

MedInProt Szinergia IV. program

Szerkezetvizsgáló módszer a rendezetlen fehérjék szerkezetének és kölcsönhatásainak jellemzésére

Tantos Ágnes

MTA TTK Enzimológiai Intézet,
Rendezetlen fehérje kutatócsoport

Fő kutatási témák:

Rendezetlen fehérjék és fehérjeszakaszok szerepe rákos megbetegedésekben
Szolid tumorok kialakításában szerepet játszó fúziós fehérjék interakciós hálózatának jellemzése
Rendezetlen fehérjék szerkezeti adaptációja

Kardos József

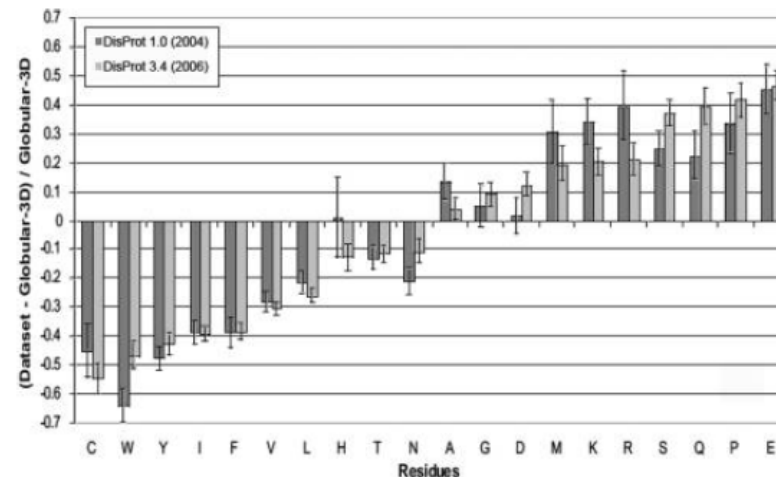
ELTE TTK Biokémiai Tanszék,
MTA-ELTE NAP B Neuroimmunológiai Kutatócsoport

Fő kutatási témák:

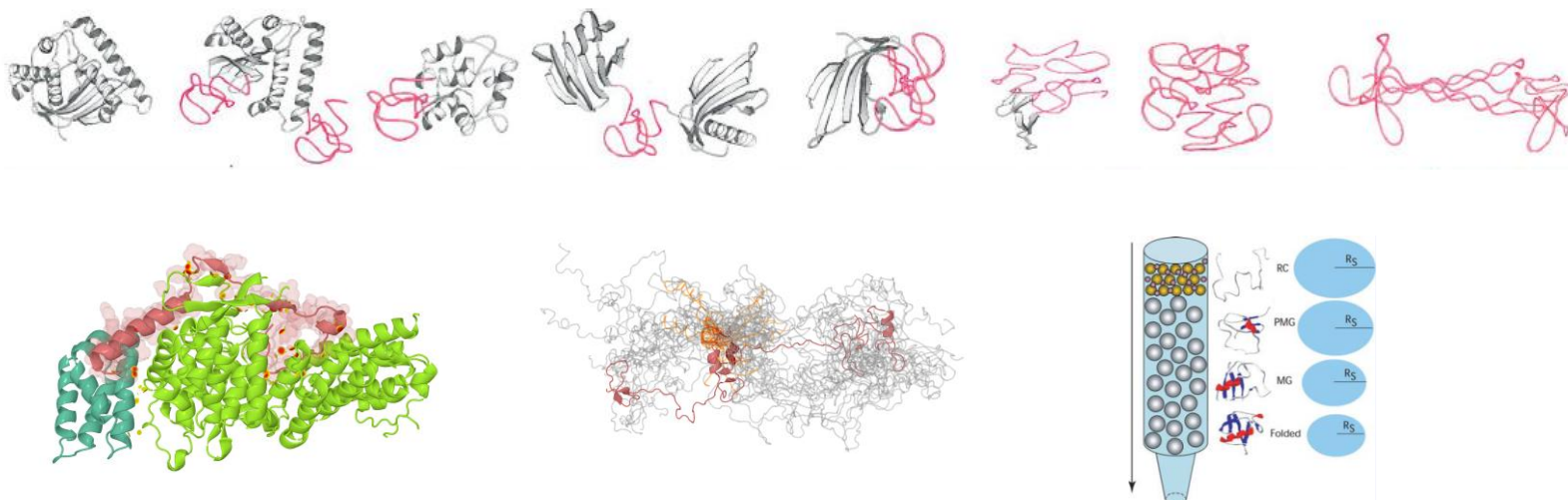
A fehérjeaggregáció és amiloidképződés szerkezeti és termodinamikai hátterének vizsgálata
Fehérjék és kölcsönhatásaik biofizikai, spektroszkópiai jellemzése
A komplementrendszer agyi szerepének vizsgálata

