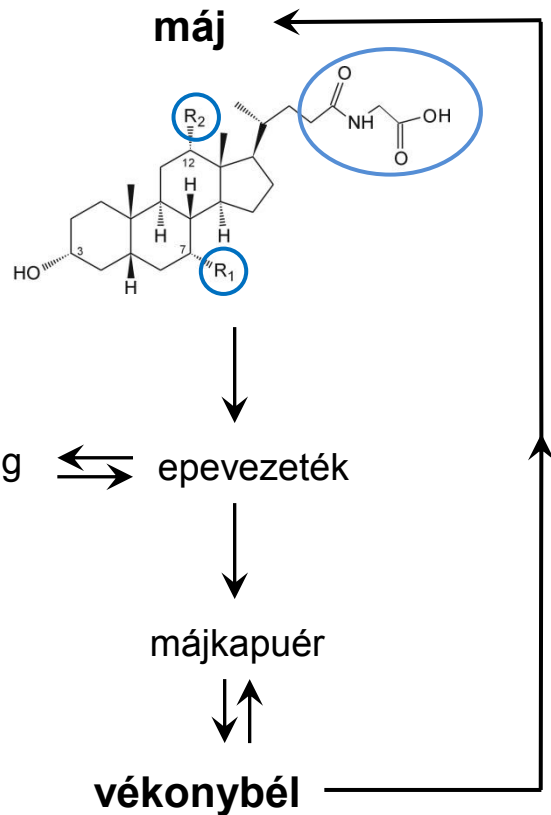


MEDinPROT Konferencia, 2015. március 21.



EPESAVAK

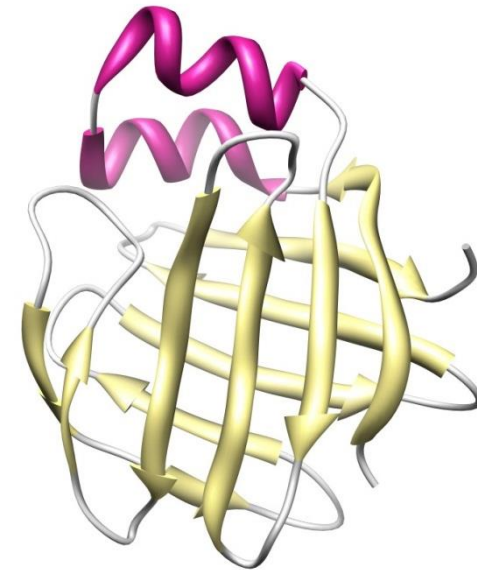
- zsírszerű anyagok felszívódásának elősegítése
- anyagcsere folyamatok szabályozása
- magas koncentrációban apoptotikus hatás



ENTEROHEPATIKUS KÖRFORGÁS

EPESAV-KÖTŐ FEHÉRJE (humán I-BABP)

- 14.2 kDa
- 10 antiparallel β -szál
- hélix-hurok-hélix motívum
- kötőüreg: $\sim 1000 \text{ \AA}^3$
a „hordó” belsejében

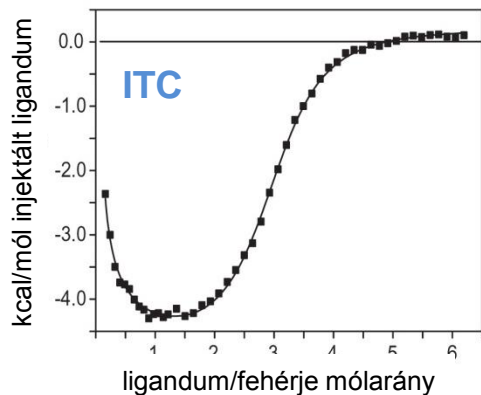


PDB: 1O1U

Kurz et al. (2003) *Proteins* 50, 312-328.

