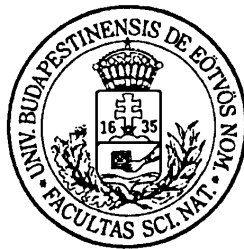


Szerkezeti rendezetlenség szerepe a fehérjék chaperone aktivitásában

Kovács Sándor Dénes

Doktori értekezés tézisei



Eötvös Loránd Tudományegyetem

Biológia Doktori Iskola (A Doktori Iskola vezetője: Dr. Erdei Anna)

Szerkezeti Biokémia Doktori Program (A program vezetője: Dr. Gráf László)

Témavezető: Dr. Tompa Péter

Magyar Tudományos Akadémia, Szegedi Biológiai Központ,

Enzimológiai Intézet

2008

Bevezetés, irodalmi áttekintés

A rendezetlen fehérjék nagy gyakorisággal fordulnak elő az élővilágban, azonban a funkcióik pontos jellemzése mind a mai napig hiányos. A szerkezeti rendezetlenség alapfeltétele az aminosav összetételben található, ami lehetővé teszi a nyújtott szerkezet kialakulását natív körülmények között. A rendezetlen fehérjék között számos olyan fehérje ismert, amelyek hiánya vagy helytelen működése súlyos betegséget okoz. Ez a felismerés rámutat, hogy a rendezetlen fehérjék lényeges szerepet látnak el az élőlények életében. Ezenkívül cáfolja azt a feltevést is, hogy a rendezetlen fehérjék pusztán melléktermékei az evolúciónak. Az eddig vizsgált rendezetlen fehérjék funkciói között megtalálhatóak az enzimszabályozás, a sejtszerveződés szabályozása, molekuláris komplexek összeszerelése és stabilizálása, transzkripció szabályozása, stb.

Funkcióik a szerkezetükből adódnak egyrészt a kiterjedt polipeptid láncon, másrészt az egyedi makromolekuláris kölcsönhatásokon alapulnak. A rendezetlen fehérjék között nem ismert enzim. Feladatuk legfőképp a biokémiai folyamatok szabályozására, rendszerezésére korlátozódik. Egyik rendkívüli funkciójuk a chaperone (dajka fehérje) aktivitás, amely a szubsztrát fehérje vagy RNS feltekeredésének elősegítésében, vagy a szerkezet védelmében nyilvánul meg. Ennek érdekessége abban rejlik, hogy a rendezetlen fehérjék 3D szerkezet kialakulása nélkül fejtik ki hatásukat. A folyamat feltételezett mechanizmusát az ún. entrópia transzfer modell írja le, amely azon az elgondoláson alapul, hogy a rendezetlen fehérje „mozgékonyosságának” egy részét „átadja” a partner molekulának, aminek hatására a partner molekula szerkezete fellazul. Ennek következtében a helytelen szerkezettel rendelkező molekula kimozdul a lokális energia minimumból, ami lehetővé teszi a konformációs tér ismételt bejárását.

A rendezetlen dehidrin fehérjék a LEA fehérje család részét képezik, amelyek a magfejlődés késői szakaszában, illetve a hideg- és szárazság stressz esetében fejeződnek ki a növényben. Jelenlétük szükséges a növény fejlődéséhez, illetve stressz toleranciája kialakulásához. Hiányuk a stressz tolerancia csökkenéséhez vezet. Molekuláris tulajdonságaik között ismert foszforilálhatóságuk, illetve membrán-kötésre való hajlamuk. A foszforilálhatósággal párhuzamosan vált ismertté, hogy bivalens fém ionokat képesek kötni, habár ennek sem funkcionális, sem szerkezeti jelentőségére eddig még nem derült fény. A dehidrinek funkciója és pontos molekuláris mechanizmusa nem ismert, de számos feltételezés született arra

nézve, hogy hidratációs pufferként, ion pufferként, a jégnövekedés gátlása révén, chaperone aktivitáson keresztül, vagy éppen a membrán stabilizálás révén fejtik ki sejtbeli hatásukat.

A riboszóma helyes működése az optimális RNS és fehérje komponensek függvénye. A riboszómális fehérjék szintézise szigorúan ellenőrzött folyamatok során történik. A fehérjék mennyiségének szabályozása úgy az mRNS, mind a fehérje szintjén is megvalósul. Azonban környezeti stressz hatására, gyors sejtosztódás során, vagy rákos sejtekben egyes riboszómális fehérjék koncentrációja megemelkedik a citoszolban. Eddigi vizsgálatok azt mutatják, hogy számos riboszómális fehérje rendelkezik másodlagos funkcióval a riboszómán kívül is, némelyek RNS chaperone aktivitással rendelkeznek. A riboszómális fehérjéknek ezt az aktivitását szintén az entrópia transzfer modellel magyarázzák, bár a pontos molekuláris mechanizmus felderítése ebben az esetben is még várat magára.

