

HUMÁN TRIPSZIN 4: BETEKINTÉS A SZERIN PROTEÁZ AKTIVÁCIÓ ÉS KATALÍZIS MOLEKULÁRIS VILÁGÁBA

Doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

Gombos Linda

Eötvös Loránd Tudományegyetem Természettudományi Kar Biológia Doktori Iskola

Iskolavezető: Dr. Erdei Anna

Szerkezeti Biokémia Doktori Program

Programvezető: Dr. Gráf László

Témavezetők:

Dr. Szilágyi László, egyetemi docens

Dr. Gráf László, egyetemi tanár



Eötvös Loránd Tudományegyetem Természettudományi Kar Biológiai Intézet

Biokémiai Tanszék

Budapest, 2008

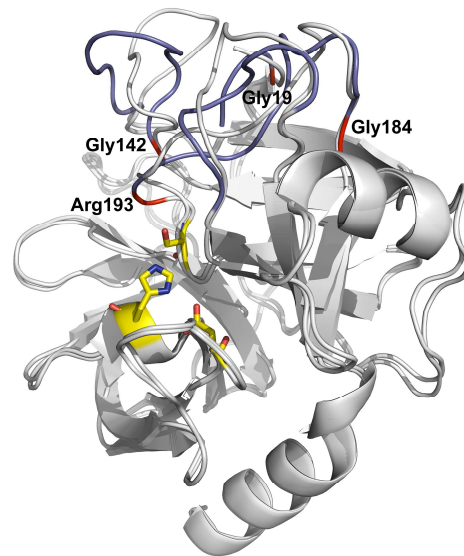
BEVEZETÉS

A tripszin a szerin proteázok S1 családjának, a legnagyobb proteáz családnak tipikus képviselője. A tripszinszerű szerin proteázok számos különböző organizmusban jelen vannak — baktériumokban, gombákban és állatokban is —, és az evolúció során a legkülönbözőbb specializált feladatok elvégzésére szakosodtak olyan alapvető élettani folyamatokban, mint a hemosztázis, immunvédekezés, jelátvitel, apoptózis, reprodukció, fejlődés és differenciálódás. Az S1 családról és általánosságban a szerin proteázokról való ismereteink azonban nagyrészt a tripszin tanulmányozásán alapulnak.

Több mint száz évvel a tripszin első leírását követően fedeztek fel egy különleges tripszint, melyet ma humán tripszin 4-nek nevezünk. Ez az enzim számos tulajdonságában eltér más tripszinektől: Egyedülálló a genomiális elhelyezkedése, és nem rendelkezik felismerhető szignálszekvenciával. Aktivitása rövid, szintetikus szubsztrátokon kismértékben különbözik más tripszinekétől, nagyméretű, fehérjetermészetű szubsztrátokon ellenben drasztikus a különbség. A humán tripszin 4 sem autoaktivációra nem képes, sem más zimogéneket nem aktivál. A kanonikus

inhibitorokkal szemben rezisztens, illetve hasítja őket. Mindezen különbségek egyetlen konzervált glicin argininre történt cseréjére vezethetők vissza a 193-as pozícióban, amint ezt az enzim atomi szerkezetének tanulmányozása és mutagenézis vizsgálatok is megerősítették.

A szerin proteázok szerkezetét általában katalitikus, szubsztrátkötő és zimogén aktivációs részekre osztják. A 193-as pozíció azonban különleges módon mindhárom strukturális elemnek tagja. A szerin proteázok a peptidkötést két lépésben, acil-transzfer mechanizmussal hasítják, melynek során egy szerin hidroxilcsoportja intéz nukleofil támadást a hasítandó peptidkötés ellen. A 193-as aminosav és a katalitikus szerin főlánc amid csoportjai egy pozitív töltésű zsebet (oxianion lyuk) hoznak létre, amely aktiválja a hasadó kötés karbonil csoportját, illetve stabilizálja a tetraédres átmeneti állapot során létrejövő oxianion negatív töltését. A 193-as aminosav az S2' szubsztrátkötő zsebek is része, valamint



A humán tripszin 4 és a szarvasmarha tripszinogén egymásra illesztett szerkezete. A humán tripszin 4 aktivációs domén szegmenseit kék szín jelöli, a katalitikus triád elemei sárga színűek. A 19, 142, 184 és 193-as csuklópozíciókat piros szín jelzi.

a zimogén aktivációs domén egyik fontos csuklópántja is. A tripszinszerű szerin proteázok sajátos aktivációs mechanizmussal rendelkeznek, melynek során a zimogén egy rendezetlen doménje (aktivációs domén) rendezett szerkezetet nyer. E folyamat során az aktivációs domén szegmensei erősen konzervált glicin csuklópontok körül fordulnak el, melyek egyike a 193-as aminosav.

