

***AZ S1 SZUBSZTRÁTKÖTŐ HELY SPECIFICITÁSÁNAK
SZERKEZETI HÁTTERE PANKREATIKUS SZERIN
PROTEÁZOKBAN***

TÉZISEK

Jelinek Balázs

Biológia Doktori Iskola

Iskolavezető: Prof. Erdei Anna CMHAS,
tanszékvezető egyetemi tanár

Szerkezeti Biokémia Doktori Program

Programvezető: Prof. Gráf László MHAS

Témavezető

Prof. Gráf László MHAS



Eötvös Loránd Tudományegyetem, Természettudományi Kar

Biológiai Intézet, Biokémiai Tanszék

Budapest, 2007

Bevezetés

Doktoranduszi kutatómunkám során a pankreatikus szerin proteázok S1 szubsztrátkötőhely-specifitásának szerkezeti hátterét vizsgáltam. Az S1 kötőhelyet jórészt a 185-195, 213-223 és 226-228 szakaszokból álló szubsztrátkötő zseb alkotja, mely az evolúció során az egyes enzimtípusokban különböző oldalláncok befogadásához adaptálódott. A tripszin a zseb alján található Asp189 negatív töltése miatt a pozitív töltésű Arg és Lys szubsztrát oldalláncok mellett hasít, míg a kimotripszin tag, apoláros zsebe a Tyr, Phe és Trp oldalláncokat, az elasztáz szűkült zsebe pedig a kisebb, apoláros oldalláncokat (Ala, Val, Leu) részesíti előnyben.

A hetvenes években készült kristályszerkezetekből kimutatták, hogy a kötőzsebek pontos komplementerei az általuk preferált oldalláncoknak. Az eredmények arra utaltak, hogy a szubsztráttal közvetlen kölcsönhatásban álló 189, 216 és 226-os oldalláncok határozzák meg a szubsztrát specifitást. Ez az egyszerű specifitási modell azóta tankönyvi alappélda lett, a modellt tesztelő helyspecifikus mutagenézis kísérletsorozat azonban nem igazolta a feltevéseket. A tripszin, a kimotripszin és az elasztáz specifitásának egymásba alakítását célzó kísérletek során a szubsztrátkötő helyet alkotó aminosavak különböző csoportjait cserélték ki a cél enzimnek megfelelő aminosavakra. Az első sikeres tripszin→kimotripszin irányú átalakítás során 15 aminosavat kellett kicserélni, ami egy jóval komplexebb szubsztrát felismerő rendszerre utal. Valóban, a feltűnő szerkezeti hasonlóságok mellett (pl. a zsebet alkotó két felszíni hurkot összekötő 191-220 cisztin pozíciója) az egyes S1 régiók szekvenciájának, szerkezetének és H-kötés hálózatának összehasonlítása olyan különbségeket is mutat, melyek egyedien jellemzik az adott enzimet.

A további, komplex modell alapján készített tripszin→elasztáz, kimotripszin→elasztáz és kimotripszin→tripszin irányú átalakítások azonban a számos aminosav csere ellenére aspecifikus, alacsony aktivitású enzimeket eredményeztek. A kimotripszin→tripszin kísérletben használt kimotripszin B-típusú volt, melyben a 226-os pozícióban egy Ala található. Tripszinokban azonban ez a pozíció konzervált, minden esetben Gly-t tartalmaz. Egy korábbi kísérletben vizsgált G226A tripszin mutáns tripszinszerű aktivitásának jelentős csökkenése is arra utalt, hogy a 226-os pozíciónak kiemelt szerepe lehet a specifitás kialakításában, és egyben kételyeket támasztott a kimotripszin→tripszin irányú átalakítások eredményeit illetően.

Célkitűzések

A felmerült kételyek tisztázása végett megvizsgáltuk a 226-os pozíció lehetséges szerepét a kimotripszin→tripszin irányú átalakításban. Az A226G cserét bevittük mind az egyszerű specificitási modell alapján készült S189D kimotripszin-B mutánsba (S189D+A226G), mind pedig egy a komplex modell alapján készült, az S1 régióban számos cserét tartalmazó mutánsba (S1+A226G).

