

# Egy szimmetrikus homodimer $\text{Ca}^{2+}$ -kötő fehérje, az S100A4 aszimmetrikus kölcsönhatásai

NYITRAY László\*

ELTE Biokémiai Tanszék, Pázmány Péter sétány 1/c, 1112 Budapest

## Bevezetés: szimmetria és aszimmetria a fehérjeszerkezetek világában

Herman Weyl, a híres matematikus így fogalmaz a „Szimmetria” című könyvében: „A szimmetria olyan fogalom, mellyel az ember hosszú korokon át igyekezett a rendet, szépséget és tökéletességet megérteni”.<sup>1</sup> Természetesen igaz ez az állítás a szerkezeti biológusokra is. Elég csak arra gondolnunk, hogy a sokak által a molekuláris és a szerkezeti biológia születésének tekintett felfedezés, a DNS kettős hélix szerkezet megfejtése és az abban rejlő elegáns információtaralási mód feltárása mit jelentett a biológiai „rend” megértése terén. Ez a felfedezés 1953-ban volt, amikor a proteinek, a biológia szempontból „elsődleges” (a görög *proteios* szó jelentése ez) makromolekulák térszerkezetéről még nem voltak ismereteink, az első fehérje kristályszerkezeti modell megszületésére még öt évet kellett várni.

A weyli definíció alapján nem volt meglepő a fehérjekutatók is azt feltételezték, hogy az általuk vizsgált bonyolult molekulák téralkata is a természet által kedvelt, nekünk esztétikai élményt nyújtó szimmetrikus szerkezetet mutat. De tévedtek – amikor John Kendrew bemutatta az oxigéntároló fehérje, a mioglobint térszerkezeti modelljét, azt csúnyának látta, s a legfontosabb tulajdonságának a komplexitáson túl a szimmetria hiányát tekintette.<sup>2</sup> Ma már több tízezer fehérje térszerkezetét ismerjük, de a keresett szimmetriát az egyetlen polipeptidláncból álló fehérjék háromdimenziós szerkezetében sehol sem fedezhetjük fel. Ez korántsem meglepő, hiszen a biológiailag fontos polimerek építőköveire a homokiralitás elve áll fenn, ami kizárja a tükörszimmetriát a fehérjék világából.

A több tízezer ismert fehérje közel felének téralkata mégis szimmetrikus felépítésű, mivel a fehérjemolekulák több mint kétharmada negyedleges szerkezettel bír, azaz több polipeptidláncból (több alegységből) áll, amelyek többségében azonosak (homooligomerek), bár van köztük sok heterooligomer is. (Zárójeles megjegyzés, hogy a molekuláris biológusok számára a „molekula” fogalma nem egyezik a kémikusokéval, mivel az előbbiek a hemoglobint vagy a DNS-t molekulának tekintik, holott a hemoglobin négy polipeptidlánc és a DNS két polinukleotidlánc között „csak” gyenge másodlagos kötések vannak.) A homooligomer fehérjék döntő többsége forgási (kisebb hányaduk helikális) szimmetriát mutat, azaz a weyli világrend helyreállt. Érdemes megjegyezni, hogy már a Max Perutz által megoldott második fehérje térszerkezet, a két-két azonos alegységből álló, tetramer hemoglobin térszerkezete is szimmetrikusnak bizonyult (pszeudo- $D_2$ -es szimmetriájú).

A negyedleges szerkezetű fehérjék legnagyobb része homodimer. Ezek szinte kivétel nélkül  $C_2$  szimmetriát

\* Tel.: +36 1 381-2171; fax: +36 1 381-2172; e-mail: nyitray@elte.hu

mutatnak, de érdekes módon, a komplexitás irányában csökkenő sorrendben az összes (forgási) krisztallográfiai szimmetriatípus megtalálható az oligomer fehérjeszerkezetek között ( $C_3$ ,  $C_4$ ,  $C_5$ ,  $C_6$ ,  $C_7$ ,  $D_2$ ,  $D_3$ ,  $D_4$ ,  $D_6$ , T, O, I). Mi az a hajtóerő, ami a fehérjék világában előnyt biztosít a szimmetrikus oligomerek számára? Jacques Monod tömören így fogalmazta meg a választ: „...*finiteness, stability, and self-assembly*”.<sup>3</sup> Az oligomer fehérjék szimmetriaviszonyainak és evolúciójának további részleteiről a téma iránt érdeklődő olvasók a hivatkozások között szereplő alapos összefoglaló közleményben olvashatnak.<sup>4</sup>

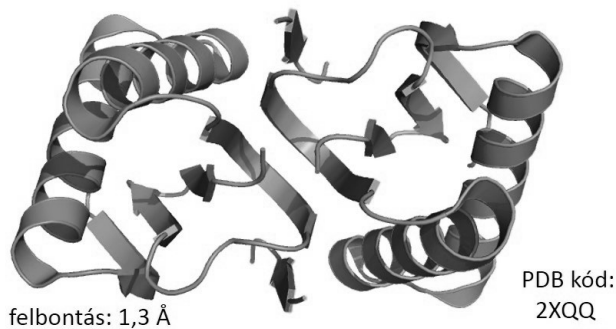
Vajon mennyire tökéletes a szimmetria a komplex fehérjékben és a fehérje komplexekben? Viszonylag gyakori a „szimmetriasértés”, bár ezek az esetek többségében viszonylag kismértékűek és lokálisak. A szimmetria átmeneti megszűnése tipikus tulajdonsága az allosztérikusan szabályozott illetve kooperációra képes oligomer szerkezetű fehérjéknek.<sup>4</sup> Nagyobb mértékű aszimmetria alakul ki sok esetben a jeltovábbító membránreceptor fehérjékben a ligandumaik (pl. fehérje hormonok) kötésének illetve a transzkripciós faktorok DNS-hez kötődésének hatására. A szimmetrikus oligomer szabályozófehérjékben bekövetkező aszimmetrikus perturbációkról és az ezeket felfedő módszertani lehetőségekről kitűnő összefoglaló közleményt jelentetett meg a közelmúltban két magyar kutató.<sup>5</sup>

A Krisztallográfia Nemzetközi Éve keretében megtartott akadémiai ülésen elhangzott előadásomban egy olyan fehérjeszerkezeti példát ismerttettem, ahol a kísérleteink során egy tumor áttétképzésben szerepet játszó homodimer fehérjének egy partnerfehérjével alkotott komplexében jelentős mértékű szimmetriasértést tártunk fel – jóllehet, az eddigi szakirodalom szimmetrikus kölcsönhatást vetített előre.

