

**Az enzimreakciók nemarrheniusi viselkedésének térszerkezeti háttere –
a konformációs flexibilitás szerepe a fehérjék hőmérsékleti adaptációjában**

Doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

Hajdú István

Témavezető:

Dr. Závodszy Péter

egyetemi tanár, az MTA rendes tagja

Eötvös Loránd Tudományegyetem Doktori Iskolája,

Szerkezeti Biokémia Doktori Program

Programvezető: Dr. Gráf László

Doktori Iskola vezetője: Dr. Erdei Anna

Készült:

A Magyar Tudományos Akadémia

Szegedi Biológiai Központjának Enzimológiai Intézetében

Budapest

2009



Tudományos előzmények

Az enzimek nagyfokú specificitását egyedi térszerkezetük és felszíni mintázatuk, hatékony funkciójukat szerkezetük rugalmassága, konformációjuk flexibilitása biztosítja. Ezen a fehérjékre és csakis a fehérjékre jellemző tulajdonságok mögött az élettelen világban is működő erők és fizikai kölcsönhatások vannak.

A fehérjemolekulák egyik sajátossága, hogy szerkezeti stabilitásukat és működőképességüket csak megfelelő környezeti tényezők mellett és meglehetősen szűk hőmérsékleti tartományban őrzik meg. Laboratóriumunkban fehérjék működésének szerkezeti hátterével foglalkozunk. Ennek során a környezeti tényezők hatását vizsgálva az enzimek működésére, számos érdekes megfigyelést tettünk. Tekintettel arra, hogy az egyes fehérjék konformációs stabilitása csak élettani hőmérsékletük szűk környezetében biztosított, hidegtűrő, mezofil és hőkedvelő mikroorganizmusokból izolált (ortológ) enzim sorokon vizsgáltuk a katalitikus funkciók és a szerkezeti stabilitás, valamint a konformációs flexibilitás összefüggéseit, kiszélesítve ezáltal a vizsgálható hőmérséklettartományt.

Arra a kérdésre kerestük a választ: miként valósul meg az enzimek szintjén a környezeti hőmérsékletre való alkalmazkodás. Miként tükröződik a katalitikus aktivitás megváltozott hőmérsékleti optimuma a fehérje konformációs stabilitásában és szerkezeti flexibilitásában. Arra a kérdésre is választ kerestünk, hogy milyen fizikai kölcsönhatások biztosítják a fehérjéknek a környezeti feltételekhez – elsősorban a környezeti hőmérsékletre történő alkalmazkodását az atomi kölcsönhatások és mozgások szintjén.

A kémiai reakciók hőmérsékletfüggését az Arrhenius-egyenlet írja le, amely szerint a reakciósebességi állandó a hőmérséklet függvényében exponenciálisan növekszik. Az enzimek által katalizált reakciók esetén a sebességi állandót az enzim konformációja és dinamikai sajátosságai módosítják, így a sebességi állandó hőmérsékletfüggésében ezeknek a fizikai tulajdonságoknak a hőmérsékletfüggése is tükröződik, ennek eredményeként az enzimkinetikai paraméterek hőmérsékletfüggése nem mindig követi a nemkatalizált kémiai reakciók esetén megfigyelhető lineáris összefüggéseket. A nemarrheniusi viselkedés vizsgálata során felvetődött az enzimreakciók csatolása a konformációs fluktuációkkal, és feltételezések szerint ezek hőmérsékletfüggése befolyásolhatja a katalizált reakciók összetett sebességi állandóinak viselkedését.

Célkitűzés

Az enzimek működésében két ellentétes hatású fizikai jelenségnek, a szerkezeti stabilitásnak és a konformációs flexibilitásnak finoman összehangolt egyensúlyára van szükség. Az enzimek aktivitásához szükség van konformációs mozgásokra, viszont a natív szerkezetük fenntartása is elengedhetetlen kritérium. Az enzimek rendkívül érzékeny objektumok, csak igen szűk hőmérséklettartományban működnek. Azonos funkciójú, de különböző hőmérsékletre alkalmazkodott enzimek összehasonlító vizsgálata segítségével a flexibilitás, stabilitás és aktivitás közötti összefüggések alaposabban vizsgálhatóak. Munkám során a katalizált reakciók és katalizátoraik konformációs flexibilitásának hőmérsékletfüggését vizsgáltam. Fő célom az enzimaktivitás és a konformációs flexibilitás közötti összefüggések részletes megértése volt. Vizsgálati objektumként két dehidrogenázt, a GAPDH-t és az IPMDH-t választottam.

