

Kémleni a láthatatlant: építőelemek, foldamerek, peptidek és fehérjék

BODOR Andrea, FARKAS Viktor, HARMAT Veronika, JÁKLI Imre, KARANCSINÉ MENYHÁRD Dóra, STRÁNER Pál és PERCZEL András*

Eötvös Loránd Tudományegyetem, Kémiai Intézet, Fehérjemodellező Kutatócsoport, Szerkezeti Kémia és Biológia Laboratórium, Pázmány Péter sétány 1/A, 1117 Budapest, Magyarország.

Az MTA-ELTE Fehérjemodellező Kutatócsoport és a Szerkezeti Kémia és Biológia Laboratórium közös munkájának rövid bemutatása, az ott folyó kutatások sokrétűsége okán szép, ám összetett feladat. Közös gondolkodásunk és munkánk középpontjában a természetes poliamid rendszerek, közismert nevükön a polipeptidek és fehérjék állnak. Kutatási témáink gyakran teázás vagy borozás közben kezdődnek, mikor biológus vagy orvos kollégáink mesélnek egy érdekes jelenségről, egy örökletes betegség és egy azzal társítható fehérje működéséről. Mikor a probléma már kellően körvonalazott, akkor következnek a molekulamodellezési feladatok, majd a peptid, foldamer, fehérje szintézise vagy expressziója, majd tisztításuk. Ezután megkísérjük a „képalkotást” részben diffrakciós, részben spektroszkópiai (NMR, ECD, VCD, IR, stb.) módszerek bevetésével. Gyakran nem csak a „hogyan néz ki” kérdésre keressük a választ, hanem a 3D-téralkat belső dinamikáját, a különböző időskálákon történő mozgások lehető legpontosabb leírását is szeretnénk megadni. Néha elegendő egy, a részleteket mellőző összehasonlító vizsgálat is. Ám gyakran, „mivel az ördög a részletekben rejlik” csak hosszantartó, s a makromolekula atomi részleteit is feltáró vizsgálatok vezetnek megoldásra. Mint általában a kutatás, a miénk is egyfajta belső iteráció mentén finomodik, s a partnerekkel való konzultációk sora, újabb és újabb mutások és variációk előállítása vezet a keresett válasz felé. Ma már nem csak eredményesen működünk együtt több hazai és külföldi kutatócsoporttal, de komplex belső projekteken is dolgozunk. Ilyenkor a kérdésfelvetéstől az előzetes számolásokon és modellezéseken át, a preparatív, foldamer- és expressziós labor munkákon keresztül, a szerkezetvizsgálatig, a feladatok teljes sorát igyekszünk megoldani a csoporton belül. Míg korábban egyes ferrocének és heterociklusos fehérje konjugátumait és glikozidjait állítottuk elő és tanulmányoztuk, addig ma szénhidrát származékokból állítunk elő β -aminosavakat, s vizsgáljuk önmagukkal, valamint α -aminosavakkal alkotott poliamid rendszereiket. Az elmúlt évtizedben a szintetikus szerves kémia eszköztára nagyban gazdagodott és bővült. Ma már nem csak hogy enzimeket használunk a szerves laborban, de nem tekinthető igazi újdonságnak az sem, hogy kémikusok fehérjéket és peptideket bakteriális, vagy éppen feltárt sejtes rendszerek segítségével szintetizálnak.

Az élő rendszerek gyakran alkotnak „közösséget”, nincs ez másként az élet molekuláris alapjaiért felelős fehérjék esetében sem. A biokémiai folyamatok megértése és feltérképezése során elengedhetetlen tehát a résztvevő

fehérjék mellett azok ligandumainak, szabályzó partner-molekuláinak és kölcsönhatási hálózatainak atomi szintű feltérképezése. Az elmúlt évek során például több proteáz (kimotripsinek család tagjai, prolil-oligopeptidázok) és a hozzájuk kapcsolódó kismolekulák (szubsztrát vagy inhibitor), valamint ezen fehérjék között létrejövő kölcsönhatás részleteit vizsgáltuk. A proteázok nemcsak az említett kölcsönhatások tanulmányozásához kínálnak kiváló modellt, de fontos szerepet játszanak különböző életfolyamatok szabályozásában is, s így munkánk esetenként átvezet a racionális gyógyszertervezés területére. A fehérjék „születnek”, működnek, hatnak és szabályoznak, majd a kellő pillanatban lebomlanak, és a szervezetben újra hasznosulnak. Különösen izgalmas folyamat, a születő fehérje felterkedése, vagy a lebontást iniciáló denaturáció és aggregáció. A belső mozgás, dinamika, re- és denaturáció, illetve ezen utóbbi jelenséget kísérő aggregáció mélyebb megértése áll érdeklődésünk középpontjában. E vizsgálatokhoz állítunk elő speciális polipeptideket, foldamereket, valamint kis és nagyobb méretű fehérjéket.

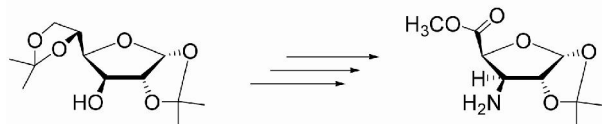
Az alábbiakban a teljesség igénye nélkül, egy-egy részfeladat bemutatásán keresztül adunk képet munkánkról, a vele járó sikerekről, kudarcokról, és intellektuális kihívásokról.

1. Manus facere: kémiai szintézis kézzel, géppel vagy sejtekkel

Hogy pontosan mennyi is az ismert molekulák száma, az attól függ, hogy ezt mikor kérdezzük (l. a <http://www.cas.org/> című honlapot). Ez a szám e cikk olvasása pillanatában már vélhetőleg meghaladja a 67 milliót! Mégis a szerves kémikus megszállottan keresi és szintetizálja - újabb reakciók, eszközök és rendszerek alkalmazásával - az újabb molekulákat. A szintetikus biológia hajnalán, amikor akár egy teljes bakteriális genomot is elő lehet állítani, a kémia egyik új és izgalmas területe a biomimetikus makromolekulák világa, s ezen belül is az úgynevezett foldamer-kémia. Ezen a területen végzett kutatásaink célja olyan vegyületek tervezése, szintézise és vizsgálata, melyek téralkata a fehérjék másodlagos szerkezeti elemeihez hasonlít, azok kémiai konstitúciója azonban eltér a természetes α -(L)-aminosavakból felépülő rendszerekétől. E vegyületszámok érdekessége, hogy bár bio-mimetikus és biodegradálható molekulák, az élő rendszerekben - a megfelelő hasító enzimek (proteázok) hiányában, - lényegesen tovább maradnak meg, mint a polipeptidek és fehérjék. A nemrég kialakított preparatív laboratóriumainkban elsősorban egyszerű monoszacharidokból kiindulva, hagyományos szerves kémiai szintetikus úton állítunk elő peptidkötésre

* email: perczel@chem.elte.hu

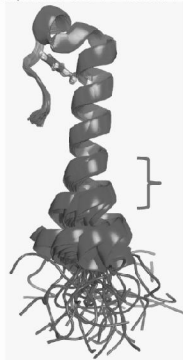
alkalmas β -aminosavakat, a már ismertebb gyűrűs β -aminosavak (pl. aminociklopentán-karbonsav) vízdoldható analógjait (1. ábra).



1. Ábra. Egyszerű cukrokból többlépéses szintézis során vízdoldható β -aminosavak állíthatók elő.