A humán tripszin 4 élettani szerepe máig tisztázatlan. A pankreatikus forma szerepet játszhat a táplálékban található inhibitorok lebontásában. A humán tripszin 4 azonban főképp a hasnyálmirigyen kívül termelődik, jellemzően az agyban és hámsejtekben. Az agyi forma részt vehet jelátviteli folyamatokban proteáz aktivált receptorok (PAR) agonistájaként, valamint különböző neurodegeneratív betegségek kialakulásában, mint a multiplex szklerózis és az Alzheimer-kór.

CÉLKITŰZÉSEK

Munkám során a szerin proteázok katalízisének, szubsztrátkötésének és aktivációjának összefüggéseit vizsgáltam a humán tripszin 4 példáján. Az alábbi konkrét kérdésekre kerestem a választ:

1. A humán tripszin 4 kristályszerkezete és az arginin/glicin csere tisztázta a 193-as arginin szerepét az enzim különleges tulajdonságainak meghatározásában. Nem adott azonban választ arra a kérdésre, hogy vajon a nyújtott pozícióban elhelyezkedő arginin nagy mérete által kiváltott szterikus gátlás vagy a szubsztrátkötő helyre bevitt pozitív töltés elektrosztatikus hatása az elsődleges. Ezzel szoros összefüggésben felmerült egy állatmodell használatának lehetősége a humán tripszin 4 élettani szerepének tisztázásához. Ez az izoforma ugyanis kizárólag főemlősökben található meg, és egyetlen más tripszin sem ismert, amely a 193-as pozícióban arginint tartalmazna. Ismertek azonban patkány, illetve egér tripszinek, melyek ebben a helyzetben egy másik nagyméretű aminosavat, tirozint tartalmaznak. Léteznek továbbá kígyóméregből izolált trombinszerű enzimek is, melyek a 193-as pozícióban glicin helyett arginint, fenilalanint, illetve ciszteint tartalmaznak. Az arginint, illetve fenilalanint tartalmazó formák a humán tripszin 4-hez hasonlóan inhibitor rezisztensnek bizonyultak.

Ezért célul tűztem ki a 193-as pozícióban tirozint, valamint fenilalanint tartalmazó tripszin mutánsok előállítását és kinetikai viselkedésének összehasonlítását a 193-as glicint, illetve arginint tartalmazó formákkal különböző szubsztrátokkal és inhibitorokkal szemben.

2. Munkám célja volt továbbá a glicin/arginin csere hatásának részletes elemzése kisméretű kromogén/fluorogén szubsztrátokon. Egyrészt protonleltár méréseket végeztem, amely a hidrogénhidaknak a katalitikus ciklus során bekövetkező változásairól ad felvilágosítást, másrészt gyorskinetikai módszerrel részletesen jellemeztem a glicint, illetve arginint tartalmazó formák katalitikus mechanizmusát 4-metilumbelliferil 4-guanidinobenzoát (MUGB) szubsztrátanalógon.

3. Ugyancsak munkám célja volt a zimogén aktivációt kísérő konformációváltozás tanulmányozása. Célul tűztem ki, hogy az aktivációs domén csuklópántjai körüli flexibilitás csökkentésének hatását vizsgáljam mind a zimogén/aktív konformációs átmenetre, mind a katalízisre. Ehhez az egyes csuklóglicineket alaninra cseréltem, és megvizsgáltam, hogy ez a perturbáció milyen hatással van az aktív forma aktivációs doménjének szerkezetére, illetve a katalitikus mechanizmusra. A kérdés nem csak a szerin proteázok működése szempontjából fontos, hanem a fehérjeműködés általános aspektusaiba is betekintést nyújthat, mivel az aktivációs domén csuklópánt glicinjeihez igen hasonló működésű konzervált glicinek más fehérjékben, pl. nátrium és kálium csatornáknak is megtalálhatók.

ALKALMAZOTT MÓDSZEREK

Mutagenézis és klónozás: A kívánt mutációkat megaprimer mutagenézissel vittük be a humán tripszin 1 és 4, valamint a patkány tripszin 2 génjébe. A PCR termékeket egy módosított pET-17b vektorba klónoztuk, az elkészült konstrukciókat szekvenálással ellenőriztük.

Rekombináns fehérje expresszió és renaturálás: A rekombináns tripszinogéneket E. coli BL21(DE3)pLysS törzsében zárványtest formájában expresszáltuk, majd in vitro renaturáltuk.