- A GAPDH enzimek mezofil és termofil változatának vizsgálata során arra kerestem a választ, hogy miként valósul meg a magas hőmérsékletre való alkalmazkodás az enzimek konformációs flexibilitásában és stabilitásában.
- Az IPMDH enzimváltozatok hőmérsékleti adaptációját megvizsgálva kerestem arra a kérdésre a választ, hogy mennyire tekinthető általánosnak az a megfigyelés, hogy a konformációs flexibilitás beállítása a hőmérsékleti adaptáció fő stratégiája, vagy egyéb alkalmazkodási lehetőségek is megvalósulnak.
- Megfigyelésünk szerint az *E. coli* IPMDH által katalizált reakcióban a szubsztrátra vonatkozó Michaelis-Menten állandó hőmérsékletfüggésének van't Hoff ábrázolása szigmoid lefutást mutat. Arra a kérdésre kerestem a választ, hogy milyen fizikai kölcsönhatások következménye ez a korábban nem tapasztalt hőmérsékletfüggés. Feltételezésünk szerint a fehérje dinamikájának hőmérsékletfüggő változásai okozhatják a változást, kísérleteimmel a változás pontos okát kerestem.
- Korábbi tapasztalatok szerint a nagyobb flexibilitással rendelkező enzimek rendszerint nagyobb enzimaktivitással rendelkeznek. Arra a kérdésre is választ kerestem, hogy egy enzim konformációs flexibilitásának megnövelése célzott mutációkkal milyen hatást gyakorol az enzim aktivitására.

Alkalmazott módszerek

A vizsgálatokhoz rekombináns formában előállított bakteriális enzimekkel foglalkoztam. Az enzimek kifejezésére alkalmas DNS konstrukciók már készen voltak, csak az irányított mutációk elkészítése volt szükséges, valamint a fehérjék jobb hatásfokú előállítását lehetővé tévő változtatásokat végeztem el. Ezekhez a molekuláris biológia klasszikus módszertanát használtam. A fehérjeexpresszió és a fehérjék tisztítása, ellenőrzése SDS-PAGE gélen rutineljárásnak számítanak. Az enzimek jellemzésére kinetikai méréseket végeztem a hőmérséklet függvényében, a Michaelis-Menten kinetikát figyelembe véve. A hőstabilitási vizsgálatokhoz elsősorban differenciális pásztázó kalorimetriát (DSC), másodsorban cirkuláris dikroizmus spektroszkópiát (CD) használtam. A hőmérsékletfüggő konformációs változásokat távoli- és közeli-UV CD spektroszkópiával követtem. A fluoreszcencia rezonancia elektron transzfert disszociációs állandó, illetve a hőmérsékletfüggés kihasználása révén a nagyobb mértékű domén-domén mozgások követésére használtam. A H/D kicserélődés FTIR-rel követett módszere az enzimek konformációs flexibilitásáról szolgáltatott információkat. A szekvenciaösszerendezésnél, szerkezeti grafikus és összehasonlító vizsgálatoknál a csoport munkatársaitól kaptam segítséget.

Tudományos eredmények és következtetések

A GAPDH enzim két ortológja, a termofil *Thermotoga maritima*, valamint a nyúlból származó változata által katalizált reakció hőmérsékletfüggése egyaránt jelentős eltérést mutat a klasszikus arrheniusi lineáris viselkedéstől, azonban az észlelhető töréspont hőmérséklete a *Tm*GAPDH esetében 17°C-kal magasabb, mint a nyúlból származó enzimnél. A H/D kicserélődés vizsgálatok azt mutatják, hogy szobahőmérsékleten a *Tm*GAPDH konformációs flexibilitása alacsonyabb, viszont a hőmérsékleti optimumokon összehasonlítva a két enzim flexibilitását, azok megegyeznek, ennek alapján az enzimaktivitás nemarrheniusi hőmérsékletfüggése a konformációs dinamikával hozható összefüggésbe. A szerkezetek B-faktorainak analízise alapján a flexibilitás különbsége az enzimek koenzim- és szubsztrátkötő régióiban a legjelentősebb.

Ez az eredmény azt sugallja, hogy a konformációs flexibilitás és az enzimaktivitás között általános összefüggés állhat fenn: a túlzottan merev szerkezet alacsony aktivitáshoz vezet, a nagyobb flexibilitás pedig az aktivitást is növeli.

