

Zárójelentés az NI 61915 OTKA keretében végzett kutatásokról

A kutatócsoport tevékenységének fókuszában az OTKA pályázat által lefedett periódusban az enzim működés szabályozásának alaposabb megértése állt. A fehérjéket az teszi különleges természeti objektumokká, hogy jól definiált, de flexibilis térszerkezettel és egyedi felszíni mintázattal rendelkeznek valamint modulárisan szervezettek. Ezekből a tulajdonságokból levezethető az enzimek sokrétű funkciója, hatékonysága és nagyfokú specificitása.

Az elmúlt három év koherens kutató munkája során születtek speciális tudományos eredmények és levontunk ezekből általános következtetéseket is. Munkánk mérlege a nemzetközi folyóiratokban megjelent 30 közlemény összesen 130 IF-al. Ezen kívül nagyszámú plenáris és meghívott előadást tartottunk nemzetközi konferenciákon (a konferencia absztraktokat, nagy számuk miatt a beszámolóban tételesen nem szerepeltetjük). A munkában 5 posztdoktor és 11 doktorandusz vett részt (4 hallgató megszerezte a PhD fokozatot, további 5 túljutott a szigorlaton és benyújtotta dolgozatát).

Az általunk legfontosabbnak tartott tudományos eredmények röviden a következők:

Molekuláris immunológiai kutatásaink keretében meghatároztuk 4 komplement proteáz és a C1-inhibitor szerkezetét - különösen az utóbbi hozott számunkra nagy nemzetközi elismerést. A szerkezetek és funkcionális eredményeink alapján általánosan elfogadott aktiválási modellt dolgoztunk ki a komplement rendszer lektin útjának szabályozási mechanizmusára.

Jelentősnek tartjuk a C1-inhibitor heparin által történő potenciozásának mechanizmusára javasolt, szerkezeti alapú modell kidolgozását, a flagellin fehérje egyik rendezetlen szakaszának export szignálként történő azonosítását (szabadalom is született belőle), a foszfoglicerátkináz enzim domén záródásban résztvevő allosztérikus jeltovábbító hálózat azonosítását, az enzimaktivitás rendhagyó hőmérsékletfüggésének a konformációs flexibilitás alapján történő értelmezését a izopropilmalát dehidrogenáz esetében, átmeneti zóna felfedezését a rendezett és rendezetlen szerkezetet kódoló aminosav szekvencák között.

Munkánkat a multidiszciplinaritás és a módszertani sokoldalúság jellemezte. Vegyészek, fizikusok, biológusok és bioinformatikusok együttműködése tette lehetővé, hogy a munkánkhoz szükséges bonyolult biológiai objektumok előállítását, funkcionális és szerkezeti jellemzését valamint a számítógépes modellezést legtöbb esetben magunk végeztük el. Ennek fő előnye a gyorsaság mellett a komplex szemlélet kialakulása a kutatócsoportban.

A komplement fehérjék és funkcionális komplexeik, a flagelláris rendszerek, multidomén enzimek együttes vizsgálata lehetővé tette a fehérjék önszerveződésével, a

molekuláris szintű felismeréssel és az allosztérikus jeltovábbítás mechanizmusával kapcsolatos általános következtetések levonását. Ezzel kapcsolatos eredményeinket három összefoglalóban és két könyvfejezetben publikáltuk és nyolc nemzetközi konferencián tartott plenáris illetve meghívott előadásban tettük közzé.