Amint azt a korábbi vizsgálatok is mutatták, a mutációk hatása sokkal pontosabban értelmezhető, ha a kinetikai méréseket kiegészítjük a mutánsok kristályszerkezetének meghatározásával. Az S189D+A226G mutáns biztató kinetikai eredményei fontos kérdéseket vetettek fel az S1 hely lehetséges átrendeződéseit illetően, ezért meghatároztuk a mutáns kristályszerkezetét, valamint megvizsgáltuk az aktivitás pH-függését és a mutáns triptofán fluoreszcenciáját is.

Ha áttekintjük a specificitás átalakítását célzó számos korábbi kísérletet, az eredményekből nem vonható le egyértelmű következtetés az S1 hely specificitását meghatározó szerkezeti elemekről. Az egyszerű modell alapján készített mutánsokkal nem sikerült átalakítani a specificitást, és az egyetlen eredményes tripszin→kimotripszin irányú átalakítástól eltekintve az S1 hely teljes cseréje szintén lerontotta a mutánsok aktivitását. Ennek oka feltehetően az, hogy az S1 régió és az enzim egyéb szerkezeti elemei között fellépő kölcsönhatások is fontosak, tekintve, hogy az S1 hely alapvetően a teljes szerkezetbe van beágyazva. Ez a feltételezés összhangban van a tripszin→kimotripszin irányú átalakítás során megfigyelt, az S1 helyen kívül eső Y172W mutáció által kiváltott jelentős aktivitásnövekedéssel. Egy másik elképzelés szerint a specificitás átalakításához elegendő lehet az S1 régió egyes kulcspozícióinak kicserélése, anélkül, hogy alapvetően megváltoztatnánk a szerkezetet és így az enzim távolabbi régióival kialakított kölcsönhatásrendszerét. Az S1 régió teljes cseréjével ugyanis olyan új oldalláncok illetve konformációs motívumok kerülhetnek a szerkezetbe, melyek nem kompatibilisek az enzim S1 régiót határoló elemeivel. Munkám során célul tűztem ki 1) az S1 specificitás szerkezeti hátterének további vizsgálatát, különös tekintettel a tripszin specificitást meghatározó Asp189 töltésének stabilizálására; valamint 2) az S1 specificitási modell további fejlesztését, míg az a specificitás-átalakítási kísérletek próbáját is kiállja. Eredményeink várhatóan a fehérjetervezés és a gyógyszerfejlesztés területének fejlődéséhez járulnak majd hozzá.

Alkalmazott módszerek

- Mutáns DNS konstrukciók elkészítése Kunkel módszere szerint, a konstrukciókat szekvenálással ellenőriztük
- Fehérje termelés pET expressziós rendszerrel *E. coli* baktériumban
- Fehérje inklúziós testek renaturálása
- Fehérje tisztítás affinitás kromatográfiával, gélszűrés, SDS-PAGE analízis
- Aktív hely titrálás
- Steady-state enzimaktivitás mérések
- Enzimaktivitás pH függésének vizsgálata
- Specificitási profil vizsgálata kompetitív oligopeptid szubsztrát könyvtáron RP-HPLC kiértékeléssel
- Fehérje kristályosítás függő csepp módszerrel
- Röntgensugár diffrakciós adatok gyűjtése és feldolgozása
- Szerkezeti modell felépítése molekula-helyettesítés módszerrel, pontosítás automatizált és manuális módszerekkel, a modell értékelése
- A kész szerkezeti modell elemzése, szerkezeti összehasonlítások

Tézisek

1. Az A226G mutáció számos tripszinszerű tulajdonsággal ruházta fel az S189D kimotripszin mutánst.

Míg az S1+A226G mutáns kimotripszin-szerű specificitást mutatott, az egyetlen A226G csere tripszinszerű specificitást eredményezett a kimotripszin-szerű S189D mutánsban. A katalitikus aktivitás tripszin szubsztráton két nagyságrenddel nőtt, míg kimotripszin szubsztráton egy nagyságrenddel csökkent. A kettős mutáns tripszinszerű aktivitása 50-szerese az eddigi legjobb kimotripszin→tripszin mutáns aktivitásának. A magas tripszinszerű aktivitás lehetővé tette a koncentráció aktív hely titrálással történő pontos meghatározását, erre a korábbi mutánsok esetében nem volt lehetőség.

A kompetitív oligopeptid szubsztrát könyvtáron végzett mérések kimutatták, hogy az A226G csere az S189D mutáns kimotripszin jellegű profilját a tripszinéhez nagyon hasonlóvá alakította, a tripszinre jellemző, Lys-hez viszonyított Arg preferenciával.

