

Zárójelentés

Fémek szerepe a fehérjeszerkezetben és -működésben
TS044730 OTKA Iskola pályázat

Célok

Pályázatunkban különböző fémeket – elsősorban magnéziumot, kalciumot és vasat – kötő fehérjék és peptidek szerkezetét és működését kívántuk tanulmányozni. Célunk egyrészt a térszerkezet meghatározása volt fehérjekrisztallográfiai és mágneses magrezonancia-spektroszkópiai módszerekkel, másrészt – megfelelő modellekből kiindulva – molekulapálya és molekuladinamikai számítások valamint spektroszkópiai mérések kivitelezése a ligandumok kötődésének, illetve az enzimműködés részleteinek tisztázása céljából. Vizsgálatainkat hem fehérjékre, a kalmodulinra (CaM) és a dUTP-ázra összpontosítottuk. A közelmúltban a mikrotubuláris rendszerrel és a CaM-nal összefüggő fehérje-fehérje kölcsönhatások molekuláris szintű vizsgálata során egy új agy-specifikus fehérjét izoláltunk, melyet az *in vitro* funkciója és molekulatömege alapján TPPP/p25-nek (*Tubulin Polymerization Promoting Protein*) neveztünk el. A fehérje nem rendelkezik meghatározott szerkezettel, működésének megértése különleges kihívást jelent, ezért a pályázatunkban eredetileg kitűzött célokat a TPPP/p25 vizsgálatával is kiegészítettük. Eredményeinket az alábbiakban foglaljuk össze, A témában megjelent közleményeinkre a jelentéshez csatolt jegyzékben feltüntetett számmal hivatkozunk.

Kvantummechanikai módszerek és számítások

Az enzimreakciók modellezésének megkönnyítése érdekében javaslatot tettünk a korábban kidolgozott, és a széles körben elterjedt, kombinált kvantummechanikai-molekulamechanikai (QM/MM) módszerek egyik előfutárának tekinthető Fragmens SCF molekulapálya módszerünk ab inió szintű továbbfejlesztésére [16]. Máig megoldatlan feladat az MM régióban lévő atomok töltésének megbízható becslése, e nélkül nem várható az enzim elektrosztatikájának pontos leírása. Javasoltunk egy új töltéskiosztási módszert, mellyel a valóságos kémiai viszonyokhoz jobban illeszkedő atomi töltéseket lehet meghatározni viszonylag egyszerűen [26]. Miután az enzimreakciók potenciálfelülete rendkívül bonyolult, a kismolekulás rendszerekhez képest komoly problémát jelent az optimális reakcióút meghatározása. Javasoltuk egy már ismert módszer továbbfejlesztését, mellyel a számítások lényegesen leegyszerűsödnek és bonyolult reakció utak is meghatározhatók [27]. Kvantummechanikai számításokkal határoztuk meg a kimotripszin által katalizált hidrolízis részletes reakcióútját [28], számításokat végeztünk a hisztidin protonmegkötő képességének konformáció-függésére [9] és NMR kémiai eltolódására vonatkozóan [18]. Kvantummechanikai módszerrel vizsgáltuk az *N*-formil-*L*-metionin-amid konformációit [19] és a β -peptidek parallel elrendeződése révén kialakuló nanocsöveket [25].

Modell peptidek vizsgálata

A kationokat tartalmazó vendég-gazda kölcsönhatások jobb megértése érdekében vizsgáltuk királis koronaéterek különböző fémionokkal képezett komplexének szerkezeti tulajdonságait [23]. A spektroszkópiai mérésekhez modellvegyületeket állítunk elő.

