PROTEINKEMI FOODTECH

## Et allosterisk CO-sensorprotein: Kommunikation mellem to polypeptidkæder

Mange proteiner er opbygget af mere end en polypeptidkæde - et eksempel er COsensorproteinet CooA. Dette dimerprotein findes i bakterien *R. Rubrum* og påbegynder ved højt CO-niveau aflæsningen af coo-genet, som koder for proteiner, der forbrænder CO. Her beskrives proteinets kooperativitet og dynamik ved binding af CO til dets to hæmgrupper

#### Af Steen Brøndsted Nielsen, Institut for Fysik og Astronomi, Aarhus Universitet

Et proteins konformation er altafgørende for dets funktion og aktivitet. Fejlfoldning kan føre til inaktivitet eller værre: skadelige processer; et eksempel er prionproteiner, der i en bestemt konformation fører til Creutzfeldt-Jacob sygdom. Det er derfor ikke overraskende, at proteinfoldning og proteindynamik er et forskningsfelt, der har tiltrukket meget stor opmærksomhed gennem årene med det sigte at belyse det fundamentale i foldningsprocessen og at karakterisere de forskellige mellemtrin. Ydermere, hvis man forstår, hvordan et protein finder dets rette konformation og tidsskalaen herfor, kan »kunstige« proteiner, nanomotorer, designes til at udføre specielle opgaver.

Men hvordan kan et fuldstændig udfoldet protein opnå den rette konformation i et tidsrum fra millisekunder til omkring et minut (Levinthals paradox)? Det er en gåde, der stadig mangler at blive løst. Proteiners konformationsændringer er desværre svære at studere direkte, om end en del fotofysiske metoder giver megen information.

Mange proteiner er sammensat af mere end en polypeptidkæ-



43

# ODTECH PROTEINKEMI

de. Hvordan og hvor hurtigt et sådant protein ændrer sin kvarternære struktur, når en af peptidkæderne ændres, er et andet interessant spørgsmål. Hvordan opnås den komplekse omorganisering? Hvis der er diskrete mellemprodukter, hvordan opfører protein-substrukturerne sig så i de mellemliggende trin? Er der generelle principper i proteindynamik, eller er hvert protein en unik »maskine«?

Det nok mest kendte eksempel er hæmoglobin (Hb), det iltbindende transportprotein, der er skyld i blods røde farve. Max Perutz bestemmelse af dette proteins tredimensionelle struktur vha. røntgenkrystallografi var en milepæl i molekylærbiologi. Hb består af fire polypeptidkæder, to α-kæder og to β-kæder, der er holdt sammen af ikke-kovalente bindinger [1]. Hver kæde (subunit) indeholder en jernholdig hæmgruppe, hvortil ilt bindes. Begge  $\alpha$ -kæder er i kontakt med begge  $\beta$ -kæder, hvorimod der er få vekselvirkninger mellem to kæder af samme type. Vekselvirkninger imellem forskellige sites kaldes allosteriske vekselvirkninger.

At Hb er et allosterisk protein kommer til udtryk ved, at iltbinding til en hæmgruppe favoriserer successiv iltbinding til en anden hæmgruppe i det samme Hb - og det selvom de fire hæmgrupper er for langt fra hinanden til en direkte vekselvirk-



Vi analyserer også patentinformation W, O K D tO Du får: Viden om den nyeste teknologi

PATENT- OG VAREMÆRKESTYRELSEN

 Overblik over konkurrenternes rettigheder og udviklingsstadie



 Beslutningsgrundlag for om dine innovationer kan beskyttes

tlf. 4350 8000 • fax 4350 8001 • pvs@dkpto.dk

ning. Dvs. hæmgrupperne »kommunikerer« med hinanden via vekselvirkningerne mellem de fire kæder.

Denne kooperative iltbinding resulterer i en S-formet iltbindingskurve (mætningsgrad som funktion af iltpartialtryk). Iltoptagelsen er effektiv i lungerne, hvor iltpartialtrykket er højt, og modsat er iltafgivelsen effektiv i musklerne, hvor trykket er lavt.

#### CooA-proteinet: en dimer der binder CO

CooA er en CO-sensor i bakterien Rhodospirillum Rubrum, der gror anaerobt under tilstedeværelsen af CO. Proteinet er en homodimer af to ens peptidkæder, der hver består af 222 aminosyrer og en hæmgruppe, og ligesom Hb har det en kvarternær struktur. CO bindes reversibelt til hæm. Proteinets struktur er afdækket vha. røntgenkrystallografi (figur 1) [2], og man ved, at den terminale prolin (Pro2) fra en monomer binder til hæm i den anden monomer. Hæmgruppens jern i Fe(II)-tilstanden koordinerer desuden histidin (His77).

