

BESZÁMOLÓ AZ NK67800 OTKA PÁLYÁZAT KERETÉBEN VÉGZETT MUNKÁRÓL

A kutatás fő célja az egyikünk által felfedezett és jellemzett prolil oligopeptidáz családhoz tartozó acilaminoacil peptidázok működési mechanizmusának kísérleti vizsgálata volt kinetikai és fehérjekrisztallográfiai módszerekkel. A család elsőként felismert, névadó enzime, a prolil oligopeptidáz szerkezetére, működésére és biológiai szerepére vonatkozó tudományos eredményeket összefoglalóan ismertettük [1].

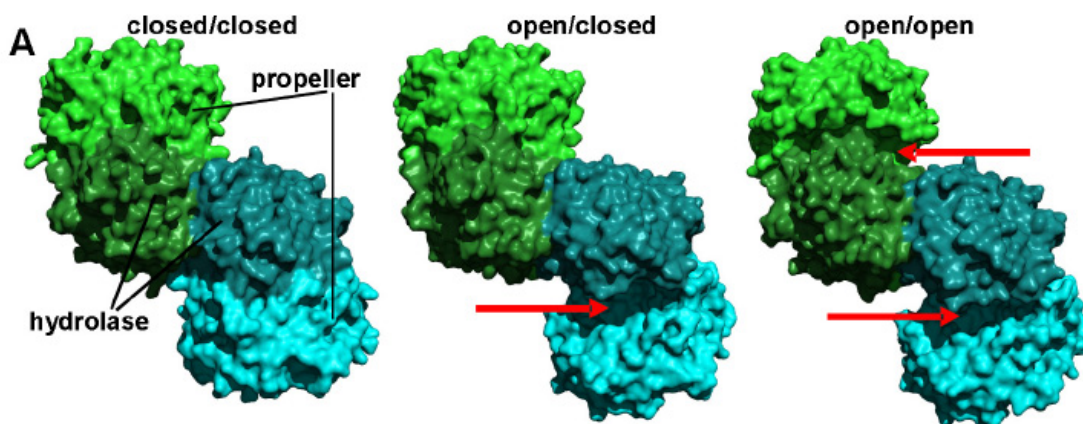
A katalitikus apparátus a prolil oligopeptidáz családban kevésbé konzervált, mint a kimotripszin családban: az enzimreakció tetraédes intermedierjét hidrogénkötésekkel stabilizáló oxianion hely különbözőféleképpen épül fel a prolil oligopeptidázban, és az acilaminoacil peptidázban. Az acilaminoacil peptidázokban konzervált, oxianion hely közelében lévő hisztidin (*Aeropyrum pernix*-ből származó enzimben His367) szerepét vizsgáltuk az enzimműködésben. Kinetikai módszerekkel igazoltuk, hogy a H367A mutánsban a katalitikus aktivitás három nagyságrenddel csökken a vad típushoz képest. Meghatároztuk a mutáns kristályszerkezetét, és ebből kiindulva megállapítottuk, hogy a mutáció hatására a 367. aminosavat tartalmazó hurokrégió konformációja megváltozik, és mozgékonyága is nő, ezáltal az oxianion hely torzul. Ez okozza az aktivitás csökkenését [2]. A katalitikus triád aszparaginsavjának (Asp524) szerepének vizsgálata céljából enzimkinetikai méréseket végeztünk az enzim két mutánsával (D524A és D524N). A vizsgálatok során jellemeztük a szubsztráton belüli hasítási helytől való függést is (szubsztrátok, amelyeken exopeptidáz, illetve endopeptidáz aktivitással rendelkezik az enzim). Azt találtuk, hogy – szemben a vad típusal – egy kivétellel a mutánsok kinetikája a pH függvényében kettős szigmoid görbével jellemezhető. A sebességi állandó 3-4 nagyságrenddel csökkent a vad típusú enzimhez képest. Összehasonlítottuk a vad típus és a D524A, valamint a D524N mutánsok térszerkezetét. A mutánsok eltérő kinetikai viselkedése magyarázható a mutációk okozta eltérő szerkezeti torzulásokkal. A D524A mutánsban az aszpartát karboxilát csoportjának helyén egy vízmolekula található, ami a katalitikus hisztidin gyűrűjének elmozdulását, a hisztidin-szerin hidrogénkötés torzulását okozza. A D524N szerkezetben a torzulás még nagyobb mértékű, és a kedvezőtlen konformációban rögzített Asn524 a hisztidin katalízis szempontjából kedvezőtlen tautomerjét stabilizálja [5].