Fémionok katalitikus és szerkezeti szerepe a dUTPáz működésében

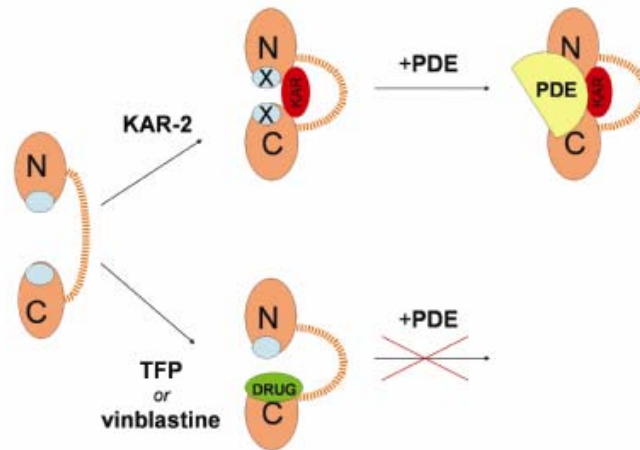
Kimutattuk, hogy a dUTPáz katalitikusan aktív, zárt formájának létrejöttéhez szükséges alapvető konformáció-változás eukarióta és prokarióta enzimekben eltérő időzítéssel megy végbe [11]. Munkahipotézisünk szerint az eltérő mechanizmus okát az alegységek eltérő kölcsönhatásai okozhatják: a homotrimer enzim központi csatornája prokarióta enzimeknél hidrofób, míg eukarióta enzimeknél poláris, és valószínű, hogy Mg^{2+} -iont tartalmaz. Azonosítottuk azt az aminosav oldalláncot (Glu-131), amely részt vesz a fémion koordinálásában. Vizsgáltuk a dUTPáz szabályozását a *Drosophila melanogaster*-ben [7].

A működés szempontjából optimális fehérjeszerkezet stabilizálása mellett a Mg^{2+} -ion az enzimreakcióban katalitikus kofaktorként is szolgál. Elektron paramágneses rezonancia- és kettős elektron-mag rezonancia-spektroszkópiai vizsgálatokkal sikerült részletesen feltérképezni a katalitikus Mg^{2+} -iont az aktív centrumban helyettesítő VO^{2+} -ion koordinációs szféráját [3]. Ezeket az adatokat molekuláris grafikai modellezéssel kombinálva, munkahipotézisként megadtunk egy lehetséges fémion kötőhelyet az aktív centrumban és feltételeztük, hogy a katalitikus kofaktorként szereplő Mg^{2+} -ion is koordinálja azt a vízmolekulát, amely meghatározó szerepet játszik a katalitikus mechanizmusban. Ezt a hipotézisünket fehérjekrisztallográfiai vizsgálatokkal sikerült igazolni [1,8].

Az enzimreakció mechanizmusát egyedi és újszerű módon a reakciókoordináta mentén rögzített szerkezeti pillanatfelvételekkel vizsgáltuk [6]. A pillanatfelvételek elkészítésére az adott lehetőséget, hogy az alkalmazott szubsztrát (α,β -imino-dUTP, PNP) bomlása lassan játszódik le, mivel ebben a hasadó C–O kötést a lassabban reagáló C–N kötés helyettesíti. A szinkrotron-sugárzás segítségével igen rövid időközökben detektálható diffrakciós mintázatok egyike elvileg megfelelhet a rövid életű enzim-intermedier komplex szerkezetének. Szisztematikus mérésekkel meghatároztuk az apoenzim térszerkezetét, az enzim-szubsztrát és a hipotetikus enzim-intermedier, valamint az enzim-termék komplexek térszerkezetét és azonosítottuk a nukleofil támadásért felelős vízmolekulát. A kapott szerkezetek alapján valószínűsítettük az enzimreakció mechanizmusát (l. 1. ábra) [8,11,12,15,].

A szakirodalomban élénk vita folyik a foszfátészter-hidrolízis részleteiről. Egyesek szerint az ún. disszociatív mechanizmus dominál, vagyis az észterkötés először elhasad, majd ezt követi a hidrolízisért felelős vízmolekula támadása. Mások szerint azonban ötös koordinációjú, trigonális bipiramisos szerkezetű, rövid életű intermedier alakul ki, melynek bomlása vezet a hidrolízis termékeihez. A foszfofoglukomutáz nevű enzim esetében röntgen-diffrakciós vizsgálatok ez utóbbi mechanizmust támasztják alá (Lahiri et al., Science 299:2067,2003). A mi krisztallográfiai vizsgálataink is ezt a mechanizmust valószínűsítik, de nem zárható ki, hogy az átmeneti állapothoz igen hasonló intermedier (1.D. ábra) szerkezetének megfelelő röntgen-diffrakciós mintázat a kiindulási és a végtermék piramisos szerkezetének átlagolódásával jön létre. Erre mutatott rá a [6] közleményünk a *Cell* c. folyóiratba küldött, eredeti kéziratának egyik lektora, amikor nem javasolta a közlést. Előzetes vizsgálatokat végeztünk a retrovirális dUTPáz szerkezetének meghatározására [24].

