

——— Tudományos Diákköri Dolgozat ———

Kiss-Szemán Anna Júlia

**„Nyitott az újra – méretszelekció másképp”,
avagy a *Pyrococcus horikoshii* acilaminoacil-peptidáz
vizsgálata**

Dr. Harmat Veronika és Dr. Karancsiné Menyhárd Dóra

ELTE Kémiai Intézet
Szerves Kémia tanszék



——— Eötvös Loránd Tudományegyetem ———
——— Természettudományi Kar ———
— Budapest, 2011 —

Tartalomjegyzék

Bevezetés.....	3
1. Történeti áttekintés, előzmények.....	4
1.1. Az enzimek és a szerin-proteázok.....	4
1.1.2. Katalitikus megkötődés és hasítás mechanizmusa.....	4
1.2. A prolil-oligopeptidáz család.....	5
1.3. Az acilaminoacil-peptidázok.....	6
1.4. A klórmetil-keton inhibitorok.....	7
Célkitűzések.....	8
2. Fehérjekrisztallográfiai módszerek és alkalmazásuk.....	9
2.1. Bevezetés a fehérjekrisztallográfiába.....	9
2.1.1. Kristályosítás.....	9
2.1.2. Röntgendiffrakciós mérés és adatfeldolgozás.....	12
2.1.3. Modellépítés és szerkezetfinomítás.....	14
3. Molekuladinamikai számítások.....	16
3.1. Mozgásegyenlet és erőter.....	16
3.2. Energiaminimalizáció.....	17
3.3. Molekuladinamika.....	17
3.3.1. A dinamikai szimuláció globális algoritmusa.....	18
3.4. A <i>Pyrococcus horikoshii</i> acilaminoacil-peptidáz rendszer vizsgálata.....	19
4. Eredmények és következtetések.....	21
4.1. A kezdeti feltevés.....	21
4.2. A meghatározott kristályszerkezet.....	21
4.3. A molekuladinamikai szimulációk eredményei.....	25
4.3.1. A ligandummentes és a komplexált állapotra vonatkozó eredmények összevetése.....	25
4.3.2. A számított és a röntgenszerkezetek összevetése.....	30
Összefoglalás és kitekintés.....	32
Köszönetnyilvánítás.....	34
Rövidítések.....	35
Hivatkozások.....	35

Bevezetés

Az enzimek a szervezetben előforduló olyan fehérjemolekulák, amelyek élettani feladatok biokatalizátorai [1,2,3]. Szerkezetük és funkciójuk összefügg – működésük értelmezéséhez szerkezetük meghatározása jelentősen hozzájárulhat. A fehérjekrisztallográfia pontos információt szolgáltat a fehérjemolekulák térszerkezetéről. A meghatározott szerkezetek a reakciómechanizmusok megismerését, értelmezését, mutációk hatásának tanulmányozását segítik elő, ami orvostani és tudományos szempontból is elengedhetetlen.

Munkánk során az acilaminoacil-peptidáz (AAP) fehérjecsalád egy tagjával foglalkoztunk. Ezek proteázok: oligopeptidek hidrolízisét katalizálják. A közelmúltban kimutatták, hogy ez az enzimes család kapcsolatba hozható alapvető fontosságú élettani folyamatokkal, amelyek rendellenességei betegségekhez vezethetnek, mint pl. a kissejtes tüdő- és veserák [4,5] valamint az Alzheimer kór [6]. Az AAP enzimek képesek amiloid-képzésre hajlamos-béta peptideket hasítani. A hasítást követően létrejövő peptidrészletek könnyebben formálnak aggregátumokat, ún. amiloid plakkokat. Neurobiológiai kutatások azt is kimutatták, hogy az AAP fehérjének szubsztrátjai egyes foszfát-észter csoportba tartozó ingerületátvivő anyagok az emberi idegrendszerben [7]. Ezek alapján feltételezhető, hogy az enzim az acetilkolin-észterázéhoz hasonló, fontos szerepet tölt be az emberi agy kémiai folyamataiban is [8].

Tudományos diákköri munkám során a *Pyrococcus horikoshii* AAP-t (PhAAP) vizsgáltam, amely modellje az emberi enzimnek. Kovalens inhibitorral képzett komplexét kristályosítottam, szerkezetét meghatároztam, összevettem a családon belüli más fehérjékkel és molekuladinamikai számításokkal egészítettem ki a röntgendiffrakciós adatokat.

Eredményeink – reményeink szerint – elmélyíthetik az oligopeptidázokra illetve a szerin-proteázokra vonatkozó ismereteinket, másrészt lehetőséget nyújthatnak egy potenciális gyógyszer-célpont fehérje specificitásának és szabályozásának megértéséhez.

1. Történeti áttekintés, előzmények

1.1. Az enzimek és a szerin-proteázok

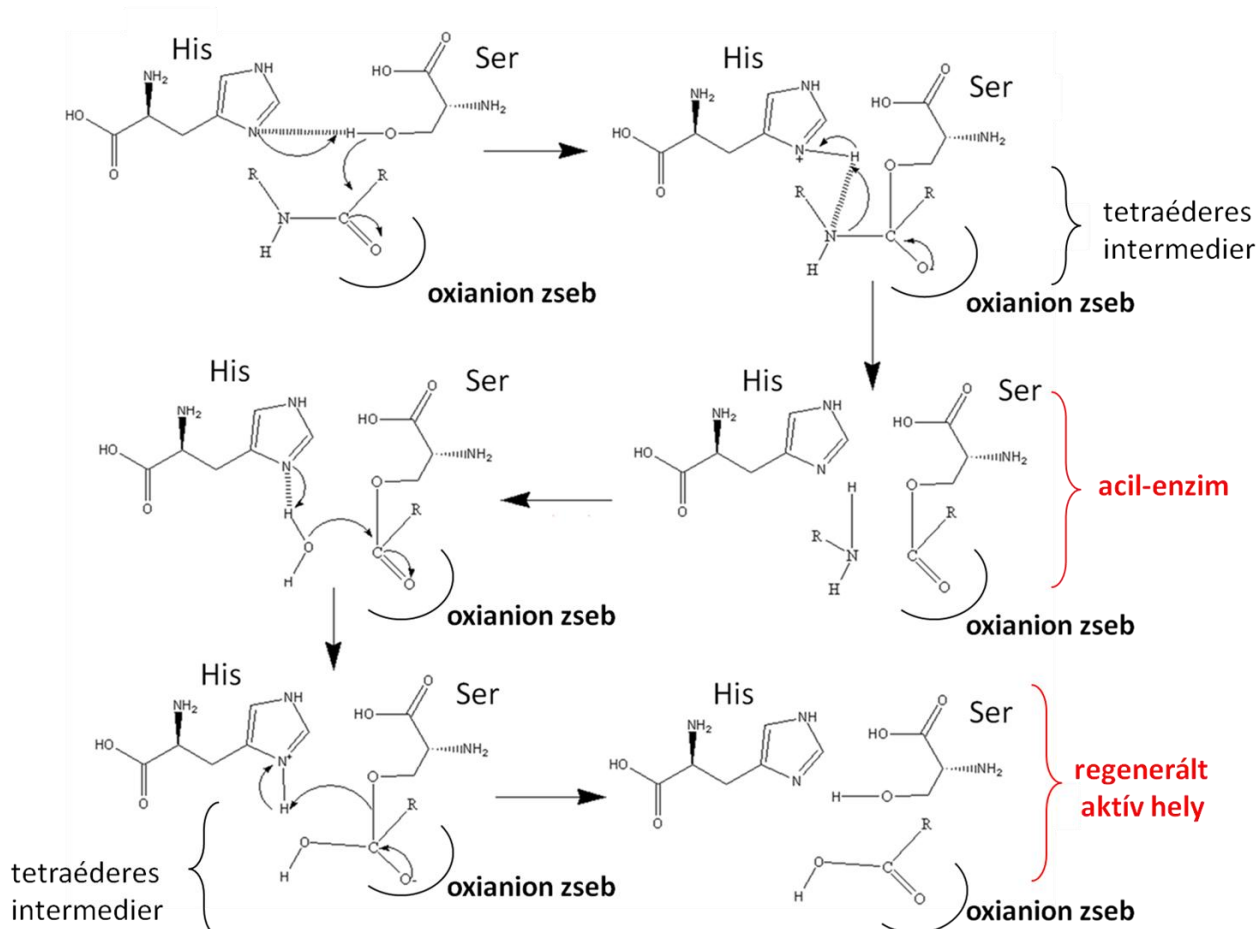
A szerin-proteáz enzimesalád tagjai fehérjéket (peptideket) hasítanak (peptidkötés hidrolízisét katalizálják), egy legtöbbször a molekula felszínén található árokban elhelyezkedő aktív hely segítségével. A szerin-proteáz típusú enzimek aktív helyén egy katalitikus triád található, amelyet három, térben egymáshoz közel elhelyezkedő aminosav, a szubsztráttal kémiai reakcióban lépő – névadó – szerin, egy hisztidin és egy aszparaginsav alkot. A család talán legtöbbet tanulmányozott képviselője a kimotripszin, amelynek működési mechanizmusát és az általa katalizált kémiai reakció kinetikáját részletesen vizsgálták [9].

1.1.2. Megkötődés és a katalitikus hasítás mechanizmusa

A hasítás első lépéseként a hasítandó fehérjemolekulának (peptid, szubsztrát) meg kell közelítenie az aktív helyet, és azon belül az aktív szerint [10]. A bekötés után a szerin hidroxil-oxigénje nukleofil támadást intéz a peptidkötés karbonil csoportja ellen és az aktív szerin észtere keletkezik (acilezés) (1. ábra). A szerin protonját átveszi a katalitikus hisztidin és a keletkezett pozitív töltést a katalitikus aszparaginsav negatív töltése semlegesíti. Az acilezési lépés során egy negatív töltésű, a megtámadott karbonil szén körül tetraéderes konfigurációjú ún. oxianion közti termék alakul ki, majd alakul tovább acil-enzimmé. A hasonló nevű oxianion zseb gondoskodik a negatív töltés stabilizálásáról, két főláncbeli amid-hidrogén segítségével. A hisztidinen „tárolt” protont megkapja a szubsztrát távozó N-terminusa és amino-csoport keletkezik, szétesik az intermedier.

Az aktív hely felszabadulása egy vízmolekula segítségével megy végbe, ami előidézi az acilenzim (kovalens kötéssel összekötött enzim-szubsztrát) hidrolízisét.

Ennek következtében újra tetraéderes intermedieren keresztül megy végbe a reakció: a vízmolekula deprotonálódik a hisztidin javára és nukleofil támadást intéz az enzimhez kötött szénatom ellen, elhasad az enzim-szubsztrát észter kötés is (dezacilezés), a hisztidin protonálja a szerin „csupasz” oxigénjét így az aktív hely regenerálódik és új hasításra képes (1. ábra).