A rendezetlen fehérjék

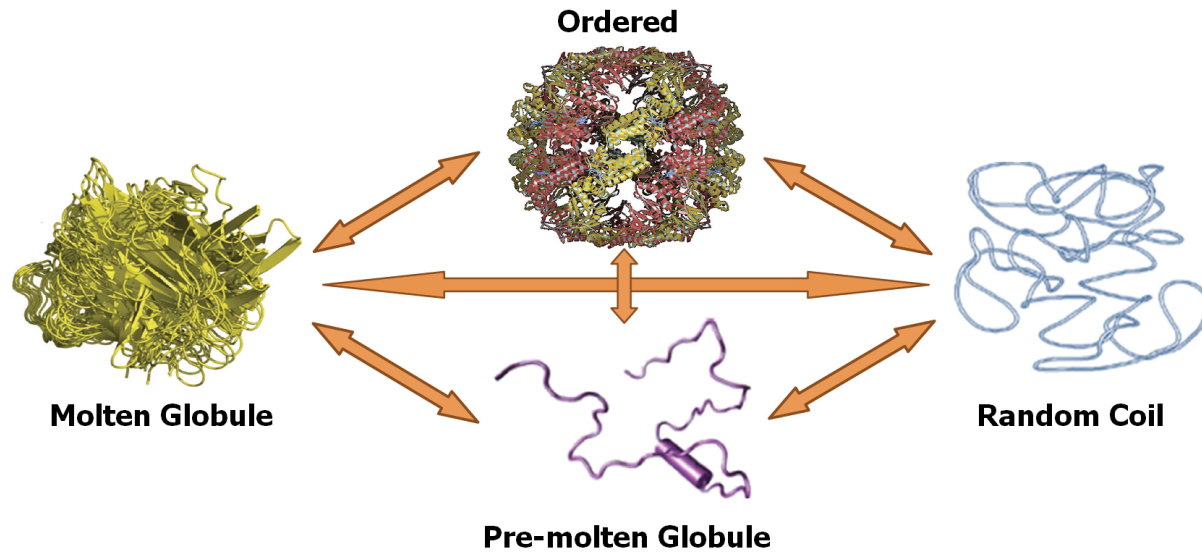
- Sajátos aminosav összetétel
- Nyílt és oldószernek kitett peptidlánc
- Flexibilitás, mobilitás
- Szerkezeti heterogenitás (sokaság)
- Nagy hidrodinamikai térfogat



Habchi *et al.* (2014) Chem. Rev.



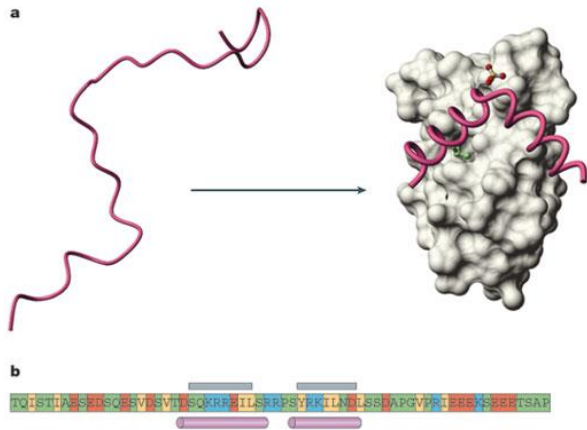
A funkció bármelyik állapotból és az átmenetekből is származhat



Sun et al. (2012)

Lineáris motívumok

Az ELM szerver <http://elm.eu.org/>



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

ELM The Eukaryotic Linear Motif resource for *Functional Sites in Proteins*

Search ELMs Instances Candidates Links About News Help Downloads Diseases Viruses

Functional site prediction

Protein sequence
Enter Uniprot Identifier or accession number; (auto-completion)
e.g. EPN1_HUMAN, P04637, TAU_HUMAN, [RANDOM]

Or paste the sequence (Single letter code sequence only or FASTA format):

Cell compartment (one or several):
☐ not specified
☐ extracellular
☐ nucleus
☐ cytosol
☐ peroxisome
☐ glyoxysome
☐ Endoplasmic reticulum

Taxonomic Context
Type in species name (auto-completion):

Motif Probability Cutoff:

Featured paper:
 PDB-Structure 4BLD showing peptide from ELM class **LIG_SUFLU_1**
 "Use of host-like peptide motifs in viral proteins is prevalent strategy in host virus interactions."
 Become an ELM sponsor
 The ELM phosphorylation DB
 The Switches.ELM DB

ALG-2

255 annotated **ELM classes**

2,909 experimentally validated **ELM instances** in 195 taxons

110 **ELM methods** described in 2,896 articles to experimentally validate ELM instances

418 solved **PDB structures** for curated ELM instances (from [PDB](#))

131 globular **ELM binding domains** (from [Pfam](#), [SMART](#), and [InterPro](#))

