

**A 3-FOSZFOGLICERÁT KINÁZ ENZIM DOMÉNZÁRÓDÁSÁNAK
VIZSGÁLATA:
SZERKEZETI ÉS FUNKCIONÁLIS MEGKÖZELÍTÉSEK**

Doktori (Ph.D.) értekezés

dr. Perbiróné Szabó Judit
okleveles biológus

Témavezető:

Kazinczyné Dr. Vas Mária, tudományos tanácsadó, az MTA doktora

Készült:

Magyar Tudományos Akadémia SzBK Enzimológiai Intézetében

és

Eötvös Loránd Tudományegyetem Biológia Doktori Iskolájában
(vezetője: Prof. Dr. Erdei Anna, akadémikus)

Szerkezeti Biokémia Program keretében
(vezetője: Prof. Dr. Gráf László, akadémikus)



Budapest, 2008

TARTALOMJEGYZÉK

| | |
|--|-----------|
| 1. BEVEZETÉS | 1 |
| 2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS | 2 |
| 2.1. <i>A szerkezeti flexibilitás és a fehérjeműködés kapcsolata</i> | 2 |
| 2.2. <i>A doméneket érintő konformációváltozások</i> | 5 |
| 2.2.1. A domének definíciója | 5 |
| 2.2.2. A doménmozgások típusai | 5 |
| 2.2.3. A doménmozgások jelentősége | 6 |
| 2.2.4. Belső sajátsága-e a fehérjéknek a doménzáródás vagy a szubsztrátok indukálják? | 7 |
| 2.2.5. Irodalmi példák a fehérjeműködés és a doménmozgások kapcsolatának ill. a doménmozgások mechanizmusának vizsgálatára | 8 |
| 2.2.5.1. A kristályszerkezeti adatok molekuláris grafikai összehasonlítása | 8 |
| 2.2.5.2. Oldott fehérjékkel végzett biofizikai vizsgálatok | 9 |
| 2.2.5.3. Mutációs és enzimkinetikai analízis | 11 |
| 2.2.5.4. Számítógépes modellezés | 13 |
| 2.3. <i>PGK mint a doménzáródási mechanizmus felderítéséhez modellként szolgáló enzim</i> | 13 |
| 2.3.1. A PGK élő szervezetekben betöltött szerepe | 14 |
| 2.3.2. A PGK röntgenkrisztallográfiai szerkezete | 16 |
| 2.3.2.1. A szubsztrátmentes enzim szerkezete és a „hinge-bending” hipotézis | 16 |
| 2.3.2.2. A 3-PG kötőhely szerkezete | 18 |
| 2.3.2.3. A nukleotid kötőhely szerkezete | 20 |
| 2.3.2.3.1. A nukleotid szubsztrátok kötődési módja | 20 |
| 2.3.2.3.2. Nukleotid analógok (AMP-PNP és AMP-PCP) kötődési módja | 24 |
| 2.3.2.4. A PGK nyitott és zárt kristályszerkezete | 26 |
| 2.3.2.4.1. A szubsztrátok elhelyezkedése és kölcsönhatásai a katalitikus komplexben | 26 |
| 2.3.2.4.2. A nyitott és zárt szerkezetek összehasonlítása: a PGK molekula csukló-régióinak meghatározása | 30 |
| 2.3.3. A PGK tulajdonságai oldat fázisban | 33 |
| 2.3.3.1. A szubsztrátkötődés jellemzése: disszociációs állandók (K_d értékek) | 34 |
| 2.3.3.2. A PGK szubsztrátjainak egymásra hatása a terner enzim-szubsztrát komplexben | 35 |
| 2.3.3.3. PGK által katalizált reakció enzimkinetikai jellemzése | 36 |
| 2.3.3.3.1. Az enzimkinetikai reakciómechanizmus | 36 |
| 2.3.3.3.2. A PGK anomális kinetikai viselkedése: szubsztrátfelesleg-, és anion aktiválás | 36 |
| 3. CÉLKITŰZÉSEK | 38 |
| 4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK | 40 |
| 4.1. <i>Anyagok</i> | 40 |
| 4.2. <i>Módszerek</i> | 41 |
| 4.2.1. DNS szintű munkák a vad típusú és mutáns hPGK enzimek előállítására | 41 |
| 4.2.2. A humán PGK előállítására citoplazmatikus fehérje expresszióval | 42 |
| 4.2.3. A vad típusú hPGK és mutánsainak feltárása és tisztítása | 42 |
| 4.2.4. Fehérjeoldatok koncentrációjának meghatározása | 43 |
| 4.2.5. Szubsztrátok koncentrációjának meghatározása | 43 |
| 4.2.5.1. 3-PG koncentrációjának meghatározása | 43 |
| 4.2.5.2. ATP koncentrációjának meghatározása | 43 |
| 4.2.5.3. ADP koncentrációjának meghatározása | 43 |
| 4.2.5.4. 1,3-BPG koncentrációjának meghatározása | 44 |
| 4.2.6. Enzimkinetikai mérések | 44 |
| 4.2.6.1. PGK enzimaktivitás mérése: 3-PG-ből és MgATP-ből kiinduló enzimreakció | 44 |
| 4.2.6.2. A pirofoszfát anion enzimaktivitásra gyakorolt hatásának vizsgálata | 45 |
| 4.2.7. Szubsztrátok kötődését jellemző K_d értékek meghatározása | 46 |
| 4.2.7.1. DTNB-vel történő tiol-módszítés módszere | 46 |
| 4.2.7.2. Fluorimetriás titrálás módszere ANS jelenlétében | 48 |
| 4.2.8. CD spektroszkópia | 48 |
| 4.2.9. Differenciális pásztázó mikrokolorimetria (DSC) | 49 |

| | | |
|------------|--|------------|
| 4.2.10. | Izotermális titráló kalorimetria (ITC) | 49 |
| 4.2.11. | Kisszögű röntgenszórás (SAXS) | 50 |
| 4.2.12. | Molekuláris grafikai analízis | 50 |
| 4.2.13. | A PGK konzervatív oldalláncainak azonosítása | 51 |
| 4.2.14. | A vad típusú és a mutáns hPGK-k termodinamikai adatainak kiszámítása | 51 |
| 5. | EREDMÉNYEK ÉS ÉRTELMEZÉSÜK | 53 |
| 5.1. | <i>A PGK doménzáródásához mindkét szubsztrát együttes kötődése szükséges</i> | 53 |
| 5.2. | <i>Az R38 és K215 katalitikus oldalláncok szerepe a doménzáródásban: az R38A és K215A hPGK mutánsok SAXS analízise</i> | 55 |
| 5.3. | <i>A fő csuklóként feltételezett L-jelű β-redő és a vele kölcsönhatásban álló régiók aminosav-maradékai szerepének vizsgálata irányított mutagenézissel</i> | 59 |
| 5.3.1. | A humán PGK aminosav-oldalláncainak kiválasztása pontmutációra | 59 |
| 5.3.2. | A csukló régió mutánsainak szerkezeti jellemzése | 62 |
| 5.3.2.1. | Cirkuláris dikroizmus mérések (CD) | 63 |
| 5.3.2.2. | Kalorimetriás mérések (DSC) | 63 |
| 5.3.2.3. | Enzimszerkezet stabilitásának jellemzése tiol-reaktivitási vizsgálatok segítségével | 65 |
| 5.3.3. | A csukló régió mutánsainak enzimkinetikai és szubsztrátkötődési vizsgálata | 66 |
| 5.3.3.1. | Kinetikai vizsgálatok a csukló régió mutánsaival | 66 |
| 5.3.3.2. | Kötődési vizsgálatok a csukló régió mutánsaival | 70 |
| 5.3.4. | A csukló régió mutánsainak kisszögű röntgenszórás vizsgálata | 72 |
| 5.4. | <i>A szubsztrátkötőhely oldalláncainak szerepe a doménzáródás folyamatában</i> | 72 |
| 5.4.1. | <i>A nukleotidkötőhely oldalláncjai doménzáródásban betöltött szerepének vizsgálata irányított mutagenézissel</i> | 74 |
| 5.4.1.1. | A nukleotid kötőhely mutánsok szerkezeti stabilitásának vizsgálata | 75 |
| 5.4.1.2. | Enzimkinetikai és szubsztrátkötődési vizsgálatok a nukleotidkötőhely mutánsokkal | 77 |
| 5.4.1.2.1. | Kötődési vizsgálatok | 77 |
| 5.4.1.2.2. | Kinetikai vizsgálatok | 80 |
| 5.4.1.3. | Kisszögű röntgenszórás vizsgálatok a nukleotidkötőhely mutánsoknál | 81 |
| 5.5. | <i>A mutációk enzimműködésre gyakorolt hatásának energetikai értelmezése</i> | 84 |
| 5.6. | <i>A doménzáródást kísérő szabidentalpia-változás meghatározása</i> | 89 |
| 6. | ÖSSZEFOGLALÁS | 94 |
| 7. | AZ ÉRTEKEZÉS TÉMAKÖRÉHEZ KAPCSOLÓDÓ KÖZLEMÉNYEK | 98 |
| 8. | IRODALMI HIVATKOZÁSOK | 101 |
| 9. | FÜGGELÉK | 108 |

ÁBRÁK JEGYZÉKE

| | |
|---|----|
| 1. ábra A natív konformációs állapotok sokfélesége Henzler-Wildman és mtsai nyomán [1]..... | 3 |
| 2. ábra A konformációs mozgások típusai..... | 4 |
| 3. ábra A doménnmozgások típusai Gerstein és Krebs ábrázolásában [8]..... | 6 |
| 4. ábra A PGK molekula szerkezete..... | 14 |
| 5. ábra A 3-PG szubsztrát kötődése és a szubsztrátok (3-PG, 1,3-BPG) szerkezeti képletei..... | 19 |
| 6. ábra A MgADP szubsztrát kötődése és az ADP szerkezeti képlete..... | 21 |
| 7. ábra A MgATP és az ATP kötődési módja a sertésizom PGK szerkezetben..... | 23 |
| 8. ábra Az ATP analógok kötődése és szerkezeti képleteik..... | 24 |
| 9. ábra Különböző nukleotid szubsztrátok és ATP analógok kötődésének összehasonlítása..... | 26 |
| 10. ábra A Lys215 oldallánc pozíciójának megváltozása a zárt szerkezetben..... | 28 |
| 11. ábra A modellezett 1,3-BPG kölcsönhatásai..... | 29 |
| 12. ábra A PGK főbb csukló régiói: az $\alpha 7$ két végpontja és a βL [76]..... | 31 |
| 13. ábra Az N- és a C-terminális domént a βL redő közelíti egymáshoz..... | 31 |
| 14. ábra A PGK főbb másodlagos szerkezeteinek elmozdulása a doménzáródás során..... | 32 |
| 15. ábra A szubsztrátok konformáció-változtató hatásának terjedése a fő csukló régió, a βL felé..... | 33 |
| 16. ábra A hPGK kisszögű röntgenszórási görbéi szubsztrátmentes és szubsztrátokat tartalmazó komplexei esetében [58, 94]..... | 54 |
| 17. ábra Kisszögű röntgenszórási eredmények a vad típusú hPGK-val és a katalitikus oldalláncok mutánsaival..... | 57 |
| 18. ábra Az Arg38 kölcsönhatásai a 3-PG-vel ill. a βL fő csukló régióival..... | 58 |
| 19. ábra A PGK βL redőjének pozíciója nyitott és zárt konformációjú szerkezetben..... | 61 |
| 20. ábra A PGK doménjei között állandóan fennálló hidrofób, elektrostatikus és H-híd kölcsönhatások..... | 62 |
| 21. ábra A vad típusú hPGK és néhány csukló régió mutáns CD spektruma..... | 63 |
| 22. ábra A fő csukló régió és környeze egyes oldalláncai pontmutánsainak DSC és tiol-reaktivitási vizsgálata..... | 64 |
| 23. ábra A fő csukló régióban végzett pontmutációk hatása a hPGK kinetikai viselkedésére..... | 67 |
| 24. ábra A PGK fő csukló régiójának kölcsönhatásai..... | 70 |
| 25. ábra A Cys oldalláncok elhelyezkedése a szerkezetben és ezek módosítási vizsgálata Ellman reagens segítségével..... | 71 |
| 26. ábra Nukleotid kötőhelyen létrehozott mutációk hatása a CD spektrumra és a hőstabilitásra..... | 75 |
| 27. ábra A T375A mutáns fluorimetriás titrálása az ANS fluoreszcens jel változásának követésével..... | 78 |
| 28. ábra A nukleotid kötőhely mutánsok kinetikai vizsgálata..... | 80 |
| 29. ábra A nukleotidkötő oldalláncok szerepe a doménzáródásban..... | 82 |
| 30. ábra Az enzimreakció szabadentalpia-változása..... | 84 |
| 31. ábra A szubsztrátkötőhely és a csukló régió oldalláncainak hozzájárulása a katalízis aktivációs szabadenergia változásához..... | 87 |
| 32. ábra A szubsztrátkötőhely és a csukló régió oldalláncainak hozzájárulása a 3-PG kötéséhez..... | 88 |
| 33. ábra A szubsztrátkötőhely és a csukló régió oldalláncainak hozzájárulása a MgATP kötéséhez..... | 88 |
| 34. ábra A T393del mutáns ITC-s vizsgálata..... | 89 |
| 35. ábra A két szubsztrát kötődésének termodinamikai ciklusa..... | 90 |

TÁBLÁZATOK JEGYZÉKE

| | |
|--|----|
| 1. táblázat A PGK ismert röntgendiffrakciós szerkezetei..... | 17 |
| 2. táblázat A szubsztrátok K_d értékei (mM) szabad enzim esetén oldatban és kristályban, valamint PGK*3-PG komplex esetén kristályban..... | 34 |
| 3. táblázat Az irányított mutagenezéshez használt forward ill. reverz primerek DNS szekvenciája..... | 41 |
| 4. táblázat A kísérletes és az elméleti SAXS adatok összehasonlítása..... | 56 |
| 5. táblázat A PGK β L régióját alkotó és azt szekvenciálisan követő, valamint azokkal harmadlagos kapcsolatban lévő aminosav-maradékok konzervativitásának mértéke..... | 60 |
| 6. táblázat A csukló régió mutánsainak hőstabilitása és a szubsztrátok stabilizáló hatása a szerkezetükre..... | 65 |
| 7. táblázat A csukló régió mutánsainak enzimkinetikai és szubsztrátkötődési állandói..... | 68 |
| 8. táblázat Kísszögű röntgenszórás mérések a csukló régió mutánsaival..... | 73 |
| 9. táblázat A nukleotid kötőhely oldallancai konzervativitásának mértéke a katalitikus R38-hoz hasonlítva..... | 74 |
| 10. táblázat A szubsztrátkötőhely mutánsainak (DSC) kalorimetriás méréseinek T_m adatai szubsztrátok jelen-, és távollétében..... | 76 |
| 11. táblázat A kinetikai és kötődési állandók összefoglalása a szubsztrátkötőhely mutánsok és a vad típusú hPGK esetén..... | 79 |
| 12. táblázat A szubsztrát kötőhely mutánsok kísérletes kísszögű röntgenszórás adatainak összevetése az elméleti szórásgörbék adataival..... | 83 |
| 13.a táblázat A vad típusú és a szubsztrátkötőhely mutáns hPGK-k szubsztrátkötési és kinetikai állandóiból származtatott termodinamikai paraméterek..... | 85 |
| 13.b táblázat A vad típusú és a csukló régió mutáns hPGK-k szubsztrátkötési és kinetikai állandóiból származtatott termodinamikai paraméterek..... | 86 |
| 14. táblázat A vad típusú hPGK és két kiválasztott mutáns szubsztrátkötésének termodinamikai adatai..... | 92 |
| 15. táblázat A terner komplex képződését kísérő teljes szabadentalpia-változás ill. a doménzáródást kísérő szabadentalpia-változás a vad típusú hPGK-nál valamint az N336A és T393del mutánsoknál..... | 92 |
| 16. táblázat A doménzáródás bekövetkezése a vad típus és a különböző PGK mutánsok esetén (kinetikai viselkedésük, kalorimetriás stabilitásuk és SAXS adataik alapján)..... | 97 |

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

| | |
|--------------------------------|--|
| AMP-PNP | β,γ -imido-adenozin-5'-trifoszfát |
| AMP-PCP | β,γ -metilén-adenozin-5'-trifoszfát |
| ANS | 8-anilino-naftalin szulfonsav |
| APS | ammónium-perszulfát |
| 1,3-BPG | 1,3-biszfoszfoglicerát |
| <i>B. stearo</i> ; <i>Bs</i> | <i>Bacillus stearrowthermophilus</i> |
| CD | cirkuláris dikroizmus |
| DSC | differentiális pásztázó mikrokolorimetria |
| DTNB | 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoát) |
| DTT | ditiotreitól |
| <i>E. coli</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| GAPDH [EC 1.2.1.12] | glicerinaldehid-3-foszfát dehidrogenáz |
| G6PDH | glükóz-6-foszfát dehidrogenáz |
| HK | hexokináz |
| hPGK | humán PGK |
| IPTG | izopropil- β -D-tiogalaktopiranozid |
| LDH | tejsav dehidrogenáz |
| NADH | nikotinamid-adenin-dinukleotid |
| PCR | polimeráz láncreakció |
| PEP | foszfoenol-piruvát |
| 3-PG | 3-foszfoglicerát |
| PGK [EC 2.7.2.3] | 3-foszfoglicerát kináz |
| PK | piruvát kináz |
| SAXS | kiszögű röntgenszórás |
| SDS | nátrium-dodecil-szulfát |
| <i>T. brucei</i> ; <i>Tb</i> | <i>Trypanosoma brucei</i> |
| TEMED | N,N,N',N'-tetrametil-etilén-diamin |
| <i>T. maritima</i> ; <i>Tm</i> | <i>Thermotoga maritima</i> |
| <i>Yt</i> | <i>yeast</i> |

Köszönetnyilvánítás

Köszönetemet fejezem ki témavezetőmnek, Kazinczyné Dr. Vas Máriának, hogy lehetőséget biztosított számomra, hogy a foszfoglicerát kináz enzim vizsgálatával kapcsolatos kutatásokba bekapcsolódjak. Köszönöm szakmai irányítását; értékes tanácsait, melyekkel támogatta munkámat, formálta gondolkodásomat.

Köszönet illeti Dr. Flachner Beátát az irányított mutagenézis munkákban való segítségéért, a fehérje kifejezés és termelés módszerének kidolgozásáért valamint a kísérletes munkákban való részvételéért. Köszönöm Matkoviczné Dr. Varga Andreának a kísérletes munkákban való aktív részvételét, tanácsait; Dr. Kalmár Lajosnak a PGK szekvenciák analíziséhez használt program elkészítését; Gráczer Éva kollégámnak a molekuláris grafikai munkában való részvételét és segítségét.

Hálás vagyok az Intézet korábbi és jelenlegi igazgatójának, Dr. Friedrich Péter és Dr. Závodszy Péter akadémikusoknak, hogy lehetőséget biztosítottak számomra, hogy kutatómunkámat a Magyar Tudományos Akadémia Szegedi Biológiai Központjának Enzimológiai Intézetében végezhettem.

Köszönettel tartozom Dr. Závodszy Péter akadémikusnak a doktori tanulmányaimhoz nyújtott szakmai segítségéért és anyagi támogatásáért; valamint az EMBL-nek a hamburgi szinkrotron mérőállomáshoz való kiutazásomhoz nyújtott ösztöndíjért.

Köszönöm Szüleimnek és Férjemnek, dr. Perbiró Gábornak segítő, türelmes szeretetüket, támogatásukat, tanácsaikat.

1. BEVEZETÉS

*„A haladás a kezdetleges megoldásoktól a bonyolultakon át az egyszerűekig vezető út.”
(Kurt Biedenkopf)*

A biológiai rendszerek makromolekulái között, a fehérjéket is beleértve, specifikus felismerő mechanizmusok biztosítják azok szervezett, összehangolt működését, amelyek az életműködésekhez szükségesek. Az enzimfehérjék speciális szerkezeti adottságai teszik lehetővé szubsztrátjaik felismerését, melyek kémiai átalakulását katalizálják. A biokémiai tudományok kezdeti korszakában az enzim-szubsztrát kapcsolatot a kulcs-zár hasonlaltal közelítették meg. Hamarosan kiderült azonban, hogy a felismerés ennél sokkal komplexebb folyamat, melyben a fehérjék szerkezetének flexibilis jellege döntő szereppel bír. A fehérjék háromdimenziós szerkezetét kialakító nem kovalens kötések (H-hidak, van der Waals és elektrosztatikus kölcsönhatások) olyan természetűek, hogy a hőmozgás energiájának rovására képesek átrendeződni, ami helyi, lokális fluktuációkat vagy nagyobb léptékű szerkezetváltozásokat eredményezhet (mint hurokrégiók elmozdulása vagy a domének relatív elmozdulása). A különféle ligandumokkal (szubsztrátokkal, effektorokkal) való kapcsolat e mozgásokat olyan irányba befolyásolja, hogy az enzim-szubsztrát kapcsolat a katalizált reakció szempontjából optimális módon alakulhasson, a reagáló csoportok megfelelő közelségbe kerülhessenek. Ezen kölcsönhatások az enzimek speciális kötőhelyein (pl. a szubsztrátkötő zsebekben), viszonylag kisszámú aminosavdallanc részvételével jönnek létre, mégis szerkezetváltoztató hatásuk gyakran a fehérjemolekula távolabbi részein is megnyilvánul. Ez az ún. allosztéria jelensége, melyet már régen felfedeztek, azonban mechanizmusának molekuláris szintű részleteiről még igen keveset tudunk.

Doktori munkám során arra a kérdésre kerestem a választ, hogy milyen módon történik meg egy tipikus, két doménből felépülő kináz enzim, a 3-foszfoglicerát kináz (PGK) nyitott (inaktív) konformációjú állapotának a zárt (aktív) formává történő átrendeződése. Munkám kezdetén már sokrétű információ állt rendelkezésemre a PGK működéséről, csoportunk is közreműködött az enzim különböző röntgenkrisztallográfias szerkezeteinek (konformációinak) meghatározásában, a molekula lehetséges csuklórégióinak kijelölésében és a szokványostól eltérő enzimkinetikai viselkedésének szerkezeti alapon történő értelmezésében. Munkám során a PGK feltételezhető fő csukló régiója működésének, azaz az enzimműködéshez nélkülözhetetlen doménzáródás folyamatának az oldallanc-kölcsönhatások szintjén történő megértését tűztem ki célul.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. *A szerkezeti flexibilitás és a fehérjeműködés kapcsolata*

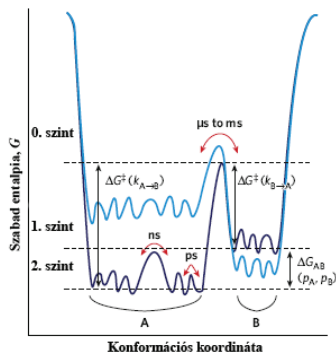
Az enzimfehérjék az élő szervezetekben speciális feladatokat látnak el. Meghatározott szerkezetű szubsztrátok speciális kémiai átalakulását katalizálják, lehetővé téve az élethez szükséges anyagcsere-folyamatok megfelelő sebességgel történő végbemenetelét. Ahogy számos összefoglaló munka is tárgyalja, az enzimaktivitás kifejtéséhez nélkülözhetetlen a fehérjeszerkezet stabilitása és flexibilitása közötti precíz egyensúly [1-3]. Az enzimeknek elég stabilaknak kell lenniük ahhoz, hogy háromdimenziós szerkezetüket fenntartsák: megfelelő térszerkezettel, aktív helyükön meghatározott pozícióban, meghatározott katalitikus oldalláncokkal kell rendelkezzenek. Ugyanakkor elég flexibilisnek is kell lenniük azonban ahhoz, hogy a katalízishez optimális módon kössék meg a szubsztrátokat, a kémiai reakció lejátszódhasson, és a termékek felszabadulhassanak.

Már régen feltételezték, hogy egy natív állapotú (feltekeredett) fehérjének fiziológiai hőmérsékleten, oldatban, nem egyetlen, hanem több konformációs állapota létezik, melyek egymással egyensúlyban vannak [4, 5]. Ma már kísérletes bizonyítékok egész sora áll rendelkezésre arra vonatkozóan, hogy a hőmozgás révén ezek a konformerek, melyek stabilitása nagyon hasonló, egymásba könnyen átalakulhatnak mégpedig a funkció kifejtéséhez szükséges optimális módon [6].

Amint azt az 1. ábra is szemlélteti, kisebb aktiválási szabadentalpia (ΔG^\ddagger) befektetést igénylő lokális fluktuációk gyorsan, a piko- ill. nanoszekundumos időskálán zajlanak. Emellett előfordulnak lassabb, a mikro- és milliszekundumos időskálán lejátszódó mozgások is, melyek kisebb valószínűséggel, ritkábban következnek be, hiszen nagyobb energiabefektetést igényelnek. Ilyen például az A állapotból B konformációs állapotba való átalakulás. Ezek a mozgások már különböznek a random fluktuációktól, rendszerint a molekula nagyobb részletének kooperatív, irányított elmozdulását jelentik. Ezek a konformációs mozgások az aminosavszekvenciában és ezzel együtt a térszerkezetben kódoltak, vagyis ez a dinamizmus a fehérje belső sajátása.

A fehérje konformációs energiatérképe függ az adott körülményektől. Ha a rendszer megváltozik, pl. ligandumkötődésre, mutáció vagy akár külső körülmények (hőmérséklet, pH, ionerősség) változásának hatására, az magával vonja az energiatérkép megváltozását is. A ligandum kötődése tehát nem indukálja az új szerkezet kialakulását, hanem csupán szelektíven kötődik bizonyos konformerekhez és ezáltal eltolja a különböző konformerek

közi egyensúlyt (a kérdést részletesebben a 2.2.4. fejezetben tárgyalom). Bahar és munkatársai szerint egy natív fehérje oldatában lévő egyensúlyi konformereknek, melyeknek konformációs energiája a globális energiaminimumhoz közeli, feltételezhetően funkciójuk van [7].

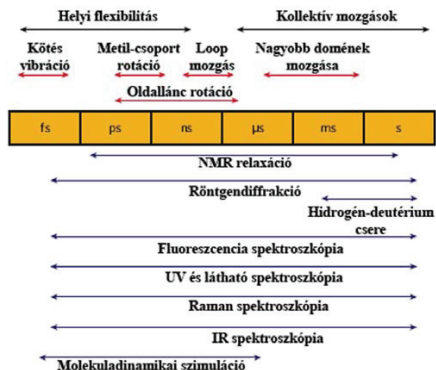


1. ábra A natív konformációs állapotok sokfélesége Henzler-Wildman és mtsai nyomán [1]

Az ábrán a natív állapotnak megfelelő lokális energiaszintek láthatóak a konformációs koordináta függvényében. Ez az energiaszint perturbálódhat a körülmények (ligandumkötés, mutáció, oldószer, ionerő, pH) megváltozása által. Ezt szemléltetik a világoskék és sötétkék színű görbék.

Az elméleti munkák és a kísérletes tapasztalatok alapján még a látszólag random mozgásoknak is szerepük van a biológiai funkció kifejtésében. Az egyre növekvő mennyiségű adat birtokában azt lehet mondani, hogy a fehérjéknek belső sajátosságuk, hajlamuk van arra, hogy a funkciónak megfelelő konformációs változásokon menjenek át, és valószínűleg evolúciós nyomás is van arra, hogy a megfelelő struktúrák szelektálódjanak.

A fehérjén belül megvalósuló mozgások lehetnek lokális mozgások vagy kollektív mozgások [1] (2. ábra). Előbbi csoportba tartozik az egyedi kötések vibrációja az atomi fluktuációk szintjén, ahogy azt a hőmozgás példázza. Ezek femtoszekundumos időskálán játszódnak le. Szintén lokális mozgás egy-egy oldallánc elfordulása, a másodlagos szerkezeti elemek deformációja vagy az azokat összekötő hurkok elmozdulása, melyek már zömében a piko- és nanoszekundumos időskálán valósulnak meg. A kollektív mozgások csoportjába tartoznak a nagyobb molekulárszettek pl. nagyobb hurkok vagy domének mozgásai. (Domének definícióját illetően ld. 2.2.1. fejezetet). A domének között csúszó (nyíró) vagy csukló mentén történő elforduló mozgások mehetnek végbe. Ezek mikro- ill. milliszekundumos időskálán zajlanak. A 2. ábra foglalja össze az egyes mozgástípusokra jellemző időskálákat, valamint azok kísérletes vizsgálatára alkalmas módszereket.



2. ábra A konformációs mozgások típusai

Az ábrán a különböző mozgástípusok és vizsgálati módszerek időskálák szerinti csoportosítása látható.

A mozgások különböző kategóriákba sorolása nem egyszerű feladat. Gerstein és Krebs hasonlóan az előző osztályozáshoz az elmozduló egység mérete alapján csoportosította a mozgásokat, de egy kicsit más módon [8]. Három kategóriát különböztetett meg: alegységek, domének és doménektől kisebb szerkezeti egységek mozgása. Ez utóbbira példa a felszíni loop-ok mozgása, ahogy azt a fehérje tirozin foszfatáz enzim esetén láthatjuk [9], de ide tartoznak másodlagos szerkezeti elemek elmozdulásai is, így hélixeké, mint amelyet az inzulinban figyelhetünk meg [10]. Természetesen az oldalláncok rotációját is ebben a kategóriában említhetjük, bár ez inkább a fehérjék általános tulajdonsága, belső flexibilitás, azaz egyfajta háttérnek tekinthető, semmint egyedi mozgásnak. (A domének mozgásáról ld. 2.2.2. fejezetet.) Az alegység kölcsönhatások révén bekövetkező konformációs változások annyiban különböznek más, nagyobb molekularészleteket (pl. doméneket) felölelő konformációs mozgásoktól, hogy itt nem kovalens kölcsönhatásban lévő struktúrák elmozdulásáról van szó. Ezek gyakran allosztérius kölcsönhatások velejárájaként következnek be (pl. hemoglobin esetén) [11]. Megjegyzem, hogy az allosztéria fogalma ma már jóval tágabb értelemben használatos: a negyedleges szerkezetben bekövetkező konformáció változásokon kívül ide sorolhatók a harmadlagos szerkezetben bekövetkező különböző típusú változások is, amelyek kismolekulájú ligandum vagy másik fehérje molekula kötődésekor észlelhetők. Az allosztéria (=másik hely) meghatározása szerint egy kismolekula ill. másik fehérje molekula kötődése befolyásolja a kötőhelytől távol eső molekularészlet konformációját [12].

2.2. *A doméneket érintő konformációváltozások*

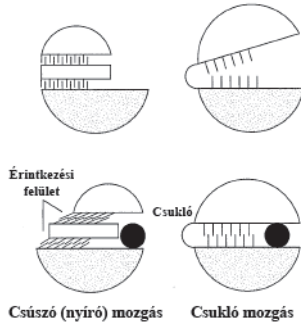
2.2.1. *A domének definíciója*

Ha a fehérjéket a térszerkezet szintjén vizsgáljuk, megfigyelhetjük, hogy kompakt, globuláris, térbelileg jól elkülönülő egységek tagolják őket. Ezeket az átlagosan 30-400 aminosavmaradékot tartalmazó globuláris, szerkezeti és rendszerint valamilyen funkcióval is rendelkező egységeket doméneknek nevezzük. Egy polipeptidlánc is gyakorta két vagy több doménre tagolódhat, melyeket flexibilis láncszakaszok kötnek össze. Ilyen pl. az egyes sejtek felszínén meglévő CD4 fehérjemolekula is, mely a HIV vírus megtapadására szolgáló receptor, melynek sejtén kívüli része 4 egyforma, egyenként 100-100 aminosavból felépülő doménre tagolódik [13]. A domének közötti régió lehet egyszerűbb felépítésű (pl. immunoglobulinok esetén), de kompaktabb szerkezettel rendelkező is. Az utóbbira példa vizsgálataim tárgya, a 3-foszfoglicerát kináz (PGK) enzim, mely két kb. azonos méretű doménből és a domének közötti kompakt szerkezetű „csukló” régióból épül fel. A domének között elhelyezkedő régiók rendkívül fontos szereppel bírnak a doménmozgásokban és azok szabályozásában. Mindez pedig a több doménből felépülő fehérjemolekulák működésének lényeges eleme.

2.2.2. *A doménmozgások típusai*

A doménmozgások a fehérjeflexibilitás tipikus példájaként szolgálnak [8]. Megkülönböztetünk csukló körüli (elforduló) mozgást ill. nyíró (csúszó) mozgást, aszerint, hogy jelen van-e a mozgás során egy folytonosan fenntartott érintkezési felület vagy sem (3. ábra). A nyíró mozgás (mely alapvetően a csúszó mozgás egy fajtájaként írható le) feltételezi, hogy egy jól „pakolt” (rendezett) érintkezési felület marad fenn a mozgás során. A mozgás síkja ezen érintkezési felület síkjával párhuzamos, az elmozdulás során nem deformálódik a főlánc. Egyetlen nyíró elmozdulás nem tud összetett nagy mozgást előidézni, ezért csak több ilyen együttese képes nagy hatást kifejteni. Főként azokra a fehérjékre jellemző ez a típusú doménmozgás, melyek réteges felépítésűek. Ilyen például a citrát szintáz [14, 15] és az aszpartát aminosztransferáz is [16, 17]. Csukló mozgás esetén, ezzel szemben nem egy folyamatosan fenntartott érintkezési felszín mentén történik az elmozdulás, hanem a domének az őket összekötő polipeptidláncban található csuklók mentén mozdulnak el. A csuklók mentén bekövetkező néhány nagy torziósszög-változás majdnem

elegendő a teljes mozgás kivitelezéséhez, a fehérje többi része mint rigid test mozdul el. A mozgás síkja mindig merőleges az érintkezési felület síkjára. Jellegzetes példa erre a laktoferrin fehérje vagy az adenilát kináz konformációs mozgása [14, 18].



3. ábra A doménmozgások típusai Gerstein és Krebs ábrázolásában [8]

Természetesen a valódi doménmozgások ezen két alapmechanizusból épülnek fel és a domináló mozgástípus alapján nevezhetjük el őket. A legtöbb nyíró mozgásban csuklók is részt vesznek, összekapcsolva a különböző csúszó részeket, így a csuklók jelenléte nem szembetűnő különbség a két alapmechanizmus között, sokkal inkább a folyamatosan fenntartott érintkezési felület. Bár a doménmozgások nagy része besorolható a csukló vagy a nyíró mozgások valamelyikébe, azonban akadnak kivételek. Erre példa az az eset, amikor a mozgás magában foglal egy csúszást a folyamatosan fenntartott érintkezési felület mentén, akár csak a nyíró mozgásnál, azonban mivel az érintkezési felület síma, ezért a mozgás nagyarányú, akár egy csukló mozgás esetén.

Bár sokféle enzim esetén figyeltek meg doménmozgásokat, azonban még igen keveset tudunk a mozgások hajtóerejéről és arról, hogy milyen molekuláris mechanizmus szerint, milyen időskálán és mekkora aktiválási energiát igényelve zajlanak le.

2.2.3. A doménmozgások jelentősége

Az enzimek aktív centruma a legtöbb esetben a domének közötti (interdomén) régióban található, ahol a szubsztrátoknak a katalízis érdekében kötődniük kell. Így tehát a doménmozgások szerepet játszanak abban, hogy a szubsztrátok a domének kinyílásakor az aktív helyre bejussanak, majd a doménzáródást követően egy nagyon speciális

mikrokörnyezetben a szubsztrátok reaktív csoportjai a katalízis szempontjából optimálisan orientálódnak és végbemehessen az enzimreakció, majd ezt követően a domének kinyílásakor a termékek távozhassanak. A doménmozgások jelentősége tehát abban áll, hogy gyakran segítségével alakul ki az aktív konformáció, hatásukra olyan oldalláncok kerülhetnek térbeli közelségbe, melyek szekvenciálisan egymástól igen távol helyezkednek el, vagy akár egy nyitott enzimkonformációban (pl. szubsztrátmentes enzim) távol találhatóak a katalízis helyétől. A doménmozgások, pontosabban a domének összezáródása segíthet kizárni a vizet az enzim aktív helyéről, így akadályozva meg a szubsztrátok nonspecifikus hidrolízisét mint mellékreakciót. A doménmozgások szerepet játszhatnak az enzimreakció más jellegű szabályozásában is (pl. PGK esetén ilyen az anionok általi aktiválás, ld. 2.3.3.3.2. fejezet).

2.2.4. Belső sajátsága-e a fehérjéknek a doménzáródás vagy a szubsztrátok indukálják?

Manapság két ellentétes szemlélet található az irodalomban. Az egyik szerint a biológiai funkcióhoz szükséges konformációs mozgások, mint pl. a doménzáródás, szubsztrátok távollétében is bekövetkezhetnek; a másik szerint pedig a szubsztrátok indukálják a doménzáródást, vagy az egyéb allosztérikus jellegű változásokat. Az „ellentét” nem kibékíthetetlen a két szemlélet között, hiszen valószínűleg mindkét álláspont igaz: szubsztrátok távollétében is bekövetkezhet doménzáródás egy bizonyos valószínűséggel, de ezt a valószínűséget a szubsztrátok jelenléte sokszorosára növeli (pl. az 1. ábrán látható nagyobb aktiválási energiát igénylő átmenet is végbemehet szubsztrátok távollétében, de sokkal ritkábban). A szubsztrátok kötődése a konformációk sokféleségének egyensúlyát eltolja a katalitikusan kompetens forma javára. A szubsztrátok távollétében bekövetkező doménzáródásra szolgáltatnak kísérleti példát a glutamát-dehidrogenáz kristályszerkezetei [19]. A szerkezeti flexibilitás fontosságát tekintve jól tanulmányozott másik példa az adenilát kináz enzim. Heinzler-Wildman és munkatársai NMR relaxációs kísérletekkel megmutatták, hogy oldatban az adenilát kináz enzim szubsztrátjai nélkül is képes olyan konformációs állapotokban létezni, melyekben a domének különböző mértékben záródnak [6]. Hasonlóan az előző kutatócsoporthoz, Snow és munkatársainak dinamikus mintavételi szimulációi is arra mutattak, hogy az adenilát kináz esetében ligandumok nélkül is képes kialakulni a zárt konformáció [20].

Ezzel szemben a citrát szintén a zárt és nyitott állapot közti szabadenergia-gát nagymértékben gátolja ezt a spontán, ligandumok nélküli záródást [20]. Mindennek

magyarázata az interdomén régió összetettségére vezethető vissza. Azon enzimek esetén, ahol a doménzáródás egyszerű csuklók segítségével valósul meg, sokkal gyakrabban figyeltek meg szubsztrátok távollétében is doménzáródást. Az interdomén régió komplexitása tehát alapvetően meghatározza azt, hogy képes-e egy enzim szubsztrátok távollétében is zárt konformációt kialakítani. A csukló mozgás segítségével történő doménmozgások esetén alacsony az energiagát a nyitott és zárt állapot között, így ligandumok távollétében is bekövetkezhet bizonyos valószínűséggel a doménzáródás.

A biológiai funkció és a konformációs flexibilitás közötti kapcsolat további kérdése, vajon hogyan egyeztethető össze, hogy a funkcionális folyamatok (pl. enzimek katalitikus ciklusa) általában a mikro ill. milliszekundumos időskálán zajlanak, míg a konformációs fluktuációk piko- és nanoszekundumos időskálán mennek végbe (ld. 1. ábra). Ez az eltérés felveti azt a kérdést, hogy a gyors atomi fluktuációknak lehet-e egyáltalán szerepük a fehérjék (enzimek) működésében. Az adenilát kináz kísérletes bizonyítékot szolgáltatott arra is, hogy elsősorban a csukló régiókban zajlanak nagyobb intenzitással a piko-, és nanoszekundumos időskálán bekövetkező atomi fluktuációk. Tehát a gyors fluktuációk és a nagyarányú koordinált mozgások között szoros összefüggés van [21]. Feltehetően, a gyors mozgások helyszínén nagyobb valószínűséggel következnek be a nagyarányú, lassabb (mikro-, ill. milliszekundumos időskálán lejátszódó) mozgások is (pl. a doménmozgások), melyek a katalitikus, zárt konformációt hozzák létre.

2.2.5. Irodalmi példák a fehérjeműködés és a doménmozgások kapcsolatának ill. a doménmozgások mechanizmusának vizsgálatára

2.2.5.1. A kristályszerkezeti adatok molekuláris grafikai összehasonlítása

A több doménből felépülő fehérjéknél a doménmozgások vizsgálatának különböző fázisai vannak. Először rendszerint a domének relatív elmozdulásának tényét mutatják ki. Ez sok esetben akkor derül ki, amikor egy fehérjéről több különböző kristályszerkezet kerül közlésre, melyek a doméneket egymástól eltérő relatív pozícióban mutatják meg. Ez történt a doménmozgások egyik klasszikus modelljének tekinthető adenilát kináz (AK) enzim esetén is [22], ahol megállapították az ún. LID (fedő)-domén és az AMP-kötő domén elmozdulását a termer komplexben az ATP-kötő ún. CORE-doménhez képest. A doménmozgást részletesebben analizálták Gernstein és mti [18], és megmutatták, hogy a csukló-típusú

mozgás során két hélix úgy záródik, mint ahogyan két szomszédos emberi ujj tud összezáródni.

A különböző kristályszerkezetek összehasonlítása segítségével tehát nemcsak a doménmozgás ténye állapítható meg, hanem a csukló régiók is lokalizálhatók. Az AK-hoz hasonló doménmozgást állapítottak meg más, szintén a nukleotid-monofoszfát kináz családba tartozó kinázoknál, pl. a guanilát-kináznál, timidilát-kináznál és az UMP/CMP-kináznál is [23, 24]. Szintén a röntgenszerkezetek összehasonlításából állapították meg a guanidino-kinázok családjába tartozó arginin-kináznál, illetve a kreatin-kináznál, hogy ezeknél a két doménből felépülő kinázoknál a doménmozgásokon túl az ATP-kötő domén két hurok (loop) régiójának elmozdulása teszi lehetővé a katalízist [25]. A nagyfelbontású szerkezet alapján azt is feltételezték, hogy a nukleotidkötő konzervatív oldalláncok valószínűleg a doménzáródásban is fontosak. Szintén nagyfelbontású szerkezetek összehasonlítása alapján azonosították a doménzáródásban szerepet játszó oldalláncokat a citrát-szintetáznál és az aszpartát-aminotranszferáznál és mindkét esetben komplex csúszó (nyíró) mozgásra következtettek [26]. Az alkohol dehidrogenáz és a cAMP-függő protein-kináz doménmozgásai is hasonlítanak egymáshoz, de inkább csukló mozgás jellegűek [26]. A hexokináz esetén megállapították, hogy a glükóz-kötött formában egy specifikus loop elmozdul a rigid doménhez képest és az aktív centrum bezáródik [27].

A doméneket különböző relatív pozícióban mutató kristályszerkezetek összehasonlítására még számos példát lehet felhozni [28-32], amelyek sok esetben részleteiben is leírják a nyitott és zárt konformációk közötti különbségeket, de mégsem adnak magyarázatot arra, hogy milyen mechanizmussal alakul át egyik konformáció a másikba. Másrészt, a kristályszerkezetek vizsgálatán kívül nagyon fontos, hogy a fehérjék (enzimek) oldatában is bizonyítékot kapjunk a doménmozgásokról, hiszen a kristály az oldattól eltérő fizikai állapotot jelent, továbbá a fehérjék általában oldott állapotban működnek.

2.2.5.2. Oldott fehérjékkel végzett biofizikai vizsgálatok

Mivel doménzáródáskor a fehérjemolekulák alakja jelentősen megváltozik, a kisszögű röntgenszórás módszere (SAXS) oldatban lévő fehérjemolekulák esetén alkalmas az ilyen típusú alakváltozás kimutatására. SAXS módszerét alkalmazták pl. a monomer arginin-kináznál és a dimer kreatin-kináznál [33] vagy a tetramer foszfofrukto-kináznál [34] is a szubsztrátok jelenlétében bekövetkező szerkezetváltozás kimutatására.