1. ábra A szerin-proteáz enzimes család általános katalitikus mechanizmusa

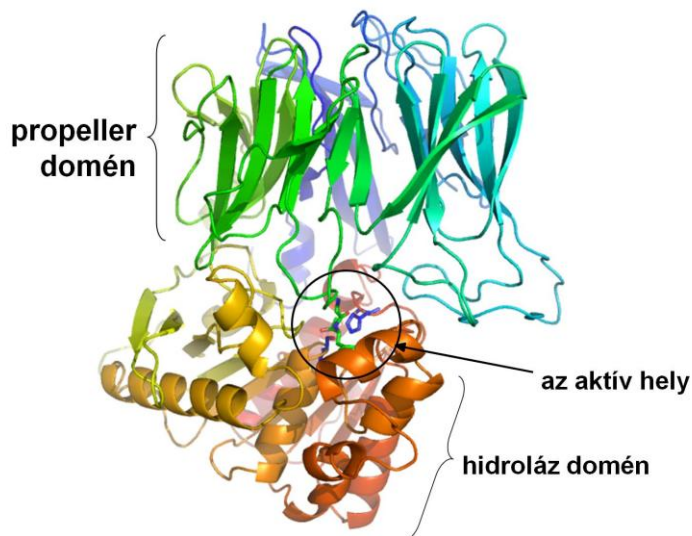
A szerin-proteáz enzimek a bioszintézis során ún. előenzim formában jönnek létre. Ezeknek megfelelően aktiválódniuk kell (pl. konformáció változás), hogy el tudják végezni a kijelölt feladatukat. Ez az elő és aktív forma biztosítja a megfelelő enzimaktivitás egyensúlyát.

1.2. A prolil-oligopeptidáz család

A szerin-proteáz családok közül a prolil-oligopeptidáz (POP) családot fedezték fel legkésőbb [11]. Élettani és gyógyászati szempontból is érdekes fehérjék tartoznak a családba: a névadó prolil-oligopeptidáz (kognitív folyamatok), dipeptidil-peptidáz IV (II típusú cukorbetegség), oligopeptidáz B (álomkór), és az általunk is vizsgált acilaminoacil-hidroláz. Közös tulajdonságuk a szubsztrátok méret szerinti szelektálása: csak maximum kb. 30 aminosavas oligopeptideket tudnak elhasítani, nagyobb fehérjéket nem.

A szerin-peptidázok tipikus 25-30 kDa-os tömegéhez képest a prolil-oligopeptidázok 80-120 kDa tömegűek. Tipikusan két alegységből állnak: α/β -hidroláz domén és egy 7

„lapátból” felépülő β -propeller domén (2. ábra). A méretszelekció hátterében az áll, hogy az aktív hely a két domén közötti üregben helyezkedik el.



2. ábra A *Pyrococcus horikoshii* ősbaktérium eredetű aciaminoacil-peptidáz enzim
Az aktív helynél kék színnel van kiemelve a katalitikus triád (Ser466, His578, Asp546), zöld színnel az inhibitor

Más szerin-peptidázokkal ellentétben bioszintézisükkor azonnal aktív alak keletkezik, mivel a két doménes szerkezet meggátolja, hogy kontrollálatlanul elhasítsanak nem a szubsztrátjaik közé tartozó fehérjéket.

1.3. Az acilaminoacil-peptidázok

Az acil-aminoacil peptidázok (röv. AAP) más néven az acilpeptid-hidrolázok a szerin-proteázokon belül, a prolil-oligopeptidáz enzimeszaládba tartoznak [12]. Ahogy a nevük is mutatja a hasítandó peptid N-terminusáról acilezett aminosavakat hasítanak le [13]. A lehasított acilező csoport lehet acetil-, kloroacetil-, formil-, esetleg foszfátcsoport. Számos emlős szervezetében (eukarióta sejtek) kimutatták az AAP-k jelenlétét, és meghatározták a patkányból, sertésből és emberből kinyert enzimek teljes aminosav sorrendjét [14,15,16]. A három enzimet egyenként 723 aminosav építi fel, amelyek térbeli elrendeződése közel kilencven százalékban azonos, valamint a katalitikus triád elhelyezkedése is megegyező [11,17].

A legtöbb szerkezet-funkció összefüggés vizsgálat eddig az *Aeropyrum pernix* hőkedvelő ősbaktérium acilaminoacil-peptidáz enzimét célozta (ApAAP). Az ApAAP-ra a nyitott-csukott forma dinamikus egyensúlya jellemző, amikor a nyitott állapotban inaktiválódik az katalitikus hely [18]. A dolgozatomban vizsgált acilaminoacil-peptidáz, ami a *Pyrococcus horikoshii* szintén termofil ősbaktériumból származik (PhAAP). A fehérjét

(PhAAP) *E. coli* baktériumban fejezték ki (MTA Enzimológiai Intézet, Polgár László professzor kutatócsoportja, [Enzim]=133 μ M V=200 μ l, [Inhibitor]= 336,4 μ M (Z-Gly-Gly-Phe-CMK), puffer 10mM TRIS, pH=7,5), és a megfelelő tisztítás után használtuk fel az egyetem fehérjekristallográfiai laboratóriumában.

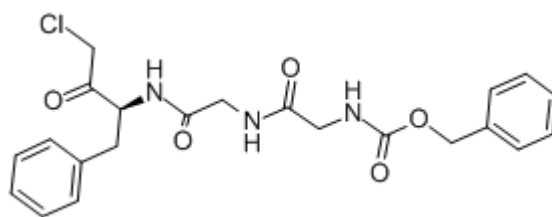
Különböző fajokból származó AAP-k különböző multimereket alkotnak: az ApAAP dimer [18,19,20], az emlős enzimek tetramer [14,15,16], a PhAAP hexamer felépítésű [21]. A vizsgálatok egyik fontos célja a multimerizáció funkcionális szerepének megértése.

1.4. A klórmetil-ke-ton inhibitorok

A klórmetil-ke-ton származékokat (CMK) nagyon régóta használják a szerin-proteázok kovalens inhibitoraként [7,22].

A mi esetünkben azért volt rá szükség, mert az enzim szubsztrátkötő mechanizmusát is vizsgálni akartuk. Ehhez szükség volt egy szubsztrát-szerű viszonylag kicsi molekulára, ami ugyanakkor kovalensen hozzákötődik az aktív helyhez [8,23]. Az inhibitor úgy működik, hogy bekötődik az aktív szerinhez, de a második lépés (aktív hely regenerálása) már nem tud lejátszódni, így a tetraéderes állapot kovalensen rögzítve marad. Ugyanis az inhibitor epoxid-intermedieren keresztül a hisztidinhez is kovalensen hozzákötődik.

A PhAAP-hez adott inhibitor Z-Gly-Gly-Phe-CMK szekvenciájú, ahol Z benziloxi-karbonil csoportot, a Gly két glicint, a Phe egy fenilalanint és a CMK a klórmetil-ke-ton-t jelöli (3. ábra).



3. ábra Az alkalmazott inhibitor szerkezeti képlete
(CMK-Phe-Gly-Gyl-Z)

A fehérje az ELTE Fehérjekristallográfiai laboratóriumába – az inhibitor-t is tartalmazó – oldat formájában került, az inhibitor az enzimhez képest háromszoros feleslegben volt. Ebből az oldatból dolgoztunk a kristályosítás során (ld. lent).

Célkitűzések

A röntgen kristallográfiai vizsgálat elsődleges célja annak a kérdésnek megválaszolása volt, hogy a korábban meghatározott PhAAP szerkezetéhez képest [21], okoz-e változást az aktív helyen egy kovalens szubsztrát-szerű inhibitor kötődése, illetve hogy hatással van-e ez a szubsztrát a fehérje teljes térszerkezetére. Mivel az enzim ürege viszonylag kicsi, egy harminc aminosavas oligopeptid nehezen tudna megfordulni benne. Ez felveti azt a kérdést, hogy az enzim irányítja-e valamilyen módon az üreg bejáratánál az oligopeptid szubsztrátot.

A korábban meghatározott inhibitor nélküli szerkezet [21] valójában tartalmaz egy az aktív helyhez koordinálódott 1,6-hexándiol molekulát, így érdemben nem tekinthető „üres”-nek. Molekuladinamikai szimulációval ezt a teljesen „üres” állapotot kívántuk modellezni, és megállapítani, hogy milyen konformációban található a katalitikus triád, amikor nem kényszerül kölcsönhatásra sem szubsztrát-, vagy szubsztrát jellegű molekulával, sem a kristályosító oldatból származó hexándiollal.

A dinamikai modellezés során a PhAAP molekulát önálló monomerként vizsgáltuk, azzal a céllal, hogy további információt szerezzünk a két domén egymáshoz való térbeli viszonyáról.

Az általunk vizsgált ősbaktérium eredetű acilaminoacil-peptidázok szoros kapcsolatban állnak az emlős eredetű AAP fehérjékkel, amelyek szerkezet meghatározása eddig nem járt sikerrel. Ha megértjük a bakteriális rokonfehérje szerkezetét és működési mechanizmusát, közvetett információt szerezhethetünk az orvosbiológiai és gyógyszerészeti szempontból fontosabb eukarióta enzimfehérjéről.

2. Fehérjekrisztallográfiai módszerek és alkalmazásuk

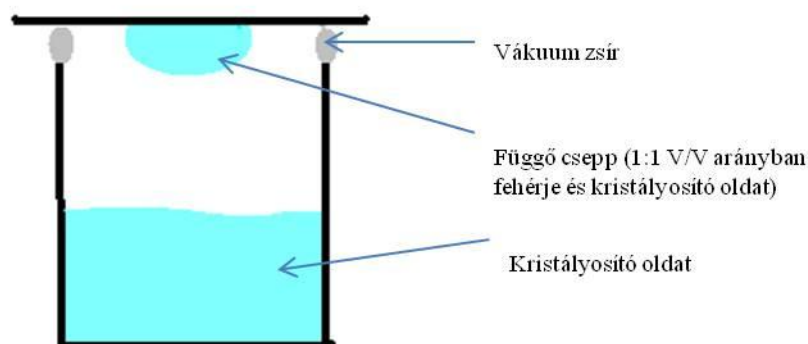
2.1. Bevezetés a fehérjekrisztallográfiába

A fehérjekrisztallográfia olyan szerkezetvizsgáló módszer, ahol atomok pontos térbeli helyzetéről – a molekulák térszerkezetéről – röntgendiffrakciós módszerrel információt nyerhetünk. Ennek a módszernek (diffrakció) alapja a sugárzás anyaggal való rugalmas kölcsönhatása, amelynek eredménye a diffrakciós kép. Az „egyszerű” optikai mikroszkópos vizsgálattal ellentétben a kristályokon szóródott sugarakat nem lehet egyszerű fizikai eszközökkel refokuszálni, ezért diffrakciós képet detektálunk, amelyből (a szórt sugarak fázisainak közelítő módszerekkel való meghatározása után) a tárgy képét matematikai módszerekkel (Fourier-transzformáció), számítógép segítségével számoljuk. A röntgensugárzás a töltéssel rendelkező részecskék elektromos terével lép kölcsönhatásba, de az atommagok hozzájárulása elhanyagolható, ezért a diffrakciós mintázatból a molekula elektronsűrűségi függvénye számítható ki. Ez egy „térkép”, aminek értelmezésével atomi koordinátákká fordítjuk le azt. A kristályszerkezetek a tapasztalat szerint általában a fehérje biológiailag aktív konformációját tükrözik [24].