1,293 **interactions** mediated by curated ELM instances

879 regulatory **switches** mediated by curated ELM instances (from [Switches.ELM DB](#))

784 **pathways** from [KEGG](#) involving linear motifs annotated in 832 Sequences

242 **viral instances** interfering with host cellular processes

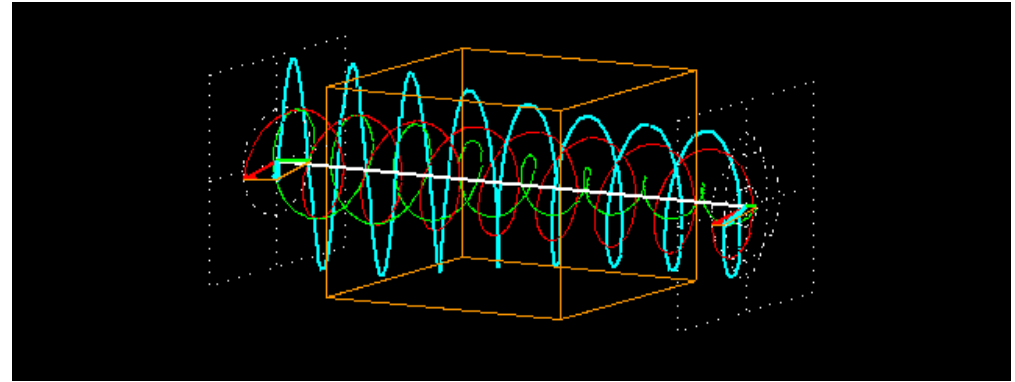
11 **ELM related diseases** annotated as being caused by aberrant motif function

2 examples where **pathogens abuse** motifs to deregulate host cells

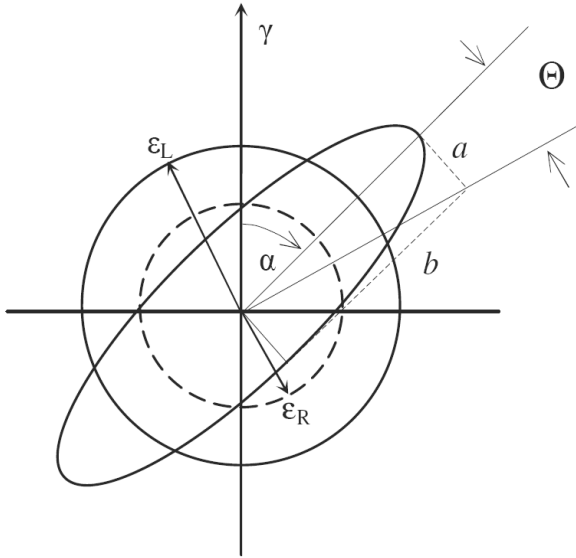
Rendezetlen fehérjék szerkezetének és kölcsönhatásainak vizsgálata

- Nagyfelbontású módszerek (röntgendiffrakció, NMR) korlátozottan használhatóak
- Másodlagos szerkezet vizsgálata: **cirkuláris dikroizmus (CD)** és Fourier-transzformációs infravörös (FTIR) spektroszkópia
- Egyéb módszerek a hidrodinamikai rádiusz, alak, kompaktság stb. meghatározására
- Kötődés vizsgálata: izotermális titráló kalorimetria (ITC), felszíni plazmon rezonancia (SPR) stb.

CD spektroszkópia



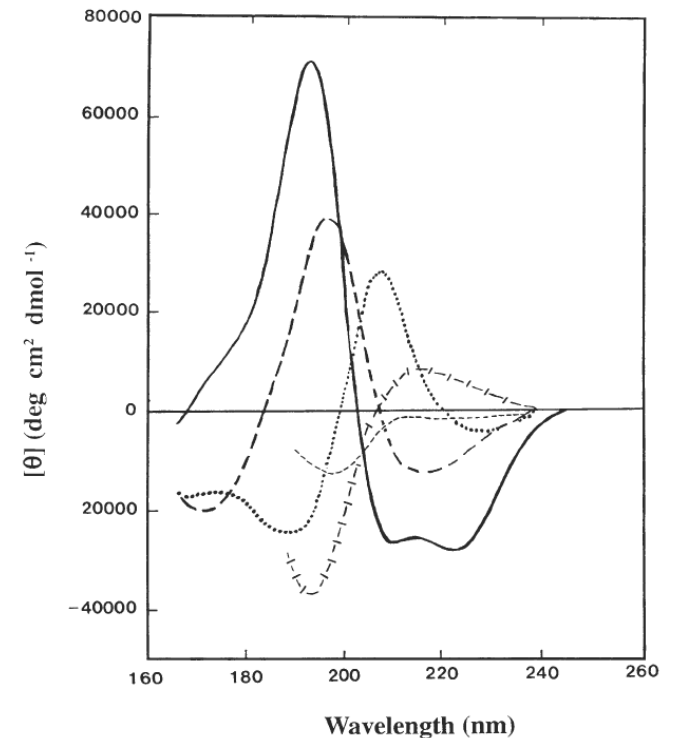
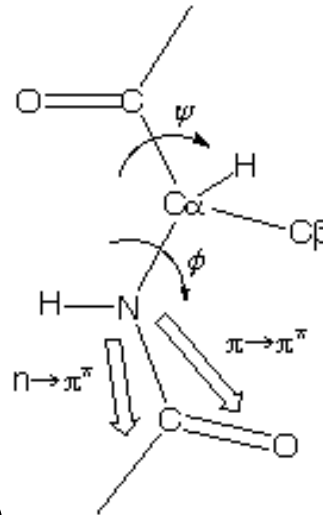
Szilágyi András, Enzimológiai Intézet