A Fülöp Ferenc és Martinek Tamás (Szegedi Tudományegyetem Gyógyszerkémiai Intézet) vezette kutatócsoport eredményei által inspirálva, hidrofíli és hidrofób β -aminosavak variálásával egyrészt önmagukban is érdekes téralkatú peptido-mimetikumokat szintetizálunk, másrészt felhasználjuk a tervezett foldamereket egyes polipeptidek és fehérjék térszerkezetének rögzítésére is. A Tóth Gáborral (Szegedi Tudományegyetem Orvosi Vegytani Intézet) és munkatársaival β -aminosav származékok felhasználásával, α/β hibrid-peptidek szintézisével, majd kémiai összekapcsolásával speciális biológiai aktivitású makromolekulákat szintetizálunk. Különösen izgalmas téma az Exenatid (Ex-4) – a II-típusú cukorbetegség gyógyítására használt, 39 aminosavból álló polipeptid pirossal kiemelt alegységének kicserélése a megfelelő foldamerre (2. ábra). A β -peptidrészlet beépítésétől az eredeti molekula helikális részletének a természetesnél merevebb formáját kívánjuk megalkotni, remélve ezzel az eredeti hatóanyag bioaktivitásának fokozását és lebomlásának lassítását. Ebben a konkrét esetben olyan specifikus, biológiailag aktív peptidet módosítunk, amely már bizonyítottan kiváló terápiás tulajdonságokkal rendelkezik. Itt jegyezzük meg, hogy az Ex-4 három másodlagos szerkezeti elemet tartalmaz: egy hosszabb α - és egy rövidebb 3_{10} -hélixet, valamint egy poliprolin-II C-terminális részt. Célunk hogy jobban megértsük az Ex-4 molekula kötődését a GLP1-receptorhoz, valamint az, hogy a kölcsönhatásban részt nem vevő fragmentumát merevebbé, ezáltal a lebontó enzimekkel szemben ellenállóbbá tegyük.

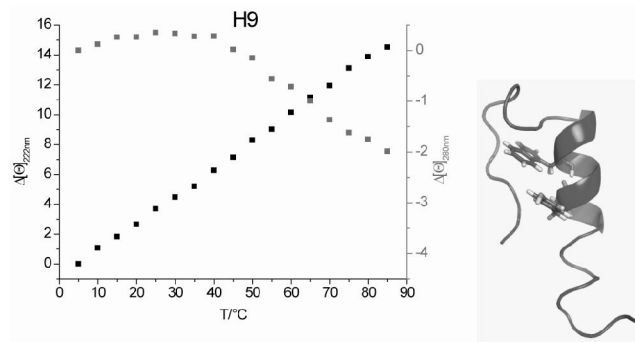
HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPS



2. Ábra. Az Ex-4 primer szekvenciája (fent) és a molekula oldaltáji (NMR-) térszerkezete (lent). Piros kapcsos zárójellel jelöltük a foldamerre cserélendő peptidszakaszt. A cserétől a molekula mozgékony részének stabilizálását, lebomlásának lassulását reméljük.

A szerkezetkutató már a szintetikus munka közben is a születendő molekula térszerkezetén, stabilitásán gondolkodik. Jó példa erre az előbb említett Ex-4 egyik analóg vegyülete, egy, a közeli UV-tartományban fontos

kromofór-párral rendelkező variánsa. Ez a tirozin és triptofán tartalmú fehérje jellegzetes téralkatát az emelkedő hőmérséklet hatására, sajátos módon veszíti el. Bár ez a fehérje igen kicsi, mégis a hidrofób magja (az ún. Trp-kalicka) a hőmérsékletemelésnek, akár 40°C-ig is eredményesen ellenáll (3. ábra).^{1,2} Ez azzal magyarázható, hogy a triptofánt körülvevő hidrofób partnerek együttműködésének köszönhetően a fehérje magja nagyobb hőstabilitást mutat, mint a kompakt α -helikális „rúd”. Ez utóbbi α -hélix, partner és védőfaktor hiányában, folyamatosan veszít stabilitásából, a hőmérséklet emelkedésével folyamatosan letekeredik. Mindezt látványosan jelzi az elektronikus cirkuláris dikroizmus (ECD) spektrum $n \rightarrow \pi^*$ (222 nm) intenzitásának lineáris csökkenése. Már ebből a viszonylag egyszerű kísérletből is kiolvasható, hogy az alkalmas molekuláriszerek (hidrofób aminosavak) kooperativitása mennyire eredményes lehet egy külső, kedvezőtlen behatás leküzdése céljából. Az együttműködés világos szelekciós előnnyel jár nem csak a molekuláriszerek, de az evolúció magasabb szintjén is, ahogy ezt Freund Tamás, a 2010-es Széchenyi-emlékestén mondott beszédében számos biológiai példa segítségével plasztikusan összegezte.



3. Ábra. A jobb oldalon látható minifehérje ECD spektrumában kiválasztott 2 sáv intenzitásának hőmérsékletfüggése. Az α -hélix $n \rightarrow \pi^*$ (222 nm, fekete négyzet) és a hidrofób magot felépítő Tyr $\leftrightarrow$ Trp oldalláncok (ábrán kiemelve) kölcsönhatására utaló (280 nm, piros négyzet) jelek intenzitásváltozása eltérő. Míg az α -hélix folyamatosan letekeredik, addig a hidrofób mag az 5-40°C-os tartományban eredményesen áll ellen a termikus denaturációnak, s csak ennél magasabb hőmérsékleten kezdődik a lassú szétesése.

Már több mint 5 éve hogy Nyitrai Lászlónak és munkatársainak köszönhetően (ELTE Biokémia Tanszék) kiépítettük a „Protex labort”, ahol polipeptideket és fehérjéket állítottunk elő élő *E. coli* sejtekben. Bár ilyen módon fehérjéket ma sok helyen expresszálnak az országban, a mi munkának érdekessége nem csak az, hogy ezt kémikusként egy kémiai intézetben tesszük, bővítve ezzel a szerves kémia eszköztárát, hanem az is, hogy alkalmas fúziós rendszerek kifejlesztését és optimalizálását követően akár rövidebb polipeptidek szintézise és (^{15}N , ^{13}C) izotópjelölése is megoldhatóvá vált. A prokarióta expressziós rendszerek alkalmazásának legfőbb előnye, hogy segítségükkel nagy mennyiségben termeltethetők fehérjék, a baktériumtörzsek fenntartása és a fehérjék izolálása könnyen kivitelezhető. Hátrányos viszont, hogy több eukarióta fehérje (membránfehérjék, receptorok, stb.) mérgezi az *E. coli* gazdasejtet. További nehézséget jelenet, hogy általában 40 aminosavnál rövidebb poliamidok önálló termeltetése nem lehetséges, mert az ilyen rövidebb peptidok „nem férnek el” a riboszómán, nem vesznek

