Kutatási eredményeim a 2014 február 1- augusztus 31. a Varga József Alapítvány Pungor Ernő doktorjelölti ösztöndíjas időszak során

1. projekt

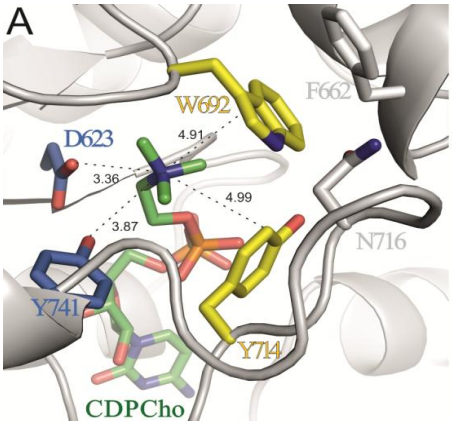
Kvaterner ammónium ligandot használó enzimek ligand kötőhelyének általános szerkezeti felépítésének felismerése és jellemzése

A 2013 decemberi doktorjelölti eljárás indítás előtt küldtem be egy kéziratot az Angewandte Chemie folyóiratba, melynek témája a Plasmodium falciparum CTP:foszfokolin citidililtranszferáz (*Pf*CCT) enzim kolin csoportot koordináló aktív helyen elhelyezkedő zseb szerkezetének és működésének elemzése. Az ebben a kéziratban leírt eredmények összefoglalását a „Doktori munkám során elért eredmények.doc" fájl tartalmazza. A kéziratot az újság szerkesztője visszaküldte, számos átdolgozási javaslattal. Ígéretet kaptunk, hogy amennyiben a kért kísérleteket elvégezzük, ismét beküldhetjük a kéziratot, ugyanazon bírálókhoz, akik így a saját elvárásaiknak megfelelő változtatásokat várhatóan értékelik. A kéziratot augusztusban visszaküldtük, jelenleg elbírálás alatt áll három hét óta.

Főbb kiegészítések:

1.1 A *Pf*CCT enzim kolin kötő helyének vizsgálata

A *Pf*CCT enzim aktív helyén a szubsztrát ill. termék kolin csoportját koordináló fehérje oldalláncok mind a négy képviselőjének vizsgáltam a szerepét helyspecifikus mutagenezissel, kiegészítve az eleddig csupán a Trp692 oldalláncra kiterjedő tanulmányt. Ennek során az aromás gyűrűvel kation-π kölcsönhatást létesítő aromás oldalláncokat más aromás oldalláncokra cseréltem (Tyr-> Phe; sárga színkód), míg a kolin csoport elektrosztatikus kölcsönható partnerei helyett hasonló szerkezetű, töltéssel nem rendelkező oldalláncokat juttattam be (Tyr-> Phe, Asp-> Asn; kék színkód) (1. ábra).

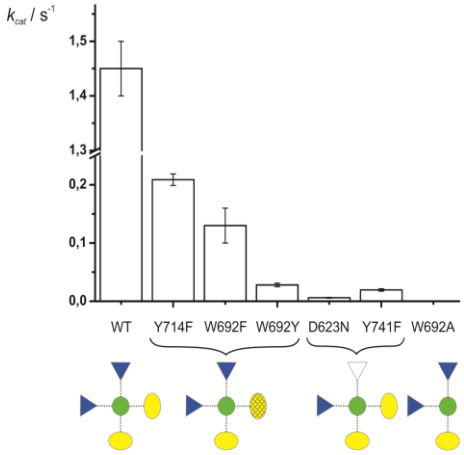


1. ábra

A *Pf*CCT enzim aktív helyén a CDP-kolin termék kolin csoportját koordináló fehérje oldalláncok.

Az így létrehozott fehérje pontmutánsokat heterológ módon, *E coli* gazdában termeltem, majd nikkel-affinitás kromatográfia, illetve gél szűrés módszerekkel tisztítottam. A fehérje konstrukciók elektrospay ionizációs tömegspektrometriás vizsgálata (Vékey Károly, MTA TTK) kimutatta, hogy az egyes mutációk nem befolyásolták a fehérje dimer oldatbeli állapotát.