Szintén oldatban alkalmazható a fluoreszcencia energia-transzfer (FRET) módszere is a doménzáródás bekövetkezésének kimutatására. Ilyen munka a cAMP-függő protein-kinázal végzett FRET kísérlet [35]. Kutatók az enzim mindegyik doménjébe specifikus fluoreszcens jelölést vittek be oly módon, hogy mindegyik doménben külön-külön, jól megválasztott helyen, reaktív (cisztein) oldalláncot alakítottak ki mutációval. A ciszteinil oldalláncokat szelektíven reagáltatták két különböző fluoreszcens festékkel. A két fluoreszcens jelölő ágens között már a szubsztrátmentes apoenzim esetén is kimutattak bizonyos mértékű FRET létrejöttét. Az energiáttranszfer hatásfoka azonban szubsztrátok jelenlétében megnőtt, jelezvén a kovalensen kötött donor és akceptor jelölők közötti távolság csökkenését, összhangban a kisebbik domén csuklószérű ill. csúszo elmozdulásával.

A SAXS és a FRET méréseken kívül más típusú kísérletek is végezhetők a fehérjék oldatában annak érdekében, hogy a doménzáródás természetét felderítsük. Például a fehérjék mikrokalorimetriás hőátmenetét vizsgálva gyakran előfordul, hogy az egymással gyenge kölcsönhatásban álló domének (pl. nyitott doménkonformáció esetén) egymástól jól elkülönülő hőátmenetet adnak. Az ilyen típusú fehérjéknél várható, hogy a zárt konformáció kialakulásakor, amely a domének együttműködését igényli, a független átmenetek egybeolvadnak az egész molekulára jellemző, sokkal kooperatívabb átmenetűvé. A két doménből felépülő hexokináz A érdekes példát szolgáltatott az ilyen kalorimetriás kísérletre [36]. Nevezetesen, hogy pH-tól függően változott a kalorimetriás olvadási görbék profilja: savas pH-n egyetlen, látszólag kooperatív hőátmenetet kaptak, míg alkalikus pH-n két független hőátmenet volt megfigyelhető. Az eredményeket az ismert kristályszerkezetek alapján értelmezve Kumar és m. társai arra következtettek, hogy az aktív centrumban elhelyezkedő hét darab savas oldallánc taszítása szabályozhatja a doménzáródást, azaz ezen oldalláncok lehetnek felelősek a zárt szerkezet kinyílásáért. Lényegében ez történik lúgos közegben, amikor a savas oldalláncok disszociálnak és negatívan töltötté válnak. A negatívan töltött oldalláncok taszítása stabilizálja a nyitott szerkezetet, melynél, ahogy várható, a domének független hőátmenete figyelhető meg. A szubsztrát glükóz kötődését kísérő konformáció-változás során a savas oldalláncok bázikus oldalláncokkal lépnek kapcsolatba, így megszűnik a savas oldalláncok közötti taszítás és ezáltal az a hatás is, ami a nyitott szerkezetet stabilizálta; ekkor záródnak a domének. Hasonló hatása van az alacsony pH-nak is, amikor a savas oldalláncok protonálódása következtében a közöttük lévő taszítás megszűnik.

2.2.5.3. *Mutációs és enzimkinetikai analízis*

A xilulóz kináznál az oldott enzim katalizálta reakció kinetikai analízisével egészítették ki a doménmozgásokra utaló kristályszerkezeti adatokat és megállapították, hogy a két szubsztrát (cukor és MgATP) kötődése a reaktív terner komplexben erős szinergizmust mutat. A MgATP enzimhez való kötődési módját modellezéssel meghatározva a doménzáródás és a szubsztrát-szinergizmus között párhuzamot véltek felfedezni [37].

A feltételezhető csukló régióban lévő oldalláncok helyspecifikus mutációval történő cseréje és a módosított fehérje funkcionális és szerkezeti vizsgálata már valamivel közelebb vihet a doménmozgások kérdésének megoldásához. Ilyen típusú, komplexebb analízisekre jelenleg még csak kevés példa akad. A 3-foszfoglicerát dehidrogenáznak kristályszerkezet alapján valószínűsített csukló régiójában a két szekvenciálisan szomszédos Gly-Gly oldalláncok egyikét vagy mindkettőt Val-ra cserélték ki és meghatározták kristályszerkezetüket L-szerin inhibitor jelenlétében, melynek gátlóhatása kifejtéséhez doménzáródás szükséges [38]. A szerkezetek azt mutatták, hogy a mutások esetén a tetramer enzim alegységeinek elfordulása nagymértékben korlátozódott a vad típusú enzimhez képest, miközben a szerinrel szembeni érzékenység csökkent, holott a mutációk a szerinkötőhely szerkezetét nem befolyásolták. Ez a munka tehát igazolta a feltételezett csukló régió helyét, bár a molekuláris csukló működésére ezekből az adatokból még nem derült fény.

Egy bakteriális fotoreceptor fehérje esetén, ahol két glicin (Gly47 és Gly51) szerepe látszott fontosnak a doménzáródásban, ezek szerin-mutánsait (mind egyszeres, mind kettős mutánsokat) állították elő [39]. A mutánsok kristályszerkezet-meghatározása mellett vizsgálták a fotociklus sebességére gyakorolt hatásukat is. Az adatok összhangban voltak a glicinek feltételezett konformációs szerepével, pl. a kettős mutáció additív hatást eredményezett.

A miozin motor-domén szerkezetváltozásai és az ATP-kötő domén, ill. az ATP-hidrolízis kapcsolatát szintén mutációs kísérletekkel vizsgálták [40]. Itt két hélix érintkezési felületén kialakuló kölcsönhatás (F482 és G680) szerepét támasztották alá a mutációt követő kinetikai és fluorimetriás (FRET) kísérletek.

A fenilalanin hidroxiláz enzim esetén többféle egyszeres mutációkat hajtottak végre a feltételezett csukló régióban [41]. Erős korrelációt figyeltek meg a mutánsok enzimaktivitásra és az enzim globális konformációs átmenetére (felületi plazmon rezonancia és fehérje-fluoreszcencia) kifejtett hatása között.

Az irodalomban eddig csak egyetlen olyan példa lelhető fel, ahol egy kétszubsztrátos enzim, a poliadenilil polimeráz (PAP) termer komplexének (5-mer oligo-adenilil-RNS és MgATP szubsztrátok) kristályszerkezet-meghatározását összekapcsolták olyan kiterjedt enzimkinetikai analízissel, melyből szubsztrátkötődés és a kémiai átalakulás termodinamikai (energetikai) paramétereit is megállapították, mind a vad típusú enzim esetén, mind pedig a csukló régióban módosított mutáns enzimeknél [42]. Megállapították, hogy a mutációk a szubsztrátok K_m értékeit nagymértékben megnövelték, de sem az egyes szubsztrátok kötődési állandóira (K_d), sem pedig a maximális aktivitásra (k_{kat}) nem volt lényeges hatásuk. Ez energetikailag azt jelenti, hogy mindkét szubsztrát jelenlétében bekövetkező konformációs záródás egy magasabb (labilisabb) energiaszint szerinti állapotnak felel meg, ami ésszerűen a K_m értékek növekedésében nyilvánult meg és ezáltal csökkent a katalitikus hatékonyság. A mutáció azonban elvileg okozhat olyan változást is az enzimreakció energetikájában, hogy a nyitott konformációs állapotot stabilizálja egy a zárthoz képest alacsonyabb energiaszinten. Ekkor a szubsztrát K_m értéke nem változik, de a k_{kat} érték jelentősen csökken a mutáns enzim esetén. A PAP enzim mutánsainál ezt a jelenséget nem észlelték, de a vad típusú enzim esetén alternatív szubsztrátokat alkalmazva éppen ez az eset állt elő. Az általam vizsgált PGK mutánsok egyike erre az extrém esetre szolgáltatott példát (ld. 30.b ábra).

Az irodalomban vannak még más jellegű kísérletes példák is, melyek a domén-, vagy hurok-mozgások néhány részletkérdésére is választ tudtak adni. Így például a Yersinia fehérje tirozin foszfatáz enzim (PTP) esetén az aktív centrum bejáratát záró hurok mozgásának időfüggését sikerült regisztrálni lézer indukálta hőugrás módszerével (T-jump), a hurokban található egyetlen Trp oldallánc fluoreszcencia-változását követve [9]. A szerzők a szubsztrát egy kompetitív inhibitorával mint analógiával indukálták a mozgást és bebizonyították, hogy a szubsztrát kötődése és a loop-régió mozgása szorosan összekapcsolt folyamatok, és a mozgás szubmilliszekundumos időskálán megy végbe. A relaxációs kinetikai mérésekből meghatározták mind a hurokzáródás és kinyílás sebességi állandóját, mind pedig a konformációs egyensúlyi állandót. Megállapították azt is, hogy a hurok dinamikus mozgása sokkal gyorsabb, mint az enzimreakció, tehát nem limitálja annak sebességét.

A fentebb már említett AK esetén viszont sikerült megállapítani (^{15}N -NMR relaxációs spektroszkópiai mérésekkel), hogy a doménkinyílás elsődleges sebességi állandója azonos az enzimreakció katalitikus ciklusáéval [43]. Tehát a domén kinyílása, ami lehetővé

teszi a termék ADP távozását az aktív centrumból, az enzimreakció sebességét meghatározó lépés.

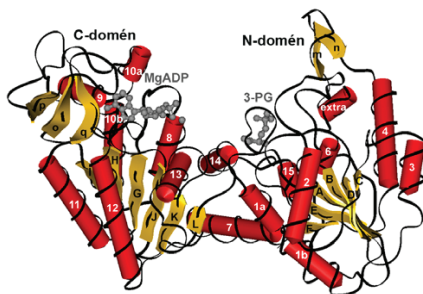
2.2.5.4. Számítógépes modellezés

A fenti néhány specifikusabb vizsgálat a doménmozgások dinamikájának jellemzésére komplex kísérleti módszerek együttes alkalmazását igényli, amire még kevés példa található az irodalomban. A kísérletes módszerek alkalmazását ezért sok esetben számítógépes modellezéssel egészítik ki. Ezek általában csak közelítésnek tekinthetők (pl. az ún. normál mód analízis elhanyagolja az oldószerszert, vö. [44, 45]), nem helyettesítik a kísérletes vizsgálatot, de annak fontos kiegészítői lehetnek. Ilyen, ún. molekuladinamikai szimulációval mutatták ki Balog és mti. az általam vizsgált PGK enzimnél, hogy nanoszekundumos időskálán is már bekövetkezhet a domének bizonyos mértékű záródása [46]. Számos esetben, amikor legalább két extrém konformáció áll rendelkezésre (pl. krisztallográfiai kísérletekből) ilyen analízissel határozzák meg, hogy milyen konformációs útvonalon következhet be ezek egymásba történő átalakulása. Ilyen szimulációkat közöltek pl. az acetil-kolineszteráznál [47], a glukokináznál [48], egy membrán-metallo-proteáznál [49], alkohol-dehidrogenáznál [50], továbbá az adenilát kináz és a citrát szintáz már fent tárgyalt összehasonlításakor [20].

2.3. *PGK mint a doménzáródási mechanizmus felderítéséhez modellként szolgáló enzim*

A PGK mint tipikus, két doménből felépülő kináz enzim (4. ábra) már vizsgálataim kezdetén a doménmozgások klasszikus példájának számított. Amint az alábbi irodalmi áttekintésben bemutatom, hosszú története van annak, hogy a kb. 3 évtizeddel ezelőtt meghatározott első nagyfelbontású szerkezet kapcsán felállított ún. „hinge-bending” hipotézis (azaz a domének csuklók körüli elfordulásának hipotézise) (ld. 2.2.2. fejezet) bizonyítást nyert. Ez azonban még nem jelentette azt, hogy értjük is, mi a doménmozgások mozgatórugója, azaz hogyan is működnek a molekuláris csuklók. A molekula kis méreténél és egyszerű szerkezeténél fogva a „hinge-bending” hipotézis tesztelésére és mechanizmusának részletesebb vizsgálatára alkalmas objektumnak ígérkezett.

A fenti irodalmi áttekintés fényében munkám során arra törekedtem, hogy különböző jellegű kísérletes módszerek együttes alkalmazásával minél sokrétűbb információt szerezsek a PGK doménmozgásainak mechanizmusáról.

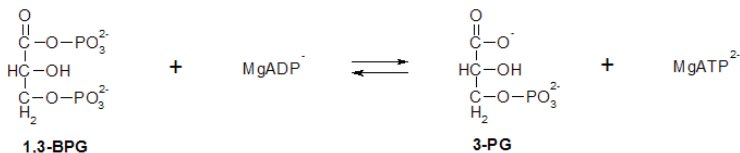


4. ábra A PGK molekula szerkezete

A molekula polipeptidláncát fekete szalagdiagram szemlélteti, az α hélixek (számozva) piros hordókkal, a β redők (betűkkel) sárga lemezekkel, a szubsztrátok szürke golyós modellel láthatók.

2.3.1. A PGK élő szervezetekben betöltött szerepe

Már régóta ismert a PGK legtöbb élő szervezetben betöltött nélkülözhetetlen szerepe. Az aerob szervezetekben a glikolízis során azt az ATP-t előállító lépést katalizálja, melyben 1,3-biszfoszfo-glicerátból (1,3-BPG) és MgADP-ből 3-foszfoglicerát (3-PG) és MgATP keletkezik (1. séma).



1. egyenlet A PGK által katalizált kémiai átalakulás

Nukleotid szubsztrátként csak kétértékű fémionnal, rendszerint Mg^{2+} -mal komplexált formáját képes elfogadni akár az ATP-nek, akár az ADP-nek, de más nukleotid analógnak is. A nukleotid szubsztrátra nézve kevésbé specifikus, mint a 3-foszfoglicerát (3-PG) szubsztrátot tekintve. Az aerob szervezetekben a reakció egyensúlya az ATP univerzális energiatároló vegyület keletkezése irányába van eltolva. Az aerob szervezetek glikolízisén kívül a PGK az anaerob szervezetekben nélkülözhetetlen a fermentációban, szerepet játszik a növények fotoszintézisében is, ahol viszont cukor-felépítést katalizál a fotoszintézis sötét szakaszában.

A PGK-nak az utóbbi évtizedekben, az élő szervezetekben betöltött több más funkciója is bizonyítást nyert. Például a PGK más, szintén intracelluláris kinázokhoz képest (nukleozid difoszfát kináz, kreatin kináz, piruvát kináz) sok esetben jobban képes

foszforilálni az L-nukleozid analógokat [51, 52], melyek a természetben előforduló D-nukleozidok tükörképi párjai (sztereoizomerjei). Ez azért figyelemre méltó tulajdonság, mert rák- és vírusellenes terápiákban gyakran különféle D- és L-nukleozid-analógokat alkalmaznak gyógyszerként [53]. Ezen vegyületeket nukleozid-formában kell bejuttatni az élő szervezetbe, hogy a sejtmembránon át tudjanak jutni. A farmakológiailag aktív hatóanyag-formájuk viszont a foszforilált nukleotid-trifoszfát. A foszforilációt az élő szervezet kináz enzimei végzik, több lépésben. A terápiában szintén használatos D-nukleozid analógokhoz [54] hasonlítva az L-analógok kevésbé toxikusak, mert nem gátolják a gazdasejt polimeráz enzimét, viszont hatásosan gátolják a vírus reverz transzkriptázát, azáltal, hogy az beépíti az analógot a DNS-be, ami eltérő szerkezeténél fogva meggátolja a lánc továbbépülését [53]. A nukleozid-difoszfátokból trifoszfátok képződése a foszforilációs folyamat „legszűkebb keresztmetszete”, ugyanis sok esetben kimutatták a farmakológiailag hatástalan mono-, vagy difoszfátok sejten belüli felhalmozódását [55]. A PGK tehát fontos szerepet tölthet be a vírusellenes gyógyszer-molekulák aktiválásában. Több gyógyszerjelölt molekula jelenleg is a klinikai kipróbálás fázisában van [56], míg mások már a gyógyászatban is használatosak pl. az antivirális [51, 53] és hepatitis B terápiákban [56, 57].

Az L-ADP mint analóg vegyület PGK-val való kölcsönhatását kutatócsoportunk is vizsgálta és megállapítottuk, hogy természetes párjához a D-ADP-hez hasonlóan jó szubsztrátja az enzimnek. Továbbá Mg-L-ADP és 1,3-BPG szubsztrátokat tartalmazó terner enzim-szubsztrát komplexben megtörténik a doménzáródás is, ahogy azt kisszögű röntgenszórás (SAXS) méréseink bizonyították [58].

A rákellenes terápiákat tekintve tehát az L-nukleozidok foszforilálásában már bizonyítottan látszik a PGK szerepe. A PGK és a tumorok kapcsolatáról azonban más megállapítások is születtek. Hogg és mti. közölték, hogy a PGK (sok más fehérje mellett) a tumor angiogenezisének gátlásában is szerepet játszhat. A PGK a plazmint redukálva angiosztatint hoz létre, mely a tumorok angiogenezisét, azaz érképződését gátolja [59]. Feltételezhető volt, hogy a redukációs aktivitásért a PGK aktív centruma közelében elhelyezkedő két reaktív ciszteinil oldallánc a felelős. Azonban, meglepő módon Lay és mti azt tapasztalták, hogy a plazminnak hPGK általi redukciója független a hPGK-ban lévő Cys oldalláncoktól, amit a Cys-ek Ala-ra való módszeres kicserélésével kapott mutánsok segítségével állapítottak meg [60]. A mechanizmust a doménzáródás során létrejövő konformáció változással próbálták leírni [61], de kémiaiilag adekvát magyarázat mindmáig nincs a folyamatra.

Emlős sejtekben kimutatták azt is, hogy a PGK befolyással van DNS szintézis és javítási mechanizmusokra [62, 63], valamint szerepet játszik kationok (Na^+ [64] és Ca^{2+} [65]) transzportjában. Feltételezhetően - más glikolitikus enzimekkel együtt - kapcsolatban áll a szarkoplazmatikus retikulummal, így szolgáltat ATP-t a pumpa működéséhez. Ezzel kapcsolatos szerepe az emberi hemolitikus anémia betegségben [66, 67], melyben a vörösvérsejtek károsodnak, súlyos esetben kipukkadnak. A betegség hátterében az X kromoszómán bekövetkező mutáció áll, mely a PGK funkcionális károsodása révén ATP hiányt okoz, ami a K-Na pumpa működését gátolja, melynek következtében a sejtmembrán két oldala közti Na^+ - és K^+ -gradiens eltűnhet.

A PGK fontos élettani szerepének megértéséhez nélkülözhetetlen az enzimműködés mechanizmusának pontosabb megismerése.

2.3.2. A PGK röntgenkristallográfias szerkezete

2.3.2.1. A szubsztrátmentes enzim szerkezete és a „hinge-bending” hipotézis

A lóizom PGK aminosav-szekvenciáját és térszerkezetét szubsztrátok távollétében már 1979-ben meghatározták Blake és mti. [68]. Azóta többféle, különböző forrásból származó PGK enzimek kristályszerkezete is ismertté vált. Ezeket foglalja össze az 1. táblázat. A Függelékben pedig a különböző eredetű PGK molekulák összerendezett aminosavsorrendje van bemutatva.

A lóizom enzimet vizsgálva megállapították, hogy az egyetlen polipeptidláncból felépülő, kb. 44500 Da molekulatömegű PGK molekula két szerkezeti doménből épül fel. A fehérjemolekula mindkét doménje igen jól rendezett, globuláris szerkezetű. A kristályszerkezet egyértelműen az enzim nyitott konformációját mutatta. Ekkor még a szubsztrátkötőhelyeket és azok szerkezetét nem ismerték. A nukleotid-szubsztrát ADP-t ill. ATP-t azonban már ekkor sikerült a kristályba diffundáltatni és kötőhelyét a C-terminális doménon azonosítani. Ugyanez a 3-PG szubsztrát esetén nem volt lehetséges, mert a kristály komoly fizikai változásokat szenvedett. Az N-terminális domén belső oldalán elhelyezkedő bázikus oldalláncok sokasága azonban azt valószínűsítette, hogy a 3-PG kötőhelye itt található. Ebből született az ún. „hinge-bending” hipotézis. Ugyanis a 3-PG feltételezhető kötőhelye olyan távol (kb. 10 Å-nyi távolságra) helyezkedett el a másik doménon lévő nukleotid kötőhelytől, hogy a két kötött szubsztrát között kémiai reakció végbemenetele csak úgy volt elképzelhető, ha a két domén közelebb fordul egymáshoz, azaz záródik. Blake és

mti. ezért feltételezték, hogy a mindkét szubsztrátot kötő enzim molekula zárt konformációt vesz fel a katalízishez. A zárt konformáció létezésének kristallográfiás bizonyítása azonban még kb. 20 évet váratott magára, amikor két különböző forrásból származó PGK esetén sikerült kristályos terner komplexet előállítani (ld. 2.3.2.4. fejezet).

1. táblázat A PGK ismert röntgendiffrakciós szerkezetei

| Komplex típusa | Szubsztrát | Szerkezet | Felbontás (Å) | PDB kód | Hivatkozás | Forrás |
|----------------|----------------|-----------|---------------|---------|------------|--------------------|
| Apo | — | nyitott | 2,5 | — | [68] | <i>lőizom</i> |
| | — | nyitott | 2,5 | 3PGK | [69] | <i>élesztő</i> |
| | — | nyitott | 2,5 | — | [70] | <i>sertésizom</i> |
| Biner | MgADP | nyitott | 1,65 | 1PHP | [71] | <i>B. stearo</i> |
| | MgATP | nyitott | 2,1 | 1VJC | [72] | <i>sertésizom</i> |
| | ATP | nyitott | 1,9 | 1VJD | [72] | <i>sertésizom</i> |
| | 3-PG | nyitott | 2,0 | — | [73] | <i>sertésizom</i> |
| Terner | 3-PG*MgAMP-PNP | zárt | 2,0 | 1VPE | [74] | <i>T. maritima</i> |
| | 3-PG*MgADP | zárt | 2,5 | 13PK | [75] | <i>T. brucei</i> |
| | 3-PG*MgADP | nyitott | 1,8 | 1HDI | [76] | <i>sertésizom</i> |
| | 3-PG*MgAMP-PNP | nyitott | 2,0 | — | [77] | <i>sertésizom</i> |
| | 3-PG*MgAMP-PCP | nyitott | 2,5 | 1KF0 | [70] | <i>sertésizom</i> |

Az oldott enzim esetén azonban már az első szerkezet-meghatározással egyidőben sikerült SAXS mérésekkel bizonyítani, hogy mindkét szubsztrát jelenlétében (3-PG és MgATP) a PGK nagyarányú konformációs változáson megy keresztül [78]. SAXS mérések oldat fázisú makromolekulák girációs sugaráról (R_g) adnak információt, azaz a molekula kiterjedését, alakját jellemzik. Mindkét szubsztrát jelenlétében kb. 1 Å girációs sugár csökkenést tapasztaltak a szubsztrátmentes enzimre jellemző R_g értékhez képest. Ha csak egyik vagy másik szubsztrátot adták az enzimhez, akkor nem volt egyértelműen eldönthető, hogy csökkent-e a girációs sugár [78-80]. Míg Pickover és mti a biner komplexek esetén nem kaptak mérhető változást az enzim girációs sugarában a szubsztrátmentes enzimhez képest, addig Henderson szerint a nukleotid szubsztrát nem reaktív analógja, a CrATP, az enzimmel alkotott biner komplexében a terner komplexben megfigyelhető hasonló mértékű csökkenést okoz a PGK girációs sugarában. A mindkét szubsztrát jelenlétében bizonyosan bekövetkező girációs sugár csökkenés legegyszerűbb magyarázata, hogy szubsztrátok hatására a domének között elhelyezkedő nagy árok záródik. SAXS mérésekkel a hexokináz (HK) enzim esetén is hasonló eredményre jutottak. Tehát, a ligandum-indukálta

konformációs változás természete és a csukló mozgás nagysága hasonló lehet a PGK és HK esetén. A két domén egymáshoz közelebb kerülése egybevág azzal az elképzeléssel, hogy a MgATP az egyik, a 3-PG pedig a másik doménon kötődik.

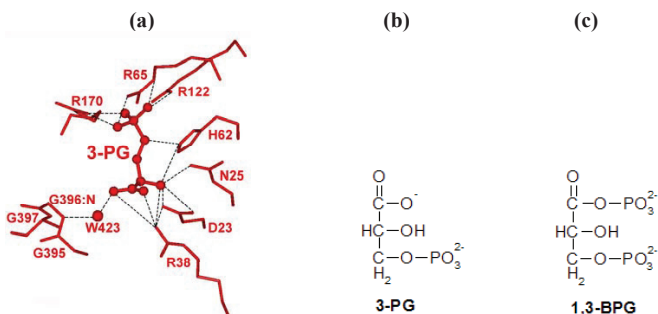
A doménzáródás és az enzimműködés közötti szoros összefüggésre szintén oldatkísérletek, mégpedig további SAXS mérések szolgáltatnak döntő bizonyítékot. 1989-ben Sinev és mti. a sertésizom PGK aktív és inaktív kémiaiailag módosított származékait vizsgálták [81]. SAXS mérésekkel bizonyították, hogy az aktív, módosítatlan PGK esetében 0,1 nm (azaz 1 Å) csökkenés tapasztalható a girációs sugárban mindkét szubsztrát jelenlétében, a szubsztrátmentes enzimhez viszonyítva. Ugyanezt a csökkenést tapasztalták a két felszíni SH-csoporton metilált, de teljesen aktív PGK származékánál is. Viszont ha a felszíni SH-csoportokra egy valamivel nagyobb méretű karboxamido-metil csoportot vittek be, akkor a kinetikai mérések alapján az enzim inaktívvá vált, de a szubsztrátokat továbbra is képes volt megkötni. Ezen karbox-amidometilezett enzim holo formájának a girációs sugara azonban nem különbözik az apo-forma girációs sugarától. Ebből tehát az következik, hogy a karbox-amidometilezett enzim esetén nem történik meg a doménzáródás. Tehát bebizonyosodott, hogy a doménzáródás csupán az aktív, működő enzim tulajdonsága. A karboxi-amidometilezés következtében tapasztalt aktivitásvesztés pedig éppen annak tulajdonítható, hogy az interdomén régióba beépített karboxamidometil-csoport, fizikailag gátolja a doménzáródást. Ugyanakkor a kisebb méretű metil-csoport nem akadályozza a doménmozgást.

2.3.2.2. A 3-PG kötőhely szerkezete

A PGK és 3-PG szubsztrát biner komplex krisztallográfias szerkezet meghatározása nagyon sokáig váratott magára, ugyanis a kristályosításhoz rendszerint használt sóoldatok anionjai (szulfát, foszfát) megakadályozták a szintén anionos jellegű 3-PG kötődését. Alacsony ionerősségnél, pl. PEG jelenlétében viszont a PGK nehezen volt kristályosítható. Végül 1992-ben közzölték a sertésizom PGK 3-PG-t kötő biner komplexének szerkezetét [73]. A 3-PG fehérje-oldalláncokkal való kölcsönhatásainak részleteit az 5. ábra mutatja.

A 3-PG az N-terminális doménon kötődött, jó egyezésben a korábbi feltételezéssel [68]. A szubsztrát negatívan töltött 3-foszfát csoportja és a pozitívan töltött arginin oldalláncok (Arg65, Arg122 és Arg170) között elektrosztatikus kölcsönhatások alakulnak ki. Az Arg65 esetén az oldallánc orientációja nem egészen optimális a kölcsönhatás kialakulásához. Mint később kiderült az Arg65-nek nemcsak a 3-PG kötésében, hanem az

enzim zárt konformációjának stabilizálásában is szerepe van a másik doménben lévő Asp218-val történő sókötés kialakításával. A 3-foszfat csoport észterkötésének oxigén atomja a His62-vel lép kontaktusba. A szubsztrát 2-hidroxil csoportja, amely a szubsztrát sztereospecifitására felelős (D-enantiomer), viszont az Asp23 és Asn25 oldalláncokkal alakít ki H-hid kölcsönhatást. A karboxil csoport pedig egy vízmolekula közvetítésével a 14-es hélix pozitív töltésű N-terminálisához (Gly394, Gly395, Gly396) kötődik. Figyelemreméltó még, hogy az Arg38 oldallánc ionos kölcsönhatásban van a 3-PG enzimreakcióban résztvevő karboxil-csoportjával.



5. ábra A 3-PG szubsztrát kötődése és a szubsztrátok (3-PG, 1,3-BPG) szerkezeti képletei

Az (a) ábrán a 3-PG golyó-pálcika modellel látható, a szubsztrát kölcsönhatásait a fehérje oldalláncokkal szaggatott vonalak szemléltetik. A (b) ábra a 3-PG, a (c) pedig az 1,3-BPG szerkezeti képletét mutatja.

A kötőhely részleteit is megmutató krisztallográfiás adatok megjelenését megelőzően és vele egyidőben is végeztek mutációs kísérleteket a 3-PG feltételezett kötőhelyén elhelyezkedő oldalláncokkal. Ezek a kísérletek, melyeket élesztő (*Yt*) PGK-val végeztek, szintén valószínűsítették az *Yt*Arg65/Arg65, *Yt*Arg121/Arg122 és *Yt*Arg168/Arg170 szerepét a 3-PG kötésében [82, 83]. A *Yt*His62/His62 konzervatív oldallánc Ala-ra történt mutációja pedig megmutatta, hogy a His62-nek alapvető szerepe van a 3-PG kötésében [82, 84]. Az *Yt*Arg65/Arg65 szerepét külön is vizsgálták R65Q mutáns esetén. A mutáns 3-PG-re vonatkozó K_d -je a vad típuséhoz képest hatszorosára növekedett, utalva az oldallánc szubsztrátkötésben betöltött szerepére [83, 85].

A *Yt*Arg38Arg38 oldallánc Ala-ra történt mutációja, a fenti mutációkkal ellentétben, nemcsak a 3-PG kötés gyengüléséhez vezetett, hanem az enzimaktivitás dramatikus elvesztését is okozta. Ezért már akkor feltételezték, hogy ezen oldalláncnak a katalízis kémiai részében, azaz a foszfo-transzferben közvetlen szerepe lehet [85]. Ezt a szerepet a későbbi kristályszerkezetekből nyert információk (ld. 2.3.2.4. fejezet) is alátámasztották.

A 3-PG-t kötő biner komplex kristályszerkezete nemcsak a 3-PG kötődési módját mutatta meg, hanem a 3-PG szubsztrát kötődését kísérő konformáció-változásokról is képet adott. A szubsztrátmentes lóizom enzim kristályában tapasztalt konformációhoz képest egy kb. 7,7°-os elfordulást lehetett megfigyelni a domének relatív pozíciójában, ami részleges doménzáródásnak felel meg, tehát a „hinge-bending” hipotézis mellett szól. Ez a csukló mozgás a szerkezetben kötött 3-PG-t valamivel közelebb viszi az ATP kötőhelyhez, de a reaktív csoportok még mindig túl távol vannak egymástól a katalízis lejátszódásához. A globális szerkezetváltozáson kívül a 3-PG hatására a PGK molekula különböző részein lokálisan bekövetkező változások is megfigyelhetők voltak a szubsztrátmentes enzim szerkezetéhez képest. Így pl. az interdomén régióban elhelyezkedő $\alpha 13$ hélix (ld. 4. ábra) határozott rendeződése, továbbá az $\alpha 5$ és $\alpha 14$ hélixek elmozdulása (nincs bemutatva) következett be. A kristályszerkezet megjelenésekor még csak sejteni lehetett, ezen hélixek 3-PG okozta rendeződésének ill. elmozdulásának szerepét a doménzáródás mechanizmusában.

A 3-PG-vel szemben az 1,3-BPG kötődési módját hagyományos krisztallográfiával nem lehet meghatározni, mivel az 1,3-BPG rendkívül bomlékony vegyület (az 1-es foszfátja vizes oldatban gyorsan hidrolizál, felezési ideje 10 °C-on, pH=7,5-n kb. 6 óra [86]). Az 1,3-BPG kötődésére vonatkozóan mégis sikerült információhoz jutni a később meghatározott zárt konformációjú kristályszerkezetek analizálásával ill. modellezéssel (ld. 2.3.2.4. fejezet).

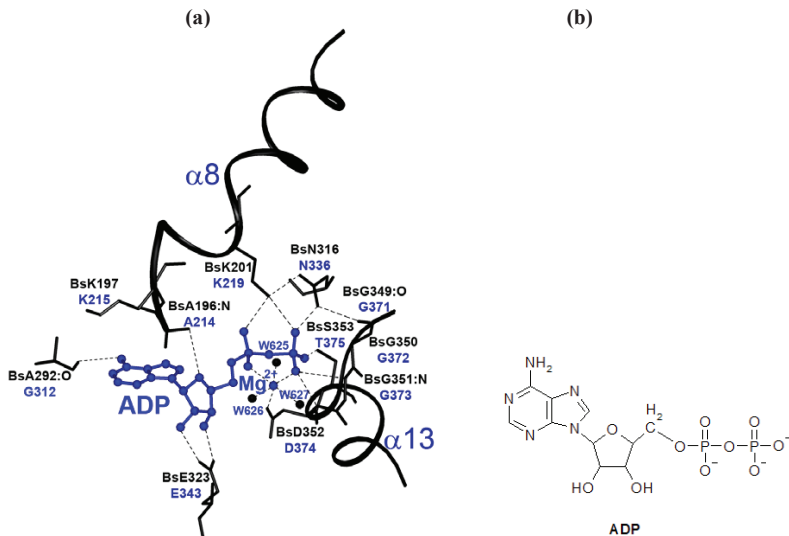
2.3.2.3. A nukleotid kötőhely szerkezete

2.3.2.3.1. A nukleotid szubsztrátok kötődési módja

A nukleotid szubsztrátok kötődési módjáról már a lóizom PGK kristályszerkezet meghatározásakor nyertek információt, amikor az apoenzim kristályába sikerrel diffundáltatták be a MgADP-t ill. MgATP-t. Lényegében ezt erősítették meg a későbbi nagyfelbontású szerkezetek is.

A MgADP-vel alkotott biner komplex szerkezetét a *Bacillus stearothermophilus* (Bs) PGK esetén határozták meg, rendkívül jó, 1,65 Å-ös felbontásban [71] (6. ábra). Ebben a komplexben a domének relatív pozíciója nyitott maradt, hasonlóan a szubsztrátmentes PGK kristályszerkezetben megfigyeltékhez. A szerkezetben kötött szubsztrát MgADP adenin gyűrűje a C-terminális doménon egy hidrofób zsebben található. Az adenin gyűrűn lévő NH₂ csoport H-hídkötést alakít ki a BsAla292/Gly312 peptid O-jével. A ribóz gyűrű a konzervatív BsPro318/Pro338 oldallánc pirrolidin gyűrűje által kialakított sekély zsebben

helyezkedik el. Mind a 2', mind pedig a 3'-OH csoport H-híd kötést formál a *BsGlu323/Glu343* karboxil-csoportjának két O-atomjával. A Mg-ion tetragonálisan torzított oktahedrális koordinációt mutat: az ADP α -, és β -foszfátjainak egy-egy O-atomjával, továbbá a fehérje *BsAsp352/Asp374* oldallánc karboxil-csoportjával, valamint három vízmolekulával alakít ki kölcsönhatásokat. A MgADP foszfát csoportjainak jellegzetes kölcsönhatásai a következők: az α -foszfát a *BsLys201/Lys219* oldallánccal, míg a β -foszfát az *BsAsn316/Asn336*-tal és a *BsSer353/Thr375* hidroxil-csoportjával alakít ki ionos kölcsönhatást ill. H-hídkötéseket. A negatívan töltött β -foszfát helyzetét tovább stabilizálják az α 13 hélix részlegesen pozitívan töltött N-terminális végével kialakított elektrosztatikus kölcsönhatások, továbbá ugyanezen hélix peptidgerinc (*BsGly349/Gly371*, *BsGly350/Gly372*, *BsGly351/Gly373*) atomjaival létrejött H-híd kötések.



6. ábra A MgADP szubsztrát kötődése és az ADP szerkezeti képlete

Az (a) ábrán a *B. stearothermophilus* PGK szerkezetében golyó-pálcika modell mutatja a MgADP-t, a hélixek szalagokként láthatók. A Mg^{2+} -mal kölcsönható vízmolekulákat fekete golyók jelölik. A szubsztráttal kölcsönható oldalláncok jelét és számát feketével, a humán szekvenciában lévő párjukat kézzel adtam meg. A kölcsönhatásokat szaggatott vonalak ábrázolják. A (b) ábrán az ADP szerkezeti képlete látható.

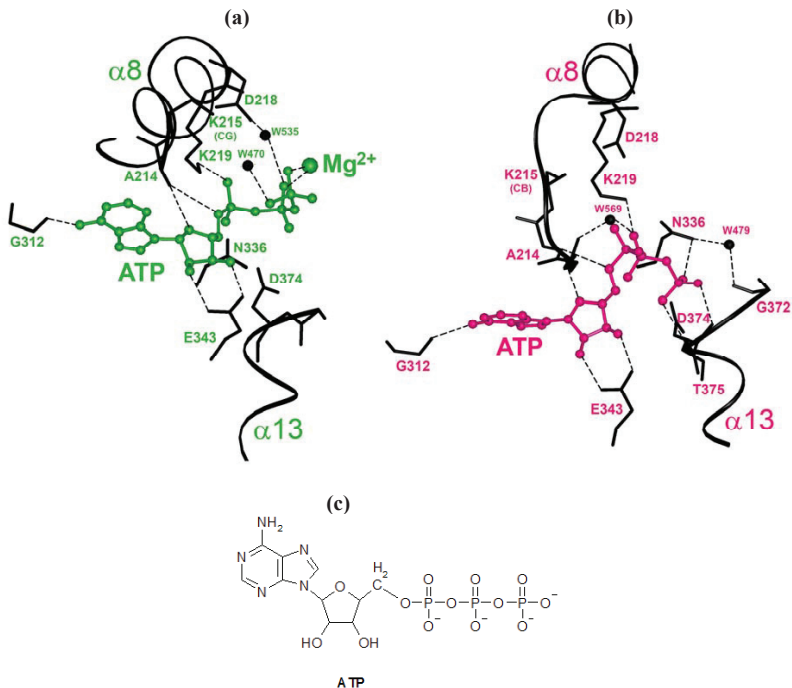
A másik nukleotid szubsztráttal, a MgATP-vel, valamint Mg^{2+} -mentes ATP-vel is rendelkezésre áll ma már a biner komplex kristályszerkezete sertésizom PGK esetén (7. ábra) [72]. Az enzim molekula globális konformációja ezekben a szerkezetekben is nyitott, azaz a nukleotid szubsztrátok kötődése látszólag nem befolyásolta a két domén

relatív helyzetét. Mind az ATP, mind a MgATP, hasonlóan a MgADP-hez, a C-terminális domén ismert adenzinokötő zsebében kötődik, viszont a foszfátlánc iránya és geometriája különbözik, nemcsak egymástól, de a többi ismert nukleotidot kötő szerkezetben megfigyelttől is.

MgATP esetén (7.a ábra), eltérően a MgADP-től, a foszfátlánc nem a 13-as, hanem a 8-as hélixhez kerül közel, bár közvetlen kölcsönhatást nem alakít ki vele, hanem a β -foszfát O-atomja egy vízmolekulán keresztül kötődik a α 8 hélixben lévő Asp218 oldallánchoz. A γ -foszfát egyik O-atomja szintén egy vízmolekulával formál H-hídkötést. Az α -foszfátnak a Lys219-es oldallánccal való kapcsolata viszont azonos a MgADP-t kötő szerkezetben megfigyelttel. A Mg^{2+} koordinációja pedig ismét lényeges eltérést mutat a MgADP-t kötő biner komplexhez képest: a γ - és a β -foszfátok O-atomjaival alakít ki kapcsolatot, viszont semmiféle kölcsönhatásban nincs a fehérjemolekulával.

Mg^{2+} távollétében az ATP foszfátlánca a 13-as hélix felé fordul (hasonlóan a MgADP-hez) és a γ -foszfát O-atomjai ezen hélix aminosavmaradékainak, Asp374, Thr375 ill. (vízmolekulán keresztül) a Gly372 főláncbeli N atomjaival alakítanak ki H-hídkötéseket (7.b ábra). Emellett a hélix N-terminálisával létrejövő ionos kölcsönhatások is stabilizálják a kapcsolatot. Továbbá, nem a β -foszfát létesít koordinációt az Asn336 oldallánccal, ellentétben a PGK összes ismert nukleotidkötő szerkezetével (ld. alább), hanem a γ -foszfát. Hasonlóan, nem az α -foszfát, hanem a β -foszfát alakít ki kapcsolatot a Lys219 oldallánccal. Mg^{2+} távollétében tehát az ATP szubsztrátszerű kötődése valószínűleg nem tud kialakulni.

Mindkét szerkezet további érdekessége, hogy az α 8 hélixbeli konzervatív Lys215-ös oldallánc környezetében igen alacsony elektronsűrűséget lehetett csak kimutatni, ami ezen oldallánc mozgékonyágára utal. Mivel konzervatív oldallánccról van szó, mozgékonyága igen figyelemreméltó, és az oldallánc szerepének további vizsgálatát indokolta. Már szakdolgozati témám is ezen kérdés vizsgálatához kapcsolódott. Ennek során részt vettem a K215A mutáns hPGK kifejezésében, tisztításában és enzimológiai jellemzésében. A Lys215 módosítása az enzimaktivitás nagymértékű csökkenését és a MgATP-re vonatkozó K_m értékének jelentős növekedését eredményezte [87] (ld. 11. táblázat). Ezen adatok egyértelműen alátámasztották a Lys215 részvételét a Michaelis enzim-szubsztrát komplex kialakulásában, amit a zárt konformációjú kristályszerkezetek is már megjósoltak (ld. 2.3.2.4. fejezet).



7. ábra A MgATP és az ATP kötődési módja a sertésizom PGK szerkezetben

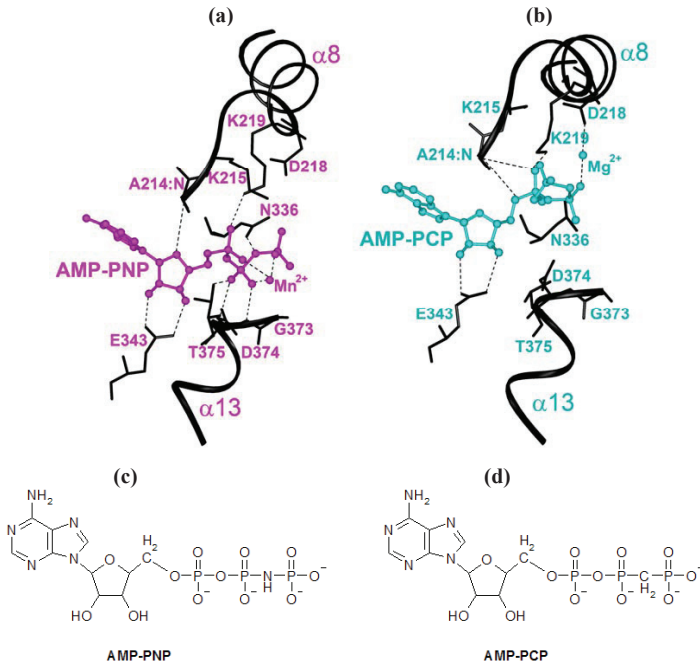
Az (a) ábrán a MgATP (zöld), a (b) ábrán pedig az ATP (rózsaszín) kötődése látható golyó-pálcika modellekkel. Mindkét ábrán fekete gömbök szimbolizálják a vízmolekulákat, szaggatott vonalak mutatják a szubsztrát kapcsolatait a fehérje-oldalláncokkal. A (c) ábrán pedig az ATP szerkezeti képlete látható.

