

Belső molekuláris mozgások vizsgálata a humán epesav-kötő fehérjében NMR-spektroszkópiával

Doktori értekezés tézisei

Horváth Gergő

Eötvös Loránd Tudományegyetem, Természettudományi Kar, Biológia Doktori Iskola

Vezető: Prof. Erdei Anna

Szerkezeti Biokémia Doktori Program

Programvezető: Prof. Nyitray László



Témavezető:

Tőke Orsolya, Ph.D., tud. főmunkatárs

MTA TTK, Szerves Kémiai Intézet

Budapest

2015



1. Bevezetés

A vékonybél távoli szakaszában termelődő humán epesav-kötő fehérje (I-BABP) kulcsszerepet tölt be az epesavak metabolikus célbajuttatásában, konkrétan azok ún. enterohepatikus (bél-máj) körforgásában. Az epesavak azon túlmenően, hogy segítik a zsírok, zsírban oldódó vitaminok felszívódását a szervezetben, fontos szerepet játszanak az anyagcsere folyamatok, többek között saját maguk szintézisének és ezzel a koleszterinszintnek a szabályozásában. Az intracelluláris lipidkötő fehérjék (iLBP) családjába tartozó humán I-BABP két kötőhellyel rendelkezik, amelyek között kötőhely szelektivitással párosuló pozitív kooperativitás működik. Mindkét jelenség esetében meghatározó szerepet játszik a ligandumok hidroxil-csoport mintázata, amely alapján valószínűsíthető, hogy a kommunikáció a két kötőhely között H-kötések közvetítésével valósul meg. Ennek molekuláris részletei azonban egyelőre tisztázatlanok. Úgyisntén tisztázatlan miként jutnak be a ligandumok a fehérje belsejében található kötőüregbe, és miként távoznak onnan. Megállított áramlásos kinetikai mérések és rokon iLBP fehérjéken végzett biofizikai vizsgálatok a konformációs fluktuációk fontosságára utalnak az I-BABP fehérje működésében.

Az NMR spektroszkópia azon ritka kísérleti módszerek egyike, amellyel a molekuláris felismerési folyamatoknak mind a szerkezeti, mind a dinamikai aspektusa tanulmányozható. További előnye, hogy segítségével a fehérjékben egymásra szuperponálódó és a biológiai működés szempontjából meghatározó molekuláris mozgások széles időskálán tanulmányozhatók. Fontos szempont az is, hogy az NMR vizsgálatokkal nyert atomi- vagy legalábbis aminosav-szintű információ összefüggésbe hozható makroszkopikusan mérhető termodinamikai és kinetikai paraméterekkel.

Röntgen-szerkezet hiányában a ~ 14 kDa molekulatömegű humán I-BABP fehérje különösen ideális célpontja az NMR szerkezeti és dinamikai vizsgálatoknak. Segítségével mechanisztikus kép nyerhető a fehérje-epesav kölcsönhatás molekuláris részleteiről, mely a jövőben hozzájárulhat új, a fehérje biológiai funkciójával összefüggésbe hozható patológias állapotok gyógyításához illetve megelőzéséhez.

2. Célkitűzések

Doktori munkám célja a biológiai működés szempontjából meghatározó μ s-ms és ps-ns időskálán zajló belső mozgások aminosav-szintű jellemzése a humán I-BABP fehérjében, beleértve a ligandum kötődés hatásának feltárását a fehérjében zajló molekuláris fluktuációkra. Ezzel összefüggésben céltom továbbá a ligandumkötődés - korábbról ismeretes - termodinamikai paramétereinek, valamint a komplexképződést kísérő szerkezeti változásoknak az értelmezése a belső dinamikai folyamatok tükrében.