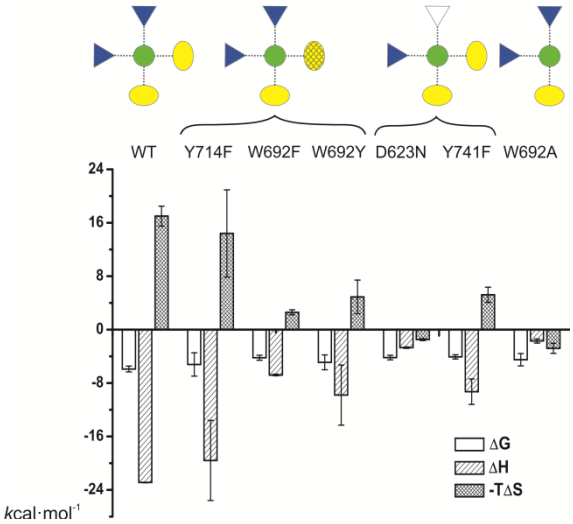
A létrehozott mutánsok enzim aktivitását egy folyamatos, csatolt fotometriás módszerrel követve megmutattam, hogy a mutációk nagy többsége jelentős aktivitás csökkenést eredményezett, ezen belül a töltött → töltés nélküli oldallánc cserék drasztikusabb hatást okoztak.



2. ábra A *Pf*CCT enzim mutánsainak enzim aktivitása

A mutációk okozta változásokat az ábra alatt sematikusan jelöltem. Balról jobbra: vad típusú enzim eredeti kolin kötőhellyel, megváltozott aromás gyűrű a kation- π kölcsönhatásban, töltött oldallánc töltés nélkülire cserélése, egy aromás oldallánc alaninra cserélése, az aromás gyűrű eltörlésével.

Megvizsgáltam a létrehozott mutánsok ligand kötő képességét is, ennek során CDP-kolin termék kötődését vizsgáltam izotermális titrációs mikrokalorimetria módszerrel (2.ábra).



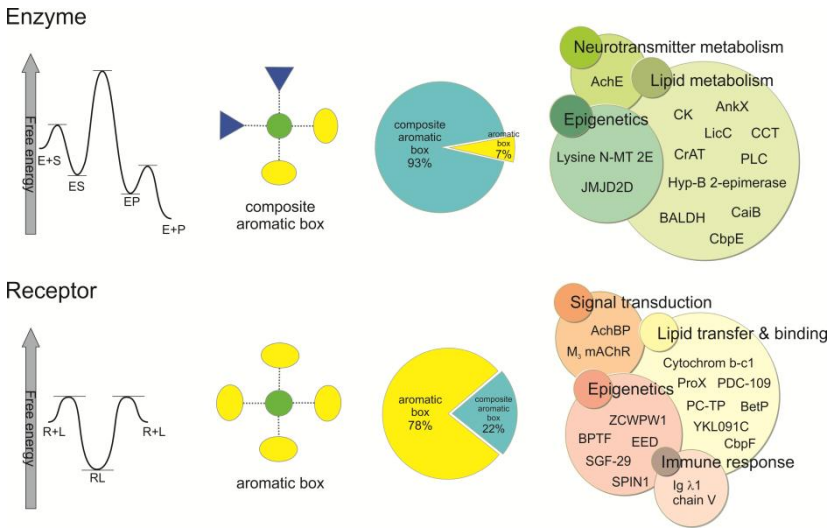
3. ábra A *Pf*CCT enzim mutánsainak CDP-kolin kötés termodinamikája. Az oszlopdiagram az egyes mutánsok ligand kötési szabadentalpiáját, valamint ennek entalpikus és entrópikus összetevőit mutatja, rendre üres, csíkos és sraffozott oszlopokkal. Az egyes mutációk okozta változásokat sematikusan jelöltem az oszlopdiagram felett (vö. 1. ábra).