Rekombináns fehérjék tisztítása: A tripszinogéneket ioncserélő kromatográfiával tisztítottuk. A zimogéneket enterokinázzal aktiváltuk, majd az aktív tripszineket affinitás kromatográfiával tisztítottuk szójabab tripszin inhibitor oszlopon. A fehérjepreparátumok tisztaságát és homogenitását SDS poliakrilamid gélelektroforézissel és reverz fázisú HPLC-vel ellenőriztük.

Differenciális pásztázó kalorimetria és cirkuláris dikroizmus spektroszkópia: A humán tripszinogén 4 mutánsok szerkezetének stabilitását és helyes feltekeredését a vad típusú enzimmel vetettük össze.

Limitált proteolízis: A humán tripszin 4 variánsai aktivációs doménjének konformációját limitált kimotriptikus proteolízissel vizsgáltuk. Ez a módszer alkalmazható a fehérjék rendezetlen, illetve flexibilis szegmenseinek azonosítására. A meghatározott időközönként vett mintákat SDS poliakrilamid gélen futtattuk meg. Az egyes sávok intenzitását denzitometriával határoztuk meg. A limitált proteolízis időbeni lefolyását a denzitometriás adatokhoz történő exponenciális görbeillesztéssel elemeztük.

Az N-terminális kémiai módosítása: Az N-terminális hozzáférhetőségét az Ile16 NaNCO által történő módosításával vizsgáltuk. A karbamiláció sebességét a szabad N-terminális eltűnésének Edman-lebontással való követésével határoztuk meg.

Proflavin kötés: Az aktív konformációban jelenlévő tripszin arányát proflavin kötéssel határoztuk meg gyorskinetikai módszerrel. A tripszin/proflavin komplex kialakulását spektrofotometriásan követtük. A proflavin egy akridin festék, amely reverzibilisen kötődik a tripszin és más szerin proteázok aktív konformációjának S1 kötőzsebéhez, ami jelentős abszorpciós spektrum változásokat eredményez.

Enzimaktivitás mérés: A méréseket különböző szintetikus amid szubsztrátokon végeztük. A szubsztrát hidrolízist spektrofotometriásan követtük. A mérési adatok kiértékelésénél a Michaelis-Menten modellt alkalmaztuk. A gátlási vizsgálatok során különböző szintetikus, illetve fehérje inhibitorokat alkalmaztunk.

Zimogén aktiváció vizsgálata: A tripszin variánsok fehérje szubsztráton való aktivitását kimotripszinogén aktivációval vizsgáltuk. A meghatározott időközönként vett minták kimotripszin aktivitását spektrofotometriásan mértük.

Tranziens kinetika: A Gly193 argininnel történő szubsztitúciójának hatását az egyes reakciólépésekre gyorskinetikai módszerrel vizsgáltuk 4-metilumbelliferil 4-guanidinbenzoát (MUGB) szubsztrát analógon. Ehhez szubsztrát telítési kísérleteket végeztünk egy megállított áramlásos (stopped-flow) készülékben. A reakció lefolyását spektrofluorimetriásan követtük.

Protonleltár mérések: A protonleltár mérések könnyű- és nehézvíz különböző arányú keverékeiben történnek, és információt szolgáltatnak az átmeneti állapot során átadódó hidrogének, illetve másodlagos módon megváltozó kötések számáról. A protonleltár adatok kiértékelése során adatainkhoz a Gross—Butler egyenlet különböző egyszerűsített formáit illesztettük a legkisebb négyzetek módszere szerint. A mechanizmus leírásához a legjobb statisztikai eredményt, illetve konzisztens eredményeket szolgáltatató modellt választottuk.

EREDMÉNYEK ÉS KÖVETKEZTETÉSEK

1. A 193-as glicin nagyméretű aminosavakkal — argininnel, fenilalaninnal és tirozinnal — történő szubsztitúciójának a különböző szubsztrátokkal és inhibitorokkal szembeni hatását többféle fehérjekörnyezetben is megvizsgáltuk. Kisméretű, P' oldali aminosavakkal nem rendelkező szubsztrátok, illetve inhibitorok esetében azt tapasztaltuk, hogy a mutációk a kötési lépést nem befolyásolják. Mind a k_{cat} , mind a K_M értékek kismértékű növekedése volt megfigyelhető, így összességében a katalitikus hatékonyság nem változott. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a dezacilezés sebessége nő. Nagyméretű, fehérjetermészetű kölcsönható partnerek (szubsztrát, illetve inhibitorok) esetében az enzim felszínén való megkötődés sztérikus gátlása válik dominánssá a nagyméretű oldalláncok következtében.