Célkitűzés

Munkám célkitűzése hat rendezetlen fehérje szerkezeti és funkcionális jellemzése volt. Az ERD10 és ERD14 (ERDk) a növényi stresszfehérjék családjába, ezen belül a dehidrinek csoportjába tartozik. Mivel az ERDk szerkezeti és biofizikai vizsgálata még hiányos volt, ezért első céлом rendezetlenségük igazolása, és tulajdonságaik részletes jellemzése volt. A többi négy fehérjét az *E. coli* riboszóma nagyalegységében található riboszómális fehérjék közül választottam ki. Az L15, L16, L18 és L19 szerkezete nyújtott, elsődleges funkciójuk a riboszóma helyes felépítésének elősegítése. Legutóbbi vizsgálatok fényt derítettek másodlagos funkciójukra, ami a riboszómán kívüli RNS chaperone aktivitás. A dehidrinek esetében ismert, a riboszómális fehérjék esetében feltételeztem, hogy környezeti stressz hatására a sejt védelmében játszanak szerepet. Munkám fő célkitűzése ezért a hat kiválasztott fehérje fehérje-chaperone aktivitásnak vizsgálata és jellemzése volt.

Alkalmazott módszerek

Rendezetlenség vizsgálata, igazolása: A két dehidrin fehérje szerkezeti rendezetlenségének igazolására több technikát is alkalmaztam, amelyek mindegyike más megközelítésből vizsgálja a fehérjéket. A rendezetlenséget az IUPred, és a PONDR algoritmusokkal

predikáltam (ERD10: NP_564114, ERD14: NP_177745). A cirkuláris dikroizmus spektrumot 10mM Na₂HPO₄ pufferben, pH 7,5, 0,5 mg/ml fehérje koncentrációban, Jasco J-720 spektropolariméteren vettem fel. Az ¹H-NMR spektrumot H₂O:D₂O (9:1)-ben, 1mM koncentrációban, 20°C-on Bruker DRX 500-MHz spektrométeren vettem fel. A hőstabilitás vizsgálatot 10 perces forralás, majd centrifugálási lépéssel végeztem el, amit követően a mintákat SDS-PAGE elektroforézissel vizsgáltam. A limitált proteolízist négy proteázzal (tripszin, kimotripszin, szubtilizin, proteináz K), több proteáz koncentráció mellett (1/50 – 1/1500 proteáz arány) is elvégeztem. A proteolízis pufferelt közegben, 30°C-on, 30 s-ig zajlott, amit SDS mintafelviteli oldattal, és forralással állítottam le. A mintákat ezután SDS-PAGE elektroforézissel vizsgáltam. A relaxációs NMR méréseket Bruker SXP 4-100 spektrométeren végeztük, 84,2 MHz frekvencián, 25 mg/ml (BSA, ERD10 és ERD14) fehérjekoncentráció mellett, 20 mM Tris (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 5 mM merkaptotanol pufferben, 210 - 298K hőmérséklet tartományban. A hidrátburok méretét abszolút értékben adtam meg, az aminosavak moláris mennyiségére nézve.

Kölcsönhatás foszfolipid vezikulával: A vizsgálatokat marha agyból izolált foszfolipidekből és foszfatidilkolin : foszfatidilszerin (1:1) arányú elegyből készített vezikulákon végeztem el. A fehérjék kötődését a vezikulákhoz mini-gélfiltrációs technikával ellenőriztem, 50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,5 alappufferben, 250 µg/ml vezikula és 0,5 mg/ml ERD10 vagy ERD14 felhasználásával. A kalcium hatását a kötődésre 100µM CaCl₂ mellett vizsgáltam, a só hatását 0 - 1000mM NaCl koncentrációk között mértem. A limitált proteolízist a fentivel megegyező fehérje és foszfolipid koncentrációk mellett, 1/9000 arányú szubtilizin felhasználásával végeztem el.

Fluoreszcens anizotópia vizsgálatok: A kísérleteket 40 µg/ml foszfatidilkolin:foszfatidilszerin (1:1) összetételű vezikula és 10 – 200 µg/ml közötti ERD10 és ERD14 mellett végeztem el, 5 és 55°C közötti hőmérséklettartományban. A vezikulát 1,6-difenil-1,3,5-hexatrién (DPH) fluoreszcens festékkel jelöltem. A mérés során egy T-elrendezésű fluoriméteren követtem a DPH mozgékonyágbeli változását a fehérje koncentráció, és hőmérséklet függvényében.