A mutációk csökkentették az enzim CDP-kolin affinitását, ami a kötést meghatározó entalpikus komponens nagysága is mutat. Ez arra utal, hogy az 1. ábrán bemutatott enzim aktivitás csökkenésekében meghatározó szerepet játszik a kolin koordináció változása. A kinetikai és ligand kötési mérések együttesen rámutatnak az elektrosztatikus és kation-π kölcsönhatások

megkülönböztetésének jogosságára, ez a legszembetűnőbb módon a Y714F és Y741F mutációk esetén érhető tetten. A kation- π kölcsönható partner Y714 aromás oldalláncát másik aromás csoportra (F) cserélése mérsékelten zavarta az enzim aktivitását és ligand kötő képességét, míg ugyanez a változtatás a Y741 oldallánc esetén drasztikus hatással bírt, mivel itt a fenolos OH csoport eltűnésével az elektrosztatikus kölcsönhatás nem jöhetett létre.

1.2 „Összetett aromás doboz”/composite aromatic box enzimekre jellemző általános kvaterner ammónium kötőhely felismerése a Fehérje Adat Bank (PDB) elemzésével

A kézirat előző verziójában a kvaterner ammónium kötő enzim szerkezetek elemzését szélesebb alapra helyeztem. A szerkezeteket leíró irodalmakból kiindulás helyett a PDB adatbázis szerkezeteire végeztem keresést a Relibase szerver használatával, kvaterner ammónium csoportot tartalmazó találatokat keresve. Az így kapott elsődleges találati listából kiszűrtem a ligandot oldószernek kitett környezetben tartalmazó szerkezeteket, valamint irodalmi kötéstávolság konvenciók szerint meghatároztam kvaterner ammónium csoport koordinációs partnereit. Ezután a találatokat csoportosítottam a fehérje kötőhelyének funkciója szerint, enzimekre és receptorokra. Végül a statisztikai analízisbe minden egyes fehérjéből egyetlen szerkezetet vontam be, hogy az egyes fehérjék kutatási eredményessége ne torzítsa az összehasonlítást. Az új, teljes körű keresés megerősítette az kvaterner ammónium csoportok enzim és receptor-típusú felismerésének meghatározó különbségét (4. ábra). A composite aromatic box /összetett aromás doboz kötőhely 15 különböző fehérje feltekeredési családba (protein family clan) tartozó enzim esetén jelentkezett, így számos evolúciósan különböző különböző útvonalon alakult ki ez a kedvező felismerő hely szerkezet.



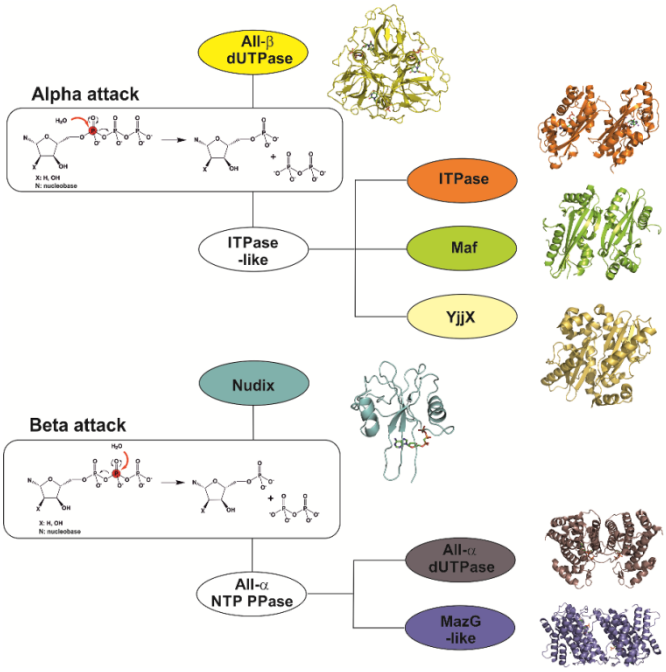
4. ábra Kvaterner ammónium ligandot felismerő enzimek és receptorok kötőhelyének jellemzése. Amíg a receptor típusú fehérjék meghatározó kötőhelye típusa a három, vagy négy aromás oldallánc alkotta ’aromatic box’(lent), az enzim találatok túlnyomó többsége esetén a kötésben egy vagy kettő aromás oldallánc, valamint töltött oldalláncok együttesen vettek részt, innen adódott az összetett aromás doboz”/composite aromatic box elnevezés (fent).