Megvizsgáltuk oligopeptidek kötődését az enzimekhez, és a katalitikus szerin oldalláncot alaninra cseréltük, hogy ezzel meggátoljuk a ligandum hidrolízisét. Azt találtuk, hogy a kötődést az aszparaginsav mutációja nem befolyásolja jelentősen. Ezzel szemben az Ac-Phe-OH inhibitor kötődése az Ala mutáns esetében lényegesen eltért a vad-típusú és az Asn mutánsnál kapott eredménytől, amennyiben itt a kötődés gyengébb és nem függ a pH-tól. Az eredmények azt mutatják, hogy a katalízis nem csak a mutáció milyenségétől, hanem a vizsgált szubsztrát természetétől is függ [5].

Röntgen-diffrakcióval, molekulamodellezéssel és más módszerekkel vizsgáltuk az enzimesalád prototípusa a prolil-oligopeptidáz különböző, R-Pro-(dekarboxi-Pro) típusú inhibitorokkal alkotott komplexeit. A vizsgált komplexekben a Pro-(dekarboxi-Pro) részlet hasonlóan kötődik. Az R-csoport gyűrűrendszerét az inhibitor többi részétől elválasztó lánc ideális hossza viszont az R-csoport alakjától függ: planáris gyűrűrendszer esetén két szénatomnyi, térben kiterjedt gyűrűrendszer esetén pedig három szénatomnyi [3].

Az acilaminoacil peptidázok *Pyrococcus horicoshii*-ből származó képviselőjének vizsgálata során méretkizárásos kromatográfiával kimutattuk, hogy a hat azonos alegységből épül fel, ami egyedülálló az oligopeptidáz család enzimjei között [4]. Szerkezeti és funkcionális szempontból is meglepő eredmény, hogy a hexamer enzim dimerek trimerjeként felépülő merev szerkezet, tehát az *Aeropyrum pernix* enzimre és prolil-oligopeptidázra jellemző interdomén hajlékonyság itt nem tapasztalható. Ehelyett új módon, a hexameren belüli csatornák segítségével valósul meg a családra jellemző méret-szelektivitás, ezeken csak kis méretű, letekeredett fehérjefregmensek vagy oligopeptidek juthatnak el az aktív helyhez. A dimereken belül a két domén közötti stabilizáló kölcsönhatást a propeller domén bővülése biztosítja, ez stabilizálja a katalitikus hisztidint tartó hurkot. Az endopeptidáz aktivitás a szubsztrátkötő régió nyitottsága következtében lép fel.

Négy vizsgált *Aeropyrum pernix* acilaminoacil peptidáz kristályszerkezet (vad típus, D524N és két D524A kristályforma) elemzése alapján tisztáztuk a szubsztrátfelvétel és -leadás mechanizmusát. A szerkezetek között találtunk nyitott konformációjút, melyben az aktív hely az oldat felől akár nagyobb fehérjék számára is hozzáférhető. A kinyílás azonban a katalitikus hisztidint tartalmazó hurok jelentős konformáció változását, és a katalitikus triád felbomlását okozza a mutációtól függetlenül. Mivel a szubsztrátot vagy terméket nem tartalmazó enzimszerkezetek között nyitott és csukott is van, feltételezzük, hogy oldatban a katalitikusan aktív csukott és az inaktív nyitott konformáció egyensúlyban van, ezáltal a szubsztrát felvétele konformációs szelektív mechanizmus szerint megy végbe és a kémiai reakciót lehetővé tevő csukott alakot stabilizálja, így biztosítva az oligopeptidek szelektív hidrolízisét [5]. A különböző ApAAP dimer szerkezeteket az 1. ábrán mutatjuk be.