Az S189D+A226G mutáns kimotripszin zimogén formája autoaktiválódik, ami szintén a tripszinre jellemző fontos tulajdonság. A korábbi kimotripszin→tripszin mutánsok nem autoaktiválódtak, feltehetően azért, mert esetükben a tripszinogén szerű szerkezet integritásának szintje nem érte el az autoaktiválódáshoz szükséges minimumot.

A kettős mutáns a kimotripszinogén aktiválására is képes, ami *in vivo* kizárólag a tripszin feladata.

A benzamidin - egy kisméretű tripszin inhibitor - erősen kötődik a kettős mutánshoz: a tripszin gátlás során mért K_i értékkel megegyezően képes gátolni a mutáns aktivitását.

2. A kettős mutáns szerkezetéből látszik, hogy az A226G csere azért növelte az S189D kimotripszin mutáns tripszinszerű aktivitását, mert hatására egy a vad típusú tripszinéhez hasonlóbb szerkezet alakult ki.

Az A226G csere által kiváltott szerkezetváltozások oka a 226-os alanin metilcsoportja és a zsebet alkotó két felszíni hurkot összekötő 191-220 cisztin közötti kölcsönhatás megszűnése. A tripszinszerű aktivitás növekedését eredményező átrendeződések során a cisztin, valamint a két hurok egyes részei a vad típusú tripszinéhez közelebbi pozícióba kerültek, az Asp189 oldallánc pedig a zseb belseje felé fordult.

3. Az egyszeres és a kettős mutáns szerkezete azt mutatja, hogy mindkét mutáns olyan konformációban kristályosodott, amely nem egyeztethető össze a szubsztrátkötéssel és a katalitikus aktivitással.

A vad típusú enzimekben az úgynevezett autolízis hurok érintkezik a zsebet alkotó két hurokkal, a 191-220 cisztinnel és az N-terminális 16-17 aminosavakkal. Ezek a kölcsönhatások feltehetően kulcsfontosságúak az aktív konformáció stabilizálásában. A mutáns szerkezetekben azonban az autolízis hurok szubsztrátkötő felszínét foglal el, és nincs érintkezésben a 191-220 cisztinnel és az N-terminálissal. Ezenkívül útjában áll az oxianion üreg kialakulásának, és Lys145 aminosavának amid nitrogénje hidrogénkötésre képes a 195-ös katalitikus aktív szerin hidroxil csoportjával. A kettős mutáns szerkezetében is megmaradtak az egyszeres mutáns szerkezetében megfigyelhető zimogénszerű tulajdonságok: az oxianion üreg nem alakult ki, és az Asp194 oldallánc az N-terminális helyett a His40 oldallánccal alakít ki sóhidat.

4. Az S1 helyre bevitt mutációk befolyásolhatják a pankreatikus szerin proteázok aktív és zimogénszerű inaktív formái között fennálló egyensúlyt. pH függés kísérleteink és triptofán fluoreszcencia méréseink eredményei azt mutatják, hogy az S189D mutáció erősen befolyásolja az aktív és inaktív forma közötti egyensúlyt, és a kristályszerkezetben megfigyelt zimogénszerű forma oldatban is a meghatározó konformáció lehet.

Oldatban az aktív és a zimogénszerű inaktív forma egymással egyensúlyban van, és a vad típusú kimotripszin molekulák 10%-a még optimális pH-n is inaktív konformációban van. A triptofán fluoreszcenciás mérésekből látszik, hogy oldatban a kettős mutáns túlnyomórészt a zimogénszerű inaktív konformációban van, a benzamidin kötődése azonban optimális pH-n kialakíthatja az aktív konformációt. Az aktivitás pH függése azt mutatja, hogy a kettős mutáns esetében a szubsztrát - jellegétől függően - képes befolyásolni az S1 régió szerkezetét: a szubsztrát pozitív töltése stabilizálja az aktív konformációt.