A MgADP és MgATP kötődési módját összevetve, a foszfátlánc eltérő pozíciójával összhangban van az az érdekes krisztallográfiai megfigyelés, hogy a MgATP foszfátláncának *B*-faktor értéke lényegesen magasabb ($62,8 \text{ \AA}^2$), mint a MgADP foszfátláncáé ($16,7 \text{ \AA}^2$). Ez azt jelenti, hogy az enzimen kötött MgATP foszfátlánca a kötés ellenére flexibilis, míg a kötött MgADP foszfátlánca jól meghatározott módon rögzítve van. Arra vonatkozóan, hogy a foszfátlánc flexibilitásának van-e és milyen szerepe a katalízisben, már munkám kezdetén felállítottunk egy hipotézist. Mivel a K215A mutáns a MgATP szubsztrátot már a biner komplexben is csak nagyon gyengén kötötte, ezért feltételeztük, hogy a kötött MgATP foszfátlánca, flexibilitása révén nemcsak kapcsolatba kerül az $\alpha 8$ hélixben lévő Lys215 oldalláncsal, hanem ezen kapcsolat révén az $\alpha 8$ hélixet képes

elmozdítani és közelíteni a $\alpha 13$ hélixhez, ezzel elősegítve az aktív centrum geometriájának kialakulását a doménzáródás során [87].

2.3.2.3.2. Nukleotid analógok (AMP-PNP és AMP-PCP) kötődési módja

Szerkezetvizsgálati célokra gyakran alkalmazzák az ATP nem-reaktív szerkezeti analógjait (8. ábra), ugyanis a krisztallográfias munkához stabil szerkezetű fehérje-ligandum komplexekre van szükség, melyekben a szubsztrátok kötődési módja hasonló a valódi, működő enzim-szubsztrát komplexekéhez, azonban az enzimreakció nem játszódik le.



8. ábra Az ATP analógok kötődése és szerkezeti képleteik

Az (a) ábra a MnAMP-PNP [77], míg a (b) ábra a MgAMP-PCP kötődési módját mutatja a *Sertésizom* PGK szerkezetében [70]. A hélixeket szalag diagram, az ATP analógokat golyó-pálcika modell ábrázolja, a kölcsönhatásokat pedig fekete szaggatott vonalak mutatják. A (c) és (d) ábrákon az ATP analógok szerkezeti képletei láthatók.

Az AMP-PNP ill. az AMP-PCP szubsztrátanalógok annyiban különböznek az ATP-től, hogy β -, és γ -foszfocsoportot összekötő oxigén atom helyett NH -, ill. CH_2 -csoport található molekulájukban. A helyettesítés izosztérikus, azaz nem változtat jelentősen a

kötésszögeken, sőt a foszfátok disszociációs tulajdonságait sem befolyásolja lényegesen [88].

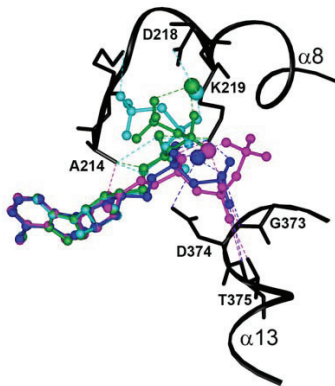
Az első AMP-PNP-t kötő kristályszerkezetet a *sertésizom* PGK esetén közölték, miután sikerült a nukleotid analógot a 3-PG-t kötő biner PGK komplex kristályába diffundáltatni [77]. Az adozin rész, ahogy várható volt, a C-doménen lévő hidrofób zsebbe kötődik, a foszfátlánc viszont meglepő módon, eltérően a MgATP esetén megfigyelt pozíciójától, de hasonlóan a MgADP-jéhez, az α 13 hélix N-terminálisához kapcsolódik (8.a ábra): a β -foszfát H-híd kölcsönhatást alakít ki a Thr375 oldalláncal. A szintén közel lévő Asn336 (β J) pedig a β -, és γ -foszfát közötti imido-csoporttal alakít ki kapcsolatot. Az α -foszfát minden nukleotid ligandumra jellemző kapcsolata a Lys219 láncvégi aminosoportjával szintén megfigyelhető. Különbség a fémion koordinációjában van: az AMP-PNP mindhárom foszfát-csoportja koordinálja az ebbe a szerkezetbe bevitt Mn-iont (ami a Mg-ot helyettesítheti a PGK esetén), de semmilyen fehérjeoldallánc nem vesz részt a koordinációban.

Az AMP-PNP-nek szintén nagyon hasonló kötődési módját állapították meg a *Thermotoga maritima* PGK kristályszerkezetében is, melyet kötött AMP-PNP-t és 3-PG-t tartalmazó terner komplex kristályosításával nyertek [74]. A sertésizom enzimből előállított azonos összetételű terner komplex kristállyal szemben ez a szerkezet zárt konformációs állapotú. (A nyitott és zárt szerkezetek összehasonlítását a 2.3.2.4. fejezetben tárgyalom.)

Az AMP-PCP PGK-hoz való kötődési módját csoportunk határozta meg a *sertésizom* enzim 3-PG-t és AMP-PCP-t kötő terner komplexének kristályosításával és annak röntgen diffrakciós vizsgálatával [70]. Ezen terner szerkezetben, a várakozással ellentétben, az enzim molekula nyitott konformációt vett fel. Valószínűleg a kristályban működő rácserek akadályozták meg a domének záródását [89]. A kristály rigid állapotot jelent, ahol az oldatban kis valószínűséggel előforduló konformáció fixálódhat és a kristályosítás során a konformációs egyensúly e forma felé tolódhat el. Az AMP-PCP kötődési módja viszont feltűnően eltér az AMP-PNP fent leírt kötődési módjától és inkább a MgATP-jéhez hasonlít: a foszfátlánc visszahajlik a C-domén felé, távolodva a 3-PG kötőhelytől (8.b ábra): a β -foszfát a Mg^{2+} -on keresztül az α 8 hélixben lévő Asp218-hoz kapcsolódik, tehát nincs semmilyen kölcsönhatása az α 13 hélixszel. Az AMP-PCP-t kötő kristályszerkezet tehát egy új típusú nukleotid-fémion-fehérje kölcsönhatást mutatott meg a PGK esetén. Bár a γ -foszfát látszólag semmilyen kölcsönhatásban nincs a fehérjével, a Lys215-tel (mely oldalláncnak terminális vége nem jól látható a szerkezetben) mégis valószínűsíthető a kapcsolata. Az α -foszfát azonban a szokásos módon kapcsolódik a Lys219-hez. További érdekessége a

szerkezetnek, hogy bár az adenin ill. a ribóz részekre számított kristallográfias *B*-faktorok értéke alacsony (18,84 ill. 31,1 Å²), a foszfátlánc *B*-faktor értéke magas (63,1 Å²), ami az utóbbi mozgékonyaságára utal, a nukleotid kötőhely teljes betöltöttsége mellett.

A 9. ábra mutatja összehasonlítva a fent ismertetett különböző nukleotidok kötődési módjait. Míg a MgADP és a MgAMP-PNP foszfátlánca a 13-as hélix N-terminálisához kötődik, addig a MgAMP-PCP foszfátlánca a 8-as hélix N-terminálisának aminosavaival alakít ki kölcsönhatásokat. A MgATP viszont nem alakít ki közvetlen kapcsolatot az α8 hélixszel, bár ahhoz közeledik.



9. ábra Különböző nukleotid szubsztrátok és ATP analógok kötődésének összehasonlítása

A MgATP (zöld) és MgADP (sötétkék) szubsztrátokat, valamint a MgAMP-PCP (türkizkék), MnAMP-PNP (lila) analógokat golyó-pálcika modell jelöli, a kölcsönhatásaikat a fehérje oldalláncokkal pedig a megfelelő színű szaggatott vonal. Az összemásolás az adenosin gyűrű szerint történt.

A különböző kristályszerkezetekből származó kép a nukleotid-foszfátlánc különböző pozícióinak lehetőségét veti fel, jó egyezésben a kristallográfias *B*-faktor értékekből, továbbá a K215A mutáns enzimológiai vizsgálatából levont következtetéssel (ld. 2.3.2.3.1.) a foszfátlánc flexibilitásáról és a Lys215 oldallánccal való kapcsolat kialakításáról.

2.3.2.4. A PGK nyitott és zárt kristályszerkezete

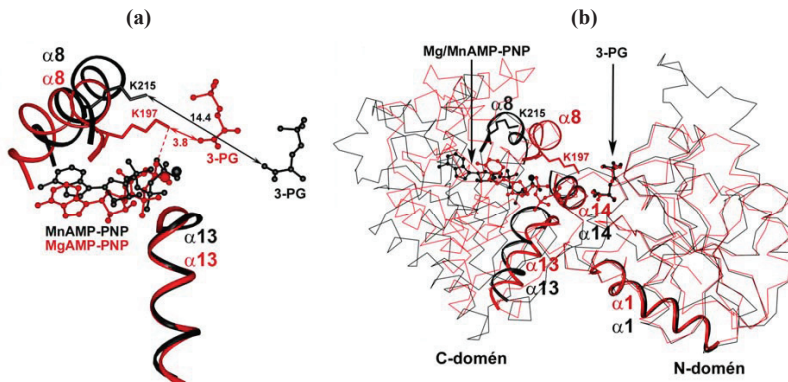
2.3.2.4.1. A szubsztrátok elhelyezkedése és kölcsönhatásai a katalitikus komplexben

Már a doméneket zárt konformációban megmutató kristályszerkezetek közlése előtt, a nyitott szerkezetek analizisekor érdekes megfigyeléseket tettek pl. arról, hogy a feltételezhetően katalitikus oldallánc, az N-doménben elhelyezkedő Arg38 (ld. 2.3.2.2.

fejezet) kölcsönhatásai és helyzete látványosan megváltozik a terner komplex kialakulásakor, azaz miután az AMP-PNP-t bediffundáltatták a 3-PG-t kötő biner komplex kristályába [77]. Egyrészt a Thr393-mal (C-domén) többszörös H-híd kapcsolatba lép, másrészt a 3-PG reakcióban résztvevő karboxil-csoportjával való kölcsönhatása is megerősödik. Ezt a megállapítást szintén alátámasztotta a *Thermotoga maritima* (*Tm*) termofil baktériumból származó PGK ugyanilyen összetételű, de zárt konformációjú terner komplexének kristályszerkezete is [74] (15.d ábra). Ebből valószínűsíthető lehetett, hogy az Arg38-nak fontos szerepe lehet egyrészt a 3-PG karboxil-csoportjának irányításában az enzimreakció során, másrészt a két domén közötti kommunikáció megteremtésében.

Már a nyitott szerkezetek vizsgálata is felvetette még egy érdekes oldallánc, a Lys215 esetleges szerepét a katalízisben, amit a zárt szerkezetek későbbi megismerése valóban alátámasztott. A *Tm* PGK*3-PG*MgAMP-PNP terner komplex szerkezetében [74] a Lys215 oldallánc közvetlen kapcsolatban áll a nukleotid γ -foszfátjával (10.a ábra), vagyis a foszfo-transzferben részt vevő foszfo-csoporttal, amiből arra következtettek, hogy az oldalláncnak központi szerepe lehet a foszfo-csoport kémiai átvitelében. Ezt a következtetést alátámasztja az is, hogy amikor ebbe a szerkezetbe a kötött 3-PG helyére modellezték az 1,3-BPG-t, a Lys215 oldallánc pozíciója optimálisnak látszott a foszfo-transzferben résztvevő 1-foszfáttal való kölcsönhatás szempontjából is. Kérdésként merül fel, hogyan, milyen mechanizmus szerint kerül ez a fontosnak látszó oldallánc az aktív centrumba, hiszen a nyitott szerkezetekben azért nem is figyeltek fel rá, mivel nagyon periférikus pozícióban volt. Mindenesetre, az $\alpha 8$ hélixhez tartozó Lys215/*Tm*Lys197 oldallánc térbeli helyzete nagyot változik a doménzáródás során: egyrészt a C-doménbeli $\alpha 8$ hélix pozíciója és konformációja változik a C-domén belső magjához képest (10.b ábra), másrészt pedig természetesen változik az N-doménhez képest, hiszen a C-domén egésze nagymértékben elfordul az N-doménhez viszonyítva. Így a Lys215 oldalláncnak pl. az N-doménon kötött 3-PG-től való távolsága kb. 10 Å-nyit rövidül a doménzáródás során (10.a ábra).

Munkám kezdetén tehát még megválaszolatlan kérdés volt, hogy a Lys215 oldallánc nagyléptékű elmozdulásának (amiben a MgATP foszfátlánccal való kölcsönhatásnak is szerepe lehet, ld. 2.3.2.3.1. fejezet) van-e valamilyen közvetlen szerepe a doménzáródás molekuláris mechanizmusában, vagy csupán egy független mechanizmus által irányított doménzáródás következményeként mozdul el.

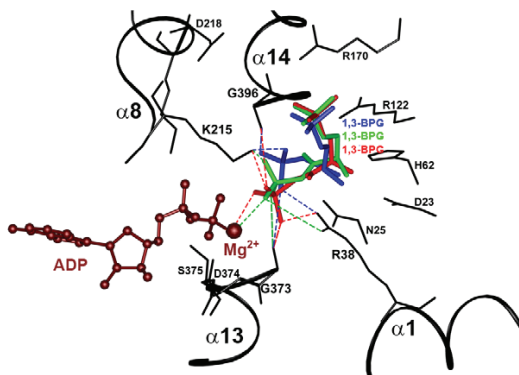


10. ábra A Lys215 oldallánc pozíciójának megváltozása a zárt szerkezetben

Az (a) és (b) ábrákon a *sertésizom* PGK nyitott szerkezete (fekete) és a *T. maritima* zárt szerkezete (piros) látható összemásolva az $\alpha 13$ hélix szerint (a), míg a (b) ábrán az N-domén β -redőinek peptidgerincének atomjai szerint. Mindkét ábrán a hélixeket szalagdiagram, a szubsztrátokat golyópálcika modell ábrázolja. A távolságok Å-ben vannak megadva. A *TmLys197/Lys215* kölcsönhatása a nukleotid γ -foszfátjával szaggatott piros vonallal látható.

A *T. maritima* PGK fenti szerkezetén kívül, nagyjából vele egyidőben, napvilágot látott egy másik, még tökéletesebben zárt PGK szerkezet, egy egysejtű élőlény, a *Trypanosoma brucei*-ből (*Tb*) származó PGK MgADP és 3-PG szubsztrátokkal alkotott nem működő terner komplexe [75]. A szerkezetben kötött 3-PG karboxil-csoportja és a kötött MgADP β -foszfátja közé a szerzők modellezték a reakcióban átadódó trigonális foszfo-csoportot (nincs bemutatva). A központi foszforatom egyenlő távolságra van a nukleofil és a távozó csoporttól. A foszfo-csoport mindhárom negatívan töltött oxigén-atomja többszörösen stabilizálódik: az *TbArg39/Arg38* guanidinium csoportja ($\alpha 1$ hélix), a *TbGly376/Gly373* ($\alpha 13$ hélix N-terminális) peptidgerinc amidja, a *TbGly399/Gly396* ($\alpha 14$ hélix N-terminális) peptidgerinc amidja, a *TbLys219/Lys215* oldallánc terminális aminos-csoportja ($\alpha 8$ hélix) és a magnézium ionnal való kölcsönhatás révén. (Az oldalláncok relatív pozícióját a zárt szerkezetben a 11. ábra mutatja.) Ezen kristallográfias szerkezet külön érdekessége, hogy a monomer PGK ebben dimerként kristályosodott, melynek egyik alegysége a MgADP*3-PG terner komplex, míg a másik alegység egy MgADP*P_i pszeudoterner komplex. A két alegység aktív centrumát a kötött MgADP szerint összemásolva kiderült, hogy a P_i nem a 3-PG helyén, hanem mellette, a kötött 1,3-BPG 1-es foszfátjának feltételezhető helyén kötődik, azaz az átmenő foszfát helyét foglalja el és szintén a modellezett foszfo-csoporthoz hasonló kölcsönhatásokat alakít ki. Tehát a *T. brucei* PGK zárt szerkezete szintén az Arg38 ($\alpha 1$ hélix) és a Lys215 ($\alpha 8$ hélix) oldalláncok,

valamint az $\alpha 13$ és $\alpha 14$ hélixek N-terminálisainak feltételezett katalitikus szerepe mellett szól. A négy hélix aktív centrumot kialakító szerepe mellett szól az 1,3-BPG szubsztráttal csoportunkban végzett modellezési munka is [87] (11. ábra), amely egy további érdekességre is felhívta a figyelmünket ezen szubsztrát kötődésével kapcsolatban. A modellezés az 1,3-BPG 1-es foszfátját több, egymástól kissé különböző pozícióban és kölcsönhatásban mutatta meg, utalva arra a lehetőségre, hogy a MgATP γ -foszfátjához hasonlóan, az 1,3-BPG 1-es foszfátja szintén flexibilisen mozoghat, még a zárt aktív centrumban is. Figyelemre méltó, hogy mindkét esetben az enzimreakcióban átadódó foszfo-csoportok mozgékonyaságáról van szó. Az 1-es foszfát mozgása által az Arg38-at hordozó $\alpha 1$ hélix, valamint a Lys215-öt hordozó $\alpha 8$ hélix és az $\alpha 13$ ill. $\alpha 14$ hélixek pozitívan töltött N-terminálisa közeledhetnek egymáshoz. Tehát amíg a MgATP az $\alpha 8$ és $\alpha 13$ hélixek közelítésével segítheti elő a doménmozgást és az aktív konformáció kialakulását, addig a 1,3-BPG-nek is hasonló szerepet tulajdoníthatunk, kiterjesztve azt az $\alpha 1$ és $\alpha 14$ hélixekre is. Nem zárhatjuk ki azt sem, hogy az 1,3-BPG (melyről ismert az enzimszerkezetre kifejtett nagy hatása [90]) esetleg már önmagában képes a zárt konformációt létrehozni és stabilizálni. Doktori munkám során ezen hipotézisek érvényességét is vizsgáltam.



11. ábra A modellezett 1,3-BPG kölcsönhatásai

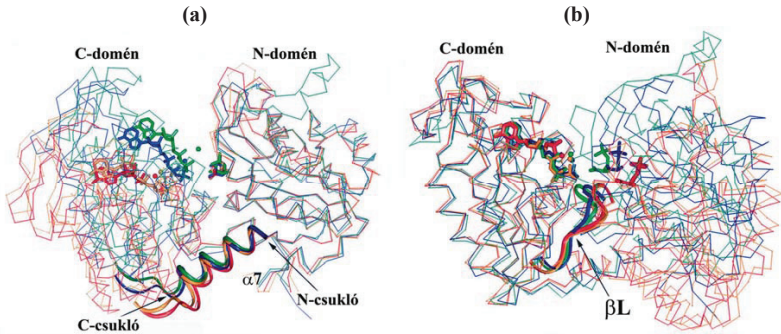
Az ábrán pálcika modellel látható a három modellezett 1,3-BPG szubsztrát a *Tb* PGK zárt szerkezetében. A hélixek szalagdiagrammal, a MgADP pedig golyó-pálcika modellel látható. A kölcsönhatásokat szaggatott vonalak mutatják. Az oldalláncok számozása a hPGK szekvenciájának megfelelő.

2.3.2.4.2. A nyitott és zárt szerkezetek összehasonlítása: a PGK molekula csukló-régióinak meghatározása

A doménmozgások mechanizmusának felderítéséhez első lépés, hogy a molekula lehetséges csukló régióit meghatározzuk. Ennek legegyszerűbb módja az lehet, ha az ugyanazon forrásból származó enzimet sikerül nyitott és zárt konformációs állapotban is kristályos formában előállítani és szerkezetét meghatározni. Ebben az esetben a két szerkezet összehasonlítását nem zavarják szekvenciális különbségek és a molekula csukló régiói így viszonylag könnyen lokalizálhatók. Csoportunk e célból próbálta meg a *sertésizom* PGK*3-PG*MgADP terner komplexét magas foszfát-ion koncentráció mellett kristályosítani, azaz az előbbi fejezetben tárgyalt *T. brucei* PGK hasonló komplexével azonos körülmények között. A várakozással ellentétben, azonban a sertésizom enzimnek ismét nyitott konformációját kapták meg [76]. Szintén ugyanilyen eredményre vezetett a *T. maritima* PGK-nál bevált alacsony ionerősségű PEG mint kristályosító ágens alkalmazása a sertésizom PGK*3-PG*MgAMP-PCP kristályosításakor [70]. Mint a 2.3.2.3.2. pontban tárgyaltam, a sertésizom PGK kristályában működő rácserők akadályozhatják meg a domének záródását.

Ebben a helyzetben a PGK csukló régióinak feltérképezéséhez két nyitott (*sertésizom*) és két zárt (*T. maritima* és *T. brucei*) terner komplex szerkezetét hasonlították össze [76]. A *sertésizom* PGK*3-PG*MgADP és az ugyanezen forrásból származó PGK*3-PG*MnAMP-PNP szerkezetek nyitott konformációt, míg a *T. brucei* PGK*3-PG*MgADP és a *T. maritima* PGK*3-PG*MgAMP-PNP kristályszerkezetek zárt állapotot képviselnek. Ha felváltva az egyes domének belsejében található β -redők peptidgerince alapján másoljuk össze a szerkezeteket, megfigyelhetjük, hogy a domének relatív pozíciója egymástól igen különböző (12. ábra).

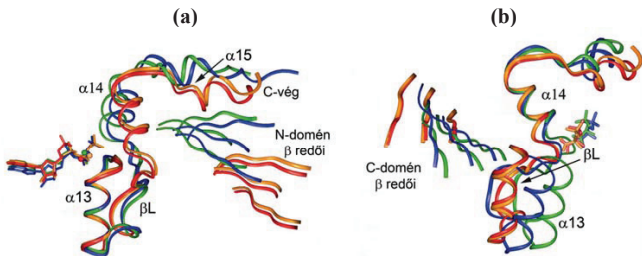
A domének mint rigid testek mozdulnak el egymáshoz képest a csukló régiók mentén. Bernstein és munkatársai 1997-ben már leírták, hogy a 7-es hélix két terminálisa csuklóként funkcionálhat a doménzáródás folyamatában [91]. Az $\alpha 7$ C-terminális csuklójának pozíciója merőben eltérő a nyitott és zárt szerkezetekben [76].



12. ábra A PKG főbb csukló régiói: az $\alpha 7$ két végpontja és a βL [76]

Az ábrán négy szerkezet összemósolása látható: piros szín jelöli a *Sertésizom* PKG*3-PG*MgADP szerkezetet, narancssárga a *Sertésizom* PKG*3-PG*Mn/MgAMP-PNP szerkezetet, kékkel látható a *T. maritima* PKG szerkezet, míg zölddel a *T. brucei* PKG zárt szerkezet. Az (a) ábrán az összemósolás az N-domén, míg a (b) ábrán a C-domén β -redőinek C α atomjai szerint történt. Mindkét ábrán a szubsztrátok palcika modellel, az $\alpha 7$ és βL szalagdiagrammal látható.

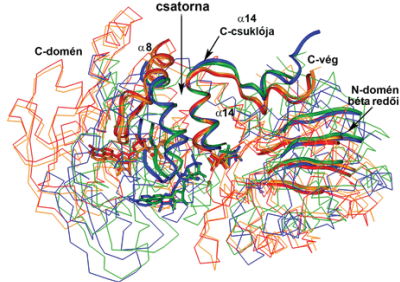
Az $\alpha 7$ hélix végénél fontosabb csukló régióknak látszik a 13-as és 14-es héliceket összekötő L-jelű β -redő, mivel ez több konzervatív aminosav-maradékot is tartalmaz. Míg a 13-as hélix a C-terminális domén része és azzal együtt mozog, addig a 14-es hélix az N-terminális doménhez tartozik. A doménzáródás során a βL redő nagymértékű konformációs változáson megy keresztül és ennek alapján Szilágyi és mti feltételezték, hogy lényegében ez a változás szabályozza a két domén relatív helyzetét és közelíti egymáshoz a szubsztrátkötő zsebeket. Később a DynDom program használatával is alátámasztották a csukló létezését a βL -nél [92]. Ezért a βL redőt tekinthetjük a PKG fő csukló-régiójának (13. ábra)



13. ábra Az N- és a C-terminális domént a βL redő közelíti egymáshoz

Mindkét ábrán a színek azonos kristályszerkezeteket jelölnek a következők szerint: piros a *Sertésizom* PKG*3-PG*MgADP (nyitott szerkezet), narancssárga a *Sertésizom* PKG*3-PG*MnAMP-PNP (nyitott szerkezet), kék a *Tm* PKG*3-PG*MgAMP-PNP (zárt szerkezet) és a zöld pedig a *Tb* PKG*3-PG*MgADP (zárt szerkezet). Az (a) ábrán a kristályszerkezetek összemósolása az $\alpha 13$ hélix, a (b) ábrán pedig az $\alpha 14$ hélix peptidgerinc atomjai szerint történt.

Említésre méltó még a 8-as hélix is, mely integráns része a C-terminális doménnek, mégis attól többé-kevésbé függetlenül mozog (10.b ábra), elsősorban a nukleotiddal való kapcsolat révén. A doménzáródás folyamán az $\alpha 8$ konformációja rendeződik és elmozdul az $\alpha 14$ hélix irányába, mely mozgás a két domén közötti csatornát zárja (14. ábra).

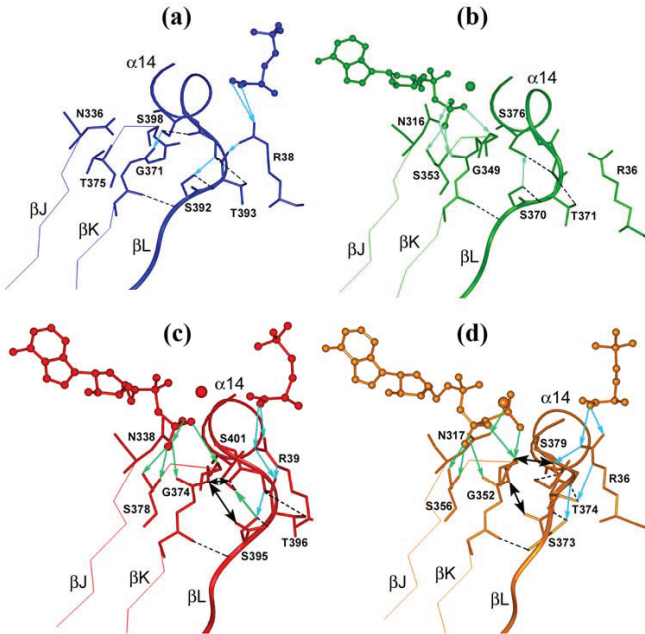


14. ábra A PGK főbb másodlagos szerkezeteinek elmozdulása a doménzáródás során

A színek a következő kristályszerkezeteket jelölik: piros a *Sertésizom* PGK*3-PG*MgADP (nyitott szerkezet), narancssárga a *Sertésizom* PGK*3-PG*MnAMP-PNP (nyitott szerkezet), kék a *Tm* PGK*3-PG*MgAMP-PNP (zárt szerkezet) és a zöld pedig a *Tb* PGK*3-PG*MgADP (zárt szerkezet). Az ábrán a kristályszerkezetek összemásolása az N-domén béta redői alapján történt. A hélixek és redők szalagdiagrammal, a szubsztrátok pálcika modellel láthatók.

A csukló régiók azonosítása nagy lépést jelentett a doménmozgások megértése felé. A továbbiakban csoportunk kísérletet tett a doménmozgások mechanizmusának részletesebb felderítésére is. Ehhez összehasonlították a konzervatív oldalláncok atomi kölcsönhatásait a nyitott (biner) és a zárt (terner komplexek) kristályszerkezetekben. Meglepő módon kiderült, hogy csupán a βL redőt érintő néhány molekuláris kölcsönhatásban van különbség a két extrém konformáció között [93]. A 15. ábrán világoskék és zöld nyilak jelzik a 3-PG ill. a nukleotid szubsztrát hatására a megfelelő biner komplexekben kialakuló molekuláris kölcsönhatásokat az interdomén régióban. Ezek a kölcsönhatások a terner komplexekben is fennmaradnak és működnek. A zárt terner komplexekben csupán néhány további kölcsönhatás alakul ki, melyeket a fekete nyilak jeleznek (15.c és d ábrák). Ezzel lényegében kiterjed és stabilizálódik a biner komplexekben már kezdeményeiben jelen lévő H-híd kötés-rendszer, ami a βL alapvető konformáció-változását és ezzel párhuzamosan a domének összezáródását eredményezi. Tehát a mindkét szubsztrát együttes hatására kialakuló speciális H-kötés rendszer egy kettős molekuláris kapcsolóként fogható fel [94]. Munkám kezdetén ezen hipotézis kidolgozásába kapcsolódtam be, mely feltételezi, hogy konzervatív oldalláncok közvetítik a szubsztrátok hatását a βL csukló régióhoz, továbbá, hogy mindkét

szubsztrát együttműködése szükséges az aktív termer komplexben a doménzáródás bekövetkezéséhez.



15. ábra A szubsztrátok konformáció-változtató hatásának terjedése a fő csukló régió, a β L felé. Az (a) ábrán a *Sertisizom* PGK*3-PG biner (kék), míg a (b) ábrán a *B. stearrowthermophilus* PGK*MgADP biner (zöld) szerkezete látható. A C ábra a *Tb* PGK*3-PG*MgADP terner (piros), a D ábra pedig a *Tm* PGK*3-PG*MgAMP-PNP terner (narancssárga) szerkezeteit mutatja a szubsztrátkötő helyek és a β L régió környezetét kiemelve. A szubsztrátok/analógok (3-PG, MgADP, MgAMP-PNP) golyó-pálcika modellel láthatók, a β L-et és az α 14-et szalagdiagram jelöli, a β J és β K redők peptidgerince pálcika modellel látható. Az oldalláncok számozása az adott szerkezetnek megfelelő. Az állandó kölcsönhatásokat szaggatott vonal jelöli, a 3-PG hatására kialakulókat kék nyíl, a nukleotid szubsztrát/analóg hatására kialakulókat pedig zöld nyíl mutatja. A terner szerkezetekben - (c) és (d) ábra - kialakuló két új kölcsönhatást fekete kettős nyilak ábrázolják.

2.3.3. A PGK tulajdonságai oldat fázisban

Egy enzim működésének megértéséhez nem elég a nagyfelbontású kristályszerkezet ismerete, hanem az enzim oldatában elvégezhető különféle (egyensúlyi és kinetikai) enzimológiai vizsgálatok, valamint fizikai kémiai mérések (pl. CD, DSC, SAXS) együttesen adhatnak csak képet a fehérjemolekula viselkedéséről. Ez utóbbiak annál is inkább fontosak, mert az enzimek általában oldatban működnek, és amint fentebb is tárgyaltam (ld. 2.3.2.4.2.

pont), a kristályos enzim vizsgálatából nyert információkat gyakran befolyásolhatja az a tény, hogy a kristályban működő rácserők a fehérjének esetleg az oldatban csak kis valószínűséggel előforduló konformációját stabilizálják.

2.3.3.1. A szubsztrátkötődés jellemzése: disszociációs állandók (K_d értékek)

Az egyes szubsztrátok kötődésének K_d értékeit mutatja be a 2. táblázat 1. oszlopa. Általában elmondható, hogy a 3-PG, a MgATP és a MgADP K_d értéke a mikromólos koncentráció-tartományba esik, szemben az 1,3-BPG K_d -értékének nanomólos értékével, mely ez utóbbinak rendkívül szoros kötődését tükrözi.

2. táblázat **A szubsztrátok K_d értékei (mM) szabad enzim esetén oldatban és kristályban, valamint PGK*3-PG komplex esetén kristályban**

| Szubsztrát | Oldat | | Kristály |
|------------|--|-----------------------------------|-------------------|
| | PGK | PGK*3-PG | PGK*3-PG |
| 3-PG | 0,032±0,003 [95] 0,022 [96] 0,03±0,01 [97] 0,011±0,005 [98] | — | — |
| 1,3-BPG | 0,00005±0,00002 [95] 0,00005±0,00001 [97] 0,000056±0,000024 [87] | — | — |
| MgADP | 0,048±0,009 [99] 0,060±0,010 [100] | 0,34±0,13 [99] 0,38±0,05 [101] | 0,096±0,021 [101] |
| MgATP | 0,145 [102] 0,23±0,05 [100] 0,27±0,09 [99] | 0,51±0,22 [99] 0,38±0,06 [101] | 0,21±0,02 [101] |

A szubsztrátok K_d értékeinek meghatározása különféle módszerekkel történt, pl. közvetett fluorimetriás titrálással, NMR spektrum változása alapján vagy az egyensúlyi dialízis közvetlen módszerét használva. A módszerek sokfélesége is lehet az oka annak, hogy a különféle kutatócsoportok által közölt eredmények eltérnek a szubsztrátkötés stöchiometriája szempontjából. Főként a nukleotid szubsztrátok esetén véltek egyes szerzők egy másodlagos kötőhelyet is kimutatni [102, 103]. Kutatócsoportunk az egyensúlyi dialízis és ITC módszerrel csak egyetlen nukleotid kötőhelyet határozott meg [72, 100], összhangban a röntgenkristallográfiás adatokkal.

Érdeemes összevetni a MgADP és MgATP kötődését jellemző adatokat, hiszen a szerkezeti adatok szerint a két nukleotid szubsztrát kötődési módja különböző. A 2. táblázat adataiból látható, hogy a MgADP sokkal szorosabban kötődik az enzimen, mint a MgATP, továbbá azt is tudjuk, hogy a Mg^{2+} csak az ADP kötődésére hat, az ATP kötődésére pedig nem (nincs bemutatva, [100]). Kutatócsoportunk kalorimetriás titrálással (ITC) is jellemezte a két nukleotid szubsztrát enzimmel való kölcsönhatását. A titrálási adatokból a kötődés energetikai paraméterei is megadhatóak voltak [72]. Kiderült, hogy míg a MgADP kötődése főként entalpia-vezérelt exoterm folyamat, addig a MgATP kötődését főként a kötődési entrópiaváltozás irányítja. Az eredmények tehát összhangban vannak a krisztallográfiai szerkezetekből levont következtetésekkel, azaz a kötött MgATP foszfátláncának nagymértékű flexibilitására utalnak.

2.3.3.2. *A PGK szubsztrátjainak egymásra hatása a terner enzim-szubsztrát komplexben*

Az oldott PGK esetén azt tapasztalták, hogy a nukleotid szubsztrát kötődése gyengül, ha az enzimen már kötve van a 3-PG szubsztrát ([99], 2. táblázat 2. oszlop). Ezt a jelenséget szubsztrát antagonizmusnak nevezték el, mivel az egyik szubsztrát kötődése negatívan hat a másik kötődésére. A szubsztrát antagonizmus jelensége nemcsak a PGK sajátja. Megfigyelték pl. a foszfofrukto-1-kináz enzim esetében is [104].

A szubsztrátok ilyen jellegű kölcsönhatása csak akkor valósulhat meg, ha az egyik doménon kötődő szubsztrát valamilyen információt képes átadni a másik doménon elhelyezkedő másik szubsztrátkötőhelyre. Ez pedig a két domén kommunikációját kell hogy feltételezze. Mivel szintén a két domén közötti nagyfokú együttműködés szükséges a doménzáródáshoz is, feltételezhetjük, hogy a doménzáródás és a szubsztrát antagonizmus összefüggenek. Valóban ezt az összefüggést bizonyították a nyitott konformációjú kristályos enzimmel végzett kötődési vizsgálatok. Az egykristály mikrospektrofotometria módszerét alkalmazva meghatározták a *sertésizom* PGK 3-PG-vel alkotott biner komplex kristályához kötődő MgADP ill. MgATP disszociációs állandóit (2. táblázat, 3. oszlop). Érdekes módon a kapott K_d értékek az oldott enzimre 3-PG távollétében meghatározott értékekkel mutattak jó egyezést, szubsztrát-antagonizmus nem volt kimutatható. Ez tehát bizonyítja, hogy a nyitott enzimkonformációban a két domén közötti együttműködés nem valósul meg, a doménzáródás pedig ugyanezen oknál fogva szintén nem következik be. Azaz a szubsztrát antagonizmus és a doménzáródás összefüggenek.

A PGK szubsztrátja és doménje közötti együttműködésnek egy másik szép kísérletes példája az enzim-szubsztrát komplexek kalorimetriás (DSC) vizsgálata. A munkából egyértelműen kiderült, hogy a terner enzim-szubsztrát komplexek hőstabilitása nagyobb, mint a biner enzim-szubsztrát komplexeké külön-külön [93]. A karbox-amidometilezett PGK-val (inaktív, de a szubsztrátokat jól kötő, nyitott konformációjú enzim [81]) elvégzett fentihez hasonló kísérletek viszont azt mutatták, hogy ezen módosított enzim esetén mindkét szubsztrát együttes kötődése nem idéz elő nagyobb változást az enzim konformációjában, mint az egyes szubsztrátok külön-külön. Az eredmény összhangban van a fentiekben ismertetett kettős kapcsoló hipotézisünkkel, azaz hogy a két domén együttműködését a szubsztrátok együttesen szabályozzák. A szabályozás mikéntjének, molekulaszervezeti hátterének kísérletes meghatározása szolgált alapul doktori munkámhoz.

2.3.3.3. PGK által katalizált reakció enzimkinetikai jellemzése

2.3.3.3.1. Az enzimkinetikai reakciómechanizmus

A PGK által katalizált reakció mechanizmusa (Cleland-féle osztályozás) szerint szekvenciális, azaz mindkét szubsztrátnak kötődnie kell az enzimen mielőtt bármelyik termék felszabadulna. A mechanizmust továbbá a szubsztrátok gyors egyensúlyt elérő és random módon való kötődése jellemzi, azaz a szubsztrátkötődés gyorsabb, mint az enzimreakció és nincs sorrendiség a kötődésben [105]. Tiofoszfát nukleotidanalóggal végzett kinetikai vizsgálatok arra is rámutattak, hogy a PGK katalizálta foszfo-transzfer inverzióval játszódik le, asszociatív jellegű, vagyis nincs kovalens foszfo-enzim intermedier, hanem a foszfo-csoport közvetlenül adódik át az egyik szubsztrátról a másikra [106]. A termékek közül a MgADP távozik először, ugyanis az 1,3-BPG kötődése az enzimen olyan szoros ($K_d=60$ nM [95], 56 nM [87]), hogy annak disszociációja a sebesség-meghatározó lépés. Ezt az élesztő PGK-val végzett tranziens kinetikai vizsgálatok is bizonyítják [107, 108].

2.3.3.3.2. A PGK anomális kinetikai viselkedése: szubsztrátfelesleg-, és anion aktiválás

A PGK különleges kinetikai tulajdonságokat mutat: jellemző rá a szubsztrátfelesleg-aktiválás, ami azt jelenti, hogy a szubsztrátok nagy koncentrációban aktiválják az enzimet. Továbbá a többértékű anionok alacsony koncentrációban aktiválják, míg nagy koncentrációban gátolják az enzimet [109]. Ezeket a jelenségeket Scopes már 1978-ban

megfigyelte, és úgy magyarázta, hogy a szubsztrátok vagy anionok elősegíthetik a szorosan kötődő termék, az 1,3-BPG felszabadulását az enzimről [95], azonban a jelenséget kvantitatívan leírni nem tudta.

Az anionok gátló hatása sokkal egyértelműbben értelmezhető: valószínűleg az anionos jellegű szubsztrátokat szorítják ki a kötőhelyükről.

A szubsztrátfelesleg és anionok általi aktiválás értelmezéséhez és kvantitatív leírásához feltételezni kellett legalább egy, a szubsztrátkötőhelyeken kívül létező szabályozó helyet [110]. A hipotézis szerint a szubsztrátok ill. más anionok számára léteznie kell az aktív centrumon kívüli, a szubsztrátok kötőhelyeivel nem átfedő aktiváló helynek. Ez a hely a nyitott konformációjú enzimben valószínűleg csak elemeiben létezik és csupán a doménzáródás során alakul ki. Kialakításában valószínűleg mind az N-, mind pedig a C-terminális domén oldalláncai részt vesznek. A szubsztrátok/anionok egyrészt csökkenthetik a nyitott és zárt szerkezet közti energiagátat, másrészt közvetlenül elősegíthetik a lassan távozó termék, az 1,3-BPG disszociációját is. A feltételezett aktiváló anionkötőhely pozícióját csoportunk is tovább vizsgálta modellezés segítségével. A modellezés több lehetséges anionkötőhelyet eredményezett egyrészt a szubsztrátkötőhelyek közelében, másrészt pedig a zárt szerkezetű enzim felszínén [87]. Ez utóbbi azonosnak látszik a Szilágyi és Vas által feltételezett aktiváló hellyel [110]. Mivel az anionaktiválás és a doménzáródás összefügghet egymással, ezért a doménzáródás mechanizmusának felderítése hozzásegíthet az anionaktiválás jelenségének jobb megértéséhez is.

3. CÉLKITÚZÉSEK

Az irodalmi áttekintésben tárgyaltak szerint a több doménből felépülő enzimek működésének megértéséhez sokirányú, komplex vizsgálatok szükségesek. Az általam tanulmányozott PGK enzimet széles körben alkalmazzák modellként a domének közötti kölcsönhatások vizsgálatára. A PGK esetén kristályszerkezeti és enzimológiai adatok alapján már munkám megkezdésekor egy részletes, ún. „kettős kapcsoló” hipotézis állt rendelkezésre az enzim működéséhez szükséges konformáció-változásokról és a két szubsztrát együttes szerepéről. A hipotézis csupán molekuláris grafikai analízisen alapult: a konzervatív oldalláncok feltételezhető atomi kölcsönhatásainak szintjén vázolta fel a fő csukló régióknak tekintett β L redő működését. Egy másik, alternatív hipotézisünk szerint a MgATP mozgékony foszfátláncának a Lys215 oldallánccal való időleges kapcsolata, akár függetlenül is, előidézhetheti a doménzáródást azáltal, hogy az α 8 és α 13 hélixeket közelíti egymáshoz. Hasonló szerep tulajdonítható az 1,3-BPG mozgékony 1-es foszfátjának, amely az Arg38 oldallánccal való kapcsolata révén közelítheti még az α 1 és α 14 hélixeket is a doménzáródás során. Az eddigi kísérleti eredmények alapján azonban nem dönthető el, hogy a Lys215 és Arg38 oldalláncoknak ill. az azokat hordozó α 8 és α 1 hélixeknek van-e közvetlen szerepe a doménzáródás molekuláris mechanizmusában, vagy csupán egy független mechanizmus (pl. β L redő működése) által irányított doménzáródás következményeként mozdulnak el.

Doktori munkám során célul tűztem ki, hogy kísérleti módszerekkel döntsek a hipotézisek érvényességéről. A hipotézisek ellenőrzésére a kérdéses konzervatív oldalláncokat irányított mutagenézissel módosítottam és a mutáns fehérjéket enzimológiai ill. biofizikai módszerekkel vizsgáltam. A doménzáródás mechanizmusával kapcsolatban közvetlen módszerrel kívántam tisztázni, hogy kristályszerkezetek alapján valószínűsített feltevés valósul-e meg, azaz mindkét szubsztrát együttes kötődése szükséges-e ahhoz, hogy az enzim molekulának a zárt konformációja kialakuljon.