2.1.1. Kristályosítás

Ahhoz, hogy a méréshez eljussunk, végre kell hajtánunk, a talán legidőigényesebb feladatrészt: a fehérje kristályosítását, így készítjük elő a mintát a mérésre. A mérés alapvető feltétele, hogy nagyméretű, minél kevesebb kristályhibát tartalmazó egykristályt állítsunk elő ezt a fehérje-koncentráció változtatásával, a gócképződés és –növekedés folyamatainak befolyásolásával érhetjük el, valamint különböző kristályosító adalékokkal (pl. só, lecsapószer, puffer) lehet gyorsítani a kristályok kialakulását, illetve megakadályozni a nem kívánatos mellékfolyamatokat (pl. detergens adagolás a nem specifikus aggregáció elkerülésére). A kristályképződési folyamatot befolyásoló paramétereket (pl. pH, hőmérséklet, koncentráció stb.) is optimalizálni kell. Itt egy kis kreativitásra és türelemre van szükség. Az első széleskörű (tág pH, koncentráció, hőmérséklet tartományok) keresés után az ígéretes körülmények optimalizálását kell elvégezni, amíg végül megtaláljuk az ideális körülményt – ez próbálgatásos módszer, ezen kívül segítségünkre lehet néhány jó bevált, mások által már alkalmazott krisztallográfus fogás [25]. Elengedhetetlen a fehérje tisztasága (~99). Kristályosító oldatot adunk a fehérjéhez (tartalmaz többek között kicsapó szert, ami csökkenti a fehérje oldhatóságát), puffer adalékkal szabályozzuk a pH-t, és

használatosak viszkozitás növelő adalékok (pl. glicerin). A kristályok előállításához ún. függőcsepp módszert alkalmaztunk (4. ábra), ami a gőzdiffúzió elvén alapszik. Az üvegfedélre pipettázott csepp (néhány μl) a kristályosító oldatra nézve hígabb, és felülete görbült, ezért a két oldal fölötti gőznyomás között különbség van, amelyek kiegyenlítődése során vízgőz távozik a cseppből, ezzel annak töményedését okozza, így megindulhat a gócképződés, majd a kristálynövekedés.

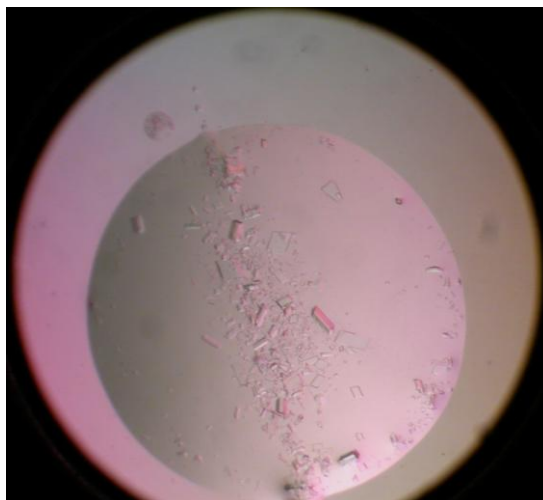


4. ábra A függőcsepp módszer

A *Pyrococcus horikoshii* ösbaktérium eredetű fehérjét *E. coli* baktériumból fejezték ki (a fehérjeoldat összetételét ld. fent). A kristályosítást a korábban bevált körülmények alapján terveztük. Mivel általános tapasztalat, hogy a fehérjeminta kis változása is (pl. mutáció, vagy eltérő komplexált ligandum) az optimális körülmények jelentős megváltozását okozhatják, a kristályosító körülményeket optimáltuk. Az első próbálgató körben 33-55 μl 3M MgCl_2 , 50 μl 1M Tris[hidroximetil]aminometán]/HCl (pH 7,2-8,5), 250-400 μl 5M 1,6-hexándiol kerül 500 μl végtérfogatú kristályosító elegybe. A cseppet pedig a körülményből 2 μl -t 2 μl fehérjeoldattal elegyítve készítettük Cyberlab kristályosító robot segítségével. Ezek közül a körülmények közül a 250 μl és 300 μl hexándiolt, 33 μl MgCl_2 -ot, 50 μl puffert (pH=8,5) tartalmazó 500 μl végtérfogatú elegy vált be – hét nap elteltével ebből nőttek a legformásabb (legvastagabb, lap alakú) kristályok. Ezek azonban elég kicsik voltak, úgyhogy nagyobb cseppet tettünk fel, ezt már manuálisan, ahol 3 μl kristályosító oldathoz 3 μl fehérjeoldatot valamint 4 μl kristályosító oldathoz 4 μl fehérjeoldatot adtunk.

Az 5. ábrán látható csepp egy ún. átoltott csepp. Ez olyan csepp, amiben nem tud elindulni a gócképződési folyamat, mert nem elég tömény az oldat. Ekkor egy másik cseppből kristálygócokat juttatunk át a célcseppbe. Általában macskabajusszal végigsimítva egy kristályt lemorzsolódik róla néhány mikroszkopikus kristálydarab, és feltapad a szádra. Ezt a szálat keresztülhúzva a tiszta cseppen belemossuk a kristálygócokat. Abban az esetben, ha a

kristálynövekedésre alkalmas koncentrációtartományban van az oldat, néhány nap múlva megfigyelhető a jellegzetes „vonalmonti” kristályképződés (5. ábra).



5. ábra Átoltott csepp és a benne jellegzetesen vonal mentén képződő kristályok

1. táblázat Az optimális körülmény összetétele (végtérfogat 500 μl)

	koncentráció
1,6-hexándiol	2,5 mol/dm ³
MgCl ₂	0,2 mol/dm ³
Tris[hidroximetil]aminometán/HCl puffer (pH=8,5)	0,1 mol/dm ³

A 4. ábrán látható kép egy 4 μl + 4 μl -es csepp fényképe, amely a méréshez felhasznált kristályt is tartalmazza. Végül az itt (6. ábra) látható a kristályt mértük meg.



6. ábra A PhAAP enzim kristályai

A jobb felső részen a mérhető példány, a többi szép kristály, de méreten aluli

2.1.2. Röntgendiffrakciós mérés és adatfeldolgozás

A fehérjekristályok mechanikai hatásokra érzékenyek, a molekulák között térrészeket az oldószer tölti ki, aminek elpárolgásával tönkremehet a kristály, és röntgensugárzás hatására roncsolódhatnak. Ezért célszerű hideg nitrogén áramban kb. 100 K-re hűtve kivitelezni a mérést. Fontos, hogy a mérés előtt a kristályt ún. krio-oldatba tegyünk, amelynek összetétele gátolja a kristályos jég képződését a lehűlés rövid ideje alatt, ugyanis a jégkristályok szórásukkal akadályoznák a mérés kiértékelését (100K-en már nem képződnek jégkristályok, mert az amorf vízfázis a stabil). A mi esetünkben már a kristályosító körülmény krio-oldatként viselkedett viszonylag alacsony víztartalma (33,4 térfogat%) miatt.

Az adatgyűjtést az ELTE Fehérjekrisztallográfiai Laboratóriumban található diffraktométeren (réz K_α sugárzás, Rigaku RU-H2R forgó anódos generátor, Rigaku R-Axis IV++ image plate detektor) végeztük (240 felvétel, 15 perces expozíciós idő és $0,5^\circ$ oszcilláció felvételenként). Az adatfeldolgozást az XDS és XSCALE programokkal [26] végeztük. Ennek során a diffrakciós képek feldolgozása történik, eredménye az elemi cella paraméterei, a szimmetria és a reflexiók amplitúdóinak adatsora (2. táblázat).

A röntgendiffrakciós mintázatból a szórt sugaraknak csak az intenzitása számítható közvetlenül, a fázisa nem. Ezért az elektronsűrűségi térkép számításához matematikai úton kell megoldani az ún. fázisproblémát.

A fázisproblémát a CCP4 programcsomag MOLREP programjának [27,28] segítségével oldottuk meg. A helyettesítéshez felhasznált molekula a korábbi hexándiol tartalmazó szerkezet [21] fehérje része (a hexándiol és vízmolekulákat, és ionokat kivettük, mert ezek eltérő helyzetben lehetnek a két szerkezetben). Erre a molekulára teljesül, hogy az aminosav sorrendjének legalább 25%-a megegyezik az általunk vizsgált molekuláéval, ekkor feltételezzük, hogy a két fehérje szerkezete alapvető vonásaiban hasonlít. (Esetünkben az egyezés 100%, de globálisan jelentős különbségek lehetnek a két domén relatív helyzetének akár csak kis különbsége miatt is.) Az ismert szerkezet modellül szolgál a meghatározandó molekulának. A molekuláris keresés feladata, hogy megtalálja az meghatározni kívánt molekula helyét és orientációját az új elemi cellában. Ebből a modellből számítható fázisok adják azt a kiindulási fáziskészletet, amelynek segítségével az első elektronsűrűségi térképet számítjuk. A mi esetünkben azonban izostrukturális volt a modell és a vizsgált szerkezet, így az elemi cella is megegyezett, a kiindulási pozíciót csak merevtest finomítással igazítottuk, hogy a két domén helyzete közti kis különbséget figyelembe vegyünk [29].

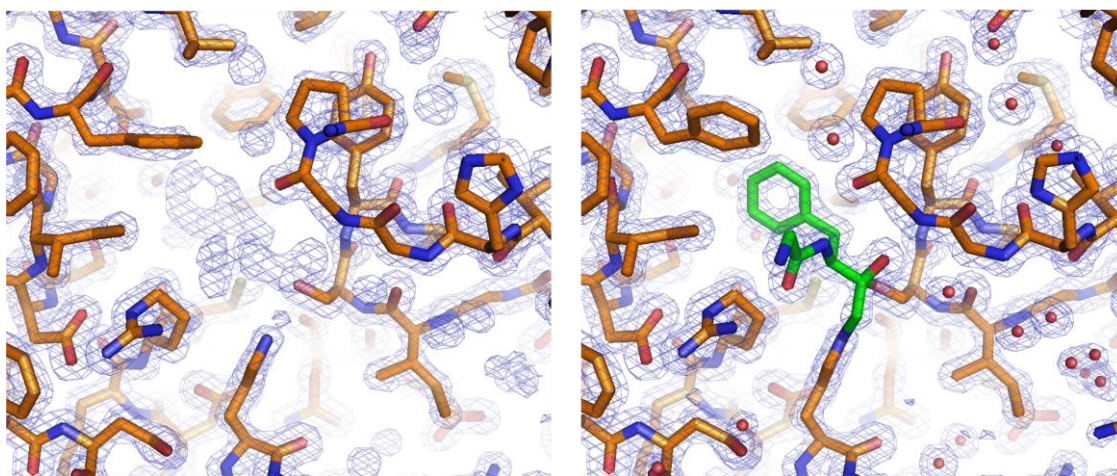
2. táblázat A röntgenmérésből származó eredmények összefoglalása

Kristályrendszer	trigonális
Cellaparaméterek (a, b, c / Å, α, β, γ / °)	184.057 184.057 145.529 90,0 90,0 120,0
Térceport	H 3 2 (155)
R_{meas}^a	0,066
$I / \sigma(I)$	22,25
Felbontási tartomány	19,741 – 1,601
Összes/független reflexiók száma	861050/122438
Teljesség	99,2 %

$$^a R_{\text{meas}} = \frac{\sum_{hkl} \sqrt{\frac{N}{N-1}} \sum_i^N |I_i(hkl) - \overline{I(hkl)}|}{\sum_{hkl} \sum_i I_i(hkl)}$$

2.1.3. Modellépítés és szerkezetfinomítás

Mivel a fázisprobléma megoldását molekuláris helyettesítéssel végeztük, a számítások eredményeképpen a kiindulási modellmolekulát és az elektronsűrűségi térképet kaptuk. Így a feladatunk a modellmolekula térképéhez való hozzáigazítása volt úgy, hogy a nagy elektronsűrűségű régiókba illesztjük/igazítjuk az atommagokat [30,31]. A modellen végrehajtott, helyi kézi javítások/igazítások (COOT program) [32] következtében a modellből számítható fázisok, és a velük számítható új elektronsűrűségi térkép is javul. Ezt modellépítési és finomítási lépések váltakozásával érhetjük el. Ekkor a térkép javulása a zajszint csökkenését is eredményezi (7. ábra).