A moduláris szerveződés szerepe a fehérjék feltekeredésében és működésében

Egy tipikus allosztérikus mechanizmussal működő enzim, a 3-foszfoglicerátkináz (PGK) szerkezeti doménjei közötti együttműködés és a doménmozgások mechanizmusának részletes molekuláris leírását adtuk meg. A humán PGK helyspecifikus mutánsain végzett enzimkinetikai, ligandkötődési és szerkezeti (DSC, SAXS) kísérleteink valamint a kristályszerkezetek molekuláris grafikai analízise alapján azonosítottuk azokat a konzervatív oldalláncokat, melyek kontaktusai egyrészt továbbítják a két doménen külön-külön kötődő szubsztrátok hatását az interdomén-régióban elhelyezkedő, feltételezett fő csukló régióhoz, másrészt pedig ebben a csukló-régióban elhelyezkedve, fontos szerepük van a domének közötti kommunikációban. Tehát azonosítottuk az oldallánc-kölcsönhatásokra épülő allosztérikus „útvonalakat”, melyek közvetítik az egyes szubsztrátok hatását a kötőhelyüktől az L-jelű béta-redőben elhelyezkedő fő csukló felé. Ilyen oldalláncok egyrészt a katalízis kémiai folyamatában is résztvevő R38, amely a 3-PG szubsztrátot is köti, másrészt a nukleotid-szubsztrát kötésében résztvevő K219, N336 és E343. Az L-jelű béta-redőben lévő S392 és T393, valamint ezek környezetében lévő F165 és E192 oldalláncok Ala-ra való mutációja szintén a doménzáródás hiányához és jelentős enzimaktivitás-csökkenéshez vezetett. A T393del deléciós mutáns elkészítése különösen drasztikus aktivitásvesztéshez és a nyitott szerkezet nagyfokú stabilizálódásához vezetett, ami egyértelműen megmutatta, hogy a béta L redő hossza és alakja nagyon lényeges a zárt konformáció kialakulásához, igazolva annak, mint fő-csuklónak a szerepét a PGK működésében. Kísérleteink azt is bizonyították, hogy az F165 és E192 oldalláncok nemcsak a csukló-régió működéséért, hanem az egész fehérjemolekula konformációs stabilitásáért is felelősek. Összegezve, azonosítottuk a két szubsztrát együttes kötődésekor kialakuló H-híd-láncolatot, amely mintegy „kettős molekuláris kapcsoló”-ként szabályozza a fő csukló működését és irányítja a domének záródását a katalitikus ciklus során.

Az izopropilmalát-dehidrogenáz (IPMDH) különböző hőstabilitású formáival (termofil *Thermus thermophilus*, mezofil *E. coli* és hidegtűrő *Vibrio sp.* I5) végzett denaturációs-renaturációs vizsgálataink rávilágítottak a fehérjestabilitás kinetikai és energetikai alapjaira.

Fluoreszcencia- és CD-spektroszkópiás ill. enzimaktivitás-méréssel követve a térszerkezet-felbomlásának ill. kialakulásának időbeli folyamatát, megállapítottuk, hogy az IPMDH-k stabilitásbeli különbségei kizárólag denaturációjuk különböző sebességének tulajdonítható, míg a térszerkezet-kialakulás folyamata hasonló sebességgel zajlik. Tehát a térszerkezet kialakulási folyamat átmeneti állapotában csupán a polipeptidlánc fő topológiai jellemzői alakulnak ki, a különböző IPMDH-k eltérő szerkezeti stabilitását megszabó jellemzők (pl. a specifikus kölcsönhatások a nem-konzervatív oldalláncok között) a térszerkezet-kialakulási folyamat későbbi stádiumában jönnek csak létre. Molekuláris grafikai szerkezeti analízissel azonosítottuk azokat a molekuláris régiókat, melyek felelősek lehetnek a termostabilitásért. - Az IPMDH, mint dimer fehérje, melynek alegységei két-két doménre tagozódnak, alkalmas modell volt annak a kérdésnek vizsgálatára is, hogy az alegységek vagy domének térszerkezet-kialakulása mennyiben zajlik egymástól függetlenül. Megállapítottuk, hogy a polipeptidláncok már a térszerkezet-kialakulási folyamat korai szakaszában asszociálnak, majd ezen inaktív dimer intermedier szerkezete rendeződik át egy sokkal lassabb elsőrendű folyamatban aktív enzimmé. Az intermedier CD- és fluorimetriás spektruma jobban hasonlít a natív, mint a denaturált IPMDH spektrumához, azaz határozott szerkezetre utal. Tehát az IPMDH natív térszerkezete kialakulásának előfeltétele a polipeptidláncok molten globula-szerű asszociációja a renaturáció kezdeti fázisában. Irányított mutagenézissel előállítottunk olyan IPMDH mutánsokat, melyek csak egyetlen Trp oldalláncot tartalmaznak egyik vagy másik doménben, így azok fluoreszcens jelét felhasználva az egyes domének térszerkezetének kialakulását külön-külön vizsgálhattuk. Kiderült, hogy a domének térszerkezete szorosan összehangolt módon, az alegység molekuláris szimmetriájának fenntartásával zajlik.