Mielőtt bemutatom a kutatásaink tárgyát képező kölcsönható fehérjéket, néhány általános megjegyzés a fehérje-fehérje kölcsönhatások (PPI) jelentőségéről és típusairól. Az élő rendszerek megismerésének egyik kulcsa, hogy a megértsük a biomolekulák közötti molekuláris felismerés szerkezeti alapjait. Ebből a szempontból a legfontosabbak a két vagy több fehérje közötti (valamint a DNS-kötő fehérjék és a DNS közötti) kölcsönhatások feltérképezése. A fehérjék egymással és más molekulákkal, ionokkal kizárólag ezeken a kölcsönhatásokon keresztül képesek kommunikálni. A fehérjék közötti kölcsönhatások részletes, mechanisztikus feltárása a jelenkor szerkezeti biológiájának egyik fő agendája.

Alapvetően kétféle PPI-t különböztetünk meg. Az egyik típusú interakció két globuláris fehérje vagy azok doménjei

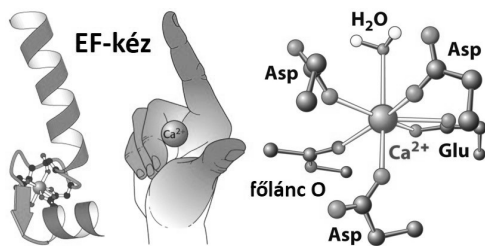
(kvázi-független feltekeredési egységei) között jön létre, amelyek sokszor kiterjedt kölcsönható felszín alkotnak. A második típusnál – amely az én érdeklődésem homlokterében áll – az egyik kölcsönható partner rövidebb peptidszakasza, egy ún. lineáris motívum vesz részt a kötődésben. A lineáris motívumok nagyon gyakran eredendően rendezetlen fehérjeszakaszokon (IDP: *intrinsically disordered protein*) fordulnak elő, központi szerepet játszanak a tranziens fehérje-fehérje hálózatok (az interaktom) kialakításában, és halmozottan fordulnak elő a jeltoábbítás (szignál transzdukció) valamint sok más szabályozó fehérje kölcsönhatásaiban.<sup>6</sup> Példaként egy lineáris motívum és egy sok PPI-ben résztvevő homodimer csomóponti fehérje (*hub protein*) között létrejött szimmetrikus 2:2 komplex térszerkezetét mutatom be, amelyet a kutatócsoportunk határozott meg.<sup>7</sup>



1. **Ábra.** Az LC8 homodimer fehérje két lineáris kötőmotívummal (a miozin-5a motorfehérjéből származó peptid) kialakított szimmetrikus komplexének kristályszerkezeti modellje.

### Az EF-kéz $\text{Ca}^{2+}$ -kötő fehérjecsalád és az S100 fehérjék

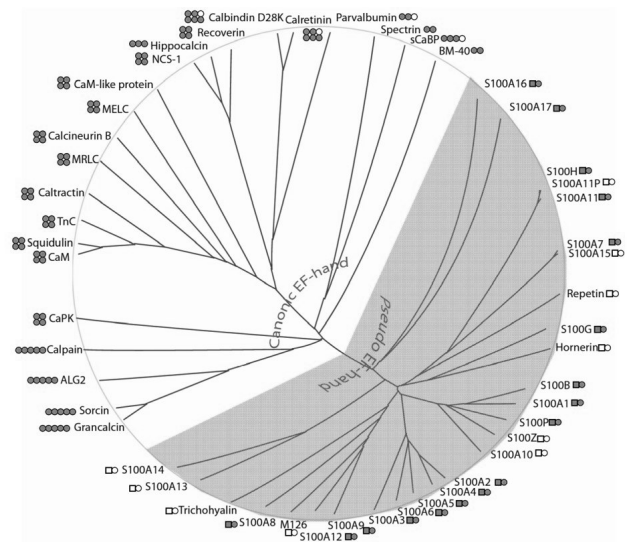
A  $\text{Ca}^{2+}$  a sejtek számára egy ún. másodlagos hírvívó, amely az izomkontrakciótól és a sejt migrációtól kezdve a programozott sejthalálig számos biológiai folyamatot szabályoz. A sejtben belüli koncentrációja külső jelek hatására a nyugalmi  $<10^{-7}$  mol/dm<sup>3</sup>-ról  $\sim 10^{-6}$  mol/dm<sup>3</sup>-re emelkedik, s  $\text{Ca}^{2+}$ -érzékeny fehérjékhez kötődik. A  $\text{Ca}^{2+}$ -kötés hatására ezek a „molekuláris kapcsoló” szerepet betöltő fehérjék olyan konformációváltozáson mennek keresztül, aminek következtében kölcsönhatásba lépnek más fehérjékkel, s azok aktivitását szabályozzák. A  $\text{Ca}^{2+}$  minden esetben koordinációs kötéssel kapcsolódik a fehérjékhez, méghozzá a legtöbb szabályozó fehérjében egy tipikus hélix-hurok-hélix szerkezetű motívumhoz, amely az EF-kéz nevet viseli (a név a parvalbumin  $\text{Ca}^{2+}$ -kötő fehérje „E” és „F” jelű  $\alpha$ -hélixére és az emberi kézhez hasonló alakjára utal).



2. **Ábra.** Egy tipikus EF-kéz  $\text{Ca}^{2+}$ -kötő motívum szerkezete és a kétértékű kation koordinálásában résztvevő oxigén atomok elhelyezkedése.

Az EF-kéz 12 aminosavból álló hurok régiójában található oxigéntartalmú oldalláncok (elsősorban Asp és Glu), a polipeptidgerinc karbonil-oxigénje vagy szerkezeti vizek koordinálhatják a kétértékű kationt, általában pentagonális bipiramis alakú ligandumteret alkotva. Szinte mindig két EF-kéz motívum alkot egy kooperatív funkcionális egységet. Az EF-kéz fehérjecsalád (amelynek  $>500$  tagja ismert) legtipikusabb képviselője az eukarióta sejtekben univerzálisan előforduló, 4 kalciumiont kötő kalmodulin.