2. A kisméretű, kromogén szubsztráton végzett protonleltár mérések azt mutatják, hogy a humán tripszin 4 esetében — a 193-as glicint tartalmazó humán tripszin 1-hez hasonlóan — két proton átmenet történik az átmeneti állapot kialakulása során, ami megfelel a szerin proteázok katalitikus triádjának működéséről alkotott általános képnek. Elmondhatjuk tehát, hogy a katalitikus mechanizmus a mutáció hatására nem változik alapvetően. Mindazonáltal az oldószer hatás hiánya arra utal, hogy a Gly193 argininnel történő helyettesítése hatására az oxianion lyuk szerkezete torzul, így az átmeneti állapotot stabilizáló hidrogénhidás kölcsönhatások gyengülnek.

A Gly193 argininnel való helyettesítésének hatását az enzim katalitikus mechanizmusára MUGB szubsztrátanalógon tranziens kinetikai módszerrel részletesen is elemeztük. A kapott időgörbék két exponenciális és egy lassabb lineáris fázissal írhatók le, az exponenciális fázisok megfigyelt sebességi állandója hiperbolikus függést mutat a szubsztrátkoncentráció függvényében. Eredményeink alapján a reakció leírására egy, a korábbiaknál részletesebb modellt állítottunk fel, melyben a tetraédes átmeneti állapot reverzibilis kialakulása megkülönböztethető az acil-enzim keletkezésétől. A tranziens kinetikai vizsgálatok — az egyensúlyi mérésekből levonható következtetésekkel összhangban — azt mutatják, hogy a glicin/arginin csere hatására az első tetraédes átmeneti állapot kialakulásának sebessége csökken, míg a dezacilezés sebessége nő. További termodinamikai vizsgálatok megmutatták, hogy a sebességcsökkenés hátterében szerkezeti átrendeződések állnak.

3. Tanulmányoztuk a konformációs flexibilitás szerepét a zimogén aktivációt kísérő konformációs átrendeződésben. Ehhez a csuklópontokban található glicineket alaninra

cseréltük helyspecifikus mutagenézis révén, majd megvizsgáltuk a mutációk hatását mind az aktivációt kísérő konformációs átmenetre, mind pedig a tripszin katalitikus mechanizmusára. Mutánsaink zimogénszerű szerkezetet mutattak, melyet bizonyos aktivációs domén szakaszok megnövekedett flexibilitása, a molekula N-terminálisának fokozott hozzáférhetősége, valamint az aktív hely deformitása jellemez. Mindez arra utal, hogy a csuklópántok körüli flexibilitás csökkentése gátolja a zimogén/aktív enzim átalakulást, így eltolja a két forma közötti egyensúlyt a zimogén forma irányába. Az egyes enzimek szerkezete azonban eltérőnek bizonyult. A katalitikus aktivitás az aktív hely katalízisre alkalmas konformációjának mértékével mutat összefüggést, mely az N-terminális és az autolízis hurok eltérő konformációs állapotaival társulhat. Szubsztrát analógok kötődése az aktív forma irányába tolja el az egyensúlyt, mivel inhibitor-kötött állapotban a mutáns tripszinek is a valamennyi csuklópozícióban glicint tartalmazó variánshoz hasonló szerkezeti jellemzőket mutatnak. A zimogén/aktív konformációs átmenetet gyorskinetikai módszerrel is kimutattuk.

Tekintve, hogy a tripszinszerű szerin proteázok számos élettani folyamatban fontos szerepet játszanak, munkánk különböző betegségek, mint pl. hemofiliák molekuláris mechanizmusába is betekintést nyújt.

A DOLGOZAT ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK

Gombos, L., Kardos, J., Patthy, A., Medveczky, P., Szilágyi, L., Málnási-Csizmadia, A., and Gráf, L. (2008) Probing conformational plasticity of the activation domain of trypsin: the role of glycine hinges. *Biochemistry* **47**(6): 1675-1684.

Tóth, J., Simon, Z., Medveczky, P., **Gombos, L.,** Jelinek, B., Szilágyi, L., Gráf, L., and Málnási-Csizmadia, A. (2007) Site directed mutagenesis at position 193 of human trypsin 4 alters the rate of conformational change during activation: role of local internal friction in protein dynamics. *Proteins* **67**(4):1119-1127.

Tóth, J., **Gombos, L.,** Simon, Z., Medveczky, P., Szilágyi, L., Gráf, L., and Málnási-Csizmadia, A. (2006) Thermodynamic analysis reveals structural rearrangement during the acylation step in human trypsin 4 on 4-methylumbelliferyl 4-guanidinobenzoate substrate analogue. *J. Biol. Chem.* **281**(18): 12596-12602.

Gombos, L., Tóth, J., Medveczky, P., Málnási-Csizmadia, A., and Szilágyi L. (2005) Comparative kinetic study on S2' trypsin variants. *FEBS J.* **272**(s1): 168.