Az eredményeket a *Proteins, Biochemistry*, a *FEBS Letters*, *JBC*, *Nucleic Acid Res*, ill. a *BBRC* folyóiratokban közzeltük.

Moduláris szerin proteázok aktiválódása és gátlása

Kutatási tervünk egyik fő célkitűzése volt a számos élettani folyamatban kulcsszerepet játszó moduláris szerin proteázok aktiválódási és szabályozási mechanizmusainak felderítése. A moduláris szerin proteázokból álló kaszkádrendszerek egyik legfontosabb képviselője a komplementrendszer, amely a természetes immunitás egyik fő komponense. A rendszer szabályozott működése nélkülözhetetlen a hatékony immunválasz kialakítása szempontjából, kontroll nélküli aktiválódása azonban betegségek kialakulásához vezethet. Kutatási

objektumaink a komplementrendszer klasszikus és lektin útjának iniciálásában résztvevő MASP-2, C1r és MASP-1 proteázok voltak.

A MASP-2 proteáz zimogén formában képződik és megfelelő körülmények között képes autoaktiválódásra és a komplement kaskád beindítására C2 és C4 komponensek hasítása által. Az autoaktiválódási mechanizmus tanulmányozása céljából meghatároztuk a zimogén és az aktív MASP-2 enzim térszerkezetét. A zimogén enzim inaktív térszerkezettel rendelkezik: erősen torzult a katalízishez nélkülözhetetlen oxianion lyuk és a szubsztrátkötő zseb. Ennek megfelelően a zimogén MASP-2 nem képes kismolekulatömegű szintetikus szubsztrátok hasítására. Meglepő módon azonban, a nagyméretű fehérjeszubsztrátot (C4) az aktivált enzimmel összemérhető hatékonysággal hasítja. Ebből az következik, hogy az egyláncú zimogén forma képes átalakulni proteolitikusan aktív formává anélkül, hogy az aktivációs peptid elhasadna. Ehhez azonban szükséges a fehérjeszubsztrát jelenléte, amely a zimogén-aktív konverziót indukálja. Nyilvánvaló, hogy a zimogén enzim proteolitikus aktivitása felelős az autoaktiváció jelenségéért. A lektin út iniciációs komplexében két MASP-2 molekula található, amelyek katalitikus doménjei könnyen érintkezhetnek az aktivációs folyamat során. A két zimogén molekula találkozásából egy enzim-szubsztrát komplex alakul ki, ahol az első lépésben az egyik zimogén hasítja a másik zimogént. Ezután a felaktivált MASP-2 hasítja a még zimogén formában lévő másik MASP-2 molekulát. Ezt az autoaktiválódási mechanizmust számítógépes modellezéssel és *in vitro* mutagenézissel bizonyítottuk. Kétféle zimogén mutánst készítettünk: az egyikben az elhasadó (R444-I445) kötést mutáltuk (R444Q) mutáns, míg a másikban az aktív szerint cseréltük alaninra (S633A) mutáns. Várakozásainknak megfelelően az R444Q mutáns hasította az S633A zimogén mutánst. Azt is igazoltuk, hogy a tripszin-szerű szerin proteázok aktivitásához nélkülözhetetlen sóhídra, amely az aktív enzim N-terminálisa és a konzervatív Asp194 között alakul ki, nincs szükség a szubsztrát indukálta aktivitás kialakulásához. A D632N mutáns MASP-2 képes volt autoaktivációra és a kétláncú forma hatékonyan hasította a C4 szubsztrátot. Valószínűleg hasonló mechanizmussal autoaktiválódnak a C1r és MASP-1 proteázok is.