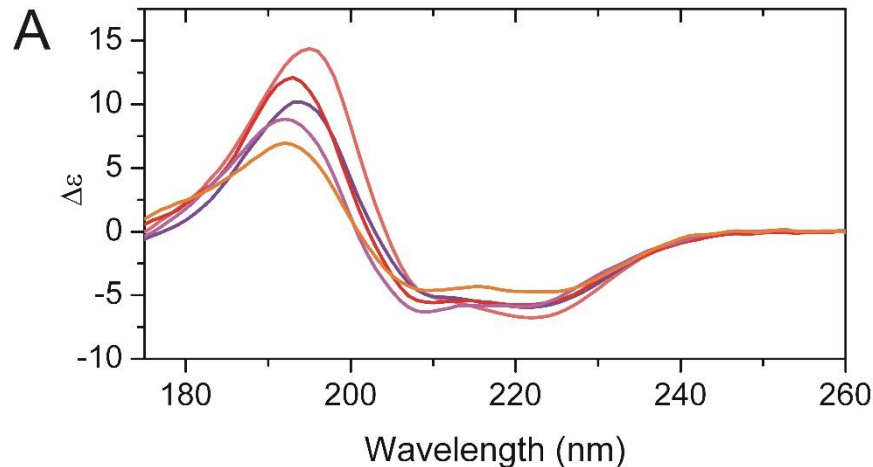
$$\Delta\epsilon = \epsilon_R - \epsilon_L = \Delta A / (c \times l) \quad (\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1})$$

$$[\Theta] = 100 \times \Theta / (c \times l) \quad (\text{deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1})$$

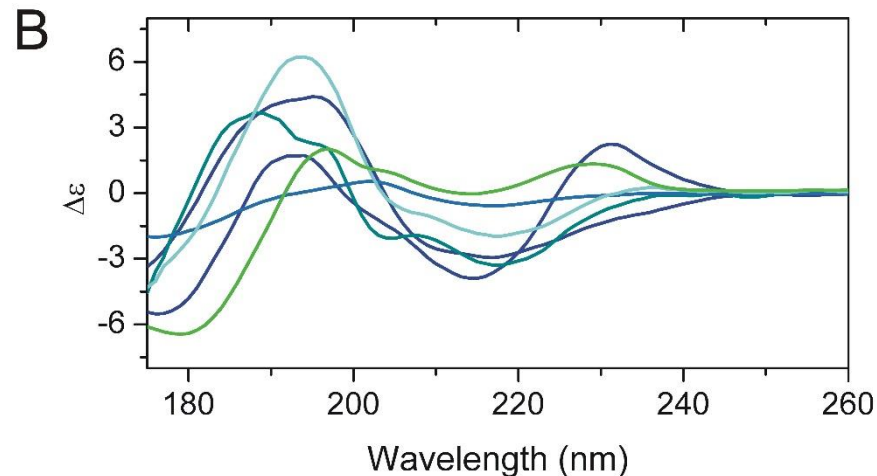
$$\Delta\epsilon = [\Theta] / 3298.2$$



A másodlagos szerkezet CD spektrumból történő meghatározásának problémája – a β -redős fehérjék spektrumának változatossága