Kimutattuk, hogy a KAR-2 csak részlegesen képes gátolni a CaM hatását és a Ca^{2+} -függő fehérje-fehérje kölcsönhatásokat, ugyanakkor részlegesen megszünteti a TFP gátló hatását. A KAR-2 tehát nem szünteti meg a CaM-által modulált fehérje-fehérje kölcsönhatásokat, nem gátolja a CaM által szabályozott enzimatikus folyamatokat. Fehérjekrisztallográfiai és NMR-spektroszkópiai mérésekkel meg tudtuk magyarázni, hogy mi az oka a KAR-2 különleges fiziológiai hatásának (1. 2. ábra). A fehérje-ligandum komplex



2. ábra. A KAR-2 javasolt hatásmechanizmusa kötődési és funkcionális vizsgálatok alapján. PDE: foszfodiészteráz.

szerkezetének elemzése révén kimutattuk, hogy ez a drog egy új, eddig nem azonosított kötőhellyel hat kölcsön és szerkezetváltozást indukál a CaM molekulában. Ennek révén a célfehérjék (pl. foszfodiészteráz) illetve más antagonisták kötődése nem gátolt, így a CaM képes kifejteni moduláló hatását a CaM-enzim-KAR-2 terner komplexen belül, a drog tehát nem fejt ki anti-CaM aktivitást [17,32]. Az a tény, hogy a KAR-2 nem a CaM C-terminális hidrofób zsebébe kötődik arra utal, hogy a biszindol származékok nem kívánt toxikus mellékhatása azok CaM-antagonista tulajdonságával függhet össze, azaz a drog kapcsolódása egy új kötőhelyhez a kalmodulin felszínén összefügg a KAR-2 egyedülálló farmakológiai viselkedésével. Folyamatban van a KAR-2 egy származékának szintézise, mely reményeink szerint kiindulási alapul szolgálhat egy szabadalmaztatható, hatékony, egyúttal csekély toxikus mellékhatással bíró molekula kifejlesztéséhez.

Allosztérikus effektusok a hemoglobinban

Elvégeztük a hemoglobin hem-csoportjainak normál koordináták szerinti analizését abból a célból, hogy meghatározzuk, mennyire torzulnak. A meghatározott deformációk azt mutatják, hogy a hem csoport szerkezete érzékeny a molekula távoli részében kötődő effektor jelenlétére, ami az allosztérikus reguláció hatásmechanizmusának a terciér szerkezettel való kapcsolatát támasztja alá [2].

A humán hemoglobin (Hb) R (oxi) állapotban effektort kötő komplex szerkezetét röntgen-diffrakciós módszerekkel nem sikerült eddig meghatározni, ami azért lenne fontos, mert az effektorok kötődési módja és szerepük az R állapotban hosszú ideje vitatott. Együttműködő partnereink (NIH-FIRCA, Takashi Yonetani) korábban kísérletileg igazolták, hogy a vizsgált effektorok kötődnek a Hb R állapotában és befolyásolják az oxigén-affinitást.

Molekuladinamikai számításokkal meghatároztuk az effektor kötő komplex szerkezetét. A módszer megbízhatóságát egy T állapotú komplexre végzett számítás és a röntgenkrisztallográfiával kapott adatok összehasonlításával teszteltük, igen jó egyezést kaptunk [20].

Molekuladinamikai szimulációval meghatároztuk a Hb pH 7 és 300K hőmérséklethez tartozó szerkezetét oxigén-mentes (T) ionmentes és oxigént kötő (R) ionmentes állapotban, valamint ugyanezen formák szerkezetét Cl-ionok és a difoszfoglicerát (DPG) természetes effektor jelenlétében. Megállapítottuk, hogy a T állapotban az effektorok kötése a határfelületi kötések lazulását eredményezi, míg az R állapotban a határfelületek asszociáció-erőssége az effektorok kötésével erősödik. A szimulációs eredmények összhangban vannak a laboratóriumban végzett dimér-asszociációs kísérletek eredményeivel [30].