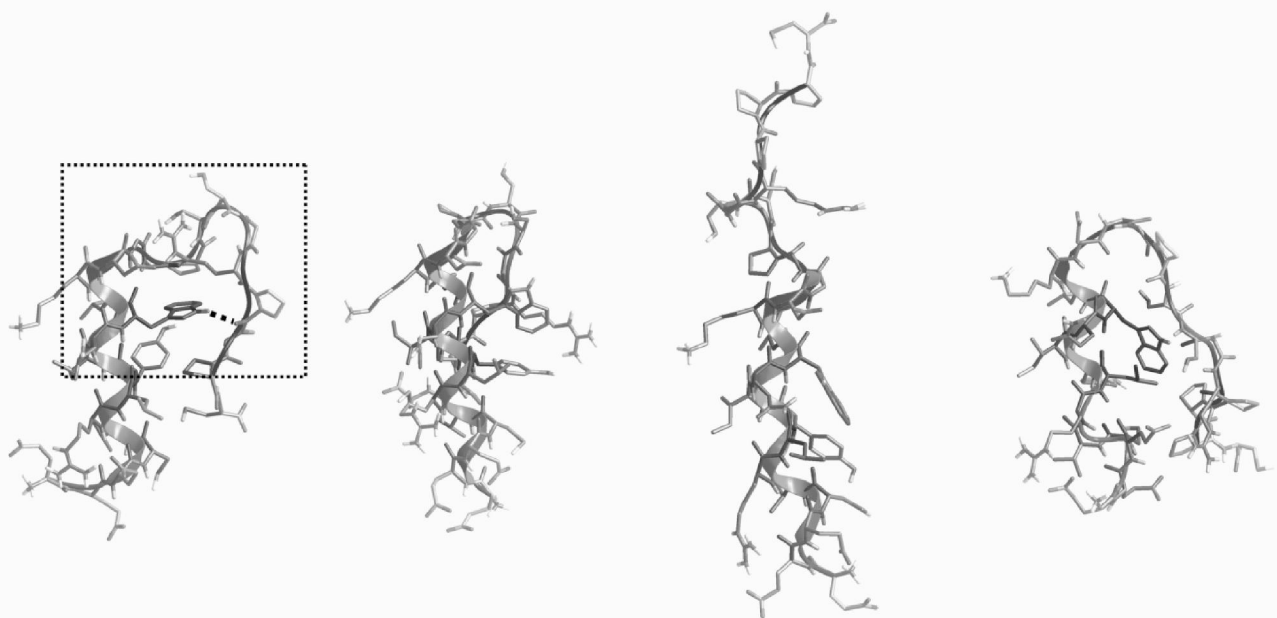
fel kellően kompakt téralkatot, s ezért a gyártó sejt saját fehérjebontó enzimei szinte születésük pillanatában le is bontják azokat. Az elmúlt években ilyen típusú molekulák előállításához fúziós rendszereket dolgoztunk ki, ahol a cél-peptidet összekötjük egy alkalmas segédfehérjével (pl. ubiquitin-nel), s a fúziós peptid-fehérje együttest kovalens kötéssel összekapcsolva fejezzük ki, majd izoláljuk. Később, egy alkalmasan beépített hasító helynek köszönhetően leválasztjuk a cél-peptidet a fúziós fehérjéről. Az expressziós laborunk most egészül ki egy speciális, nagyhatékonyságú kromatográfiás rendszerrel, amelynek köszönhetően spektroszkópiai tisztaságú makromolekulákat tudunk majd előállítani. A polipeptidek és minifehérjék biotechnológián alapuló szintézise tovább gazdagítja a Bruckner Győző által több mint 50 éve kezdeményezett, és a Medzihradszky Kálmán és munkatársai által nemzetközi szintre emelt fehérjekutatásokat az ELTE Szerves Kémiai Tanszékén.

Kutatócsoportunk egyik ígéretes projektje – a GLP-1 receptor és ligandumainak előállítása – szorosan összekapcsolja munkánkat a gyógyszerkutatással. E munkánk során a II-es típusú cukorbetegség egy lehetséges gyógyszer-célpontjaként ismert Glucagon-like-Peptide-1 receptorát és alkalmas(?) 20-39 aminosav tagszámú ligandumait fejezzük ki és vizsgáljuk *in vitro* kölcsönhatásukat, ligandum kötésük atomi részleteit. Bár a receptor-ligandum kötődés vizsgálatához elegendő a GLP-1 receptor extracelluláris doménjének bakteriális kifejeztetése, tehát nem szükséges a teljes transzmembrán fehérje (>500 aminosav) előállítása, most legfőbb gondunk a 6 ciszteint tartalmazó fehérje helyes feltekeredési körülményeinek meghatározása.

2. In silico számítások segítik kísérleti munkánkat

A csoportunkban folyó kísérleti munka segítése-, értelmezése- és kiegészítéseként, molekulamodellzési feladatokat, adatbányászatot, programfejlesztéseket és alkalmazott kvantumkémia számításokat végzünk. Az adott elméleti szinten megvalósított modellezések alkalmasak a kísérletileg nehezen kezelhető régiók, (mozgékony hurkok), a pontmutációk, a pH és hőmérsékleti változások, vagy kémiai módosítások szerkezeti hatásának előrejelzésére. Az enzimkatalizált folyamatok jobb megértése végett *in silico* meghatározhatjuk szubsztrát vagy inhibitor molekulák elhelyezkedését az aktív helyen, és kötődésük részleteit vizsgálhatjuk. A következőkben példákat adunk a molekulamodellzés és az alkalmazott kvantumkémiai hasznosságáról, majd az adatbányászás és módszerfejlesztések előnyeit mutatjuk be röviden.

Molekuladinamikai (MD) szimuláció módszerével tanulmányozzuk a már fent említett GLP-1 analógok hőstabilitását, illetve a korábban ismertetett ECD mérések során kimutatott, hőmérsékleti érzékenységükben tapasztalható különbségeket (4. ábra). MD számításaink rámutattak arra, hogy hol található ezen peptid legstabilabb régiói, illetve hogy a helikális rész középső szakasza, valamint az N-terminális régió által kialakított „Trp-kalicka” miként és milyen körülmények között tekeredik le. Ezen szimulációk eredményeit használjuk fel az újabb mutánsok tervezése során, s bár az MD számítások nem helyettesítik az NMR méréseket, mégis segítenek a helyes mutánsok és variánsok körének megválasztásában.

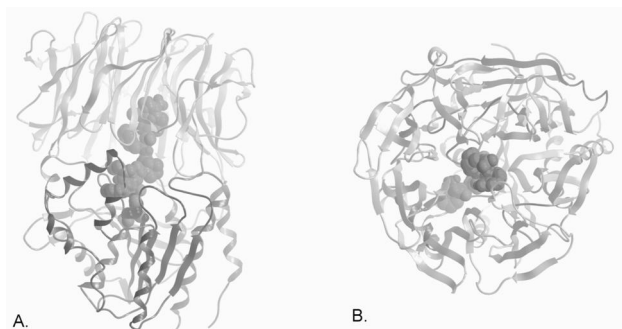


4. Ábra. Egy MD szimulációval követett GLP-1 analóg molekula magas hőmérsékleten történő szerkezeti destabilizációjának állomásai. A baloldali képen bekeretezett Trp-kalicka még intakt, stabilitásáért a központi Trp oldalláncát körülvevő hidrofób aminosavak, valamint speciális H-híd a felelősek. Jobbra a már részlegesen vagy teljesen kitekeredett téralkatokat láthatjuk.