A C1r proteáz a komplementrendszer klasszikus útjának aktiválásában játszik szerepet. A C1r képes autoaktiválódni a C1 komplexen belül. Munkánk során meghatároztuk az aktív C1r enzim katalitikus régiójának (CCP1-CCP2-SP fragmentum) térszerkezetét. Az aktív C1r, hasonlóan a zimogénhez, dimert alkot, amelyet a molekulák közötti CCP1-SP kölcsönhatások stabilizálnak. A szerkezet azonban az autoaktiválódási folyamat részleteiről is sokat elárul, mivel a kristályrácsban a szomszédos dimerekben lévő C1r molekulák enzim-

termék komplexet alkotnak. A komplexekben jelen van az S1-P1 sóhíd, valamint az intermolekuláris CCP2-SP kölcsönhatás. Ez összhangban van kinetikai méréseinkkel, ahol megmutattuk, hogy a CCP2 modult tartalmazó fragmentumok sokkal gyorsabban autoaktiválódnak, mint a magányos SP domének. A szerkezet alapján egy modellt állítottunk fel a zimogén C1r autoaktiválódására a C1 komplexen belül. Ez az aktiválódási modell jobban összhangban van a kísérleti eredményekkel, mint a korábban mások által publikált modellek.

Minden aktiválódási modell kulcseleme a komplexek (C1 komplex, MBL-MASP komplex) és ezeken belül a multidomén szerin proteázok flexibilitása. A szerin proteázoknak többféle, egymástól igencsak eltérő konformációt kell felvennie az autoaktiválódáshoz és az ezt követő szubsztrát hasításhoz. A flexibilitás forrása elsősorban a doméneket összekötő linker régiókban lehet. Ebből a szempontból fontos, hogy mind a C1r, mind pedig a MASP-2 proteázokban kimutattuk, hogy a CCP2 és az SP doméneket összekötő szakasz egyfajta „hinge” pontként működik. Ennek fontos szerepe lehet szubsztrát hasítás során az SP domén megfelelő orientálásában, azonban ez nem elegendő ahhoz a flexibilitáshoz, ami az aktiválódási folyamathoz szükséges. Tanulmányoztuk ezért a C1r CCP1-CCP2 és CUB2-CCP1 fragmentumait. NMR spektroszkópia segítségével vizsgáltuk az izolált doméneket és a fragmentumokat. A CCP1 és a CCP2 domén között erős kölcsönhatásokat találtunk. Ezek az eredmények és más kísérleti adatok is arra utalnak, hogy a CCP1-CCP2 modul pár inkább merev, mint flexibilis struktúrának tekinthető. Ezzel szemben a CUB2-CCP1 régió nagyfokú konformációváltozásra lehet képes. Kimutattuk, hogy a CUB2 domén Ca^{2+} iont köt, e nélkül szerkezete rendezetlen. ITC kalorimetria segítségével meghatároztuk a Ca^{2+} kötés egyensúlyi állandóját. Ennek alapján megállapítottuk, hogy a vérben a Ca^{2+} kötőhelyek csak részlegesen vannak telítve, vagyis a CUB2 domén Ca^{2+} kapcsolóként működve biztosítja a C1r molekula flexibilitását az autoaktiválódás és a C1s hasítás során. A CUB2-CCP1 régió flexibilitását hidrogén-deutérium kicserélődés mérésével is igazoltuk.

A C1-inhibitor egy olyan serpin típusú molekula, amely képes gátolni a C1r, C1s MASP-1, MASP-2 és a plazma kallikrein enzimek aktivitását. A C1-inhibitor az egyik legfontosabb természetes gyulladáscsökkentő molekula, hiányában súlyos betegség, az örökletes angioödéma alakul ki. Ennek a fontos molekulának a térszerkezetét már régóta próbálták megfejteni. Nekünk sikerült elsőként kristályosítanunk a C1-inhibitor serpin doménjét és megoldani a térszerkezetét. A térszerkezet egy eddig még le nem irt látens konformációt mutat. Valószínűleg a C1-inhibitor hiányos kórképek hátterében gyakran ennek a látens formának a kialakulása állhat. A térszerkezet alapján elemeztük a betegséget okozó mutációk szerkezeti hátterét, valamint hipotézist dolgoztunk ki a C1-inhibitor hatásának

heparin általi modulációjának magyarázatára. A „töltés szendvics” modell szerint, a proteáz és a C1-inhibitor közé beépülő negatívan töltött heparin leárnyékolja a két molekula pozitív töltését, ezáltal a kezdeti proteáz-inhibitor komplex könnyebben ki tud alakulni. Ennek a hipotézisnek az igazolása további kísérleteket igényel.