A fentiek értelmében a következő munkatervet követtem:

1. A vad típusú hPGK-val végzett kisszögű röntgenszórás (SAXS) mérésekkel kívántam igazolni vagy cáfolni, hogy mindkét szubsztrát együttes kötődése szükséges-e a PGK doménzáródásához.
2. A K215A és R38A hPGK aktív hely mutánsok SAXS analízisével terveztem meghatározni, hogy a szubsztrátok kötődése előidézi-e a zárt konformáció

- kialakulását ezen mutánsok esetén is, azaz hogy a K215 és R38 oldalláncoknak van-e közvetlen szerepe a doménzáródásban.
3. A PGK feltételezett fő csukló régiójában, a β L-ben elhelyezkedő és a környező hélixekben lévő, vele kapcsolatos oldalláncok irányított mutagenezissel való módosítása által és a mutánsok enzimológiai (enzimkinetikai és egyensúlyi szubsztrátkötődési) és biofizikai (DSC, SAXS) vizsgálatával kívántam az adott oldalláncok katalízisben ill. a doménzáródásban betöltött szerepét tisztázni.
 4. Hasonló mutációs kísérleteket és analízist terveztem a PGK eddig még kevésbé vizsgált nukleotid szubsztrát kötőhelyén és környezetében, azért, hogy felderítsem, milyen oldallánc kölcsönhatások révén közvetítődik a nukleotid hatása a β L fő csukló régióhoz. Az enzimológiai és SAXS vizsgálatok együttes analiziséből vártam választ a doménzáródás molekuláris mechanizmusának részleteire, az oldallánc-kölcsönhatások szintjén.
 5. A mutánsok enzimkinetikai és szubsztrátkötődési állandóinak ismeretében a mutációk hatásának energetikai értelmezése céljából a vad típusú enzimhez viszonyított ún. differencia energiadiagramot terveztem elkészíteni. Az adatok kvantitatív analiziséből kívántam következtetni a mutáció hatásának természetére (szubsztrátkötés gyengítése, katalízis aktiválási szabadentalpia-gátjának növelése). Az aktiválási szabadentalpia-gát doménzáródásra fordítandó részét, azaz a doménzáródást kísérő szabadentalpia-változást közvetlen izotermális titráló kalorimetriás mérésekkel, mégpedig a biner és terner enzim-szubsztrát komplexek képződését kísérő hőeffektusok összehasonlításával szintén terveztem meghatározni, mind a vad típusú enzimmél, mind pedig a doménzáródást akadályozó mutánsoknál.

4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

4.1. *Anyagok*

A fehérjetermelés és tisztítás során felhasznált anyagok közül az LB tápoldatok készítéséhez szükséges élesztő kivonat, a bacto trypton, a NaCl, valamint a CM-Sepharose oszlopkromatográfiához szükséges NaH_2PO_4 és Na_2HPO_4 Reanal termék; a hPGK fehérjék előállításához szükséges ampicillin és a kloramfenikol Sigma; az IPTG Fermentas gyártmány volt, míg az $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a Merck-től származott. Az irányított mutációk kivitelezéséhez használt QuikChange kit Stratagene termék volt. A PCR reakcióhoz a primereket az Invitrogen-től rendeltük.

Az enzimológiai vizsgálatokhoz szükséges 3-PG, az ATP és az ADP Na-só formában Boehringer gyártmányú volt. A MgATP ill. MgADP szubsztrátokat MgCl_2 (Sigma) hozzáadásával készítettem. A MgATP disszociációs állandóját 0,1 mM értéknek, míg a MgADP-jét 0,6 mM-nak vettem [111-113]. 1,3-BPG-t gliceraldehid-3 foszfátból (Sigma) preparáltam Negelein [114] módszer szerint Furfine és mtsa-inak változtatásai alapján [115]. A kinetikai mérésekhez szükséges NADH-t a Sigma cégtől rendeltük. A kötődési vizsgálatokhoz szükséges Ellman reagenst (DTNB) a Serva-tól, az ANS-t a Sigmától vásároltuk. A Tris Serva, az EDTA Merck, a DTT Fluka gyártmány volt. A többi vegyszer is analitikai tisztaságú készítmény volt.

A PGK enzim [EC 2.7.2.3.] humán változatának génjét pET11c vektorba klónozva P. J. Hogg (University of New South Wales, Sydney, Ausztrália) laboratóriumából kaptuk.

A kinetikai vizsgálatokhoz szükséges GAPDH-t sertésizomból izoláltam és a PGK-hoz hasonló körülmények között tároltam.

K215A és R38A mutáns hPGK-k DNS konstrukciói rendelkezésemre álltak korábbi, részben szakdolgozati munkám eredményeként. Ezen mutáns enzimek előállítását a *Módszerek* fejezetben tárgyalt módon, a vad típusú hPGK-hoz hasonlóan hajtottam végre.

4.2. Módszerek

4.2.1. DNS szintű munkák a vad típusú és mutáns hPGK enzimek előállítására

Az irányított mutagenézis kivitelezésére PCR reakciót alkalmaztam, melyet a QuikChange helyspecifikus mutagenézis kit segítségével kiviteleztem az alábbi primerek felhasználásával (3. táblázat). A mutáns enzimek elkészítésére irányuló DNS munkában Flachner Beáta segített.

A PCR segítségével felszaporított mutációt tartalmazó plazmidot Epicurian Coli XL1-Blue szuperkompetens sejtekbe; fehérjetermelés céljából pedig BL21-CodonPlus (DE3)-RIL (Stratagene) kompetens sejtekbe transzformáltam.

3. táblázat Az irányított mutagenézishez használt forward ill. reverz primerek DNS szekvenciája

Minden mutáció esetén felső sorban az alkalmazott forward, alatta pedig a reverz primer bázissorrendje látható.

| Mutáció típusa | Primerek: forward (5'→3') és reverz (5'→3') |
|----------------|---|
| F165A | GTC AATGATGCT GCT GGCACTGCTCACAG CTGTGAGCAGTGCC AGC AGCATCATTGAC |
| E192A | GATGAAGAAG GCG CTGAACTACTTTGC GCAAAGTAGTTCAG CGC CTTCTTCATC |
| F196A | GAAAAAAGAGCTGAACTAC GCT GCAAAGGCCCTGGAGAG CTCTCCAAGGCCTTTGC AGCG TAGTTCAGCTCTTTTTTC |
| K219A | GCTAAAGTTGCAGAC GCG ATCCAGCTCATC GATGAGCTGGAT CGC GTCTGCAACTTTAGC |
| N336A | GCAGATTGTGTGG GCT GGTCTGTGGGGG CCCCACAGGACC AGC CCACACAATCTGC |
| E343A | GTCCTGTGGGGGTATTT GCA TGGGAAGCTTTTGCCCG CGGGCAAAGCTTCCCAT TGCA AATACCCACAGGAC |
| T375A | GGTGGTGAGAC GCT TGCCACTTGCTGTG CACAGCAAGTGGC AGC GTCTCCACCACC |
| S392A | GTCAGCCATGTG GCC ACTGGGGGTGGTGTG CACCACCCCA GTGCC CATGGCTGAC |
| T393A | CAGCCATGTGAGC GCT GGGGGTGGTGCCAG CTGGCACCACCC AGC GTCCATGGCTG |
| S392A-T393A | GATAAAGTCAGCCATGTG GCCGCT GGGGTGGTGCCAGTTTG CAAAC TGGCACCACCC AGCGGCCA CGTGCAC TTTATC |
| T393del | GATAAAGTCAGCCATGTGAGC --- GGGGGTGGTGCCAGTTTG CAAAC TGGCACCACCC --- GCTCACATGGCTGC TTTATC |
| S398A | CTGGGGTGGTGGC GCT TTGGAGCTCTCG CCAGGAGCTCCAA AGC GGCACCACCCCAAG |

A mutációkat DNS szekvenálattal ellenőriztük (BIOMI Kft., Gödöllő).

4.2.2. *A humán PGK előállítás a citoplazmatikus fehérje expresszióval*

A vad típusú hPGK-t ill. mutánsait is BL21(DE3)-RIL törzsben termeltem. A plazmidot tartalmazó BL21-C+(DE3)-RIL kinőtt telepek közül egyet 20 µl 100 mg/ml ampicillint és 20 µl 30 mg/ml kloramfenikolt tartalmazó 20 ml LB tápoldatba tettem, egy éjszakán át növesztettem. A fehérje termelést 2 l-es Erlenmeyer lombikokban, egyenként 500 ml LB-táptalajjal végeztem, melyhez 5 ml kezdő kultúrát, 500 µl 100 mg/ml ampicillint, és 500 µl 30 mg/ml kloramfenikolt adtam. A kultúrákat 180 rpm sebességgel rázatva, 37 °C-on, kb. 3 órán át $OD_{600}=0,6$ értékig növesztettem, majd 0,5 mM IPTG-vel indukáltam. 4 órán keresztül termeltem az enzimet. Ezt követően 4000 rpm-mel, 15 percig 4 °C-on centrifugálással ülepítettem a kultúrákat és a sejtsapadékat kb. 20 ml NaP_i , 1 mM EDTA, pH=6,2 pufferrel felfuszpendáltam, majd lefagyasztottam és feltárásig -80 °C-on tároltam.

4.2.3. *A vad típusú hPGK és mutánsainak feltárása és tisztítása*

A sejtszuspenziót ultrahangos feltárással (szonikálás) kezeltem ötször 1 percig jégben, a felmelegedés elkerülése érdekében. Ezt követően 12000 rpm-el 4 °C-on 15 percig centrifugálással ülepítettem a sejtszuspenziót. Első lépésben a felülúszót állandó keverés mellett, jeges vízfürdőben lassan telítettem ammónium-szulfáttal 2,3 M koncentráció eléréséig (357 g/l), a csapadékat 12000 rpm-el 4 °C-on 15 percig centrifugálással távolítottam el, majd a felülúszót 3,4 M koncentráció eléréséig (195 g/l) továbbtelítettem. Ebben a lépésben válik ki csapadékként a PGK. A szuspenziót 12000 rpm-el 4 °C-on 15 percig centrifugáltam, majd a csapadékat 20 mM NaP_i , 1 mM EDTA, pH=6,2 pufferben oldottam. Ezután a fehérjeoldatot dializáltam 1 mM merkaptóetanolt tartalmazó 20 mM-os NaP_i , 1 mM EDTA, pH=6,2 pufferrel szemben. A sómentesített fehérjét karboxi-metil-(CM)-Sepharese kationcserélő gyantán oszlopkromatográfiával hidegszobában tisztítottam tovább. 0-1 M közötti NaCl-gradiens elúciót alkalmaztam. A kromatogram alapján SDS-gélelektroforézis segítségével azonosítottam a hPGK-t tartalmazó frakciókat, és azok tisztaságát ellenőriztem. Az előállított fehérje 98 %-os tisztaságú volt. A kísérletekhez a fehérjéket 50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA pufferrel (pH 7.5) dializáltam, mely 1 mM merkaptóetanolt tartalmazott. A PGK-t lefagyasztva -80 °C-on tároltam 0,4 mM-os (20 mg/ml) koncentrációjú preparátumokként. Így hónapokig megőrzi aktivitását.

4.2.4. Fehérjeoldatok koncentrációjának meghatározása

A vad típusú hPGK-ra (44,5 kDa) jellemző fehérje moláris abszorpciós koefficiense (Pace és mtsai alapján számolva) [116] $\epsilon_{280}=27960 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Ezzel az értékkel számoltam a fehérjekoncentrációt mind a vad típusú, mind pedig a mutáns PGK-k esetében ugyanis sem Tyr, sem Trp, sem pedig Cys módosítása nem történt meg.

A GAPDH enzim (145 kDa) esetén mg/ml mértékegységet használtam, ismervé, hogy az 1 mg/ml-es GAPDH oldat abszorbanciája 1 cm-es fényút esetén 280 nm-en 1,0 [117].

4.2.5. Szubsztrátok koncentrációjának meghatározása

4.2.5.1. 3-PG koncentrációjának meghatározása

Meghatározása enzimatikusan történt az enzimaktivitás méréséhez használt reakcióelegyben (4.2.6. fejezet) azzal a különbséggel, az MgATP szubsztrátot és a PGK-t ill. a GAPDH segédenzimet nagy koncentrációban alkalmaztam, hogy a kis koncentrációban (kb. 0,1 mM) alkalmazott 3-PG teljes mennyisége gyorsan átalakuljon. NADH abszorbancia-változását követtem 340 nm-en ($\epsilon_{\text{NADH}, 340\text{nm}}=6220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

4.2.5.2. ATP koncentrációjának meghatározása

Kétféle módon történt: enzimatikusan az előző ponthoz hasonlóan, ATP koncentrációját alacsonyan tartva; továbbá 260 nm-nél határoztam meg a koncentrációját $\epsilon=15400 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ abszorpciós koefficiens felhasználásával.

4.2.5.3. ADP koncentrációjának meghatározása

Enzimátikus meghatározás piruvát kináz és laktát-dehidrogenáz enzimek által katalizált reakció segítségével történt.



A meghatározáshoz a MgADP koncentrációját alacsonyan tartottam, hogy a teljes mennyiség átalakuljon, az enzimeket és a PEP ill. piruvátot pedig magas koncentrációban alkalmaztam, hogy a reakció gyorsan végbemenjen. NADH abszorbancia-változását követtem 340 nm-en.

Az ATP koncentráció-beméréséhez hasonlóan 260 nm-en is elvégeztem a koncentráció meghatározását, ahol az ADP ϵ értéke $15000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

4.2.5.4. 1,3-BPG koncentrációjának meghatározása

Enzimatiskus módszerrel NADH abszorbancia-változását követve 340 nm-en történt a következő reakcióegyenlet alapján, ahol az 1,3-BPG koncentrációját alacsonyan tartottam, hogy teljes mennyisége átalakuljon:



4.2.6. Enzimkinetikai mérések

A kinetikai méréseket 20°C -on, 20 mM Tris-HCl pufferben, 1 mM DTT jelenlétében pH=7,5 végeztem.

4.2.6.1. PGK enzimaktivitás mérése: 3-PG-ből és MgATP-ből kiinduló enzimreakció

A PGK enzimaktivitását 3-PG és MgATP szubsztrátokból kiindulva 340 nm-en NADH oxidációjának követésével GAPDH segédenzimet használva mértem a következő reakció szerint:



Ahhoz, hogy a reakcióban ténylegesen a PGK enzimaktivitását határozzuk meg, az szükséges, hogy a konsekutív reakcióban a PGK által katalizált reakció legyen a sebesség-meghatározó, amit úgy érhetünk el, hogy a GAPDH segédenzimet nagy feleslegben alkalmazzuk.

Az enzimaktivitás szubsztrát koncentrációtól való függésének meghatározásához (szubsztráttelítési görbék) egyik esetben a 3-PG szubsztrát koncentrációját változtatva,

telítési MgATP koncentráció mellett, másik esetben a MgATP szubsztrát koncentrációját változtatva telítési 3-PG koncentráció mellett mértem a vad típusú ill. mutáns hPGK enzimek aktivitását. A vad típusú hPGK (és néhány mutáns PGK) esetében a következő egyenlet írja le az enzimaktivitás szubsztrátkoncentráció függését [110]:

$$v = v_s \cdot \frac{[S]}{K_{S(\text{kat})} + [S]} + v_s \cdot (a-1) \cdot \frac{[S]}{K_{S(\text{kat})} + [S]} \cdot \frac{[S]}{K_{S(\text{akt})} + [S]} \quad 7. \text{ egyenlet}$$

Az egyenlet első tagja írja le a katalitikus hely telítődését a szubsztráttal, abban az esetben, ha nincs aktiválás. Ez a tag megfeleltethető a jól ismert Michaelis-Menten egyenletnek.

Az egyenlet második tagja írja le az aktiváló hely telítődéséből adódó aktivitás-növekedést. A $K_{S(\text{kat})}$ a katalitikus hely, míg a $K_{S(\text{akt})}$ az aktiváló hely disszociációs állandója, a pedig az aktiválási faktor.

A legtöbb mutáns enzim esetén a görbéket egyszerű Michaelis-Menten egyenlettel lehetett illeszteni.

$$v = v_{\text{max}} \cdot \frac{[S]}{K_M + [S]} \quad 8. \text{ egyenlet}$$

4.2.6.2. A pirofoszfát anion enzimaktivitásra gyakorolt hatásának vizsgálata

Állandó, alacsony (0,5 mM) szubsztrátkoncentrációk (MgATP és 3-PG) mellett pirofoszfát anion koncentrációjának függvényében határoztam meg az enzimaktivitást. Mivel a pirofoszfát gátolhatja a GAPDH enzim aktivitását, ezért addig növeltem koncentrációját a reakcióelegyben, míg a PGK aktivitásának további növekedését nem tapasztaltam.

A kísérleti pontokat a vad típusú és néhány mutáns hPGK esetén a következő egyenlettel illesztettem [72].

$$v = v_0 + v_0 \cdot (a-1) \cdot \frac{[A]}{K_{A(\text{akt})} + [A]} - \left\{ v_0 + v_0 \cdot (a-1) \cdot \frac{[A]}{K_{A(\text{akt})} + [A]} \right\} \cdot \frac{[A]^n}{K_{A(\text{inh})} + [A]^n} \quad 9. \text{ egyenlet}$$

Az egyenletben a v_0 az enzim aktivitása anion távollétében adott szubsztrát koncentrációk mellett, a az aktiválási faktor, amely megmutatja, hogy az anion hatására az aktivitás hányszorosára emelkedne, amennyiben gátlás nem lépne fel. Az a egynél nagyobb érték. $K_{A(\text{akt})}$, $K_{A(\text{inh})}$ az anionra vonatkozó látszólagos disszociációs állandók az aktiváló és gátló helyen. Az n a Hill koefficiens, mely a gátlóhelyek számát adja meg, ami a hPGK esetén

$n=2$ -nek adódott. Az egyenlet első tagja az enzimaktivitás anion távollétében, a második tag az anionaktiválás, míg a harmadik (negatív előjelű) tag a gátlásra vonatkozó rész. Az egyenlet tehát akkor ad jó illeszkedést a kísérleti pontokra, amikor anionaktiválás és aniongátlás jelensége is megfigyelhető. A vad típusú hPGK-t és néhány mutáns enzim esetén ez volt megfigyelhető, vagyis hogy a többértékű anionok kis koncentrációban aktiválják, nagy koncentrációban pedig gátolják az enzim aktivitását.

A többi mutáns esetén egyszerű aniongátlás jelenségét tapasztaltam. Ezt a viselkedést leíró egyenlet az előbbi egyenletből származtatható oly módon, hogy az aktiválási tagot elhagyjuk.

$$v = v_0 - v_0 \cdot \frac{[A]^n}{K_{A(\text{inh})} + [A]^n} \quad 10. \text{ egyenlet}$$

Az egyenletből származtatható anionra vonatkozó aktiválási és gátlási állandók látszólagos állandók az adott szubsztrát koncentrációra vonatkoznak. A valódi állandókat a következő képlet segítségével lehet kiszámítani, feltételezve az anionok és szubsztrátok közti kompetitív kiszorítást.

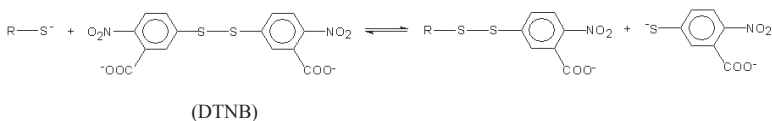
$$K_{A(\text{inh})} = \frac{K_{A(\text{inh})\text{app}} \cdot K_{S(\text{kat})}}{[S] + K_{S(\text{kat})}} \quad 12. \text{ egyenlet}$$

4.2.7. Szubsztrátok kötődését jellemző K_d értékek meghatározása

A kísérleteket 20 °C-on, 50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA pH=7,5 pufferben végeztem.

4.2.7.1. DTNB-vel történő tiol-módosítás módszere

A meghatározás elve az, hogy az enzimen kötött szubsztrátok védő hatást fejtenek ki az enzim tiol-csoportjainak módosításával szemben. Így a módosítás sebességi állandóit meghatározva különböző szubsztrátkoncentrációk mellett a szubsztrátok kötődési görbéit lehet származtatni. 7-10 μM hPGK-t reagáltattam DTNB-vel (Ellman-reagens), mely reakció spektrofotometriásan követhető 412 nm-es hullámhossznál a felszabaduló színes termék (tiolát-anion, $\epsilon=14150 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) révén. A reakciót a 13. egyenlet írja le.



13. egyenlet

A vad típusú hPGK-val való reakció során elsőként a felszínén elhelyezkedő (enzim mólonként 2 db, Cys378 és Cys379) könnyen hozzáférhető, ún. gyorsan reagáló tiol-csoport reagál. Az eltemetett tiol-csoportok (enzim mólonként 5 db) reakciója ennél lényegesen lassabb, sebessége a gyors SH-k módosításához képest elhanyagolható [118].

A tiol-csoport módosítás másodrendű reakciója nagy feleslegben alkalmazott DTNB esetén látszólag elsőrendű folyamat. Ezért a DTNB koncentrációját az enzimmólonkénti viszonyítva minimum hétszeresnek vettem. Szubsztrát (ligandum) távollétében és különböző szubsztrát (ligandum) koncentrációknál mértem a tiol módosítás sebességét. A módosítással szembeni védőhatás mértéke arányos a keletkezett enzim-ligandum komplex mennyiségével, melyből a K_d számítható. A mérési pontok illesztéséhez a következő egyenletet alkalmaztam [70]:

$$k_{\text{mért}} = k_{\text{max}} - \frac{(k_{\text{max}} - k_{\text{min}}) \cdot [\text{L}]}{K_d + [\text{L}]} \quad 14. \text{ egyenlet}$$

A k_{max} , a tiol-csoport módosítás sebességi állandója ligandum távollétében; a $k_{\text{mért}}$ ill. k_{min} a különböző ill. telítési ligandum-koncentrációknál mért módosítási sebességi állandók. Az $[\text{L}]$ pedig a szabad ligandum koncentráció, amit itt helyettesíthetünk a teljes ligandum koncentrációval, mivel az enzimen kötött ligandum mennyisége elhanyagolható a kísérleti körülményeink között.

Ez utóbbi feltétel nem érvényesül az igen szorosan kötődő 1,3-BPG esetén, ezért disszociációs állandóját 3-PG jelenlétében határoztam meg, amely az 1,3-BPG látszólagos disszociációs állandóját $K_d^{\text{app}}(1,3\text{-BPG})$ megnöveli, mivel kompetitíven kiszorítja azt. Az 1,3-BPG valódi K_d -je pedig az alábbi összefüggés alapján számolható:

$$K_d(1,3\text{-BPG}) = \frac{K_d^{\text{app}}(1,3\text{-BPG}) \cdot K_d(3\text{-PG})}{[3\text{-PG}] + K_d(3\text{-PG})} \quad 15. \text{ egyenlet}$$

4.2.7.2. Fluorimetriás titrálás módszere ANS jelenlétében

A mérés alapja, hogy a szubsztrátok (ligandumok) hozzáadására az ANS jelölt hPGK emissziós fluoreszcencia spektrumában jellegzetes változás következik be, mely lehetőséget ad a szubsztrát kötődésének detektálására és így az adott szubsztrátra vonatkozó K_d érték meghatározására [97].

Méréseimben 0,003 mM (0,13 mg/ml) hPGK-t, 0,150 mM ANS-t alkalmaztam. A gerjesztési hullámhossz 350 nm volt, (az emissziós hullámhossz a jelenlévő szubsztrát típusától függött) a kivetta fényúthossza 1 cm volt, a gerjesztési résszélességek 2 és 4 nm-esek voltak, az emissziós résszélesség pedig minden esetben 4 nm volt. Emissziós spektrumokat vettem fel mind a szabad ANS, az enzimkötött ANS valamint a szubsztrátokkal való titrálás során. A fluorimetriás titrálásokat kettős monokromátorral ellátott Peltier termosztáttal felszerelt SPEX Fluoromax-3 spektrofluoriméterben végeztem el. A különböző ligandum-koncentrációk mellett mért fluoreszcencia intenzitás értékekből ($F_{\text{mért}}$) a ligandum disszociációs állandóját a 16. és 17. egyenletekkel számoltam ki. Előbbi arra az esetre vonatkozik, amikor a ligandum hozzáadására a fluoreszcencia-intenzitás csökken, míg a második arra az esetre, amikor az intenzitás növekszik.

$$F_{\text{mért}} = F_{\text{max}} - \frac{(F_{\text{max}} - F_{\text{min}})[L]}{K_d + [L]} \quad 16. \text{ egyenlet}$$

$$F_{\text{mért}} = \frac{(F_{\text{max}} - F_{\text{min}})[L]}{K_d + [L]} \quad 17. \text{ egyenlet}$$

A kinetikai és szubsztrátkötődési mérések kvantitatív kiértékeléséhez a SigmaPlot 6.0 és a Microsoft Excel szoftvereket használtam.

4.2.8. CD spektroszkópia

CD spektroszkópiás mérések segítségével a mutációt tartalmazó hPGK enzimek másodlagos és harmadlagos szerkezetét vizsgáltam a vad típusú enzimhez viszonyítva. A távoli UV tartományban (200-260 nm) végzett mérések a másodlagos szerkezeti elemekről, míg a közeli (260-350 nm) UV tartományban kapott eredmények a harmadlagos szerkezetről adnak felvilágosítást.

Méréseimet JASCO 720 spekropolariméterben végeztem, 0,1 cm-es cellahossz esetén, 0,009 mM (0,4 mg/ml) enzimkoncentráció mellett a távoli, míg 1 cm-es cellahossz

esetén, 0,056 mM (2,5 mg/ml) enzimkoncentráció mellett a közeli UV tartományban. Méréseimet 50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH=7,5 pufferben 20 °C-on, DTT távollétében végeztem.

4.2.9. Differenciális pásztázó mikrokolorimetria (DSC)

DSC mérésekkel meghatározható az enzimek olvadáspontja (T_m), a szubsztrátok hatása a T_m -re és képet kaphatunk a domének együttműködéséről is. A hő hatására történő denaturáció lehet kooperatív, amikor a fehérje doménjei nem külön-külön, hanem egymást „segítve” tekerednek le. A szubsztrátok befolyásolhatják a T_m értékét, a PGK esetében a szerkezet stabilizálásával a magasabb hőmérsékleti tartományokba tolvaa az olvadáspontot.

Méréseimet MicroCal VP-DSC típusú mikrokoloriméterben (MicroCal) végeztem, melynek cellatérfogata 0,51 ml. 0,003 mM (0,13 mg/ml) PGK enzimkoncentrációt és 1 °C/perc felfűtési sebességet alkalmaztam, mintáim 10 mM DTT-t tartalmaztak. A mintacellába az enzimoldatot, a referencia cellába pedig a puffert töltöttem, mellyel szemben az enzimet dializáltam. A minták előzetesen alaposan légtelenítettem és a cellákba buborékmentes töltöttem be. A mintacellában levő enzim-szubsztrát oldat esetén a referenciacella mindazokat a komponenseket tartalmazta, amelyeket a mintacella, az enzim komponens kivételével. Enzim-szubsztrát komplex esetén a szubsztrátot mindig olyan magas koncentrációban alkalmaztam, amit tovább növelve már nem változtatta a T_m -et.

A DSC mérések analíziséhez a Microcal Inc. DSC 5.0 Origin szoftvert használtam. Méréseimet 50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH=7,5 pufferben végeztem.

4.2.10. Izotermális titráló kalorimetria (ITC)

A méréseket a Veszprémi Egyetemen végeztük, Gugolya Zoltán és Vonderviszt Ferenc segítségével.

MicroCal VP-ITC típusú mikrokolorimétert (MicroCal Inc.) használtunk, a méréseket 20 °C-on végeztük. A fehérje és ligandum mintákat 50 mM Tris-HCl, pH=7,5 pufferrel szemben dializáltuk. A mérés előtt a mintákat 1-2 órán át 20 °C-on termosztáltuk, valamint gondosan légtelenítettük vákuumban történő keveréssel. Ezt követte a minták cellákba történő betöltése. A mintacella 0,5-1 mM koncentrációban tartalmazta a PGK-t, a referenciacellába pedig a dializáló puffer mintája kerül. Mindkét cella tartalmát kb. 60 lépésben titráltuk meg egyenként 5 μ l térfogatú ligandumot injektálva, az injektálást 3

percenként ismételve. A cellák térfogata 1,42 ml. A ligandummal való titrálás során mértük a bekövetkező hőváltozást. A puffer titrálásakor kapott kis hőeffektust korrekcióba vettük a fehérjeoldat titrálásakor kapott érték meghatározásánál. Az adatokat MicroCal Origin 5.0 programmal analizáltuk, 1:1 kötődési sztöchiometriát feltételezve.

4.2.11. Kisszögű röntgenszórás (SAXS)

A kisszögű röntgenszórás méréseket a hamburgi szinkrotron mérőállomáson (EMBL Outstation, Hamburg) végeztem. Az adatokat Peter Konarev és Dmitri Svergun analizálta.

A mérésekhez 0,1-0,3 mM-os (5-15 mg/ml) hPGK oldatokat használtam mind a szubsztrátmentes, mind pedig az egyik szubsztrátot tartalmazó biner, ill. mindkét szubsztrátot tartalmazó terner komplexek esetén. A méréseket 50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH=7,5 pufferben 1 mM DTT jelenlétében 20 °C-on végeztem. A SAXS adatok gyűjtése MAR345 képernyőn történt, a minta és a detektor közti távolság 2,4 m volt, a röntgensugár hullámhossza 1,5 Å, a momentum transzfer tartomány értéke $0,012 < s < 0,45 \text{ \AA}^{-1}$ ($s=4\pi\sin(\theta)/\lambda$, ahol 2θ a szóródási szög) volt. A sugárzási károsodás miatt az adatokat kétszer két perces időtartamban gyűjtöttük. Az adatok nem mutattak mérhető változást a szórási képben az expozíciós idő növelésével. Az adatokat átlagolták a beeső sugárnyaláb intenzitásának és a puffer szórásának normalizálását követően. Az adatok feldolgozását a PRIMUS programcsomaggal végezték a hamburgi kollégák. A vad típusú hPGK és annak szubsztrát-komplexei krisztallográfiás szerkezeteiről az elméleti szórási görbéket a CRY SOL program segítségével származtatták. A girációs sugár meghatározása két független módon is megtörtént, a GNOM és Guinier megközelítések felhasználásával.

4.2.12. Molekuláris grafikai analízis

A PGK kristályszerkezetei összehasonlításához, az atomi kölcsönhatások analíziséhez és a szerkezeti ábrák elkészítéséhez Insight II (Biosym/MSI, San Diego, CA, USA) szoftvert használtam.

A következő PGK szerkezeteket analizáltam:

Sertésizom PGK szubsztrátmentes szerkezete, melyet Kovári Zoltántól kaptunk,

B. stearothermophilus PGK*MgADP komplexe, pdb kód: 1PHP [71],

Sertésizom PGK*MgATP komplexe, pdb kód: 1VJC [72],

Sertésizom PGK*ATP komplexe, pdb kód: 1VJD [72],

Sertésizom PGK*3-PG komplexe, melyet a szerzőtől kaptunk [73],
Sertésizom PGK*3-PG*MgAMP-PCP komplexe, pdb kód: 1KF0 [70],
T. maritima PGK*3-PG*MgAMP-PNP komplexe, pdb kód: 1VPE [74],
T. brucei PGK*3-PG*MgADP, pdb kód: 13PK [75].

A H-hídkötés, a hidrofób kölcsönhatás és az ionos kölcsönhatás határértékei rendre 3,5; 4,5 és 4,0 Å-nek választottuk.

4.2.13. *A PGK konzervatív oldalláncainak azonosítása*

A PGK szekvenciák konzervatív oldalláncainak azonosítását kétszer végeztük el: először a munkám elején 2005-ben, majd pedig a kísérletes munkák végeztével, ellenőrzésként, 2008-ban. Mindkét esetben a szekvenciák az ExPASy molekuláris biológiai szerverről származtak. A kétszeres analízis oka az ismert PGK szekvenciák számának jelentős mértékű megnövekedése. Munkánk elején mindösszesen 135 PGK szekvencia állt rendelkezésünkre. Ezek szekvencia-összerendezését a ClustalW program segítségével végeztük el, majd pedig manuálisan megszámloltuk az adott pozícióban egyező ill. különböző oldalláncokat. Konzervatívnak tekintettünk egy oldalláncot 90 %-os vagy afölötti egyezés esetén. 2008-ra azonban az ismert PGK szekvenciák száma 1100 darabra növekedett, így a manuális értékelés lehetetlenné vált. Az oldalláncok konzervativitásának megállapításában számítógépes program volt segítségemre, melyet Kalmár Lajos kollegám írt. Az 1100 darab PGK szekvenciát a ClustalW program segítségével rendeztettük össze, majd a megírt program %-os arányban adta ki az adott aminosav előfordulási valószínűségét egy-egy pozícióban. Az így kapott eredményeket valamint a korábbi manuális kiértékelés eredményeit a mutált oldalláncokra vonatkozóan táblázatos formában foglaltam össze (ld. Eredmények és értelmezésük fejezetben).

4.2.14. *A vad típusú és a mutáns hPGK-k termodinamikai adatainak kiszámítása*

A vad típusú és a mutáns hPGK enzimek kinetikai és kötődési állapotából termodinamikai paraméterek számolhatók. Ezen termodinamikai paraméterekre a továbbiakban a Fersht-féle nevezéktant használom.

A ΔG_s , azaz egy szubsztrát kötődését kísérő Gibbs szabadentalpia változás, a szubsztrát K_d értékéből a következő összefüggés alapján számolható ki:

$$\Delta G_S = -RT \ln \frac{1}{K_d} \quad 18. \text{ egyenlet,}$$

ahol az R az egyetemes gázállandó, T az abszolút hőmérséklet Kelvin-ben kifejezve, K_d pedig a szubsztrát kötődési állandója.

A katalitikus ciklust kísérő teljes szabadentalpia-változást (ΔG_T^\ddagger) a 19. egyenlet fejezi ki.

$$\Delta G_T^\ddagger = \Delta G_S + \Delta G^\ddagger \quad 19. \text{ egyenlet,}$$

ahol ΔG^\ddagger a kémiai lépést kísérő aktivációs szabadentalpia, mely energiabefektetést igényel.

Ezzel szemben a ΔG_S az energetikailag előnyös tagja a 19. egyenletnek.

A ΔG_T^\ddagger értékét a 20. egyenlet alapján számoltam.

$$\Delta G_T^\ddagger = RT \ln \left(\frac{k_B T}{h} \right) - RT \ln \left(\frac{k_{\text{kat}}}{K_m} \right) \quad 20. \text{ egyenlet,}$$

ahol a k_B a Boltzmann állandó, a h pedig a Planck állandó.

A PGK két szubsztráttal működik, viszont az egyik szubsztrátra vonatkozó kinetikai paramétereiket a másik szubsztrát telítési koncentrációja mellett határoztam meg. Amikor az enzimet az egyik szubsztráttal telítjük (másik szubsztrát koncentrációját állandó értéken hagyjuk), akkor a ΔG_T^\ddagger értéke magában foglalja a második szubsztrát kötődését valamint a katalitikus reakciót, melyet a 20. egyenlet ír le. Ebből az értékből, valamint a mindkét szubsztrátra függetlenül meghatározott kötődési szabadentalpiából, a kémiai lépés (ΔG^\ddagger)

szabadentalpia-változása meghatározható a 19. egyenlet alapján. A ΔG^\ddagger értékét függetlenül meghatároztam mindkét szubsztrátra, majd átlagukat vettem, annak érdekében, hogy az adott irányú katalízis energiaigényét jellemezni tudjam.

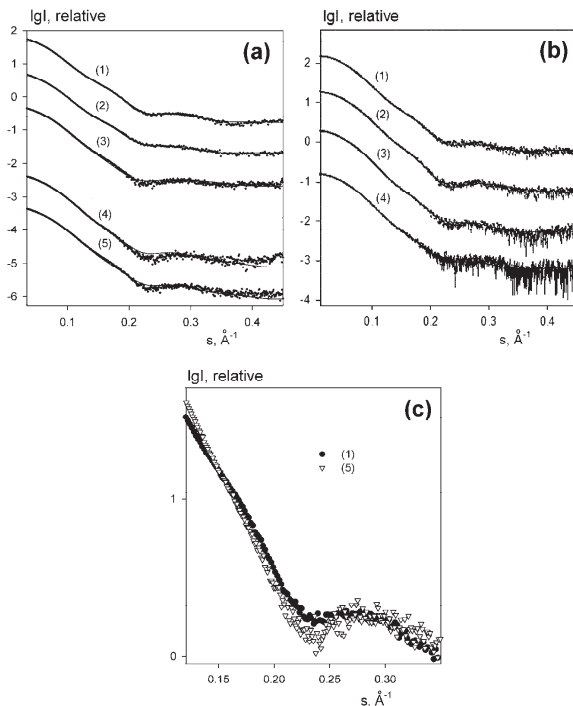
5. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTELMEZÉSÜK

5.1. A PGK doménzáródásához mindkét szubsztrát együttes kötődése szükséges

A PGK doménzáródási mechanizmusának vizsgálatához elsőként azt a kérdést kellett tisztázni, hogy a szubsztrátok egyike vagy másika, illetve mindkettő együttesen képes-e stabilizálni az enzim zárt konformációját. A szubsztrátok random kötődési módja és a mindkét szubsztrátot kötő terner komplexekkel kapott zárt konformációjú kristályszerkezetek (pl. *T. brucei*, *T. maritima*) összhangban voltak azzal a feltételezéssel, hogy mindkét szubsztrát együttes kötődése szükséges a doménzáródáshoz. Ugyanakkor volt arra is példa (a sertésizom PGK esetén), hogy a doménmozgásokat a kristályrácserek megakadályozták és így a terner komplex nyitott konformációban kristályosodott [89]. Ennek alapján indokoltnak látszott az oldott enzimmel kiegészítő kísérletek elvégzése.

A kisszögű röntgenszórás módszere (SAXS) alkalmas a fehérjemolekulák globális konformációjának vizsgálatára és különösen arra, hogy a kristályszerkezetből kapott konformáció oldatban való létezését ellenőrizzük. Amint tárgyaltam (2.3.2.1. fejezet) a PGK esetén korábban végzett SAXS kísérletek nem adtak egyértelmű választ a szubsztrátok hatását illetően, ugyanis vagy csak terner komplexet vizsgáltak (*sertésizom* enzimmél [81]), vagy pedig a biner komplexekre vonatkozóan ellentmondó eredményeket közöltek (*élesztő* PGK esetén [78, 80]). Ezért szisztematikus SAXS méréseket végeztünk a humán PGK különböző enzim-szubsztrát komplexekkel.

A 16.a és b ábrák szemléltetik a szubsztrátmentes hPGK; az egy szubsztrátot (3-PG, MgATP, 1,3-BPG vagy MgADP) tartalmazó biner komplexek és a mindkét szubsztrátot tartalmazó működő (3-PG és MgATP ill. 1,3-BPG és MgADP) ill. nem működő (3-PG és MgADP) terner komplexek kisszögű röntgenszórási görbéit. Az adatokból meghatározott girációs sugár értékek, melyek a molekula alakjáról adnak információt, a 4. táblázatban vannak összefoglalva. A terner komplexek esetén kimutatott girációs sugár csökkenés hasonló mértékű, mint amit akár az élesztő, akár a sertésizom PGK-nál korábban tapasztaltak. Azonban a biner komplexek egyikénél sem volt kimutatható szignifikáns csökkenés a girációs sugárban a szubsztrátmentes enzimhez képest.



16. ábra A hPGK kisszögű röntgenszórási görbéi szubsztrátmentes és szubsztrátokat tartalmazó komplexei esetében [58, 94]

Az (a) és (b) ábrákon az (1) szubsztrátmentes vad típusú hPGK szórási görbéje látható. Az (a) ábrán a reverz irányú reakció szubsztrátjaival a következő sorrendben mutatja a vad típusú hPGK szórási görbéit: (2) 20 mM 3-PG, (3) 10 mM ATP és 12,5 mM MgCl₂, (4) 20 mM 3-PG, 10 mM ATP és 12,5 mM MgCl₂ (működő terner komplex) és (5) 20 mM 3-PG, 2,5 mM ADP és 12,5 mM MgCl₂ jelenlétében (nem működő terner komplex). A (b) ábrán a forward irányú reakció szubsztrátjaival láthatók a vad típusú hPGK szórási görbéi: a (2) 2,2 mM ADP és 12,5 mM MgCl₂, (3) 0,9 mM 1,3-BPG és (4) 2,2 mM ADP, 12,5 mM MgCl₂ és 0,9 mM 1,3-BPG jelenlétében. A (c) ábrán az (a) ábra (1) és az (5) szórási görbéi, azaz egy nyitott állapotú és egy zárt konformációjú komplex együttese látható kinagyítva.

Az adatok további, részletes analizisekor az ismert kristályszerkezetekből számított elméleti szórási görbékhez hasonlítottuk a kísérletes szórási görbéket, χ^2 próbával pedig a legkisebb eltérést kerestük. A 4. táblázat mutatja a számolt értékeket, melyek közül a vastagon szedett jelzi, hogy melyik kristályszerkezet reprezentálja legjobban az oldatbeli konformációt. Ez a kiértékelés kvantitatív képet ad, míg a szórási görbék alakjából kvalitatíve is következtethetünk a doménzáródás bekövetkezésére a következők szerint. A 16.c ábra egy nyitott (16.a ábra 1-es görbéje) és egy zárt (16.a ábra 5-ös görbéje) szerkezet

szórási görbáját hasonlítja össze. A zárt konformáció szórási görbéjére jellemző egy kevésbé kifejezett váll $0,18 \text{ \AA}^{-1}$ környékén és egy erős maximum $0,20\text{-}0,25 \text{ \AA}^{-1}$ környékén.

Értékelve a kísérletes adatokat, csak mindkét szubsztrát jelenlétében (mégpedig a működő terner komplex esetén leginkább) tapasztaltuk a legkisebb χ^2 értéket a krisztallográfiásan meghatározott zárt konformációjú szerkezetekhez viszonyítva. Tehát zárt konformáció csak a terner komplex esetében figyelhető meg, a többi szerkezet nyitott konformációs állapotot képvisel. A nem működő terner komplex esetében is zárulnak a domének, de nem olyan jelentős mértékben, mint a 3-PG és MgATP tartalmú működő komplex esetén. Ezen eredmények, melyek a teljes szórási görbék kvantitatív analizésén alapulnak, egyértelműbbek, mint a korábbi SAXS kísérleteké, melyek csupán a girációs sugár meghatározására szorítottak. Ez egyben azt is jelenti, hogy sem a nukleotid szubsztrát MgATP, sem pedig a szintén átadódó foszfo-csoportot tartalmazó 1,3-BPG önmagában nem képes a doménzáródást előidézni. Eredményeink tehát nem igazolták azt a korábbi kinetikai munkából levont következtetést, hogy az extrém módon szorosan kötődő 1,3-BPG már önmagában stabilizálná a zárt konformációt [108]. Tehát a MgATP ill. 1,3-BPG foszfátláncának flexibilitása, bár közreműködhet az aktív centrum kialakításában, de nem döntő faktor a doménzáródás előidézésében. A zárt aktív konformáció létrejötté csak a mindkét szubsztrát együttes kötődésének, azok együttműködésének köszönhető, jó összhangban az ún. kettős kapcsoló hipotézisünkkel (2.3.2.4.2. fejezet).

5.2. *Az R38 és K215 katalitikus oldalláncok szerepe a doménzáródásban: az R38A és K215A hPGK mutánsok SAXS analízise*

A már szakdolgozati munkám során elkészített DNS konstrukciókból előállítottam mind a K215A, mind pedig az R38A mutáns enzimeket, azért, hogy SAXS kísérletekkel megvizsgáljam ezen mutációk hatását a PGK doménzáródására. Ahogy az Irodalmi áttekintésben tárgyaltam, és korábbi méréseim [87] is alátámasztják, a Lys215 és Arg38 oldalláncok katalitikus szerepűek, melyek nagy valószínűséggel kémiaiilag stabilizálják az enzime reakció során átadódó foszfo-csoportot. Azt is bemutattam, hogy mindkét oldallánc jelentősen elmozdul (kb. 10 ill. 3 \AA -nyit) a domének összezáródásakor. Érdekesnek látszott megvizsgálni, hogy ezen elmozdulásoknak van-e valami közvetlen szerepe a zárt konformáció kialakításában, vagy csupán egy független mechanizmus által irányított doménzáródás következményei.