Röntgendiffrakciós módszerrel meghatároztuk egy oligopeptidáz enzim kovalensen kötődő inhibitorával képzett komplexének térszerkezetét.³ A kovalensen kötődő inhibitor az enzimreakció közti termékének analógja. A molekulamodellzés eszköztárát és a meghatározott

kristályszerkezetet felhasználva felépítettük az enzim aktív helyén a szubsztrát-kötött állapotot, amely a hasítás előtti állapot modellje, a teljes, 7 aminosav hosszúságú szubsztrátot is tartalmazza. Az elrendeződést Monte Carlo Multiple Minimum módszerrel (a peptid torziós szögeknek

véletlenszerű megváltoztatásával majd a kapott szerkezetek energia minimalizációjával) optimaltunk, és a legalacsonyabb energiájú elrendeződés stabilitását molekuladinamikai szimulációval vizsgáltuk (5. ábra). A számítások eredményei szerint a szubsztrát N-terminusával a hidroláz doménen található katalitikus triád közelében kötődik meg (mint az a kristályszerkezetből is kiderült). A peptidlánc pedig a méretszelekcióért felelős propeller domén központi csatornájaiba fűződik be. Az általunk meghatározott komplex szerkezete arra utal, hogy a kis méretű ligandum a propeller domén csatornáján keresztül közelíti meg az eltemetett aktív helyet, valamint analizálhatóvá tette, hogy mely aminosavak felelősek az enzim specifitásáért, és hogy milyen típusú szintetikus ligandumok lennének az enzim hatékony inhibitorai.

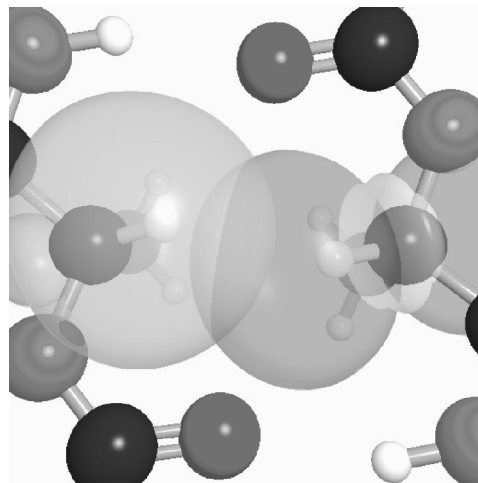


5. Ábra. Az *Aeropyrum pernix*-ből származó acilpeptid hidroláz szubsztrát-kötött állapotának modellje oldalnézetben (A) és felülnézetben (B). Sötétebb lila a katalitikus Ser oldalláncot (zöld) tartalmazó hidroláz domén, míg világosabb színnel a propeller domént jelöltük. A világoskék színnel ábrázolt peptid szubsztrát a propeller domén központi csatornájának belsejében helyezkedik el.

Számos neurodegeneratív betegség kialakulása a peptidek aggregációja során létrejövő ún. amiloid szerkezetű plakkok jelenlétéhez köthető, melyekhez hasonló jellegű aggregátummá a legtöbb fehérje átalakulhat, függetlenül azok primer szekvenciájától. Ezen aggregátumokban szereplő amiloid szerkezetek β -redőzött rétegeket tartalmaznak.^{4,5} Ezen a téren vizsgálataink kétféle forrásból származó eredményekből táplálkoznak. Egyrészt β -szálak elméleti (MD és QM) számításain keresztül feltérképezzük ennek a fontos másodlagos szerkezeti elemnek a belső energiaviszonyait, különös tekintettel a peptidláncok között működő kölcsönhatásokra. Másrészt több adatbázist és automata adatkezelő rendszert hoztunk létre fehérje szerkezeti adatbázisokból (pl. Protein Data Bank) a vizsgált molekuláris környezet minél nagyobb és változatosabb adathalmazzal való lefedése céljából.⁶

Hogy közelebb kerülhessünk az aggregációs folyamatok hajtóerejének megértéséhez, kvantumkémiai (QM) módszerekkel vizsgáltuk kisebb modell peptidek átalakulását, az amiloidra jellemző β -redős szerkezetté. Kiszámítottuk különböző termodinamikai függvények (entalpia, entrópia, illetve szabadentalpia) változását az aggregátumok létrejötté során, majd általánosítottuk a számítási módszert nagyobb rendszerekre.⁷ Az antiparallel redő esetében rezgési analízist végeztünk a dimerizációs folyamatra és azt találtuk, hogy a csökkenő entrópiát a dimerben újonnan létrejövő rezgések kompenzálják. A redők kialakulásakor fellépő szabadentalpia változás minden esetben negatív, így a kialakuló amiloid szerkezet stabilnak adódik. A jelenséget

a természetes kötőpályák (natural bond orbitals, NBO) segítségével szemléltettük (6. ábra).

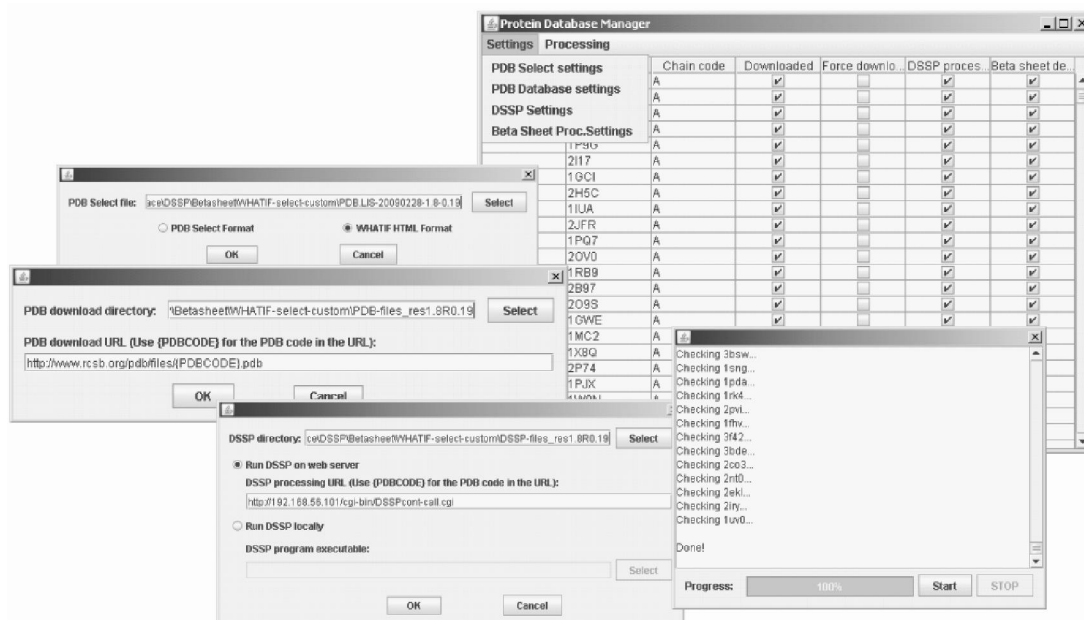


6. Ábra. A szomszédos β -szálak között kialakuló (C-H) (kék) * (C-H) vonzó és taszító kölcsönhatás szemléltetése NBO analízis segítségével.

Az elvégzett kvantumkémiai számítások magyarázatot adnak a fehérjék amiloid szerkezeteinek kialakulására, illetve az aggregációs folyamatok termodinamikai hajtóerejét sikerült minden kétséget kizáróan ab initio módszerekkel igazolnunk. Eredményeinket felhasználva következtetni lehet hasonló, kiterjedtebb rendszerek stabilitására, illetve az ezek disszociációjához szükséges befektetendő energia nagyságrendjére így növelve az aggregáció visszaszorításának esélyét.

Felépítettük a β -redőzött rétegekben egymás mellett futó polipeptid szálakban az egymással közvetlen szomszédságban, és bizonyos geometriai elrendeződés esetén hidrogénkötésben lévő aminosavak (7. ábra) adatbázisát. Ennek folyamatos karbantartását az adatok összegyűjtésétől a másodlagos szerkezetek szűrésén át a statisztikai elemzésekig automatikusan elvégzi az általunk kifejlesztett keretrendszer.