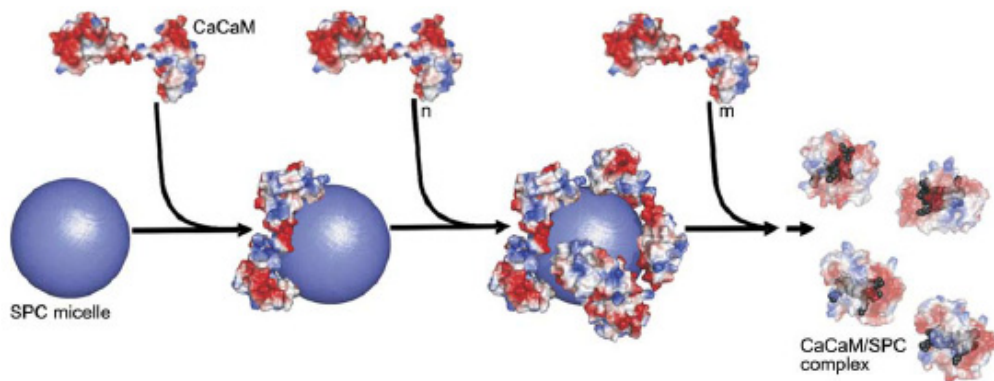


1. ábra. Az ismert ApAAP dimer szerkezetek molekuláris ábrázolása (kék és zöld: monomerek, sötétebb színek: hidroláz domének). A korábban publikált szerkezetek (PDB id 1VE6, 1VE7, 2HU5, 2HU7 és 2HU8) zárt/zárt, az általunk meghatározott három szerkezet nyílt/zárt, a negyedik nyílt/nyílt konformációt vesz fel. A domének közötti nyílást piros nyíllal jelöltük.

Az enzim-inhibitor komplexek példáján elemeztük a molekuláris felismerés szerkezeti vonatkozásait az acilpeptid hidroláz és prolil oligopeptidáz esetében röntgen-diffrakcióval meghatározott szerkezetek alapján. Kimutattuk, hogy a térbeli felismerés mindkét enzimnél jelentős szerepet játszik, a viszonylag merev és kicsiny inhibitor molekulák egymásra helyezve jól kirajzolják a farmakofór térbeli részét [6]. Az *Aeropyrum pernix* acilpeptid hidroláz kovalens, irreverzibilis klórmetil-ke-ton inhibitorát alkalmazva arra a kérdésre kerestük a választ, hogy a nyitott formában, amelyben a katalitikus hely torzult, helyreállhat-e

a katalitikus triád szerkezete a szubsztrátkötés hatására. Nyitott és csukott enzimformát is tartalmazó kristályokat az inhibitor oldatába áztatva azt találtuk, hogy ez csak a csukott enzim molekulákkal alkot kovalens komplexet. Ebből arra a következtetésre jutottunk, hogy az enzim becsukódása szükséges ahhoz, hogy a katalitikus hely aktív konformációba billenjen, a kisméretű szubsztráttal esetleg kialakított nemkovalens komplex képződése ehhez nem nyújt elég segítséget.