7. ábra A finomítási és modellépítési ciklusok hatása az elektronsűrűségi térképre

Az ábrán az ún. differencia-elektronsűrűségi térkép látható, ami közelítőleg a valódi molekula térképének kétszerese és a modellmolekula térképének különbsége ($0,56e/\text{\AA}^3$)
(balra a molekuláris helyettesítés után, jobbra a finomítás végén)

A finomítási ciklusokat a REFMAC5 programmal [33] végeztük (CCP4 szoftver), amely során a modell modellhibával korrigált szórási függvényét illesztettük a mért szórási függvényhez. Ezekben a finomítási ciklusokban a program felhasznál fehérjeszerkezetekre vonatkozó általános ismereteket is (pl. sztereokémiai korlátozások, jellemző kötэшosszak, kötэшszögek, torziós szögek stb.), ezekhez az „obszervációkhoz” is illesztjük a szerkezetet. Ezeken kívül még alkalmaztunk ún. TLS-finomítást (translation, libration, screw-rotation) is [34], amikor a modellmolekula egységesebb régióinak hőmozgási anizotrópiáját modellezhetjük. Esetünkben a fehérjemodell két doménje (hidroláz, propeller) volt a két kijelölt régió. A szerkezet validálását („jóság vizsgálat”) a CCP4 program végezte (3. táblázat).

3. táblázat A finomítás eredménye

Finomítás	
R-faktor ^b	0,1538
R_{free} ^c	0,1841
Atomok száma	
Fehérje atomok	5174
Inhibitor (CMK)	16
1,6-hexándiol	88
Mg ²⁺ /Cl ⁻	5/1
Víz	667

$$^b R = \frac{\sum_h |F_{obs}(h)| - k |F_{calc}(h)|}{\sum_h |F_{obs}(h)|}$$

^c Az adatkészlet 5%-át különítettük el az R_{free} számítására (validálás céljából).

^d A sztereokémiai paraméterek jellemzésére a PROCHECK [35] programot használtuk.

^e Az aktív hely szerinje, és öt mozgékony régióban található aminosav.

Átlagos négyzetes eltérés az ideális geometriától	
Kötéshosszak (Å)	0,030
Kötésszögek (°)	2,253
Trigonális/általános síkok (Å)	0,013
Átlagos B-faktor (Å ²)	17,757
Átlagos koordinátahiba (Å)	0,068
Ramachandran térkép ^d	
φ / ψ a legkedvezőbb régióban	481 (87,5%)
φ / ψ a megengedett régióban	63 (11,5%)
φ / ψ a bővített megengedett és tiltott régióban	6 ^e (1%)

3. Molekuladinamikai számítások

A molekuladinamikai számítások alkalmasak makromolekulák kedvezőtlen elrendeződéseinek optimalizálására, illetve fiziológiás, egyensúlyi állapotot leíró dinamikus sokaságok előállítására. A röntgendiffrakciós mérés során egyfajta merev, korlátozottan szolvatált szerkezetet vizsgálunk. Ezzel szemben a dinamikai vizsgálat lehetővé teszi, hogy a molekulát szolvatált közegbe helyezzük, így engedélyezzük a szabadabb mozgást. Ehhez szükséges egy megfelelő modellrendszer alkalmazása.

3.1. Mozgásegyenlet és erőter

Az elektronok sokkal gyorsabban mozognak mint az atommagok, és ez a két mozgás különválasztható (Born–Oppenheimer közelítés). Az atommagok helyzetétől függő potenciális energiaszint a Schrödinger–egyenlet alapján lehetne számítani, ez azonban lehetetlen egy több ezer atommagot tartalmazó fehérjemolekula esetében. Ezért a molekulák szerkezetét és szerkezeti átalakulását vizsgálva, a molekulát rugókkal összekötött, töltéssel rendelkező tömegpontok összegének tekintjük (klasszikus modell-rendszer), ahol az atommagok mozgását követjük, amit az elektronfelhő kiátlagolt hatása befolyásol.

Az atommagok mozgásának leírására a Newton–féle mozgásegyenletet használjuk,

$$F_i = m_i \frac{\partial^2 r_i}{\partial t^2} \quad (i=1 \dots N) \quad (1)$$

ahol F az erő, m a redukált tömeg, r az atom-atom távolság és t az idő.

A lokálisan ható erőket pedig egy empirikus potenciálfüggvényből számítjuk,

$$F_i = -\frac{\partial V}{\partial r_i} \quad V(r_1, r_2, \dots, r_N) \quad (2)$$

Az empirikus energiaegyenlet matematikai alakját és a benne szereplő állandókat ún. erőterként (*forcefield*) definiáljuk. Fehérjékre vonatkozó számításokhoz alkalmazott legismertebb erőterek: AMBER, GROMOS, ECEPP, CVFF és az általunk is alkalmazott CHARMM27 [36].

Az energiafüggvény alakja:

$$\begin{aligned}
 V = & \sum_{\text{bonds}} k_b (b - b_0)^2 + \sum_{\text{angles}} k_\theta (\theta - \theta_0)^2 + \sum_{\text{dihedrals}} k_\phi [1 + \cos(n\phi - \delta)] \\
 & + \sum_{\text{impropers}} k_\omega (\omega - \omega_0)^2 + \sum_{\text{Urey-Bradley}} k_u (u - u_0)^2 \\
 & + \sum_{\text{nonbonded}} \epsilon \left[\left(\frac{R_{\min_{ij}}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{R_{\min_{ij}}}{r_{ij}} \right)^6 \right] + \frac{q_i q_j}{\epsilon r_{ij}}
 \end{aligned} \tag{3}$$

ahol a tagok a kötés (1. tag), a kötőszögek változásához kapcsolódó (2. tag), a nem-kötő kölcsönhatások leíró, atomok sík csoportból való kitéréséhez illetve a kiralitás-kényszerek megsértéséhez köthető (3. tag), a torziós szögek változásából eredő (4. tag) illetve a szomszédos kötésen át ható Urey–Bradley erők (5. tag) valamint a szterikus effektusokat leíró Van der Waals (6. tag) és a töltések közti Coulomb kölcsönhatásból (7. tag) eredő erők. A képletekben szereplő paraméterek (erőállandók k_i), az ideális elrendeződést leíró geometriai paraméterek (b_0 , θ_0 , ϕ_0 , ω_0 , u_0 , $R_{\min}$) és egyéb állandók(ϵ) röntgendiffrakciós mérésekből (a paraméterek átlagos értékei és szórásai egy adott vegyületesaládon belül), spektroszkópiai analízisekből és kvantumkémiai számításokból származó adatok.

3.2 Energiaminimalizáció

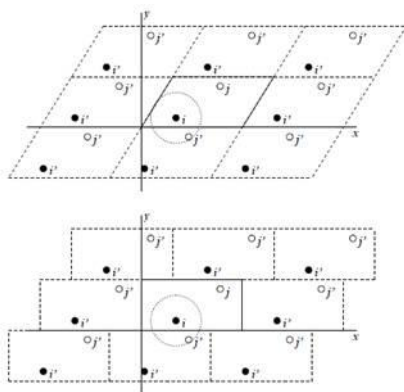
Az energiaminimalizáció célja, a potenciálfelület legközelebb eső lokális minimumainak megkeresése, ahol a molekulánk számára energetikailag kedvező és feltételezhetően jellemző térszerkezetet vesz fel. Számításaink során két algoritmust alkalmaztunk, ezek közül az egyik a legmeredekebb esés módszere, ahol a következő potenciális energia-felületen való elmozdulás az energiafelület deriváltjának (gradiens) irányába történik egy vonalmenti keresés minimumpontjába (hátránya, hogy a minimum közelében rosszul konvergál). A másik módszer a konjugált gradiens módszer, ahol a lépés irányához számított gradienst az előző lépések deriválási eredményeivel korrigáljuk. Mi a Polak-Ribiere konjugált gradiens módszert használtuk a minimum-közeli optimalizációs lépések során [37].

3.3. Molekuladinamika (MD)

Korábban már említettük, hogy célunk a fehérjemolekula dinamikus viselkedésének vizsgálata. Ennek kivitelezéséhez használjuk (1) és (2) egyenleteket – a rendszer mozgását

newtoni mechanika alapján szimuláljuk, a rendszerben fellépő erőhatásokat pedig az energiafüggvényből számítjuk. Első lépésben az általunk választott hőmérsékletnek megfelelő atomi sebességeket, valamint δt integráláshoz szükséges „lépésintervallumot” határozunk meg (tipikusan néhány femtoszekundum). Az időlépés hosszát úgy választjuk, hogy lényegesen kisebb legyen, mint a vizsgálni kívánt leggyorsabb mozgás frekvenciájának reciproka.

A molekulánkat egy oldószert tartalmazó dobozba foglaljuk, amelynek méretét úgy választjuk meg, hogy ha az azonos dobozokkal lenne körülvéve, akkor se érzékelje közvetlenül a szomszédos dobozban elhelyezkedő fehérje molekulát. Rendszerünket az ilyen módon létrehozott dobozzal azonos dobozokból felépített végtelen rendszernek tekintjük (8. ábra), így a szabad mozgás mellett az állandó anyagmennyiséget is biztosítani tudjuk (ha egy molekula „kiúszik” a dobozból, annak másolata az azonos szomszédos dobozból az ellenkező irányból „beúszik”), valamint a távolható kölcsönhatások (leginkább a töltések közötti Coulomb kölcsönhatás) egyértelműen meghatározott összegzését a Particle-Mesh Ewald módszerrel végezhetjük [38,39].



8. ábra A periodikus határfeltételek szemléltetése

3.3.1. A dinamikai szimuláció globális algoritmusa

1. Kiindulási feltételek megadása

A lehetséges kölcsönhatások és az atomi pozíciók megadása: összes lehetséges atom pozíciója (r) és kiindulási sebessége (v). Ez utóbbi a kezdeti lépésben egy véletlenszerűen generált sebesség-eloszlás, amely megfelel a kívánt szimulációs hőmérsékletnek (esetünkben 300 K), a többi lépésben az előző lépésben keletkezett adatok „öröklődnek”.

2. Az erők számítása

Egyetlen atomra ható erő számolása az

$$F_i = \sum_j F_{ij} \quad (4)$$

képlet alapján a kötő és az egymással nem közvetlenül kötött atompárok között, valamint a nemkötő-kölcsönhatásból származó erők számítása, majd ennek felhasználásával az atomi sebességek hozzárendelése. A potenciális, a kinetikus energiák és a nyomás tenzor számítása a sebességek szükség szerinti korrekciója a definiált kényszerfeltételek, illetve a kívánt hőmérséklet és nyomás értékeknek megfelelően.

3. Szerkezet módosítás

Az atomok elléptetése a választott időlépés figyelembevételével a Newton-féle mozgásegyenlet alapján numerikusan számítva. Esetünkben ez a velocity-Verlet algoritmust használva [40] történt.

4. Végso lépés

Atomi pozíciók, sebességek, energiák, hőmérséklet, nyomás összegzése és dokumentálása. A 2., 3. és 4. lépés addig kerül ismétlésre, amíg az előre megszabott szimulációs idő végére nem érünk.

3.4. A *Pyrococcus horikoshii* acilaminoacil-peptidáz rendszer vizsgálata

A rendszer energiáját több lépésben minimalizáltuk, úgy hogy csökkenő erősségű kényszereket alkalmaztunk a fehérje atomjaira. A minimalizáció első lépése során rögzített fehérje szerkezet mellett a vízmolekulák helyzetét optimáltuk, majd fokozatosan kiegészítettük a fehérje-atomok helyzetének lokális optimalásával. Ezután kezdődött az dinamikai szimuláció.

A PhAAP rendszer tanulmányozásához 2 fs-os időlépést választottunk.