4. táblázat A kísérletes és az elméleti SAXS adatok összehasonlítása

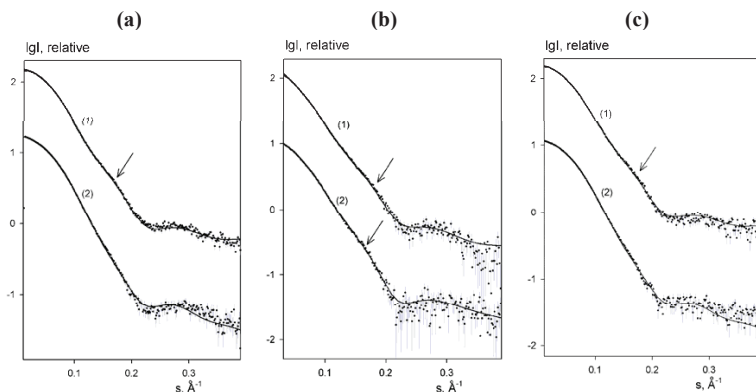
| Enzimek | SAXS mérések | | Az elméleti és a kísérletes adatok négyzetes eltérése (χ^2) | | | | | |
|----------------------------------|----------------------|----------|--|-----------------------------|-------------------------------------|------------------------------------|--|--|
| | R_g (kísérleti), Å | | Nyitott kristályszerkezetek | | | | Zárt kristályszerkezetek | |
| | GNOM | Guinier | <i>Sertésizom</i> PGK (apo) | <i>Bs</i> PGK*MgADP (biner) | <i>Sertésizom</i> PGK*MgATP (biner) | <i>Sertésizom</i> PGK*3-PG (biner) | <i>Tm</i> PGK*3-PG*MgADP (Termer 1) ^b | <i>Tb</i> PGK*3-PG*MgAMP-PNP (Termer 2) ^b |
| Vad típusú hPGK | 23,9±0,5 | 24,2±0,1 | 2,746 | 4,332 | 3,524 | 3,158 | 9,135 | 9,560 |
| hPGK*3-PG | 23,3±0,7 | 23,8±0,2 | 2,678 | 5,329 | 3,297 | 1,958 | 6,052 | 6,125 |
| hPGK*MgATP | 23,2±0,6 | 23,4±0,2 | 3,855 | 2,848 | 2,409 | 3,389 | 3,179 | 3,910 |
| hPGK*MgADP ^a | 23,5±0,7 | 23,7±0,2 | 1,486 | 3,235 | 1,627 | 1,140 | 5,151 | 6,193 |
| hPGK*3-PG*MgATP | 22,5±0,5 | 23,0±0,2 | 6,140 | 6,044 | 4,656 | 5,307 | 2,247 | 1,611 |
| hPGK*3-PG*MgADP | 23,4±0,5 | 23,9±0,2 | 2,303 | 3,522 | 2,795 | 2,049 | 2,018 | 2,922 |
| R38A | 23,8±0,3 | 24,2±0,3 | 2,55 | 2,71 | 2,99 | 2,93 | 5,22 | 5,70 |
| R38A*3-PG*MgATP | 24,0±0,3 | 24,3±0,3 | 1,41 | 1,35 | 1,26 | 1,33 | 1,62 | 1,91 |
| K215A | 23,9±0,3 | 24,3±0,2 | 1,25 | 1,33 | 1,28 | 1,29 | 1,81 | 2,01 |
| K215A*3-PG*MgATP | 22,6±0,2 | 22,9±0,3 | 3,48 | 3,74 | 2,79 | 2,93 | 2,26 | 2,21 |
| R_g (elméleti), Å ^a | | | 24,25 | 24,34 | 24,02 | 23,97 | 23,26 | 22,64 |
| Molekulatömeg, kDa ^a | | | 43,7 | 43,2 | 43,6 | 43,8 | 43,7 | 45,3 |

^a A modellek R_g és molekulatömeg adatai az alábbi PDB kódú fájlok alapján lettek kiszámítva: 1PHP a *Bs* PGK*MgADP, 1VJC a *Sertésizom* PGK*MgATP, 1VPE a *Tm* PGK termer és 13PK a *Tb* PGK termer komplexére. A szubsztitúciós és a 3-PG-t tartalmazó *Sertésizom* PGK szerkezetek PDB fájljait a szerzőktől kaptuk.

^b Termer1: MgAMP-PNP*3-PG, Termer2: MgADP*3-PG

^c A MgADP biner komplex esetén a *Bs* PGK krisztallográfias modellje, a várakozással ellentétben, nem mutatja a legjobb egyezést a mért adatokkal. Ennek valószínű oka a *Sertésizom* PGK szerkezetében (és feltehetően a humán enzim esetén is) jelen lévő extra hurok (Gly128 és Lys145 között), ami hiányzik a *Bs* PGK szerkezetből.

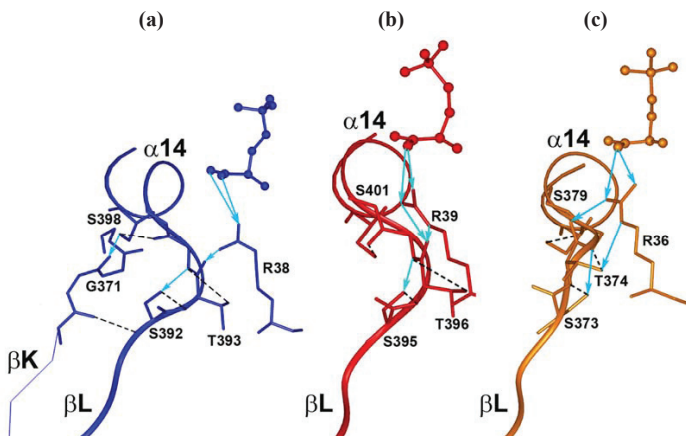
Ezért mindkét mutáns enzimmel kisszögű röntgenszórás méréseket végeztem, egyrészt szubsztrátok távollétében, másrészt a 3-PG és MgATP jelenlétében működő terner komplex esetén (17. ábra). Az eredményeket szintén a 4. táblázatban foglaltam össze.



17. ábra Kisszögű röntgenszórási eredmények a vad típusú hPGK-val és a katalitikus oldalláncok mutánsaival

Az (a), (b) és (c) ábrák (1) számú görbéi a szubsztrátmentes enzimet, (2) számú görbéi pedig a 3-PG és MgATP jelenlétében mért enzim terner komplexek szórási görbéit ábrázolják. Az (a) ábrán a vad típusú hPGK, a (b) ábrán az R38A, a (c)-n pedig a K215A mutáns szórási görbéi láthatók. A nyilak a görbén a nyitott szerkezetre jellemző sajátosságra mutatnak ($0,18 \text{ \AA}^{-1}$ váll-régió).

A szubsztrátmentes enzimformák mindkét esetben természetesen nyitott konformációs állapotot képviseltek. Ezzel szemben a katalitikus, mindkét szubsztrátot tartalmazó terner komplex szerkezete az R38A mutáns esetén nyitott maradt, míg a K215A mutáns esetén záródott. Az eredmények arra utalnak, hogy míg a nagyot mozduló K215 oldalláncnak nincs szerepe a doménzáródásban, addig a kisebb mértékű elmozdulást mutató R38 oldallánc fontos szerepet tölt be abban. Meglepő volt a K215 oldallánc szerepének hiánya, hiszen a MgATP flexibilis γ -foszfátjával való kapcsolata révén fontosnak véltük a doménzáródás folyamatában. Az eredmény azonban összhangban van a MgATP-t kötő biner komplex SAXS analízisekor kapottakkal, azaz, hogy a MgATP nem képes önmagában indukálni a doménzáródást. A K215 nagyléptékű elmozdulása tehát egy független (feltehetően a fő csukló, a β L segítségével működő) doménzáródási mechanizmus következménye lehet. Az R38 szerepét a doménzáródásban viszont éppen a fő csukló β L redővel való közvetlen kapcsolata magyarázza (18. ábra) és nem az átadódó foszfo-csoporttal való kapcsolata.



18. ábra Az Arg38 kölcsönhatásai a 3-PG-vel ill. a β L fő csukló régióval

Az ábrán golyós modellel látható a 3-PG szubsztrát, a redőket szalag diagram jelöli, a szubsztrát kölcsönhatásait a PGK oldalláncával világoskék nyilak szimbolizálják. Az (a) ábrán a sertésizom PGK*3-PG biner komplex, a (b) ábrán a *T. brucei* PGK*3-PG*MgADP, míg a (c) ábrán a *T. maritima* PGK*3-PG*MgAMP-PNP terner komplex szerkezetének részlete látható.

Az R38 oldallánc szerepe a doménzáródásban röviden így foglalható össze: az R38 lényegében a kötött 3-PG hatását továbbítja a fő csukló β L-hez. Az összes 3-PG-t kötő szerkezetben (függetlenül attól, hogy nyitott vagy zárt ill. biner vagy terner komplex) a 3-PG karboxil-csoportja elektrosztatikus kölcsönhatásban van az R38 guanidino-csoportjának egyik NH-csoportján keresztül, a másik NH-csoportja pedig a β L-ben található T393 peptid O-atomjával alakít ki H-híd kapcsolatot. Ez a 3-PG hatására kialakuló kölcsönhatás lényegében kapcsolatot teremt az N- és C-terminális domén között. A H-híd láncolat kiterjesztéseként a β L-ben lévő S392 OH-csoportja H-kötésbe lép az α 14 hélix végén lévő G394 peptid N-atomjával (18.a ábra). A terner komplexekben az R38-nak megfelelő oldalláncok, az R39 (*Tb* PGK) ill. R36 (*Tm* PGK) kölcsönhatásai kiterjednek, itt az oldallánc NE atomja további kölcsönhatást alakít ki a T393-nak megfelelő T396 aminosavmaradékának peptid O-atomjával (*T. brucei* PGK szerkezet, 18.b ábra) ill. a megfelelő T374 oldallánc OH csoportjával (*T. maritima* PGK szerkezet, 18.c ábra). Ez utóbbi kölcsönhatások felvetik annak lehetőségét, hogy az R38 mellett a vele kapcsolatba lépő T393 oldalláncnak is fontos szerepe lehet a két domén együttműködésében és a fő csukló működésében. A továbbiakban ezért ezen oldallánc szerepét külön vizsgáltam (ld. 5.3. fejezet).

5.3. *A fő csuklóként feltételezett L-jelű β -redő és a vele kölcsönhatásban álló régiók aminosav-maradékai szerepének vizsgálata irányított mutagenézissel*

5.3.1. *A humán PGK aminosav-oldalláncainak kiválasztása pontmutációra*

Az L-jelű β -redő doménzáródásban betöltött szerepének tisztázása során kérdésként merült fel, hogy a redő bizonyos aminosav-maradékainak van-e kitüntetett szerepe a doménzáródás mechanizmusában vagy pedig esetleg annak több aminosav-maradéka együttesen működik közre abban. Hasonlóan a kettős kapcsoló hipotéziséhez vezető munkához, továbbra is feltételeztük, hogy a doménzáródás mechanizmusát konzervatív oldallánccok kölcsönhatásainak kell irányítani, hiszen a különböző eredetű (azaz különböző szekvencia-összetételű) PGK enzimek működési mechanizmusa (a doménzáródást is beleértve) feltehetően nagyon hasonló. Ezen megfontolás alapján megvizsgáltuk a β L szekvenciáját, hogy mennyiben szerepelnek benne konzervatív aminosav-maradékok. Munkánk kezdetén 135 PGK szekvencia állt rendelkezésünkre, melyeket összerendezve az egyes oldallánccok konzervativitását vizsgáltuk. Az analízis eredményét az 5. táblázat foglalja össze. A táblázatban összehasonlításként láthatóak a jelen dolgozat készítésének időpontjában megismételt analízis adatai is, mely az azóta eltelt kb. három év alatt 1100 darabra növekedett PGK szekvencia-összehasonlítása alapján készült. A táblázat adatai alapján a PGK fő csuklójaként feltételezett L-jelű β -redő (389-394 szekvenciárészlet) vége és az azt követő szakasz (394-397) egy igen konzervált régióknak látszik.

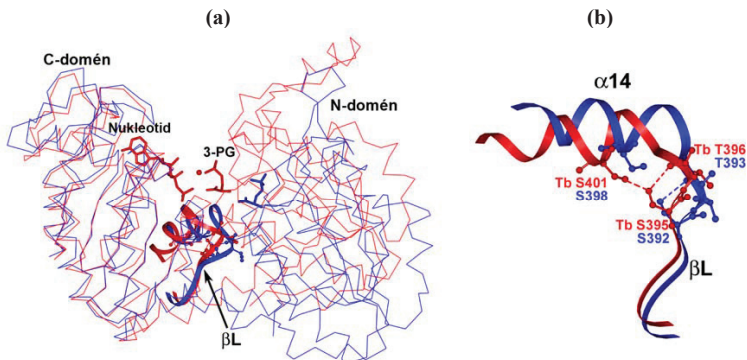
Amint a fentiekben kifejtettem (ld. 5.2. fejezet) a β L T393 aminosav-maradékának nagyon valószínű, hogy kitüntetett szerepe van a két domén együttműködésében és a doménzáródásban. Ezzel a feltételezéssel az oldallánc szekvencia-analízissel talált teljes konzervativitása is jó összhangban áll. Ezért a T393 oldallánc pontmutációval alaninra történő cseréje elsődleges terveim között szerepelt.

Hasonlóan érdekesnek ígérkezett a szekvenciálisan szomszédos, szintén gyakorlatilag teljesen konzervatív S392 mutációja, melynek OH-csoportja a szubsztrát 3-PG kötődésekor alakít ki H-híd kapcsolatot a β L végén lévő konzervatív Gly394 peptid N-atomjával (18. ábra). A csak részlegesen konzervatív His390 (melyet más gyűrűs oldallánccok, Tyr vagy Trp is helyettesíthetnek) szerepét már korábbi mutációs kísérletek alapján ki lehetett zárni a doménzáródásban [119].

5. táblázat A PGK β L régióját alkotó és azt szekvenciálisan követő, valamint azokkal harmadlagos kapcsolatban lévő aminosav-maradékok konzervativitásának mértéke

| Aminosav-maradékok | | Aminosav(ak) előfordulási gyakorisága adott pozícióban | |
|------------------------|---|--|------------------------------------|
| A hPGK szekvenciájában | Helye a másodlagos szerkezeti elemekben | 135 szekvenciát tekintve | 1100 szekvenciában vizsgálva |
| F165 | α 5 | F: 100 % | F: 97,3 % |
| E192 | α 7 | E: 100 % | E: 96,9 % |
| F196 | | L: 48,9 %; F: 39,3 %; I: 10,4 % | L: 61,8 %; F: 16,5 %; I: 10,1 % |
| S389 | | S: 76,3 %; T: 16,3 % | S: 66 %; T: 20 %; G: 5,4 % |
| H390 | β L | H: 63,7 %; Y: 23,7 %; W: 6,7 %; F: 5,2 % | H: 49,1 %; Y: 38,2 % |
| V391 | | I: 52,6 %; V: 45,9 % | I: 67 %; V: 2,7 % |
| S392 | | S: 100 % | S: 96,4 % |
| T393 | | T: 100 % | T: 94,7 % |
| G394 | β L és α 14 között | G: 93,3 %; A: 6,7 % | G:84,2 %; A:12,6 % |
| G395 | | G: 99,3 % | G: 96,6 % |
| G396 | | G: 99,3 % | G: 96,3 % |
| A397 | | A: 97,8 % | A: 95,6 % |
| S398 | α 14 | S: 74 %; F: 25,9 % | S: 50,7 %; F: 37,6 % |

Felvetődött azonban a β L-hez csatlakozó α 14 hélixben lévő S398 szerepének tisztázása, bár ez az oldallánc csak 74 %-ban bizonyult konzervatívnak. A S398 oldallánc kölcsönhatásai ugyanis szintén nagyon érdekesen változnak meg az egyes szubsztrátokkal alkotott komplexekben. Míg a 3-PG-vel alkotott nyitott konformációjú biner komplexben a S398 OH-csoportja az α 13 hélix N-terminálisához kötődik az ott lévő Gly371 peptid N-atommal képez H-kötést (18.a ábra), addig a MgADP-vel alkotott biner komplexben (*B. stearothermophilus* PGK), továbbá a 3-PG*MgADP*PGK terner komplex (*T. brucei*) zárt szerkezetében a megfelelő S398/*Bs*S376/*Tb*S401 OH-csoportja a β L S392/*Bs*S370/*Tb*S395 OH-csoportjával alakít ki H-kötést (19.b ábra). Ezen kötészvariációk szabályozhatják a β L alakjának változását, továbbá az α 14 hélixhez viszonyított relatív helyzetét is, melyek a nyitott és zárt konformációk közötti átmenetre jellemző szerkezet-változások (19.a ábra). Ilyen meggondolások alapján célul tűztem ki az S398 oldallánc mutációját is.



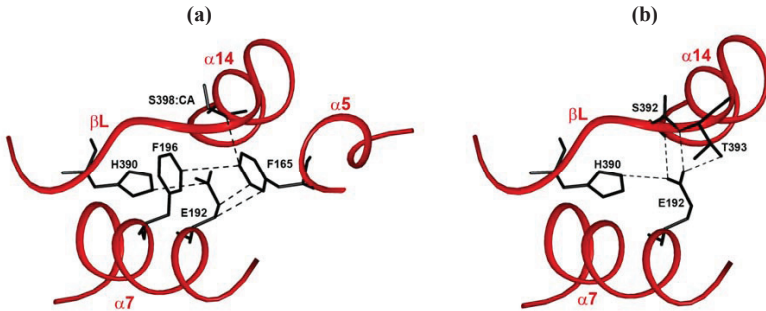
19. ábra A PGK β L redőjének pozíciója nyitott és zárt konformációjú szerkezetben

Mindkét ábrán kék szín jelöli a nyitott konformációs állapotú *sertésizom* PGK*3-PG biner komplex szerkezetét, piros pedig a zárt konformációs állapotú *Tb* PGK*3-PG*MgADP terner komplex szerkezetét. Az összemáslás a C-terminális domén magi β -redői alapján történt. A β L és az α 14 szalagdiagrammal, a szubsztrátok pálcica modellel, bizonyos oldalláncok pedig golyó-pálcica modellel láthatók.

A β L aminosav-maradékainak más másodlagos szerkezeti elemekhez tartozó aminosav-maradékokkal való kölcsönhatásait is számba vettük, hiszen ezek is hozzájárulhatnak pl. a szubsztrátkötőhelyekről a β L felé irányuló konformációs információ terjedéséhez vagy pedig a β L és az egyéb csukló régiók (pl. α 7 hélix végein lévő) közötti összeköttetés megteremtéséhez. Ilyen szempontból a konzervatív oldalláncoknak nemcsak a változó (szubsztrátok kötődésekor kialakuló), hanem az állandó (szubsztrátok kötődésétől függetlenül meglévő) atomi kölcsönhatásai is fontosnak bizonyulhatnak. A 20. ábra szemlélteti a hPGK interdomén régiójának szerkezetét, melyben a β L központi helyet foglal el.

A teljes régiót konzervatív oldalláncok építik fel, melyek között kiterjedt hidrofób (20.a ábra) ill. elektrosztatikus és H-híd (20.b ábra) kölcsönhatások állnak fenn az összes ismert PGK kristályszerkezetben. Különösen érdekesnek látszanak az α 7-hez tartozó E192 oldallánc kölcsönhatásai a β L-ben lévő T393, S392 és H390 oldalláncokkal, továbbá a α 5-höz tartozó F165 oldallánccal. Figyelemre méltó, hogy az E192 és a F165 teljes mértékben konzervatív oldalláncok. A hidrofób kölcsönhatásokhoz a csak részlegesen konzervatív F196 is hozzájárul. A szekvencaanalízisből azonban kiderült, hogy a szekvenciák nagy részében leucin ill. izoleucin, azaz szintén apoláros kölcsönhatásokra alkalmas oldallánc szerepel ezen a helyen. Az élesztő PGK F196L ill. F196W mutánsaival végzett NMR vizsgálatok felvetették, hogy az F196-nak fontos szerepe lehet az interdomén régió mobilitásában [120].

Mindezeket figyelembe véve tervbe vettem az F165, E192 és F196 oldalláncok alaninra történő mutációját is.



20. ábra A PGK doménjei között állandóan fennálló hidrofób, elektrosztatikus és H-híd kölcsönhatások

Az (a) ábra a hidrofób kölcsönhatásokat, míg a (b) az elektrosztatikus és H-híd kölcsönhatásokat mutatja. Piros szalagdiagram jelöli a héliceket és a β L redőt, míg az oldalláncok fekete pálcika modellel láthatók.

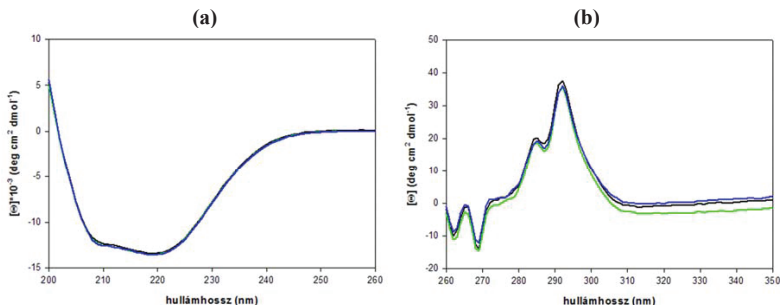
5.3.2. A csukló régió mutánsainak szerkezeti jellemzése

Amikor egy fehérje (enzim) akárcsak egyetlen oldalláncát mutációval kicseréljük, ha kismértékben is, de megbolygatjuk a fehérje háromdimenziós szerkezetét fenntartó atomi kölcsönhatások láncolatát. A kicserélt oldallánc szerkezetfenntartó szerepétől függően kisebb vagy nagyobb szerkezetváltozást idézhet elő a mutáció. Természetesen az ideális eset az lenne, ha a mutáció nem idézne elő szerkezetváltozást, mert ekkor tudnánk teljesen egyértelmű következtetést levonni a kicserélt oldallánc funkcionális szerepéről.

A mutáció esetleges szerkezetváltoztató hatásának ellenőrzésére különféle biofizikai vizsgálatokat (CD, DSC) végeztem az általam előállított hPGK mutánsok esetén. A cirkuláris dikroizmus mérések segítségével (közeli és távoli UV tartományban) a mutáns enzimek spektrumait a vad típusú enzim spektrumához hasonlítottam. A kalorimetriás mérések segítségével pedig, egyrészt az olvadási hőmérsékletek révén, másrészt pedig a hőtmeneti görbe alakja alapján a mutáns enzimek stabilitásáról kaptam információt a vad típusú hPGK-hoz viszonyítva.

5.3.2.1. Cirkuláris dikroizmus mérések (CD)

Cirkuláris dikroizmus (CD) mérések segítségével megvizsgáltam mind a vad típusú mind pedig a mutáns enzimek szerkezetét. Közeli és távoli UV tartományban is felvettem a fehérjeoldatok spektrumait (21. ábra).



21. ábra A vad típusú hPGK és néhány csukló régió mutáns CD spektruma

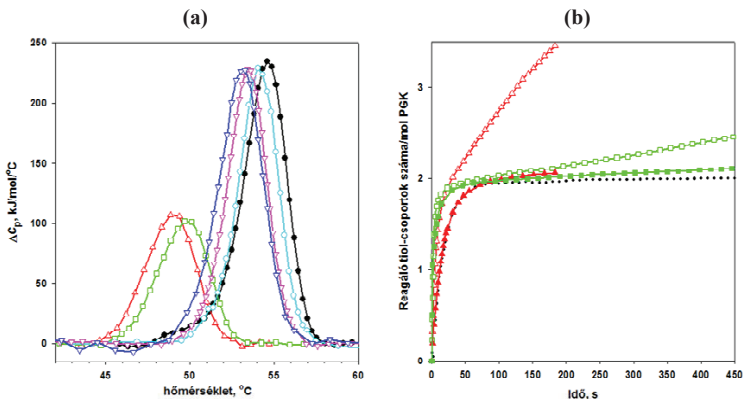
Az (a) ábra a távoli UV, míg a (b) a közeli UV tartományban mért spektrumokat mutatja. Mindkét ábrán a fekete szín a vad típusú hPGK-t, zöld az S392A mutánszt, kék pedig az T393A mutánszt jelöli.

A távoli UV tartományban (200-260 nm) végzett mérések a másodlagos szerkezeti elemekről, míg a közeli UV tartományban (260-350 nm) kapott eredmények a harmadlagos szerkezetről adnak felvilágosítást. Amint a 21. ábrán bemutatott példa bizonyítja, egy-egy oldallánc cseréje a mutáns enzimekben nem okozott kimutatható térszerkezetváltozást a vad típusú enzimhez képest.

5.3.2.2. Kalorimetriás mérések (DSC)

Megvizsgálva mind a vad típusú hPGK, mind pedig annak csukló régióbeli mutánsainak hőkapacitás görbéit, azt tapasztaltam, hogy az olvadási hőmérsékletek (T_m értékek) nem változtak drasztikusan a csukló régió mutánsai esetében (22.a ábra), kivéve a F165A és E192A mutánsok esetét.

A vad típusú hPGK 54,7 °C-os T_m értékéhez képest leginkább a F165A 49 °C-os olvadási hőmérséklete mutatott különbséget, amely a mutáns szerkezeti stabilitásának csökkenésére utal. Ehhez hasonló hőátmenet figyelhető meg az E192A mutáns esetén is. A többi esetben az olvadáspontok csak kevéssel esnek a vad típusra jellemző érték alá (6. táblázat).



22. ábra A fő csukló régió és környeze egyes oldalláncai pontmutásainak DSC és tiol-reaktivitási vizsgálata

Az (a) ábrán a vad típusú hPGK (●), F165A (△), E192A (□), S398A (▽), T393del (∇) és T393A (○) jelölésekkel látható. A (b) ábrán a 9 μ M-os hPGK-t pontozott vonallal ábrázoltam, míg a szubsztrátmentes mutánsok: F165A (△), E192A (□) reakcióját 0,05 mM Nbs₂-vel üres jelölő mutatja, addig a 10 mM 3-PG jelenlétében adott reakciókat tömött jelölők (F165A (▲) és E192A (■)) ábrázolják. A reagáló tiol-csoportok számát 1 mol hPGK-ra az $\epsilon_{412}=14150 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ értékből számoltam és ábrázoltam a reakcióidő függvényében.

A T_m értékének alacsonyabb hőmérsékleti tartományba való eltolódásán túl a szerkezetstabilitás csökkenésére utaló jelenség a hőkapacitásgörbe magasságának és félértékszélességének a megváltozása is. Megfigyelhető az F165A és az E192A mutánsok esetén, hogy a vad típusú hPGK-hoz viszonyítva, görbéik laposabbak és szélesebbek, mely változások a szerkezet fellazulására utalnak. Tehát ezen interdomén régióban elhelyezkedő oldallánccok fontos szerepet töltenek be az egész PGK molekula szerkezeti integritásának fenntartásában. A 20. ábra szemlélteti ezen oldallánccok atomi kölcsönhatásait. Láthatóan stabilizálják az $\alpha 5$ és $\alpha 7$ hélixek és a βL egymáshoz viszonyított térbeli helyzetét az interdomén régióban. Ezen régió szerkezeti stabilitása tehát, a kalorimetriás eredmények szerint, az egész molekula szerkezeti stabilitására hatással van.

A szubsztrátok jelenlétében az összes mutáns olvadási hőmérséklete jelentősen megnő, hasonlóan a vad típusú enzim viselkedéséhez (6. táblázat). Tehát a mutánsok kötik a szubsztrátokat és azok jelentősen stabilizálják a mutánsok szerkezetét is. Egyetlen kisebb különbség a vad típusú enzimhez képest, hogy a mutánsok esetén (az S398 kivételével) a két szubsztrát együttes stabilizáló hatása a termer komplexben alig nagyobb, mint az egyes szubsztrátokat kötő biner komplexekben. Amint az Irodalmi áttekintésben tárgyaltam, a két szubsztrát együttesének megnövekedett stabilizáló hatását korábban bizonyíthatóan

összefüggésbe hozták a doménzáródás bekövetkezésével (2.3.3.2. fejezet). Ez alapján jelen kalorimetriás adatokat tekintve (különösen, ha a mérési hibát is figyelembe vesszük), nehéz lenne eldönteni, hogy a doménzáródás bekövetkezhet-e a mutánsok esetén. A doménzáródás bekövetkezését ezért közvetlen SAXS mérésekkel vizsgáltuk meg (ld. 5.3.4. fejezet).

6. táblázat A csukló régió mutánsainak hőstabilitása és a szubsztrátok stabilizáló hatása a szerkezetükre

A kalorimetriásan meghatározott T_m értékek összefoglalása. Az adatok °C-ban vannak megadva. A meghatározás hibája $\pm 0,5$ °C.

| Enzimek | Szubsztrátmentes | +3PG | +MgADP | +3PG+MgADP | ΔT_m (turner-biner) |
|------------------------|------------------|------|--------|------------|--------------------------------|
| Vad típusú hPGK | 54,7 | 59,1 | 58,9 | 60,5 | +1,4 |
| F165A | 49,0 | 51,9 | 53,8 | 54,8 | +1,0 |
| E192A | 49,9 | 53,2 | 55,6 | 56,5 | +0,9 |
| F196A | 51,3 | 54,4 | 56,6 | 57,7 | +1,1 |
| S392A | 51,6 | 55,1 | 56,7 | 57,3 | +0,6 |
| T393A | 54,1 | 57,2 | 58,5 | 59,5 | +1,0 |
| T393del | 53,4 | 56,5 | 58,4 | 58,4 | 0 |
| S392A-T393A | 51,9 | 54,8 | 56,5 | 57,2 | +0,7 |
| S398A | 53,1 | 58,2 | 58,9 | 60,9 | +2,0 |

5.3.2.3. Enzimszerkezet stabilitásának jellemzése tiol-reaktivitási vizsgálatok segítségével

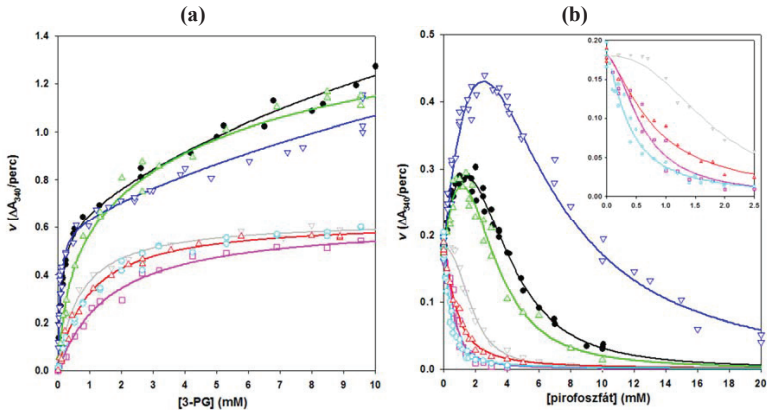
A csukló régió mutánsainak szerkezeti stabilitásáról tiol-reaktivitási vizsgálatokkal is érdekes információkhoz jutottam. Az F165A és E192A mutánsoknál kalorimetriásan kimutatott szerkezet-destabilizálódást a tiol-reaktivitási vizsgálatok is alátámasztották. Ahogyan az a 22.b ábrán látható, ezen mutánsok esetében az eltemetett tiol-csoportok sokkal reaktívabbá válnak a vad típusú hPGK-hoz viszonyítva. A hPGK szerkezetében két felszíni, gyorsan reagáló SH-csoporton kívül még öt, a szerkezetben eltemetett helyzetű, lassan reagáló tiol-csoport van [118]. Ezen utóbbiak Ellman-reagenssel való reakciója válik gyorsabbá az F165A és az E192A mutánsok esetén a vad típusú enzimhez képest, ami egyértelműen a szerkezet fellazulására utal. Viszont amikor 10 mM 3-PG szubsztrát jelenlétében végeztem el a kísérleteket, akkor azt tapasztaltam, hogy a szubsztrát jelenléte ellensúlyozza a mutáció okozta destabilizációt. A szubsztrát jelenlétében bekövetkező szerkezeti stabilizációt a szerkezetben eltemetett SH-csoportok reakciójának lelassulása jelzi (tömött jelekkel ábrázolva). Az a tény, hogy a szubsztrátok képesek a mutáció okozta szerkezeti fellazulást ellensúlyozni, abban is megnyilvánul, hogy az F165A és E192A mutánsok viszonylag jó katalitikus hatékonysággal rendelkeznek (lásd 5.3.3.1. fejezet).

5.3.3. *A csukló régió mutánsainak enzimkinetikai és szubsztrátkötődési vizsgálata*

5.3.3.1. *Kinetikai vizsgálatok a csukló régió mutánsaival*

A mutációk hatásának vizsgálatakor az egyik legfontosabb a funkcionális tulajdonságok jellemzése. A β L és az azt körülvevő régió pontmutánsainak viselkedése enzimkinetikai vizsgálatok során igen változatos képet mutatott. Ha az enzim aktivitását az egyik szubsztrát növekvő koncentrációjának függvényében vizsgáltam (míg a másik szubsztrát koncentrációját állandó, telítési értéken tartottam), akkor egyes mutánsok (S392A és S398A) a vad típushoz hasonlóan a szubsztrátfelesleg-aktiválás jelenségét mutatták, míg a többi mutánsnál ez hiányzott. Az utóbbi esetekben a növekvő szubsztrátkoncentráció függvényében ábrázolt reakciósebességi adatokat egyszerű Michaelis-Menten egyenlettel lehetett illeszteni (23.a ábra). Az anionaktiválás-gátlás vizsgálatokban a vad típusra jellemző viselkedést (azaz hogy a kis koncentrációban alkalmazott többértékű anion aktivál, míg nagy koncentrációban gátol) szintén ugyanazon két esetben, csak a S392A és az S398A mutánsoknál tapasztaltam. Az összes többi mutáns esetén az anionok nem aktiválják, csupán gátolják az enzimreakciót (23.b ábra).

A 23.b ábrán az is megfigyelhető, hogy az S398A normalizált görbéje a vad típusú enzimhez viszonyítva jóval nagyobb maximális aktivitást ér el, mely aktivitást csak nagyobb pirofoszfát koncentrációnál veszíti el. Tehát, furcsa módon, az S398A mutáns enzimet az anionok nagyobb mértékben aktiválják, mint a vad típusú enzimet. Ez annál is inkább meglepő, mert sem a pirofoszfát gátlási állandója (7. táblázat), sem pedig a szubsztrátfelesleg aktiválás mértéke nem különbözik a vad típusú enzimmél meghatározottól. A kísérleti eredmények azt mutatják, hogy az interdomén régióba bevezetett mutációk a legtöbb esetben megváltoztatják a vad típusú PGK-ra jellemző anion-, és szubsztrát-okozta aktiválási jelenségeket, habár a mutált oldalláncok egyike sem vehet részt közvetlenül az aktiváló anionok vagy szubsztrátok megkötésében. Az interdomén régióba bevezetett módosítások bizonyára megzavarják a domének közötti kommunikációt, a doménzáródás folyamatát. Az a tény, hogy ezt az anionaktiválási tulajdonság megváltozása is kíséri, alátámasztja a feltételezésünket, hogy az anionaktiválás és a doménzáródás egymással szorosan összefüggenek. Elképzelhető, hogy az S398 mutációja éppen olyan módon zavarja meg az interdomén régiót, hogy az anionaktiválás még kifejezettebbé válik.



23. ábra A fő csukló régióban végzett pontmutációk hatása a hPGK kinetikai viselkedésére

Az (a) ábrán a 3-PG koncentrációjának függvényében láthatóak a mért enzymaktivitások 10 mM MgATP jelenlétében (melyet 10 mM ATP és 12,5 mM MgCl₂ hozzáadásával készítettem) a következő jelölések szerint: 8 nM vad típusú hPGK (●), 7,1 nM S392A (△), 32,4 nM S398A (▽), 6,7 nM F165A (△), 30,8 nM T393A (○), 2,9 nM F196A (▽), 107 nM S392A-T393A (□). A 7. és 8. egyenleteket alkalmaztam a kísérleti pontok illesztésére. A (b) ábrán a pirofoszfát általi aktiválás és gátlás kinetikája látható. A kísérleteket 0,5 mM 3-PG és 0,5 mM MgATP-vel (0,6 mM ATP és 1 mM MgCl₂ hozzáadásával) végeztem. A következő enzymkoncentrációkat alkalmaztam a kísérletekben: 10,7 nM vad típusú hPGK (●), 8,2 nM S392A (△), 65,4 nM S398A (▽), 4,4 nM F165A (△), 15,2 nM T393A (○), 4,8 nM F196A (▽), 155,9 nM S392A-T393A (□). A kísérleti pontokat a vad típusú hPGK, az S392A és az S398A mutáns esetén a 9. egyenlettel illesztettem, míg a többi esetben a 10. egyenletet alkalmaztam. A kinetikai állandók értékeit az 7. táblázatban foglaltam össze.

A csukló régió mutánsainak kinetikai állandóit a 7. táblázat összegzi. A mutációk általában a katalitikus aktivitás csökkenését eredményezték, bár egyes mutások (F196A, S392A és S398A) aktivitása nagyságrendileg megközelíti a vad típusú enzymét. A szubsztrátok K_m értékei általában megnőnek, kivéve az S398A mutánsnál, amely ebből a szempontból is a vad típusú enzymhez hasonlóan viselkedik. Az enzymek számított katalitikus hatékonysága (k_{kat}/K_m) a legtöbb esetben jelentős csökkenést mutat a vad típusú enzymhez viszonyítva. A legerőteljesebb hatást, a k_{kat}/K_m két nagyságrendnyi csökkenését, a T393A mutáns mutatta. Mindenesetre, a csukló régióban végzett mutációk egyik esetben sem vezettek olyan drasztikus, több mint három nagyságrendnyi aktivitásvesztéshez, mint amit a katalitikus oldalláncok, a R38 vagy K215 mutációja okozott.

Feltételeztük, hogy a csukló régióknak nem egyetlen oldallánca, hanem azok együttese felelős a csukló működéséért. Ezért elkészítettem az S392A-T393A kettős mutáns. Ennek aktivitása és katalitikus hatékonysága jóval alatta maradt a T393A mutánsénak, pedig az S392A mutáció önmagában alig rontotta el a katalitikus tulajdonságokat. Ebből az következik, hogy az egyes oldalláncok kumulatív hatása érvényesül a csukló működésekor.

7. táblázat A csukló régió mutánsainak enzimkinetikai és szubsztrátkötődési állandói

| Állandók ^a | | PGK formák | | | | | | | | |
|-----------------------|--|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| | | hPGK | F165A | E192A | F196A | S392A | T393A | S398A | S392A-T393A | T393del |
| Kinetika | k_{cat} | 833±50 | 270±20 | 155±3 | 610±20 | 575±2 | 58±3 | 200±2 | 16,4±0,7 | 0,067±0,050 |
| | K_{cat}^{MgATP} vagy K_m^{MgATP} | 0,11±0,02 | 0,83±0,07 | 0,24±0,01 | 0,33±0,02 | 0,078±0,041 | 0,86±0,15 | 0,030±0,003 | 0,66±0,05 | 0,13±0,04 |
| | K_{cat}^{3PG} vagy K_m^{3PG} | 0,05±0,01 | 0,95±0,08 | 0,53±0,09 | 0,69±0,05 | 0,32±0,19 | 0,99±0,06 | 0,062±0,010 | 1,66±0,13 | 0,11±0,05 |
| | k_{cat}/K_m^{MgATP} | 7,6*10 ⁶ | 3,3*10 ⁵ | 6,5*10 ⁵ | 1,8*10 ⁶ | 7,4*10 ⁶ | 6,7*10 ⁴ | 6,7*10 ⁶ | 2,5*10 ⁴ | 5,2*10 ² |
| | k_{cat}/K_m^{3PG} | 1,7*10 ⁷ | 2,8*10 ⁵ | 2,9*10 ⁵ | 8,8*10 ⁵ | 1,8*10 ⁶ | 5,9*10 ⁴ | 3,2*10 ⁶ | 9,9*10 ³ | 6,1*10 ² |
| | Anion aktiválás | + | - | - | - | + | - | + | - | - |
| Kötődés | K_i^{MgATP} | 0,33±0,15 | 0,76±0,20 | 0,33±0,09 | 0,83±0,09 | 0,65±0,20 | 0,64±0,21 | 0,43±0,08 | 0,43±0,05 | 0,66±0,08 |
| | K_d^{MgADP} | 0,029±0,004 | 0,006±0,004 | 0,011±0,003 | 0,025±0,004 | 0,040±0,007 | 0,031±0,002 | n.m. | 0,062±0,020 | 0,010±0,005 |
| | K_d^{3PG} | 0,035±0,008 | 0,045±0,010 | 0,045±0,010 | 0,073±0,01 | 0,12±0,02 | 0,16±0,02 | 0,034±0,006 | 0,12±0,04 | 0,044±0,030 |
| | $K_d^{1,3BPG}$ | 0,000056±0,000024 | n.m. | 0,00040±0,00010 | 0,00013±0,00006 | 0,00016±0,00004 | 0,00051±0,00020 | n.m. | 0,00024±0,00005 | 0,000085±0,000040 |
| | $K_i^{pirofoszfát}$ | 0,22±0,07 | 0,29±0,08 | 0,12±0,04 | 0,98±0,15 | 0,80±0,10 | 0,11±0,05 | 0,18±0,07 | 0,18±0,07 | n.m. |

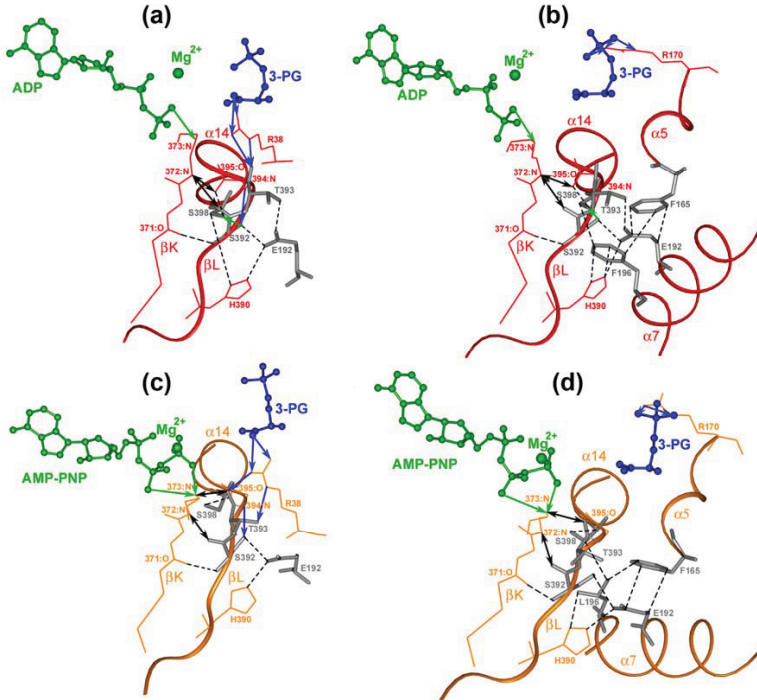
^a A sebességi és az egyensúlyi állandók s⁻¹ ill. mM, míg a katalitikus hatékonyság M⁻¹s⁻¹ mértékegységben vannak kifejezve.
n.m.: nincs meghatározva

A β L redő szerepének további vizsgálatára készítettem egy deléciós mutáns is. Kitérőttem a T393 oldalláncot, ami által a redő megrövidült és ez valószínűleg befolyásolta az alakjának megváltozását a szubsztrátok kötődésekor. Ez a módosítás a katalitikus aktivitás minden eddig tapasztaltnál nagyobb mértékű csökkenéséhez vezetett, viszont a szubsztrátokra vonatkozó K_m értékek, meglepő módon, egyáltalán nem változtak meg a vad típusú enzimhez képest. Ez a mutáció azt a speciális (szélső) esetet testesíti meg, amikor a mutáció stabilizálja a nyitott konformációjú enzimszerkezetet. A másik szélső esetre, amikor a katalitikus hatékonyság nem változik, de a K_m értékek igen [42]; a hPGK-val végzett mutációk nem szolgáltattak példát. A többi mutáns a két szélső eset közti pozíciót mutatja, vagyis mind a katalitikus aktivitás, mind pedig a szubsztrát K_m értékek megváltoztak. A T393del mutánssal kapott eredmény hangsúlyozza nemcsak ezen oldallánc, hanem a β L redő mint fő csukló régió hosszának és alakjának fontosságát is a PGK működésében. Amint már fentebb kifejtettem, a C-terminális domén T393 oldallánca kölcsönhatásba lép az N-doménbeli R38 3-PG-kötő oldallánccal. Ezáltal nemcsak közvetlen kapcsolat jön létre a két domén között, hanem így jut el a 3-PG szubsztrátkötőhelyről kapott információ a β L-hez mint fő csuklóhoz (24.a és c ábrák).