~50% α -hélixet tartalmazó
fehérjék SRCD spektrumai



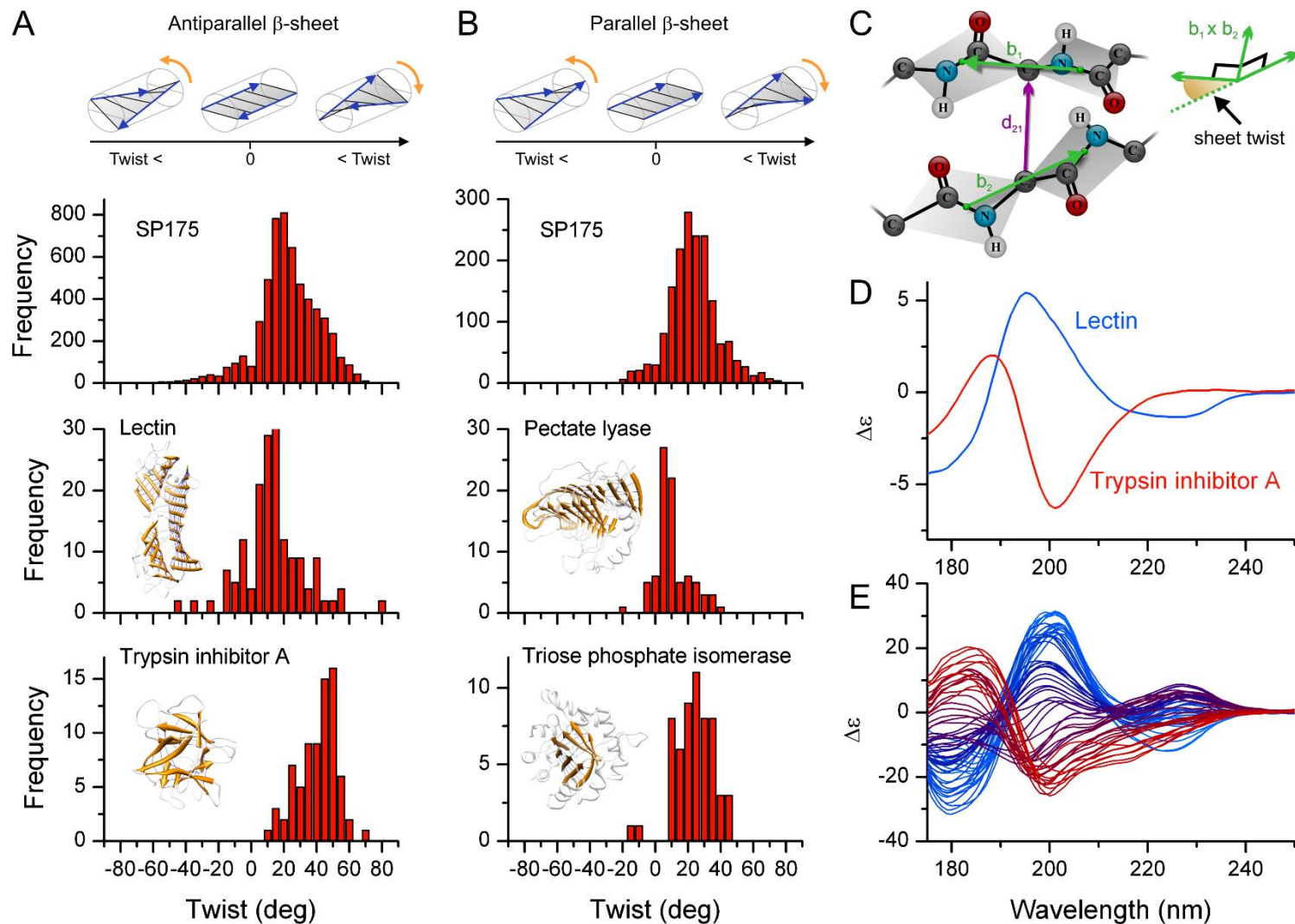
~50% β -szerkezet tartalmú
fehérjék SRCD spektrumai

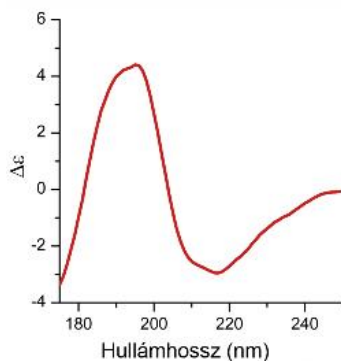
— Glycogen phosphorylase-b (1gpb) — Glutamate dehydrogenase I (1hwx)
— Phosphatidylcholine 2-acylhydrolase (1une) — 3-dehydroquinase (1qfe)
— Aldolase (1ado) — Streptavidin (1stp) — Gamma-s-crystallin C (1ha4)
— Immunoglobulin G (1igt) — Beta lactoglobulin (1b8c) — Avidin (1rav)
— Gamma-B crystallin (4gcr)



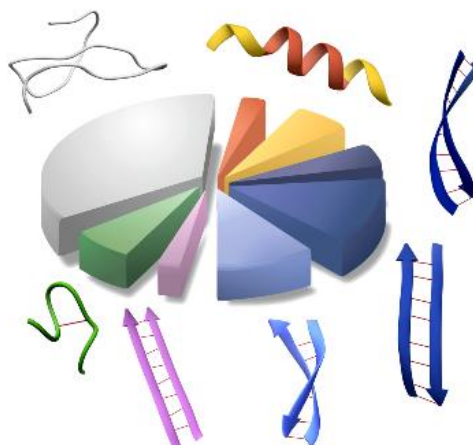
A β -szerkezetek diverzitását a
módszer korlátjaként értékelik,
amely lehetetlenné teszi a pontos
másodlagos szerkezet
meghatározását