HUMÁN I-BABP: AMIT EDDIG TUDUNK

1:2 sztöchiometria, pozitív kooperativitás



GCA

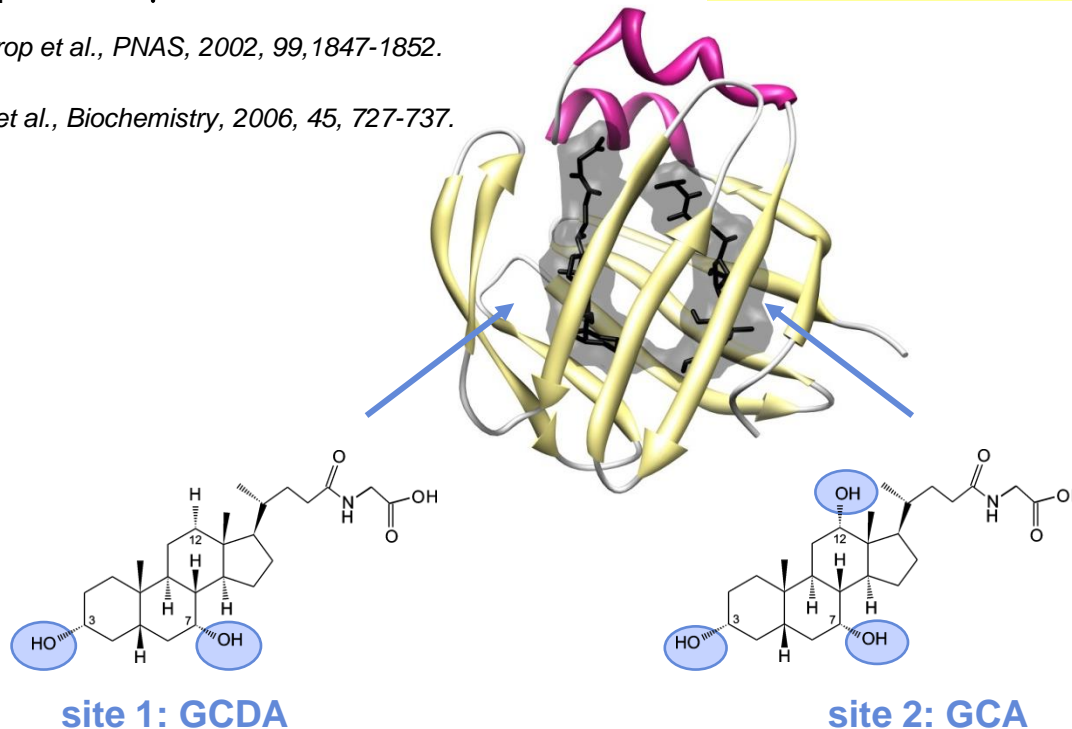
$$K_{d1}^{obs} = 490 \mu\text{M}$$

$$K_{d2}^{obs} = 4.3 \mu\text{M}$$

Tochtrop et al., PNAS, 2002, 99, 1847-1852.

Tőke et al., Biochemistry, 2006, 45, 727-737.