Az erősen konzervatív kalmodullinnal ellentétben az általunk vizsgált S100 fehérjecsalád tagjai igen sokfélék. Az evolúció során a gerincesekben jelentek meg, a humán genom huszonnégy S100 gént kódol, s az ezekről átiródó izoformák többé-kevésbé szövetspecifikusan fejlődnek ki. Döntő többségük szimmetrikus homodimer fehérje, mindkét alegységük két EF-kéz  $\text{Ca}^{2+}$ -kötő motívumot tartalmaz, amelyek közül az egyik a csak erre a családra jellemző ún. pseudo-EF-kéz.<sup>8</sup>



3. **Ábra** Az EF-kéz fehérjecsalád tagjainak részleges törzsfája. Szürke háttérrel az S100 fehérjék alcsaládját (a kis gömbök és négyzetek a kanonikus ill. a pseudo-EF-kéz motívumokat jelölik)

Honnan származik az S100 család elnevezése? A biokémikusok által előszeretettel használt durva fehérjetisztítási módszer, a kisózás során ezek a fehérjék 100%-os ammónium-szulfát szaturáció mellett is oldatban maradnak (így könnyen tisztíthatók).

Az S100 fehérjék fiziológiás jelentőségéről összefoglalóan azt mondhatjuk, hogy nagyon sokoldalú a szerepük, amit még fokoz, hogy a sejtben belül és kívül is megtalálhatók.  $\text{Ca}^{2+}$ -függő módon célfehérjékhez kötődve szabályozzák többek között a sejtproliferációt, differenciációt, apoptózist, az energia metabolizmust, gyulladási folyamatokat és a sejt migrációt. Humán vonatkozásban fontos kiemelnünk a patológiás jelentőségüket, mivel a túlermelődésük számos betegséggel hozható összefüggésbe: neurológiai kórképekkel (pl. S100B), különböző tumorok kialakulásával (pl. S1002, S1006, S100P), gyulladási folyamatokkal (S1008/9, S100A12), pikkelysömörrel (S100A7) és kardiomiopátiákkal (S100A1).<sup>9</sup>

### Az S100A4 funkciói, diszfunkciói és célfehérjéi

Az S100 családtagok közül a munkacsoportom az S100A4, „leánykori” nevén metasztazin fehérjével kezdett el foglalkozni, mivel ismert volt az irodalomból, hogy az általam korábban sokat tanulmányozott miozin motorfehérjék egyik, ún. nem-izom izoformájának (NM2A) *coiled-coil* régiójához kötődik, és ezáltal befolyásolja a sejtek migrációs képességét.

„A Small Actor Playing Many Roles” – ezt a címet adta az S100A4-gyel foglalkozó egyik kutató a fehérjét bemutató összefoglaló közleménynek.<sup>10</sup> A számos fiziológiás funkció mellett a metasztazin név egy diszfunkcióra utal: számos klinikai eredmény és állatmodellen végzett kísérlet is azt mutatja, hogy az S100A4 mennyisége jelentősen megemelkedik a metasztázisra, tehát áttétképzésre hajlamos mell-, vastagbél-, petefészek-, prosztata és néhány további ráksejtekben. Minél magasabb a fehérje szintje a primer tumorban, annál nagyobb valószínűséggel következik be az áttétképzés. Időközben kiderült, hogy az S100A4 túltermelődése több más krónikus betegség, így a reumás ízületi gyulladás, különböző fibrózisok, sőt a legújabb kutatások szerint allergiás kórképek kialakulásában és fenntartásában is szerepet játszik.<sup>11</sup>

Az 4. ábra foglalja össze azokat a funkciókat, amelyekben az S100A4 minden bizonnyal szerepet játszik, valamint a túltermelődéséből adódó diszfunkciókat és betegségeket. Érdekes módon az ún. KO egér, amelyből célzottan eltávolították („kiütötték”) az S100A4 gént, nem nagyon különbözik a vad-típusú társaitól – kivéve, hogy a makrofág sejtejei nem képesek a gyulladásos helyekre kemotaxissal eljutni; ezenkívül ezekben az egerekben szinte sosem alakul ki tumor metasztázis.<sup>12</sup>

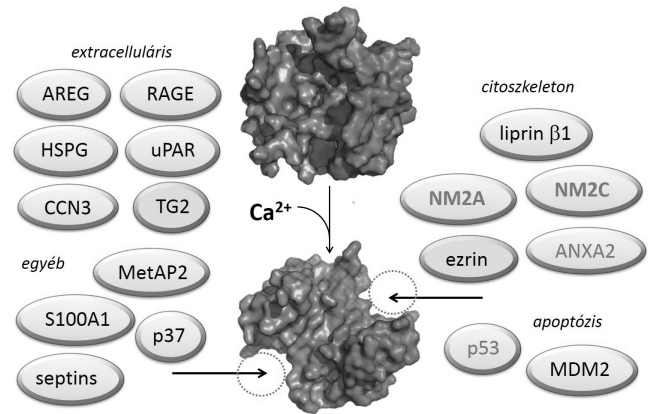


4. Ábra. Az S100A4 fehérje funkciói (felső két sor), diszfunkciói (harmadik sor), valamint azok a betegségek (alsó sor), amelyekkel kapcsolatba hozható

Mit tudunk az S100A4 célfehérjéről? Az irodalomban eddig közel két tucat fehérjéről bizonyították kísérletesen (de az esetek egy részénél csak *in vitro*), hogy komplexet alkotnak az S100A4-gyel. A  $Ca^{2+}$ -kötés hatására olyan konformációváltozás következik be a fehérje mindkét alegységében, aminek a hatására hozzáférhetővé válik két azonos hidrofób kötőzseb, amelyet a célfehérjékben található S100 kötőszekvenciák felismernek.

### A nem-izom miozin-2 motorfehérje

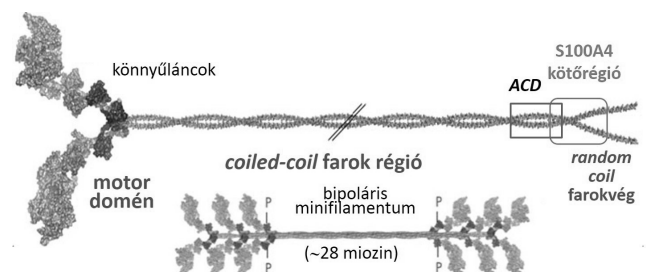
Mi a szerepük és milyen a szerkezetük a „nem-izom” miozin-2 (NM2) motorfehérjéknek? Az ún. konvencionális



5. Ábra. Az S100A4 célfehérjéi, amelyek az ábra közepén bemutatott konformációváltozással kinyíló, két azonos hidrofób zsebbe (körök szaggatott vonallal) kötődnek.