Az acilaminoacil peptidáz két doménjének elmozdulásával kapcsolatban érdekes tanulságokkal szolgált a szintén két doménből álló kalmodulin vizsgálata. Ismeretes, hogy ez az enzim legtöbbször úgy fejt ki a hatását, hogy „rácsukódik” a célfehérje egy szakaszára, ezáltal idézve elő a konformáció megváltozást. Vizsgálataink az enzim szfingozil-foszforilkolinnal kialakított kölcsönhatására vonatkoztak. A kalmodulinnak a lipid micellákkal való kölcsönhatását kétlépéses folyamatként írtuk le, amelyben először a kalmodulin molekulák körbeveszik a micellát, majd a második lépésben felbontják azt miközben egy-egy kalmodulin molekula néhány lipidmolekulát zár körbe. A fehérje becsukódása itt is indukált folyamat, azonban ebben az esetben nem specifikus hidrofób kölcsönhatások a meghatározók, ami a lipid molekulák rendezetlenségét okozza a komplex szerkezetében (l. 2. ábra) [7]. A hidrofób



2. ábra. A CaCaM-SPC kölcsönhatás folyamatábrája. Az SPC micellát kék gömbbel jelöltük, a fehérje felszínét az elektrosztatikus potenciál szerint színeztük ki (piros: negatív, kék: pozitív). Első két lépés: a CaCaM molekulák kötődnek a pozitív töltésű micellához, itt az elektrosztatikus kölcsönhatások meghatározók. Harmadik lépés: a micella szétesik és a fehérje zárt konformációt vesz fel, melyben több, szürke színnel jelölt SPC monomert köt meg (l. a jobb oldalon). Ebben a fázisban a hidrofób kölcsönhatások jelentős szerepet játszanak a komplexképződésben.

illeszkedés aspektusait a kalmodulin kis molekulákkal képezett komplexei szerkezetének elemzésével világítottuk meg egy összefoglaló cikkünkben [6]. Összefoglaló cikkben elemeztük a kalmodulin fehérjéssel és kis molekulákkal képezett komplexeinek a szerkezetét [8].

Analógiát találtunk a dUTPáz enzim és az acilaminoacil peptidáz kölcsönhatásai között, miközben összehasonlítottuk előbbi a vad típusú és D28N mutáns formáját. A konzervált aszpartát oldallánc töltésének semlegesítése az enzim, és a felszínéhez kötött vízmolekulák hidrogénkötés rendszerének megváltoztatása révén egyrészt közvetlenül a kémiai reakcióban résztvevő szereplők (dUTP α -foszfo csoport és katalitikus víz) elrendeződését változtatja

meg, másrészt a konzervált régiók közvetítésével destabilizálja a szubsztrátkötő régiót [9]. Az acilaminoacil peptidáz esetén is jellegzetesen megváltozik a hidrogénkötés hálózat a töltött Asp524 oldallánc semlegesítése esetén [5]. A dUTPáz-zal kapcsolatos vizsgálatok rámutatnak, arra, hogy egy mutáció nagyobb szerkezeti egységek kölcsönhatását is destabilizálhatja a hidrogénkötés hálózaton keresztül. Annak a kiderítése, hogy ez az acilaminoacil peptidáz esetén így van-e, további vizsgálatokat igényelne. A *Staphylococcus aureus* szuperantigén-hordozó patogenicitás-szigetei szabályozása szerkezeti alapjainak a megértésében segít a Stl SaPIbov1 és a Φ 11 segítő fágból származó dUTPáz kölcsönhatásának vizsgálata. Ehhez a munkához kapcsolódóan részt vettünk a Φ 11 dUTPáz enzim szerkezet-meghatározásában [13].

Egy másik szerin proteáz, a MASP-1 szerkezetvizsgálata érdekes párhuzamot mutatott ki az acilaminoacil peptidázzal. Bár a MASP-1 másik szerin proteáz családba tartozik, az aktív hely környezetének nyitottsága itt is összefüggésbe hozható a szélesebb szubsztrát-szelektivitással. A szubsztrát specificitási zseb szokatlan elektrosztatikus árnyékoltsága pedig hipotézisünk szerint hozzájárul az alacsony enzimaktivitáshoz [10]. A szerin proteázok specificitásának szerkezeti hátterét világította meg a MASP-2 és a MASP-1 in vitro evolúcióval kifejlesztett specifikus fehérje-inhibitorokkal alkotott komplexeinek krisztallográfiai vizsgálata. Az inhibitorok a kötő régió négy aminosavában különböznek, ez lehetővé teszi a két enzim specifikus gátlását. Megállapítottuk, hogy míg a MASP-1 komplexének létrejöttéhez az enzim szerkezetének minimális változása szükséges csak, a MASP-2 esetén allosztérikus effektus figyelhető meg, aminek hatására megváltozik az S1 hely specificitása [14].