Előkészítésként, ismét alkalmazva a fehérje atomokra a csökkenő erősségű rögzítő-kényszerek rendszerét, rövid (3 x 200 ps) „restrained”-dinamikai szimulációkat majd a rögzítő kényszerek kikapcsolása után egy nyomás-stabilizáló szimulációt végeztünk (200 ps) kanonikus sokaság alkalmazásával (rögzített anyagmennyiség, térfogat és hőmérséklet).

A szolvatált fehérje-rendszerünk egyensúlyba juttatása és az adatgyűjtés nagykanonikus sokaság alkalmazásával történt, ezért az anyagmennyiség mellett a rendszer hőmérsékletét és nyomását is állandó értéken tartottuk, Nose-Hoover termosztát [41,42] és Berendsen barosztát [43] alkalmazásával. A ligandummentes illetve az 1,6-hexándiolt tartalmazó monomert szerkezeteken végzett szimulációk 10 illetve 15 ns-ig tartottak.

4. Eredmények értékelése és következtetések

4.1. Kezdeti feltevés

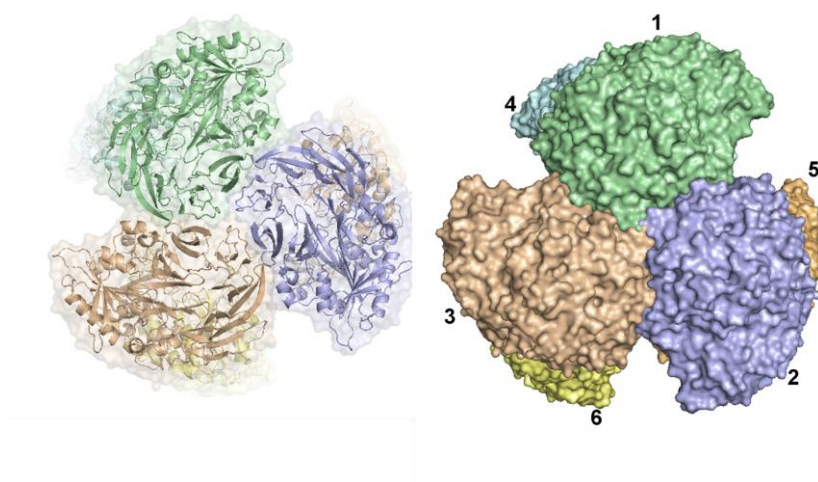
Vizsgálatunk célja az volt, hogy megállapítsuk, hogy a korábban meghatározott oldószeres PhAAP szerkezetéhez képest, okoz-e változást az aktív helyen egy kovalens szubsztrát-szerű inhibitor kötődése, illetve hogy ez hatással van-e a fehérje globális térszerkezetére. Választ kerestünk arra a kérdésre, hogy hogyan valósul meg a méretszelekció és hasítási mechanizmus.

A kutatás adott pillanatában valószínűsítették, hogy a fehérje felszíni polaritása befolyásolja a szubsztrát szelekciót. Mivel a fehérje üregében elég szűk a hely, a behatolt szubsztrát már nem tud orientációt változtatni a molekula belsejében. Ezért kiemelt szerepet kap a molekula oldalán található „belépő kapu” polaritása.

4.2. A meghatározott kristályszerkezet

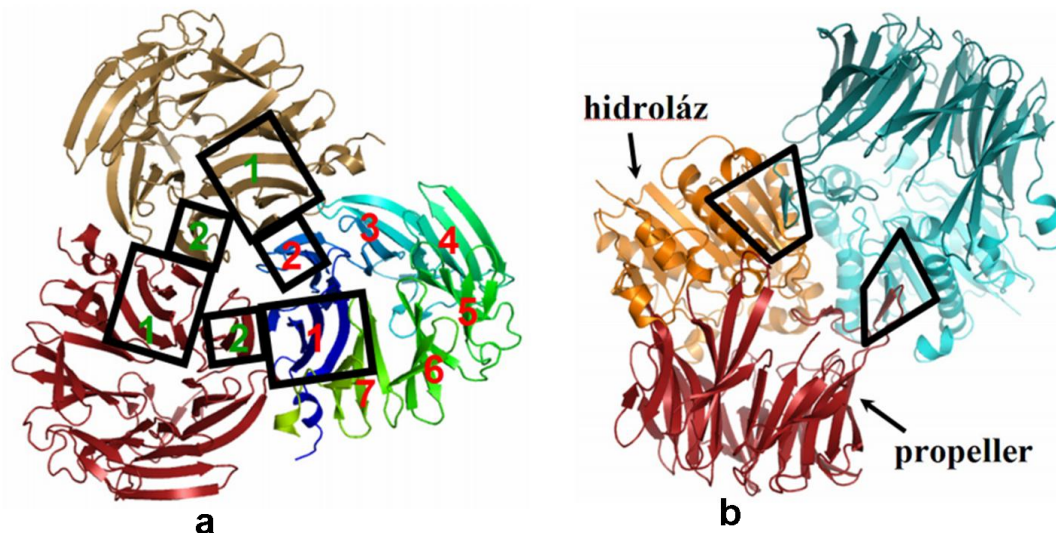
Az általunk meghatározott szerkezet jobb felbontással rendelkezik (1,6 Å) mint az eddigi mérések. A jobb felbontás előnye, hogy pontosabban megfigyelhetők a korábban kevésbé egyértelműen meghatározott pl. mozgékonyabb régiók. Ennek következtében beépítettünk tizenegy további aminosavat (Glu51, Asp52, Gly53, Glu80, Glu81, Lys82, Lys83, Asp128, Lys373, Glu374, Gly375, Lys618), így már csak négy aminosav hiányzik a fehérjeláncban az N- és két aminosav a C-terminusról. Ezek azonban olyan mozgékony régiók, amelyek rendezetlenek a kristályban, és ezért az elektronsűrűségi térképen (ami a kristálybeli molekulák elektronsűrűségének átlaga) nem azonosíthatók.

A PhAAP-CMK komplex a biológiailag aktív hexamer formájában kristályosodik (9. ábra).



9. ábra A PhAAP-CMK hexamer alakja
(az egyes monomereket számmal jelöltük)

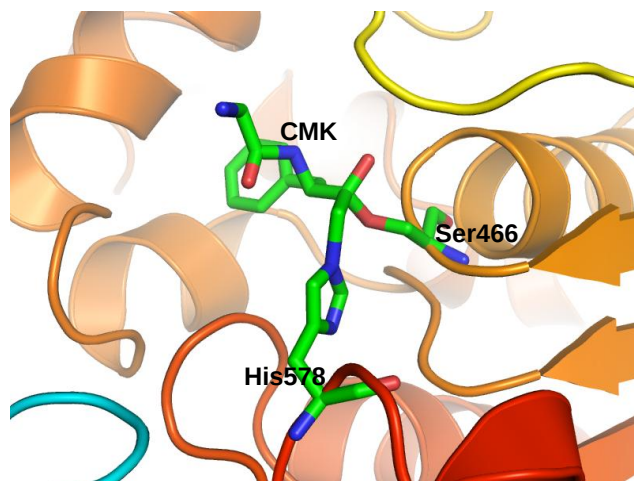
A hexamerizációban a propeller régióban az 1 és a 2 számú propeller lapát vesz részt (10. ábra, a), míg a hidroláz domén szabad β -éle lép kapcsolatba a szomszéd monomer 3. propeller lapátban található inzercióval (10. ábra, b).



10. ábra A hexamerizációban résztvevő monomer régiók [21]

a) hexamerizáció a propelleren, b) a hidroláz és a propeller domén kapcsolata két monomer esetében

A megoldott szerkezetből megállapíthattuk, hogy a kovalens inhibitort tartalmazó szerkezet globális konformációja nem tér el – néhány kivétellel – az 1,6-hexándiolt tartalmazó szerkezettől. A kristályban megfigyelt aktívhely-konformáció is nagyon hasonló, annak ellenére, hogy a létrejött tetraédes elrendeződésű komplexben az inhibitor mind az aktív szerinnel, mind pedig az aktív hisztidinnel kovalens kötést alkot (11. ábra).



11. ábra A kovalensen kötött klorometil-kezon inhibitor (CMK) tetraédes konformációja az aktív helyen

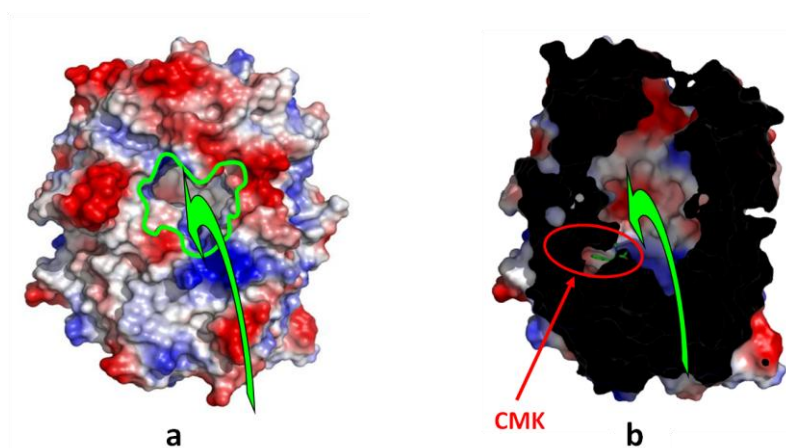
A klorometil-kezon (CMK-Phe-Gly-Gly-Z, szerkezeti képlet ld. 3. ábra) inhibitorból a CMK és az utána következő két aminosav látszik csak, a Z-védőcsoport egyáltalán nem, a glicin

pedig csak kevésbé volt látható az elektronsűrűségi térképen (11. ábra). Ennek a Z-Gly rész rendezetlensége lehet az oka, de az is lehetséges, hogy az inhibíció előtt lehasította az enzim. A két szerkezet ilyen nagymértékű hasonlósága arra utal, hogy az enzim egy előre formált aktív helyet tartalmaz (12. ábra).



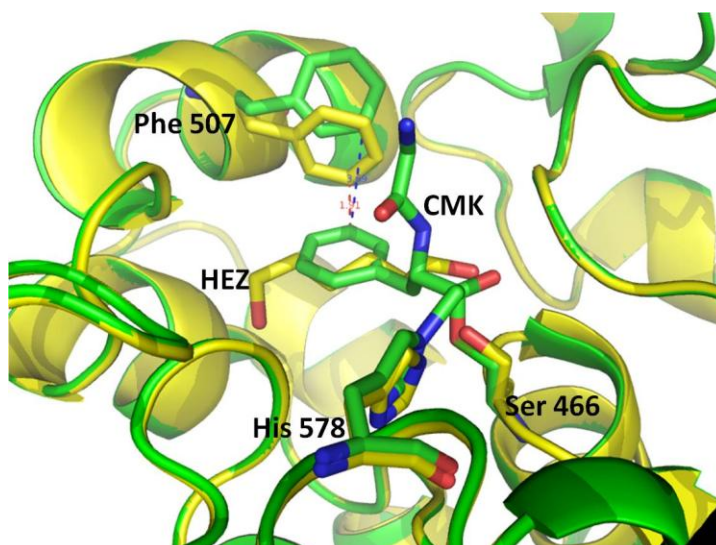
12. ábra A PhAAP-oldószer komplex és a PhAAP inhibitorral képezett szerkezetének összehasonlítása.
Sárga színnel ábrázolva a 1,6-hexándiol molekulát és zöld színnel ábrázolva a CMK kovalens inhibitort tartalmazó szerkezet

A szubsztrát kötés korai fázisának jobb megértéséhez vizsgáltuk a molekulafelszín töltéseloszlását is. A 13. ábrán látható a belépőnyílás közvetlen környezetét meghatározó kékkel jelölt pozitív polaritású felszín az üreg belsejében folytatódik. Ez valószínűleg a negatív töltésű C-terminálist vonzza maga felé, így megvalósulhat a szubsztrát megfelelő orientálódása már az enzimhez való kötődést megelőzően.