Den nøjagtige struktur af det CO-bundne protein kendes ikke, da proteinet endnu ikke er krystalliseret på denne form. NMR har dog vist, at det er prolin-aminosyren, der udveksles med CO [3], hvorved en konformationsændring initieres. Den CO-bundne form kan binde sig til DNA og påbegynde aflæsningen af coo-genet, der koder for proteiner, der er forbundet med oxidation af CO (CO-forbrænding).

Når CO binder sig til et hæm, hvordan påvirkes CO-affiniteten så af det andet hæm? Hvad er tidskonstanten for CO-binding og CO-fraspaltning? Disse spørgsmål er for nylig besvaret vha. spektroskopiteknikker.

#### CooA er et positivt kooperativt protein

Om CooA-dimeren udviser kooperativitet i sin binding af CO kan bl.a. afgøres ved at måle Hill-koefficienten n, der er defineret ved,

$$CooA + 2 CO = CooA(CO)_2$$
(1)

$$\alpha = \frac{[CO]^n}{K_H + [CO]^n}$$
(2)

hvor α er mætningsgraden, dvs. brøkdelen af hæmgrupper med bundet CO, og  $K_H$  er Hill-ligevægtskonstanten.

Hvis *n* er mindre end 1, er proteinet negativt kooperativt; hvis *n* er lig med 1, er proteinet ikke-kooperativt; og hvis *n* er større end 1, er proteinet positivt kooperativt (figur 2).

*n* er i princippet en ufysisk størrelse. Dens afvigelse fra et heltal skyldes, at ligning (2) kun gælder, når de to polypeptidkæder er fuldstændig uafhængige af hinanden (n = 1), når bin-



Figur 2. Illustration af kooperativitet.

ding til en peptidkæde øjeblikkeligt fører til ligandbinding til den anden (n = 2) eller umuliggør binding til den anden (n = 0). En mere tilfredsstillende analyse er at måle ligevægtskonstanterne for hvert bindingstrin (Adair-analyse):

$$CooA + CO = CooA(CO)$$
 (3)

$$CooA(CO) + CO = CooA(CO)_2$$
 (4)





Figur 3. CO-titrering af CooA.

A. Absorptionsspektre af CooA tilsat forskellig mængde CO. I hjørnet ses differensspektre.

B. Brøkdelen af hæmgrupper der har bundet CO som funktion af CO-koncentrationen. Kurven med n=1 svarer til tilfældet, hvor der ikke er kooperativitet, og kurven med n=2 svarer til maksimal kooperativitet. Det bedste fit giver n = 1.4.

For at kunne måle  $\alpha$  benyttes der absorptionsspektroskopi, idet absorptionen er markant anderledes for CooA og CooA(CO) (figur 3). Bl.a. ligger abs. maks. for Soretbåndet ved hhv. 424 nm og 420 nm. De to spektre benævnes basisspektre.

For at finde  $\alpha$  blev der optaget spektre for forskellige COkoncentrationer, og hvert sumspektrum blev opløst i basisspektre. Resultatet ses på figur 3. En tilpasning til Hill-modellen giver n = 1.4, dvs. proteinet er positivt kooperativt i dets CO-bin-



Figur 4. Absorptionen ved 560 nm som funktion af tiden efter blanding af WT-CooA (wild type) og CO og  $\Delta P3R4$ -CooA og CO.

ding. Adair-modellen giver de to CO-bindingskonstanter: 0.17 μM<sup>-1</sup> og 1.25 μM<sup>-1</sup>.

#### Dvnamikken for CO-bindina: prolinfraspaltning fra hæm er hastighedsbestemmende

Hastighedskonstanter for CO-binding til CooA blev målt vha. stopped-flow-eksperimenter: en proteinopløsning blandedes med en opløsning af CO, og der blev optaget absorptionsspektre som funktion af tiden. Figur 4 viser den tidsmæssige afhængighed af absorptionen ved 560 nm (Q-bånd). Dataene kan beskrives med summen af to eksponentialfunktioner, der giver to observerede hastighedskonstanter,  $k_{obs}$ .

Hastighedskonstanternes afhængighed af CO-koncentrationen er vist i figur 5, side 46. Afhængigheden er ikke lineær, men hyperbolsk. En simpel forklaring er, at det hastighedsbestemmende trin ikke er selve CO-bindingen, men prolinfraspaltning fra hæm-gruppen. Ifølge denne model afhænger  $k_{abs}$ således af CO-koncentrationen:

$$k_{obs} = (k_{P} k_{CO} [CO] + k_{P} k_{CO} + k_{P} k_{CO})/ (k_{P} + k_{P} + k_{CO} [CO])$$
(5)

hvor  $k_{-P}$ ,  $k_P$ ,  $k_{CO}$  og  $k_{-CO}$  er defineret ifølge figur 6. Et kurvefit, der beskriver dataene tilfredsstillende, er indlagt i figur 5.