miozint (miozin-2), amely képes az ATP-ben tárolt kémiai energiáját mechanikai munkává alakítani, az izom motorjaként ismerjük, habár a kissé eltérő „nem-izom” izoformái majdnem minden eukarióta sejtben előfordulnak. Sokoldalú szerepet töltenek be a sejtosztódásban, sejt migrációban, sejt differenciációban, általában az aktin citoskeleton átrendeződését igénylő folyamatokban. A három NM2 izoforma (NM2A, 2B, 2C) sejt típusonként eltérő mértékben termelődik, különböző helyen lokalizálódik és eltérő mechanikai tulajdonságokkal bír. Az izom vastag (több száz miozinból álló) filamentumaitól eltérően az NM2 motorok 28 molekulából álló minifilamentummá állnak össze, s kizárólag ebben a komplex formában képesek erő kifejtésre.<sup>12</sup>

A miozin-2 heterohexamér fehérje, két ún. nehézláncból és négy könnyűláncból áll. A nehézláncok N-terminális végén található a két globuláris motor domén (itt történik az ATP hidrolízis, az aktinkötés és az erőgenerálás), ide kötődnek a regulációs szerepet betöltő könnyűláncok. A két fejet egy hosszú, *coiled-coil* szerkezetű fark régió tartja össze, míg a *coiled-coil* felszínnek eltérő töltésmintázata felelős ionos kötésekkel a filamentumok kialakításáért. Ez utóbbihoz nélkülözhetetlen a *coiled-coil* végénél található ACD (*assembly competent domain*) régió, ami részben átfed az általunk pontosított S100A4 kötőrégióval, ami viszont részben a szerkezet nélküli „farkvégre” esik.



6. Ábra. A nem-izom miozin-2 térszerkezete (felül) és a funkcióképes minifilamentumok vázlatos szerkezete (lent).

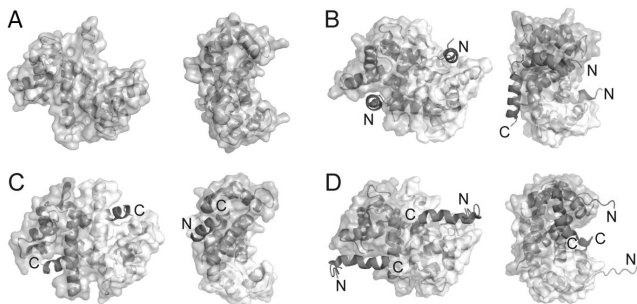
Az amöboid migrációra képes sejtekben (pl. makrofágok vagy áttétképző tumorsejtek) a miozin-2 motorok a sejtek vezető éle mögött (NM2A izoforma) és a sejtek hátsó végén (NM2B izoforma) helyezkednek el. Alapvetően nem a sejt elejének a kitüremkedéséért felelősek – bár ezt



feltételezhetnénk –, hanem éppen ellenkezőleg, a motorként „előrenyomuló” polimerizálódó aktin filamentumok visszahúzásában, a sejteket valamilyen „aljzathoz” rögzítő stabil sejtadhéziók kialakulásában (NM2A) és a sejtest hátsó részének az előremozdításában (NM2B) játszanak szerepet. Az NM2C fő feladata a sejtosztódás végső fázisában, a citokinézisben van.<sup>12</sup>

### Az S100A4-NM2A komplex (nem várt) aszimmetrikus térszerkezete

A munkahipotézisünk az volt, hogy az S100A4 és az NM2A szimmetrikus dimer-dimer fehérjekomplexet hoz létre. Mivel a miozin szerkezeten belül az S100A4 kötőhelye a kétláncú fark régióban van, ezért feltételeztük, hogy a két azonos lánc a homodimer  $\text{Ca}^{2+}$ -kötő fehérje két azonos kötőzsebével lép specifikus kölcsönhatásba. Ráadásul a PDB térszerkezeti adatbázisban az S100 családból már több célfehérje komplex szerkezete ismert volt, amelyek mindegyike az „elvárt” forgási szimmetriát mutatta, két azonos kötőpeptiddel.

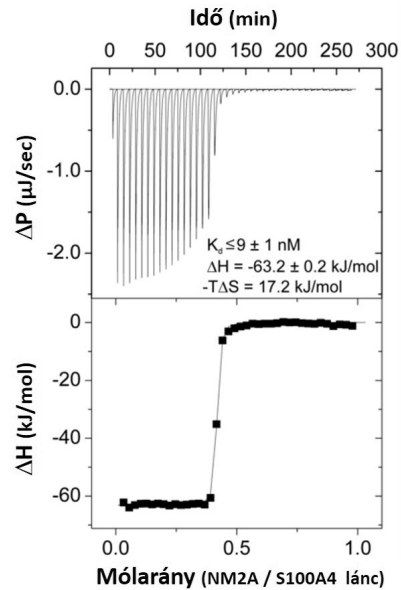


7. Ábra. A  $\text{Ca}^{2+}$ -kötött, de „üres” S100A4 (A; PDB kód: 3ZWH) és néhány korábbi ismert térszerkezeti modell, ahol S100 fehérje egy-egy célfehérje kötőmotívummal szimmetrikus 2:2 komplexet hoz létre (B-D). B: S100A6-SÍP (2JTT), C: S100A10-ANXA2 (1BT6), D: S100B-p53 (1DT7).

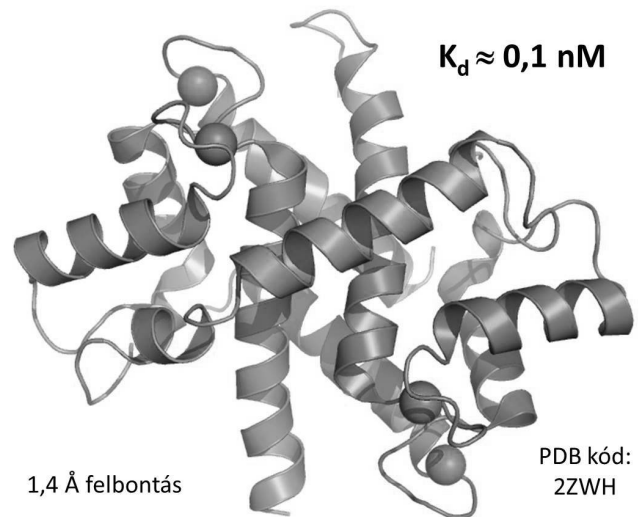
Először azonosítottuk a NM2A nehéz láncban belül azt a minimális, 45 aminosavból álló peptidszakaszt (lineáris kötőmotívum), amivel a szerkezeti munkát megkezdhattuk (a teljes méretű miozinnal történő kristályosítás a motorfehérje nagymértékű flexibilitása miatt reménytelen vállalkozás). Megjegyzendő, hogy az irodalomban korábban közölt 16-tagú „minimális kötőpeptid” mérete hibás adatnak bizonyult; de nem ez volt az egyetlen tévút, hiszen a komplex sztöchiometriáját 2:2-nek feltételezték (ez lett volna várható egy szimmetrikus homodimer komplexben).<sup>13</sup>

Ezzel szemben a 8. ábrán bemutatott izotermális titráló kalorimetriás mérési eredményünk erősen valószínűsítette, hogy csak egy NM2A peptid kötődik egy S100A4 dimerhez. Ráadásul a fehérjecsaládban eddig nem tapasztalt nagyon erős kötést mértünk: az  $\sim 0,1$  nM-os disszociációs állandó egy lineáris peptid motívumtól igen figyelemreméltó, viszonylag nagy kötőfelszín előrevetítő érték.

