

Elméleti módszerek a fehérjekutatásban

Fuxreiter Mónika
Enzimológiai Intézet

Elméleti módszerek alkalmazási lehetőségei

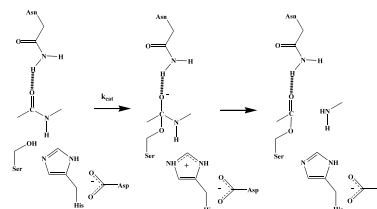
- a probléma kísérleti módszerrel nem megoldható (pl. átmeneti állapotok vizsgálata)
- kísérleti adatok kiegészítéseként (pl. szerkezetmeghatározásoknál)
- kísérleti adatok felbontásának javítására (pl. modellépités)
- kísérleti adatok értelmezésére (pl. kinetikai mérések, mutánsok vizsgálata)
- enzimsaládok vizsgálata (pl. evolúciós rokonságok)
- **jóslás** (szerkezet, mutánsok, mechanizmus ...)

Szerkezeti biológiai problémák

1. Enzim-mechanizmusok		k_{cat} [s ⁻¹]
	enzim	víz
carbonic anhydrase	6×10^5	10^{-9}
acetylcholine esterase	2×10^4	8×10^{-10}
staphylococcal nuclease	10^2	2×10^{-14}

1. Enzim-mechanizmusok

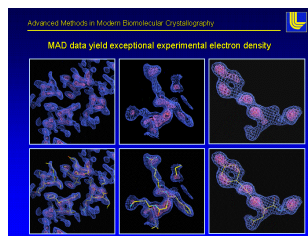
Szerin-proteázok



Enzim-mechanizmusok Problémák

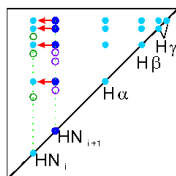
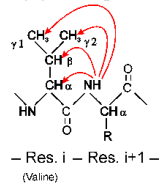
- Mechanizmus
 - reakciólépések pontos leírása
 - reakcióban közvetlenül résztvevő oldalláncok
 - sebességmeghatározó lépés azonosítása
- Katalízis értelmezése (miért gyorsabb, mint oldatban)
 - reaktánsok közel vannak
 - más a stabil konformáció (sztérikus stressz)
 - aktív centrum közreműködése (pl. sav-bázis katalízis)
 - távoli oldalláncok segítenek
 - más környezet (ROSSZ: gázfázis szerű)
 - speciális hidrogénkötések
- Mutációk hatásának értelmezése

2. Szerkezet-meghatározások Röntgenkristallográfia



Szerkezet-meghatározások NMR

Dipeptide Fragment



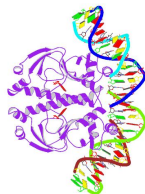
Szerkezet-meghatározások

- rossz paraméter/adat arány
modellépítés
finomítás empirikus erőter alkalmazásával
konformerek vizsgálata
- hiányzó részek azonosítása
rendezetlenség
hurkok (loop)
szubsztrát kötődés
inhibitor kötődés
kofaktor kötődés

Példák DNS kötő fehérjék

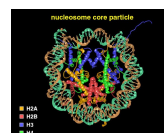
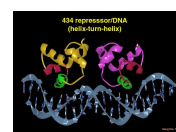
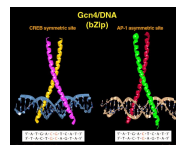


TATA box binding protein
(TBP)



catabolic gene activator protein
(CAP)

Példák DNS kötő fehérjék



Kvantitatív alkalmazások

- fehérjék, fehérje-DNS komplexek dinamikai vizsgálata (MD)
- kristallográfiai és NMR adatok finomításánál
- oldatfázis vizsgálata (ionos környezet)
- feltekeredés (földing) kinetikájának vizsgálata
- szekvencia-hasonlóság esetén szerkezetjölés
- rezgési spektrum vizsgálata (alacsony felbontáson)
- fehérje-szerkezet stabilitásának számítása (különbségek)
- enzimaktivitás kinetikájának számítása
- ligandumok kötődési energiájának számítása
- mutációk hatásának számítása
- katalitikus hatás értelmezése

Elméleti módszerek teljesítőképességének vizsgálata

Összehasonlítás megfelelő kísérleti adatokkal

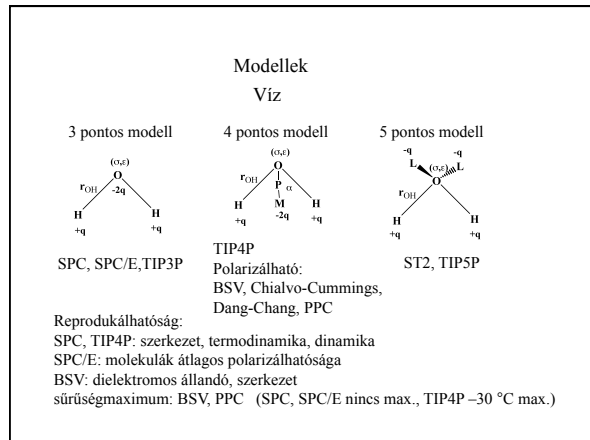
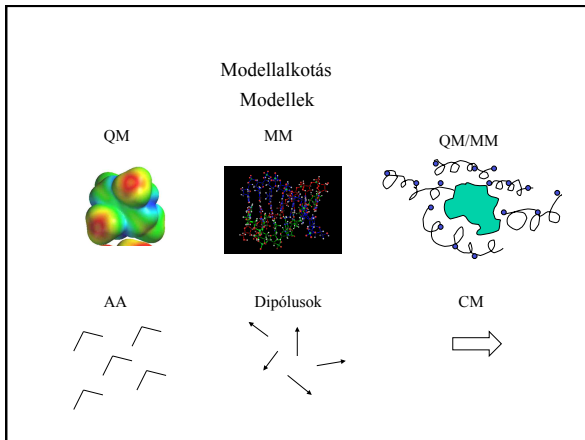
Szerkezetmeghatározásoknál