Som en test af denne model lavede vi et CO-bindingseksperiment for CooA-varianten ΔP3R4. I denne er to aminosyrer, Pro3 og Arg4, fjernet fra N-terminal-enden, så kæden, der bin-







vælg en sikker leverandør Swagelok

www.hytor.dk



### Digitalvægte

Prisbillige Laboratorievægte fra kr. 3.698,ex moms

> Hurtigt respons Modeller fra 150g til 60kg Oplosning 0,001g - 1g Stort display Bar graf Tælle-, vejemodeller **RS232** interface

Tlf. 8625 8899 FAX 8625 5889 salg@atimeo.dk www.atimco.dk

45









Figur 5. De to observerede hastighedskonstanters afhængighed af COkoncentrationen.

der til hæmgruppen, er mere strakt (figur 7). Det forventes at give en mindre barriere for prolinfraspaltning (sml. med en kort, udspændt elastik) og dermed en større  $k_{\text{-p}}$ . Dette eksperiment støtter modellen, da  $k_{\text{obs1}}$  vokser ca. en faktor tusind for proteinvarianten (figur 4).

#### Dynamikken for CO-fraspaltning: »indfangning« af produkter

Ved at »fange« CO hver gang det fraspalter ČooA(CO), kan  $k_{co}$  bestemmes. Myoglobinmutanten H64L deoxyMb har en meget stor CO-affinitet og er effektiv til at fjerne CO fra en opløsning. I et *stopped-flow*-eksperiment blandede vi derfor CooA(CO)<sub>2</sub> med denne mutant og målte igen ændringen i absorption som funktion af tiden. To hastighedskonstanter blev målt for  $k_{co}$ : 0.02 s<sup>-1</sup> og 0.002 s<sup>-1</sup>.

I et andet eksperiment blev hæmgruppen »fanget« efter COfraspaltning ved hurtig binding af NO. Hastighedskonstanter blev bestemt som i det første eksperiment. En tolkning af disse to hastighedskonstanter foreslås i modellen senere beskrevet baseret på to forskellige former af det CO-bundne protein, en åben og en lukket form.

#### Dynamikken for CO-binding til femkoordineret jern: fotolyseeksperimenter

Tilbage er at bestemme, hvor hurtigt CO binder sig til femkoordineret jern. Det blev gjort vha. *flash*-fotolyse-eksperimenter. Efter fotolyse af bindingen mellem CooA og CO måltes ændringen i Soretbåndets absorption som funktion af tiden, når CO genbindes. Eksperimentet muliggøres af, at et femkoordineret hæmkompleks har absorptionsmaksimum ved 435 nm (420 nm for CooA(CO)).



Figur 6. Model for binding af CO til hæm (vandret rød streg) i CooA.

I et andet eksperiment optog vi tidsopløste resonans Ramanspektre (RR) efter fotolyse. RR-effekten forstærker en chromofor-enheds vibrationsbånd ved at stille laseren ind på bølgelængden af en elektronisk overgang, i dette tilfælde 420 nm. Herved monitoreres bestemte strukturelle enheder i proteiner med stor følsomhed og selektivitet. Rød- og blåskift siger noget om, hvordan det kemiske miljø i nærheden af chromoforen ændrer sig og om styrken af de kemiske vekselvirkninger. Forudsætningen for eksperimentet er, at det karakteristiske n<sub>4</sub>-hæmbånd afhænger af, hvilke ligander der er bundet til jern. Når prolin er bundet, ligger båndet ved 1360 cm<sup>-1</sup>, når CO er bundet ved 1370 cm<sup>-1</sup> og ved 1355 cm<sup>-1</sup> for femkoordineret jern (figur 8). Ud fra toppenes tidsudvikling udledes der to hastighedskonstanter for CO-binding, og de passede med *flash*-fotolyse-transient-absorptionseksperimentet.



Figur 7. I  $\Delta$ P3R4-varianten er de to aminosyrer, prolin og arginin, efter den terminale Pro2 skåret af.

#### Afsluttende bemærkninger: en mulig model

Det store arbejde var nu at få alle data til at indgå i en samlet model, der redegør for positiv kooperativitet og den fundne dynamik. Det vil gå for vidt at give alle detaljerne, og i stedet skitseres kort den foreslåede model. Interesserede læsere henvises til reference 4.

