

Specifikus DNS szekvenciák felismerésének molekuláris szintű értelmezése

A specifikus DNS felismerés molekuláris tényezői közül megvizsgáltam a i) kétértékű fémionok; ii) a fehérje szegmensek (esetleg egyedi oldalláncok) flexibilitásának; valamint a iii) fehérje alegységek közötti kommunikációnak szerepét a s a specifikus kötődés folyamatában, valamint értelmeztem a kétértékű ionok katalízishez történő hozzájárulását.

Ismeretes, hogy a működésükhöz kétértékű fémionokat igénylő restriktív endonukleázok szekvencia-specifitása Mg^{2+} és Mn^{2+} ionok jelenlétében lényegesen eltér egymástól: a Mn^{2+} ionok hatására a szelektivitás általában több nagyságrenddel csökken. Mivel a kétféle fémion elhelyezkedése és koordinációja a restriktív enzimek aktív helyén nagyon hasonló, a jelentős szelektivitás különbség finomabb elektronszerkezeti különbségekre vezethető vissza. Magas szintű ab initio számításokkal kimutattuk, hogy már a fémion-nukleinsav-bázis kölcsönhatások energetikája lényegesen eltér Mg^{2+} és Mn^{2+} ionok esetén, még akkor is, ha a két fémion azonos pozícióban kapcsolódik a heterociklushoz. A Mn^{2+} ionok DNS bázisokkal alkotott komplexei gyengébben kötődtek, nagyobb geometriai változékonyságot mutatnak, mint a Mg^{2+} ionok megfelelő komplexei, mely akár új hidrogénkötések kialakításához is vezethet. A bázisokról a Mn^{2+} ionokra jóval nagyobb a töltésvándorlás, mint Mg^{2+} ionok esetén, ami a komplexek képződése szempontjából kedvezőtlen. Ehhez hasonlóan a polarizáció mértéke is nagyobb ezekben a komplexekben. Ezek a különbségek a solvatáció figyelembe vételével nőnek. Ebben az értelemben a fehérje oldalláncok tovább növelik a hidratált fémionok és DNS bázisok kölcsönhatásai közötti különbségeket. Mivel ezek finom elektronszerkezeti okokra vezethetők vissza, a két fémion közötti szelektivitásbeli különbséget sikerült már a hidratált fémion-DNS bázis szinten visszaadni (Solt, 2007).

Annak ellenére, hogy a kétértékű fémionok elengedhetetlen feltételei a restriktív endonukleázok katalitikus aktivitásának, számuk a reakcióban nem egyértelmű. Biokémiai és szerkezeti adatok alapján egy, két valamint három fémiont tartalmazó katalitikus modell is létezik. Molekuladinamikai (Mones, 2007a) és hibrid kvantummechanikai/molekulamechanikai számításokat (Mones, 2007b) végeztünk annak eldöntésére, hogy a BamHI enzim kristályszerkezetében megfigyelt két fémion milyen mértékben járul hozzá az enzim aktivitásához. Megállapítottuk, hogy a két fémion sem szerkezeti, sem pedig energetikai szempontból nem egyenértékű. Az A fémion erősebben kötődik és kevésbé flexibilis, mint a B fémion és a katalízis során kitüntetett szerepet játszik. Ez a fémion stabilizálja a foszfodiészter-hidrolízishez szükséges nukleofilt, és koordinálja azt a reakció átmeneti állapotáig. Ezzel szemben a B fémion az átmeneti állapot stabilizációjához járul hozzá és hiánya csak kisebb mértékben csökkenti a katalitikus hatást. Ez a megfigyelés összefüggést teremt a két és az egy fémion tartalmazó restriktív enzimek között, hiszen a katalizált reakcióban csak egy fémion

(mely mindegyikben jelen van) játszik kitüntetett szerepet. Ezek a számolások tehát a restriktív endonukleázok divergens evolúciójának modelljét támogatják.

A dUTPáz fehérje működésében, a dUTP szubsztáttal kialakított kölcsönhatásokban lényeges szerepe van a C-terminális résznek; mely flexibilitása miatt azonban szerkezetileg nehezen jellemezhető röntgenkristallográfiás módszerekkel. Ez indokolja, hogy a C-terminális szegmens működésének értelmezéséhez homológia-modellezést, valamint molekuladinamikai szimulációkat végeztem (Németh-Pongrácz, 2007). Az MPMV (Mason-Pfizer monkey virus) dUTPáz trimer szerkezetéből kiindulva előállítottam a 218-228 aminosavak alkotta „kar” modelljét és megvizsgáltam a szubsztrát kötésben lényeges szerepet játszó kölcsönhatásokat. Kiderült, hogy ebben a dUTPáz szerkezetben a kar a saját monomerre hajlik vissza és nem a szokásos módon a szomszéd monomerre lapol át. Megállapítottam, hogy annak ellenére, hogy a kar nagyfokú flexibilitással rendelkezik a dUTPáz γ foszfátja és az Arg222 guanidinio csoportja között stabil hidrogénkötés alakul ki. A másik szubsztrátot rögzítő kölcsönhatás, a Phe222 oldalláccal kialakított van der Waals kontaktus viszont jóval variábilisabbnak mutatkozott. Ezek a megfigyelések összhangban vannak mutációs kísérletek eredményeivel. Kimutattam továbbá, hogy a szubsztráthoz kapcsolódó (ún. zárt) C-terminális kar számos kontaktust létesít a szomszédos monomer egység flexibilis N-terminális végével mely a flexibilis C és N terminális szakaszok együttes feltekeredésére (ún. „co-folding”-jára) utal. A kiemelkedő flexibilitású C-terminális szakasz szerepe tehát a szubsztráttal kialakított közvetlen kölcsönhatásokon kívül a szubsztrát megkötéséhez szükséges szerkezeti elemek kialakítása és valószínűleg a termék távozásának elősegítése.