A MASP-1 enzim viszonylag nagy mennyiségben fordul elő a vérben, (koncentrációja tízszerese a MASP-2-nek), pontos fiziológiás szerepe azonban még nem tisztázott. Proteomikai módszerekkel azonosítottuk a MASP-1 néhány lehetséges szubsztrátját a vérben. A kísérleti adatok arra utalnak, hogy a MASP-1 jóval szélesebb szubsztrátspecifitással rendelkezik, mint a többi komplement proteáz, sok tekintetben a trombinhoz hasonló. Időközben sikerült meghatároznunk a MASP-1 katalitikus fragmentumának térszerkezetét. A szerkezet alátámasztja a kísérleti adatokat: a MASP-1 szubsztrátkötő régiója sokkal nyitottabb, mint C1r, C1s vagy a MASP-2 hasonló régiója. A szerkezet arra is magyarázatot ad, hogy a MASP-1 miért hasonlít a trombinra, és miért lehet antitrombinnal gátolni az aktivitását.

A fenti munkákból több nemzetközi publikáció született (Immunobiology, JBC, Plos ONE, Arterioscler Thromb Vasc Biol, Mol Immunol, BBA, Clin Exp Immunol, Acta Crystallogr, Trends Mol Med) és számos hazai és nemzetközi konferencián ismertettük eredményeinket.

Flagelláris export és szerveződés

Munkánk a *Salmonella typhimurium* fő mozgásszerve, a bakteriális flagellum (ostor) felépítésében szerepet játszó fehérjék sejtéből történő kijuttatásának (exportjának) mechanizmusát kívánta feltárni. Ennek során azonosítottuk a flagellumot alkotó flagellin fehérje szekrécijáért felelős molekulaszegmenst. A szignál a rendezetlen N-terminális régió 26-47 aminosavait öleli fel, és alkalmasnak bizonyult egy hozzá kapcsolt kis fehérje domén sejtéből való kijuttatására. A szegmens szekvenciája nagyfokú hasonlóságot mutat a különböző fajok flagellin fehérjéi között. Kimutattuk, hogy az azonosított szignál *E. coli* baktériumban is működik, ami a biotechnológiai alkalmazás szempontjából fontos. Tovább vizsgálva a szignál természetét azt találtuk, hogy változatos méretű (9-40 kDa) és funkciójú rekombináns fehérjék exportját teszi lehetővé, amelyek általában aktív formában jelentek meg a sejt kultúra folyadékban. A 2-65, 26-47 és 2-192 flagellin szegmensek összehasonlításával kimutattuk, hogy a 26-47 szegmens tartalmazza az összes szükséges információt, ami a fehérjék exportkompetens konformációjának kialakításához és a szűk (20-25 Å átmérőjű)

exportcsatornán keresztüli kijuttatásához szükséges. További terveink között szerepel a flagelláris exportrendszer 26-47 flagellin szegmensevel kölcsönható komponenseinek azonosítása, ami reményeink szerint hozzá fog járulni az export mechanizmusának jobb megértéséhez.