3. Módszerek

A fehérje belső mozgásainak karakterizálására irányuló dinamikai vizsgálatainkat elsődlegesen NMR relaxációs módszerekkel végeztük ^{15}N izotópjelzett *apo* és *holo* (GCDA és GCA epesavak ekvimoláris elegyével komplexált) humán I-BABP fehérjén. Méréseink túlnyomó részét 600 MHz-es térerőn végeztük inverz detektálású z-gradienssel ellátott $^1\text{H}^{13}\text{C}^{15}\text{N}$ mérőfejen. A ^{15}N T_1 , T_2 relaxációs paraméterek és $^1\text{H}\{-^{15}\text{N}\}$ NOE értékek Lipari-Szabó modellmentes elemzését alapul véve, az aminosav szekvencia függvényében több különböző hőmérsékleten (10-40 °C) meghatároztuk az amid $^1\text{H}\text{-}^{15}\text{N}$ kötésvektor ps-ns fluktuációjának amplitúdóját jellemző általánosított rendparamétert (S^2), melyből az *apo* és *holo* fehérje konformációs entrópiájára vonatkozó adatokat nyertünk. A μ s-ms időskálán zajló konformációs cserefolyamatokat CPMG relaxációs diszperziós NMR technikával tanulmányoztuk a 10-25 °C hőmérséklet-tartományban. A cserefolyamatból adódó hozzájárulást a ^{15}N transzverzális relaxációhoz a CPMG tér függvényében a GUARDDD programmal elemeztük, melynek során kétállapotú cserefolyamatot feltételezve meghatároztuk a konformációs fluktuáció kinetikai (k_{ex}), termodinamikai (p_b =konformációs cserepartner populációja) és szerkezeti ($\delta\omega$ =cserepartnerek közötti ^{15}N kémiai eltolódás különbség) paramétereit. Az *apo* és *holo* fehérje relaxációs viselkedésének összevetéséhez szükség volt az *apo* fehérje gerincatomjainak jelhozzárendelésére kísérleti körülményeink között, melyet $^1\text{H}\text{-}^{13}\text{C}\text{-}^{15}\text{N}$ hármaszonancia NMR mérések kombinációjával végeztem $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ izotópjelzett fehérjén a Felix (Accelrys) program felhasználásával. NMR vizsgálatainkhoz a fehérjét rekombináns módszerrel állítottam elő ampicillin rezisztens pMON-5840 plazmiddal transzformált *E. coli* (MG1655) sejtekben.

4. Eredmények

1. Meghatároztam az *apo* humán I-BABP fehérje gerincatomjainak hozzárendelését kísérleti körülményeink között (20 mM K-foszfát, 50 mM KCl, 0,05% NaN₃, pH = 6,3, 25 °C). A H_α, C_α, C_β, CO kémiai eltolódások alapján meghatároztam a másodlagos szerkezeti elemek pozícióját az *apo* fehérjében és összevettem ezt a heterotipikus humán I-BABP:GCDA:GCA komplexben találtakkal. Megállapítottam, hogy a másodlagos szerkezeti elemek elhelyezkedése a fehérje két formájában nagyban hasonló; legnagyobb különbségek komplexálódás hatására a CD, EF és GH régiókban jelentkeznek. Megállapítottam, hogy néhány más iLBP-ben (pl. intesztinális zsírsavkötő fehérje) találtakkal ellentétben a helikális szegmens a humán I-BABP fehérjében mind az *apo*, mind a *holo* formában jól definiált másodlagos szerkezettel bír.
2. Telítési átvitel NMR mérésekkel jellemeztem a fehérjegerinc amidprotonjainak oldószer protonokkal történő cserélődésének mértékét az *apo* és a *holo* formában. Megállapítottam, hogy a ligandumok kötődése növeli a fehérje stabilitását, legjelentősebben a hurokrégiókban (CD, EF, IJ), valamint az F béta szál N-terminális végén. A fehérje mindkét állapotában a helikális régió átlagon felüli stabilitását találtam.
3. Az *apo* fehérjében CPMG relaxációs diszperziós NMR mérésekkel detektáltam egy szobahőmérséklet közelében ms időskálán zajló kiterjedt konformációs cserefolyamatot, amely ligandumkötődés hatására megszűnik. Megállapítottam, hogy a cserefolyamatban érintett aminosav pozíciók egy „lassabb” és egy „gyorsabb” klaszterbe tömörülnek, mely két klaszter 25 °C-on $k_{ex} \sim 2900 \text{ s}^{-1}$ cseresebességi állandóval egymásba olvad.
4. A 10-18 °C hőmérséklet tartományban hőmérsékletfüggő CPMG R_{ex} NMR mérésekkel meghatároztam az *apo* fehérjében zajló konformációs cserefolyamat termodinamikai paramétereit, és megállapítottam, hogy mind a lassabb, mind a gyorsabb klaszter fluktuációját entrópia-entalpia kompenzáció jellemzi, ami a néhány százalékos populációban jelenlevő magasabb energiájú állapot alacsonyabb rendezettségére utal.