2. projekt

A genomi integritás szempontjából káros dezoxinukleotid trifoszfátok hidrolízisét végző dezoxinukleotid pirofoszfatáz enzimek katalitikus mechanizmusának összehasonlítása

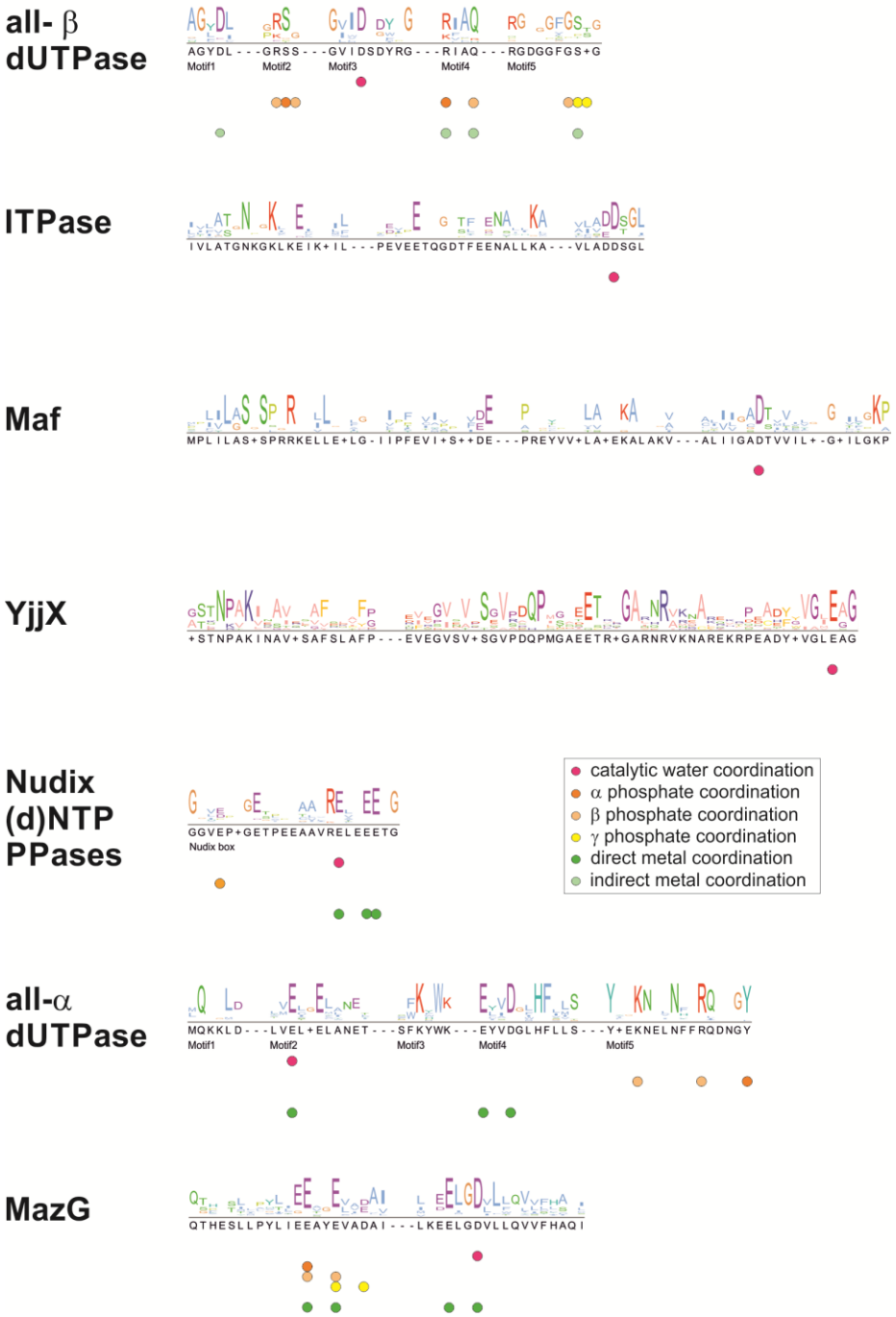
2014 tavaszán kutatócsoportunk egy felkérést kapott összefoglaló (review) cikk írására a FEBS Journal folyóirattól. A felkérés a nem DNS vagy RNS alkotóegységet képző nukleotid trifoszfátok sejtbeli mennyiségét kontrolláló enzimek újabb kutatási eredményeinek összefoglalására szólt, szerkezet, mechanizmus és biológiai jelentőség szempontjából. Ez a téma különösen releváns kutatócsoportunk számára, mivel az érdeklődésünk fókuszát képző témáról van szó. Saját doktori témám egy része is az ilyen feladatot ellátó dezoxiuridin trifoszfát pirofoszfatáz, dUTPáz szerkezetének és működésének vizsgálata (Takács, Nagy, FEBS Lett, 2010). Az irodalom kutatás, az összefoglaló írás és az ábra készítés elvégzésében meghatározó szerepem volt: 80% részesedés a nem PhD fokozattal rendelkező kutatókat tekintve, a társszerzői nyilatkozat alapján. A review cikket júliusban fogadta el a folyóirat. Az alábbiakban a cikkben közölt főbb megállapításokat foglalom össze.