kötőhely szelektivitás

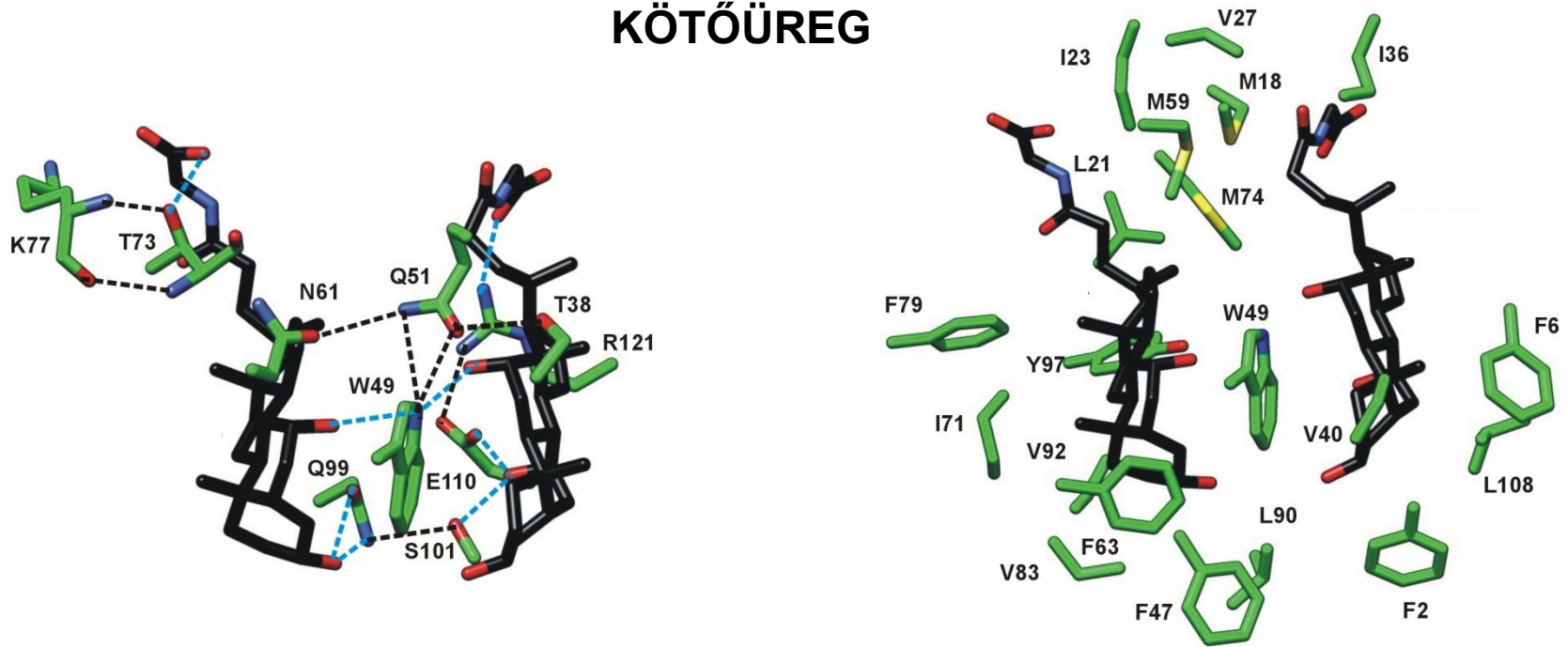


Tochtrop et al., JACS, 2004, 126:11024-11029.

Horváth et al. (2015) szerkesztés alatt

HUMÁN I-BABP: AMIT EDDIG TUDUNK

KÖTŐÜREG



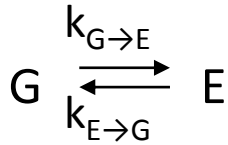
H-kötések és hidrofób kölcsönhatások kiterjedt hálózata

PDB: 2MM3

Horváth et al. (2015) szerkesztés alatt

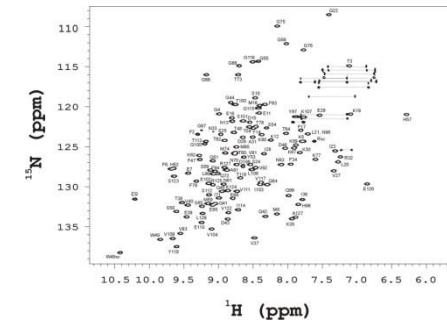
HUMÁN I-BABP: AMIT EDDIG TUDUNK

ms konformációs mozgás az *apo* fehérjében, amely ligandumkötődés hatására megszűnik



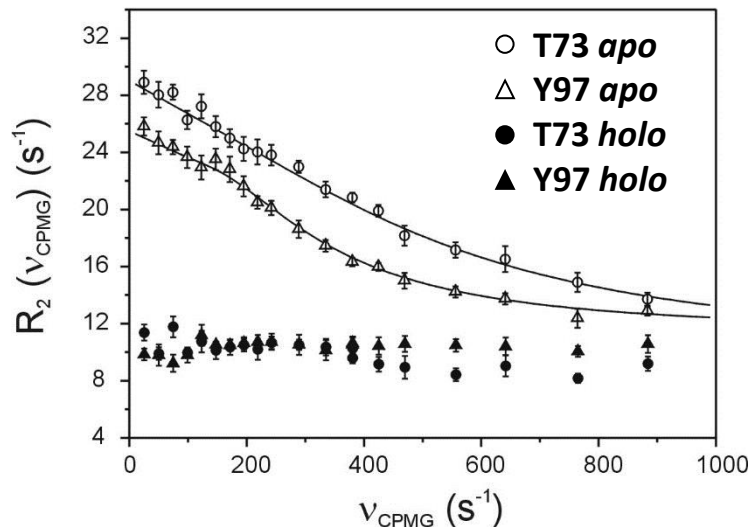
$$k_{ex} = k_{G \rightarrow E} + k_{E \rightarrow G}$$

$$p_{ex}, \delta\omega$$

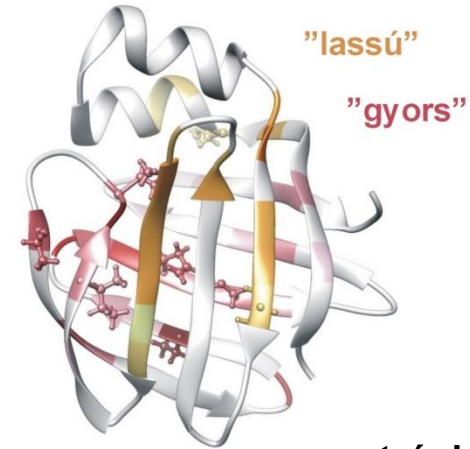


¹⁵N NMR

relaxációs diszperzió (R_{ex})