Röntgenkristallográfia: számított és mért szerkezeti tényezők
összehasonlítása (R faktor)

Összehasonlítás rokon fehérjékkel
Működés értelmezhetősége

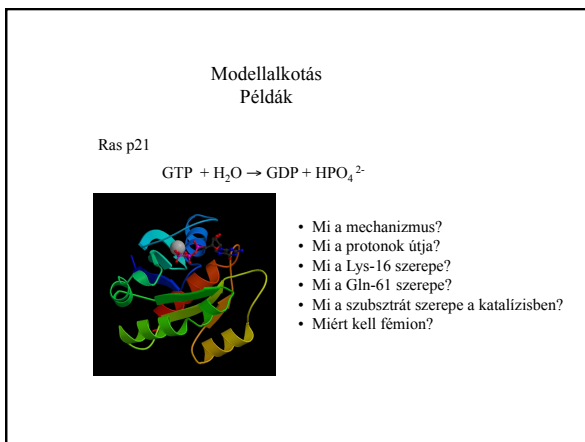
Katalitikus hatás magyarázata

k_{cat} reprodukálhatósága
 $k_{cat}(mutans)/k_{cat}(natív)$ adatok reprodukálhatósága
pH függés leírása
ionerősség függés leírása
jölés



- Modellválasztási stratégiák**
- Alapelvek
- A modell a probléma kémiai jellegével összhangban legyen. (nem mindig a QM a legjobb)
 - A problémát egészben kell tekinteni. (alapkérdések definiálása)
 - Minden fontos rész képviselve legyen. (környezet hatása)
 - eredmény/költség optimum
 - **A modell különböző részein használt módszerek hibahatára az adott probléma szempontjából hasonló legyen.**

- Modellalkotás**
Hibák
- katalitikus hatás helytelen értelmezése
 - molekuláris környezet helytelen figyelembe vétele (ionok)
 - *ab initio* számítások kevés oldallánc figyelembe vételével
 - számítások gázfázisban (nem semleges rendszer)
 - vizes környezet nem megfelelő leírása (kristályvizek)
 - elektrosztatikus hatások helytelen leírása (ϵ_m , pKa)
 - dinamikus hatások helytelen leírása



- Ras p21**
Lehetséges mechanizmusok
1. Hogyan aktiválódik a támadó vízmolekula?
- Gln-61 deprotonálja
 - másik vízmolekula deprotonálja
 - nem deprotonálódik (semleges víz támad)
 - concerted mechanizmus
 - γ -foszfát az általános bázis
 - közeli Asp vagy Glu (Asp-57) deprotonálja

Ras p21 Mechanizmusok vizsgálata

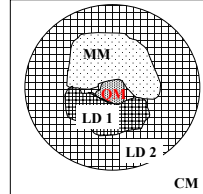
Kísérleti adatok

- Mutációs kísérletek: Gln-61, Gly-12, Gly-13 jelentős aktivitás csökkenés
- Röntgen szerkezet: ezek az oldalláncok a γ foszfát közelében vannak
- NMR: a γ foszfát pKa-ja különböző mutások esetén
- Kinetika: k_{cat} konst. ha $pH > 3$, és függ a γ foszfát pKa-jától

Hipotézis: szubsztrát közreműködésével történik a katalízis

Ras p21 Mechanizmusok vizsgálata

Warshel és mtsai. Nat. Struct. Biol. (1994) 1 pp. 476 – 484.

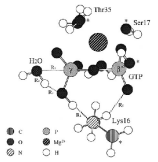


EVB/FEP módszerrel az összes lehetséges mechanizmus energiáját kiszámítják a teljes enzimműködés és víz figyelembe vételével.

Következtetés: γ foszfát deprotonálja a támadó vizet (E)

Modellalkotás Példák

Futatsugi et al. *Biophys. J.* (1999) 77 3287-3292.



Módszerek:

- szerkezet: optimált enzimből
- *ab initio* számítások alap és TS állapotra

Következtetések:

- "proton ping-pong" Lys segítségével
- Gln segít a katalitikus vizet helyes pozícióban tartani

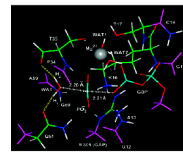
Hibák:

- Lys, GTP protonáltsági állapotát feltételezik
- enzim környezet hiányzik

Modellalkotás Példák

Cavalli et al. *J. Am.Chem.Soc.* (2002) 124, pp.3763-3768.

DFT-MD (Carr-Parinello)



- AIF₃ TS analóggal

- a fehérje elektromos terének 85%-a képviselve van
- 2 ps MD 60000 CPU óra
- O₆-Py 1.8 Å kényszerek alkalmazása
- elengedőkor a proton a Gln61 O-ra vándorol

Hiba:

irreális pKa-k, nincs összehasonlítás oldatreakcióval Gln→Glu mutáns nem magyarázható