Szerencsénkre (mivel a fehérjék kristályosítása ma is leginkább „próba-szerencse” körülmények között történik) sikerült nagy felbontásban (1,4 Å) diffraktálódó kristályokat kapnunk, amely adatokból megszületett a 9. ábrán látható szerkezeti modell.<sup>14</sup>



8. Ábra. Az S100A4 és NM2A kötőpeptid közötti kölcsönhatás meghatározása ITC mérésel. A titrálás molaránya mutatja, hogy 1 NM2A peptid kötődik az S100A4 dimerhez.



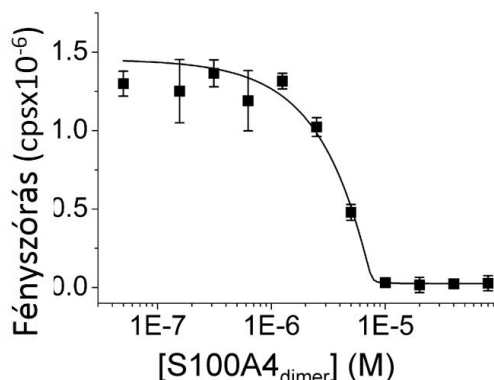
9. Ábra. Az S100A4 és az NM2A kötőmotívum (45-tagú peptid) komplexének kristályszerkezeti modellje szalag ábrázolással. Az EF-kéz motívumokhoz kötődő kalciumionokat gömbök ábrázolják.

Első látásra szembevető a komplex aszimmetriája, nevezetesen, hogy az NM2A peptid mintegy átkarolja az S100A4 dimert: az N-terminális régiója (ez a teljes NM2A szekvencián belül a *coiled-coil* régió C-terminális végén helyezkedik el) az egyik, míg a C-terminális régió (a teljes szekvencián belül a random szerkezetű „farokvégre” esik) a másik kötőzsebbe illeszkedik, amit egy helikális régió köt össze. Ha a  $\text{Ca}^{2+}$ -kötött, de „üres” S100A4 térszerkezetet nem szemből (a szimmetriatengely irányából), hanem 90°-kal elfordítva ábrázoljuk (7. ábra A része), jól látszik egy, a dimer „derekán” végigfutó árokszerű képződmény, ami már önmagában „gyanús lehetett volna”, hogy kötőfelszínként szolgálhat (amire azonban senki sem gondolt a szerkezetünk megjelenése előtt). Ebben a kötőárokba az eredetileg *coiled-coil* régió legvége ugyanolyan hidrofób intrakciókkal kötődik, mint a másik (azonos) NM2A láncához a szuperhélix szerkezetben. A kötőfelszín kb. 2600 Å<sup>2</sup>, ami

a fehérjecsalád ismert komplexeinél jóval nagyobb, ezzel magyarázatot adva az igen erős affinitásra a két fehérje között. A „szimmetriatörés” részletesebb analízis azt mutatta, hogy a kötőmotívum N-terminális régiója inkább hidrofíli, míg a másik azonos kötőzsebbe kerülő C-terminális régió elsősorban hidrofób kölcsönhatásokat alakít ki, tehát a ligandum kötés kiváltotta aszimmetria feltétele az volt, hogy a kötőzseb Janus-arcú legyen, többféle kémiai természetű ligandumot is befogadjon. Fontos még kiemelni a komplex kialakulásának biológiai következményei szempontjából, hogy a peptid C-terminális régiója gyengébben, míg az N-terminális része erősebben kötődik.

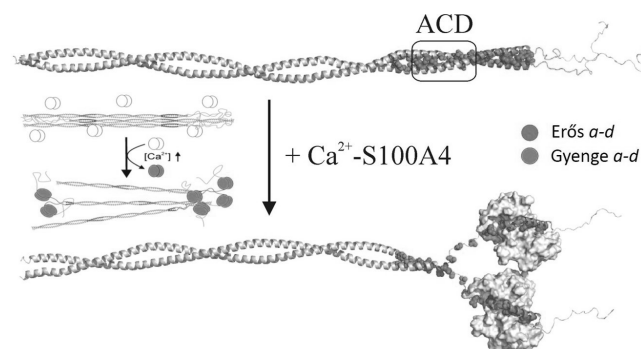
### Az S100A4-NM2A kölcsönhatás szerkezeti és funkcionális következményei

Mi történik a miozin minifilamentumokkal, ha az S100A4 kötődik hozzájuk? Kísérletileg hosszabb miozin *coiled-coil* fragmentumokkal lehet funkcionális tesztek végezni (a teljes miozin rekombináns fehérjeként történő előállítás igen körülményes feladat). Ezek az NM2 „farokdomének” fiziológiai körülmények között parakristályokat (részben szabályos aggregátumokat) képeznek, amelyek az S100A4 koncentráció függvényében – fényszórással követhető módon – szétesnek, disszociálnak. A funkcionális tesztek megerősítették a korábbi méréseket, miszerint két mól feleslegben adott S100A4 jelenlétében ( $c \gg K_d$ ) a minifilamentumok teljesen szétesnek.



10. Ábra. A miozin aggregátumok disszociációja S100A4 jelenlétében. A görbe illesztése alapján a kötés  $K_d$ -je  $\sim 8$  nM.

A szerkezeti eredmények, *coiled-coil* miozin fragmentumokkal végzett cirkuláris spektroszkópiai mérések (amelyek a másodlagos szerkezeti elemek, ebben az esetben az  $\alpha$ -hélixek mennyiségéről tudósítanak) és egyéb megfontolások alapján a következő mechanisztikus modellt állítottuk fel a miozin minifilamentumok szétesésére. Az S100A4 dimerek „elkapják” a miozin szerkezet nélküli „farokvégeit”, majd mintegy cipzárt kinyitják a fehérje szuperhélix végét, s maguk köré tekerik a kötőmotívumot. Ennek hatására a *coiled-coil* egy további rövid szakasza destabilizálódik (kb. 15 aminosav, amely gyengébben kapcsolódik egymáshoz, mivel nem ideális aminosavak helyezkednek el a két láncot összetartó hidrofób varrat  $a$  és  $d$  pozícióiban), ezáltal a filamentumok összetartásában döntő szerepet játszó ACD régió is destabilizálódik, s a miozin molekulák elválnak egymástól, a motorfehérjék ezáltal inaktíválódnak.