Ismeretes, hogy a hidrosztatikai nyomás növekedése a fehérje-társulások széteséséhez vezet. Ezt az effektust használtuk fel az R és T állapotú Hb effektor-mentes és effektor kötő állapotainak összehasonlítására. Kísérleteinkben a hidrosztatikai nyomás növelése mellett mértük a molekula triptofán savmaradékainak fluoreszcencia-paramétereit és kimutattuk, hogy a tapasztalt változás a tetramer szerkezet diméreké váló széteséséhez rendelhető. Az egyszerű mérésből származó paraméterek érdekes jellemzői a szerkezetnek, és jó egyezést mutatnak az irodalomban található adatokkal. Az általunk nyert új adatok egyértelműen bizonyítják, hogy az oxigén asszociációt módosító alloszterikus effektorok kötődése az alegységek terciér szerkezetén keresztül fejt ki hatását, ami a határfelületeken áttevődve módosítja az alegység hem-csoportjának környezetét [35].

TPPP/p25, egy új agy-specifikus fehérje [4,5,10,13,14,31,36]

A legtöbb intracelluláris fehérjének jól meghatározott másod- és harmadlagos térszerkezete van, azonban a humán genom *in silico* analízise szerint nem elhanyagolható hányaduk nem rendelkezik ilyen szerkezettel. Ezeket a fehérjéket eredendően szerkezet nélküli („*intrinsically unstructured*”) fehérjéknek nevezzük. Bebizonyosodott, hogy gyakori neurodegeneratív betegségek, pl. a Parkinson-kór (PD) vagy az Alzheimer-kór (AD) kialakulásában ilyen szerkezet nélküli fehérjék meghatározó szerepet játszanak. Nyilvánvaló, hogy további szerkezet nélküli fehérjék, és a velük kölcsönható partnerek azonosítása, a kölcsönhatások molekuláris és sejtszintű jellemzése alapvető jelentőségű mind az alap kutatás, mind a hatóanyag-tervezés szempontjából.

A közelmúltban a mikrotubuláris rendszerrel és a CaM-nal összefüggő fehérje-fehérje kölcsönhatások molekuláris szintű vizsgálata során egy új agy-specifikus fehérjét izoláltunk, melyet az *in vitro* funkciója és molekulatömege alapján TPPP/p25-nek (*Tubulin Polymerization Promoting Protein*) neveztünk el [5]. Elsődleges szerkezete nagyfokú homológiát mutat p25-szerű hipotetikus fehérjékkel, a p20-szal és a p18-cal. A TPPP/p25 szekvenciája ugyanakkor nem mutat homológiát egyetlen eddig ismert fehérjeszekvenciával sem, így a p25, p20 és p18 fehérjék egy új fehérjecsaládot képviselnek. Sejt- és szövetszintű vizsgálataink azt mutatták, hogy a TPPP/p25 és a p20 fehérje asszociáció révén stabilizálja a mikrotubuláris hálózatot, ami a fehérje élettani hatásával függhet össze.

A szerkezeteket elektronmikroszkópiával jellemeztük, *in vitro* és *in vivo*. Kimutattuk, hogy a három homológ fehérje eltérő mikrotubuláris ultrastruktúrák kialakulását eredményezi. Ezek a funkcionális sejt- és szövetszintű vizsgálatok azt valószínűsítették, hogy a három fehérje a nagyfokú homológia ellenére jelentős szerkezeti különbségeket mutat. Egy új predikciós módszert alkalmazva azt találtuk, hogy a TPPP/p25 N-terminális szakaszában egy hosszú és rendezetlen szakasz található, míg a C-terminális részben viszonylag rövidebb, szerkezettel rendelkező és szerkezet nélküli szakaszok váltakoznak. A molekula átlagos

rendezetlensége 46-47%, tehát valóban szerkezet nélkülinek tekinthető. Megállapításainkat különböző spektroszkópiai módszerekkel is alátámasztottuk.

Megállapítottuk, hogy a p18 fehérje jól meghatározott szerkezettel rendelkezik, míg a p20 fehérje a p25-höz hasonlóan, inkább szerkezet nélküli fehérjének tekinthető. A három homológ TPPP fehérje szerkezeti különbözősége megnyilvánul a tubulinnal való kölcsönhatásuk affinitási állandóiban, illetve az általuk indukált tubulin-polimerizáció hatékonyságában. Adataink arra utalnak, hogy a TPPP/p25 fehérje N-terminális „farka” nem lehet kizárólagosan felelős a fehérje jellegzetes sajátságaiért.