A genetikai információ tartalom megőrzését szolgálják mind a nukleinsavak módosított bázisait kivágó mechanizmusok, mind a beépítés előtt álló nem megfelelő (például kémiai vagy sugárzásos folyamatokban módosult) (dezoxi)nukleotid trifoszfátok (dNTP) nukleinsav szintézist megelőző elbontása. Utóbbi folyamathoz az élő rendszerek foszfát helyett pirofoszfát csoport eltávolítás végző nukleotid trifoszfát pirofoszfatáz enzimeket alkalmaznak, így a termék monofoszfátokat a nem nukleotid specifikus nukleozid difoszfát kinázok nem képesek visszaalakítani eredeti formájukra. Az ilyen típusú enzimek jelentőségét jól mutatja, hogy célzott terápiájuk hatásos és ígéretes célpont számos kórokozó valamint rákbetegségek elleni küzdelemben. Az ilyen feladatot ellátó enzimek kémiai működés szempontjából két csoportba oszthatóak, aszerint, hogy a katalizált reakció során a nukleofil támadás a nukleotid trifoszfát α- vagy β-foszforatomján történik.



5. ábra Nukleotid pirofoszforolízist végző enzimek csoportosítása katalitikus mechanizmus szempontjából.

Az elmúlt tíz évben számos biofizikai módszerrel igazolták a dNTP hidrolízist végző enzimek mechanizmusát, ezzel hozzájárulva az eleddig kevéssé tanulmányozott enzim képviselők működésének megértéséhez. A rekombináns módon termelt enzimek oldatbeli, esetenként radioaktív izotópokat alkalmazó kinetikai mérései mellett a háromdimenziós enzim szerkezetek megoldása adta az ehhez szükséges bizonyítékokat. Az alább részletezett mechanizmusokban résztvevő enzim oldalláncok megőrzöttségét mutatja a 6. ábra, míg a 7. ábra szerkezeti képet ad a két enzim típus nukleotid koordinálásáról.

