

Acylaminoacyl peptidáz enzimek katalízisének vizsgálata

Doktori értekezés tézisei

Kiss András László

Biológia doktori iskola

Iskolavezető: Prof. Erdei Anna, tanszékvezető egyetemi tanár

Szerkezeti Biokémia Doktori Program

Programvezető: Prof. Gráf László, tanszékvezető egyetemi tanár

Témavezető:

Prof. Polgár László



**Magyar Tudományos Akadémia, Szegedi Biológiai Központ,
Enzimológiai Intézet
Budapest
2007**

1. Bevezetés

A szerin peptidázok aktív centrumában a katalitikus aminosavak (His, Asp, Ser) mellett találunk két olyan aminosavat is, amelyek egy üreget formálnak (“oxianion hole”; oxianion kötőhely) és stabilizálják a katalízis átmeneti állapotában kialakuló negatív töltésű oxianiont.

A prolil-oligopeptidáz (POP) enzimes család tagjai (acylaminoacyl peptidáz, prolil-oligopeptidáz, dipeptidyl peptidáz IV, oligopeptidáz B) jelentős célpontjai a gyógyszerkutatásnak, ezért működésüket széleskörűen kutadják. Ezek az enzimek méretükben nagyobbak, mint a klasszikus szerin peptidázok, és két doménből épülnek fel, egy α/β hidroláz szerkezetű katalitikus, és egy propeller doménből, melynek feladata a szubsztrátspecifitás biztosítása. A POP és az oligopeptidáz B monomer és endopeptidáz, míg az acylaminoacyl peptidáz és a dipeptidyl peptidáz oligomer és exopeptidáz. Katalitikus triádjaikban az aminosavak elsődleges szerkezetben elfoglalt sorrendje (Ser, Asp, His) eltér a klasszikus szerin proteázok (tripszin, szubtilizin) esetén leírtaktól.

Az acylaminoacyl peptidáz (AAP) az N-terminálisan acilált peptidekről hasít le acilált aminosavat. Ezek a peptidek fontos biológiai és kóroki folyamatokban játszanak szerepet, például egyes ráktípusok kialakulásában. A humán AAP a 3. számú kromoszóma rövid karjának 21-es régióban, a DNF15S2 lókuszon kódolt. A lókusz törlődését leírták kissejtes tüdőrák- és veserák kialakulásakor. Az acylaminoacyl peptidáz szerepét kimutatták az oxidatív stressznek kitett, aggregálódott fehérjék lebontásában is, továbbá az enzimet összefüggésbe hozták a szürke-hályog kialakulásával. A bélcsatornában a bakteriális eredetű formilmetionil peptidek lebontásával az AAP megakadályozza a súlyos bélgyulladást, tehát része van a túlzott immunválasz mérséklésében.

Munkám során az AAP-ok oxianion kötőhelyének szerepét vizsgáltam és kimutattuk, hogy az exopeptidáz aktivitásáról ismert AAP-ok közül némely enzim endopeptidáz aktivitással is rendelkezik. Enzim-kinetikai méréseink és röntgenszerkezeti bizonyítékaink szemléltetik az AAP-ok szubsztrát specifitásának evolúciós változását.

2. Alkalmazott vizsgálati módszerek

Az enzimmutánsokat klasszikus molekuláris biológiai módszerek használatával (PCR, agaróz gélelektroforézis, DNS izolálás és tisztítás, klónozás) hoztuk létre. A rekombináns fehérje kifejezése *Escherichia coli* baktériumtörzsekben történt, az előállított fehérjéket különböző kromatográfiás módszerekkel tisztítottuk meg. A kinetikai méréseket foto- és fluorimetriás szubsztrátokkal végeztük, Cary-100 spektrofotométer és Cary Eclipse fluoreszcens spektrofotométer segítségével. Az enzimvariánsok fizikai stabilitását differenciális pásztázó kalorimetria (DSC) és fotoabszorpciós technika segítségével határoztuk meg. Az enzim-inhibitor illetve enzim-szubsztrát komplexeket függő csepp módszerrel kerültek kristályosításra, és a komplexek térszerkezete röntgenkristallográfia segítségével került meghatározásra.