Ellenpólust képvisel a doménzáródásban betöltött funkciója alapján a S398 oldallánc, mivel a S398A mutáns kinetikai tulajdonságait tekintve a vad típushoz képest lényegileg nem változott. Tehát kizárhatjuk, hogy a S392 oldallánccal kialakuló kölcsönhatásának, mely az ADP tartalmú PGK kristályszerkezetekben látható, bármilyen szerepe is lenne az enzim működésében.

Az F165, az E192 és az F196 oldalláncok szerepet játszanak a csukló működésében, mivel mutációik a katalitikus hatékonyság csökkenéséhez vezettek. A szubsztrátok K_m értékei közül főként a 3-PG-jé növekedett meg (szemben a MgATP-jével), amely azt mutatja, hogy a 3-PG okozta konformációs változás továbbvitelében játszanak fontosabb szerepet. Ahogy már az Irodalmi áttekintésben is tárgyaltam (2.3.2.2. fejezet), a 3-PG 3-foszfát csoportja révén közvetlen kölcsönhatásba lép az $\alpha 5$ hélixben lévő R170 oldallánccal. A kölcsönhatás révén a 3-PG kötődésekor meghúzza az $\alpha 5$ hélixet és vele együtt a szintén $\alpha 5$ -beli F165 gyűrűjét is. Ez kihat a gyűrűvel hidrofób kapcsolatban lévő $\alpha 7$ hélixben elhelyezkedő E192 helyzetére is. Ez utóbbi pedig közvetlen H-híd és elektrosztatikus kölcsönhatásban áll a S392-vel és a H390-nel, melyek már a β L alkotói. Így tehát az F165 és az E192 oldalláncok fontos szereplői a 3-PG hatásának β L régió felé való továbbításában (24.b és d ábrák). Továbbá a kalorimetriás vizsgálatok alapján nemcsak az interdomén régió, hanem az egész molekula szerkezeti integritásának fenntartásáért is felelősek. Összességében

a csukló régió mutált oldalláncainak nem egyedi, hanem kumulatív szerepük valószínűsíthető a doménzáródásban.



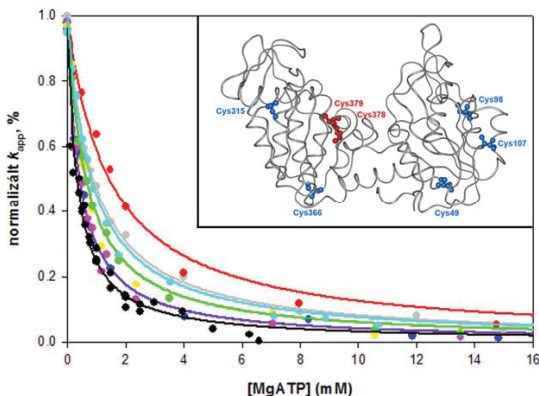
24. ábra A PGK fő csukló régiójának kölcsönhatásai

Az (a) és (b) ábra a *Tb* PGK*3-PG*MgADP, míg a (c) és (d) ábra a *Tm* PGK*3-PG*MgAMP-PNP szerkezetét ábrázolja. A szubsztrátok és a Mg²⁺ golyós modellel, a hélixek szalag diagrammal, a mutált oldallánccok szürke szimlel láthatók. Az oldallánccok számozása a hPGK szekvenciájának megfelelő. Az állandó kölcsönhatásokat fekete szaggatott vonalak, szubsztrátok hatására kialakulókat a szubsztrátoknak megfelelő színű nyilak, míg a csak terner komplexekben kialakuló kölcsönhatásokat kettős fekete nyilak jelölik.

5.3.3.2. Kötődési vizsgálatok a csukló régió mutánsaival

Mivel a szubsztrátok *K_m* értékei több esetben jelentősen megnöttek a csukló régió mutánsainál, ezért megvizsgáltam, hogy az egyes szubsztrátokkal való kölcsönhatások már a biner komplexekben is gyengülnek-e. A szubsztrátokra vonatkozó kötődési állandók meghatározására kétféle módszert használtam, a fluorimetriás titrálást ANS-jelzett enzimmel, illetve a tiol-reaktivitás mérésen alapuló módszert. Mindkét módszert részletesen

ismertetem az Anyagok és Módszerek fejezetben. Itt a tiol-reaktivitás módszerének használatára mutatok be példát (25. ábra). A 25. ábra betétábrájában látható (pirossal) a két reaktív ciszteinil-oldallánc elhelyezkedése a PGK molekulában, az α 13 hélixben. Ez a két tiol-csoport a szubsztrátmentes enzimben (akár vad típusú, akár mutáns) felszíni csoportként viselkedik és a szabad cisztein aminosavval összehasonlítható sebességgel reagál az Ellman-reagenssel [118]. Szubsztrátok, pl. MgATP jelenlétében a kialakuló enzim-szubsztrát komplex koncentrációjával arányosan csökken a tiolok reaktivitása (25. ábra). Tehát a módosítás sebességi állandójának csökkenése egyenesen arányos a kialakult enzim-szubsztrát komplex koncentrációjával. Ezen összefüggés ismeretében tehát a szubsztrát enzimhez való kötődésének disszociációs állandója meghatározható (ld. Anyagok és Módszerek 4.2.7.1. fejezete).



25. ábra A Cys oldalláncok elhelyezkedése a szerkezetben és ezek módosítási vizsgálata Ellman reagens segítségével

A betétábrán a PGK reaktív, felszíni SH-csoportjai láthatók pirossal, az eltemetett, lassan reagálók pedig kék színnel. A nagy ábra a csukló régió mutánsainak MgATP kötődési görbéit ábrázolja 0 és 100% közötti értékre normalizálva. A színek az alábbi mutánsokat jelölik: 8,8 μ M F165A (●), 7,7 μ M S398A (●), 9 μ M F196A (●), 7,8 μ M S392A-T393A (●), 9,3 μ M T393del (●), 8,9 μ M S392A (●), 8,9 μ M T393A (●) és 9 μ M vad típusú hPGK (●).

Részben ezzel a módszerrel, részben pedig az ANS-sel jelzett PGK fluorimetriás titrálásával meghatározott disszociációs állandók értékei a csukló régió mutánsai esetében a 7. táblázatban vannak összefoglalva. Ebből megállapíthatjuk, hogy a szubsztrátokra vonatkozó kötődési állandók általában nem változtak lényegesen (azonos nagyságrendűek maradtak) a vad típusú hPGK-hoz viszonyítva. Tehát a mutánsok K_m értékeiben tapasztalt változások (7. táblázat) nem a K_d -értékek megváltozásának tulajdoníthatók, hanem inkább a működő terner komplexben a két szubsztrát kölcsönhatásokor bekövetkező változásoknak.

5.3.4. *A csukló régió mutánsainak kisszögű röntgenszórás vizsgálata*

Az egyes oldalláncok doménzáródásban betöltött szerepét közvetlenül a mutánsokkal végzett kisszögű röntgenszórás (SAXS) kísérletekkel vizsgáltam meg.

Ahogy már az 5.1. fejezetben részleteztem a vad típusú hPGK-val végzett SAXS vizsgálataink bizonyították, hogy mindkét szubsztrát együttes jelenléte szükséges a doménzáródás bekövetkezéséhez. Azaz a szubsztrátmentes PGK nyitott, míg a mindkét szubsztrátot tartalmazó terner komplex zárt konformációs állapotot képvisel a vad típusú enzim esetén.

A SAXS méréseket a mindkét szubsztrátot tartalmazó terner komplexekkel végeztük. A vizsgált csukló régió mutánsok közül egyedül az S398A mutáns viselkedett a vad típusú enzimhez hasonlóan, mely bizonyította, összhangban a kinetikai méréseinkkel, hogy ezen oldalláncnak nincs közvetlen szerepe a doménzáródásban (8. táblázat).

A másik szélső állapotot a T393del mutáns testesítette meg, melynél a vizsgált terner komplex a szubsztrátmentes apo állapothoz hasonlóan teljesen nyitott konformációs állapotot képviselt. Tehát a T393 oldallánc kitörlése drasztikus változást idézett elő a doménzáródásban, összhangban a katalitikus hatékonyság nagyarányú csökkenésével.

A többi vizsgált csukló régió mutáns hPGK átmeneti, részlegesen zárt állapotot képvisel, csak az egyik szubsztrátot tartalmazó (biner) komplex kristályszerkezetek elméleti szórási görbéihez hasonlítanak a terner komplexeik szórási görbéi. Ez az eredmény jól leírható az enzimkinetikai mérések alapján kialakított képpel, azaz hogy ezen oldalláncok kumulatív, együttes szerepe a meghatározó a doménzáródás létrejöttében.

5.4. *A szubsztrátkötőhely oldalláncainak szerepe a doménzáródás folyamatában*

A kettős molekuláris kapcsoló hipotézisünk, ahogyan már az Irodalmi áttekintésben is részleteztem, a szubsztrátkötő helyek felől induló kettős H-híd láncolat kialakulását feltételezi, mely a fő csukló régiónál, a β L redőnél olvad össze ill. teljeseedik ki és okoz markáns változást a redő konformációjában, ami azután a domének relatív pozíciójának megváltozásához vezet. Az „információ-átadás” kiindulópontjai tehát a szubsztrátkötő zsebek. A 3-PG-t kötő oldalláncok közül az R38 fontos szerepét a doménzáródásban a fentiekben bemutatott kísérleti adataim egyértelműen bizonyították (ld. 5.2. fejezet). Ezen kívül még nagyon valószínű, hogy hozzájárulhat a doménzáródáshoz az α 5 hélixben lévő R170 is, amely a 3-PG foszfátcsoportját köti (24.b és d ábrák).

8. táblázat **Kisszögű röntgenszórás mérések a csukló régió mutánsaival**^a

| SAXS mérések | | A kristályszerkezeti modellek és a kísérletes adatok szórási görbéje közti négyzetes eltérés | | | | | | |
|------------------------------------|----------------------|--|-----------------------------------|--------------------------------|---|--|---|---|
| Enzim-szubsztrát termer komplex | R_g (kísérleti), Å | | Nyitott kristályszerkezetek | | | | Zárt kristályszerkezetek | |
| | GNOM | Guinier | <i>Sertésizom</i> PGK (apo) | <i>Bs</i> PGK*MgADP (biner) | <i>Sertésizom</i> PGK*MgATP (biner) | <i>Sertésizom</i> PGK*3-PG (biner) | <i>Tm</i> PGK (Termer1) ^c | <i>Tb</i> PGK (Termer2) ^c |
| Vad típusú hPGK | 22,5±0,5 | 23,0±0,2 | 6,14 | 6,04 | 4,66 | 5,31 | 2,25 | 1,61 |
| E192A | 23,7±0,3 | 23,9±0,2 | 2,89 | 3,01 | 1,99 | 2,27 | 2,79 | 3,43 |
| S392A | 23,8±0,2 | 24,1±0,3 | 1,45 | 1,78 | 1,68 | 1,43 | 2,44 | 2,40 |
| T393A | 23,7±0,3 | 24,0±0,2 | 2,77 | 3,72 | 2,35 | 2,11 | 2,93 | 2,94 |
| S392A-T393A | 23,9±0,2 | 24,1±0,2 | 2,71 | 3,99 | 2,51 | 1,97 | 3,55 | 3,76 |
| T393del | 23,8±0,2 | 24,1±0,3 | 1,27 | 1,45 | 1,29 | 1,28 | 1,83 | 1,95 |
| S398A | 22,7±0,3 | 23,0±0,2 | 3,99 | 4,02 | 3,25 | 3,45 | 1,96 | 1,40 |
| R_g (elméleti), Å ^b | | | 24,25 | 24,34 | 24,02 | 23,97 | 23,26 | 22,64 |
| Molekulatömeg, kDa ^b | | | 43,7 | 43,2 | 43,6 | 43,8 | 43,7 | 45,3 |

^a Vastagon szedve a legjobb egyezés látható a krisztallográfias modell és a SAXS mérések között a legkisebb négyzetes eltéréssel számítja.

^b A modellek R_g és molekulatömeg adatai az alábbi PDB kódú fájlok alapján lettek kiszámítva: 1PHP a *Bs* PGK*MgADP, 1VJC a *Sertésizom* PGK*MgATP, 1VPE a *Tm* PGK termer és 13PK a *Tb* PGK termer komplexére. A szubsztátmentes és a 3-PG-t tartalmazó *Sertésizom* PGK szerkezetek PDB fájljait a szerzőktől kaptuk.

^c Termer1: MgAMP-PNP*3-PG, Termer2: MgADP*3-PG

Feltételezhető, hogy az R170 hozzájárulása a doménzáródáshoz hasonló lehet a szintén ebben a hélixben található F165 hozzájárulásához, amelynek részleges szerepére tudunk csak következtetni (ld. 6. és 7. táblázatok). Az R170 mutációja tehát nem látszott ígéretesnek, annál is inkább, mert más szerzők már mutációval kicserélték ezt az oldalláncot és megállapították, hogy a 3-PG kötődésében van szerepe, de nem katalitikus oldallánc [121]. A nukleotid kötőhely oldalláncainak vizsgálata viszont annál érdekesebbnek látszott, mivel ezek szerepét mutációval még alig vizsgálták ill. a meglévő közlemények nem tartalmaznak alapos vizsgálatokat [54, 55].

5.4.1. A nukleotidkötőhely oldalláncai doménzáródásban betöltött szerepének vizsgálata irányított mutagenézissel

A nukleotidkötő oldalláncok közül a MgATP kötéséhez hozzájáruló, katalitikus fontosságú K215 oldallánc szerepét a fő csukló régió működésében, azaz a doménzáródásban már a fentiekben megvizsgáltam (5.2. fejezet). Amint tárgyaltam, ezen oldalláncnak nincs a másik katalitikus oldallánchoz (R38) hasonló közvetlen szerepe a doménzáródás létrejöttében, bár közvetett szerepe (az ATP γ -foszfátjával kölcsönhatás által) valószínűsíthető. Éppen ezért célul tűztem ki ill. elvégeztem a többi nukleotidkötő oldallánc, így az α -foszfáttal kölcsönható K219, a β -foszfáttal kölcsönható N336 ill. T375 és a ribózgyűrűvel kölcsönható E343 Ala-ra történő mutációját. Az oldalláncok vizsgálatát az a tény is indokolta, hogy azok, a T375 kivételével, csaknem teljesen konzervatívak (9. táblázat).

9. táblázat A nukleotid kötőhely oldalláncai konzervativitásának mértéke a katalitikus R38-hoz hasonlítva

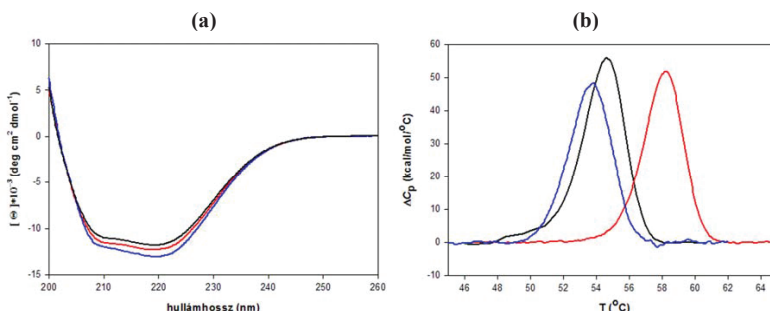
| Aminosavmaradékok | | Aminosav(ak) előfordulási gyakorisága adott pozícióban | |
|------------------------|---|--|------------------------------|
| a hPGK szekvenciájában | Helye a másodlagos szerkezeti elemekben | 135 szekvenciát tekintve | 1100 szekvenciában vizsgálva |
| R38 | α 1 | R: 100 % | R: 95,6 % |
| K215 | α 8 | K: 100 % | K: 97 % |
| K219 | | K: 100 % | K: 91,9 % |
| N336 | β J | N: 100 % | N: 94,3 % |
| E343 | β J és α 12 között | E: 100 % | E: 96,4 % |
| T375 | α 13 | T: 58,9 %; S: 38,5 % | T: 53,2 %; S: 39,7 % |

A 375-ös pozícióban a szekvenciák zömében treonin vagy szerin oldallánc van, melyek azonos természetű funkciók csoportot (OH-csoport) hordoznak, így azonos természetű kölcsönhatásokban képesek részt venni, mindössze méretükben különböznek egymástól. Ennek alapján a hPGK T375 oldalláncának Ala-ra történő mutációját szintén elvégeztem.

5.4.1.1. A nukleotid kötőhely mutánsok szerkezeti stabilitásának vizsgálata

A többi mutánshoz hasonlóan, a nukleotidhely mutánsok esetén is elvégeztem mind a cirkuláris dikroizmus spektroszkópiai vizsgálatokat, mind pedig a DSC kalorimetriás méréseket a szerkezeti stabilitás ellenőrzésére. A 26. ábra mutat példát mindkét típusú mérésre két mutáns és a vad típusú hPGK esetén. Míg a távoli UV tartományban felvett CD spektrumok nem mutattak eltérést egyik mutáns esetén sem a vad típusú enzimhez viszonyítva, addig a DSC mérések tekintetében változatosabb a kép.

A DSC mérések adatait a 10. táblázatban foglaltam össze, ahol összehasonlításképpen a korábban már jellemzett R38A és K215A aktív centrum mutánsokkal végzett hasonló kísérletek eredményeit is feltüntettem. Kiugró értéket képvisel az olvadási hőmérséklet szempontjából egyrészt az R38A mutáns, ahol jelentős destabilizálódás valósult meg, másrészt pedig az N336A mutáns, melynél stabilizációt figyeltünk meg. Ez utóbbi jelenségre szerkezeti magyarázatot nem találtunk, mivel CD spektruma a vad típusú hPGK-val azonosnak adódott. A többi mutáció nem okozott lényeges változást a T_m értékében a vad típusú enzimhez viszonyítva.



26. ábra Nukleotid kötőhelyen létrehozott mutációk hatása a CD spektrumra és a hőstabilitásra. Az (a) ábrán a CD spektrumok, a (b) ábrán a kalorimetriás hőátmenetei láthatók a vad típusú PGK-nak (—), az N336A mutánsnak (—) és a K219A mutánsnak (—). Míg a CD spektrumok tekintetében nincs szignifikáns különbség a mutánsok tekintetében a vad típusúhoz viszonyítva, addig a DSC hőátmenetek destabilizációt mutatnak a K219A mutáns esetén és stabilizációt az N336A mutáns esetén.

Az is megfigyelhető a 10. táblázat adatait tekintve, hogy a szubsztrátok a szerkezetet minden esetben jelentősen stabilizálják, hiszen egyik vagy másik szubsztrát jelenlétében a T_m értékek magasabb hőmérsékleti tartományok felé tolódtak el. Ha viszont megvizsgáljuk, hogy a terner komplex stabilitása megnő-e a biner komplexekhez képest (a táblázat utolsó oszlopa), akkor azt látjuk, hogy ez csak a vad típusú enzimmél ill. a K215A mutánsnál következik be egyértelműen. Korábban bemutattam (5.2. fejezet), hogy a K215A mutáns éppúgy képes doménzáródásra, mint a vad típusú enzim. Ez az eredmény tehát összhangban van azzal a korábbi megállapítással, hogy a doménzáródás és a stabilitásnövekedés szorosan összefüggő jelenségek [93]. Látható az is, hogy a többi mutáns esetén a terner és biner komplexek közötti különbség mértéke sokszor a negatív tartományba tolódik, vagyis a mindkét szubsztrátot kötő terner komplex kevésbé stabil, mint az egyik szubsztrátot tartalmazó biner komplex. Ennek alapján feltételeztük, hogy ezen mutánsoknál nem következik be a doménzáródás. Ezt a feltételezésünket a későbbiekben igazolták a SAXS méréseink eredményei is (ld. alább). Azt tapasztaltuk, hogy viszonylag jó korreláció figyelhető meg a két módszer eredményei között: ahol a kalorimetriásan meghatározott terner és biner komplexek közötti olvadáspont-különbség negatív érték volt, ott a doménzáródás sem következett be.

10. táblázat A szubsztrátkötőhely mutánsainak (DSC) kalorimetriás méréseinek T_m adatai szubsztrátok jelen-, és távollétében

A kalorimetriásan meghatározott T_m értékek összefoglalása. Az adatok °C-ban vannak megadva A meghatározás hibája $\pm 0,5$ °C.

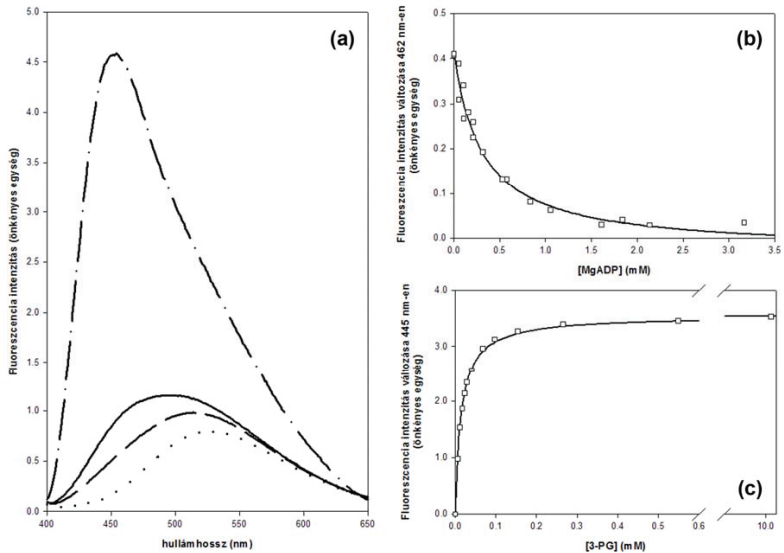
| Enzimek | Szubsztrátmentes | +3PG | +MgADP | +3PG+MgADP | ΔT_m (terner-biner) |
|------------------------|------------------|------|--------|------------|-----------------------------|
| Vad típusú hPGK | 54,7 | 59,1 | 58,9 | 60,5 | +1,4 |
| R38A | 49,0 | 50,1 | 53,8 | 53,6 | -0,2 |
| K215A | 53,5 | 58,2 | 57,4 | 59,2 | +1,0 |
| K219A | 53,7 | 58,4 | 54,9 | 57,3 | -1,1 |
| N336A | 58,2 | 61,4 | 59,4 | 60,9 | -0,5 |
| E343A | 53,3 | 58,5 | 55,9 | 57,6 | -0,9 |
| T375A | 53,6 | 58,1 | 56,5 | 58,4 | +0,3 |

5.4.1.2. Enzimkinetikai és szubsztrátkötődési vizsgálatok a nukleotidkötőhely mutánsokkal

5.4.1.2.1. Kötődési vizsgálatok

A szubsztrátokra vonatkozó K_d értékek meghatározására, hasonlóan a csukló régió mutánsokhoz, itt is két módszert alkalmaztam: az egyik a már ott bemutatott tiol-csoport módosítás módszere Ellman-reagens felhasználásával, míg a másik az ANS jelölés segítségével megvalósított fluoreszcens titrálás módszere. Azért volt szükség a két módszer alternatív alkalmazására, mert a kisebb anyagigényű ANS-jelölés módszere nem minden mutáns esetén szolgáltatott a titrálásra alkalmas nagyságú fluoreszcens jelet. A nukleotidhely mutánsok esetén azonban szerencsére alkalmazható volt: a kötött ANS fluoreszcens jelváltozását jól lehetett detektálni szubsztrátok hozzáadásakor, a szubsztrátmentes enzimhez viszonyítva. Ezt mutatom be a 27. ábrán a T375A mutáns esetén. A szubsztrátok K_d értékeinek kiszámítása a titrálási adatokból a Módszerek 4.2.7.2. fejezetének egyenletei alapján történt.

A nukleotidkötőhely mutáns enzimek esetén a nukleotidokra vonatkozó K_d értékek, ahogyan azt sejteni is lehetett, jelentősen megnöttek, azonban a 3-PG és az 1,3-BPG kötődési állandói nem változtak jelentősen (11. táblázat). Az is megfigyelhető, hogy a K219, N336 és E343 oldalláncok Ala-ra történt mutációi egyaránt gyengítik a MgATP és MgADP kötését, míg a korábban vizsgált K215A mutáns esetében kizárólag csak a MgATP K_d értéke növekedett meg, a MgADP-jé nem változott. A T375A mutáns esetén ennek éppen az ellenkezőjét figyelhetjük meg: a mutáció nem befolyásolta a MgATP K_d értékét, viszont növelte a MgADP K_d -jét. Ezek a kísérletes tények összhangban vannak a kristályszerkezetekből származó információkkal: a K219 mind a MgATP-vel mind pedig a MgADP-vel kapcsolatban áll (azok α -foszfátját köti), továbbá, míg a K215-nek nincs kapcsolata a MgADP-vel, addig a T375-nek a MgATP-vel nincs kapcsolata, így az oldott enzimmel végzett kísérleteim igazolták a kristályszerkezetben tapasztalt kötődési módokat.



27. ábra A T375A mutáns fluorimetriás titrálása az ANS fluoreszcens jel változásának követésével

Az (a) ábra a szabad ANS (---), a PGK kötött ANS szubsztrátok távollétében (—), 10 mM ADP és 12,5 mM $MgCl_2$ jelenlétében (- - -) vagy 10 mM 3-PG (- · -) jelenlétében mutatja a fluoreszcencia emissziós spektrumokat. A (b) és (c) ábrákon MgADP ill. 3-PG koncentrációjának függvényében látható a fluoreszcencia intenzitás. A görbe a legjobb illeszkedést mutatja a kísérleti pontokra (Anyagok és módszerek 4.2.7.2. fejezete).

11. táblázat A kinetikai és kötődési állandók összefoglalása a szubsztrátkötőhely mutánsok és a vad típusú hPGK esetén

| Állandók ^a | | PGK formák | | | | | | |
|-----------------------|-------------------------------|--|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------|
| | | hPGK ^c | R38A ^c | K215A ^c | K219A | N336A | E343A | T375A |
| Kinetika | k_{cat} (V ₀ /a) | 833±50 | 0,45±0,03 | 0,48±0,05 | 0,90±0,07 | 6,0±0,8 | 14,3±1,5 | 125,0±8,3 |
| | K_m^{MgATP} | 0,11±0,02 | 0,96±0,07 | 2,47±0,2 | 4,43±0,51 | 1,34±0,19 | 1,69±0,06 | 1,04±0,06 |
| | K_m^{3PG} | 0,10±0,02 ^b 0,05±0,01 ^c | 4,5±0,4 | 0,41±0,04 | 1,72±0,12 | 0,54±0,04 ^d | 0,31±0,03 ^d | 0,63±0,06 |
| | k_{cat}/K_m^{MgATP} | 7,58*10 ⁶ | 4,69*10 ² | 1,96*10 ² | 2,03*10 ² | 4,48*10 ³ | 8,48*10 ³ | 1,20*10 ⁵ |
| | k_{cat}/K_m^{3PG} | 1,67*10 ⁷ | 1,00*10 ² | 1,18*10 ³ | 5,23*10 ² | 1,11*10 ⁴ | 4,62*10 ⁴ | 1,98*10 ⁵ |
| | Anion aktiválás | + | - | - | - | - | - | - |
| | $K_I^{pirofoszfát}$ | 0,22±0,07 | 0,13±0,09 | 0,51±0,15 | 0,52±0,11 | 0,09±0,06 | 0,14±0,06 | 1,9±0,6 |
| Kötődés | K_d^{MgATP} | 0,33±0,15 | 0,59±0,20 | 1,45±0,15 | 2,65±0,64 | 1,01±0,22 | 1,61±0,23 | 0,22±0,05 |
| | K_d^{MgADP} | 0,029±0,004 | 0,035±0,009 | 0,045±0,007 | 1,96±0,47 | 0,38±0,14 | 0,57±0,10 | 0,30±0,06 |
| | K_d^{3PG} | 0,035±0,008 | 0,94±0,30 | 0,039±0,01 | 0,043±0,001 | 0,054±0,003 | 0,032±0,003 | 0,017±0,005 |
| | $K_d^{1,3BPG}$ | (5,6±2,4)*10 ⁻⁵ | (9,0±2,0)*10 ⁻³ | (5,2±1,9)*10 ⁻⁵ | (8,4±1,0)*10 ⁻⁵ | (1,4±0,4)*10 ⁻⁴ | (2,7±0,5)*10 ⁻⁵ | n.m. |

^a A sebességi és egyensúlyi állandók s⁻¹ ill. mM mértékegységben vannak megadva.

^b 10 mM MgATP jelenlétében mérve

^c 2,5 mM MgATP jelenlétében mérve

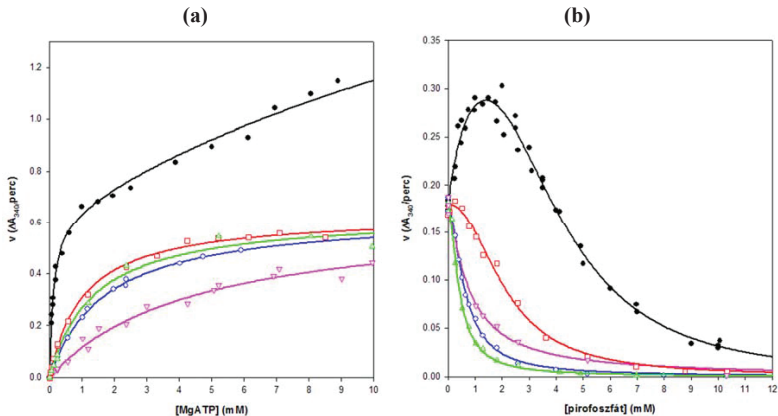
^d 4,0 mM MgATP jelenlétében mérve

n.m. nincs meghatározva

^e [87]

5.4.1.2.2. Kinetikai vizsgálatok

Hasonlóan a csukló régió mutánsokhoz, a nukleotid kötőhely mutánsok esetén is elvégeztem azon kinetikai méréseket, melyek a mutáns enzimek enzimaktivitásáról (k_{kat}), kinetikai állandóiról (K_m értékek), a hPGK sajátos kinetikai viselkedéséről adnak információt. Azt tapasztaltam, hogy a k_{kat} értékek jelentősen csökkentek mindegyik mutáns esetén, miközben a T375A-nál volt a legkisebb mértékű a csökkenés (11. táblázat), ami azt mutatja, hogy ezen oldalláncoknak szerepe van az enzimaktivításban. Mivel a mutánsok mindkét szubsztrátra vonatkozó K_m értékei is megnöttek (még abban az esetben is, amikor a K_d értékek nem változtak), ebből az következik, hogy ezen oldalláncok részt vesznek a Michaelis-komplex képzésében és ezen keresztül nyilvánulhat meg szerepük az enzimaktivításban is. A táblázatban összehasonlításképpen feltüntettem a korábban vizsgált két katalitikus oldallánc, az R38 és K215 mutánsaival kapott adatokat is [87].



28. ábra A nukleotid kötőhely mutánsok kinetikai vizsgálata

Az (a) ábrán 8 nM vad típusú hPGK (●), 12,5 nM T375A (□), 0,32 μM N336A (Δ), 0,92 μM E343A (○) és 1,8 μM K219A (∇) enzimek aktivitásának változása látható növekvő MgATP szubsztrát koncentráció függvényében (melyet 10 mM ATP és 12,5 mM MgCl_2 hozzáadásával készítettem) 10 mM 3-PG jelenlétében. A kísérleti pontok illesztésére a 7. és 8. egyenleteket alkalmaztam. A (b) ábrán 10,7 nM vad típusú hPGK (●), 20,8 nM T375A (□), 0,21 μM N336A (Δ), 0,10 μM E343A (○) és 11,3 μM K219A (∇) enzimek aktivitásának változása látható növekvő pirofoszfát anion koncentráció jelenlétében. A kísérleti pontokat a vad típusú hPGK esetén a 9. egyenlettel illesztettem, míg a többi esetben a 10. egyenletet alkalmaztam. A kinetikai állandók értékeit a 11. táblázatban foglaltam össze.

A PGK különleges enzimkinetikai viselkedése a mutánsok esetén megváltozik: a szubsztrátellátási görbék jellegzetessége, hogy a vad típusú enzimekre jellemző szubsztrátfelesleg-aktiválás jelensége eltűnik és Michaelis-Menten kinetikát követ (28.a

ábra). Anionnal végzett vizsgálatokban pedig az anionaktiválás jelensége tűnik el, aniongátlás figyelhető csak meg (28.b ábra). Az aktiválási jelenségek eltűnését fentebb a csukló régió mutánsok esetén is bemutattam. Ott bizonyítékot szolgáltatott a SAXS mérések arra a feltételezésünkre, hogy az anionaktiválás és a doménzáródás összefüggő jelenségek. A nukleotidhely mutánsok esetén is elvégeztük a megfelelő SAXS méréseket, melyek több nukleotidhely mutánsnál valóban megmutatták a doménzáródás hiányát (ld. alább).

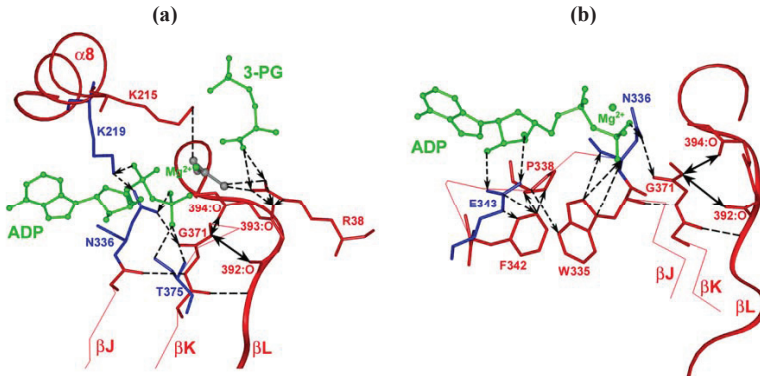
A legnagyobb aktivitásvesztést a K219A esetén tapasztaltunk, ami összemérhető az R38A-nál ill. a K215A-nál kapott értékekkel. Tudjuk, hogy a nukleotid α -foszfátjával a K219 kölcsönhatásba lép, de csupán ezen kölcsönhatás alapján nehéz megértenünk a K219A mutáns vad típusú enzimhez viszonyított nagymértékű aktivitásvesztését. Elképzelhető, hogy hasonlóan az R38 és K215 oldalláncokhoz, a K219-nek is lehet közvetlenebb szerepe a katalízisben. Ennek vizsgálatára csoportunk további, ^{19}F NMR kísérleteket kezdett el ezen mutánsokkal, az átmeneti állapotot képviselő analóg AIF₃ használatával.

5.4.1.3. Kisszögű röntgenszórás vizsgálatok a nukleotidkötőhely mutánsoknál

Kisszögű röntgenszórás vizsgálatokat végeztünk, hogy megvizsgáljuk a nukleotidkötőhely mutált oldalláncainak szerepét a doménzáródás végbemenetelében. A méréseket mindkét szubsztrátot tartalmazó terner komplexekkel végeztük.

Méréseink azt mutatták, hogy a K219A, N336A és E343A mutánsoknál a doménzáródás nagymértékben gátlódott, csupán a T375A mutáció nem akadályozta a doménzáródást (12. táblázat).

A T375A mutáns tehát hasonlóan viselkedett a korábban már bemutatott K215A mutánshoz, mellyel kapott adatokat összehasonlításképpen ebben a táblázatban is feltüntettem. Ebből tehát arra következtettünk, hogy a K219, N336 és E343 oldalláncok nemcsak a nukleotiddal való kölcsönhatás kialakításában fontosak, hanem ugyanezen oldalláncok közvetítik a nukleotidhelyről induló konformációs információt a fő csukló irányába, tehát közreműködnek a doménzáródásban. Szerepüket a krisztallográfiás adatok felhasználásával a 29.a és b ábrák illusztrálják.



29. ábra A nukleotidkötő oldallánc szerepe a doménzáródásban

Mindkét ábrán a *T. brucei* PGK szerkezete látható piros szímmel, a mutált oldalláncok kék pálcikamoddellel, a szubsztrátok zöld golyó-pálcika modellel, a hélixek szalag diagrammal. Az (a) ábrán az átmenő foszfo-csoport szürke golyó-pálcika modellel látható. Az oldalláncok számozása a hPGK számozásának megfelelő. A H-híd és hidrofób kölcsönhatásokat szaggatott vonalak, míg a szubsztrát hatására kialakuló kölcsönhatásokat szaggatott nyilak, csak a terner komplexekben meglévő kölcsönhatásokat pedig kettős nyilak szimbolizálják.

A K219 és N336 oldalláncok, miközben a nukleotid α - és β -foszfátjával kölcsönhatnak, egyúttal egymással is H-híd kölcsönhatásban vannak, amely kölcsönhatás tovább terjed az α 13 hélix N-terminálisánál lévő Gly371 peptid O-atomjához (29.a ábra). Ezek az új kölcsönhatások erősítik a J, K és L-jelű β -redők közötti kölcsönhatásokat. A β L-lel kialakuló új H-kötések a redő alakjának megváltozását és ezáltal doménzáródást eredményeznek. Az E343 oldallánc, amely a nukleotid ribózgyűrű OH-csoportjait köti, egyidejűleg hidrofób kölcsönhatásban áll a F342 gyűrűjével, ami továbbá kölcsönhat a szintén konzervatív P338-cal, majd pedig a W335-tel. Így jut el a nukleotidhelyről induló kölcsönhatás-láncolat az N336 α -atomjához (29.b ábra). Az N336 pedig már a fent leírt módon kapcsolatban van a molekula fő csuklójával. A T375 oldallánc esetén, bár fontos szerepe van a nukleotid-foszfatokkal való kölcsönhatások kialakításában, ehhez hasonló útvonal nem vezethető le, összhangban azzal a kísérleti eredménnyel, hogy nincs közvetlen szerepe a doménzáródásban.

12. táblázat A szubsztrát kötőhely mutánsok kísérletes kisszögű röntgenszórás adatainak összevetése az elméleti szórásgörbék adataival

| Kisszögű röntgenszórás kísérletek | | | A kristályszerkezeti modellek és a kísérletes adatok szórási görbéje közti négyzetes eltérés | | | | | |
|-----------------------------------|------------------------------------|-----------------|--|----------------------|------------------------------|----------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| Enzim-szubsztrát terner komplex | R_g (kísérletes), Å ^a | | Nyitott kristályszerkezetek | | | | Zárt kristályszerkezetek | |
| | GNOM módszer | Guinier módszer | Sertésizom PGK (apo) | Bs PGK*MgADP (biner) | Sertésizom PGK*MgATP (biner) | Sertésizom PGK*3PG (biner) | Tm PGK (Termer1) ^c | Tb PGK (Termer2) ^c |
| Vad típusú hPGK | 22,5±0,5 | 23,0±0,2 | 6,14 | 6,04 | 4,66 | 5,31 | 2,247 | 1,61 |
| R38A | 24,0±0,3 | 24,3±0,3 | 1,41 | 1,35 | 1,26 | 1,33 | 1,62 | 1,91 |
| K215A | 22,6±0,2 | 22,9±0,3 | 3,48 | 3,74 | 2,79 | 2,93 | 2,26 | 2,21 |
| K219A | 23,6±0,4 | 23,9±0,2 | 1,49 | 1,83 | 1,58 | 1,44 | 2,32 | 2,37 |
| N336A | 23,7±0,3 | 24,0±0,2 | 2,71 | 3,70 | 2,89 | 2,35 | 4,26 | 3,71 |
| E343A | 23,7±0,3 | 23,9±0,2 | 1,53 | 1,75 | 1,41 | 1,37 | 1,55 | 1,66 |
| T375A | 22,7±0,3 | 22,9±0,3 | 1,92 | 1,95 | 1,64 | 1,69 | 1,40 | 1,37 |
| R_g (elméleti), Å ^b | | | 24,25 | 24,34 | 24,02 | 23,97 | 23,26 | 22,64 |
| Molekulatömeg, kDa ^b | | | 43,7 | 43,2 | 43,6 | 43,8 | 43,7 | 45,3 |

^a A kísérleti R_g értékek meghatározása két alternatív módon, GNOM and Guinier programok felhasználásával történt.

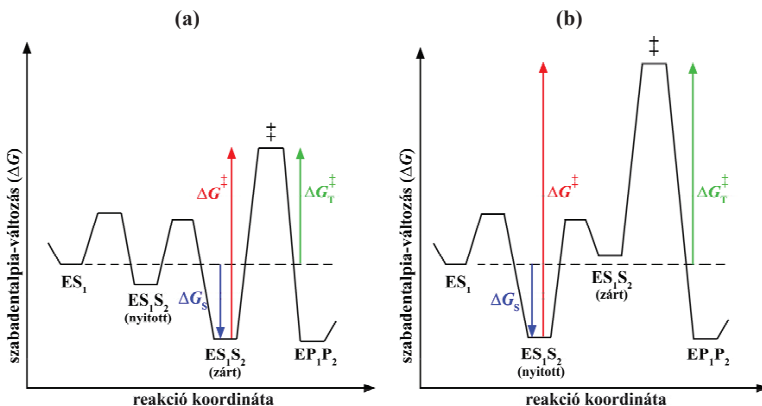
^b Az alábbi PDB kódú szerkezetekből történt a molekulatömeg és a girációs sugár kiszámítása: 1PHP a Bs PGK*MgADP, 1VJC a sertésizom PGK*MgATP, 1VPE a Tm PGK terner and 13PK a Tb PGK terner komplexekre. A sertésizom PGK szubsztrátmentes és a biner PGK*3-PG szerkezetek PDB koordinátáit a szerzőktől kaptuk.

^c Termer1: MgAMP-PNP*3-PG, Termer2: MgADP*3-PG

Vastagon szedve a legjobb egyezés látható a krisztallográfias modell és a SAXS mérések között a legkisebb négyzetek módszerével számítva.

5.5. A mutációk enzimműködésre gyakorolt hatásának energetikai értelmezése

A vizsgált mutánsok enzimkinetikai és szubsztrátkötődési adatai jól szemléltethetők az azokból számítható termodinamikai paraméterekkel, illetve ha azokat a vad típusú enzim megfelelő paramétereirez hasonlítjuk. Ezek az ún. differencia energiadiagramok, melyeket Fersht vezetett be a mutációk hatásának kvantitatív jellemzésére [122]. A katalitikus ciklust kísérő teljes szabadentalpia-változást ($\Delta G_{\ddagger}^{\ddagger}$) az Anyagok és Módszerek (4.2.14. fejezet) 19. egyenlete fejezi ki. Ez lényegében az algebrai összege az energetikailag kedvezőtlen (energiabefektetést igénylő, azaz pozitív előjelű) ΔG^{\ddagger} -nak, vagyis a kémiai lépést kísérő aktivációs szabadentalpia-változásnak és az energetikailag előnyös (energiát szolgáltató, azaz negatív előjelű) ΔG_S szubsztrátkötődést kísérő szabadentalpia-változásnak. A 19. egyenlet lényegében annak a fizikai képnek felel meg, hogy a szubsztrátok kötődési energiája fedezi az enzimreakció (a kémiai átalakulás és az azt kísérő konformációváltozások, pl. doménzáródás) végbemeneteléhez szükséges aktiválási energiát (ld. 30.a szemléltető ábrát is).



30. ábra Az enzimreakció szabadentalpia-változása

Az (a) ábrán a vad típusra jellemző szabadentalpia-változás, míg a (b) ábrán a T393del mutánsra vonatkozó szabadentalpia-változás látható a reakció koordináta függvényében. Kék nyíl a szubsztrát kötődése hatására felszabaduló szabadentalpiát mutatja, piros nyíl a ΔG^{\ddagger} , míg zöld nyíl a teljes szabadentalpia-változást szemlélteti kétszubsztrátos enzimreakció esetén.

Ezeket a termodinamikai paramétereket számítottam ki mind a mutáns, mind a vad típusú hPGK enzimek fentebb bemutatott kötődési és kinetikai adataiból a 18. és 20. egyenletek összefüggéseit felhasználva.