A létrehozott szerkezeti adatbázisokat számos területen felhasználhatjuk. Ezek közül a legjelentősebb a β -edőzött réteg szerkezetekben annak megállapítása volt, hogy β -szálak esetén mely aminosavak kerülnek gyakrabban egymás szomszédságába. A nagyobb adatbázisnak köszönhetően a korábbi elemzéseket ki tudtuk terjeszteni az aminosav oldalláncok állásának a pár-preferenciákra gyakorolt hatására is. A β -redőzött réteg szerkezetekben leggyakrabban előforduló aminosavakból (Gly, Ala, Val, Ser) felépített modellvegyületekre végzett kvantumkémiai számításokból kiderült, hogy az oldallánc állásának jelentős hatása van a szerkezet stabilizációs energiájára, ez összhangban van a szerkezeti adatbázisokból nyert adatokkal. Eredményeink felhasználásával mód nyílik a β -kanyar és β -redőzött rétegek stabilitásának és aggregációs hajlamának becslésére, ezáltal e szerkezetek tervezésére. Adatbázisaink másik fontos felhasználási területe a β -redős szerkezetek csavarodásának és meghajlásának elemzése. Az Århus University-vel együttműködésben kvantumkémiai módszerekkel vizsgáltunk poly-Gly, poly-Ala és poly-Val modelleket. Összehasonlítottuk az aminosav összetétel, a lánc hossz és a kiralitás hatását az adatbázisból kapott adatokkal



7. Ábra. A béta redőzött rendszerek aminosav-párjainak adatbázisát karbantartó keretrendszer.

különböző szintű számítások esetén. Megállapítottuk, hogy a csavarodás mértéke és a peptid gerinc konformációja szigorúan összefügg és ezt csak kis mértékben befolyásolja az aminosav oldalláncának milyensége vagy a kiralitása L- vagy D-volta. A ténylegesen megfigyelt csavarodás mértékét a potenciális energia felszínén található lokális minimumok helye határozza meg. Vizsgálataink során a „csavarodás” fogalmát kiterjesztettük a teljes Ramachandran térképre és ezzel a fehérje feltekeredtségére jellemző, egydimenziós mérőszámot kaptunk, amelynek reményeink szerint a különböző foldamerek leírásában fogjuk használni.

3. A szóródott röntgensugár nyomában: fehérjekrisztallográfia

Az ELTE Kémiai Intézetben Náray-Szabó Gábor és Böcskei Zsolt vezetésével 1993-ban kezdődtek meg a fehérjekrisztallográfiai kutatások, amikor az első térdetektoros röntgen-diffraktométert üzembe helyezték. A laboratóriumban 2009 óta Rigaku R-AXIS IV++ típusú készülék működik az MTA-ELTE Fehérjemodellező Kutatócsoport irányítása alatt. A laboratórium részét képezi egy felszerelt kristályosító labor, mely kiegészül egy elsősorban oktatási célokat szolgáló kristályosító robottal. A laboratórium célja a hazai kutatócsoportok fehérjekrisztallográfiai igényeinek kiszolgálása együttműködésben végzett kutatások keretében, mérési idő biztosítása és tanácsadás, valamint a leendő krisztallográfusok elméleti és gyakorlati képzése. Ennek a célnak a kiteljesítését elősegítendő 2011-ben a BME Biostruct Laborral és a KKI Röntgendiffrakciós Laborral együtt létrehoztunk egy nyitott szerveződést a hazai infrastruktúra megosztása és használatának széles körű elterjesztése céljából.

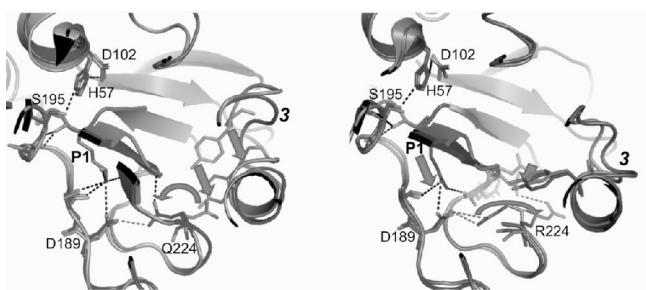
Kutatásaink során szerin proteázok esetén vizsgáltuk az enzimműködés mechanizmusát és szabályozását, kismolekulás és fehérje inhibitorokkal való kölcsönhatásaikat. Bekapcsolódtunk emellett más fehérjék

(kalmodulin, dUTPáz, dinein könnyűlánc) szerkezet/funkció összefüggéseinek feltárásába is a fehérje/fehérje és fehérje/kismolekulás ligandum kölcsönhatások jellemzésével. Együttműködő partnereink az MTA Enzimológiai Intézet több kutatócsoportjának és az ELTE Biokémiai Tanszékének munkatársai.

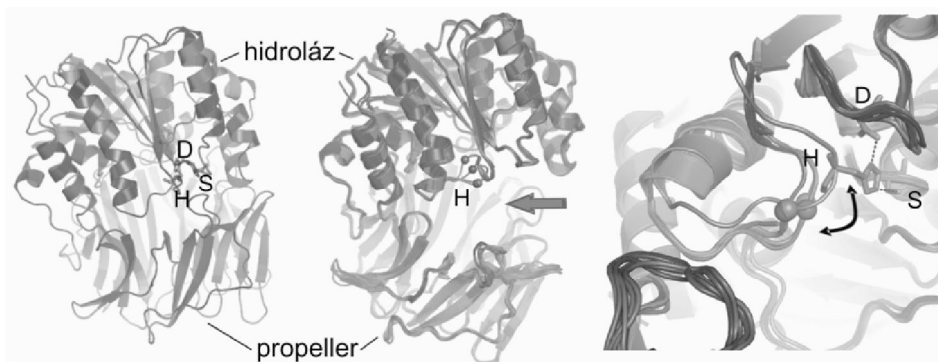
Egyik fő kutatási területünk, az MTA Enzimológiai Intézetében Závodszy Péterrel és Gál Péterrel együtt a komplement rendszer aktiválás első fázisában részt vevő enzimek vizsgálata. A komplement rendszer a veleszületett immunitás fontos részét képezi, működésének célja a szervezetbe került kórokozók és károsodott saját sejtek eltávolítása egy enzim kaszkádszisztéma segítségével. Rendellenes aktiválódása súlyos szövetszövetkárosodáshoz vezethet (gyulladásos és autoimmun folyamatok), ezért a különböző aktiválódási utak megismerése és szelektív gátlásának kidolgozása gyakorlati jelentőséggel is bír. Az aktiválódás klasszikus és lektin útjának első enzimatis lépései a homológ, moduláris felépítésű szerin proteázok autoaktiválódása, valamint a kaszkád következő tagjának aktiválása. A katalízisért a kimotripszin-szerű szerin proteáz domén felelős.