13. ábra A PhAAP molekuláris felszíne elektrosztatikus potenciál szerint színezve (kék:negatív, piros:pozitív)
a) a belépőkapu környéke b) bekarikázva pirossal az inhibitor elhelyezkedése az enzim "üregében" (metszeti kép)

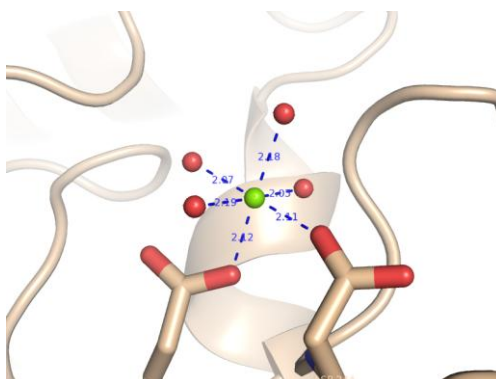
A szubsztrát analóg kötődésekor kisebb, indukált átrendeződést tapasztaltunk a Phe507 oldallánc konformációjában, ami elmozdult az inhibitorban található fenil-alanin gyűrű taszítása miatt (14. ábra).



14. ábra Konformáció változás az aktív helyen

Sárga színnel ábrázoltuk a hexándiolt (HEZ) tartalmazó, zöld színnel ábrázoltuk a kovalens inhibitor tartalmazó szerkezet

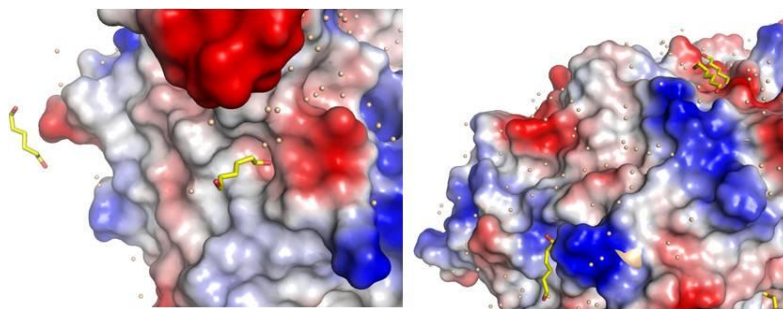
Azonosítottunk a szerkezetben öt magnézium iont, amik oktaédes elrendeződésben koordinálnak karboxil oldalláncú aminosavat (pl. két aszparaginsavat) és négy vízmolekulát (15. ábra). Ez előbbieknél fiziológiás jelentőségük is lehet – az emberi szervezetben előfordulnak ún. Mg^{2+} által aktivált enzimek. Ezeknél az enzimeknél a Mg^{2+} hozzákapcsolódik az enzimhez, így részt vesz a szerkezet stabilizálásában, ezáltal az enzim aktivitását befolyásolja [44]. A PhAAP-ra vonatkozóan eddig nem merült fel, hogy ilyen enzimről lenne szó, mindazonáltal érdekes, hogy a megfelelő enzimrokonság révén képes arra, hogy az oldószerben jelenlévő Mg^{2+} -ionokkal ilyen jellegű komplexet alkosson.



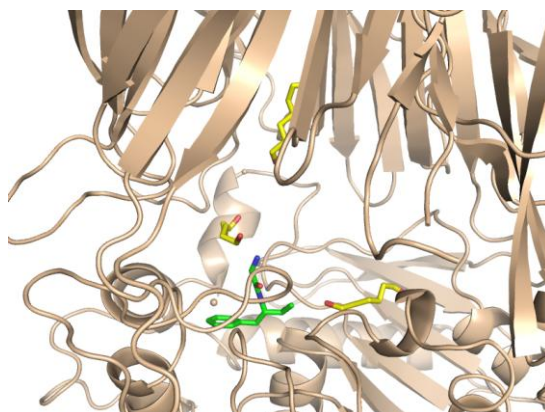
15. ábra Mg^{2+} ion oktaédes koordináció kialakítása a Asp244, a Glu263 és négy vízmolekula segítségével

Meghatároztunk tíz, az oldószerből a fehérje felszínén másodlagos kötésekkel stabilizálódott hexándiol molekula helyzetét is.

Ebből hét a molekula külső felszínén, kettő a hidroláz domén zsebében, egy pedig a propeller doménben a lapátok között kötődött meg (16., 17. ábra).



16. ábra A molekulafelszín közelében található 1,6-hexándiol molekulák (sárga színnel ábrázolva)



17. ábra Az enzim belsejében található 1,6-hexándiol molekulák (sárga színnel ábrázolva, zöld színnel a kovalens inhibitor)

4.3. A molekuladinamikai szimulációk eredményei

A számítás alapját az a kérdésfeltevés adta, hogy vajon a röntgenszerkezetben az aktív helynél megfigyelt oldószer molekula [21] rendelkezik-e szerkezetformáló hatással, vagy az előre formált, merev szerkezetű kötőhelyre kötött be.

A PhAAP enzim ligandummentes állapotára és az 1,6-hexándiollal képzett komplexére végeztünk molekuladinamikai szimulációkat. A PhAAP a természetben és kristályszerkezeteiben is hexamer. Kíváncsiak voltunk arra is, hogy a PhAAP-t a hexamerből oldatbeli dinamikáját monomerként vizsgálva milyen torzulások következnek be a szerkezetben, például változik-e az aktív hely konformációja.

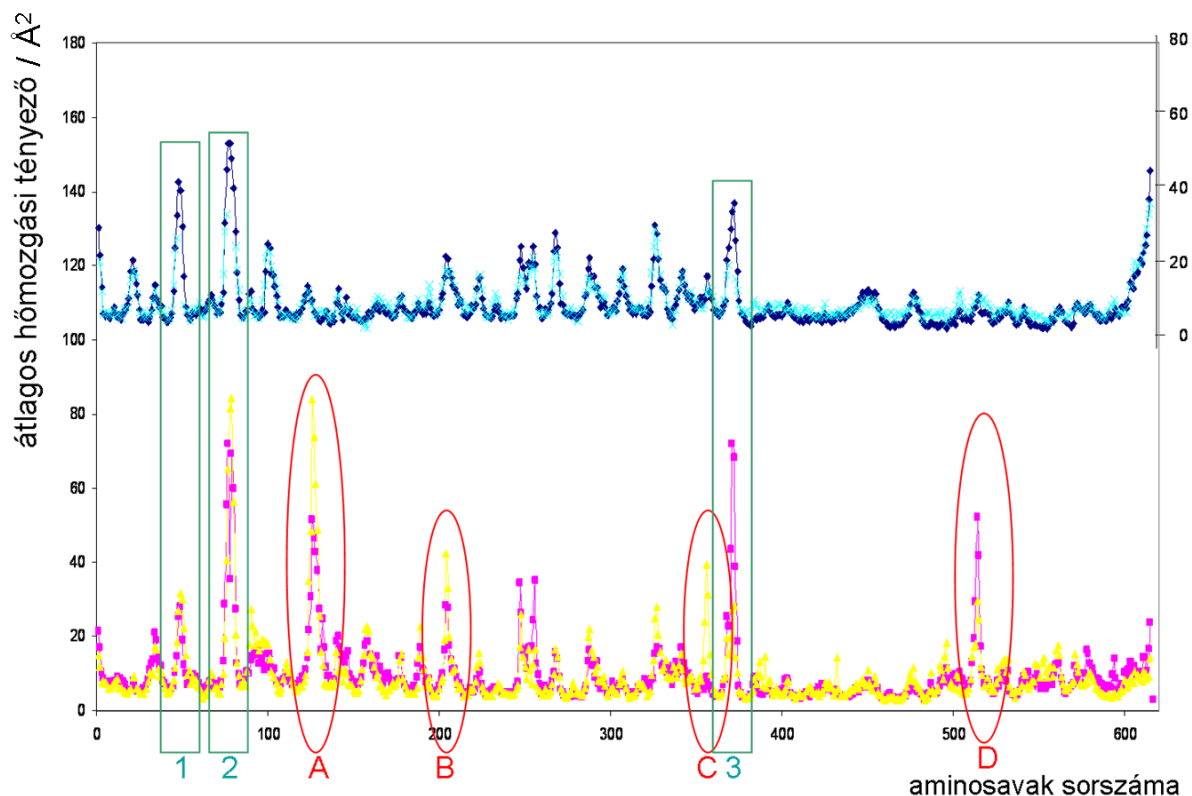
4.3.1. A ligandummentes és a komplexált állapotra vonatkozó eredmények összevetése

A számított trajektóriákból (a szimuláció időbeli lefutását jellemző függvényből) az egyensúlyi szakaszon átlagszerkezetet képeztünk, és ezen a modellen vizsgáltuk a fehérjemolekulán belüli egyes kisebb régiók mozgékonyágát (18. ábra, 3. táblázat).

Mindkét esetben tapasztaltuk, hogy azok a régiók rendelkeztek a legnagyobb hőmozgási tényezőkkel, amelyek a kristályszerkezetben is kevésbé jól definiált, mozgékony régiókat alkottak (18. ábrán rendre 1,2,3 számokkal jelölve a Glu51-Gly53, Glu80-Lys83, Lys373-Gly375). A két szerkezet közötti eltéréseket is tapasztaltunk, ezek olyan régiók, amelyek hexamer szerkezet kialakulásáért felelős kontaktusokban résztvevő aminosavak, valamint a 4. propeller lapát felső régiója (ami a propeller későbbi elmozdulására utal) alkotnak (18. ábrán rendre A-val, B-vel, C-vel, D-vel jelölve az Asp128-Phe133, Ile359, Asn207, Pro516-Asn519,). A mért és számított atomi mozgástényezők hasonlósága és a különbségek kézenfekvő magyarázata igazolja, hogy a szimulációk kielégítően leírják a vizsgált rendszer alapvető adottságait, így megfelelő modellt biztosítanak a molekuláris kölcsönhatások részletesebb elemzéséhez.

3. Táblázat Az átlagos hőmozgástényezők eltérésének és hasonlóságának értelmezése a röntgen és a dinamikai modellen

Egyezés		Eltérés	
1	Glu51-Gly53	A	Asp128-Phe133
2	Glu80-Lys83	B	Asp207
3	Lys373-Gly375	C	Ile359
		D	Pro516-Asn519



18. ábra Az egyes aminosavak hőmozgási tényezője (300K)

Kékkel ábrázolva a röntgenszerkezetek, világoskékkel a hexándiolt, sötétkékkel az inhibitort tartalmazó szerkezet, eltolva 100-zal a dinamikai modellekhez képest, saját y értékét ld. jobb oldali függőleges tengelyen. Rózsaszínnel ábrázolva az „üres”, sárgával ábrázolva a hexándiolt tartalmazó szerkezet molekuladinamikai modellje.

Fontos megfigyelni, hogy a PhAAP ligandummentes és az 1,6-hexándiollal képzett komplexének szimulációja jellegében igen hasonló atomi mozgástényező-eloszláshoz vezetett. A dinamikus sajátosságokon túl a két átlagszerkezet szerkezetileg is igen hasonló, a fehérjegerinc jól illeszthető egymáshoz: az illesztés után a gerincatomok helyzetének átlagos négyzetes eltérése az összes aminosavra 1,0 Å, a propeller doménre 1,1 Å, míg a konzerváltabb hidroláz doménre 0,9 Å (19. ábra).