13. a táblázat A vad típusú és a szubsztrátkötőhely mutáns hPGK-k szubsztrátkötési és kinetikai állandóiból származtatott termodinamikai paraméterek

| Állandók | Vad típusú hPGK | R38A | K215A | K219A | N336A | E343A | T375A |
|--|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| $\Delta G_S^{\ddagger \text{MgATP}}$ | -19,5±1,2 | -18,1±0,9 | -15,9±0,3 | -14,5±0,6 | -16,8±0,6 | -15,7±0,4 | -20,5±0,6 |
| $\Delta G_S^{\ddagger \text{3PG}}$ | -25,0±0,6 | -17,0±0,8 | -24,7±0,1 | -24,5±0,1 | -23,9±0,2 | -25,2±0,3 | -26,8±0,8 |
| $k_{\text{kat}} / K_m^{\text{MgATP}}$ | $7,58 \cdot 10^6$ | $4,69 \cdot 10^2$ | $1,96 \cdot 10^2$ | $2,03 \cdot 10^2$ | $4,48 \cdot 10^3$ | $8,48 \cdot 10^3$ | $1,20 \cdot 10^5$ |
| $k_{\text{kat}} / K_m^{\text{3PG}}$ | $1,67 \cdot 10^7$ | $1,00 \cdot 10^2$ | $1,18 \cdot 10^3$ | $5,23 \cdot 10^2$ | $1,11 \cdot 10^4$ | $4,62 \cdot 10^4$ | $1,98 \cdot 10^5$ |
| $\Delta G_T^{\ddagger} (\text{MgATP})$ | 33,2 | 56,8 | 58,9 | 58,8 | 51,3 | 49,7 | 43,2 |
| $\Delta G_T^{\ddagger} (\text{3PG})$ | 31,2 | 60,5 | 54,5 | 56,5 | 49,0 | 45,6 | 42,0 |
| $\Delta G^{\ddagger} (1)$ | 8,2 | 39,8 | 34,2 | 34,3 | 27,3 | 24,5 | 16,5 |
| $\Delta G^{\ddagger} (2)$ | 11,7 | 42,4 | 38,6 | 42,0 | 32,2 | 29,9 | 21,5 |
| $\Delta G^{\ddagger} (1-2)$ (átlag) | 10,0±1,8 | 41,1±1,3 | 36,4±2,2 | 38,2±3,9 | 29,8±2,4 | 27,2±2,7 | 19,0±2,5 |

Ahol $\Delta G^{\ddagger} (1) = \Delta G_T^{\ddagger} (\text{MgATP}) + \Delta G_S^{\ddagger \text{3PG}}$; $\Delta G^{\ddagger} (2) = \Delta G_T^{\ddagger} (\text{3PG}) + \Delta G_S^{\ddagger \text{MgATP}}$.

A ΔG értékek kJ/mol, míg a k_{kat}/K_m értékek $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ vannak megadva.

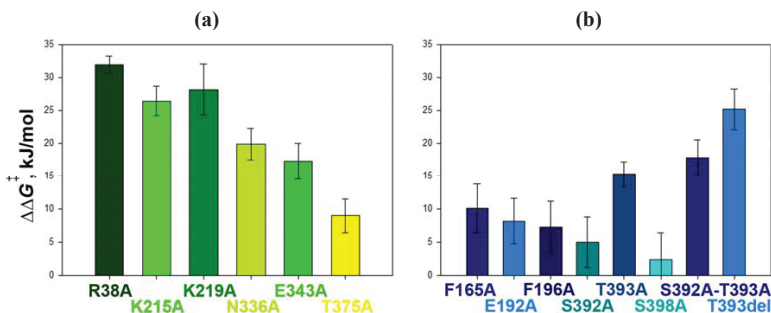
13. b táblázat A vad típusú és a csukló régió mutáns hPGK-k szubsztrátkötési és kinetikai állandóiból származtatott termodinamikai paraméterek

| Állandók | Vad típusú hPGK | F165A | E192A | F196A | S392A | T393A | S398A | S392A-T393A | T393del |
|---------------------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| $\Delta G_S^{\text{MgATP}}$ | -19,5±1,2 | -17,5±0,7 | -19,5±0,7 | -17,3±0,3 | -17,9±0,8 | -17,9±0,9 | -18,9±0,5 | -18,9±0,5 | -17,8±0,3 |
| $\Delta G_S^{3\text{PG}}$ | -25,0±0,6 | -24,4±0,1 | -24,4±0,1 | -23,2±0,1 | -22,0±0,4 | -21,3±0,3 | -25,1±0,4 | -22,0±0,9 | -24,4±0,5 |
| $k_{\text{cat}} / K_m^{\text{MgATP}}$ | 7,58*10 ⁶ | 3,25*10 ⁵ | 6,46*10 ⁵ | 1,85*10 ⁶ | 7,37*10 ⁶ | 6,74*10 ⁴ | 6,67*10 ⁶ | 2,48*10 ⁴ | 5,15*10 ² |
| $k_{\text{cat}} / K_m^{3\text{PG}}$ | 1,67*10 ⁷ | 2,84*10 ⁵ | 2,92*10 ⁵ | 8,84*10 ⁵ | 1,80*10 ⁶ | 5,86*10 ⁴ | 3,23*10 ⁶ | 9,88*10 ³ | 6,09*10 ² |
| $\Delta G_T^{\ddagger}(\text{MgATP})$ | 33,2 | 40,8 | 39,2 | 36,6 | 33,2 | 44,7 | 33,5 | 47,1 | 56,5 |
| $\Delta G_T^{\ddagger}(3\text{PG})$ | 31,2 | 41,2 | 41,1 | 38,4 | 36,7 | 45,0 | 35,2 | 49,3 | 56,1 |
| $\Delta G^{\ddagger}(1)$ | 8,2 | 16,4 | 14,8 | 13,4 | 11,2 | 23,4 | 8,4 | 25,1 | 32,1 |
| $\Delta G^{\ddagger}(2)$ | 11,7 | 23,7 | 21,6 | 21,1 | 18,8 | 27,1 | 16,3 | 30,4 | 38,3 |
| $\Delta G^{\ddagger}(1-2)$ (átlag) | 10,0±1,8 | 20,1±3,7 | 18,2±3,4 | 17,3±3,9 | 15,0±3,8 | 25,3±1,9 | 12,4±4,0 | 27,8±2,7 | 35,2±3,1 |

Ahol $\Delta G^{\ddagger}(1) = \Delta G_T^{\ddagger}(\text{MgATP}) + \Delta G_S^{3\text{PG}}$; $\Delta G^{\ddagger}(2) = \Delta G_T^{\ddagger}(3\text{PG}) + \Delta G_S^{\text{MgATP}}$.
A ΔG értékek kJ/mol, míg a k_{cat}/K_m értékek M⁻¹s⁻¹ vannak megadva.

A számításokat mindkét szubsztrátra (3-PG és MgATP) vonatkozóan függetlenül elvégeztem, majd a 19. egyenlet alapján kapott ΔG^\ddagger értékek átlagát vettem, annak érdekében, hogy az adott irányú katalízis energiaigényét jellemezni tudjam. A kapott értékeket a 13.a és b táblázatok foglalják össze.

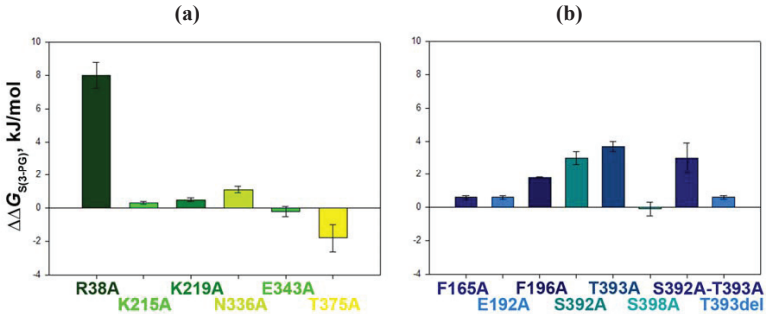
Ezen adatok felhasználásával készítettem el az ún. differencia energiadiagramokat, amelyeken a $\Delta\Delta G^\ddagger$ értékek azt szemléltetik, hogy a különböző mutánsok esetén mennyivel növekedett meg a vad típusú enzimhez képest a katalízis végbemeneteléhez szükséges, befektetendő aktiválási energia. A 13. táblázatból látható, hogy a vad típusú hPGK által katalizált reakció aktiválási szabadentalpiája 10 kJ/mol körüli érték. Ez az érték pl. a K215A ill. a K219A mutánsok esetén 36 ill. 38 kJ/mol körüli értékre nő meg, azaz a $\Delta\Delta G^\ddagger$ 26 ill. 28 kJ/mol-nak adódik. Ez a termodinamikai magyarázata az adott mutánsok esetén a katalízis több nagyságrenddel való lelassulásának. A nukleotidkötőhely ill. a csukló régió egyes mutánsainál kapott differencia energiadiagramot a 31. ábra szemlélteti. Látható, hogy a $\Delta\Delta G^\ddagger$ értékek valóban azon mutánsoknál nagyok, ahol a fentebb bemutatott (5.4.1.2.2. fejezet) kinetikai vizsgálatoknál is nagymértékű csökkenést tapasztaltam a katalitikus hatékonyságban.



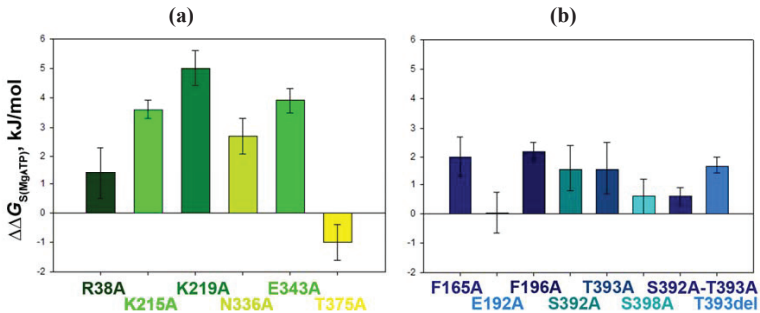
31. ábra A szubsztrátkötőhely és a csukló régió oldallancainak hozzájárulása a katalízis aktivációs szabadenergia változásához

A mutánsok esetén azonban a katalitikus ciklus aktiválási energia igényét a vad-típusú enzimhez képest csak kisebb mértékben fedezi a szubsztrátok kötődési energiája, ugyanis az adott mutáció hatására a szubsztrátok kötődésekor felszabaduló ΔG_S kötődési szabadentalpia csak sokkal kisebb mértékben változik, mint a ΔG^\ddagger . (Mindemellett természetesen pl. a nukleotidkötőhely mutánsai esetén ΔG_S maga kisebb negatív érték lesz a vad típusú enzimhez képest, azaz a nukleotid kötődése gyengül.) A 3-PG és MgATP

szubsztrátok kötődésére vonatkozó differencia energiadiagramokat szemléltetik a 32. és 33. ábrák.



32. ábra A szubsztrátkötőhely és a csukló régió oldalláncainak hozzájárulása a 3-PG kötéséhez. Az (a) ábrán a szubsztrátkötőhely mutánsainak, míg a (b) ábrán a csukló régió mutánsainak 3-PG kötésében való fontossága látható.



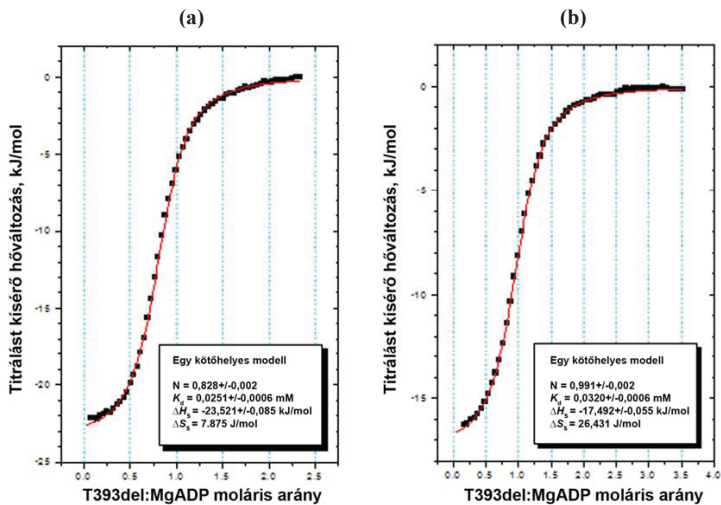
33. ábra A szubsztrátkötőhely és a csukló régió oldalláncainak hozzájárulása a MgATP kötéséhez.

Az (a) ábrán a szubsztrátkötőhely mutánsainak, míg a (b) ábrán a csukló régió mutánsainak 3-PG kötésében való fontossága látható.

Ha ezen ábrák ordináta-értékeit összehasonlítjuk a 31. ábráéval, kitűnik, hogy különösen a csukló régió mutánsai nem azért csökkentik az enzim katalitikus hatékonyságát, mert gyengén kötik a szubsztrátokat. Ez a megállapítás a legfeltűnőbb a T393del mutáns esetén. Ez a mutáns valószínűleg azt az extrém esetet testesíti meg, amikor a mutáció az enzim nyitott konformációját stabilizálja (hozza mélyebb energiaszintre) és ezáltal növeli meg az enzimreakció aktiválási energiáját. Ezt az esetet szemlélteti a 30.b ábra a vad típusú enzim energiadiagramjához hasonlítva.

A T393del mutáns szubsztrátkötésének jellemzésére izotermális kalorimetriás titrálást végeztünk (34. ábra), melynek segítségével nemcsak a ΔG_S adható meg, hanem a kötődési

entalpia (ΔH_S) és a kötődést kísérő entrópiaváltozás (ΔS_S) is. A 14. táblázat adataiból látható, hogy bár a ΔG_S értékek alig különböznek a vad típusú enzim megfelelő értékétől. A ΔH_S -ek nagy negatív értékei azt mutatják, hogy a szubsztrátok kötődése mind a vad típusú, mind a mutáns hPGK esetén entalpiavezérelt folyamat. Azonban a $T\Delta S_S$ mennyiség ennél a mutánsnál negatív irányba változik a vad típusú PGK-hoz képest, azaz a T393del mutáns a szubsztrátokat igen rigidén köti, a kötött szubsztrátok nem rendelkeznek semmilyen mozgékonyssággal. Ez a rigid kötés nyilvánvalóan energetikailag nem előnyös, de ezt kompenzálják a nagy exoterm ΔH_S értékek, így végül a szubsztrátokat ez a mutáns majdnem olyan erősen (hasonló K_d -vel) köti, mint a vad típusú enzim. Ez a nagy rigiditás kötődésmód az oka annak, hogy a doménzáródás és a katalízis bekövetkezésének valószínűsége ilyen nagymértékben lecsökken.



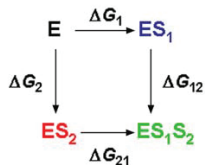
34. ábra A T393del mutáns ITC-s vizsgálata

Az (a) ábrán a T393del MgADP-vel történt titrlási görbéje látható, míg a (b) ábrán a T393del*3-PG biner komplexének továbbtitrlása MgADP szubsztráttal. A kísérleti pontok az egy kötőhelyet feltételező modell egyenletével lettek illesztve.

5.6. A doménzáródást kísérő szabadentalpia-változás meghatározása

Az előbbi fejezetben tárgyalt energetikai megfontolások adták az ötletet ahhoz, hogy meghatározzuk a doménzáródás által igényelt energiabefektetés mértékét, amennyiben jellemezni tudjuk a szubsztrátok kötődését olyan terner komplexekben, ahol az enzimreakció nem mehet végbe, de a doménzáródás bekövetkezik. Ilyen nem működő terner komplex

például a MgADP*3-PG*PGK komplexe, melyről saját SAXS méréseink során kimutattuk, hogy konformációja közel áll a zárt szerkezetű enzim molekula konformációjához (5.1. fejezet). Minthogy mindkét szubsztrát kötődése szükséges a doménzáródáshoz, a komplex képződésekor a másodikként kötődő szubsztrát kötődésekor be fog következni a doménzáródás is. Tehát a másodikként kötődő szubsztrát kötődési állandója (és a belőle származtatott energetikai paraméterek is) különbözni fog(nak) attól az esettől, amikor ez a szubsztrát elsőként kötődik az enzimhez. A különbség éppen a doménzáródás folyamatára jellemző értéket fogja megadni számunkra. A kötődési állandók ilyen mérésorozattal történő meghatározásával elvileg ugyanazon paramétereket határozhatjuk meg a doménzáródás jellemzésére, függetlenül a szubsztrátok enzimhez való hozzáadásának sorrendjétől, azaz akármelyik szubsztrátot (MgADP-t vagy 3-PG-t) adjuk először a PGK-hoz. Ezt az elvet szemlélteti a következő ábrán látható termodinamikai séma (35. ábra). Szubsztrátmentes apo állapotból a terner komplexig két úton juthatunk el, attól függően, hogy melyik az első és a második szubsztrát, mellyel a titrlást végezzük.



35. ábra A két szubsztrát kötődésének termodinamikai ciklusa

A ΔG_1 ill. a ΔG_2 az első szubsztrát kötődésekor fellépő szabadentalpia-változást jelenti, melynek során apo állapotból (E) az első szubsztrátot kötő biner enzim-szubsztrát komplexig (ES_1 ill. ES_2) jutunk. A terner komplex (ES_1S_2) akármelyik biner komplexből kialakulhat a még hiányzó szubsztrát hozzáadásával.

A termodinamika törvénye szerint a két út energiaigényének meg kell egyeznie:

$$\Delta G_1 + \Delta G_{12} = \Delta G_2 + \Delta G_{21} \quad 21. \text{ egyenlet}$$

Mivel a másodikként kötődő szubsztrát kötődését a doménzáródás is kíséri, ezért ezzel a konformáció-változással együtt járó szabadentalpia-változást itt kell figyelembe vennünk:

$$\Delta G_{12} = \Delta G_2 + \Delta G_{\text{konf}} \quad 22. \text{ egyenlet}$$

III.

$$\Delta G_{21} = \Delta G_1 + \Delta G_{\text{konf}} \quad 23. \text{ egyenlet}$$

Ahol a ΔG_{konf} a konformációs szabadentalpia-változást jelenti.

A konformációs szabadentalpia-változás tehát kétféle módon is megadható ill. számítható:

$$\Delta G_{\text{konf}} = \Delta G_{12} - \Delta G_2 \quad 24. \text{ egyenlet}$$

$$\Delta G_{\text{konf}} = \Delta G_{21} - \Delta G_1 \quad 25. \text{ egyenlet}$$

A 14. táblázatban foglaltam össze a MgADP és 3-PG szubsztrátok egymás jelen- és távollétében meghatározott disszociációs állandóit és az azokból számított ΔG_S (azaz a ΔG_1 , ΔG_2 , ΔG_{12} és ΔG_{21}), valamint a mért ΔH_S és a számított $T\Delta S_S$ paramétereiket. A 15. táblázatban pedig megmutatom, hogy a terner komplex képződés teljes energia-mérlege valóban kísérleteink szerint is független a képződés útjától a 21. egyenletnek megfelelően. A számított ΔG_{konf} értékeket is itt tüntettem fel. A vad típusú enzim esetén ez az érték 4,0-4,1 kJ/mol-nak adódott. A pozitív előjel jelzi, hogy a doménzáródás bekövetkezéséhez energiát kell befektetni. Ez az energiamennyiség azonban meglepően kicsi, csupán néhány H-kötés energiájának felel meg. Ez az eredmény összhangban van azzal a feltételezésünkkel, hogy a zárt szerkezetet csupán néhány további H-hídkötés stabilizálja, a biner komplexekben már kialakuló kölcsönhatásokhoz képest (ld. 24. ábra). Az N336A és a T393del mutánsokkal végzett hasonló ITC kísérletek a vad típusú enzimhez viszonyítva jóval kisebb ill. közel nulla értékeket szolgáltattak a ΔG_{konf} értékére, jelezve azt, hogy ezeknél a doménzáródás csak részlegesen következik be, vagy egyáltalán nem is megy végbe.

A 14. táblázat termodinamikai paramétereit elemezve további érdekes megállapításokat tehetünk. A vad típusú hPGK esetében megállapíthatjuk, hogy az első szubsztrát kötődése, legyen az akár 3-PG vagy MgADP, entalpia-vezérelt folyamat. Viszont a második szubsztrát kötődése inkább entrópia-vezéreltté válik, kisebb entalpia-változás kíséri, mert a hő egy része a doménzáródás energiaigényére fordítódik és a záródás folyamán a szubsztrátkötőhelyek mozgékonyasága megnő. A szubsztrátok egymás jelenlétében meghatározott K_d értékeiből az is látszik, hogy a vad típusú enzim esetén érvényesül az ún. szubsztrát-antagonizmus jelensége (ld. 2.3.3.2. fejezet), azaz a szubsztrátok a terner komplexben gyengítik egymás kötődését. A korábbi irodalmi adatokkal összhangban az antagonizmus és a doménzáródás összefüggését támasztják alá az itt vizsgált két mutánsnal kapott K_d értékek, amennyiben az antagonizmus mértéke összhangban van azzal, hogy a doménzáródás részlegesen (N336A) vagy teljes mértékben (T393del) gátlódik.

Az N336A mutáns esetén mindkét szubsztrát kötődését kisebb entalpia-változás kíséri, mint a vad típusú hPGK-nál, összhangban a mutáns gyengébb szubsztrátkötő képességével. Továbbá, a mutáns szubsztrátkötése entrópiavezérelt folyamatá válik, szemben a vad típusú hPGK-val. Ez arra utal, hogy a mutánshoz kötött szubsztrátok nagyobb mozgékonyaságúak.

14. táblázat A vad típusú hPGK és két kiválasztott mutáns szubsztrátkötésének termodinamikai adatai

Az ES komplexekben szereplő S₁ ill. S₂ a 3-PG ill. MgADP szubsztrátokat jelöli. A táblázatban szereplő mért adatok hibája ±10 %.

| Titrálás típusa | Vad típusú hPGK | | | | N336A | | | | T393del | | | |
|-----------------|------------------|---------------------------------|------------------|---------------------------------|------------------|---------------------------------|------------------|---------------------------------|------------------|---------------------------------|------------------|---------------------------------|
| | E+S ₁ | ES ₂ +S ₁ | E+S ₂ | ES ₁ +S ₂ | E+S ₁ | ES ₂ +S ₁ | E+S ₂ | ES ₁ +S ₂ | E+S ₁ | ES ₂ +S ₁ | E+S ₂ | ES ₁ +S ₂ |
| K_d | 0,033 | 0,18 | 0,054 | 0,29 | 0,065 | 0,248 | 0,18 | 0,658 | 0,14 | 0,28 | 0,025 | 0,032 |
| ΔG_s | -25,1 | -21,0 | -23,9 | -19,9 | -23,5 | -20,3 | -20,9 | -17,9 | -21,7 | -20,0 | -25,8 | -25,2 |
| ΔH_s | -20,2 | -7,5 | -13,3 | -10,7 | -10,0 | -6,6 | -4,1 | -12,9 | -37,7 | -23,0 | -23,5 | -17,5 |
| $T\Delta S_s$ | 4,9 | 13,5 | 10,6 | 9,2 | 13,5 | 13,6 | 16,9 | 5,0 | -16,0 | -3,1 | 2,3 | 7,8 |

K_d értékek mM-ban, a többi mennyiség pedig kJ/mol-ban van megadva

15. táblázat A terner komplex képződését kísérő teljes szabadentalpia-változás ill. a doménzáródást kísérő szabadentalpia-változás a vad típusú hPGK-nál valamint az N336A és T393del mutánsoknál

| Termodinamikai kör | Vad típusú hPGK | | N336A | | T393del | |
|---------------------------------|------------------------------|------------------------------|-------|-------|---------|--|
| | | $\Delta G_1 + \Delta G_{12}$ | -45,0 | -41,4 | -46,9 | |
| | $\Delta G_2 + \Delta G_{21}$ | -44,9 | -41,2 | -45,8 | | |
| ΔG_{konf} értéke | $\Delta G_{21} - \Delta G_1$ | 4,1 | 3,2 | 1,7 | | |
| | $\Delta G_{12} - \Delta G_2$ | 4,0 | 3,0 | 0,6 | | |

A ΔG_{konf} értékének kiszámítása a 24. és 25. egyenletek alapján történt. A ΔG értékek kJ/mol-ban vannak megadva.

A T393del mutáns esetén, ahogyan ezt már az előbbieken (5.5. fejezet) is tárgyaltam, ugyanezen folyamatokat sokkal kisebb entrópiaváltozás kíséri, azaz a mutáns a szubsztrátokat rigiden köti, a kötött szubsztrátok abszolút nem mozgékonyak, ami energetikailag nem előnyös a kötődés szempontjából, de ezt az exoterm entalpiaértékek kompenzálják, melyek azt eredményezik, hogy a K_d értékek a vad típusú enziméhez hasonlóak lesznek.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

Doktori munkám során egy tipikus két doménből felépülő kinázon, a 3-foszfoglicerát kinázon (PGK) mint a doménzáródási folyamat vizsgálatára alkalmas modell enzimen végeztem átfogó enzimológiai és biofizikai vizsgálatokat. Munkám célja annak az allostérius konformáció-változásnak molekuláris szinten történő megértése volt, amelyet a szubsztrátok kötődése indít el és a működőképes zárt konformáció kialakulását eredményezi. A PGK molekula feltételezhető fő csukló régiójában található aminosavmaradékok szerepét irányított mutagenézissel, a mutánsok enzimkinetikai és szubsztrátkötő képességének jellemzésével, továbbá szerkezetvizsgáló módszerekkel (CD, DSC, ITC és SAXS) és molekuláris grafikai analízissel tanulmányoztam.

Főbb eredményeim a következők:

1.) A vad típusú humán PGK-val végzett kisszögű röntgenszórás mérések segítségével sikerült eldöntenem azt a kérdést, hogy mely szubsztrát(ok) kötődése a domének zárt konformáció létrejöttéhez szükséges elmozdulásában. Bebizonyítottam, hogy a PGK zárt konformációja mindkét szubsztrát együttes jelenlétében, a terner enzim-szubsztrát komplexben alakul csak ki, függetlenül attól, hogy a működő (PGK*3-PG*MgATP vagy PGK*1,3-BPG*MgADP) vagy nem működő (PGK*3-PG*MgADP) komplex. Egy szubsztrát kötődése a biner komplexben, azaz a 3-PG (vagy 1,3-BPG), illetve a MgATP (vagy MgADP) önmagában nem képes a domének teljes záródását előidézni.

2.) Korábbi mutációs munkáink valószínűsítették, hogy a K215 és az R38 a PGK katalitikus szerepű oldalláncai, amelyek az enzimreakció során átadódó foszfo-csoportot kémiaiilag stabilizálják. Érdekes módon ezen oldallánccok csak a zárt konformációjú szerkezetben kerülnek megfelelő pozícióba az aktív centrumba, azaz lényegében a doménzáródási folyamatban alakul ki az aktív centrum. A nyitottból a zárt konformációba való átalakulásakor a K215 oldallánca kb. 10 Å-nyit, míg az R38-é kb. 3 Å-nyit mozdul. Tehát feltételezhető volt, hogy az oldallánccok közvetlen katalitikus szerepén túlmenően a doménzáródásban is szereppel bírnak. A K215A és R38A mutánsokkal végzett kisszögű röntgenszórás méréseim megmutatták, hogy míg az R38 oldallánc jelenléte fontos a doménzáródás bekövetkezéséhez, addig a K215 oldallánc erre nincs hatással (ld. 16. táblázat). Ebből az eredményből arra következtettem, hogy bár a nukleotid szubsztrát foszfátláncának vagy az 1,3-BPG 1-es foszfátjának a K215 oldallánccal való időleges

kapcsolata segítheti ezen oldallánc elmozdulását a doménzáródás során, de nem ezek a kölcsönhatások a doménzáródási folyamat fő irányítói. Valószínűleg más, független mechanizmus valósítja meg a doménzáródást, aminek egyik következménye a K215 oldallánc elmozdulása is.

3.) Ez a független mechanizmus lehet a csoportunk által már korábban feltételezett β L redőnél lévő fő csukló működése. A feltételezés érvényességének ellenőrzésére, továbbá a molekuláris csukló működésének megértésére különböző típusú mutánsokat készítettem a β L redőben és annak környezetében. A β L-ben lévő konzervatív S392 és T393 oldallancok egyedi (S392A és T393A) ill. együttes (S392A-T393A dupla mutáns) Ala-ra történő mutációja rávilágított arra, hogy szerepük a doménzáródásban fontos, de nem egyedül felelősek érte, mert hatásuk nemcsak összeadódik, hanem egymás hatását tovább növelik, azaz együttes részvételük a döntő. A T393 aminosavmaradék kitörlése (T393del mutáns) egyértelműen megmutatta azt is, hogy a fő csukló β L redő hosszának megváltoztatása drasztikus hatással van az enzim működésére, ami a doménzáródás hiányának tudható be (16. táblázat). A T393del mutánsal végzett kísérletek tehát bebizonyították, hogy a β L redő alakja döntő fontosságú a doménzáródás szempontjából, ahogyan azt korábban a nyitott és zárt kristályszerkezetek összehasonlítása alapján gondolni lehetett. Tehát a β L redő mint fő csukló létezésének feltételezése kísérleti bizonyítást nyert.

Érdekes módon azonban a T393del mutáns a szubsztrátokat ugyanolyan kötődési állandóval köti, mint a vad típusú enzim. ITC-s kísérleteink alapján azonban kiderült, hogy az azonos kötődési állandók különböző kötődési módoknak felelnek meg. A T393del mutáns esetén a szubsztrátok kötődése sokkal inkább entalpiavezérelt folyamat, mint a vad típusú enzimmél. Ez azt jelenti, hogy a mutáns jóval rigidebben köti a szubsztrátokat, mint a vad típusú enzim. Ezzel függhet össze a mutánsnál tapasztalt doménzáródás hiánya (nyitott konformáció stabilizálása) és az aktivitás elvesztése.

Megjegyzendő, hogy az összes vizsgált csukló régió mutáns esetén érvényes az, hogy a szubsztrátok kötődési állandójának csak kisebb mértékű változása következik be, míg a katalitikus hatékonyság sokkal nagyobb mértékben csökken. A T393del mutánsnál ugyanez a hatás extrém módon nyilvánul meg.

A mutánsokkal végzett munka alapján az is kiderült, hogy a S398 oldallánc egyáltalán nem működik közre a doménzáródásban, habár szerepe feltételezhető volt két különböző kristályszerkezet alapján is.

4.) Az interdomén régióban elhelyezkedő és a β L redővel közvetlen vagy közvetett módon kölcsönhatásban lévő α 7 hélixbeli E192 és F196, továbbá az α 5 hélixbeli F165 oldalláncok szerepét hasonló mutációs kísérletekben vizsgáltam meg. A mutánsokkal végzett DSC és tiolreaktivitási kísérletek alapján bebizonyosodott, hogy az F165 és E192 oldalláncoknak kulcsfontosságú szerepe van az interdomén régió szerkezetének fenntartásában és ezen keresztül az egész fehérjemolekula szerkezetének stabilizálásában. Az F165A és E192A mutánsok fellazult szerkezetét azonban a szubsztrátok kötődése stabilizálni képes és így nemcsak a mutánsok aktivitását tudtam jellemezni, hanem a szubsztrátoknak az enzim szerkezetére gyakorolt hatását szintén vizsgálni tudtam. A DSC kísérletek eredményei szerint a terner enzim-szubsztrát komplexek stabilizáló hatása mindhárom mutáns (F165A, E192A és F196A) esetén csak kicsivel nagyobb, mint az egyes biner komplexek esetén tapasztalt stabilitás-növekedés. Tehát a mutációk hatására a doménzáródás nem vagy csak részlegesen megy végbe. Ezzel összhangban vannak az E192A mutánsnal végzett SAXS kísérletek adatai is. Az interdomén régió ezen oldalláncjai tehát szintén aktívan közreműködnek a doménzáródási folyamatban. Szerepük abban lehet, hogy a β L redővel való kapcsolatuk folytán közvetítik az információt a fő csuklótól az α 7 hélix N- és C-terminális végein azonosított további csuklók felé.

5.) Azt a további kérdést, hogy a β L redő alakjának változását milyen mechanizmus eredményezi, kísérlete megválaszolni csoportunkban a munkám kezdetén felállított kettős kapcsoló hipotézis. Ez a hipotézis feltételezte, hogy mindkét szubsztrát együttes kötődésekor, a terner komplexben, kiterjedhet az a H-híd kötési láncolat, amely kezdeményeiben már az egyes biner komplexekben kialakul és ez vezet a β L redő alakjának megváltozásához ill. vele együtt a doménzáródáshoz. A hipotézissel összhangban mindkét szubsztrát együttes kötődésének szükségességét támasztották alá saját SAXS méréseink is (1. pont). A hipotézisnek arra részére vonatkozóan pedig, hogy az egyes szubsztrátok hatása hogyan terjed kötőhelyüktől a β L-nél található csuklóig, mutagenézis kísérleteim szolgáltattak bizonyítékot. A 3-PG kötésében is résztvevő, továbbá katalitikus szerepet is betöltő R38 oldallánccról SAXS kísérleteink (2. pont) bizonyították be a doménzáródásban játszott fontos szerepét. A nukleotid szubsztrátkötőhelyen készített mutánsok enzimkinetikai és SAXS analízise megmutatta, hogy a K219, N336 és E343 oldalláncok közreműködnek mind a szubsztrátkötésében, mind a doménzáródásban, s ezáltal a katalízisben is. Méréseim felvetették, hogy a K219 oldalláncnak esetleg közvetlenebb szerepe is lehet a katalízisben. Ugyanakkor a korábban már említett, a MgATP kötésében résztvevő K215, valamint a

MgADP kötésében résztvevő T375 oldalláncoknak nincs szerepe a doménzáródás előidézésében. Azonban, míg a K215 alapvető katalitikus oldallánc, addig a T375 nem járul hozzá lényegesen a katalízishez.

16. táblázat A doménzáródás bekövetkezése a vad típus és a különböző PGK mutánsok esetén (kinetikai viselkedésük, kalorimetriás stabilitásuk és SAXS adataik alapján)

Kékkel a csukló régió mutánsok, zölddel pedig a szubsztrátkötőhely mutánsok láthatók.

| <i>Doménzáródás megvalósulása terner komplex esetén</i> | PGK formák |
|---|--|
| IGEN | Vad típusú hPGK, K215A, T375A, S398A |
| NEM | R38A, T393del |
| Részlegesen | F165A, E192A, F196A, K219A, N336A, E343A, S392A, T393A, S392A-T393A |

6.) Izotermális titráló kalorimetria segítségével sikerült megbecsülni a doménzáródás energiaigényét, az egyes biner ill. terner komplexek esetén meghatározott kötődési állandók összehasonlításával. Meghatároztuk, hogy csupán kb. 4 kJ/mol energia befektetésére van szükség a doménzáródáshoz, ami összhangban van a kettős molekuláris kapcsoló hipotézis szerint feltételezett kisszámú H-hídkötés kialakulásával a zárt terner komplexben a nyitott biner komplexekhez képest.

7.) A bemutatott kísérletes munkák eredményeit összevettem a kettős molekuláris kapcsoló, kristályszerkezeteken alapuló hipotézisével és a molekuláris grafikai analízis eredményeként sikerült definiálni a szubsztrátkötő zsebektől a fő csukló régióig terjedő „konformációs útvonalat”, mely kizárólag konzervatív oldalláncok kölcsönhatásait jelenti és a PGK doménzáródásának lényegi eleme. Eredményeim tehát igazolják a β L csukló régió és a kettős molekuláris kapcsoló működésének szerepét a PGK aktív konformációjának kialakításában.

7. AZ ÉRTEKEZÉS TÉMAKÖRÉHEZ KAPCSOLÓDÓ KÖZLEMÉNYEK

1. Referált tudományos folyóiratban megjelent közlemények:

J. Szabó, A. Varga, B. Flachner, P. V. Konarev, D. I. Svergun, P. Závodszy and M. Vas (2008)

Communication between the Nucleotide Site and the Main Molecular Hinge of 3-Phosphoglycerate Kinase

=Biochemistry **47** 6735–6744

J. Szabó, A. Varga, B. Flachner, P. V. Konarev, D. I. Svergun, P. Závodszy and M. Vas (2008)

Role of side-chains in the operation of the main molecular hinge of 3-phosphoglycerate kinase

=FEBS Letters **582** 1335–1340

A. Varga, **J. Szabó**, B. Flachner, B. Roy, P. Konarev, D. Svergun, P. Závodszy, C. Périgaud, T. Barman, C. Lionne and M. Vas (2008)

Interaction of human 3-phosphoglycerate kinase with L-ADP, the mirror image of D-ADP

=BBRC **366** 994–1000

A. Varga, B. Flachner, P. Konarev, É. Gráczér, **J. Szabó**, D. Svergun, P. Závodszy and M. Vas (2006)

Substrate-induced double sided H-bond network as a means of domain closure in 3-phosphoglycerate kinase

=FEBS Letters **580** 2698-2706

B. Flachner, A. Varga, **J. Szabó**, L. Barna, I. Hajdú, G. Gyimesi, P. Závodszy and M. Vas (2005)

Substrate-assisted movement of the catalytic Lys 215 during domain closure: Site-directed mutagenesis studies of human 3-phosphoglycerate kinase

=Biochemistry **44** 16853-865

2. Konferencia kiadványok, konferencia összefoglalók:

(az előadás ill. a poszter előadója a szerzők sorában az első helyen szerepel)

J. Szabó, A. Varga, B. Flachner, P. Konarev, D. Svergun, P. Závodszy and M. Vas
Insight into the molecular details of domain movements of 3-phosphoglycerate kinase (PGK)
8th FEBS - IUBMB Young Scientist Forum, Loutraki, Görögország, 2008 (poszter),
33th FEBS Congress and 11th IUBMB Conference, Athén, Görögország, 2008 (poszter),
FEBS Journal **275** Supplement 1, p.466, YSF-111

A. Varga, **J. Szabó**, C. Lionne, S. Arold, B. Roy, P. Závodszy, T. Barman and M. Vas
Structure-based distinction in antiviral drug activation: 3-phosphoglycerate kinase (PGK)
and nucleoside diphosphate kinase (NDPK)
8th FEBS - IUBMB Young Scientist Forum, Loutraki, Görögország, 2008 (poszter),
33th FEBS Congress and 11th IUBMB Conference, Athén, Görögország, 2008 (poszter),
FEBS Journal **275** Supplement 1, p.468, YSF-120

M. Vas, A. Varga, **J. Szabó**, É. Gráczter, B. Flachner, P. Závodszy, P. Konarev &
D. Svergun
Insight into the mechanism of domain movements and its role in functioning of
3-phosphoglycerate kinase
International Conference „Biocatalysis-2007. Structure, functions, application”, Moszkva,
Szentpétervár, Oroszország, 2007 (szóbeli előadás),
Vestnik Moscow University Bulletin, Ser. No. 2. **48** 142-147

B. Flachner, **J. Szabó**, A. Varga, P. Závodszy and M. Vas
Study of operation of the molecular hinges in human PGK using site-directed mutagenesis
32nd FEBS Congress, Bécs, Ausztria, 2007 (poszter),
FEBS Journal **274** Suppl. 1. p.270, M F1 – 24

L. Chaloin, C. Gondeau, S. T. Arold, **J. Szabó**, B. Flachner, A. Varga, P. Konarev,
D. Svergun, D. Perahia, B. Roy, P. Lallemand, T. Barman, C. Lionne & M. Vas
Insight into the mechanism of PGK catalysis by molecular modelling, SAXS and
crystallography
International Biophysics Congress, London, Anglia, 2007 (poszter),
Eur. J. Biophys. **36**, p.S154, P-395

C. Gondeau, A. Varga, **J. Szabó**, B. Flachner, L. Chaloin, B. Roy, P. Lallemand,
T. Barman, M. Vas & C. Lionne (2007)
Metabolism of antiviral drugs: Phosphorylation of D and L-nucleotides by
3-phosphoglycerate kinase
International Biophysics Congress, London, Anglia, 2007 (poszter),
Eur. J. Biophys. **36**, p.S158, P-412

J. Szabó, B. Flachner, A. Varga, P. Závodszy and M. Vas
Study of operation of the molecular hinges in human 3-phosphoglycerate kinase (PGK) using site-directed mutagenesis
Straub napok, Szeged, 2006 (poszter)

Szabó Judit, Flachner Beáta, Varga Andrea, Závodszy Péter és Vas Mária
A molekuláris csuklók működésének vizsgálata irányított mutagenezissel humán 3-foszfoglicerát kinázon (PGK)
Magyar Biokémiai Társaság Kongresszusa, Pécs 2006 (poszter),
Biokémia 2006 szeptemberi szám, 78. oldal

B. Flachner, A. Varga, **J. Szabó**, I. Hajdú, P. Závodszy and M. Vas
Site-directed mutagenesis studies revealed the functional role of the conserved Lys 215 in the domain closure dependent phospho-transfer catalysed by human 3-phosphoglycerate kinase (hPGK)
30th FEBS Congress and 9th IUBMB Conference, Budapest, Magyarország, 2005 (poszter),
FEBS Journal **272**, Supplement 1, N1-017P

8. IRODALMI HIVATKOZÁSOK

1. Henzler-Wildman, K. & Kern, D. (2007) Dynamic personalities of proteins, *Nature*. 450, 964-72.
2. Swain, J. F. & Gierasch, L. M. (2006) The changing landscape of protein allostery, *Curr Opin Struct Biol*. 16, 102-8.
3. Benkovic, S. J., Hammes, G. G. & Hammes-Schiffer, S. (2008) Free-energy landscape of enzyme catalysis, *Biochemistry*. 47, 3317-21.
4. Linderström-Lang, K. & Schellmann, J. A. (1959) Protein Structure and Enzyme Activity in *The Enzymes* (Boyer, P., ed) pp. 443-510, Academic Press, New York.
5. Straub, F. B. (1964) Formation of the Secondary and Tertiary Structure of Enzymes, *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol*. 26, 89-114.
6. Henzler-Wildman, K. A., Thai, V., Lei, M., Ott, M., Wolf-Watz, M., Fenn, T., Pozharski, E., Wilson, M. A., Petsko, G. A., Karplus, M., Hubner, C. G. & Kern, D. (2007) Intrinsic motions along an enzymatic reaction trajectory, *Nature*. 450, 838-44.
7. Bahar, I., Chennubhotla, C. & Tobi, D. (2007) Intrinsic dynamics of enzymes in the unbound state and relation to allosteric regulation, *Curr Opin Struct Biol*. 17, 633-40.
8. Gerstein, M. & Krebs, W. (1998) A database of macromolecule motions, *Nucleic Acid Res*. 26, 4280-4290.
9. Khajehpour, M., Wu, L., Liu, S., Zhadin, N., Zhang, Z. Y. & Callender, R. (2007) Loop dynamics and ligand binding kinetics in the reaction catalyzed by the Yersinia protein tyrosine phosphatase, *Biochemistry*. 46, 4370-4378.
10. Chothia, C., Lesk, A. M., Dodson, G. G. & Hodgkin, D. C. (1983) Transmission of conformational change in insulin, *Nature*. 302, 500-5.
11. Perutz, M. F. (1970) Stereochemistry of cooperative effects in haemoglobin, *Nature*. 228, 726-39.
12. Kuriyan, J. & Eisenberg, D. (2007) The origin of protein interactions and allostery in colocalization, *Nature*. 450, 983-90.
13. Stryer, L. (1997) in *Biochemistry 4th. ed.* pp. 448, 504, W. H. Freeman & Co., San Francisco.
14. Gerstein, M., Lesk, A. M. & Chothia, C. (1994) Structural mechanisms for domain movements in proteins, *Biochemistry*. 32, 6739-6749.
15. Lesk, A. M. & Chothia, C. (1984) Mechanisms of domain closure in proteins, *J Mol Biol*. 174, 175-91.
16. Lawson, C. L., Zhang, R. G., Schevitz, R. W., Otwinowski, Z., Joachimiak, A. & Sigler, P. B. (1988) Flexibility of the DNA-binding domains of trp repressor, *Proteins*. 3, 18-31.
17. McPhalen, C. A., Vincent, M. G., Picot, D., Jansonius, J. N., Lesk, A. M. & Chothia, C. (1992) Domain closure in mitochondrial aspartate aminotransferase, *J Mol Biol*. 227, 197-213.
18. Gerstein, M., Schulz, G. & Chothia, C. (1993) Domain closure in adenylate kinase. Joints on either side of two helices close like neighboring fingers, *J Mol Biol*. 229, 494-501.
19. Stillman, T. J., Migueis, A. M., Wang, X. G., Baker, P. J., Britton, K. L., Engel, P. C. & Rice, D. W. (1999) Insights into the mechanism of domain closure and substrate specificity of glutamate dehydrogenase from *Clostridium symbiosum*, *J Mol Biol*. 285, 875-85.
20. Snow, C., Qi, G. & Hayward, S. (2007) Essential dynamics sampling study of adenylate kinase: comparison to citrate synthase and implication for the hinge and shear mechanisms of domain motions, *Proteins*. 67, 325-337.
21. Henzler-Wildman, K. A., Lei, M., Thai, V., Kerns, S. J., Karplus, M. & Kern, D. (2007) A hierarchy of timescales in protein dynamics is linked to enzyme catalysis, *Nature*. 450, 913-6.