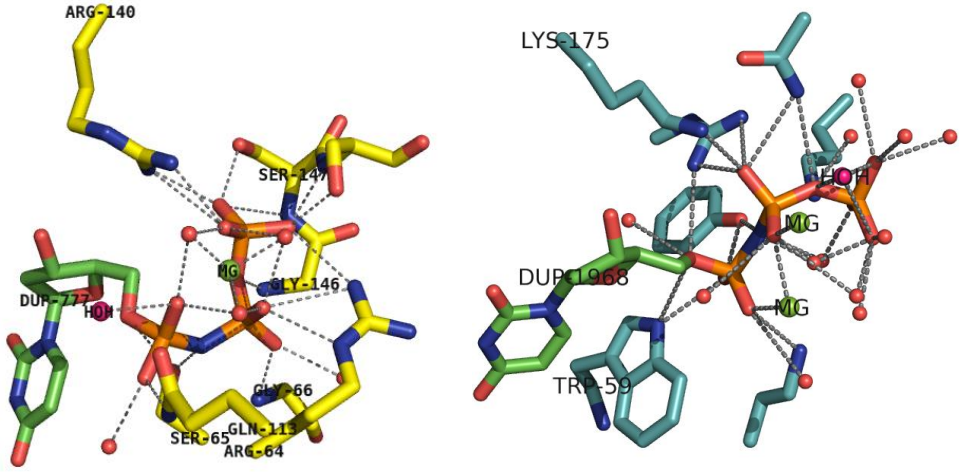


6. ábra A dNTP pirofoszforolízisében résztvevő enzimek szekvenciái, kiemelve a konzervált oldalláncokat. A különböző mechanizmussal működő enzimek eltérést mutatnak a nukleotid trifoszfát lánc koordinációs mintázatában, valamint a fémion kofaktor(ok) kötésében.

A β-foszfáton történő támadással jellemezhető működést kettő, vagy három Mg^{2+} kofaktor fémion segíti elő, ezek kulcsszerepet játszanak a nukleotid trifoszfát lánc, valamint a támadó oldószer részecske (víz vagy hidroxid ion) koordinálásában. A fémionok jelenlétét és a reakció során változó koordinációjukat az aktív helyen megtalálható szigorúan konzervált savas oldalláncok - glutamátok és aszpartátok- egy csoportja biztosítja. Ezen mechanizmus során érdekes módon a nukleotid γ-foszfát koordináció nem bír meghatározó jelentőséggel.

Az α-foszfáton történő támadást katalizáló enzimek esetén kulcsfontosságú a nukleotid trifoszfát megfelelő konformációjának biztosítása a katalitikus hatékonysághoz, amiben lényegi szerepet játszik az enzimek egyetlen Mg^{2+} kofaktora, valamint a γ-foszfátot koordináló számos megőrzött oldallánca. Általános jellemző, hogy a támadó ágens deprotonálását az egy konzervált aszpartát oldallánca végzi ezen enzimek esetén, illetve reakció átmeneti állapotában a nukleotid α- és β-foszfátokat összekötő oxigén atomján megjelenő töltés stabilizálása szerin illetve lizin oldallánc révén.

Érdekes módon a dUTPáz enzim esetén mindkét típusú működésre van példa, melyek így az evolúció során különböző eredetből konvergáltak ugyanazon feladat betöltésére (7. ábra).



7. ábra Eltérő kémiai működésű dUTPázok aktív helye, dNTP szubsztrát analóg koordinációjának pillanatában. **A)** Az α-foszfor atomon történő nukleofil támadást katalizáló homotrimer szerkezetű dUTPáz aktív helye. Megfigyelhető a számos, γ-foszfátot koordináló oldallánc valamint a katalitikus fémion mindhárom foszfát csoportot magában foglaló koordinációs szférája. **B)** A β-foszfor atomon történő nukleofil támadást katalizáló homodimer szerkezetű dUTPáz aktív helye. Ezen esetében a ligand kötésben és a katalízisben kulcsszerepet játszanak az ábrán is látható Mg^{2+} ionok.