A lektin út enzimeit, a MASP-1 és a MASP-2 a kaszkád elindításában betöltött szerepének vizsgálata céljából MASP-1- és MASP-2-specifikus fehérje inhibitorokat fejlesztettek ki SGPI kanonikus tripszin inhibitor vázon Pál Gábor (ELTE Biokémiai Tanszék) közreműködésével, amelyekkel bizonyították, hogy a MASP-1 a MASP-2 fiziológiás aktivátora⁸. Meghatároztuk a komplexátlatlan enzimek szerkezetét, majd az enzim/inhibitor komplexek (MASP-2/SGMI-2 és MASP-1/SGMI-1) szerkezetvizsgálatával a specifitás szerkezeti hátterét derítettük fel Fodor Krisztiánnal (EMBL-Hamburg) együttműködésben. Magyarázatot kaptunk arra is, hogyan járul hozzá az S1/P1 kölcsönhatás az inhibitor specifitáshoz (az SGMI-2 esetén arginin és lizin kötődése is kedvező, míg SGMI-1 esetén csak az arginint tartalmazó variánsok gátolják az enzimet). A MASP-2 esetén az inhibitor kötődése nagyobb mértékű

konformáció változással járt, ami különösen a 3 hurokrégiót, és az inhibitor ezzel kölcsönható szakaszát érintette. A 3 hurokrégió elmozdulása allosztérikusan, a Gln224 oldallánc közvetítésével érinti az S1 zsebet is, megőrizve azt a lehetőséget, hogy a P1 helyzetű arginin és lizin oldallánc egyaránt kedvező kölcsönhatásokat alakíthasson ki. A MASP-1 esetén a 224. helyzetű arginin oldallánc az Asp189 aminosavval sóhidat alakít ki és verseng az inhibitor P1 aminosavjával, ezért a hosszabb oldalláncú és erősebb kölcsönhatást létesítő, P1 helyzetű arginin kötődése kedvező, a liziné nem.



8. Ábra. A szubsztrát specifikációs zseb környezetének átrendeződése a MASP-2/SGMI-2 (balra) és MASP-1/SGMI-1 (jobbra) komplexekben. A szabad enzim szürke, a komplex zöld/világoskék, az inhibitor narancs/lila, az aminosavakat a kimotripszin számozás szerint jelöltük. A MASP-2 esetén az inhibitor kötődésekor a 3 hurokrégió lefelé mozdul el, ennek következtében térbeli okok miatt a Gln224 befordul, és a zseb H-híd rendszerében vesz részt (l. a sárga nyilakat az ábrák alsó részén). A megfelelő Arg224 a szabad MASP-1-ben ebben a zseb felé fordult konformációban van. Az inhibitor P1 arginin oldalláncja verseng vele az Asp189 sóhíddal, így az inhibitor kötődés korra kifordul.



9. Ábra. Az *A. pernix* acilpeptid hidroláz nyitott és csukott konformációjú szerkezetei. Színezés mozgékonyág szerint, piros: mozgékony, kék: merev; a katalitikus triád aminosavait S, H, D jelöli; a hisztidin helyét a nyitott szerkezetekben gömb jelzi. Balra: több kristályforma összevetésével egyféle csukott és egyféle nyitott globális konformációt találtunk. A nyitott formában a propeller domén eltávolodásával a hisztidin hordozó hurok mozgékonyvá válik, és a szerkezetekben különböző konformációt is felvehet. Jobbra: nagyított kép az aktív helyről. A csukott szerkezet az intakt katalitikus triáddal szürke, a nyitott szerkezetek mozgékonyág szerint vannak színezve.

4. A spinek „bevilágítanak” akár egy egész fehérjét

Az ELTE Természettudományi Karán működő NMR spektroszkópiai laboratórium három készüléknek ad otthont és összeköti munkánkat a Kémiai Intézet munkatársaival, Rohonczy János és Csámpai Antal kollégákkal. Az Avance 250, a DRX 500 illetve az Avance III 700 típusú Bruker (10. ábra) készülékek számos mérőfejjel vannak felszerelve, melyek a mindennapi gyakorlatban leginkább előforduló ^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{19}F , ^{31}P mérések mellett a tanulmányozott kémiai, biológiai rendszertől függően 10 más, ritkábban kiaknázott NMR aktív magok mérését is lehetővé teszik. Ezek közé sorolható például a ^{17}O , ^{27}Al , ^{29}Si , ^{51}V , ^{111}Cd , ^{195}Pt . Mindezek hűen tükrözik, hogy szerteágazó kémiai, biológiai kérdésekre lehet keresni a válaszokat.

Egy másik szerin proteáz család, a szerin oligopeptidázok vizsgálatát több mint egy évtizede végezzük Polgár László (MTA Enzimológiai Intézet) meghatározó közreműködésével. A katalízis és specificitás mellett egy további érdekes kérdés, hogy hogyan jut be a szubsztrát az aktív helyre a szerin oligopeptidázokban. Ezek csak oligopeptideket képesek elhasítani, nagyobb fehérjéket nem, ugyanis az aktív helyük a propeller és hidroláz doménjük közötti üregben helyezkedik el. Az aktív hely a család egyes képviselői esetén (pl. dipeptidil peptidáz IV) egy oldalsó nyíláson keresztül hozzáférhető a szubsztrát számára, míg másoknál (pl. prolil oligopeptidáz, acilpeptid hidroláz) az aktív enzim szerkezete zárt ⁹. Az acilpeptid hidroláz vizsgálata során olyan kristályformát sikerült előállítanunk, amelyben együtt van jelen az enzim csukott, formája, amelyben a katalitikus hely aktív konformációban van, és a nyitott forma, amelyben a két domén szétnyílt. A nyitott formában jelenlévő oldalbejáraton keresztül az aktív hely hozzáférhető a szubsztrát molekula számára, azonban a katalitikus triád középső tagját tartalmazó hurok destabilizálódott és elmozdult, elvesztvén a propeller doménnel alkotott kölcsönhatásait, tehát ebben az állapotban az enzim inaktív (9. ábra). A méretszelekció tehát azáltal valósul meg, hogy nyitott állapotban, amikor nagyobb fehérjék is hozzáférhetnének az aktív helyhez, az enzim katalitikusan inaktív, aktív állapotban pedig az enzim ürege korlátozza a szubsztrát méretét. A két állapot közötti átmenet elképzelhető szubsztrát-indukált módon vagy konformációs szelekció szerint is. Az, hogy a szabad enzim nyitott és csukott állapotban is megfigyelhető, az utóbbi mechanizmusra utal.

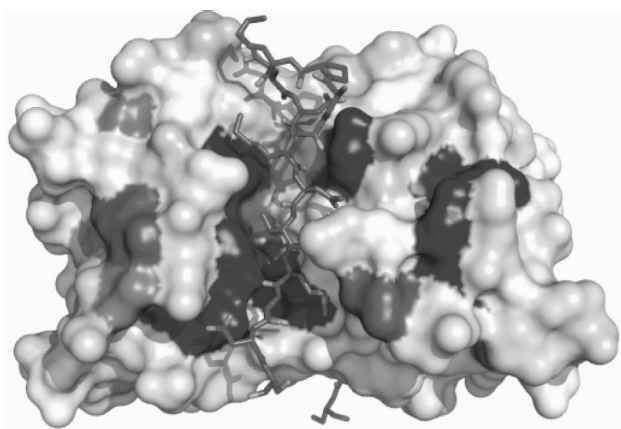
Szerkezetkutató laboratóriumunk egyik fő kutatási irányvonalát a fehérjék oldatfázisú szerkezetvizsgálata, dinamikus tulajdonságaik feltérképezése jelenti. Kisebb rendszerek esetén a természetes izotóparány adta érzékenység kiaknázása is elégséges lehet, ám nagyobb méretű fehérjék esetében szükség van ^{15}N , $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$, vagy akár $^2\text{D}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ izotópjelölésre. Ahogy arra már korábban utaltunk, a fehérje expressziós laboratórium beüzemelésének egyik hajtóereje éppen a költséges izotópjelölés házon belüli megoldása volt. Mindezek tükrében a fehérjék viselkedéséről az NMR spektroszkópia számos igen hasznos információt szolgáltat. A térszerkezet meghatározás feladata mellett gyakran fontos a peptid gerinc belső mozgásának jellemzése, az úgynevezett dinamikai paraméterek meghatározása is. A



10. Ábra. A 700 MHz-es NMR spektrométer és hasznos kellékei.

fehérje – ligandum (hatóanyag vagy gyógyszermolekula) kölcsönhatásának mikéntje, az atomi részletek meghatározása kiemelten fontos feladat, miközben nem csak az egyensúlyi komplex, de az enzimreakciók kinetikájának követése, a mechanizmus útvonalak feltérképezése is lehetővé válik a korszerű NMR spektroszkópiának köszönhetően. Paradox módon a rendezetlen (IDP, IUP) fehérjék szerkezeti jellemzése is megoldható ügyes NMR-es kísérletek segítségével, és meg kell említeni azt is, hogy előszeretettel végzünk úgynevezett in-cell NMR méréseket, amikor a kiszemelt fehérje téralkatára, kölcsönható partnereire nem izolált hanem élő sejt körülmények közepette lehet következtetni. Alább ízelítőt adunk néhány fehérjecsalád kapcsán végzett NMR-es munkánkból.