11. Ábra. Két S100A4 dimer kötődése az NM2A motorfehérje *coiled-coil* farok régiójának a végéhez (*in silico* szerkezeti modell), aminek a hatására a filamentumok szétesnek (belső kis ábra). Az „a” és „d” a szuperhélixet hidrofób kölcsönhatással stabilizáló aminosav pozíciókat jelöl.

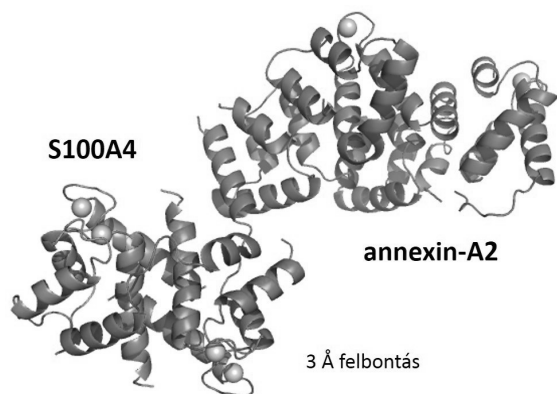
Mi lesz a miozin filamentumok szétesésének fiziológiai következménye? A miozin erő kifejthetése nélkül a sejtek adhéziója, letapadási képessége csökken, a sejtelen polimerizálódó aktin filamentumok visszafelé húzása lecsökken, végső soron a (tumor)sejtek migrációja növekszik. Bár a filamentumok szétesésének modellje egyelőre hipotetikus, a sejtek migrációs képességének fokozódását (az S100A4 fehérjék túlermelődése következtében) más kutatócsoportokkal megegyezően mi is tapasztaltuk. A mechanizmus pontos feltárása még további kísérleteket igényel.

A kísérleteink azt is feltárták, hogy a nem-izom miozin izoformák közül az S100A4 nem csak az NM2A-hoz, hanem az NM2C-hez is hasonló affinitással kötődik. Ennek a kölcsönhatásnak a biológiai jelentősége egyelőre nem ismert.

### Az S100A4 más kötőpartnerekkel alkotott komplexeinek szerkezete

Ha visszatekintünk a 7. ábrára és emlékszünk az S100A4 „derekáról” fentebb elmondottakra, akkor felmerül a kérdés, hogy az S100 családban nem alakulnak-e ki máshol is aszimmetrikus célfehérje komplexek? Bár az irodalomban ez idáig ilyen csak egy hármas komplex esetében írtak le (S100A10-ANXA2-AHNAK),<sup>16</sup> azzal a feltételezéssel kezdünk további S100 komplexeit vizsgálni, hogy a szimmetriasértés általánosabb lehet. A kérdésre még végső válaszuk nincs, de már néhány biztató előzetes eredményről be tudok számolni.

Sikerült az S100A4 és a  $Ca^{2+}$ -függő foszfolipid-kötő annexin-A2 (ANXA2) komplexének a kristályszerkezeti modelljét is meghatározni, s az is aszimmetrikusnak bizonyult. Ráadásul, ennél a komplexnél nem csak a célfehérje kötőmotívumát, hanem a teljes hosszúságú fehérjét használtuk a kristályosításhoz. Az ANXA2 N-terminálisán elhelyezkedő lineáris motívum is aszimmetrikusan „öleli át” a két kötőzsebtől a homodimer S100A4-et<sup>17</sup>. A 7. ábra C paneljén is látható egy ANXA2 komplex szerkezete, de érdekes módon az általunk azonosítottnál valamivel rövidebb kötőmotívum az S100A10-hez szimmetrikus módon, 2:2 sztöchiometriával kötődik.<sup>18</sup>



12. Ábra. Az S100A4 és az annexin-A2 komplexének kristályszerkezeti szalag modellje. Az S100A4 EF-kéz motívumaihoz és az annexin A2 típusú kötőhelyein található kalciumionokat szürke gömbök mutatják.

Az annexin-A2 is egy sokfunkciós fehérje, többek között a membránok és a citoskeleton között létesít kapcsolatot, részt vesz az exocitózis folyamatában, az epiteliális sejtek migrációjában, de extracelluláris hatása is van, ahol a plazminogén enzim aktiválásán keresztül hozzájárulhat a rákos sejtek inváziós képességéhez (az aktív plazmin proteáz ún. mátrix metalloproteázokat aktivál, amelyek az extracelluláris mátrix emésztésével „utat nyitnak” a tumorsejtek áttétképzéséhez). Az annexin család tagjai, bár  $\text{Ca}^{2+}$ -kötő fehérjék, de nem az EF-kéz családba tartozik (az általunk meghatározott szerkezetben is azonosítottunk három kalciumiont a fehérje konvex oldalán, ahol a pozitív ionok a negatív foszfolipidekhez történő kötődést közvetítik).

Kísérleti bizonyítékunk van további két szimmetriatörő S100 célfehérjére. Az egyik a „leghírhedtebb” tumor szupresszor fehérje (a humán tumorok több mint felében mutációt hordozó), a p53 N-terminális transzaktivációs doménjének lineáris motívuma, mely aszimmetrikusan kötődik az S100A4-hez. A kötődés feltehetőleg gátolja a p53 génexpresszió szabályozó funkcióját, s ezzel hozzájárulhat a rákos sejtek túléléséhez vagy egyes fibrotikus megbetegedések kialakulásához. A másik előzetes eredményünk, hogy az S100B-hez aszimmetrikusan kötődik az RSK1 protein-kináz enzim, ami melanóma sejtekben járulhat hozzá a sejtek túléléséhez. A 7. ábra D paneljén bemutatott szimmetrikus S100B komplex szerkezetében is látszik az üres „derék”, amit az RSK1 kötőmotívuma felismerhet.