19. ábra A molekuladinamikai szimulációval kapott átlagszerkezetek összehasonlítása
1,6-hexándiol-enzim komplex (sárga színnel ábrázolva) és a ligandummentes szerkezet (kék színnel ábrázolva)
összehasonlítása

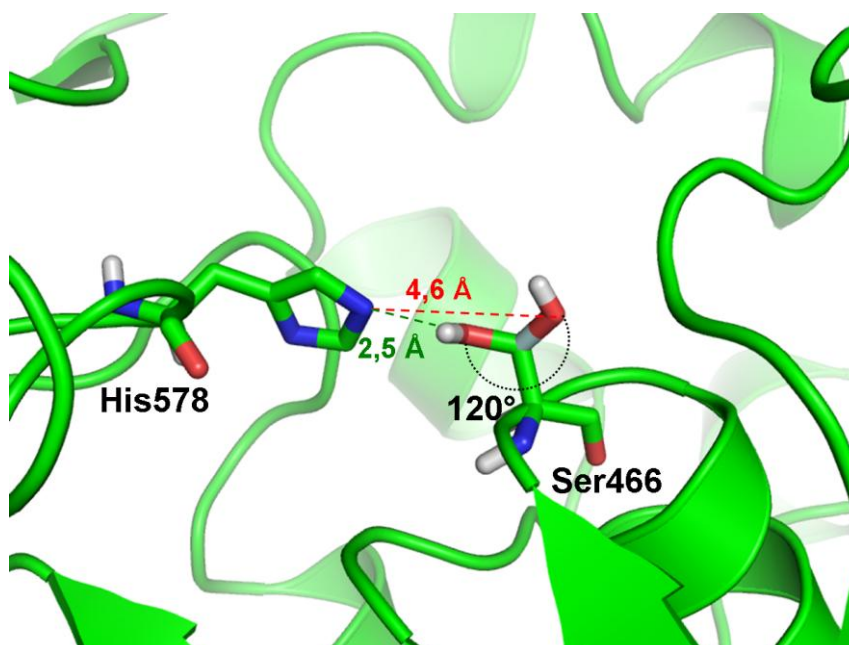
Míg a katalitikus reakció lejátszódásának előfeltétele a katalitikus triád aminosavai közötti két hidrogénkötés (Ser-His és His-Asp), mindkét szimulációban azt tapasztaltuk, hogy a szerin hidroxil-oxigénje (OG) és a hisztidin oldallánc nem protonált nitrogénje (NE2) H-híd kötő távolságon kívülre kerülnek egymástól (4. táblázat), a hisztidin oldallánc protonált nitrogénje (ND1) azonban szinte végig kapcsolatban marad a triád harmadik tagjával, az aszparaginsav OD2 oxigénjével.

4. táblázat A katalitikus triád karakterisztikus távolságai a PhAAP ligandummentes illetve az 1,6-hexándiollal képzett komplexének molekuladinamikai szimulációja alapján

A oszlop a távolságot (Å-ben), B oszlop azon szerkezetek arányát mutatja, melyekben az adott két atom közt H-híd formálódik. Pirossal jelölve a H-híd távolságon kívül, zölddel a H-híd távolságon belül és feketével a köztes távolságban található atomok

	„üres” szerkezet		1,6-hexándiol-komplex	
	A	B	A	B
Ser466 OG – His578 NE2	4,6 Å	0,2 %	4,0 Å	0,0 %
His578 ND1 – Asp546 OD1	3,4 Å	20,9 %	3,4 Å	12,7 %
His578 ND1 – Asp546 OD2	2,9 Å	96,1 %	2,9 Å	94,8 %
Ser466 OG – HEZ O1	-	-	4,5 Å	0,6 %
Ser497 OG – HEZ O6	-	-	2,9 Å	94,6 %
Arg548 O – HEZ O6	-	-	4,9 Å	0 %
Gly387 O – HEZ O1	-	-	2,9 Å	83,1 %

Az átlagszerkezetben azt is megfigyelhettük, hogy az aktív szerin, bár nincs H-hidas kapcsolatban a hisztidinnel, olyan konformációban található, amely a triád-beli aktív konformációnak természetes rotamere, így egy C-C kötés menti 120°-os fordulattal megfelelő közelségbe kerülhet (2,67 Å) a His578 gyűrűjéhez (20. ábra).



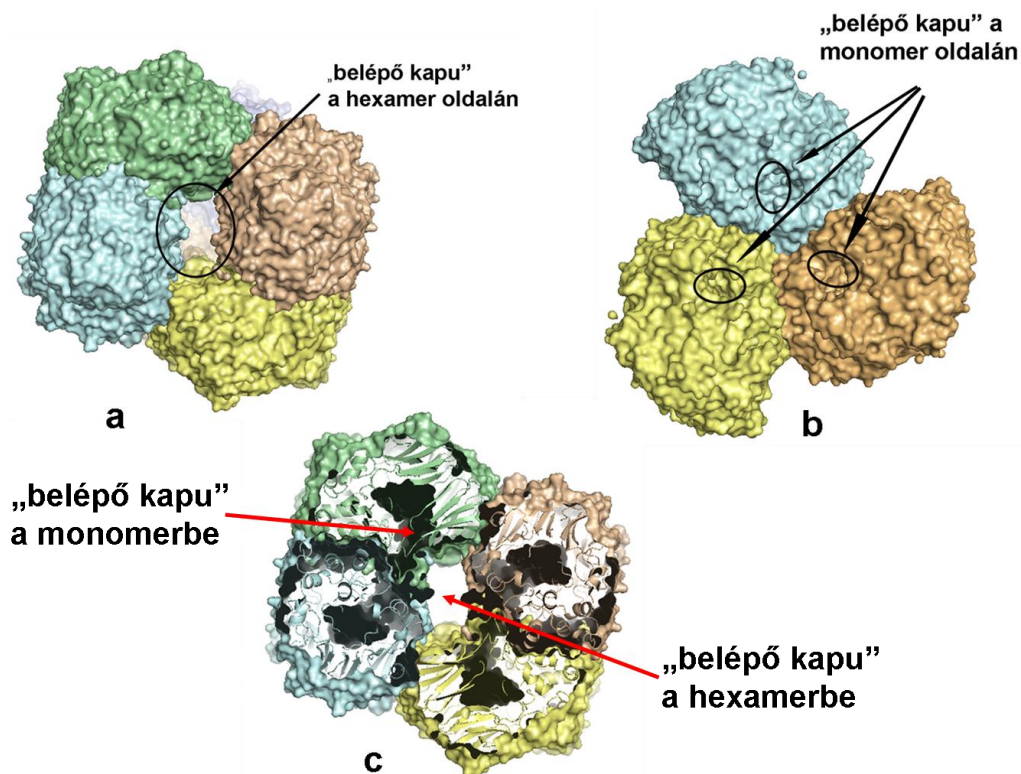
20. ábra Az "üres" átlagszerkezet aktív hely konformációja a Ser466 két megkülönböztetett rotamerével és az atomtávolságok (His NE2-Ser OG) feltüntetésével

A szerin oldallánc elmozdulását mindkét esetben a kiterjedtebb solvatációval lehet magyarázni. A katalitikus Ser466 és a His578 közé mindkét szimulációban beférkőzik egy vízmolekula, úgy mint az 1,6-hexándiollal képzett komplex szerkezetének vizsgálatakor a Ser oldallánc és a hexándiol molekula közé. A két domén közti üregben közel 100 vízmolekula található a szimuláció során (5. táblázat).

5. táblázat Az alacsony hőmozgás-tényezőjú vízmolekulák előfordulási valószínűsége hidrogénkötésben a katalitikus Ser és His aminosav oldalláncokkal (utolsó 2 ns)

ligandummentes szerkezet	van vízmolekula hidrogénkötésben	van vízmolekula mindkét aminosavval hidrogénkötésben
Ser466	91,6 %	22,4 %
His578	98,8 %	
1,6-hexándiol komplex		
Ser466	100 %	22,6 %
His578	81,9 %	

Megállapítottuk, hogy a szimuláció során a szerkezet végig „nyitott” konformációban van, vagyis a szubsztrát a két domén közti nyíláson keresztül szabadon hozzáférhetne az aktív helyhez. Az ApAAP esetében a nyitott szerkezetekben a katalitikus triád inaktív, hasításra képtelen állapotban van, az enzim emiatt nem tud nagyobb méretű fehérjéket elhasítani, amelyek csak az enzim nyitott állapotában férnének az aktív helyhez [18]. A PhAAP esetében a katalitikus aszparagin és hisztidin közötti kapcsolat nem szűnik meg, és a Ser466 is olyan konformációt vesz fel, ami lehetővé teszi, hogy be tudjon kapcsolódni a triádba, tehát könnyen össze tud „szerelődni” az aktív hely. A PhAAP esetében tehát a nem szubsztrát fehérjék és peptidek védelmét más mechanizmusnak kell biztosítania. Eredményeink szerint ez a hexamerizáció, amely két egyre szűkülő belépő nyíláson kényszeríti át a szubsztrátot (21. ábra).



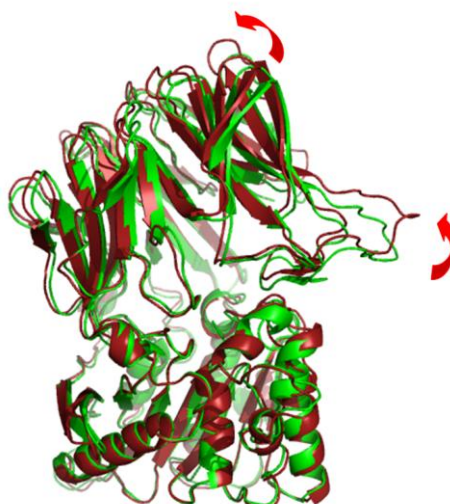
21. ábra A PhAAP-CMK rendszerben a hexamerizáció által kialakított csatornarendszer

- a) a hexamer oldalán található nyílás (mérete 10x30 Å)
- b) a monomerek oldalán található nyílások (mérete 10x20 Å) a hexamer belsejéből tekintve
- c) a csatornarendszer szemléltetése, a kétféle belépő nyílás elhelyezkedése egymáshoz képest

4.3.2. A szimulációval kapott oldatbeli szerkezetek összevetése a kristályszerkezetekkel

Az összehasonlításhoz rendelkezünk kellett egy megfelelően hosszabb szimulációval, esetünkben ennek a feltételnek az 1,6-hexándiol molekulát tartalmazó szerkezet tett eleget (15 ns). A további vizsgálatokhoz még hosszabb időintervallumon vizsgáljuk majd a modelleket (a ligandummentes szerkezetet is).

Ezen a modellen a meghosszabbított szimuláció utolsó szakaszában a solvatáció okozta általános relaxáció mellett, egyfajta nyílási folyamatot figyeltünk meg a propeller doménen (22. ábra). A hidroláz domén kristályszerkezetére valódi illesztése után a gerincatomok átlagos négyzetes eltérése a hidroláz és propeller doménre rendre 0,8 Å és 3,6 Å. Ez feltehetőleg azzal hozható összefüggésbe, hogy a molekuladinamika során monomer alakban vizsgáltuk a fehérje molekulát, a kristályos és biológiailag aktív formája azonban a hexamer.



22. ábra A domének közötti elmozdulás

Zöld színnel a kristályszerkezet, vörös színnel a molekuladinamikai szimulációból számított átlagszerkezet

A monomer és a hexamer szerkezetek globális konformációja közti különbségeket úgy foglalhatjuk össze, hogy a szimuláció során érvényesülő teljesebb solvatáció következtében fellazul a monomer szerkezete, a partnermolekulák távolléte pedig azt eredményezi, hogy a két domén közti üreg felnyílásra képessé válik. A hexamerizáció tehát nem pusztán a monomer oldali belépőnyílás „leárnyékolásáért”, hanem az optimális nyílásszög beállításáért is felelős.