5. A CPMG R_{ex} mérésekből származtatható, alap és gerjesztett állapot közötti ^{15}N kémiai eltolódás különbségek összevetése a ligandumkötődés hatására bekövetkező ^{15}N kémiai eltolódásokkal a direkt ligandum hatásnak ki nem tett aminosav pozíciókban valószínűsíti, hogy a ligandum kötődés a konformációs szelekció elve szerint valósul meg a fehérjében, az *apo* formában jelenlevő ms konformációs fluktuáció egyensúlyának eltolásával.
6. A ^{15}N T_1 , T_2 relaxációs paraméterek és $^1\text{H}\{-^{15}\text{N}\}$ NOE értékek több különböző hőmérsékleten elvégzett analízise alapján az amid $^1\text{H}\text{-}^{15}\text{N}$ kötésvektorok ps-ns fluktuációinak nemlineáris hőmérsékletfüggését állapítottam meg a vizsgált 10-40 °C hőmérséklet tartományban mind az *apo*, mind a *holo* humán I-BABP fehérjében.
7. Megállapítottam, hogy a ligandum kötődés hőmérsékletfüggő módon befolyásolja az amid $^1\text{H}\text{-}^{15}\text{N}$ kötésvektorok ps-ns flexibilitását a fehérjében a vizsgált hőmérséklet tartományban.
8. Azonosítottam több kulcsszerepet játszó aminosav pozíciót és szegmenst a humán I-BABP fehérjében, melyek támpontot adhatnak további, a ligandum kötődés dinamikai aspektusainak feltárását célzó mutagenézis vizsgálatnak.

5. Következtetések

A lassú (μs -ms) konformációs mozgások és a gyors (ps-ns) fluktuációk tanulmányozására irányuló NMR relaxációs vizsgálataink révén az *apo* és *holo* állapot dinamikai viselkedésében észlelt különbségek felvetik a lehetőségét a ligandum kötődés dinamikai sajátosságok változtatása révén történő optimalizálhatóságának. Ez utóbbi a fehérje anyagcsere folyamatokban való érintettsége révén a jövőben hozzájárulhat új gyógyszermolekulák, diagnosztikus markerek, valamint az I-BABP állványzatán alapuló szállítófehérjék tervezéséhez.

6. Publikációk

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

G. Horváth, P. Király, G. Tárkányi, O. Tőke (2012): Internal motions and exchange processes in human ileal bile acid-binding protein as studied by backbone ¹⁵N NMR spectroscopy, *Biochemistry*, 51:1848-1861, Erratum in: *Biochemistry* 2012, 51:10119, IF: 3.422 Független idézők: 8

G. Horváth, O. Egyed, O. Tőke (2014): Temperature dependence of backbone dynamics in human ileal bile acid-binding protein: Implications for the mechanism of ligand binding. *Biochemistry*, 53:5186-5198, IF: 3.194 Független idézők: 1

G. Horváth, Á. Bencsura, Á. Simon, G. P. Tochtrop, G. T. DeKoster, D. F. Covey, D. P. Cistola, O. Tőke: Solution NMR structure of the ternary complex of human ileal bile acid-binding protein with glycocholate and glycochenodeoxycholate, *szerkesztés alatt*

Egyéb közlemények

G. Nyitrai, T. Keszthelyi, A. Bóta, A. Simon, O. Tőke, G. Horváth, I. Pál, J. Kardos, L. Héja (2013): Sodium selective ion channel formation in living cell membranes by polyamidoamine dendrimer, *Biochim. Biophys. Acta*, 1828:1873-1880, IF: 3.389 Független idézők: 2