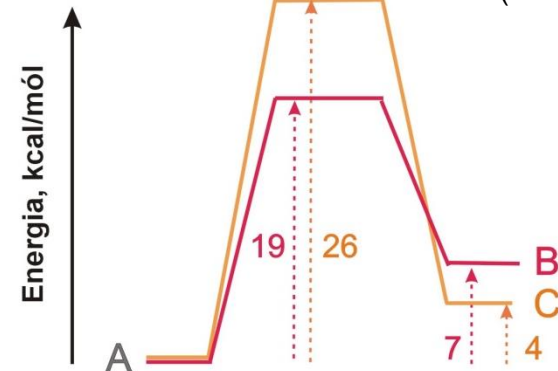
két klaszter



entrópia-entalpia
kompenzáció

$$\Delta G_{EG} \sim 2 \text{ kcal/mól}$$

(283-291 K)



Horváth, G., Király, P., Tárkányi, G., Tőke, O. (2012) *Biochemistry* 51:1848-1861.

Horváth, G., Egyed, O., Tőke, O. (2014) *Biochemistry* 53:5186-5198.

SZINERGIA

rokon iLBP fehérjékben: interakció a sejtmembránnal
csirke L-BABP: részleges letekeredés

Cél: I-BABP-membrán-epesav kölcsönhatás mechanizmusának megértése

1. lépés: górcső alatt a letekeredés



*Biczók László, D.Sc.
MTA TTK AKI*

TERMODINAMIKA
ITC, fluoreszcencia



*Tőke Orsolya, Ph.D.
MTA TTK SZKI*

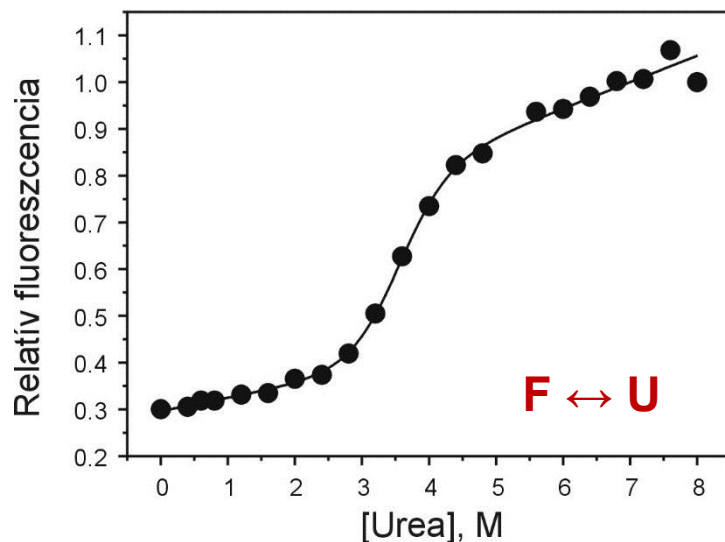
**SZERKEZET,
DINAMIKA**
NMR



