

OTKA K60694 zárójelentés

A szekurin-szeparáz rendszer szerkezeti-funkcionális jellemzése

A tervezett munka a rendezetlen fehérjék szerkezet-funkció összefüggéseire kívánt rávilágítani, a sejtciklus szabályozásában kulcsszerepet játszó szekurin-szeparáz rendszer részletes funkcionális-szerkezeti jellemzésén keresztül. A vizsgálatokat egyrészt a szekurin szerkezeti rendezetlensége, másrészt evolúciós variabilitása indokolta, amik látszólagos ellentmondásban vannak a szekurin alapvető sejtbiológiai funkciójával. További érdekessége a rendszernek, hogy a szekurin szeparázra kifejtett hatása szokatlan kettősséget mutat, amennyiben specifikusan gátolja és aktiválja is az enzimet (funkcionális promiskuitás, „moonlighting”). A szekurin-szeparáz rendszer vizsgálatának fontosságát az is alátámasztotta, hogy a szekurin hibás működése elégtelen kromoszómaszétválást, és így aneuploidiát okoz, ami többféle rák kialakulásában is kiváltó okként szerepel. A vizsgálatok alapján azt reméltük, hogy közelebb jutunk a szerkezeti rendezetlenség és funkció közötti kapcsolat megértéséhez, egyúttal hozzájárulunk a szekurin hibás működését korrigáló terápiás beavatkozás lehetőségeinek kidolgozásához is. A tervezett kutatás céljai tételesen az alábbiak voltak:

- 1) A szeparáz enzim katalitikus aktivitásának jellemzése.
- 2) Humán szekurin részletes szerkezeti jellemzése, és három fajból (élesztő, muslica, ember) származó szekurinek összehasonlító vizsgálata.
- 3) A szekurin-szeparáz kölcsönhatás részletes jellemzése.

Az elvégzett munka során a terveket számos ponton sikerült megvalósítanunk, néhol azonban eltértünk azoktól, illetve sokféle egyéb vizsgálatot is folytattunk. Az eltérés oka elsősorban az volt, hogy a szeparáz enzimet nem sikerült aktív formában előállítanunk, az erre irányuló kísérleteket nemzetközi együttműködésben folytatjuk. Az eredményeket az alábbiakban részletezzük.

- 1) Sikeresen megvalósítottuk a rendezetlen humán szekurin klónozását, és NMR segítségével történő részletes szerkezeti jellemzését, ami a fehérje teljes rezonancia-asszignációját, másodlagos kémiai eltolódás értékeinek és relaxációs paramétereinek meghatározását, részletes elemzését [18]. Ezen megfigyelésekből részletes szerkezeti modellt állítottunk fel a szekurin-szeparáz kölcsönhatás molekuláris mechanizmusára is. A szekurin jellemzését egy alapvetően újszerű NMR technika (H-start) kidolgozása is

elősegítette. Ennek lényege, hogy a kiindulási polarizációs forrást az ^1H magok képviselik, amely során lényeges érzékenységnövekedés érhető el a heteronukleáris kémiai eltolódások frekvencia-jelöléséből és a karbonil szén rezonanciák látszólagos szétkapcsolásából. A módszert külön metodikai cikkben publikáltunk [19].

2) Ezzel párhuzamosan elkészült többféle szekurin (*S. cerevisiae*, *D. melanogaster* és humán) összehasonlító szerkezeti vizsgálata is. Ennek során azt kívántuk megállapítani, hogy a szekurink közötti kétségtelen funkcionális analógia és a rendkívüli szekvenciális diverzitás miképp egyeztethető össze. Ezt különböző szerkezeti technikák (CD, gél-filtrálás, natív/8M urea 2D elektroforézis, limitált proteolízis), valamint bioinformatikai megközelítések (konzervált motívumok keresése, rendezetlenségi-rendezettségi mintázat elemzése, exon/intron szerkezet konzerváltságának megfigyelése) alkalmazásával, a hasonlóságok és különbségek számbavételével kívántuk megközelíteni. Arra jutottunk, hogy a funkció valószínűleg úgy őrződött meg, hogy a molekuláris felismerés szempontjából fontos rövid motívumok megmaradtak, ezeket változó hosszúságú, rendezetlenségüket megőrző, de szekvenciálisan teljesen eltérő szakaszok kötik össze, és a konzerváltság az exon/intron szerkezetben is felismerhető. Eredményeinkből közlemény elkészítése folyamatban van.