A CD spektrum és a β -redős szerkezet csavarodása

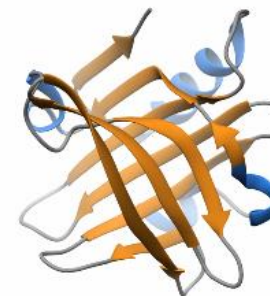




CD spektrum



Másodlagos szerkezet



Fehérje fold



PNAS PLUS

Accurate secondary structure prediction and fold recognition for circular dichroism spectroscopy

András Micsonai^a, Frank Wien^b, Linda Kernya^a, Young-Ho Lee^c, Yuji Goto^c, Matthieu Réfrégiers^b, and József Kardos^{a,1}

^aDepartment of Biochemistry and MTA-ELTE NAP B Neuroimmunology Research Group, Institute of Biology, Eötvös Loránd University, H-1117 Budapest, Hungary; ^bDISCO Beamline, Synchrotron SOLEIL, 91192 Gif-sur-Yvette, France; and ^cDivision of Protein Structural Biology, Institute for Protein Research, Osaka University, Osaka 565-0871, Japan

Edited by Carl Frieden, Washington University School of Medicine, St. Louis, MO, and approved May 6, 2015 (received for review January 15, 2015)



Célkitűzések

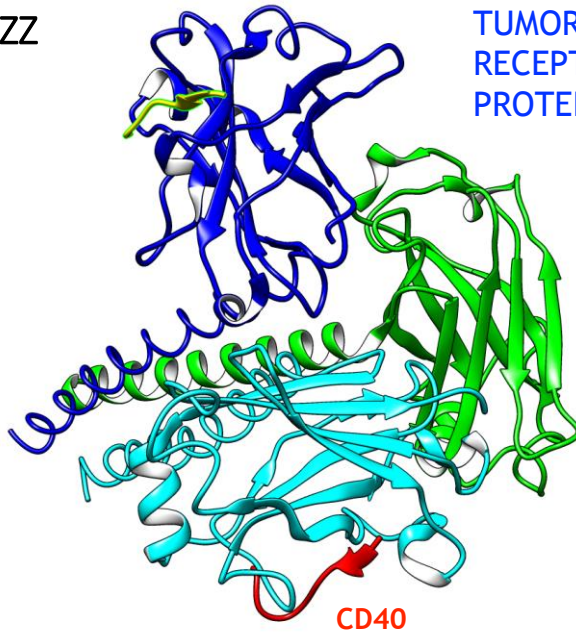
- A rendezetlen fehérjék másodlagos szerkezeti elemeinek vizsgálatára alkalmas CD spektrum elemző algoritmus fejlesztése és pontosítása.
- A CD spektrumok elemzésének eredményét összehasonlítjuk az NMR és molekuladinamikai szimulációk segítségével kapott szerkezeti adatokkal, és ennek alapján javíthatjuk a szerkezetbecslés pontosságát.
- Az algoritmus segítségével különböző rendezetlen fehérjék kötő régióinak szerkezetét jellemezzük.
- Vizsgált fehérjék:
 - p53 TAD és mdm2
 - TNFR 5
 - Splicing factor 1 (SF1)
 - ERD14