A Protein Data Bank adatait felhasználva vizsgáltuk a szerin proteázok aktív helyén található Asp-His-Ser és az analóg Glu-His-Ser triádok geometriai elrendeződésének átvihetőségét. Megállapítottuk, hogy mindössze négy térbeli pont (egy-egy az Asp és a Ser oldalláncok O atomjain, kettő a His oldallánc N atomjain) elegendő rokon enzimes családok jellemzéséhez. Az OPTICS programmal csoportokba osztottuk a térbeli elrendeződést jellemző 3x4 dimenziós vektorokat, a csoportok jó közelítéssel kiadták a tripszin-típusú szerkezeteket és azokat is, melyek α/β hidroláz fold-ot tartalmaznak. Ennek alapján felhívtuk arra a figyelmet, hogy az OPTICS program alkalmas bizonyos szerkezeti egységek felismerésére abban az esetben is, ha pl. a SCOP klasszifikáció nem áll rendelkezésre [11].

Két, jelentősen különböző oxigénaffinitással jellemezhető, de nagyon hasonló szekvenciájú bakteriális H-NOX fehérje oxi komplexének és nyugalmi állapotának a szerkezetét tanulmányoztuk molekuladinamikai számításokkal 300K és 400K hőmérsékleten. A várakozással ellentétben az eltérő oxigénaffinitást a nyugalmi állapot szerkezeteiben megmutatkozó különbségek is tükrözték. Az egyetlen sikeres O₂-kötő molekula, a Tt H-NOX 300K hőmérsékleten észlelhető nyugalmi állapotú egyensúlyi sokaságában a legnagyobb valószínűséggel felvett konformációban előzetesen kialakított oxigénkötő zseb jön létre, ami azt sugallja, hogy a kölcsönhatást a konformációs szelekció határozza meg [12].

Az oldószer hatását figyelembe vevő kvantumkémiaili módszerrel az alanin diamid modellen vizsgáltuk a fehérje gerinc proton és szén kémiai eltolódásait a konformáció függvényében. Megállapítottuk, hogy a gázfázisú modellhez képest javult az egyezés a kísérleti adatokkal, így nincs szükség nagyobb, oligoalanin modelleken végzett, jóval nagyobb gépidőt igénylő számítások elvégzésére ahhoz, hogy értelmezni tudjuk az összefüggéseket [15].

Fehérjekrisztallográfiai és mágneses rezonancia-spektroszkópiaili módszerekkel tanulmányoztuk az RSK1 MAP kináz aktivált protein kináz nevű fehérje C-terminális régióját

és kimutattuk, hogy oldatban strukturálatlan, de az ERK2-pepRSK1 komplex kristályosítható, meghatározott szerkezettel rendelkezik, mely hidrogénhidak révén stabilizálódik [16].

A [14-16] közlemények a pályázat keretében végzett munka eredményeként születtek, publikálás alatt vannak. A megjelent közlemények összes impakt faktora 43,258, egy impakt faktor pontot 762 eFt OTKA pályázati támogatásból valósítottunk meg.