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

KINETIKA
stopped-flow
fluoreszcencia

KÉMIAI DENATURÁCIÓ



135 mM KCl,
10 mM NaCl,
20 mM K-foszfát,
0.05 % NaN₃,
pH=7.2

Ex.: 285 nm (Trp)
Em.: 370 nm

$$[D]_{50\%} = 3.4 \pm 0.16 \text{ M}$$

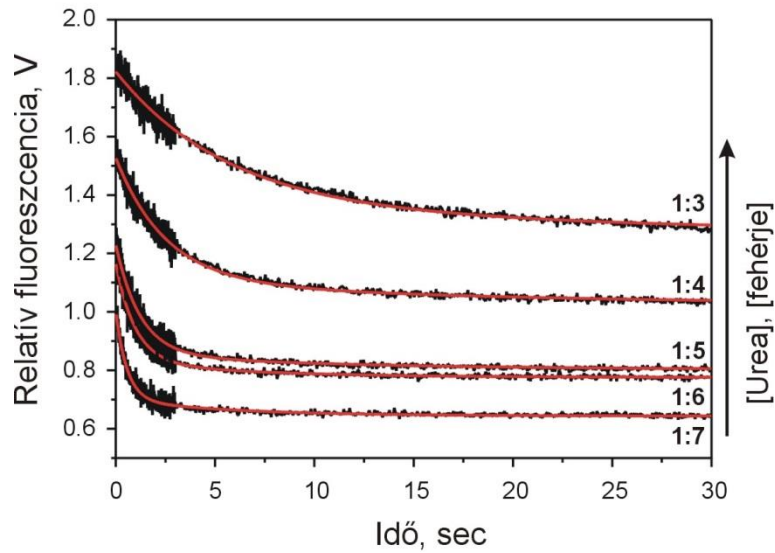
$$m = -1.61 \pm 0.01 \text{ kcal}/(\text{mól M})$$

$$\Delta G = 5.7 \pm 0.1 \text{ kcal/mól}$$

([urea]=0 M)

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

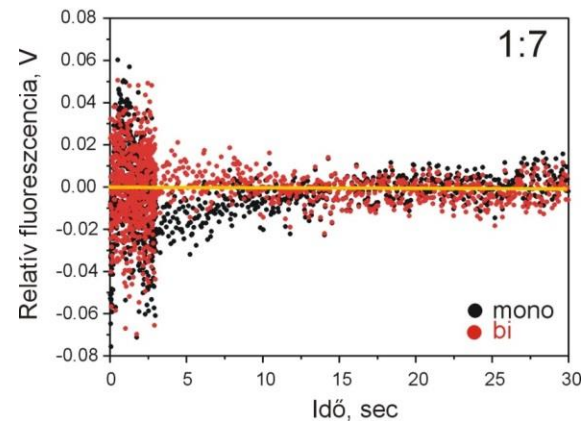
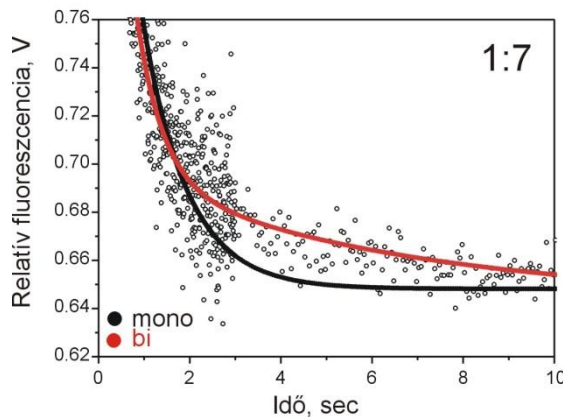
FELTEKEREDÉS STOPPED-FLOW FLUORESZCENCIÁS VIZSGÁLATA



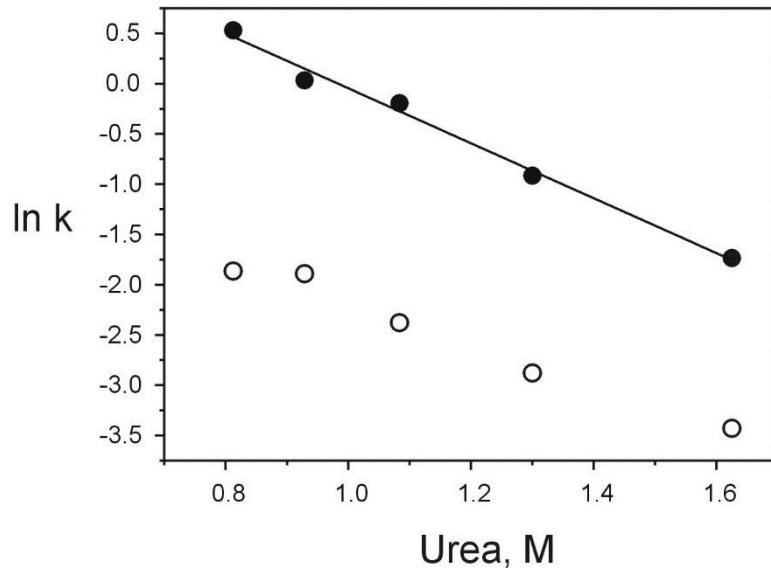
30 μ M *apo* humán I-BABP
20 h inkubálás 6.5 M ureában