Tumor necrosis factor receptor superfamily member 5

Szerkezet kötött állapotban

NMR spektroszkópia szabad állapotban

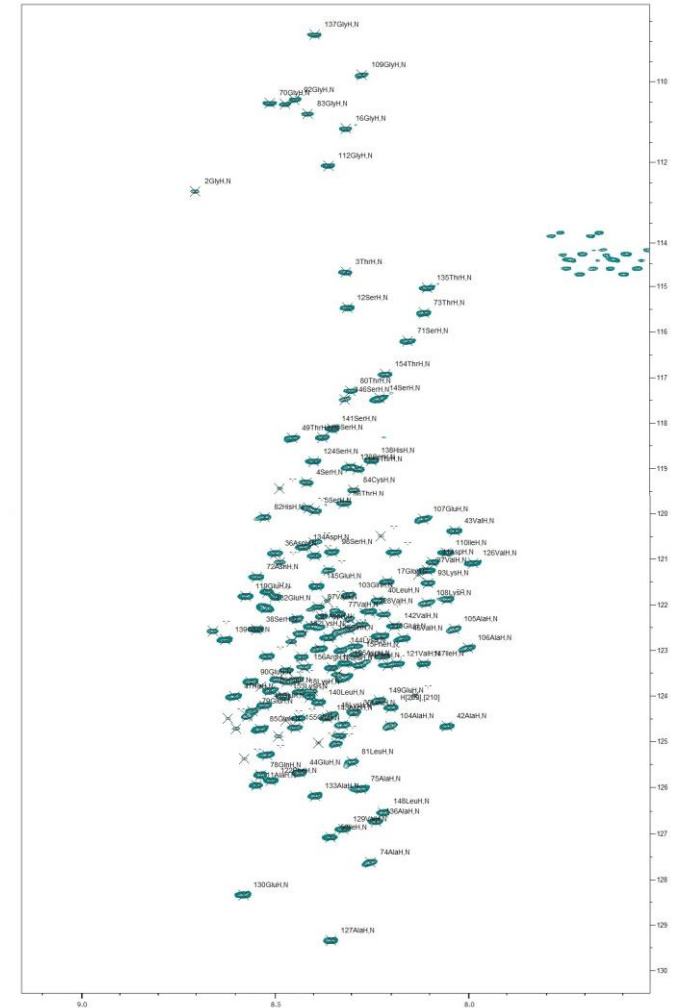
1CZZ



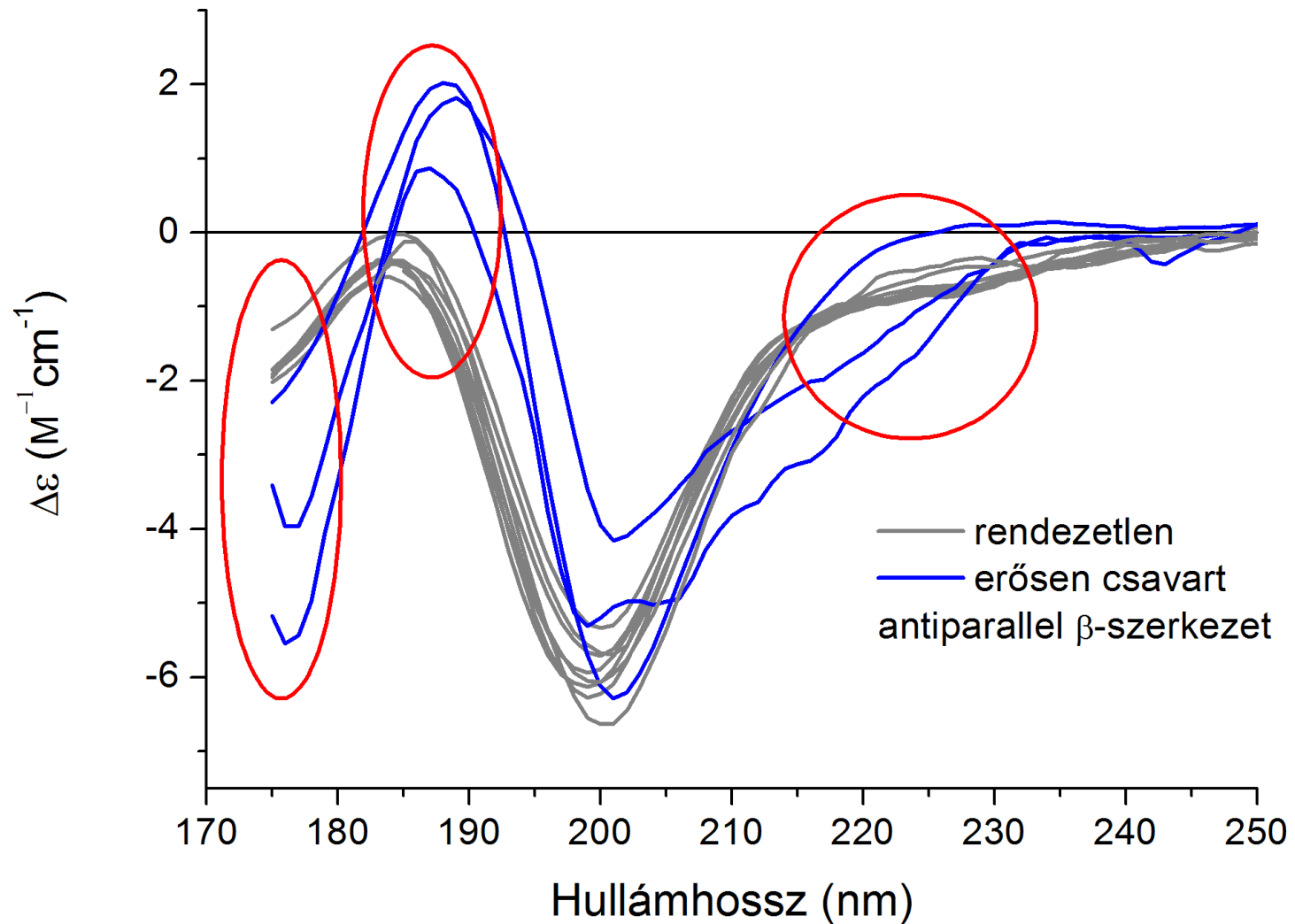
TUMOR NECROSIS FACTOR
RECEPTOR ASSOCIATED
PROTEIN 2

Ye *et al.* (1999)

