

A szerin oligopeptidázok egy proteáz és egy hét-lapátos propeller doménből állnak. Az utóbbi lefedi a katalitikus centrumot és csak oligopeptideket enged a katalitikus helyre. A szubsztrát bejutásának mechanizmusát vizsgáltuk a prolil oligopeptidáz esetében, melynek térszerkezetét előzőleg meghatároztuk, és megállapítottuk, hogy a kristályszerkezet egy merev struktúrát reprezentál, amelyben nincs bejárat még kis peptidek számára sem. Ehhez egy flexibilis szerkezetre van szükség. Két lehetőség merült fel: a fehérje vagy a propeller első és utolsó lapátja között nyílik szét, mivel ezek nincsenek kovalens módon összekötve, vagy a két domén között jut be a szubsztrát.

A problémát a következőképpen oldottuk meg. A fehérje szabad mozgását mindkét helyen (a propelleren belül és a domének között) diszulfid hidak beépítésével korlátoztuk. A ciszteineket hely-specifikus mutagenézis segítségével vittük be a fehérjébe és kidolgoztuk a ciszteinek diszulfiddá történő oxidálásának optimális körülményeit. Röntgen diffrakciós módszerrel megállapítottuk, hogy a diszulfid hidak valóban kialakultak a megfelelő helyen és növelték a fehérje szerkezetének stabilitását. Azt találtuk, hogy mind a katalitikus aktivitást mind a szubsztrát kötődését gátolták a diszulfidhidak. Ebből arra következtettünk, hogy a propeller és a peptidáz domén összehangolt mozgása szükséges az enzim működéséhez.

Hogy a propeller domén egymagában felelős lehet-e az oligopeptidáz aktivitásért, a prolil oligopeptidáz propeller doménjének előállításával és stabilitásának vizsgálatával tanulmányoztuk. A propeller domént sikerült kifejeznünk a peptidáz doméntől elkülönítve. Cirkuláris dikroizmus és tripszines emésztés segítségével kimutattuk, hogy a domén struktúrája megegyezik a természetes prolil oligopeptidázban lévő domén struktúrájával, sőt a mesterséges molekula lényegesen stabilisabbnak mutatkozott, mint a teljes oligopeptidáz molekula. Ezt több módszerrel igazoltuk: differenciális pásztázó kalorimetria, kinetikus denaturáció ureával, egyensúlyi denaturáció guanidinium kloriddal. A hét-lapátos propeller stabilitása alapján feltételeztük, hogy a hetedik lapát eltávolításával keletkező hat-lapátos propeller is létezhet. Ezt a mesterséges propellert sikerült is deléciós mutációval előállítanunk. Az eredményekből arra következtettünk, hogy a kovalens módon össze nem kötött propellerek stabil szerkezetek és a prolil oligopeptidáz katalízisének az 1-es és 7-es lapát nem távolodik el egymástól, a szubsztrát a két domén között jut el az aktív centrumba.

Az oligopeptidázok szerkezetének jelentős flexibilitása kell ahhoz, hogy a szubsztrát eljuthasson az aktív centrumhoz. A prolil oligopeptidáz aktivitását a FIRST (Floppy Inclusion

and Rigid Substructure Topology) módszerrel és atomi fluktuációval, amit molekuláris dinamikával határoztunk meg, megállapítottuk, hogy a propeller szerkezetének merevsége nem engedi meg, hogy a szubsztrát azon keresztül közelítse meg a katalitikus helyet. Ehelyett egy nagyon flexibilis csatornát találtunk a két domén között, amely a peptidáz domén N-terminális részét és a propeller doménhez tartozó hurkot (1992-205 aminosavak) foglalta magában. A flexibilis hurok funkcionális jelentőségét kinetikus vizsgálatokkal is kimutattuk, amennyiben a hurok elhasítása megváltoztatta a katalitikus aktivitást.