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

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



FELTEKEREDÉS STOPPED-FLOW FLUORESZCENCIÁS VIZSGÁLATA



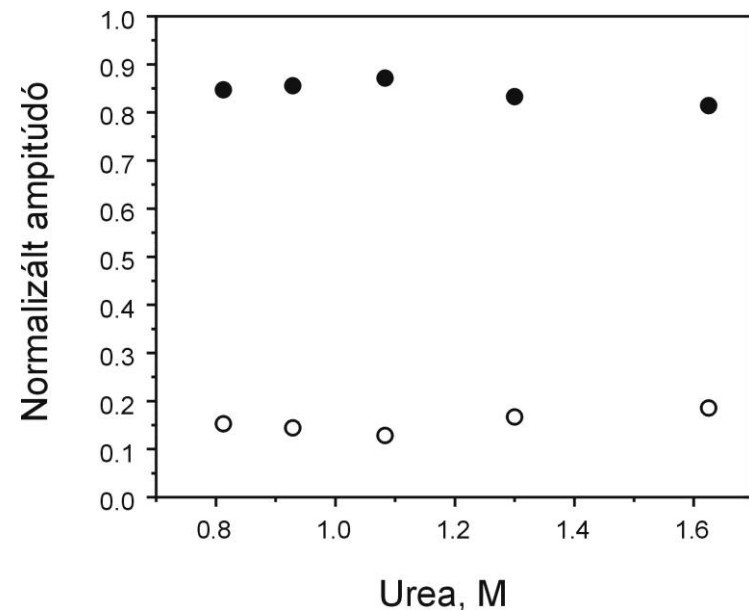
30 μM apo humán I-BABP
20 h inkubálás 6.5 M ureában

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

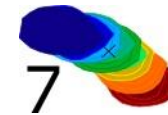
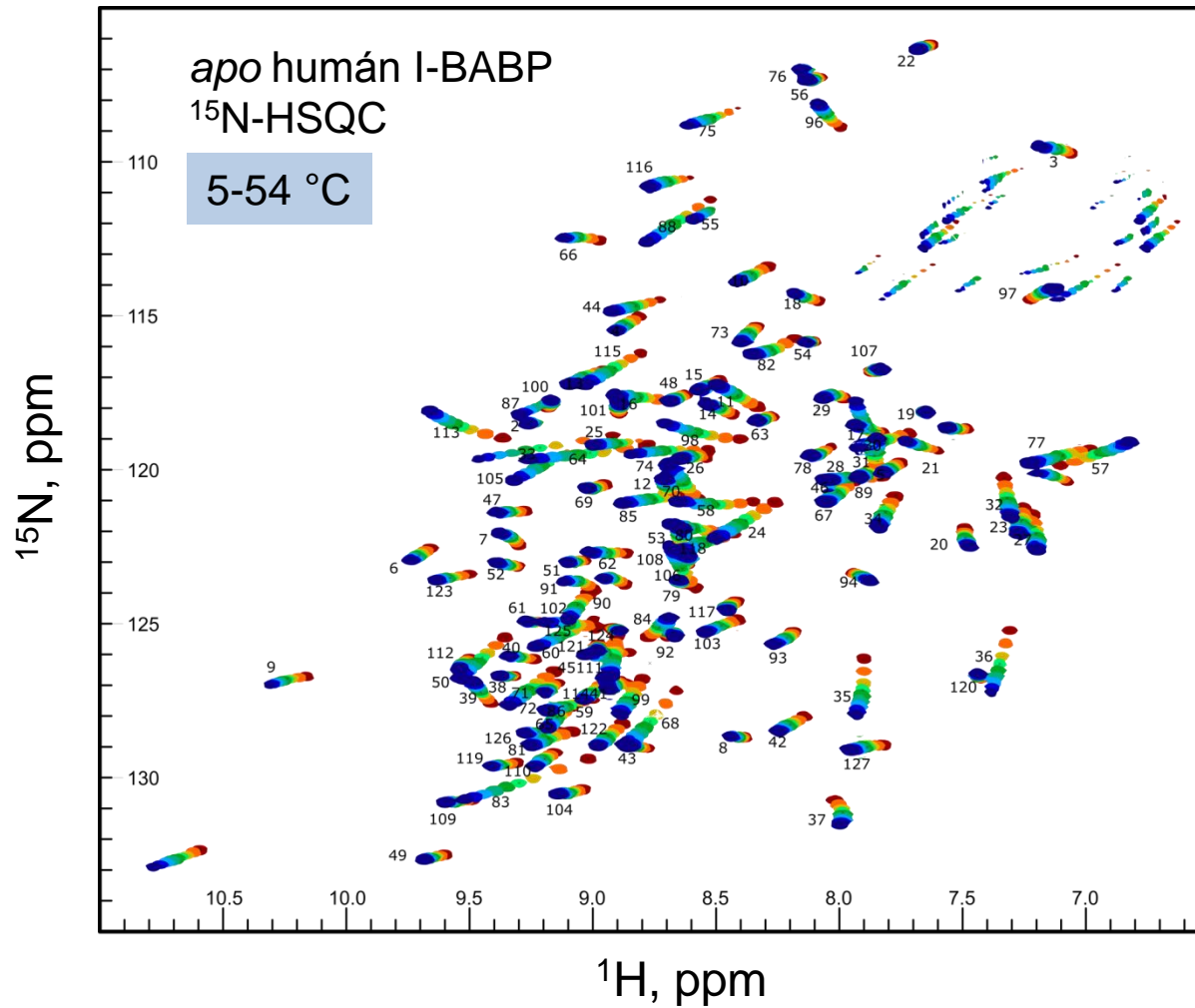
$$F(t) = F_{\infty} + A_1 \exp(-k_1 t) + A_2 \exp(-k_2 t)$$