3) A szeparáz enzim katalitikus aktivitásának bizonyítása, és szekurin általi gátlásának jellemzése csak részleges sikereket hozott. A katalitikus domén klónozását megoldottuk, nagyszámú konstrukció készült, amelyek közül több is oldható fehérjét eredményezett. Ezek aktivitását azonban nem tudtuk mérni, aminek következtében az enzim szekurin általi gátlást sem tudtuk enzimológiailag jellemezni. A munkát folytatjuk, folyamatban van egyrészt a fehérje különböző körülmények közötti kifejezése, denaturációja és renaturációja, és aktív formában való előállítás, másrészt nemzetközi együttműködésben Prof. Darren Hart-tal (EMBL Grenoble) az ESPRIT (Expression of Soluble Proteins by Random Incremental Truncation) könyvtár-szűrési technika alkalmazása további oldható, remélhetőleg aktivitást is mutató szeparáz konstrukció létrehozása. A kölcsönhatás vizsgálatára alkalmazni kívánt megközelítést azonban sikerrel használtuk fel egy másik enzim-inhibitor pár, a kalpain-kalpaszattin rendszer részletes szerkezeti-funkcionális jellemzésére, amely során elsőként írtuk le az inhibitor nem-kötött állapotban megfigyelhető rendezetlenségét, és lokális tranziens rendeződését [13], valamint a kötött állapotban történő három ponton megvalósuló (tri-partite) lehorgonyzódást [14]. Bár az előbbieket értelmében ezt szerkezetiileg nem tudtuk bizonyítani, hasonló kötési módot valószínűsítettünk a szekurin-szeparáz rendszer esetében is [18], ami kalpain-kalpaszattin

rendszerrel összhangban egy új szerkezeti jelenség, a kötött állapotban is megmaradó rendezetlenség (bolyhosság, „fuzziness”) felismeréséhez is elvezetett [10].

4) A fehérjék szerkezeti rendezetlenségének vizsgálata eközben számos kapcsolódó területen is hatékonyan folyt. Az adott időszakban - és az OTKA támogatás segítségével - lényeges eredményeket értünk el bioinformatikai eszközök fejlesztésében [7], majd fontos megfigyeléseket, felismeréseket tettünk ezek alkalmazásával. Megfigyeltük például a kölcsönhatási hálózatok csomóponti helyeit elfoglaló fehérjék (hubok) kiemelkedő rendezetlenségét [1], az aktuálisan kifejeződő gének (vagyis proteom) magas átlagos szerkezeti rendezetlenségét [2], miközben fontos előrelépést értünk el a domén koncepció rendezetlen állapotra való kiterjesztésében is [3, 15].

5) Rámutattunk, majd részletesen elemeztük egy újonnan felismert fehérje-fehérje kölcsönhatási elv (felismerés rövid felismerő motívumok, „short linear motifs” által) és a rendezetlenség kapcsolatát [4], majd ezt követően a kölcsönhatás molekuláris mechanizmusát is [5]. Megfigyeltük, hogy a fehérje-komplexek összeszerelődésében kitüntetett szerepet játszik az alegységek szerkezeti rendezetlensége [6]. Kölcsönhatási hálózatok elemzésével azt is kimutattuk, hogy a rendezetlen fehérjéknek a sejtben nincs szükségük chaperonok általi védelemre [11], és átlagos életidejük sem tér el lényegesen a rendezett fehérjékétől, vagyis a proteolitikus rendszerek szabályozottsága miatt nincsenek kitéve gyors degradációnak *in vivo* [9].

6) A rendezetlen fehérjék általunk javasolt chaperone funkciójával kapcsolatban is lényeges további felismeréseket tettünk, szerkezetileg és funkcionálisan részletesen jellemeztünk egy rendezetlen, a kromatin szerkezet átrendeződéseit elősegítő fehérjét (Df31) [8], illetve két növényi stressz-fehérjét, amelyek chaperone aktivitását elsőként sikerült igazolnunk [12, 16]. Igazoltuk a rendezetlenség kitüntetett szerepét transzkripció szabályozásban is [17].

Mindezen vizsgálataink eredményeképp az OTKA K60694 pályázat támogatásával összesen 19 publikációnk jelent meg, ezek összesített impakt fatora 93.0, és az ISI szerint az elmúlt néhány év alatt összesen már 360 hivatkozást kaptak.