A flagellin hipervariábilis D3 doménje nem vesz részt a flagellin polimerizációjában és ezáltal a filamentáris struktúra kialakításában. A D3 domént az aminosavszekvencia 190-285 szegmense alkotja. A fliC flagellin gén D3 domént kódoló darabját izoláltuk és pET21c vektorba klónoztuk. A D3 fehérjét E.coli baktériumban termeltettük és tisztítottuk. Pásztázó mikrokcalorimetria alkalmazásával megmutattuk, hogy a D3 domén izolált formában is stabil, proteázokkal szemben rezisztens térszerkezettel rendelkezik. Eredményeink arra utalnak, hogy a D3 domén kiváló vázszerkezet lehet mesterséges kötőfehérjék irányított evolúcióval történő előállítására. Folyamatban vannak olyan kísérletek, amelyek egy adott célmolekulához (pl. ösztrogén, toxinok) specifikusan kötődni képes D3 variánsok kifejlesztését célozzák irányított evolúció (fág-„display”, ill. riboszóma-„display”) segítségével. A kifejlesztett kötőmotívum flagellinbe történő visszaépítésével olyan polimer struktúra nyerhető, ami a kötődomént több ezer példányban hordozza a felületén, s kiválóan alkalmazható bioszenzorok érzékelő elemeként.

Az flagelláris exportrendszer vízdékony komponenseinek jellemzése érdekében tett erőfeszítéseink során sikerrel oldottuk meg a FliS flagellin-specifikus dajkafehérje tisztítását. Izotermális titrációs mikrokcalorimetria alkalmazásával jellemeztük a FliS-flagellin kölcsönhatás termodinamikai paramétereit. Méréseink szerint a kölcsönhatás nagyon erős, amelynek disszociációs állandója az $5 \cdot 10^{-8}$ M körüli tartományban található. Eredményeink arra utalnak, hogy a FliS monomer formában kötődik a flagellin molekula C-terminális rendezetlen régiójához, azt helikális konformációban stabilizálva. A FliS kötődése nem befolyásolja a flagellin kompakt részének szerkezeti stabilitását, ami arra utal, hogy a korábbi vélekedéssel ellentétben nem a FliS feladata a flagellin alegységek exportkompetens konformációjának kialakítása.

Az eredményeket a FEBS Letters, BBRC, Protein Pept Letters folyóiratokban közzeltük, illetve a Nature Biotechnology folyóiratban kommentárt közzeltünk, továbbá két szabadalmat nyújtottunk be.

A hőstabilitás, enzimaktivitás és a konformációs flexibilitás közötti összefüggések vizsgálata

Kutatócsoportunk korábbi vizsgálatai elsősorban a mezofil és termofil enzimek hőstabilitása közötti különbség szerkezeti hátterére fókuszáltak és az eredmények alapján az ionpárok, ionhálózatok fontos szerepét valószínűsítettük. A *Thermotoga maritima* eubaktérium két xilanáz enziméből álló modellrendszer segítségével a kevésbé tanulmányozott termofil és hipertermofil fehérjék közötti hőstabilitás különbség hátterét vizsgáltuk. Az irányított evolúciós technikák közé tartozó „family shuffling” módszert racionalizálva, kiméra enzimeket állítottunk elő, amelyeket fizikai-kémiai módszerekkel jellemeztünk, és a megnövekedett hőstabilitásért felelős tényezőket a homológia modellezés segítségével felépített szerkezetek alapján azonosítottuk.

A *Thermotoga maritima* teljes genom szekvenciájának publikálása után sikerült két olyan xilanáz fehérjét találni a baktérium genomjában, amelyek jelentős hasonlóságot mutatnak és együtt egy termofil és egy hipertermofil enzimből álló modellrendszert alkotnak. Elvégeztük a *Thermotoga maritima* xynB és xynAcat gének klónozását. A szerkezeti összehasonlítás céljából, a már ismert xilanáz B enzim röntgenszerkezete mellé homológia modellezéssel felépítettük a xilanáz A katalitikus domén lehetséges szerkezetét. A két, $(\beta/\alpha)_8$ -hordó szerkezettel rendelkező xilanázból kiindulva, a family shuffling módszer ésszerűsítésével, 21 kiméra enzimet állítottunk elő, amelyből 16 bizonyult aktívnak. A kimérák optimális működési hőmérsékletei nem mutattak monoton összefüggést a hipertermofil vad típusú enzimből származó szekvencia részlet nagyságával. Négy kimérának volt magasabb az optimális működési hőmérséklete, mint a termofil TmxAcat fehérjének, a legstabilisabb variáns az lett ($T_{opt} = 80\text{ °C}$), amelyben a láncvégi szegmenseket cseréltük le.