Chaperone assay-k

Alkohol dehidrogenáz hőindukált aktivitásvesztése: 2µM alkohol dehidrogenázt inkubáltam 45°C-on 1h-n keresztül önmagában, illetve 1-10 µM ERD10 vagy ERD14, illetve 1-

1 μM riboszómális fehérje vagy 1 μM Hsp90, illetve 1 μM BSA jelenlétében. Az alkohol dehidrogenáz aktivitásvesztését 10 percenként határoztam meg EtOH és NAD jelenlétében, Jasco UV-550 fotométeren.

Lizozim kémiai indukált aktivitásvesztése: A lizozim diszulfid hidait 20mM DTT jelenlétében redukáltam, aminek köszönhetően az enzim aktivitása csökkent. A kísérleteket 34 μM lizozimmal önmagában, vagy 5 μM ERD10, 5 μM ERD14, 1 - 1 μM riboszómális fehérje (L15, L16, L18, L19), 5 μM HSP90 vagy 5 μM BSA hozzáadása mellett külön-külön végeztem el. Az enzimaktivitás csökkenését 5 percenként határoztam meg 0,1 mg/ml *Micrococcus lysodecticus* sejtfal szuszpenzió (Sigma) bontási sebességének meghatározásával, 20 mM NaH_2PO_4 , pH 7,0 pufferben 25°C-on, 20 ml minta hozzáadásával, JASCO UV-550 spektrofotométeren.

Luciferáz hőindukált aggregációja: A luciferáz hőindukált aggregációját az abszorbancia folytonos követésével (400nm), termosztálható küvetatartóban, JASCO UV-550 spektrofotométeren vizsgáltam. 1 μM luciferázt önmagában, illetve 2 μM ERD10, 2 μM ERD14, 2 μM Hsp90 vagy 2 μM BSA jelenlétében vizsgáltam, 42°C-on, 50 mM Tris, pH 7,5 pufferben.

Citrát szintáz hőindukált aggregációja: Citrát szintáz hőindukált aggregációját technikai szempontból luciferázzal megegyező módon végeztem. A kísérleti körülmények az alábbi pontokban tértek el: a felhasznált puffer 50 mM Tris, 100 mM NaCl, pH 7,5, fehérje koncentrációk 0,5 μM citrát szintáz, 0,5 μM BSA, 0,5 μM HSP90, 0,5 μM ERD10 vagy ERD14 voltak.

Denaturált lizozim reaktiválása: 1,5 mg/ml koncentrációjú denaturált lizozim reaktiválódását optimális redox körülmények között vizsgáltam (2 M UREA, 100 mM Tris, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,5 mM redukált glutation, 0,1 mM oxidált glutation, pH 8.5 és 20 °C). Az enzim aktivitást 10 percenként határoztam meg, 0,1 mg/ml koncentrációjú *Micrococcus lysodecticus* sejtfal szuszpenzió, 25°C-on, 450 nm-en, JASCO UV-550 spektrofotométerrel. A szubsztrát, chaperone és kontroll fehérjéket az alábbi koncentrációkban használtam: 49 μM lizozim, 34 μM ERD10, 34 μM ERD14, 20-20 μM valamelyik riboszómális fehérje (L15, L16, L18, L19), 1,1 μM HSP90 vagy 15 μM BSA.