biexponenciális válasz:

- Konformációs heterogenitás?
 - Intermedier?

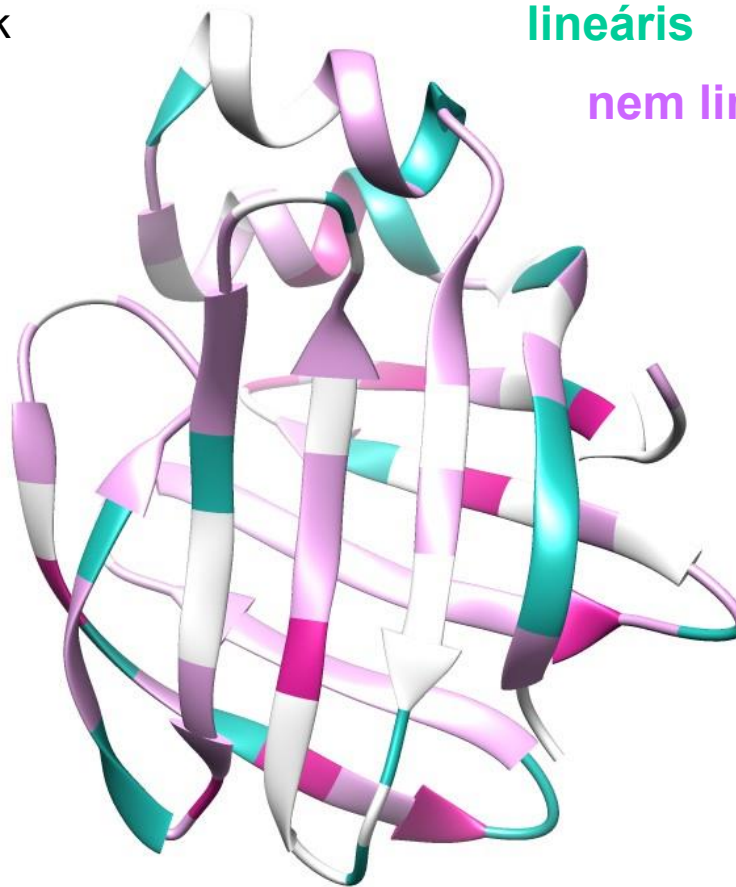


HŐDENATURÁCIÓ NMR SPEKTROSKÓPIÁS VIZSGÁLATA



HŐDENATURÁCIÓ NMR SPEKTROSKÓPIÁS VIZSGÁLATA

apo humán I-BABP
 $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ kémiai eltolódások
hőmérsékletfüggése
(5-54 °)