Következtetések

Az S189D+A226G kettős mutáns lényegében egy egyszeres S189D kimotripszin-A mutánsnak tekinthető, amely így pontos tükörképe az egyszeres D189S tripszin mutánsnak. Eredményeink meglepő módon azt mutatják, hogy ellentétben a tripszin→kimotripszin irányú átalakításokkal, egyetlen S189D mutáció képes a kimotripszint egy tripszinszerű, autoaktiválódásra is képes enzimé alakítani, míg az S1 hely teljes cseréjével itt nem sikerült tripszinszerű specificitást kialakítani. Mindez megerősíteni látszik azt az elképzelést, hogy többféle megközelítéssel is lehetséges a tripszint és a kimotripszint egymásba alakítani, és a specificitást alapvetően meghatározó pozíciók feltehetően nem ugyanott vannak a két szerkezetben.

A kristályszerkezeti adatok részben magyarázatul szolgálnak az A226G csere okozta aktivitás és specificitás változásokra. A modellben az S1 régió alkotóelemei közül csak az Asp189 oldallánc, valamint a 191-220 cisztin és környezete került az aktivitás szempontjából előnyösebb pozícióba, míg más szerkezeti elemek konformációja kifejezetten előnytelen maradt. További pH-függés és triptofán fluoreszcencia vizsgálataink azonban kimutatták, hogy oldatban a kristályszerkezetben megfigyelttől eltérő konformáció is kialakulhat, melyet egy megfelelő szubsztrát vagy inhibitor kötődése stabilizálhat. Az A226G csere tehát egyrészt maga váltott ki olyan átrendeződéseket az S189D kimotripszin mutáns S1 régiójában, melyek a szerkezetet a vad típusú tripszin szerkezete felé közelítették, ezek megfigyelhetőek a

szerkezetben. Másrészt oldatban lehetővé teszi olyan magasabb tripszinszerű aktivitású, szubsztrát vagy inhibitor által stabilizált konformációs állapotok kialakulását, melyek az egyszeres S189D mutánsban feltehetően korlátozottak.

Amint az a kinetikai eredmények összehasonlításából látszik, a kimotripszin molekula vázszerkezetében elhelyezve a kimotripszin S1 régiója alkalmasabb az Asp189 negatív töltésének stabilizálására, mint a tripszinnek megfelelőre kicserélt S1 hely. Megállapítottuk, hogy az Asp189 oldalláncnak valóban kulcsszerepe van a specificitás meghatározásában, azonban a töltés stabilizálásához egyedi kölcsönhatás-rendszer szükséges, amely a kimotripszin zsebben nem áll rendelkezésre. A kimotripszin valódi tripszinné alakítása feltehetően megoldható a teljes S1 hely cseréje mellett a kimotripszin molekula környező szerkezeti elemeit érintő további pozíciók cseréjével. Egy lehetséges másik út pedig néhány gondosan kiválasztott, az A226G mutációhoz hasonló kulcspozíció cseréje, melyek által a kimotripszin S1 helye egyrészt képessé válik az Asp189 töltésének stabilizálásához szükséges kölcsönhatások biztosítására, másrészt jól illeszkedik a kimotripszin molekula környező szerkezetébe. Az így kicserélni kívánt pozíciók megválasztása azonban azért is nehéz feladat, mert eredményeink szerint a lehetséges szerkezeti torzulásokon túl az S1 helyet érintő mutációk hatással lehetnek az aktív és a zimogénszerű inaktív formák közötti egyensúlyra is.

Publikációk

A doktori értekezés alapjául szolgáló közlemények:

Jelinek, B., Antal, J., Venekei, I., Gráf, L. (2004) Ala226 to Gly and Ser189 to Asp mutations convert rat chymotrypsin B to a trypsin-like protease. *Protein Eng. Des. Sel.*, 17, 127-131.

Jelinek, B., Katona, G., Fodor, K., Venekei, I. and Gráf, L. (2007) The crystal structure of a trypsin-like mutant chymotrypsin: The role of position 226 in the activity and specificity of S189D chymotrypsin. *The Protein Journal*, online first status, DOI: 10.1007/s10930-007-9110-3; [http://www.springerlink.com/content/111872/?k=au%3a\(jelinek\)](http://www.springerlink.com/content/111872/?k=au%3a(jelinek))

További közlemények:

Kintsés B, Simon Z, Gyimesi M, Tóth J, Jelinek B, Niedetzky C, Kovács M, Málnási-Csizmadia A. (2006) Enzyme kinetics above denaturation temperature: a heat-jump/stopped-flow apparatus. *Biophys. J.* 91(12):4605-10.

Tóth J, Simon Z, Medveczky P, Gombos L, Jelinek B, Szilágyi L, Gráf L, 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):1119-27.