A kiméra konstrukciók további szerkezeti vizsgálata és bioinformatikai analízise szerint a *Thermotoga maritima* xilanázok esetében az optimális működési hőmérséklet nem monotonon növekszik a hipertermofil összetevők arányának növekedésével, az N-és C-terminális szegmensek közötti kölcsönhatásoknak aránytalanul nagyobb hozzájárulása van a molekula teljes stabilitásához. Az eredmények várhatóan alkalmazhatók egyéb olyan $(\beta/\alpha)_8$ -hordó szerkezettel rendelkező fehérjére, ahol a két láncvégi régió kellő közelségben van egymáshoz.

Az általunk végzett kísérletek eredményei rávilágítanak a terminális régiók és a köztük lévő kölcsönhatások fontosságára a stabilitás szempontjából. A hőstabilitás szerkezeti alapjaiban fontos szerepet játszó, egyre nagyobb bizonyosságot nyerő elektrosztatikus

kölcsönhatás mellett a láncvégek közötti kölcsönhatások erősítése egy könnyen tervezhető és nagy eséllyel pozitív eredménnyel szolgáló tényező.

A gliceraldehyd-foszfát dehidrogenáz (GAPDH) enzim két ortológja, a termofil *Thermotoga maritima*, valamint a nyúlból származó változata által katalizált reakció hőmérsékletfüggése egyaránt jelentős eltérést mutat a klasszikus arrheniusi lineáris viselkedéstől, azonban az észlelhető töréspont hőmérséklete a T_m GAPDH esetében 17°C-kal magasabb, mint a nyúlból származó enzimnél. A H/D kicserélődés vizsgálatok azt mutatják, hogy szobahőmérsékleten a T_m GAPDH konformációs flexibilitása alacsonyabb, viszont a hőmérsékleti optimumokon összehasonlítva a két enzim flexibilitását, azok megegyeznek, ennek alapján az enzimaktivitás nemarrheniusi hőmérsékletfüggése a konformációs dinamikával hozható összefüggésbe. A szerkezetek B-faktorainak analízise alapján a flexibilitás különbsége az enzimek koenzim- és szubsztrátkötő régióiban a legjelentősebb.

A termofil, mezofil és hidegtűrő IPMDH enzim az aktivitási paraméterek hőmérsékletfüggése tekintetében nagyon hasonlóan viselkedik. A hőmérsékletfüggést leíró Arrhenius és van't Hoff ábrázolások alakja megegyezik, a különbség az abszolút értékekben található: az enzimek aktivitása a hőstabilitásukkal fordítottan arányos. Megállapítható, hogy az enzimek működésével járó alapvető dinamikus folyamatok a hőmérsékleti adaptáció során nem változtak meg jelentősen, csak a hőmérsékleti optimumuk toldott el a megkívánt irányba.

Az *E. coli* IPMDH által katalizált reakcióban a szubsztrátra vonatkozó Michaelis-Menten állandó hőmérsékletfüggésének van't Hoff ábrázolása szigmoid lefutást mutat. CD és DSC méréseim szerint a szigmoid változást nem konformációváltozás okozza. A H/D kicserélődés mérésekből meghatározott ΔG_{mic} mikro stabilitási szabadentalpia-értékek hőmérsékletfüggése azt mutatja, hogy 30°C-on – ami megfelel a disszociációs állandó szigmoid átmenete középpontjának – a szabadentalpia jelentősen csökken, ami a konformációs flexibilitás növekedését, új fluktuációk megjelenését indikálja. A FRET-hatékonyságnak a donoremiszióval való korrekciójával kapott f' paraméter értékével jellemeztem a fehérje dinamikáját, ebben az esetben a domének egymáshoz viszonyított relatív fluktuációjának amplitúdóját. Az f' értéke az IPM-mentes NADH-IPMDH komplexben 30°C környékén jelentősen emelkedik, ami a konformációs fluktuációk nagyobb amplitúdójával magyarázható.