Összefoglalás és kitekintés

A jelenleg folyó kutatások (ApAAP, PhAAP) arra a kérdésre keresik a választ, hogy milyen paraméterek befolyásolják az acilaminoacil-peptidáz enzimek szelektivitását. Az α/β domén szerkezetéből adódóan (hidroláz és propeller domén, közöttük viszonylag mozgékony összekötő szakasz) azt feltételeztük, hogy a sejtben az enzim előfordulhat „nyitott” illetve „csukott” formában is. De vajon mitől függ, hogy az egyik, vagy a másik, esetleg mindkét forma fordul-e elő?

A munkám során meghatározott PhAAP-inhibitor komplex térszerkezete jó közelítéssel megegyezett az aktív helyen 1,6-hexándiolt tartalmazó szerkezettel. Kivételt képezett egy az aktív helyhez közeli fenil-alanin (Phe507), amelynek gyűrűje elbillent, mert az inhibitor fenil-alaninjának nagyobb a térigénye a karcsú hexándiol molekulához képest.

A molekuladinamikai szimulációkkal igazoltuk, hogy az 1,6-hexándiol jelenléte nem okoz jelentős változást a ligandummentes állapothoz képest, így a két kristályszerkezet, az „üres” és a szubsztrát kötött állapot összehasonlításához alkalmazható. A két szerkezet nagyfokú hasonlósága arra utal, hogy az enzim előre formált aktív helyet tartalmaz, és az ApAAP enzim esetében tapasztaltakkal ellentétben nem mutat „nyitott-csukott” átalakulást szubsztrát kötődéskor. Ezek alapján valószínűsíthető, hogy a méretszelektivitásról az enzim oldalán található „belépőkapu”, illetve a hexamerizáció gondoskodik

Az oldatfázisú szimulációink kimutatták, hogy a katalitikus triád hidrogénkötés rendszere szubsztrátmentes állapotban általában nem teljes, de a szerin oldallánc elfordulásával könnyen helyreállítható. Lehetséges, hogy a szubsztrát megkötődésekor tolódik el ebbe az irányba a konformációs egyensúly. Ennek a hipotézisnek a vizsgálatára molekuladinamikai szimulációt tervezünk az enzim-szubsztrát komplexszel.

A molekuladinamikai szimulációból kapott modelleken megmutattuk, hogy a fehérje monomer alakban, nagymértékű solvatáció hatására mégis képes a felnyílásra (erre hexamer alakban nincs lehetősége a szoros kapcsolat miatt). Azonban ebben a felnyílt állapotban is könnyen aktiválható marad a katalitikus triád.

Összefoglalva, a *Pyrococcus horikoshii* acilaminoacil-peptidáz monomerének sajátos „nyitott” szerkezete az ApAAP-val szemben egy meglehetősen merev, a nyitott és a csukott szerkezet közötti átmeneti állapotban található. Míg az ApAAP dimerek a nyitott (inaktivált) és a csukott (aktív) formák dinamikus egyensúlyaként várják a szubsztrát érkezését a

PhAAP merev hexamer szerkezete komplex kettős „beléptető rendszert” hoz létre. Egy tágasabb nyílás található a monomer egységek között, amelyen áthaladva a szubsztrátnak még a monomer oldalán nyíló annak belsejébe vezető szűkebb csatornán is át kell haladnia.

Eddig még nem sikerült röntgenkristallográfiával eukarióta eredetű AAP-t vizsgálni, ezért a közeljövőben tervezzük a sertés eredetű acilaminoacil-peptidáz enzim kristályosítását és szerkezetének meghatározását.

Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Harmat Veronikának, aki lehetőséget adott arra, hogy a kutatási projektbe bekapcsolódjak, megtanított a röntgenkristallográfia alapjaira és hasznos tanácsokkal látott el a szerkezetépítés és finomítás során. Türelméért és az átadott tudásért hálával tartozom.

Köszönöm témavezetőmnek Dr. Karancsiné Menyhárd Dórának, akinek segítségével nem születhetett volna meg a dolgozat molekuladinamikai számításokkal foglalkozó részlete. Köszönöm a kitartást, lelkesedést és biztatást a reménytelen helyzetekben.

Köszönöm Dr. Perczel Andrásnak, amiért az MTA Fehérjemodellező Kutatócsoportban végezhettem a munkát.

Köszönettel tartozom a MTA Enzimológiai Intézetnek a fehérjék előállításáért (Polgár László professzor kutató csoportja).

Köszönöm Végh Ádámnak a Cyberlab kristályosító robot használatának ismertetését és felügyelését.

Köszönöm Orgován Zoltánnak az ApAAP párhuzamosan végzett vizsgálatát és a hasznos tanácsait a modellépítés során.

Végül köszönöm mindenkinek, akik segítettek, elviseltek és biztattak a kutatási illetve szövegalkotási fázisban.

Rövidítések

AAP: acilaminoacil-peptidáz

APH: acilpeptid-hidroláz, az acilaminoacil-peptidáz szinonimája

AAP: acilaminoacil-peptidáz

ApAAP: *Aeropyrum pernix* AAP

PhAAP: *Pyrococcus horikoshii* AAP

POP: prolil-oligopeptidáz

Hivatkozások

1. Perona, J.J., Craik, C.S., *Protein Sci.* **4**(3):337-60 (1995)
2. Di Cera, E., *IUBMB Life* **61**(5): 510–515 (2009)
3. Hollósi, M., Laczkó, I., Asbóth, B., *Biomolekuláris kémia I.* 238-251., Nemzeti Tankönyvkiadó (2005)
4. Naylor, S.L., Marshall, A., Hensel, C., Martinez, P.F., Holley, B., Sakaguchi, A.Y., *Genomics* **4**:355-360 (1989)
5. Erlandsson, R., Boldog, F., Persson, B., Zabarovsky, E.R., Allikmets, R.L., Sumegi, J., Klein, G.,Jornvall, H., *Oncogene* **6**:1293-5 (1991)
6. Yamin, R., Zhao, C., O'Connor, P.B., McKee, A.C., Abraham, C.R., *Mol. Neurodegen.* **4**:33 (2009)
7. Duysen, E.G., Li, B., Xie, W., Schopfer, L. M., Anderson, R. S., Broomfield, C.A., Lockbridge, J., *Pharmacol. Exp. Ther.* **299**:528-535 (2001)
8. Poulos, T.L., Alden, R.A., Freer, S.T., Birktoft, J.J. Kraut, J., *J. Biol. Chem.* **251**:1097-1103 (1976)
9. Bender, M.L., Gibian, M.J., Whelan, D.J., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **56**(3):833-9 (1966)
10. Hedstrom, L., *Chem. Rev.* **10**:4501-4523 (2002)
11. Rawlings, N.D., Polgar, L., Barrett, A.J., *Biochem. J.* **279**(3):907-8 (1991)

12. Polgar, L., *Cell. Mol. Life Sci.* **59**(2):349-62 (2002)
13. Kiss, A.L., Pallo, A., Naray-Szabo, G., Harmat, V., Polgar, L., *J. Struct. Biol.* **162**:312 (2008)
14. Scaloni, A., Jones, W.M., Pospischil, M., Scheewind, O., Popowicz, A., Bossa, F. et al., *J. Lab Chin. Med.* **120**:546-552 (1992)
15. Mitta, M., Asada, K., Uchimura, Y., Kimizuka, F., Kato, I., Sakiyama, F. et al., *J. Biochem.* **106**:548-551 (1989)
16. Kobayashi, K., Lin, L., Yeadon, J., Klickstein, L., Smith, J., *J. Biol. Chem.* **264**:8892-8899 (1989)
17. Polgar, L., *FEBS Lett.* **311**:281-281 (1992)
18. Harmat, V., Domokos, K., K. Menyhard, D., Pallo, A., Szeltner, Z., Szamosi, I., Beke-Somfai, T., Naray-Szabo, G., Polgar, L., *J. Biol. Chem.* **286**:1987-1998 (2011)
19. Bartlam, M., Wang, G., Yang, H., Gao, R., Zhao, X., Xie, G., Cao, S., Feng, Y., Rao, Z., *Structure*, **12**:1481-8 (2004)
20. Kiss, A.L., Hornung, B., Radi, K., Gengeliczki, Z., Sztaray, B., Juhasz, T., Szeltner, Z., Harmat, V., Polgar, L., *J. Mol. Biol.*, **368**:509-20 (2007)
21. Tichy-Racs, E.I., *Tudományos Diákköri Dolgozat*, ELTE Kémiai Intézet, Egy hexamer acilpeptid-hidroláz szerkezete, a méretszelektivitás újszerű módja, 14-21 (2009)
22. Richards, P.G., Johnson, M.K., Ray, D.E., *Mol. Pharmacol.* **58**:557-583 (2000)
23. Powers, J.C., Otake, S., Oleksyszyn, J., Hori, H., Ueda, T., Boduszek, B., Kam, C., *Agents Actions Suppl.* **42**:3-18 (1993)
24. Bocskei, Z., *Röntgendiffrakció (egyetemi jegyzet)*
25. Bergfors, T.M., *A Laboratory Manual, (International University Line, La Jolla,* (2002)
26. Kabsch, W., *J. Appl. Cryst.* **26**:795-800 (1993)

27. Collaborative Computational Project, Number 4., *Acta Cryst.* **D50**:760 (1994)
28. Unge, J., Mueller-Dieckmann, C., Panjikar, S., Tucker, P.A., Lamzin, V.S., Weiss, M.S., *Acta Crystallogr.* **D67**(Pt8):729-38 (2011)
29. Sheldrick, G.M., *Acta Cryst.* **A64**:112-122 (2008)
30. Ramachandran, G.N., Srinivasan, R., *Fourier Methods in Crystallography*, Wiley, New York (1970)
31. Oppenheim, A.I.V., *Proc. IEEE* **69**:529 (1980)
32. Emsley, P., Cowtan, K., *Acta Cryst.* **D60**:2126-2132 (2004)
33. Vagin, A.A., Dodson, E.J., *Acta Cryst.* **D53**:240-255 (1997)
34. Winn, M., Isupov, M., Murshudov, G.N., *Acta Cryst.* **D57**:122-133 (2001)
35. Laskowski, R.A., MacArthur, M.W., Moss, D.S., Thornton, J.M., *J. App. Cryst.* **26**:283 (1993)
36. MacKerel, A.D, et. al., *J. Phys. Chem.* **B102**:3586-3616 (1998)
37. Zimmerman, K., *J. Comp. Chem.* **12**:310–319 (1991)
38. Darden, T., York, D., Pedersen, L., *J. Chem. Phys.* **98**:10089–10092 (1993)
39. Essmann, U., Perera, L., Berkowitz, M.L., Darden, T., Lee, H., Pedersen, L.G., *J. Chem. Phys.* **103**:8577–8592 (1995)
40. Swope, W.C., Andersen, H.C., Berens, P.H., Wilson, K.R.A., *J. Chem. Phys.* **76**:637–649 (1982)
41. Nose, S.A., *Mol. Phys.* **52**:255–268 (1984)
42. Hoover, W.G., *Phys. Rev.* **A31**:1695–1697 (1985)
43. Berendsen, H.J.C., Postma, J.P.M., DiNola, A., Haak, J.R., *J. Chem. Phys.* **81**:3684–3690 (1984)
44. Varga, M., *Bioszervetlen kémia (egyetemi jegyzet)* 54-55., ELTE Eötvös Kiadó (2006)