Az EcoRI és az RsrI restriktív endonukleázokból egy 60 aminosav hosszú szakasz cseréjével sikerült egy hibrid, működőképes endonukleáz előállítani, melynek viselkedését molekuladinamikai szimulációk segítségével próbáltam meg értelmezni (Chuluunbaatar, 2007). Kimutattam, hogy az enzim több specifikus kölcsönhatást képes kialakítani a szubsztrát DNS-el, mint az EcoRI, így valószínűleg erősebben köti azt. A dimer enzimben a két monomer együttes viselkedését összehangoló szerkezeti elem az ún. 'cross-talk ring' az EERE-ben megszűnik, így az EERE két felében a DNS hasítás valószínűleg nem egyidejűleg történik meg.

A rendezetlen fehérje-szegmensek részvételével történő specifikus felismerés jelenségét elsősorban bioinformatikai módszerekkel vizsgáltam. Sikerült kimutatni, hogy a rendezetlen fehérjék nem teljesen szabálytalan szerkezetűek, hanem rendelkeznek részlegesen rendezett, tranziens másodlagos szerkezetekkel („pre-formed element”), melyek a felismerésben és kötődésben kitüntetett szerepet játszanak (Fuxreiter, 2004). Számos kísérleti eredmény igazolta ennek az elméleti modellnek a jogosságát. Egy ilyen tranziens szerkezeti elem működését és kötődésre gyakorolt hatását molekuladinamikai és szabadenergia-perturbációs módszerekkel részletesen elemeztük a CREB fehérje KID doménjének a CBP fehérje KIX doménjéhez történő kapcsolódásakor (Solt, 2005).

Fehérjék specifikus kötődéséért számos esetben nagyon rövid, gyengén konzervált szakaszok felelősek. Megvizsgáltuk, hogy milyen általános szerkezeti feltételeknek kell ilyen felismeréskor teljesülniük. Kimutattuk, hogy az ilyen lineáris motívumok működése gyakran hosszabb rendezetlen szakaszokhoz kapcsolható, melyek képlékenysége elősegíti

a kötődést (Fuxreiter, 2007). Irodalmi kereséssel számos olyan komplex szerkezetet sikerült találni, mely a kötődés után is tartalmaz rendezetlen régiókat, melyek kritikus szerepet játszanak a felismerés szempontjából (Tomba, 2008).

Referenciák

- [1] M. Fuxreiter, I. Simon, P. Friedrich and P. Tomba (2004) Preformed structural elements feature in partner recognition by intrinsically unstructured proteins. *J. Mol. Biol.* 338, 1015-1026.
- [2] A. Pingoud, M. Fuxreiter, V. Pingoud, W. Wende (2005) Type II restriction endonucleases: structure and mechanism. *Cellular and Molecular Life Sciences* 62, 685-707.
- [3] M. Fuxreiter, Cs. Magyar, T. Juhász, Z. Szeltner, L. Polgár, I. Simon (2005) The Dynamic Properties of the Structure of Prolyl Oligopeptidase. Implication for Catalysis. *Proteins* 60, 504-512.
- [4] M. Fuxreiter, M. Mezei, I. Simon, R. Osman (2005) Interfacial water as a “Hydration Fingerprint” in the noncognate complex of BamHI. *Biophys. J.* 89, 903-911.
- [5] I. Solt, Cs. Magyar, I. Simon, P. Tomba, M. Fuxreiter (2006) Phosphorylation-induced transient intrinsic structure in the kinase-inducible domain of CREB facilitates its recognition by the KIX domain of CBP. *Proteins* 64, 749-757.
- [6] L. Mones, I. Simon, M. Fuxreiter (2007) Metal sites at the active site of BamHI can conform to a one-ion mechanism. *Biol. Chem.* 388 (1) 73-79
- [7] V. Németh-Pongrácz, O. Barabás, M. Fuxreiter, I. Simon, I. Pichová, M. Rumlová, D. Svergun, M. Petoukhov, V. Harmat, É. Klement, É. Hunyadi-Gulyás, K. F. Medzihradszky, E. Kónya and B. G. Vértessy (2007) Flexible Segments Modulate Co-folding of DUTPase and Nucleocapsid Proteins. *Nucleic Acids Res.* 35, 495-505.
- [8] .Chuluunbaatar, T. Ivanenko-Johnston, M. Fuxreiter, R. Meleshko, T. Rasko, I. Simon, J. Heitman and A. Kiss (2007) An EcoRI-RsrI chimeric restriction endonuclease retains parental sequence specificity. *BBA Proteins & Proteomics* 1174, 583-594
- [9] M. Fuxreiter, P. Tomba, I. Simon (2007) Local structural disorder imparts plasticity on linear motifs. *Bioinformatics* 23, 950-956.
- [10] I. Solt, I. Simon, A.G. Császár, M. Fuxreiter (2007) Electrostatic vs. non-electrostatic effects in DNA sequence discrimination by divalent metal ions Mg^{2+} and Mn^{2+} . *J. Phys Chem B* 111, 6272-6279.
- [11] L. Mones, P. Kulhanek, J. Florian, I. Simon and M. Fuxreiter (2007) Probing the two-metal ion mechanism in the restriction endonuclease BamHI *Biochemistry* 46, 14514-14523
- [12] P. Tomba and M. Fuxreiter (2008) Fuzzy complexes: polymorphism and structural disorder in protein–protein interactions. *Trends in Biochem. Sci* 33, 2-8