A termofil, mezofil és hidegtűrő IPMDH enzim az aktivitási paraméterek hőmérsékletfüggése tekintetében nagyon hasonlóan viselkedik. A hőmérsékletfüggést leíró Arrhenius és van't Hoff ábrázolások alakja megegyezik, a különbség az abszolút értékekben található: az enzimek aktivitása a hőstabilitásukkal fordítottan arányos. Megállapítható, hogy az enzimek működésével járó alapvető dinamikus folyamatok a hőmérsékleti adaptáció során nem változtak meg jelentősen, csak a hőmérsékleti optimumuk tolódott el a megkívánt irányba. A hidegtűrő *Vibrio* sp. I5 IPMDH hideghez való alkalmazkodásának stratégiája eltér a hidegkedvelő élőlények enzimeinél gyakorta megfigyelt, magas konformációs flexibilitással és hőlabilitással jellemezhető stratégiától. Ebben az esetben az alkalmazkodás a teljes hőmérsékleti tartományban jobb katalitikus aktivitás révén valósul meg, az enzim viszonylag magas hőstabilitása mellett.

Az *E. coli* IPMDH által katalizált reakcióban a szubsztrátra vonatkozó Michaelis-Menten állandó hőmérsékletfüggésének van't Hoff ábrázolása szigmoid lefutást mutat.

CD és DSC méréseim szerint a szigmoid változást nem konformációváltozás okozza. A H/D kicserélődés mérésekből meghatározott ΔG_{mic} mikro stabilitási szabadentalpia-értékek hőmérsékletfüggése azt mutatja, hogy 30°C-on – ami megfelel a disszociációs állandó szigmoid átmenete középpontjának – a szabadentalpia jelentősen csökken, ami a konformációs flexibilitás növekedését, új fluktuációk megjelenését indikálja.

A nagyobb mérvű konformációs mozgásokat (domének egymáshoz képesti elmozdulását) FRET mérésekkel jellemeztem. A FRET-hatékonyságnak a donoremiszióval való korrekciójával kapott f' paraméter értéke jellemzi a fehérje dinamikáját, ebben az esetben a domének egymáshoz viszonyított relatív fluktuációjának amplitúdóját. Az f' értéke az IPM-mentes NADH-IPMDH komplexben 30°C környékén jelentősen emelkedik, ami a konformációs fluktuációk nagyobb amplitúdójával magyarázható.

Az IPMDH katalitikus hatékonysága ($k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$) szélesebb hőmérséklettartományban sem változik lényegesen, ezt az enzim-szubsztrát kölcsönhatás hőmérsékletfüggése okozza. Magasabb hőmérsékleten a szubsztrát affinitása alacsonyabb, a csökkenő affinitás háttérében két folyamat együttes hatása állhat: a domén-domén mozgások, valamint a lokális fluktuációk hatása. A kísérleti eredmények alapján a szubsztrát kötődése „induced fit” mechanizmus szerint megy végbe. A magasabb hőmérsékleten talált nagyobb amplitúdójú „hinge-bending” fluktuációk megnehezítik az IPM kötődését, ezáltal csökkentik az enzim affinitását a szubsztráthoz, és ez a fő okozója a $K_{\text{M,IPM}}$ szigmoid jellegű növekedésének a 20-40°C hőmérséklettartományban, ennek következményében alakul ki az IPMDH katalitikus hatékonyságának rendellenes hőmérsékletfüggése.

Az IPMDH esetében tehát közvetlen összefüggést találtunk a konformációs flexibilitás egy bizonyos típusa – a relatív doménmozgásokhoz tartozó flexibilitás – és az enzimaktivitással összefüggő egy bizonyos paraméter – a szubsztrát disszociációs állandója – között. Az intenzívebb fluktuációk megnehezítik a szubsztrát kötődését, ezzel csökkentve a katalitikus hatékonyságot. A flexibilitás–aktivitás összefüggésnek tehát még az iránya is attól függ, milyen típusú flexibilitást és milyen aktivitási mérőszámot vizsgálunk.

A konformációs flexibilitás növelése mutációk révén a nemkonzervált prolinok glicinre való cseréje útján megvalósítható, ezt H/D kicserélődés mérések alátámasztják. A *Tt*IPMDH így létrehozott mutánsainak hőstabilitása alacsonyabb a vad típusnál, a beépített glicinek számával arányosan. A mutáns enzimek hőstabilitása és konformációs flexibilitása között van összefüggés, noha a korreláció nem tökéletes. Az enzimaktivitás és flexibilitás között összefüggés nem mutatható ki. Az egyszerűbb fizikai paraméterek (hőstabilitás, flexibilitás) módosítására az egyszerű, pontmutációkon alapuló módszer megfelelő viszont az enzimaktivitás módosítására ez az eljárás nem alkalmas.

Ezek a kísérletek az mutatják, hogy annak ellenére, hogy bizonyos esetekben bizonyos típusú konformációs flexibilitások és bizonyos enzimkinetikai mérőszámok között összefüggés található, a flexibilitás és az aktivitás között nincsen általános, direkt, egyszerű összefüggés, amelyet felhasználhatnánk az aktivitás növelésére. A katalitikus funkció több tényező összjátékának az eredménye, melyek közül csupán az egyik a flexibilitás. Ennek köszönhető a környezeti adaptáció természetben megfigyelt stratégiáinak sokfélesége.