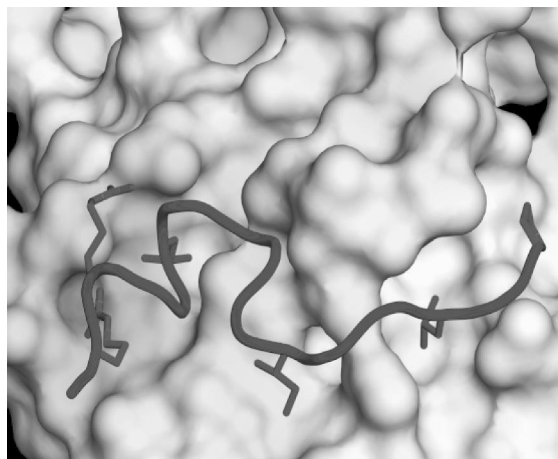
A motorfehérjék közé sorolható homodimer dinein téralkatát, Nyitrai Lászlóval (ELTE Biokémiai Tanszék) közösen vizsgáltuk,¹¹ szabad állapotában valamint egy rendezetlen miozin lánc fragmensével együtt (II. ábra). Jellemeztük a rendezetlen fragmenst mind szabad, mind kötött állapotában. Megállapítottuk a kötődéskor képződő béta redő jelenlétét, s kimutattuk a fehérje és peptid oldaláról is a kötőhely atomi jellemzőit.



11. Ábra. A dinein kölcsönhatása rendezetlen miozin láncsal (zöld színnel jelölve).

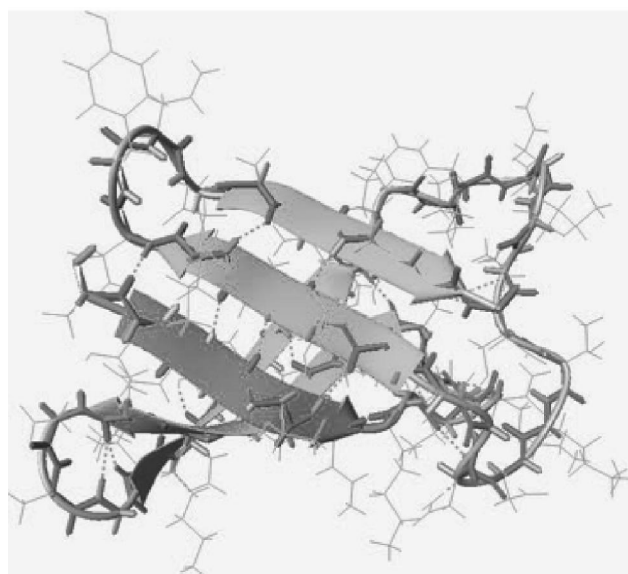
Reményi Attila (ELTE Biokémiai Tanszék) javaslatára vizsgáltuk a MAPK kinázokkal kölcsönható lineáris motívumokat (12. ábra). Az esetenként 15-25 aminosavból álló peptid fragmensek teljes multinukleáris NMR jellemzését végeztük el. Ez által rendezetlenségi

paramétereket határoztunk meg vizes oldatban és 8 mol/dm³ karbamid denaturáló közegben. Célunk a kölcsönhatás feltérképezése mellett a kinázok regulációs működési mechanizmusának mélyebb megértése.



12. Ábra. MAPK kinázokkal kölcsönható lineáris peptidlánc.

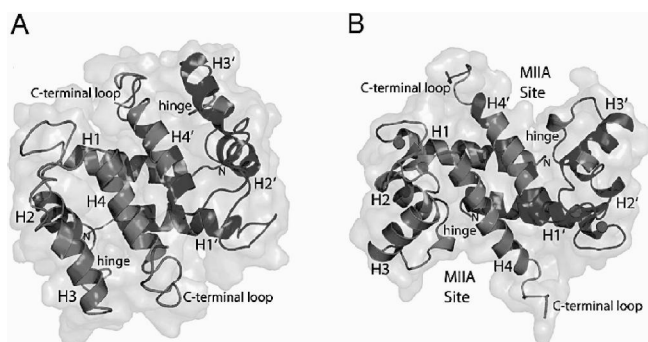
Batta Gyula (Debreceni Egyetem, Szerves Kémiai Tanszék) kollégánkkal relaxáció diszperziós méréseket végeztünk az antifungális PAF fehérjén (13. ábra), amely molekula 55 aminosavból épül fel, mégis komplex diszulfidhíd jellemzőket mutat. Megállapítottuk, hogy e fehérje esetében csak viszonylag magas hőmérsékleten jellemző a lassú (mili-, mikro-szekundumos) időskálájú mozgás.¹²



13. Ábra. Az antifungális PAF fehérje.

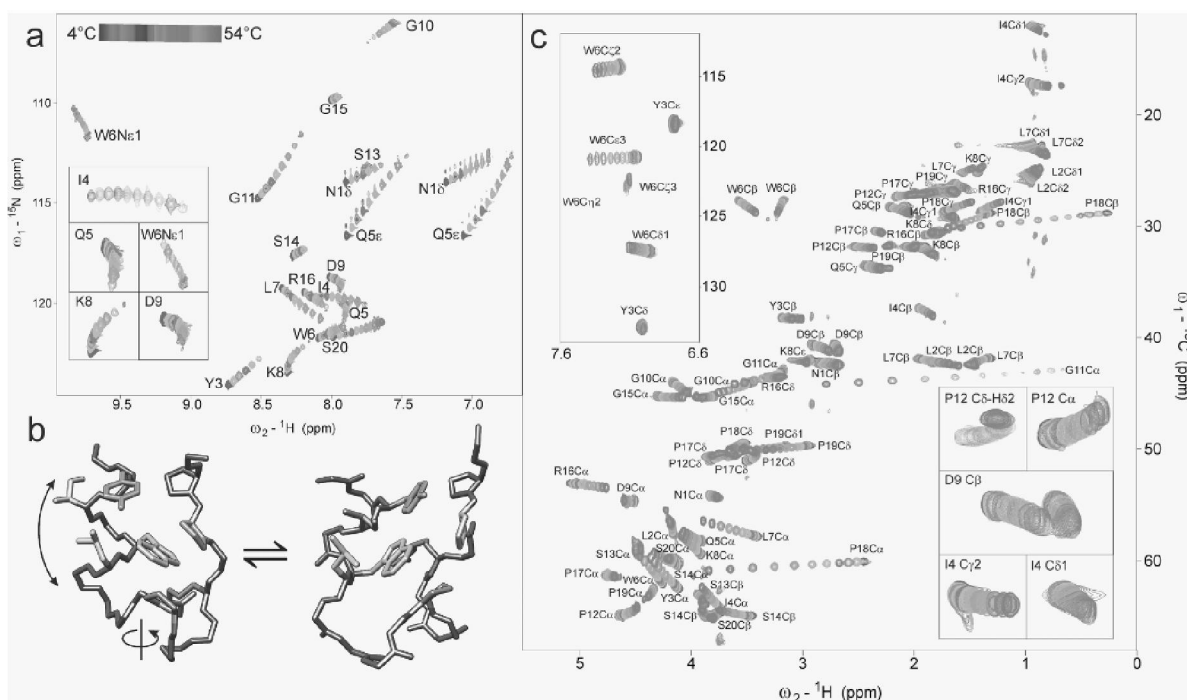
Nyitrai Lászlóval (ELTE Biokémiai Intézet) közösen vizsgáltuk az S100A homodimer fehérje Ca²⁺ kötő képességét. NMR mérésekre alapozva megállapítottuk, hogy a fehérje 2:1 arányú komplexet képez egy 45 aminosav hosszú miozin láncsal. Megfigyeltük, hogy a két fehérje kötődése során a szimmetria megbomlik (l. 14. ábra).