A TPPP/p25 élettani és patológias funkcióit megszabhatják más fehérjékkel való kölcsönhatásai. A tubulin illetve a mikrotubulus valószínűleg a TPPP/p25 legfontosabb célfehérjéje, emellett néhány további fehérjét is sikerült azonosítanunk. ELISA teszttel. Kimutattuk, hogy a centroszómákban akkumulálódott CaM és a transzsfektált humán sejtekben ugyancsak itt felgyülemelő TPPP/p25 közötti kölcsönhatás szerepet játszhat a sejtciklust szabályozó centroszómális folyamatokban.

Egyéb vizsgálatok

Előállítottuk az élesztő foszfoglicerát kináz (PGK) Trp mutáns formáit, valamint az egy-egy Trp-al megjelölt szeparált doméneket. A Trp oldalláncok fluoreszcenciájára alapozott folding kinetika egyértelműen mutatta, hogy a domének feltekeredése érzékeny a másik domén jelenlétére. Az effektus aszimmetrikus, az *N*-domén önmagában gyorsabb feltekeredést mutatott, mint a teljes fehérjében, míg a *C*-domén esetén a kölcsönhatás ellentétes hatást váltott ki [22]. A fent leírt PGK formák esetében, pH 2-ön denaturált formából kiindulva kitekeredési folyamatot indítottunk el, amelynek vizsgáltuk a kinetikáját 1 ms-tól 4 napig terjedő időtartamban. A misfolding során amyloid fibrillumok alakultak ki, amelyeket elektron-mikroszkópiával észleltünk. Az eredmények azt mutatják, hogy a domének közötti kapcsolat már hamar megmutatkozik, és mind a misfolding-ot, mind az amyloid fibrillumok kialakulását befolyásolja [34]. Elkészítettük az élesztő PGK His-tag változatát, és a vad típussal együtt refolding kinetikai méréseket végeztünk az 1 ms – 1000 s tartományban. Kimutattuk, hogy az eredmények megfelelnek a folding jelenség hierarchikus energia-landscape modellel való leírásának, amelynek megadtuk a konkrét jellemző paramétereit. Ez az első eset az irodalomban, hogy konkrét mérésekhez illeszkedő hierarchikus energia-landscape modellt sikerült alkotni [33].

Foglalkoztunk még a triózfoszfát izomeráz egy érdekes mutánsával [21] és enoláz izoformák mikrotubulusokkal való kölcsönhatásával a miogenezis során [29].



PUBLISHED BY
THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY

Department of Chemistry and Biochemistry
UCLA
607 Charles E. Young Drive East
Los Angeles, California 90095-1569
Phone: (310) 825-1790
Fax: (310) 206-9880
E-mail: acr_ed@chem.ucla.edu or acr@chem.ucla.edu

Joan S. Valentine, *Editor-in-Chief*

Professor Beata G. Vertesse
Institute of Enzymology
Hungarian Academy of Sciences
PO Box 7, H-1518
Budapest, Hungary

June 9, 2006

Dear Professor Vertesse:

It gives me great pleasure to invite you to submit an article focusing on your work for publication in *Accounts of Chemical Research*. As you know, we seek to publish short, highly readable reviews written by leading scientists on cutting edge research. I believe that an article written by you on your research would be of great interest to many of the readers of *Accounts*.

I attach a copy of our instructions on Preparation of Manuscripts. I ask you to strive to make your article accessible to some degree to research-oriented readers who are not specialists in your field; title and introduction should clearly describe the topic of your article to a non-specialist. Clear concluding remarks at the end of each section and/or at the end of the article are also of value to such readers.

Upon submission to this office, all manuscripts are sent to two or three expert reviewers for evaluation. Your suggestions for suitable reviewers are very welcome. The journal will bear the cost of publication of color illustrations that contribute to the clarity of the article.

I do hope that you will accept this invitation. If you are willing to do so, please send your proposed date of submission so that we may know when to anticipate your manuscript.

Sincerely,

Joan S. Valentine, Ph.D.
Editor-in-Chief

P.S. Please note that we also welcome submission of attractive colored graphic illustration for consideration for the cover of *Accounts of Chemical Research*. If you have any such illustrations that you wish us to consider, please include them (with a brief caption) when you submit your manuscript.