### Az S100 fehérjék lehetnek-e gyógyszercélpontok?

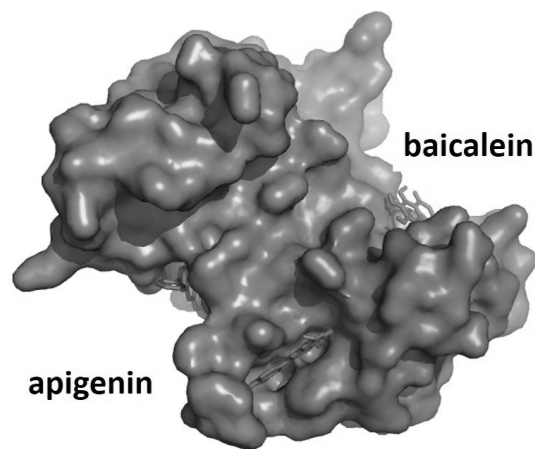
A válasz az eddig elmondottak alapján szinte magától értetődően igen. Az S1009 fehérje kapcsán jutottak legtovább a kutatók, ugyanis egy kismolekula inhibitor, a tasquinimod (kinolin-3-karboxamid) már III-as fázisú klinikai vizsgálatok alatt álló gyógyszerjelölt molekula prosztata rák kezelésére.<sup>19</sup> Az S100A4 esetében egy monoklonális antitesttel végeztek már ígéretes állatkísérleteket, ahol az extracelluláris S100A4 gátlásával sikerült tüdőtumorkok áttétképzését csökkenteni.<sup>20</sup> További lehetőség lehet az S100A4 fehérje kölcsönhatásainak gátlása kismolekula vagy peptid inhibitorokkal. Az utóbbiak fejlesztésére, a nagy affinitással kötődő NM2A peptidből kiinduló irányított evolúciós módszerrel látunk lehetőséget;

ezeket a kísérleteket Pál Gáborral (ELTE Biokémiai Tanszék) együttműködésben már elkezdtük.

A kismolekula inhibitorok kapcsán sikerült azonosítanunk több flavonoidot, amelyek mikromólos disszociációs állandóval kötődnek az S100A4-hez.<sup>21</sup> A zellerben, petrezselyemben előforduló apigenin és a bajkái csucsóka (*Scutellaria baicalensis*) hatóanyaga, a baicalein rákellenes hatása korábbról ismert volt, de hatásmechanizmusuk még feltáratlan. A potenciális S100A4 gátlószerek hatásának tesztelését rákos sejtvonalakon a közeljövőben fogjuk elkezdni.

### Zárszó

A szimmetrikus homodimer fehérjék más fehérjékkel kialakított komplexeitől intuitíve azt várjuk, hogy azok is szimmetrikusak lesznek. Az előadásomban egy olyan szerkezeti biológiai példát mutattam be, ahol az elvárásainkkal ellentétben a patológiás jelentőséggel bíró, tumor áttétek képzésében és más kórképek kialakulásában is szerepet játszó  $\text{Ca}^{2+}$ -kötő S100A4 fehérje a célfehérjével - legalábbis az általunk eddig tanulmányozott három esetben, a nem-izom miozin 2A-val, az annexin-A2-vel és a p53 tumor szupresszor fehérjével is - aszimmetrikus komplexet hoz létre. Úgy gondoljuk, hogy ez az újonnan leírt, nem szokványos fehérje-fehérje kölcsönhatás a jövőben új támadáspontokat jelenthet terápiás célú inhibitor fejlesztésekhez.



13. Ábra. Az S100A4-hez mikomólos  $K_d$ -vel kötődő két flavonoid feltételezett kötőhelyei. (Hetényi Csaba molekuláris dokkolással készült modellje).

### Köszönetnyilvánítás

A fentebb ismertetett eredmények megszületéséért hálás köszönetemet fejezem ki kutatócsoportom tagjainak, a kísérleti munka oroszlánrészét végző Kiss Bence predoktornak, azonkívül Ecsédi Péter és Biri Bea doktoranduszoknak, Gógl Gergő MSc hallgatónak, valamint együttműködő partnereimnek, Pál Gábornak (ELTE Biokémiai Tanszék), Hetényi Csabának (MTA-ELTE Molekuláris Biofizikai Kutatócsoport és ELTE Biokémiai Tanszék), Leveles Ibolyának és Vértessy Beátának (MTA TTK, Enzimológiai Intézet és BME Alkalmazott



Biotechnológia és Élelmiszertudományi Tanszék), végezetül Katona Gergelynek (Department of Chemistry and Molecular Biology, University of Gothenburg).

### Hivatkozások

1. Weyl, H. *Szimmetria*, Gondolat Kiadó, **1982**
2. Kendrew, J. C.; Bodo, G.; Dintzis, H.M.; Parrish, R.G.; Wyckoff, H.; Phillips, D. C. *Nature*, **1958**, *181*, 662-6.
3. Monod J. *In Nobel Symp. Symmetry Funct. Biol. Syst. Macromol. Lev., 11th, Stockholm*, Wiley, New York, **1968**, pp 15–27
4. Goodsell, D.S.; Olson, A.J. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **2000**, *29*, 105–53.
5. Maksay G.; Tőke O. *Prog Biophys Mol Biol.* **2014**, *114*, 153-69.
6. Diella, F.; Haslam, N.; Chica, C.; Budd, A.; Michael, S.; Brown, N. P.; Trave, G.; Gibson, T. J. *Front Biosci* **2008**, *13*, 6580-603.
7. Rapali, P.; Radnai, L.; Süveges, D.; Harmat, V; Tölgyesi, F; Wahlgren, W.Y.; Katona, G.; Nyitray, L.; Pál, G. *PLoS One.* **2011**, *6*, e18818.
8. Gifford, J.L.; Walsh, M.P.; Vogel, H.J. *Biochem J.* **2007**, *405*, 199-221.
9. Donato, R.; Cannon, B.R.; Sorci, G.; Riuzzi, F.; Hsu, K.; Weber, D.J.; Geczy, C.L. *Curr Mol Med.* **2013**, *13*,24-57.
10. Boye, K.; Maelandsmo, G.M. *Am J Pathol.* **2010**, *176*, 528-35
11. Gross, S.Rr; Sin, C.G.; Barraclough, R.; Rudland, P.S. *Cell Mol Life Sci.* **2014**, *71*, 1551-79.
12. Li, Z.H.; Dulyaninova, N.G.; House, R.P.; Almo, S.C.; Bresnick, A.R. *Mol Biol Cell.* **2010**, *21*, 2598-610.
13. Vicente-Manzanares, M.; Ma, X.; Adelstein, R.S.; Horwitz, A.R. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **2009**, *10*, 778-90.
14. Malashkevich, V.N.; Varney, K.M.; Garrett, S.C.; Wilder, P.T.; Knight, D.; Charpentier, T.H.; Ramagopal, U.A.; Almo, S.C.; Weber, D.J.; Bresnick, A.R. *Biochemistry*, **2008**, *47*, 5111-26.
15. Kiss, B.; Duelli, A.; Radnai, L.; Kékesi, K.A.; Katona, G.; Nyitray, L. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2012**, *109*, 6048-53.
16. Dempsey, B.R.; Rezvanpour, A.; Lee, T.W.; Barber, K.R.; Junop, M.S.; Shaw, G.S. *Structure.* **2012**, *20*,1737-45.
17. Ecsédi, P.; Kiss, B.; Leveles, I.; Vértessy, B.; Nyitray, L. *Biokémia*, **2014**, *28*(3), 48a
18. Réty, S.; Sopkova J, Renouard, M.; Osterloh, D.; Gerke, V.; Tabaries, S.; Russo-Marie, F.; Lewit-Bentley, A. *Nat Struct Biol.* **1999**, *6*, 89-95.
19. Gupta, N.; Al Ustwani, O.; Shen, L.; Pili, R. *Oncotargets Ther.* **2014**, *12*, 223-34.
20. Klingelhöfer, J.; Grum-Schwensen, B.; Beck, M.K.; Knudsen, R.S.; Grigorian, M.; Lukanidin, E.; Ambartsumian, N. *Neoplasia.* **2012**, *14*, 1260-8.
21. Kiss, B.; Nyitray, L. *nem közölt eredmények*