Végül de nem utolsósorban érdemes megemlíteni hogy a modern nagytérerejű NMR készülékek, valamint a biotechnológiai módszerek ötvözésének köszönhetően lehetőség nyílik ma már akár kisebb fehérjék



14. Ábra. Az S100A homodimer fehérje modellje.

állapotváltozásának (pl. termikus denaturáció, koncentráció kiváltotta aggregáció, stb.) atomi szinten történő nyomon követésére. A beépített izotópoknak (^{15}N , ^{13}C , ^2H) és a gyors pulzusszekvenciák hálója, értékes információ gyűjthető akár néhány 100 μl mennyiségű (50-100 μM -os) minta esetén, mindössze néhány perc leforgása alatt. A már korábban említett Trp-kalitka, minifehérje esetében (15. ábra) ez azt jelenti például, hogy megfigyelve egyes NMR-jelek hőmérsékletfüggését úgynevezett diszkrét „letekeredési állapotokat” (folding intermediate) azonosíthatunk és jellemezhetünk, jobban megértve ezzel a bioaktív makromolekulák szerkezet-hatás-dinamika összefüggéseit.¹³



15. Ábra. Egy „Trp-kalitka” fehérje hődenaturációjának nyomon követése heteronukleáris korrelációs NMR spektrumok segítségével.

5. Kitekintés

A molekuláris szemlélet ma már meghatározó szerepet játszik a biológiában. A modern preparatív, műszeres és modellezési módszerek fejlődése lehetővé teszi, hogy az elemi életfolyamatokat megismerjük a molekulák szintjén, értelmezzük, és ennek alapján akár tervezzük is. Ez a megközelítés döntő szerepet játszik a modern gyógyszerkutatásban is, sokszínű laboratóriumunkkal ezt igyekszünk szolgálni. Csoportunk egymással állandó kölcsönhatásban álló, jelentősen különböző kísérleti technikákat magas szinten alkalmazó tagjai képesek arra, hogy ezeket együttesen alkalmazva egy-egy téma kutatásában a hazai és nemzetközi igényeknek megfelelő eredményeket érjenek el.

Köszönetnyilvánítás

Perczel András, mint a csoport vezetője köszöni korábbi munkatársainak és hallgatóinak, valamint a képen látható összes személynek a kitartó és eredményes munkát. Köszönet a hazai (OTKA, MTA TKI, TAMOP, stb.) és külföldi (FP7, Wellcom Trust, ICGEB, stb.) támogatásokért.

Hivatkozások

- Hudáky, P.; Stráner, P.; Farkas, V.; Váradi, G.; Tóth, G.; Perczel, A. *Biochemistry* **2008**, 47, 1007-1016.
- Rovó, P.; Farkas, V.; Hegyi, O.; Szolomajer-Csikós, O.; Tóth, G.K.; Perczel, A. *Journal of Peptide Science* **2011**, 17, 610-619.
- Szeltner, Z.; Kiss, A.L.; Domonkos, K.; Harmat, V.; Náray-Szabó, G.; Polgár, L. *Biochimica et Biophysica Acta* **2009**, 1794, 1204-1210.
- Pohl, G.; Beke, T.; Csizmadia, I.G.; Perczel, A. *Journal of Physical Chemistry B* **2010**, 114, 9338-9348.
- Beke-Somfai, T.; Perczel, A. *Journal of Physical Chemistry Letters* **2010**, 1, 1341-1345.
- Perczel, A.; Gáspári, Z.; Csizmadia, I.G. *Journal of Computational Chemistry* **2005**, 26, 1155-1168.
- Perczel, A.; Hudáky, P.; Pálfi, V.K. *Journal of the American Chemical Society* **2007**, 129, 14959-14965.
- Dobó, J.; Harmat, V.; Beinrohr, L.; Sebestyén, E.; Závodszy, P.; Gál, P. *The Journal of Immunology* **2009**, 183, 1207-1214.
- Kiss, A.L.; Palló, A.; Náray-Szabó, G.; Harmat, V.; Polgár, L. *Journal of Structural Biology* **2008**, 162, 312-323.
- Gyimesi, M.; Kintses, B.; Bodor, A.; Perczel, A.; Fischer, S.; Bagshaw, C.R.; Málnási-Csizmadia, A. *Journal of Biological Chemistry* **2008**, 283, 8153-8163.



16. Ábra. Az MTA-ELTE Fehérjemodellező Kutatócsoport és a Kémiai Intézet Szerkezeti Kémia és Biológia Laboratóriumának tagjai és diákjai (nyár 2011).

11. Hódi, Z.; Németh, A.; Kovács, E.; Hetényi, C.; Bodor, A.; Perczel, A.; Nyitray, L. *FEBS Journal* **2005**, 272, 335-335.
12. Gáspári, Z.; Várnai, P.; Szappanos, B.; Perczel, A. *Current Protein & Peptide Sciences* **2010**, 11, 515-522.
13. Rovó, P.; Stráner, P.; Láng, A.; Bartha, I.; Huszár, K.; Nyitray, L.; Perczel, A. *Chem Eur J*, **2012**, nyomdában.

Observing the invisible, foldamers and structural building blocks of peptides and proteins

Among biomolecules, proteins fulfill the most diverse roles in a cellular system. Recent advances in X-ray diffraction techniques, NMR-spectroscopy and computational advances made possible to characterize both their structure and internal motion, on a wide range of time-scale. Beside their 3D structures and dynamics it is

fundamental to understand their biological activity coupled to its physical chemical properties. A brief introduction is provided on how protein structure and motion can be captured and analyzed. Our most recent results associated with chemical synthesis as well as bacterial expression of polypeptides, foldamers and proteins are described here. *In silico* methods (MM, MD, QM, *ab initio*, functionals etc.) are widely used in our Protein Modeling Research Group (HAS-ELTE) to describe various aspects of polypeptide structure and stability. X-ray diffraction methods resulted in structural information on larger proteins (e.g. Acylaminoacyl peptidase) are discussed in details. Finally, our most recent bioNMR spectroscopy related studies are spelled out. The detailed research summary of the Laboratory of Structural Chemistry and Biology is concluded by an outlook, focusing on how various molecular systems of biological importance could be studied to understand more on their Dynamics-Structure-Activity Relationships.