I modellen (figur 9) indgår to forskellige former af proteinet i dets CO-bundne form, en åben og en lukket form. Den lukkede



Figur 8. Resonans Ramanspektre optaget på forskellige tider efter fotolyse af CooA-CO. Eksperimentet blev lavet ved to forskellige PH-værdier (A) pH 7 og (B) pH 11. CO-bundet hæm har et  $n_4$ -bånd ved 1370 cm<sup>-1</sup>, mens båndet ligger ved 1355 cm<sup>-1</sup> for femkoordineret hæm. Graden af fotolyse vokser med pH.

PROTEINKEMI FOODTEC



Figur 9. Model for kooperativ CO-binding til CooA. En firkant repræsenterer en åben polypeptidkæde, der enten kan binde eller fraspalte CO, mens en oval figur indikerer, at enheden er i en lukket form (CO-binding eller -fraspaltning ikke mulig). CO-binding sker til femkoordineret jern, hvilket betinger prolinfraspaltning som første trin (hastighedsbestemmende). Hastighedskonstanter for hvert enkelt trin er anført.

form antages at skulle omdannes til den åbne form, før CO kan frigives. En sådan antagelse er nødvendig for at forklare dynamikken for CO-fraspaltning.

De andre proteinformer involverer prolinbundet hæm, femkoordineret hæm eller CO-bunden hæm. Kun til femkoordineret hæm kan CO bindes. CO-binding til én hæm påvirker prolindissociation fra en anden hæm ifølge den målte positive kooperativitet.

Et overraskende resultat er, at prolin fraspaltes langsommere efter binding af det første CO:  $k_{-P}$  mindskes efter binding af CO fra 0.42 s<sup>-1</sup> til 0.06 s<sup>-1</sup> (en faktor 7). Da CO-binding er kooperativ, betyder det, at hastighedskonstanten for prolingenbinding,  $k_P$ , mindskes endnu mere, fra 2.3 × 10<sup>3</sup> s<sup>-1</sup> til 74 s<sup>-1</sup> (en faktor 31). Dvs. proteinets kooperativitet er et resultat af, at styrken af prolins binding til jern falder, når CO bindes ikke at hastigheden for prolinfraspaltning stiger.

#### Taksigelser

En stor tak rettes til mine tidligere kollegaer på Princeton: Prof. Thomas G. Spiro, Dr. Mrinalini Puranik, Dr. James L. Bourassa, Dr. Martin A. Case og vores samarbejdspartnere på University of Wisconsin at Madison: Prof. Gary P. Roberts og Dr. Hwan Youn og på Rice University: Prof. John S. Olson og Angela N. Hvitved.

#### E-mail adresse

Steen Brøndsted Nielsen: sbn@phys.au.dk

#### Referencer

- 1. L. Stryer, »Biochemistry,« 3rd ed., W.H. Freeman and Company, New York (1988).
- W.N. Lanzilotta, D.J. Schuller, M.V. Thorsteinsson, R.L. Kerby, G.P. Roberts og T.L. Poulus, *Nat. Struct. Biol.* 7, 876-880 (2000).
- 3. K. Yamamoto, H. Ishikawa, S. Takahashi, K. Ishimori, I. Morishima, H. Nakajima og S. Aono, *J. Biol. Chem.* **276**, 11473-11476 (2001).

TEKNOLOGISK

INSTITUT

 M. Puranik, S. Brøndsted Nielsen, H. Youn, A.N. Hvitved, J.L. Bourassa, M.A. Case, C. Tengroth, G. Balakrishnan, M.V. Thorsteinsson, J.T. Groves, G.L. McLendon, G.P. Roberts, J.S. Olson og T.G. Spiro, *J. Biol. Chem.* **279**, 21096-21108 (2004).

## PROTEINKARAKTERISERING

### kontraktforskning og kvalitetskontrol

#### Teknologisk Institut tilbyder:

- Identifikation, karakterisering og kvantificering af proteiner
- Separation af komplekse proteinblandinger
- Analyse af proteinmodifikationer
- Studier af proteininteraktioner
- Kvalitetskontrol af proteiner og peptider

Vores laboratorier har udstyr til bl.a. 1D- og 2Dgelelektroforese, nano-LC-MS/MS, FPLC, immunoprecipitering og immunoblotting.

#### Samarbejdsformer:

Vi indgår i forskellige typer af samarbejde - fra analyse af enkelte prøver til længerevarende forskningsprojekter. Vi arbejder uvildigt og konfidentielt.

### For mere information, kontakt: protein@teknologisk.dk

Teknologisk Institut Holbergsvej 10 • 6000 Kolding www.teknologisk.dk/proteomics Tlf. 7220 1900 • Fax. 7220 1919