### Asymmetric interactions of the symmetric homodimer S100A4 Ca<sup>2+</sup>-binding protein

For most scientists the birth of molecular and structural biology is the discovery by Watson and Crick of the double helical structure of DNA. Symmetry of the three-dimensional shape of proteins was also expected, however the most remarkable features of myoglobin, the first protein structure determined, were “its complexity and lack of symmetry” as John Kendrew noted. Soon it turned out that symmetry is the rule rather than exception for protein, since the majority of them has quaternary structure (*i.e.* they consist of more than one polypeptide chain) and the subunits are arranged into rotational and helical symmetry. The highest percentage of oligomers is dimers with C<sub>2</sub> symmetry, but all crystallographic point group symmetries are represented among homo-oligomeric proteins. Symmetric oligomers are favored because of finite control of assembly and stability. Symmetry could be broken by many ways, however usually only locally.

At a scientific meeting at the Hungarian Academy of Sciences on the occasion of the International Year of Crystallography, I presented a crystal structure of a tumor metastasis associated homodimeric protein in complex with an asymmetrically bound to a single binding partner protein, an example of global symmetry breakage in a protein complex.

Protein-protein interactions (PPI) are key to understanding biological processes. Homodimer proteins usually make symmetric dimer-dimer interactions. Figure 1 shows an example from our laboratory, a hub protein, LC8 in complex with two so called linear motif (short peptide region of an interacting partner) showing fully symmetric interaction. During the course of studying PPIs of another symmetric dimer, the Ca<sup>2+</sup>-binding S100A4 protein, in contrary to the expected dimer-dimer stoichiometry we have revealed that a single non-muscle myosin 2A (NM2A) peptide wraps around dimer interface, leading to a ligand-induced asymmetry in the homodimeric S100A4.

S100 proteins are small, vertebrate-specific EF-hand Ca<sup>2+</sup>-binding proteins that are involved in cell proliferation, differentiation,

apoptosis, inflammation, and cell migration. Their overexpression is associated with several diseases. Our protein of interest from this family, S100A4 is a “small actor playing many roles” (Figure 4, 5). Its previous name, metastasin refers to a well-documented dysfunction; it is overexpressed in various solid tumors (breast, colon, ovary, prostate, and others) and its high concentration in the tumor microenvironment is inversely correlated with patient survival. It seems to be involved in several steps in the metastatic cascade, including migration, invasiveness, and angiogenesis. The molecular mechanism by which S100A4 exerts these functions is not fully clear. Upon Ca<sup>2+</sup>-binding it undergoes a conformational change exposing two identical hydrophobic binding pockets that could recognize target proteins. The most studied intracellular interaction partner of S100A4 is NM2A; however at least a dozen other proteins were shown to interact with it, including annexin A2, the tumor suppressor p53.

Non-muscle myosin 2 motor proteins have a fundamental role in processes that require cellular reshaping and movement, such as cell adhesion, cell migration and cell division. NM2 molecules assemble into bipolar minifilaments through interactions between their rod domains and could generate force only in these ensembles. S100A4 binds to the C-terminal end of the coiled-coil rod region overlapping with the assembly competent domain (ACD; a region necessary for filament formation) (Figure 6.).

We assumed that the homodimeric S100A4 would form a symmetric 2:2 complex with the two heavy chains of NM2A (or two recognition peptides derived from it and used for crystallization in complex with S100A4). All S100 complexes determined previously showed a symmetric complex (Figure 7). Contrary to the expectations we measured the stoichiometry to be one myosin peptide per S100A4 dimer (Figure 8). We were able to solve the high-resolution crystal structure of the complex that revealed a unique and asymmetric target-recognizing mechanism in the S100 family (Figure 9). The complex contains one NM2A peptide that is wrapped around an S100A4 dimer forming a particularly large interface compared to other S100 complexes. Functional test were carried out with NM2A fragments that form paracrystals, resembling minifilaments, confirming that two molar excess of S100A4 completely disrupt filaments (Figure 10).

Based on the asymmetric complex we proposed a model for the structural basis of S100A4-induced NMIIA filament disassembly. S100A4 is supposed to catch the nonhelical tailpiece, then partially unwind the C-terminal end of the coiled-coil rod (Figure 11.). Disruption of the ACD leads to filament disassembly. Physiological consequence of this could be the decrease of cell adhesion to the substratum and increase in cell migration. Although this model is hypothetical yet, we were able to detect, in accordance with other laboratories, increase of migration rate of cultured tumor cell lines.

Further structural studies from my research group also revealed an asymmetric binding mode of S100A4 to the recognition motif

of annexin A2 (ANXA2) and p53. ANXA2 is multifunctional  $\text{Ca}^{2+}$ - and phospholipide-binding protein involved in migration of epithelial cells and plasminogen activation that could lead to matrix metalloprotease activation and metastasis. Interaction with the tumor suppressor p53 could inhibit transcription activation and an increase of survival of tumor cells.

I raised the possibility that the description of the novel interaction surface in S100A4 complexes would facilitate the design of specific inhibitors that interfere with the S100A4–target protein interactions and could be used for therapeutic purposes. In this respect it is notable that tasquinimod, a small-molecule inhibitor of S100A9 is in phase III clinical trial to treat prostate cancers.