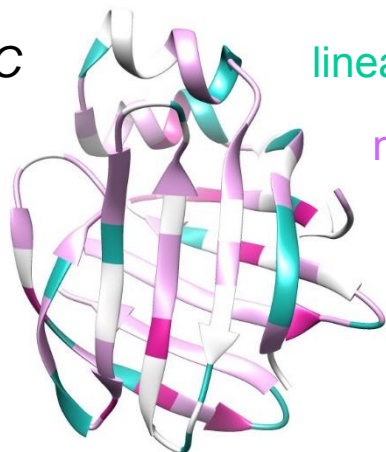


lineáris

nem lineáris

HŐDENATURÁCIÓ NMR SPEKTROSKÓPIÁS VIZSGÁLATA

5-54 °C



lineáris

nem lineáris

F ↔ I ↔ U

modell

feltételezésével

$$\delta = x_F \delta_F + x_I \delta_I + x_U \delta_U$$

$$x = P(\Delta H^{F-I}, \Delta H^{I-U}, T_m^{F-I}, T_m^{I-U}, \Delta C_p^{F-I}, \Delta C_p^{I-F}, T)$$

F ↔ I

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

$$RT \ln K^{F-I} = \Delta G^{F-I}(T)$$

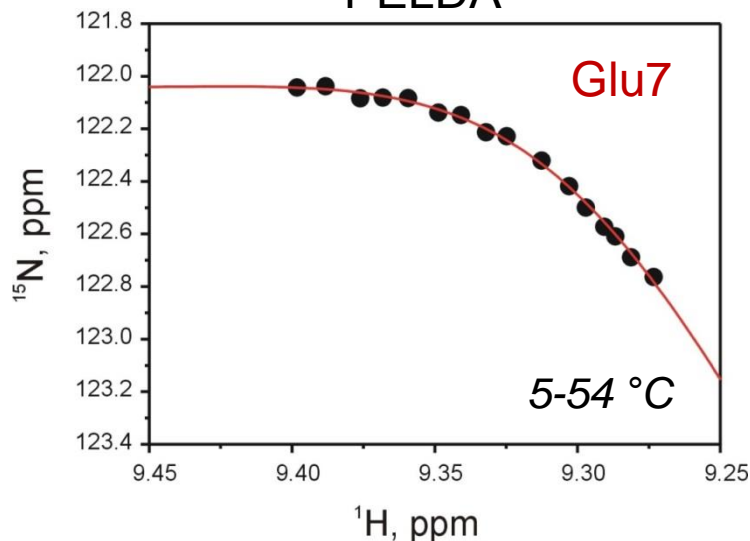
I ↔ U

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

$$RT \ln K^{I-U} = \Delta G^{I-U}(T)$$

HŐDENATURÁCIÓ NMR SPEKTROSKÓPIÁS VIZSGÁLATA

PÉLDA

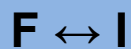


modell

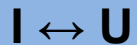
feltételezésével

$$\delta = x_F \delta_F + x_I \delta_I + x_U \delta_U$$

$$x = P(\Delta H^{F-I}, \Delta H^{I-U}, T_m^{F-I}, T_m^{I-U}, \Delta C_p^{F-I}, \Delta C_p^{I-F}, T)$$



$$\Delta G^{F-I}(T) = \Delta H^{F-I}(T_m^{F-I}) \left[1 - \frac{T}{T_m^{F-I}} \right] - \Delta C_p^{F-I} [T_m^{F-I} - T \left(1 - \ln \frac{T}{T_m^{F-I}} \right)] \quad RT \ln K^{F-I} = \Delta G^{F-I}(T)$$



$$\Delta G^{I-U}(T) = \Delta H^{I-U}(T_m^{I-U}) \left[1 - \frac{T}{T_m^{I-U}} \right] - \Delta C_p^{I-U} [T_m^{I-U} - T \left(1 - \ln \frac{T}{T_m^{I-U}} \right)] \quad RT \ln K^{I-U} = \Delta G^{I-U}(T)$$

DSC mérések és adatok elemzése folyamatban...

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS



MTA TTK Szerves Kémiai Intézet
MTA TTK Műszercentrum

Horváth Gergő

MTA TTK AKI
Spektroszkópai Kutatócsoport

dr. Miskolczi Zsombor

MTA TTK AKI
Biológiai Nanokémia Kutatócsoport

dr. Szigyártó Imola Csilla
dr. Mihály Judith

OTKA K 109035, Medinprot/MTA, TTK_all

Köszönöm a megtisztelő figyelmet!