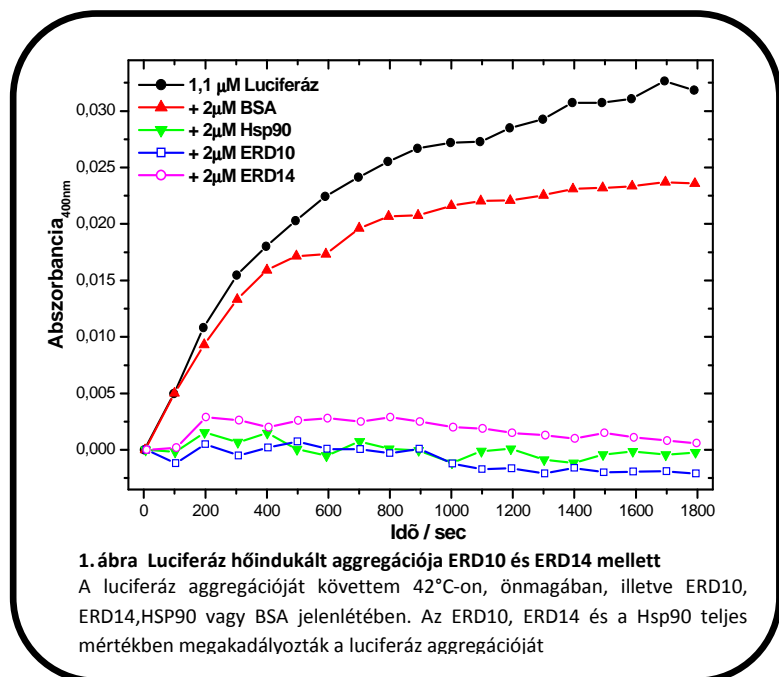
Eredmények és tárgyalásuk

1) Vizsgálataim azt igazolják, hogy az ERD10 és ERD14 (ERDk) a rendezetlen fehérjék családjába tartoznak. Az *in silico* predikció alapján lokális szerkezettel rendelkező régióin kívül mindkét fehérje teljesen rendezetlen. A predikciókat összevetve az ERDk szegmens felépítésével, a stuktúrált régiók a K-szegmensre tehetőek, amely más predikciók amfipatikus α -hélixnek jószoltak. A $^1\text{H-NMR}$ és CD spektrum alapján az ERDk rendezetlenek, kis mennyiségű α -hélikális szerkezeti elemekkel. Az ERDk limitált proteolízise nem mutatott semmilyen struktúrált - a proteolízisnek ellenálló - régiót. Relaxációs NMR mérések során összehasonlítottuk a marha szérum albumin (BSA), és a két ERD fehérje hidrát burkában kötött víz mennyiségét. A vizsgálat során az állapítottuk meg, hogy az ERD fehérjék molárisan kb. 3x több vizet kötnek aminosavanként, mint a BSA (ERDk: 12, BSA: 4,2 mol_{víz}/mol_{aminosav}, -30°C-on). Ez a különbség az ERDk nyújtott szerkezetére és magas hidratáltságára utal, ami a nagy nettó töltöttsége miatt jön létre. A hidrátburkok teljes kifagyása a BSA esetében (-58°C) alacsonyabb hőmérsékleten történik meg, mint az ERDk esetében (-50°C). A BSA utolsó fagyási lépése vélhetőleg a fehérje szerkezeti vizének fagyására utal, amiből arra is következtethetünk, hogy az ERDk nem tartalmaznak ilyen szorosan koordinált szerkezeti vizet.

2) Vizsgálataim azt mutatták, hogy az ERDk savas foszfolipidekből felépülő vezikulákhoz kötődnek, de más tulajdonságú vezikulákhoz nem. A kötött fehérje mennyisége magas NaCl koncentráció mellett (> 500mM) drasztikusan lecsökken. Ennek oka a fehérje kötőfelszínében indukált szerkezeti változás, ami elfedi a kötőfelszínt, vagy ionos jellegű kölcsönhatás esetén a magas só koncentráció elfedi a töltéssel rendelkező kölcsönható partnereket. Ennek felderítésére fluoreszcencia anizotrópia vizsgálatokat végeztem hidrofób molekulával jelzett vezikula mellett. Ez a vizsgálat alkalmas az ERDk a membrán fluiditására gyakorolt hatásának meghatározására. Azt találtuk, hogy az ERDk nem változtatták meg a vezikula fluiditását a vizsgálati hőmérséklettartományban (5°C-55°C), ami arra utal, hogy a kölcsönhatás felületi, és nem érinti a vezikula belső szerkezetét. Ezekből arra következtethetünk, hogy az ERDk ionos jellegű kölcsönhatás útján kötődnek a foszfolipid vezikulákhoz, amit a vezikula jelenlétében felvett CD spektrumok is alátámasztanak. Ugyanis a vezikula jelenlétében felvett CD spektrumok nem mutattak növekedést a fehérjék α -hélix tartalmában. Ez az eredmény fontos előrelépés a membránkötés jellegének a vizsgálatához, de nem elegendő a kötődés pon-

tos mechanizmusának a megértéséhez. Ehhez szükséges a kölcsönhatási hely szekvencia-specifikus vizsgálatokkal történő meghatározása.