22. Schulz, G. E., Muller, C. W. & Diederichs, K. (1990) Induced-fit movements in adenylate kinases, *J Mol Biol.* 213, 627-30.
23. Vonrhein, C., Schlauderer, G. J. & Schulz, G. E. (1995) Movie of the structural changes during a catalytic cycle of nucleoside monophosphate kinases, *Structure.* 3, 483-490.
24. Segura-Pena, D., Sekulic, N., Ort, S., Konrad, M. & Lavie, A. (2004) Substrate-induced conformational changes in human UMP/CMP kinase, *J Biol Chem.* 279, 33882-9.
25. Yousef, M. S., Clark, S. A., Pruetz, P. K., Somasundaram, T., Ellington, W. R. & Chapman, M. S. (2003) Induced fit in guanidino kinases--comparison of substrate-free and transition state analog structures of arginine kinase, *Protein Sci.* 12, 103-11.
26. Hayward, S. (2004) Identification of specific interactions that drive ligand-induced closure in five enzymes with classic domain movements, *J Mol Biol.* 339, 1001-21.
27. Kuser, P. R., Krauchenco, S., Antunes, O. A. & Polikarpov, I. (2000) The high resolution crystal structure of yeast hexokinase PII with the correct primary sequence provides new insights into its mechanism of action, *J Biol Chem.* 275, 20814-20821.
28. Guddat, L. W., Bardwell, J. C. & Martin, J. L. (1998) Crystal structures of reduced and oxidized DsbA: investigation of domain motion and thiolate stabilization, *Structure.* 6, 757-67.
29. Magnusson, U., Chaudhuri, B. N., Ko, J., Park, C., Jones, T. A. & Mowbray, S. L. (2002) Hinge-bending motion of D-allose-binding protein from *Escherichia coli*: three open conformations, *J Biol Chem.* 277, 14077-84.
30. Lamour, V., Hoermann, L., Jeltsch, J. M., Oudet, P. & Moras, D. (2002) An open conformation of the *Thermus thermophilus* gyrase B ATP-binding domain, *J Biol Chem.* 277, 18947-53.
31. Tucker, P. A. & Sallai, L. (2007) The AAA+ superfamily--a myriad of motions, *Curr Opin Struct Biol.* 17, 641-52.
32. Lim, K., Read, R. J., Chen, C. C., Tempczyk, A., Wei, M., Ye, D., Wu, C., Dunaway-Mariano, D. & Herzberg, O. (2007) Swiveling domain mechanism in pyruvate phosphate dikinase, *Biochemistry.* 46, 14845-53.
33. Forstner, M., Kriechbaum, M., Laggner, P. & Wallimann, T. (1998) Structural changes of creatine kinase upon substrate binding, *Biophys J.* 75, 1016-23.
34. Cabrera, R., Fischer, H., Trapani, S., Craievich, A. F., Garratt, R. C., Guixe, V. & Babul, J. (2003) Domain motions and quaternary packing of phosphofructokinase-2 from *Escherichia coli* studied by small angle x-ray scattering and homology modeling, *J Biol Chem.* 278, 12913-12919.
35. Li, F., Gangal, M., Juliano, C., Gorfain, E., Taylor, S. S. & Johnson, D. A. (2002) Evidence for an internal entropy contribution to phosphoryl transfer: a study of domain closure, backbone flexibility, and the catalytic cycle of cAMP-dependent protein kinase, *J Mol Biol.* 315, 459-469.
36. Kumar, D. P., Tiwari, A. & Bhat, R. (2004) Effect of pH on the stability and structure of yeast hexokinase A. Acidic amino acid residues in the cleft region are critical for the opening and the closing of the structure, *J Biol Chem.* 279, 32093-32099.
37. Di Luccio, E., Petschacher, B., Voegtli, J., Chou, H. T., Stahlberg, H., Nidetzky, B. & Wilson, D. K. (2007) Structural and kinetic studies of induced fit in xylulose kinase from *Escherichia coli*, *J Mol Biol.* 365, 783-798.
38. Dey, S., Hu, Z., Xu, X. L., Sacchettini, J. C. & Grant, G. A. (2007) The effect of hinge mutations on effector binding and domain rotation in *Escherichia coli* D-3-phosphoglycerate dehydrogenase, *J Biol Chem.* 282, 18418-18426.
39. van Aalten, D. M., Haker, A., Hendriks, J., Hellingwerf, K. J., Joshua-Tor, L. & Crielgaard, W. (2002) Engineering photocycle dynamics. Crystal structures and kinetics of three photoactive yellow protein hinge-bending mutants, *J Biol Chem.* 277, 6463-6468.

40. Ito, K., Uyeda, T. Q., Suzuki, Y., Sutoh, K. & Yamamoto, K. (2003) Requirement of domain-domain interaction for conformational change and functional ATP hydrolysis in myosin, *J Biol Chem.* 278, 31049-31057.
41. Stokka, A. J., Carvalho, R. N., Barroso, J. F. & Flatmark, T. (2004) Probing the role of crystallographically defined/predicted hinge-bending regions in the substrate-induced global conformational transition and catalytic activation of human phenylalanine hydroxylase by single-site mutagenesis, *J Biol Chem.* 279, 26571-26580.
42. Balbo, P. B. & Bohm, A. (2007) Mechanism of poly(A) polymerase: structure of the enzyme-MgATP-RNA ternary complex and kinetic analysis, *Structure.* 15, 1117-1131.
43. Wolf-Watz, M., Thai, V., Henzler-Wildman, K., Hadjipavlou, G., Eisenmesser, E. Z. & Kern, D. (2004) Linkage between dynamics and catalysis in a thermophilic-mesophilic enzyme pair, *Nat Struct Mol Biol.* 11, 945-949.
44. Yon, J. M., Perahia, D. & Ghelis, C. (1998) Conformational dynamics and enzyme activity, *Biochimie.* 80, 33-42.
45. Berendsen, H. J. & Hayward, S. (2000) Collective protein dynamics in relation to function, *Curr Opin Struct Biol.* 10, 165-169.
46. Balog, E., Laberge, M. & Fidy, J. (2007) The influence of interdomain interactions on the intradomain motions in yeast phosphoglycerate kinase: a molecular dynamics study, *Biophys J.* 92, 1709-1716.
47. Shen, T., Tai, K., Henchman, R. H. & McCammon, J. A. (2002) Molecular dynamics of acetylcholinesterase, *Acc Chem Res.* 35, 332-340.
48. Zhang, J., Li, C., Chen, K., Zhu, W., Shen, X. & Jiang, H. (2006) Conformational transition pathway in the allosteric process of human glucokinase, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103, 13368-13373.
49. Osenkowski, P., Meroueh, S. O., Pavel, D., Mobashery, S. & Fridman, R. (2005) Mutational and structural analyses of the hinge region of membrane type 1-matrix metalloproteinase and enzyme processing, *J Biol Chem.* 280, 26160-26168.
50. Zhang, X. & Bruice, T. C. (2007) Temperature-dependent structure of the E x S complex of *Bacillus stearothermophilus* alcohol dehydrogenase, *Biochemistry.* 46, 837-843.
51. Stein, D. S. & Moore, K. H. (2001) Phosphorylation of nucleoside analog antiretrovirals: a review for clinicians, *Pharmacotherapy.* 21, 11-34.
52. Krishnan, P., Gullen, E. A., Lam, W., Dutschman, G. E., Grill, S. P. & Cheng, Y. C. (2003) Novel role of 3-phosphoglycerate kinase, a glycolytic enzyme, in the activation of L-nucleoside analogs, a new class of anticancer and antiviral agents, *J Biol Chem.* 278, 36726-32.
53. Gumina, G., Song, G. Y. & Chu, C. K. (2001) L-Nucleosides as chemotherapeutic agents, *FEMS Microbiol Lett.* 202, 9-15.
54. Krishnan, P., Fu, Q., Lam, W., Liou, J. Y., Dutschman, G. & Cheng, Y. C. (2002) Phosphorylation of pyrimidine deoxynucleoside analog diphosphates: selective phosphorylation of L-nucleoside analog diphosphates by 3-phosphoglycerate kinase, *J Biol Chem.* 277, 5453-9.
55. Krishnan, P., Liou, J. Y. & Cheng, Y. C. (2002) Phosphorylation of pyrimidine L-deoxynucleoside analog diphosphates. Kinetics of phosphorylation and dephosphorylation of nucleoside analog diphosphates and triphosphates by 3-phosphoglycerate kinase, *J Biol Chem.* 277, 31593-600.
56. Gallois-Montbrun, S., Faraj, A., Seclaman, E., Sommadossi, J. P., Deville-Bonne, D. & Veron, M. (2004) Broad specificity of human phosphoglycerate kinase for antiviral nucleoside analogs, *Biochem Pharmacol.* 68, 1749-56.
57. Mathe, C. & Gosselin, G. (2006) L-nucleoside enantiomers as antiviral drugs: a mini-review, *Antiviral Res.* 71, 276-81.

58. Varga, A., Szabó, J., Flachner, B., Roy, B., Konarev, P., Svergun, D., Závodszy, P., Perigaud, C., Barman, T., Lionne, C. & Vas, M. (2008) Interaction of human 3-phosphoglycerate kinase with L-ADP, the mirror image of D-ADP, *Biochem Biophys Res Commun.* 366, 994-1000.
59. Lay, A. J., Jiang, X. M., Kisker, O., Flynn, E., Underwood, A., Condrón, R. & Hogg, P. J. (2000) Phosphoglycerate kinase acts in tumour angiogenesis as a disulphide reductase, *Nature.* 408, 869-73.
60. Lay, A. J., Jiang, X. M., Daly, E., Sun, L. & Hogg, P. J. (2002) Plasmin reduction by phosphoglycerate kinase is a thiol-independent process, *J Biol Chem.* 277, 9062-8.
61. Hogg, P. J. (2003) Disulfide bonds as switches for protein function, *Trends Biochem Sci.* 28, 210-4.
62. Vishwanatha, J. K., Jindal, H. K. & Davis, R. G. (1992) The role of primer recognition proteins in DNA replication: association with nuclear matrix in HeLa cells, *J Cell Sci.* 101, 25-34.
63. Popanda, O., Fox, G. & Thielmann, H. W. (1998) Modulation of DNA polymerases alpha, delta and epsilon by lactate dehydrogenase and 3-phosphoglycerate kinase, *Biochim Biophys Acta.* 1397, 102-17.
64. Segel, G. B., Feig, S. A., Glader, B. E., Muller, A., Dutcher, P. & Nathan, D. G. (1975) Energy metabolism in human erythrocytes: the role of phosphoglycerate kinase in cation transport, *Blood.* 46, 271-8.
65. Xu, K. Y., Zweier, J. L. & Becker, L. C. (1995) Functional coupling between glycolysis and sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} transport, *Circ Res.* 77, 88-97.
66. Martinov, M. V., Plotnikov, A. G., Vitvitsky, V. M. & Ataullakhanov, F. I. (2000) Deficiencies of glycolytic enzymes as a possible cause of hemolytic anemia, *Biochim Biophys Acta.* 1474, 75-87.
67. Noel, N., Flanagan, J., Kalko, S. G., Bajo, M. J., Manu Mdel, M., Fuster, J. L., Beutler, E. & Corrons, J. L. (2006) Two new phosphoglycerate kinase mutations associated with chronic haemolytic anaemia and neurological dysfunction in two patients from Spain, *Br J Haematol.* 132, 523-9.
68. Banks, R. D., Blake, C. C. F., Evans, P. R., Haser, R., Rice, D. W., Hardy, G. W., Merrett, M. & Phillips, A. W. (1979) Sequence, structure and activity of phosphoglycerate kinase: a possible hinge-bending enzyme, *Nature.* 279, 773-777.
69. Watson, H. C., Walker, N. P. C., Shaw, P. J., Bryant, T. N., Wendell, P. L., Fothergill, L., Perkin, R. E., Conroy, S. C., Dobson, M. J., Tuite, M. F., Kingsman, A. J. & Kingsman, S. M. (1982) Sequence and structure of yeast phosphoglycerate kinase, *EMBO J.* 1, 1635-1640.
70. Kovári, Z., Flachner, B., Náráy-Szabó, G. & Vas, M. (2002) Crystallographic and thiol-reactivity studies on the complex of pig muscle phosphoglycerate kinase with ATP analogues: correlation between nucleotide binding mode and helix flexibility, *Biochemistry.* 41, 8796-806.
71. Davies, G. J., Gamblin, S. J., Littlechild, J. A., Dauter, Z., Wilson, K. S. & Watson, H. C. (1994) Structure of the ADP complex of the 3-phosphoglycerate kinase from *Bacillus stearothermophilus* at 1.65 Å, *Acta Crystallogr. D50*, 202-209.
72. Flachner, B., Kovári, Z., Varga, A., Gugolya, Z., Vonderviszt, F., Náráy-Szabó, G. & Vas, M. (2004) Role of Phosphate Chain Mobility of MgATP in Completing the 3-Phosphoglycerate Kinase Catalytic Site: Binding, Kinetic, and Crystallographic Studies with ATP and MgATP, *Biochemistry.* 43, 3436-3449.
73. Harlos, K., Vas, M. & Blake, C. C. F. (1992) Crystal structure of the binary complex of pig muscle phosphoglycerate kinase and its substrate 3-phospho-D-glycerate, *Proteins.* 12, 133-144.

74. Auerbach, G., Huber, R., Grättinger, M., Zaiss, K., Schurig, H., Jaenicke, R. & Jacob, U. (1997) Closed structure of phosphoglycerate kinase from *Thermotoga maritima* reveals the catalytic mechanism and determinants of thermal stability, *Structure*. 5, 1475-1483.
75. Bernstein, B. E. & Hol, W. G. (1998) Crystal structures of substrates and products bound to the phosphoglycerate kinase active site reveal the catalytic mechanism, *Biochemistry*. 37, 4429-4436.
76. Szilágyi, A. N., Ghosh, M., Garman, E. & Vas, M. (2001) A 1.8 Å resolution structure of pig muscle 3-phosphoglycerate kinase with bound MgADP and 3-phosphoglycerate in open conformation: new insight into the role of the nucleotide in domain closure, *J Mol Biol*. 306, 499-511.
77. May, A., Vas, M., Harlos, K. & Blake, C. C. F. (1996) 2.0 Å resolution structure of a ternary complex of pig muscle phosphoglycerate kinase containing 3-phospho-D-glycerate and the nucleotide Mn adenylylimidodiphosphate, *Proteins*. 24, 292-303.
78. Pickover, C. A., McKay, D. B., Engelman, D. M. & Steitz, T. A. (1979) Substrate binding closes the cleft between the domains of yeast phosphoglycerate kinase, *J. Biol. Chem*. 254, 11323-11329.
79. Ptitsyn, O. B., Pavlov, M. Y., Sinev, M. A. & Timchenko, A. A. (1986) Study of domain displacements in proteins by diffuse x-ray scattering in *Multidomain proteins* (Pathy, L. & Friedrich, P., eds) pp. 9-25, Akadémiai Kiadó, Budapest.
80. Henderson, S. J., Serpersu, E. H., Gerhardt, B. S. & Bunick, G. J. (1994) Conformational changes in yeast phosphoglycerate kinase upon substrate binding, *Biophys Chem*. 53, 95-104.
81. Sinev, M. A., Razzulyaev, O. I., Vas, M., Timchenko, A. A. & Ptitsyn, O. B. (1989) Correlation between enzyme activity and hinge-bending domain displacement in 3-phosphoglycerate kinase, *Eur. J. Biochem*. 180, 61-66.
82. Fairbrother, W. J., Hall, L., Littlechild, J. A., Walker, P. A., Watson, H. C. & Williams, R. J. (1989) Site-directed mutagenesis of histidine 62 in the 'basic patch' region of yeast phosphoglycerate kinase, *FEBS Lett*. 258, 247-250.
83. Barber, M. D., Gamblin, S. J., Watson, H. & Littlechild, J. A. (1993) Site-directed mutagenesis of yeast phosphoglycerate kinase. Arginines 65, 121 and 168, *FEBS Lett*. 320, 193-197.
84. Sherman, M. A., Fairbrother, W. J. & Mas, M. T. (1992) Characterization of the structure and properties of the His62-->Ala and Arg 38-->Ala mutants of yeast phosphoglycerate kinase: an investigation of the catalytic and activatory sites by site-directed mutagenesis and NMR, *Protein Sci*. 1, 752-760.
85. Sherman, M. A., Dean, S. A., Mathiowetz, A. M. & Mas, M. T. (1991) Site-directed mutations of arginine 65 at the periphery of the active site cleft of yeast 3-phosphoglycerate kinase enhance the catalytic activity and eliminate anion-dependent activation, *Protein Eng*. 4, 935-940.
86. Vas, M., Lakatos, S., Hajdu, J. & Friedrich, P. (1981) Kinetic behaviour and oligomeric state of 3-phosphoglyceroyl-D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, *Biochimie*. 63, 89-96.
87. Flachner, B., Varga, A., Szabó, J., Barna, L., Hajdú, I., Gyimesi, G., Závodszy, P. & Vas, M. (2005) Substrate-Assisted Movement of the Catalytic Lys 215 during Domain Closure: Site-Directed Mutagenesis Studies of Human 3-Phosphoglycerate Kinase, *Biochemistry*. 44, 16853-65.
88. Yount, R. G., D. Babcock, Ballantyne, W. & Ojala, D. (1971) Adenylyl Imidodiphosphate, an Adenosine Triphosphate Analog Containing a P-N-P Linkage, *Biochemistry*. 10, 2484-2489.
89. Kovári, Z. & Vas, M. (2004) Protein conformer selection by sequence-dependent packing contacts in crystals of 3-phosphoglycerate kinase, *Proteins*. 55, 198-209.

90. Cheung, C. W. & Mas, M. T. (1996) Substrate-induced conformational changes in yeast 3-phosphoglycerate kinase monitored by fluorescence of single tryptophan probes, *Protein Sci.* 5, 1144-1149.
91. Bernstein, B. E., Michels, P. A. M. & Hol, W. G. J. (1997) Synergistic effects of substrate-induced conformational changes in phosphoglycerate kinase activation, *Nature.* 385, 275-278.
92. Hayward, S. & Berendsen, H. J. (1998) Systematic analysis of domain motions in proteins from conformational change: new results on citrate synthase and T4 lysozyme, *Proteins.* 30, 144-54.
93. Varga, A., Flachner, B., Gráczer, É., Osváth, S., Szilágyi, A. N. & Vas, M. (2005) Correlation between conformational stability of the ternary enzyme-substrate complex and domain closure of 3-phosphoglycerate kinase, *Febs J.* 272, 1867-85.
94. Varga, A., Flachner, B., Konarev, P., Gráczer, É., Szabó, J., Svergun, D., Závodszy, P. & Vas, M. (2006) Substrate-induced double sided H-bond network as a means of domain closure in 3-phosphoglycerate kinase, *FEBS Lett.* 580, 2698-706.
95. Scopes, R. K. (1978) Binding of substrates and other anions to yeast phosphoglycerate kinase., *Eur. J. Biochem.* 91, 119-129.
96. Wiksell, E. & Larsson-Raznikiewicz, M. (1982) Substrate binding to phosphoglycerate kinase monitored by 1-anilino-8-naphthalenesulfonate, *J. Biol. Chem.* 257, 12672-12677.
97. Vas, M. & Batke, J. (1984) Adenine nucleotides affect the binding of 3-phosphoglycerate to pig muscle 3-phosphoglycerate kinase., *Eur. J. Biochem.* 139, 115-123.
98. Fairbrother, W. J., Walker, P. A., Minard, P., Littlechild, J. A., Watson, H. & Williams, R. J. P. (1989) NMR analysis of site-specific mutants of yeast phosphoglycerate kinase. An investigation of the triose-binding site, *Eur. J. Biochem.* 183, 57-67.
99. Vas, M., Merli, A. & Rossi, G. L. (1994) Antagonistic binding of substrates to 3-phosphoglycerate kinase monitored by the fluorescent analogue 2'(3')-O-(2,4,6-trinitrophenyl)adenosine 5'-triphosphate., *Biochem. J.* 301, 885-891.
100. Molnár, M. & Vas, M. (1993) Mg²⁺ affects the binding of ADP but not ATP to 3-phosphoglycerate kinase. Correlation between equilibrium dialysis binding and enzyme kinetic data, *Biochem. J.* 293, 595-599.
101. Merli, A., Szilágyi, A. N., Flachner, B., Rossi, G. L. & Vas, M. (2002) Nucleotide Binding to Pig Muscle 3-Phosphoglycerate Kinase in the Crystal and in Solution: Relationship between Substrate Antagonism and Interdomain Communication, *Biochemistry.* 41, 111-119.
102. Fairbrother, W. J., Graham, H. C. & Williams, R. J. P. (1990) The roles of ATP⁴⁻ and Mg²⁺ in control steps of phosphoglycerate kinase, *Eur. J. Biochem.* 190, 407-414.
103. Graham, H. C. & Williams, R. J. P. (1991) The roles of ADP²⁻ and Mg²⁺ in control steps of phosphoglycerate kinase, *Eur. J. Biochem.* 197, 81-91.
104. Deville-Bonne, D., Laine, R. & Garel, J. R. (1991) Substrate antagonism in the kinetic mechanism of E. coli phosphofructokinase-1, *FEBS Lett.* 290, 173-6.
105. Larsson-Raznikiewicz, M. & Malmstrom, B. G. (1961) The metalion activation of 3-phosphoglycerate kinase in correlation with metal-binding studies, *Arch Biochem Biophys.* 92, 94-9.
106. Webb, M. R. & Trentham, D. R. (1980) Analysis of chiral inorganic (160, 170, 180) thiophosphate and the stereochemistry of the 3-phosphoglycerate kinase reaction, *J. Biol. Chem.* 255, 1775-1779.
107. Geerlof, A., Schmidt, P. P., Travers, F. & Barman, T. (1997) Cryoenzymic studies on yeast 3-phosphoglycerate kinase. Attempt to obtain the kinetics of the hinge-bending motion, *Biochemistry.* 36, 5538-5545.

108. Geerlof, A., Travers, F., Barman, T. & Lionne, C. (2005) Perturbation of Yeast 3-Phosphoglycerate Kinase Reaction Mixtures with ADP: Transient Kinetics of Formation of ATP from Bound 1,3-Bisphosphoglycerate, *Biochemistry*. *44*, 14948-55.
109. Scopes, R. K. (1978) The steady-state kinetics of yeast phosphoglycerate kinase. Anomalous kinetic plots and the effects of salts on activity, *Eur. J. Biochem.* *85*, 503-516.
110. Szilágyi, A. N. & Vas, M. (1998) Anion activation of 3-phosphoglycerate kinase requires domain closure, *Biochemistry*. *37*, 8551-8563.
111. Burton, K. (1959) Formation constants for complexes of adenosine di- or tri-phosphate with magnesium or calcium ions, *Biochem. J.* *71*, 388-395.
112. Larsson-Raznikiewicz, M. (1964) Kinetic studies on the reaction catalysed by phosphoglycerate kinase: I. The effect of Mg^{2+} and adenosine-5'-triphosphate, *Biochim. Biophys. Acta.* *85*, 60-68.
113. Gupta, R. K., Gupta, P., Yashok, W. P. & Rose, Z. B. (1983) Measurement of the dissociation constant of MgATP at physiological nucleotide levels by a combination of ³¹P NMR and optical absorbance spectroscopy, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* *117*, 210-216.
114. Negelein, E. & Brömel, H. (1939) *Biochem. Z.* *301*, 135-.
115. Furfine, C. S. & Velick, S. F. (1965) The Acyl-Enzyme Intermediate and the Kinetic Mechanism of the Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase Reaction, *J Biol Chem.* *240*, 844-55.
116. Pace, C. N., Vajdos, F., Fee, L., Grimsley, G. & Gray, T. (1995) How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein, *Protein Sci.* *4*, 2411-2423.
117. Elődi, P. & Szőrényi, E. (1956) Crystallisation and comparative studies of D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from muscle of various mammals, *Acta Physiol. Acad. Sci. Hung.* *9*, 339-350.
118. Cserpán, I. & Vas, M. (1983) Effects of substrates on the heat stability and on the reactivities of thiol groups of 3-phosphoglycerate kinase, *Eur. J. Biochem.* *131*, 157-162.
119. Mas, M. T., Bailey, J. M. & Resplandor, Z. E. (1988) Site-directed mutagenesis of histidine-388 in the hinge region of yeast 3-phosphoglycerate kinase: effects on catalytic activity and activation by sulfate, *Biochemistry*. *27*, 1168-72.
120. Joao, H. C., Taddei, N. & Williams, R. J. (1992) Investigating interdomain region mutants Phe194----Leu and Phe194----Trp of yeast phosphoglycerate kinase by 1H-NMR spectroscopy, *Eur J Biochem.* *205*, 93-104.
121. Sherman, M. A., Szpikowska, B. K., Dean, S. A., Mathiowetz, A. M., McQueen, N. L. & Mas, M. T. (1990) Probing the role of arginines and histidines in the catalytic function and activation of yeast 3-phosphoglycerate kinase by site-directed mutagenesis, *J. Biol. Chem.* *265*, 10659-10665.
122. Fersht, A. R. (1999) *Structure and Mechanism in Protein Science: A Guide to Enzyme Catalysis and Protein Folding*, 2nd ed. edn, Freeman & Co., New York.

9. FÜGGELÉK

Különböző eredetű PGK enzimek összerendezett aminosavsorrendje

A szekvenciák alatt csillag jelöli a konzervatív oldalláncokat, piros szín jelöli az itt látható hét szekvenciában az adott pozícióban azonos aminosavat. A szekvenciák fölött a másodlagos szerkezeti egységek pozíciója is fel van tüntetve.

| | | β A | | α 1A | | α 1B | | β B | | | | | |
|-------------------------|-----|--------------------|------------|-----------------|------------|------------------|-------------|-------------|------------|------------|------------|------------|--|
| Human (hPGK) | 1 | SLSNKLTLDK | LDVKGKRVVM | R VDFNVP | MKN | NQITNNQRIK | AAVPSIKFCL | DNGAKSVVLM | 60 | | | | |
| Lóizom | 1 | SLSNKLTLDK | LDVKGKRVVM | R VDFNVP | MKN | NQITNNQRIK | AAVPSIKFCL | DDGAKSVVLM | 60 | | | | |
| Sertésizom | 1 | SLSNKLTLDK | LDVKGKRVVM | R VDFNVP | MKN | NQITNNQRIK | AAIPSIKFL | DNGAKSVVLM | 60 | | | | |
| <i>T. brucei</i> (Tb) | 5 | ---EKKSINE | CDLKGKRVLI | R VDFNVP | VKN | KGITNDYRIR | SALPTLKKVL | TEGG-SCVLM | 60 | | | | |
| <i>T. maritima</i> (Tm) | 1 | MEKMTIRD | VDLKGKRVIM | R VDFNVP | VKD | GVVQDDTRIR | AALPTIKYAL | EQGAK-VILL | 57 | | | | |
| <i>B. stearo</i> (Bs) | 1 | MNKKITIRD | VDLGRKRVFC | R VDFNVP | MEQ | GAITDDTRIR | PALPTIRYAL | BHGAK-VILA | 57 | | | | |
| Élesztő (Yt) | 1 | SLSSKLSVQD | LDLKDKRVTI | R VDFNVP | LDG | KKITSNQRIK | AALPTIKYVL | EHHPRYVULA | 60 | | | | |
| | | | | * * * * | | * | | | | | | | |
| | | | | α 2 | | β C | | α 3 | | | | | |
| Human (hPGK) | 61 | S HLGRPDVGP | M----- | ----- | PDKY | SLEPVAVELK | SLLGKDVLF | KDCVG-PEVE | 104 | | | | |
| Lóizom | 61 | S HLGRPDVGP | M----- | ----- | PDKY | SLQFVAVELK | SLLGKDVLF | KDCVG-PEVE | 104 | | | | |
| Sertésizom | 61 | S HLGRPDGIP | M----- | ----- | PDKY | SLEPVAVELK | SLLGKDVLF | KDCVG-PEVE | 104 | | | | |
| <i>T. brucei</i> (Tb) | 61 | S HLGRPKGKP | MAQAGKIRST | GGVPGFQQKA | TLKPVAKRLS | ELLLRPVTFP | PDCINAADV- | 119 | | | | | |
| <i>T. maritima</i> (Tm) | 58 | S HLGRPKGKV | ----- | ----- | SPEF | SLAPVAKRLS | ELLLGKVKVF | PAVVG-DEVK | 100 | | | | |
| <i>B. stearo</i> (Bs) | 58 | S HLGRPKGKV | ----- | ----- | VEEL | RLDAVAKRLG | ELLLERPVAKT | NEAVG-DEVK | 100 | | | | |
| Élesztő (Yt) | 61 | S HLGRPNER | ----- | ----- | NEKY | SLAPVAKELQ | SLLGKDVTFP | NDCVG-PEVE | 103 | | | | |
| | | * | | | | | | | | | | | |
| | | α 3 | | β D | | α (extra) | | β m | | β n | | α 4 | |
| Human (hPGK) | 105 | KACANPAAGS | VILLENLRFH | VEEE----- | -GKGK | DASGN | KVKAEP | PAKIE | AFRASLSKLG | 157 | | | |
| Lóizom | 105 | KACADPAAGS | VILLENLRFH | VEE----- | -GKGK | DASGN | KVKAEP | PAKIE | TFRASLSKLG | 157 | | | |
| Sertésizom | 105 | KACADPAAGS | VILLENLRFH | VEE----- | -GKGK | DASGS | KVKADP | AKIE | AFRASLSKLG | 157 | | | |
| <i>T. brucei</i> (Tb) | 120 | --VSKMSPGD | VILLENVRFY | KEE-GSKKAK | D----- | ----- | ----- | ----- | AMAKILASVY | 159 | | | |
| <i>T. maritima</i> (Tm) | 101 | KAVEELKEGE | VILLENVRFH | PGE----- | ----- | ----- | ----- | ----- | TKNDP | ELAKFWASLA | 138 | | |
| <i>B. stearo</i> (Bs) | 101 | AAVDRLNEGD | VILLENVRFY | PGE----- | K----- | ----- | ----- | ----- | DP | ELAKAFaela | 138 | | |
| Élesztő (Yt) | 104 | AAVKASAPGS | VILLENLRYH | IEEGSRKV- | D----- | ----- | ----- | ----- | GQ | KVKASKEDVQ | KFRHELSSLA | 155 | |
| | | | | * * | | | | | | | | | |
| | | β E | | α 5 | | α 6 | | β F | | α 7 | | β G | |
| Human (hPGK) | 158 | DVYVNDAFGT | AHRAHSSMVG | V--NLPQKAG | GFLMKKELNY | FAKALES | PER | PFLAILGGAK | 215 | | | | |
| Lóizom | 158 | DVYVNDAFGT | AHRAHSSMVG | V--NLPQKAG | GFLMKKELNY | FAKALES | PER | PFLAILGGAK | 215 | | | | |
| Sertésizom | 158 | DVYVNDAFGT | AHRAHSSMVG | V--NLPQKAG | GFLMKKELNY | FAKALES | PER | PFLAILGGAK | 215 | | | | |
| <i>T. brucei</i> (Tb) | 160 | DVYISDAFGT | AHRDSATMTG | IPKILNGAA | GYLMEKEISY | FAKVLGNPP | PLVAIVGGAK | 219 | | | | | |
| <i>T. maritima</i> (Tm) | 139 | DIHVNDAFGT | AHRAHASNVG | IAQFIP-SVA | GFLMEKEIKF | LSKVTYNPEK | PYVVVILGGAK | 197 | | | | | |
| <i>B. stearo</i> (Bs) | 139 | DLVYVNDAFGA | AHRAHASTEG | IAHYLP-AVA | GFLMEKELEV | LKALSNDPR | PFTAIIGGAK | 197 | | | | | |
| Élesztő (Yt) | 156 | DVYINDAFGT | AHRAHSSMVG | F--DLPQRAA | GFLLEKELKY | FGKALENPT | PFLAILGGAK | 213 | | | | | |
| | | * * | * | | * | | * | * * * * | | | | | |
| | | α 8 | | β H | | α 9 | | α 10 | | | | | |
| Human (hPGK) | 216 | VADKIQILINN | MLDKVNMII | GGGMAFTFLK | VLNNMEIGTS | LFDEEGAKIV | KDLMSKAERN | 275 | | | | | |
| Lóizom | 216 | VADKIQILINN | MLDKVNMII | GGGMAFTFLK | VLNNMEIGTS | LFDEEGAKIV | KNLMSKAERN | 275 | | | | | |
| Sertésizom | 216 | VADKIQILINN | MLDKVNMII | GGGMAFTFLK | VLNNMEIGTS | LFDEEGSKIV | KDLMSKAERN | 275 | | | | | |
| <i>T. brucei</i> (Tb) | 220 | VSDKIQLLDN | MLQRIDYLLI | GGAMAYTFLK | AQGY-SIGKS | KCEESKLEFA | RSLKKAEDR | 278 | | | | | |
| <i>T. maritima</i> (Tm) | 198 | VSDKIGVITN | LMQKADRLII | GGAMMFTFLK | ALGK-EVGS | RVEEDKIDLA | KELVEKAKEK | 256 | | | | | |
| <i>B. stearo</i> (Bs) | 198 | VKDKIGVIDN | LLEKVDNLI | GGGLAYTFVK | ALGH-DVGS | LLEEDKIELA | KSPMEKAKEK | 256 | | | | | |
| Élesztő (Yt) | 214 | VADKIQILIDN | LLDKVDVSI | GGGMAFTFKK | VLNTEIGDS | IFDKAGAEIV | PKLMEKAKAK | 273 | | | | | |
| | | * | | * | * | * | | | | | | | |

| | | βI | βO | βP | βQ | $\alpha 11$ | βJ | |
|-------------------------|-----|--------------------|------------|------------|--------------------|--------------------|------------|-----|
| Human (hPGK) | 276 | GVKITL PVDF | VTADKFDENA | KTGQATVASG | IPAGWM GLDC | GPES SKKYAE | AVTRAKQIVW | 335 |
| Lóizom | 276 | GVKITL PVDF | VTADKFDENA | KTGQATVASG | IPAGWM GLDC | GPES SKKYAE | AVARAKQIVW | 335 |
| Sertésizom | 276 | GVKITL PVDF | VTADKFDENA | KTGQATVASG | IPAGWM GLDC | GPES SKKYSE | AVARAKQIVW | 335 |
| <i>T. brucei</i> (Tb) | 279 | KVQVIL PDH | VCHTEFKAVD | SPLITED-QN | IP EGHMALDI | GP KTIEKYVQ | TIGKCKSAIW | 337 |
| <i>T. maritima</i> (Tm) | 257 | GVEIVL PVDA | VIAQKIEPGV | EKKVVRIDDG | IP EGWMLDI | GP ETIELFKQ | KLSDAKTVVW | 316 |
| <i>B. stearo</i> (Bs) | 257 | GVRFY MPVDV | VVADRFANDA | NTKVVPID-A | IP ADWSALDI | GP KTRELYRD | VIRESKLVVW | 315 |
| Élesztő (Yt) | 274 | GVEVVL PVDF | IIADAFSADA | NTKTVTDKEG | IP AGWQLDN | GP ESRKLFAA | TVAKAKTIVW | 333 |
| | | * | | | * | | * | |

| | | $\alpha 12$ | βK | $\alpha 13$ | βL | | | |
|-------------------------|-----|------------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|--------------------|--------------------|-----|
| Human (hPGK) | 336 | NGFVGVFEWE | AFARG TKALM | DEVVKATSR- | GCITII GGGD | TATCCAKWNT | EDKVSHVSTG | 394 |
| Lóizom | 336 | NGFVGVFEWE | AFARG TKALM | DEVVKATSR- | GCITII GGGD | TATCCAKWNT | EDKVSHVSTG | 394 |
| Sertésizom | 336 | NGFVGVFEWE | AFAG QTKALM | DEVVKATSR- | GCITII GGGD | TATCCAKWNT | EDKVSHVSTG | 394 |
| <i>T. brucei</i> (Tb) | 338 | NGF MGV FE FMV | FY SKGT FAIA | KAMGRGTHEH | GLMSII GGGD | SASAAQLSGE | AKRMSHVSTG | 397 |
| <i>T. maritima</i> (Tm) | 317 | NGF MGV FE ID | DF AEGT KQVA | LAI AALTEK - | GAITV GGGD | SAAAVNK FGL | EDKFSHVSTG | 375 |
| <i>B. stearo</i> (Bs) | 316 | NGF MGV FE MD | AF AHG TKAIA | EALAEAL--- | DTYSV GGGD | SAAAVEK FGL | ADKMDHI STG | 372 |
| Élesztő (Yt) | 334 | NGF PGV FE FE | K FAAG TKALL | DEVVKSSAA- | GNTV II GGGD | TATVAKYK YV | TDKISHV STG | 392 |
| | | *** * * | | | ** | | ** | |

| | | $\alpha 14$ | $\alpha 15$ | |
|-------------------------|-----|---------------------|----------------------|----------|
| Human (hPGK) | 395 | GGASLEL LEG | KVLP GV DALS | NI 416 |
| Lóizom | 395 | GGASLEL LEG | KVLP GV DAAS | NV 416 |
| Sertésizom | 395 | GGASLEL LEG | KVLP GV DALS | NV 416 |
| <i>T. brucei</i> (Tb) | 398 | GGASLEL LEG | K TL PGVTVLD | EK 419 |
| <i>T. maritima</i> (Tm) | 376 | GGASLE F LEG | KEL PF CIASMR | IKKA 399 |
| <i>B. stearo</i> (Bs) | 373 | GGASLE F MEG | K QL PGVVALE | DK 394 |
| Élesztő (Yt) | 393 | GGASLEL LEG | KEL PF GVAFLS | EKK 415 |

RÖVID ÖSSZEFOGLALÁS

A több doménből felépülő enzimek működését biztosítja a domének relatív elmozdulása, melyet a fehérjeszerkezet flexibilitása tesz lehetővé és a szubsztrátokkal való kölcsönhatás szabályozza. Ekkor alakul ki a működőképes, aktív konformáció. Ezen enzimek működésének megértéséhez szükséges a doménmozgások mechanizmusának, a molekuláris csuklók működésének és az alloszterikus útvonalaknak a felderítése. Doktori munkám során a fenti kérdések vizsgálatára modellként egy tipikus két doménből felépülő kinázt, a 3-foszfoglucérat kinázt (PGK) választottam. Célom annak az alloszterikus konformációváltozásnak molekuláris szinten történő megértése volt, amelyet a szubsztrátok kötődése indít el és az aktív zárt konformáció kialakulását eredményezi. Munkám kezdetén már volt elképzelés a PGK fő molekuláris csukló régiójának működéséről. A feltételezhető fő csukló régióban és annak környezetében található aminosavmaradékok szerepét irányított mutagenézissel, enzimológiai és biofizikai módszerekkel (CD, DSC, ITC, SAXS, grafikai analízis) tanulmányoztam. Megállapítottam, hogy a PGK zárt konformációja csak mindkét szubsztrát együttes jelenlétében, a terner enzim-szubsztrát komplexben alakul ki. Az interdomén régióban lévő β L redő végén elhelyezkedő feltételezett csukló konzervatív oldalláncainak egyedi ill. együttes (dupla mutáns) Ala-ra való cseréjével megmutattam, hogy szerepük a doménzáródásban egyedileg is fontos, de együttes részvételük a döntő. A T393 aminosavmaradék kitörlését kísérő drasztikus aktivitásvesztés egyértelműen rávilágított arra is, hogy a β L redő alakja döntő fontosságú a doménzáródás szempontjából, ahogyan az egy molekuláris csuklótól várható. Izotermális titráló kalorimetriás méréseim megmutatták, hogy a T393del mutáns a szubsztrátokat igen jól, de rigidén köti, ami az inaktív nyitott konformáció stabilizálásával függ össze. Meghatároztam a vad típusú enzim esetén a doménzáródást kísérő szabadentalpiaváltozást is, ami kb. 4 kJ/mol értéknek adódott. Mutációs kísérleteim megmutatták továbbá, hogy a F165 és E192 oldalláncok kölcsönhatásai fontosak az interdomén régió stabilitásának fenntartásában, de résztvesznek az információ közvetítésében is a β L fő csuklótól az α 7 hélixnél lévő csuklók felé. A szubsztrátkötőhelyeken végzett mutagenézis kísérleteim alapján definiáltam a szubsztrátkötő zsebektől a fő csukló régióig terjedő „konformációs útvonalat”, melyben kizárólag konzervatív oldalláncok vesznek részt, beleértve a szubsztrátkötő R38, K219, N336 és E343 oldalláncokat is.

SUMMARY (ANGOL NYELVŰ ÖSSZEFOGLALÁS)

Relative domain movements of multidomain enzymes are essential for catalysis. These movements are allowed by the structural flexibility of proteins and mediated by enzyme-substrate interactions. The functionally competent active conformation is formed as a result of domain motion. Elucidation of the mechanism of domain movements, understanding operation of molecular hinges and mapping of allosteric networks are required for clarifying the structure-function relationship of such enzymes. My PhD work is aimed to study such problems with 3-phosphoglycerate kinase (PGK), a typical two-domain kinase, considered as a model. The purpose of the work was to understand the molecular details of allosteric conformational changes resulted in formation of the active, closed conformation. Previously, a hypothesis was put forward about the location and the possible mechanism of operation of the main molecular hinge of PGK. Here I studied the role of amino acid residues at and near the main hinge by site-directed mutagenesis and the mutants were characterized in enzymological and biophysical (CD, DSC, ITC, SAXS, molecular graphics) investigations. It is shown by SAXS study, that the closed conformation of PGK is only formed in the presence of both substrates, i.e. in the enzyme-substrate ternary complex. The conserved side-chains of the postulated hinge at the end of β strand L have been changed individually or simultaneously (double mutants) into Ala and are shown to be important in domain closure, especially if we consider their cumulative effects. A drastic activity loss, detected upon deletion of the residue of T393, confirm the importance of the shape of β strand L in domain closure, as expected from a molecular hinge. I have shown by isothermal calorimetric titrations that the mutant T393del binds the substrates tightly, but with high rigidity, which can be due to stabilization of the inactive open conformation. The changes of free enthalpy that accompanies domain closure of the wild type PGK has been also determined and found to be around 4 kJ/mole. The mutagenesis experiments have further shown that the contacts of side chains of F165 and E192 are important in stabilizing the interdomain region, but also participate in transmission of the conformational information from the main hinge at β strand L to the hinges at $\alpha 7$ helix. Mutagenesis experiments at the substrate binding sites have allowed defining a „conformational pathway” from the substrate sites to the main hinge with participation of several conserved side-chains including the substrate binding R38, K219, N336 and E343 ones.