KQEPQEINFPDDLPGSNTAA_PVQETLHGC_QPVTQEDGKESRISVQERQ



A rendezetlen fehérjék CD spektrumai és a csavart antiparallel β -szerkezet

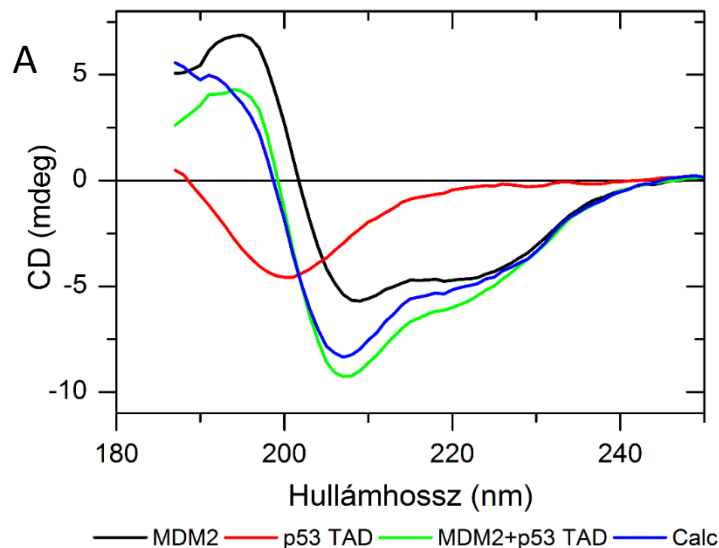


A rendezetlen fehérjék másodlagos szerkezetének becslése különféle algoritmusokkal és a módszer továbbfejlesztése

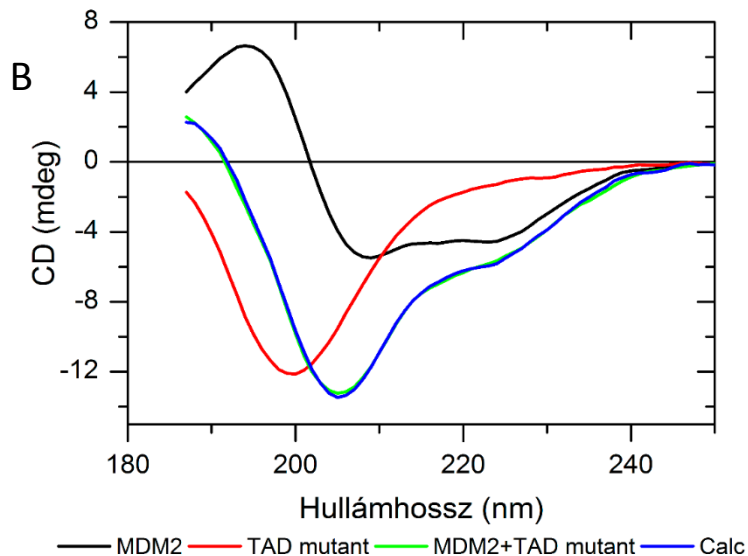
	H	B	O
BeStSel	0.077	0.206	0.717
CONTIN	0.093	0.211	0.696
K2D	0.077	0.253	0.670
SELCON	0.107	0.254	0.633
CDSSTR	0.057	0.310	0.627
VARSLC	0.035	0.515	0.500
BeStSel_IUP	0.053	0.090	0.858

Az általunk vizsgált rendezetlen fehérjék átlagos szerkezetbecslése különféle algoritmusokkal
H:hélix, B: β -szerk, O: egyéb (főleg rendezetlen).

MDM2 és p53 TAD domén kölcsönhatása



A: MDM2, p53 TAD domén, és komplexük CD spektrumai. A kölcsönhatás során 5%-kal megnő az α -hélix tartalom.



B: MDM2, p53 TAD mutáns és keverékük CD spektrumai. A mutánsban az összes aromás oldallánc glicinre lett kicserélve. Az összspektrum megegyezik a keverék spektrumával, arra utalva, hogy nincs kölcsönhatás köztük.

Összefoglalás

- A CD gyors és olcsó módszer a rendezetlen fehérjék szerkezetének és kölcsönhatásainak tanulmányozására
- SRCD spektroszkópiával széles hullámhossztartomány mérhető
- Számos rendezetlen fehérje CD spektrumát rögzítettük, szerkezetüket NMR spektroszkópiával és MD szimulációkkal is vizsgáljuk
- A BeStSel algoritmus továbbfejleszthető a rendezetlen fehérjék vizsgálatára
- A módszert eredményesen alkalmazzuk számos rendezetlen fehérje problémakörére

Köszönetnyilvánítás

Tompa Péter

Micsonai András

Szabó Bea

Murvai Nikoletta

Bulyáki Éva

Mészáros Attila

Kun Judit



MedInProt Program, ANN-OTKA 111056, a Koreai-magyar Tét,
KTIA_NAP_13-2-2014-0017, K-16-12391, SOLEIL Synchrotron