Az értekezés témaköréhez kapcsolódó közlemények

Svingor A, Kardos J, Hajdú I, Németh A, Závodszy P. (2001)

A better enzyme to cope with cold. Comparative flexibility studies on psychrotrophic, mesophilic, and thermophilic IPMDHs.

J. Biol. Chem. **276**, 28121-28125.

IF: 7,258

Gráczer E, Varga A, Hajdú I, Melnik B, Szilágyi A, Semisotnov G, Závodszy P, Vas M. (2007)

Rates of unfolding, rather than refolding, determine thermal stabilities of thermophilic, mesophilic, and psychrotrophic 3-isopropylmalate dehydrogenases.

Biochemistry. **46**, 11536-11549.

IF: 3,368

Hajdú I, Bőthe C, Szilágyi A, Kardos J, Gál P, Závodszy P. (2008)

Adjustment of conformational flexibility of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase as a means of thermal adaptation and allosteric regulation.

Eur Biophys J. **37**,1139-1144.

IF: 2,234

Hajdú I, Szilágyi A, Kardos J, Závodszy P (2008)

A link between hinge-bending domain motions and the temperature dependence of catalysis in IPMDH

Biophys J, beküldve

Az értekezés témaköréhez nem kapcsolódó közlemények

Debreczeni JE, Farkas L, Harmat V, Hetényi C, Hajdu I, Závodszy P, Kohama K, Nyitray L. (2005)

Structural evidence for non-canonical binding of Ca²⁺ to a canonical EF-hand of a conventional myosin.

J. Biol. Chem. **280**, 41458-41464.

IF: 5,854

Flachner B, Varga A, Szabó J, Barna L, Hajdú I, Gyimesi G, Závodszy P, Vas M. (2005)

Substrate-assisted movement of the catalytic Lys 215 during domain closure: site-directed mutagenesis studies of human 3-phosphoglycerate kinase.

Biochemistry. **44**, 16853-16865.

IF: 3,848

Az értekezés témaköréhez kapcsolódó előadások

Hajdú István, Szilágyi András, Kardos József és Závodszy Péter: Az enzimek nemarrheniusi viselkedésének térszerkezeti háttere, Straub Napok, Szeged 2000.

István Hajdú, András Szilágyi and Péter Závodszy: How Does Elevated Temperature Improve the Catalytic Properties of Enzymes? (2001)

Nova Acta Leopoldina Supplementum 16, 137-138.

Hajdú István, Szilágyi András, Csala Zoltán, Závodszy Péter: Az enzimreakciók nemarrheniusi viselkedésének szerkezeti háttere, MBFT Molekuláris Biofizikai Szekció Szekcióülés, Veszprém 2003.

Hajdú István, Szilágyi András, Csala Zoltán, Závodszy Péter: Az enzimreakciók nemarrheniusi viselkedésének térszerkezeti háttere, A Magyar Biofizikai Társaság XXI. Kongresszusa, Szeged 2003.

Hajdú István: A merev fehérje modellektől a kvantum enzimológiáig, A Magyar Tudományos Akadémia Biológiai Tudományok Osztálya tudományos előadói ülése, Budapest 2004.

Hajdú István, Csala Zoltán, Barna László, Szilágyi András, Závodszy Péter: A konformációs flexibilitás szerepe az enzimek működésében és stabilitásában, A Magyar Biofizikai Társaság XXII. Kongresszusa, Debrecen 2005.

István Hajdú, András Szilágyi, József Kardos, Péter Závodszy: Adaptation of dehydrogenases to extreme environments. Regional Biophysics Meeting, Balatonfüred, 2007.

Az értekezés témaköréhez kapcsolódó posztterek:

Szilágyi András, Hajdú István, Svingor Ádám, Závodszy Péter: Különböző hőstabilitású izopropil-malát dehidrogenázok aktivitásának rendhagyó hőmérsékletfüggése, A Magyar Biokémiai Egyesület Molekuláris Biológiai Szakosztálya 6. Munkaértekezlete, Sárospatak 2001.

Péter Závodszy, István Hajdú, András Szilágyi: Conformational flexibility and non-Arrhenius behaviour of enzymatic reactions XIV International Biophysics Congress, Buenos Aires 2002.

István Hajdú, András Szilágyi, József Kardos, Péter Závodszy (2007) Thermal adaptation of enzymatic reactions is driven by conformational fluctuations 6th European Biophysics Congress, London 2007.

European Biophysics Journal, **36**,P-414

IF:2,234