A konformációs flexibilitás növelése mutációk révén a nemkonzervált prolinok glicinre való cseréje útján megvalósítható, ezt H/D kicserélődés mérések alátámasztják. A

TtIPMDH így létrehozott mutánsainak hőstabilitása alacsonyabb a vad típusnál, a beépített glicinek számával arányosan. A mutáns enzimek hőstabilitása és konformációs flexibilitása között van összefüggés, noha a korreláció nem tökéletes. Az enzimaktivitás és flexibilitás között összefüggés nem mutatható ki.

A laboratóriumunkban folyó kísérleti projektekhez kapcsolódva elméleti módszerekkel elemeztük az izopropil-malát dehidrogenáz, a gliceraldehyd-3-foszfát dehidrogenáz, valamint kétféle xilanáz stabilitásának egyes vonatkozásait. A TIM-hordó szerkezetű xilanázok esetében kiméra enzimeket vizsgáltunk, melyek elemzése azt mutatta, hogy a stabilitásért leginkább felelős aminosavak nem egyenletesen oszlanak el a szekvenciában; a terminális régiók kölcsönhatásának, komplementaritásának kiemelt szerepe van.

Ezeket az eredményeket a Biochemistry, a European Biophysics Journal, ill. a BBRC folyóiratokban közzétettük.

Átmeneti zóna a rendezett és a rendezetlen fehérjék között

Kutatási projektünk fő motívuma a fehérjék stabilitását meghatározó tényezők vizsgálata. Az utóbbi években megélné a megélné az érdeklődés az ún. rendezetlen fehérjék iránt. Ezek a fehérjék natív állapotban is rendezetlenek, és fontos szerepet játszanak különféle sejtfunkciókban (jelátvitel, szabályozás, stb.). Tanulmányozásuk során felismertük, hogy vizsgálatuk a fehérjestabilitást meghatározó tényezők szempontjából is fontos információkat szolgáltat. A rendezetlenséget jósló módszerek többsége az aminosav-összetételből indul ki, de kisméretű fehérjéknél általában rosszabbul működnek. Ez arra utal, hogy összefüggés lehet a fehérjeméret, az aminosav-összetétel és a stabilitás között. Az összefüggés feltárása céljából összeállítottunk egy adatbázist rendezett és rendezetlen fehérjékből, és megvizsgáltuk ezek eloszlását az aminosavösszetétel-térben. Ez azt mutatta, hogy a fehérjeméret csökkenésével növekszik az átfedés a két fehérjeosztály között.

Az összefüggés hátterének felderítéséhez kétféle rácsmodellt (hidrofób-poláros, ill. hidrofób-pozitív-negatív) alkalmaztunk. Ezeknél a rendezetlenséget az egy monomerre eső alapállapotú energia segítségével definiáltuk: akkor tekintjük a modellt rendezetlennek, ha ez az érték egy meghatározott küszöb alatt van. A modellek jól reprodukálták a valódi fehérjéknél tapasztalt összefüggést, egy paraméter, az egy monomerre eső energia kivételével. Ennek reprodukálásához a kölcsönhatási energiákat lánchosszfüggővé kellett tenni.

A vizsgálatok konklúziója az, hogy kisebb fehérjéknél a specifikus kölcsönhatások fontosabb szerepet játszanak a stabilitás meghatározásában, mint nagyobbaknál, ezért az aminosav-összetétel kevesebb információt hordoz a stabilitásról.

A fehérjeméret növekedésével továbbá az egy aminosavra eső kontaktusok száma növekszik, ezért az egy kontaktusra eső energia kisebb jelentőségű a stabilitás szempontjából, így lehetőség van a kölcsönhatások fellazulására. A fehérjeméretnek tehát jelentősége van a stabilitásra nézve, sőt, a kétállapotú dimerek példája mutatja, hogy a méret egyes esetekben döntő is lehet (a méret megduplázása stabilizációt von maga után).

Ezt a munkát a *Biophysical Journal*-ben publikáltuk, ill. a fehérjeméret témájával kapcsolatban egy kommentárt közöltünk a *Proteins* folyóiratban.