3. Eredmények

A sertés acylaminoacyl peptidáz (AAP) 507-es hisztidine az enzimaktivitás szempontjából fontos aminosavnak bizonyult. A kérdéses aminosavat alaninra cseréve az AAP specifitására jellemző k_{cat}/K_m értéke hozzávetőleg a századrészére csökkent acetyl-Ala-4-nitroanilid szubsztrát esetén. Ez az aminosav egy evolúciósan konzervált „HGGP” motívumban található. A hisztidin katalízisben való részvételét tovább vizsgáltuk *Aeropyrum pernix* K1 ősbaktérium eredetű acylaminoacyl peptidáz (apAAP) enzimben, amelynek ismert a térszerkezete. Az 507-es hisztidin megfelelője apAAP esetén a His367, amelyet szintén alaninra cseréltünk. Az enzim variánst enzimkinetikai módszerekkel vizsgáltuk, majd kristályosítottuk és meghatároztuk a mutáns térszerkezetét az ELTE fehérje modellező csoportjával együttműködésben Harmat Veronika irányítása alatt. A H367A mutáns térszerkezete (pdb: 2qr5) megmutatta, hogy a His367-et tartalmazó főlánc jelentősen deformálódik, ezáltal megváltoztatja a közeli Gly369 helyzetét, amely az oxianion kötőhelyet biztosító egyik aminosav. Tehát a

His367 közvetve játszik szerepet az oxianion kötésében és az átmeneti állapot stabilizálásában.

Az AAP-ok N-acilált aminosavakat képesek lehasítani acilált peptidekről. A termékszerű inhibitorok (Ac-Phe és Gly-Phe) és az apAAP komplexek röntgenszerkezetét meghatározva kiderült, hogy a szubsztrátkötő hely túlnyúlik az S2 kötőzseben, tehát az enzim kötőhelye N-terminálisan meghosszabbított szubsztrát befogadására is alkalmas (pdb: 2hu7 és pdb: 2hu5). Ebből kiindulva kimutattuk, hogy a bakteriális AAP-ok valóban rendelkeznek endopeptidáz aktivitással is. Az apAAP nagy katalitikus hatékonysággal hidrolizált különböző oligopeptid szubsztrátokat. A heptapeptid Abz-GFEPF(NO₂)RA szubsztrátot együtt kristályosítottuk a S445A inaktív enzim variánssal, remélve, hogy kötődésének szerkezeti vonatkozásait is megismerhetjük. Sajnos a szubsztrát elhasadt a hosszú kristályosítás alatt és csak az acil része (Abz-GF-OH) volt látható a szerkezetben (pdb: 2hu8). Az endopeptidáz aktivitás végső bizonyítéka az Abz-KARVLF(NO₂)EANle peptid és az apAAP részleges reakciótermékének Edmann degradációja, amely kimutatta, hogy a leggyakrabban a F(NO₂) után hasad a peptidkötés, amely az N-terminálistól számítva a hetedik aminosav.

Köszönetnyilvánítás:

Köszönöm témavezetőmnek, Polgár László Professor Úrnak, hogy munkámat végig nagy figyelemmel kísérte és tanácsaival támogatta.

4. Közlemények

1. **Kiss, A.L.**, Szeltner Z., Fülöp V. and Polgár L., *His507 of acylaminoacyl peptidase stabilizes the active site conformation, not the catalytic intermediate*. FEBS Lett., 2004. **571**(1-3): p. 17-20.
2. Wright, H., **Kiss A.L.**, Szeltner Z., Polgar L. and Fülöp V., *Crystallization and preliminary crystallographic analysis of porcine acylaminoacyl peptidase*. Acta Crystallograph Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun., 2005. **61**(Pt 10): p. 942-4.
3. **Kiss, A.L.**, Hornung B., Radi K., Gengeliczki Z., Sztaray B., Juhasz T., Szeltner Z., Harmat V. and Polgar L., *The Acylaminoacyl Peptidase from *Aeropyrum pernix* K1 Thought to Be an Exopeptidase Displays Endopeptidase Activity*. J. Mol. Biol., 2007. **368**(2): p. 509-20.