Publikációk:

1. Szeltner Z, Polgár L: **Structure, function and biological relevance of prolyl oligopeptidase**, Curr Protein Pept Sci 9(1), 96-107, 2008.
2. Kiss AL, Palló A, Náray-Szabó G, Harmat V, Polgár L: **Structural and kinetic contributions of the oxyanion binding site to the catalytic activity of acylaminoacyl peptidase**, J Struct Biol 162(2), 312-323, 2008.
3. Kánai K, Arányi P, Böcskei Z, Ferenczy G, Harmat V, Simon K, Náray-Szabó G, Hermecz I: **Prolyl oligopeptidase inhibition by N-acyl-propyrrolidine-type molecules**, J Med Chem 51(23), 7514-7522, 2008.
4. Szeltner Z, Kiss AL, Domokos K, Harmat V, Náray-Szabó G, Polgár L: **Characterization of a novel acylaminoacyl peptidase with hexameric structure and endopeptidase activity**, Biochim Biophys Acta Proteins and Proteomics 1794(8):1204-10, 2009.
5. Harmat V, Domokos K, Menyhard DK, Palló A, Szeltner Z, Szamosi I, Beke-Somfai T, Náray-Szabó G, Polgár L: **Structure and Catalysis of Acylaminoacyl Peptidase Closed and Open subunits of a Dimer Oligopeptidase**, J. Biol. Chem. 286(3), 1987-1998, 2011.
6. Harmat V, Náray-Szabó G: **Theoretical Aspects of Molecular Recognition**, Croat Chem Acta 82(1) 277-282, 2009.
7. Kovács E, Harmat V, Tóth J, Vértessy BG, Módos K, Kardos J, Liliom K: **Structure and mechanism of calmodulin binding to a signaling sphingolipid reveal new aspects of lipid-protein interactions**, FASEB J. 24 3829-3839, 2010; FEBS J. 277(Suppl 1) 288-289, 2010.
8. Menyhard DK, Keserü GM, Náray-Szabó G: **Calmodulin in Complex with Proteins and Small Molecule Ligands: Operating with the Element of Surprise. Implications for Structure-Based Design**, Curr Comp Aided Drug Des 5(4), 264-279, 2009.
9. Takács E, Nagy G, Leveles I, Harmat V, Lopata A, Tóth J, Vértessy BG: **Direct contacts between conserved motifs of different subunits provide major contribution to active site organization in human and mycobacterial dUTPases**, FEBS Lett. 584, 3047-3054, 2010.
10. Dobó J, Harmat V, Beinrohr L, Sebestyén E, Závodszy P, Gál P: **MASP-1, a promiscuous complement protease: structure of its catalytic region reveals the basis of its broad specificity**, J Immunol. 183(2), 1207-1214, 2009.
11. Iván G, Szabadka Z, Ördög R, Grolmusz V, Náray-Szabó G: **Four Spatial Points That Define Enzyme Families**, Biochem. Biophys. Res. Comm. 383(4), 417-420, 2009.
12. Menyhard DK: **Conformational selection mechanism governs oxygen ligation to H-NOX proteins**, Bioorg Med Chem Lett 21(12) 3523-3526, 2011.
13. Leveles I, Róna G, Zagyva I, Bendes Á, Harmat V, Vértessy BG: **Crystallization and preliminary crystallographic analysis of dUTPase from the Φ 11 helper phage of *Staphylococcus aureus***, Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun. 67(Pt 11):1411-1413, 2011.
14. Héja D, Harmat V, Fodor K, Wilmanns M, Dobó J, Kékesi KA, Závodszy P, Gál P, Pál G: **Monospecific inhibitors show that both MASP-1 and MASP-2 are essential for lectin pathway activation and reveal structural plasticity of MASP-2**, J Biol Chem, közlésre beküldve.

15. Hudáky I, Jákli I, Náray-Szabó G, Perczel A: ***GIAO-PCM Calculations on Alanine Diamide Models Aimed at Predicting Protein Secondary Structures***, J Comput Chem, közlésre beküldve.
16. Gógl G, Zeke A, Garai Á, Törő I, Dudás E, Bodor A, Alexa A, Reményi A: ***Crystal structure of the ERK2-RSK1 docking peptide complex highlights the role of H-bond stapling in MAP kinase-linear motif interaction specificity***, kézirat publikálás alatt.