3) Mindkét fehérjecsoport kapcsolatba hozható a sejtben kialakuló stressz válasszal, ami számtalan pontban megnyilvánulhat. A dehidrinek feltételezett funkciói között szerepel a fehérje-chaperone funkció, míg a riboszómális fehérjék rendelkezhetnek extrariboszómális funkcióval, ahogy a kiválasztott fehérjék is rendelkeznek RNS-chaperone aktivitással. Vizsgálataink során azt találtuk, hogy az ERDk erős védő hatást mutatnak a szubsztrátok (alkohol dehidrogenáz (ADH), lizozim, luciferáz (1. ábra) és citrát szintáz) hő, illetve kémiaailag indukált aggregációjával, és inaktiválódásával szemben. Ez a védő hatás számos esetben meghaladja a kontroll mérésben használt Hsp90 hatását. Ezzel ellentétben egyik ERD sem mutatott szignifikáns hatást reaktiválási mérés során. Ezek alapján mindkét ERD



fehérjét potenciálisan erős chaperone-ként funkcionál, amelyek a natív fehérjék védelmében játszanak szerepet, de a hibás szerkezetű, vagy frissen szintetizált fehérjék feltekeredésében nem. A négy riboszómális fehérje (L15, L16, L18 és L19) chaperone aktivitását két aktivitás-vesztési és egy reaktiválódási mérésben vizsgáltam meg. Mind a négy fehérje a kontroll Hsp90-el összemérhető hatást mutatott a szubsztrát fehérjék védelmében, illetve nagy mértékben megnövelték a denaturált szubsztrát fehérje reaktiválódásának mértékét. Ezek alapján azt a következtetést vonhatjuk le, hogy a riboszómális fehérjék stressz körülmények között a fehérjék védelmében és azok reaktiválódásában is szerepet játszanak. Gyors sejtosztódás során, amikor a riboszómális fehérjék magasabb koncentrációban találhatóak meg a citoszolban, pedig vélhetőleg a frissen szintetizált fehérjék feltekeredését is elősegíthetik. A vizsgált riboszómális fehérjék ezek mellett RNS chaperone aktivitással is rendelkeznek, tehát kettős, ún. „Janus” chaperone funkcióval rendelkeznek.

Vizsgálataink azt igazolják, hogy a rendezetlen fehérjék biokémiai szempontból potenciális chaperone-ként viselkednek *in vitro* körülmények között. A folyamat pontos mechanizmusa még mindig ismeretlen, aminek a felderítése komoly jelentőséggel bír a rendezetlen fehérjékkel kapcsolatos ismereteink bővítésében.

Publikációs lista

Tézisek témáját képező publikációk:

1. NMR relaxation studies on the hydrate layer of intrinsically unstructured proteins.
M. Bokor, V. Csizmok, D. Kovacs, P. Banki, P. Friedrich, P. Tompa, K. Tompa
Biophys J. 2005, 88(3): 2030-7.
2. Protein-water and protein-buffer interactions in the aqueous solution of an intrinsically unstructured plant dehydrin: NMR intensity and DSC aspects.
P. Tompa, P. Banki, M. Bokor, P. Kamasa, D. Kovacs, G. Lasanda, K. Tompa
Biophys J. 2006, 91(6): 2243-9.
3. Chaperone activity of ERD10 and ERD14, two intrinsically unstructured stress-related plant proteins
D. Kovacs, E. Kalmar, Zs. Torok, P. Tompa
Plant Physiology 2008, 147: 381–390.
4. Disordered plant LEA proteins as molecular chaperones
D. Kovacs, B. Agoston, P. Tompa
Plant Signalling & Behaviour, Nyomtatás alatt
5. Janus chaperones: assistance of both RNA- and protein folding by ribosomal proteins
D. Kovacs, M. Rakacs, B. Agoston, K. Lenkey, K. Semrad, R. Schroeder, P. Tompa
RNA, Elbírálás alatt

Tézisekhez nem kapcsolódó publikációk

6. Local structural preferences of calpastatin, the intrinsically unstructured protein inhibitor of calpain
R. Kiss, D. Kovacs, P. Tompa and A. Perczel
Biochemistry. 2008, 47(26): 6936-45.
7. Calcium-induced tripartite binding of intrinsically disordered calpastatin to its cognate enzyme, calpain.
R. Kiss, Z. Bozoky, D. Kovács, G. Róna, P. Friedrich, P. Dvortsák, R. Weisemann, P. Tompa, A. Perczel
Febs Lett. 2008, 582(15): 2149-54.
8. The androgen receptor gene is associated with cognitive performance in healthy Han Chinese individuals
D. Kovacs, E. Vassos, X. Liu, X. Sun, J. Hu, G. Breen, P. Tompa, D. A. Collier and T. Li
Psychoneuroendocrinology, Elbírálás alatt