OTKA K60694 pályázat támogatásával megjelent publikációk

1. Dosztányi, Zs., Chen, J., Dunker, A. K., Simon, I. and Tompa, P. (2006) Disorder and sequence repeats in hub proteins and their implications for network evolution. *J. Proteome Res.* **5**, 2985-2995
2. Tompa, P., Dosztányi, Zs. and Simon, I. (2006) Prevalent structural disorder in *E. coli* and *S. cerevisiae* proteomes. *J. Proteome Res.* **5**, 1996-2000
3. Dosztányi, Zs., Sándor, M., Tompa, P. and Simon, I. (2007) Prediction of protein disorder at the domain level. *Curr. Prot. Pept. Sci.* **8**, 161-171
4. Fuxreiter, M., Tompa, P. and Simon, I. (2007) Local structural disorder imparts plasticity on linear motifs. *Bioinformatics*, **23**, 950-956
5. Mészáros, B., Tompa, P., Simon, I. and Dosztányi, Zs. (2007) Molecular principles of the interactions of disordered proteins. *J. Mol. Biol.* **372**, 549-61
6. Hegyi, H., Schád, E. and Tompa, P. (2007) Structural disorder promotes assembly of protein complexes. *BMC Struct. Biol.* **7**, 65
7. Dosztányi, Zs., and Tompa, P. (2008) Prediction of protein disorder. *Methods Mol. Biol.* **426**, 103-115
8. Szöllösi, E., Bokor, M., Bodor, A., Perczel, A., Klement, E., Medzihradszky, K. F., Tompa, K., and Tompa, P. (2008) Intrinsic structural disorder of DF31, a Drosophila protein of chromatin decondensation and remodeling activities. *J. Proteome Res.* **7**, 2291-2299
9. Tompa, P., Prilusky, J., Silman, I. and Sussman, J. (2008) Structural disorder serves as a weak signal for protein degradation within the cell. *Proteins* **71**, 903-909
10. Tompa, P. and Fuxreiter, M. (2008) Fuzzy complexes: polymorphism and structural disorder in protein-protein interactions. *Trends Biochem. Sci.* **33**, 2-8
11. Hegyi, H. and Tompa, P. (2008) Intrinsically disordered proteins display no preference for chaperone binding in vivo. *PLoS Comput. Biol.* **4**, e1000017
12. Kovács, D., Kalmár, É., Török, Zs. and Tompa, P. (2008) Chaperone activity of ERD10 and ERD14, two disordered stress-related plant proteins. *Plant Physiol.* **147**, 381-390
13. Kiss, R., Kovács, D., Tompa, P. and Perczel, A. (2008) Local structural preferences of calpastatin, the intrinsically unstructured protein inhibitor of calpain. *Biochemistry.* **47**, 6936-6945.
14. Kiss, R., Bozoky, Z., Kovács, D., Róna, G., Friedrich, P., Dvortsák, P., Weisemann, R., Tompa, P. and Perczel, A. (2008) Calcium-induced tripartite binding of intrinsically disordered calpastatin to its cognate enzyme, calpain. *FEBS Lett.*, **82**, 2149-2154
15. Tusnády, G.E., Kalmár, L., Hegyi, H., Tompa, P. and Simon, I. (2008) TOPDOM: database of domains and motifs with conservative location in transmembrane proteins. *Bioinformatics*, **24**, 1469-1470
16. Kovacs, D., Agoston, B., and Tompa, P. (2008) Disordered plant LEA proteins as molecular chaperones. *Plant Sign. Behav.* **3**, 710-713
17. Fuxreiter, M., Tompa, P., Simon, I., Uversky, V.N. Hansen, J.C. Asturias, F.J. (2008) Malleable machines take shape in transcriptional regulation *Nat. Chem. Biol.* **4**, 728-737
18. Csizmok, V., Felli, I., Tompa, P., Banci, L. and Bertini, I. (2008) Structural and dynamic characterization of intrinsically disordered human securin by NMR. *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 16873-16879
19. Bermel, W., Bertini, I., Csizmok, V., Felli, I.C., Pierattelli, R. and Tompa, P. (2009) H-start for exclusively heteronuclear NMR spectroscopy: the case of unfolded proteins. *J. Magn. Res.* **198**, 275-281