Mivel a peptidáz domén N-terminális része ahhoz a kapuhoz tartozik, amelyen keresztül a szubsztrát eljut az aktív centrumhoz, megvizsgáltuk, hogy a kapu kitágítása hogyan befolyásolja a katalízist. Ehhez a termofil *Pyrococcus furiosus* prolyl oligopeptidázt használtuk, mivel a csonkított emlős enzim nem bizonyult stabilisnak. A termofil *Pyrococcus furiosus* prolyl oligopeptidáz génjét klónoztuk, *Escherichia coli* sejtekben kifejeztük, és kidolgoztuk az enzim tisztítását. Az N-terminális rész (1-32 aminosavakat) eltávolítása után kinetikai, termodinamikai és stabilitási vizsgálatokkal megállapítottuk, hogy a specifitásra jellemző sebességi állandó a harmadára csökkent, míg a reakció hőmérsékleti optimuma 20 °C-kal lett alacsonyabb. A pH-sebességi állandó profil, a sebesség-meghatározó lépés és a termodinamikai paraméterek nem változtak lényegesen, míg a protein stabilitása, amit cirkuláris dikroizmus, differenciális pásztázó kalorimetriás mérés és guanidinium kloriddal történő denaturáció segítségével állapítottunk meg, jelentősen csökkent. Az eredmények azt mutatták, hogy az N-terminális rész eltávolítása nem könnyíti meg a szubsztrátnak az aktív centrumhoz való kötődését, függetlenül a szubsztrát nagyságától, hanem a protein stabilitását gyengíti, a stabilitás pedig a megfelelő aktív hely kialakításához szükséges.

A termofil és a mezofil prolyl oligopeptidáz közötti különbséget vizsgáltuk. Kimutattuk, hogy a termofil enzim az irodalmi adatokkal szemben gyakorlatilag nem képes hidrolizálni az azokazeint. Az autolízis, amit korábban megfigyeltek, a glicerinben lévő szennyezésre vezethető vissza. Kimutattuk továbbá, hogy az acilezési reakció sebességi állandójának pH-függése különbözik a sertés enzim pH-függésétől és a talált pK érték a katalitikus hisztidinre jellemző. Az eredményekből arra következtettünk, hogy a termofil enzim – hasonlóan a mezofilhez – valódi oligopeptidáz, nagy molekula tömegű fehérjéket nem hasít.

A prolyl oligopeptidáz családba tartozó enzimek fontos célpontjai a gyógyszerkutatásnak. Ezen belül a prolyl oligopeptidázt idegrendszeri zavarokkal hozták kapcsolatba. Számos adat

mutatja, hogy összefüggésbe hozható az amnéziával, a tanulással és a depresszióval. Mivel a gyógyszertervezésnél fontos az enzim specifitásának az ismerete, megvizsgáltuk, hogy a prolil oligopeptidáz egyes kötőhelyei mely aminosavakra a legspecifikusabbak. Kimutattuk, hogy az Arg, Arg, Pro, Tyr, Ile, Arg aminosavak mutatják a legnagyobb affinitást az S3, S2, S1, S1', S2 illetve az S3' kötőhelyhez.

A bipoláris zavar, más néven mániás depresszió, a magyar lakosság több mint egy százalékát érinti. Közülük minden tizedik öngyilkosság következtében hal meg. Feltételezik, hogy a betegségben a prolil oligopeptidáz is szerepet játszik. Megvizsgáltuk, hogy a hangulatstabilizáló gyógyszer, a valproinsav gátolja-e a prolil oligopeptidázt. Azt találtuk, hogy 0,5 mM valproinsav, amely megfelel a terápiás dózishoz, jelentősen gátolja az enzim aktivitását. A kinetikai analízis azt mutatta, hogy az inhibitor mind a katalitikus aktivitást, mind a szubsztrát kötődését gátolja. Egyéb adatokat is figyelembe véve arra következtettünk, hogy a valproinsav a hangulatnak a depresszió irányába történő változását gátolja a prolil oligopeptidázzal való kölcsönhatás következtében.

A KIAA0436 gén, az új nomenklatura szerint a PREPL gén hiánya súlyos betegséghez vezet. A gén terméke a primer szerkezet szerint a prolil oligopeptidáz családba tartozik, és az oligopeptidáz B-vel való homológia alapján az arginin és a lizin után kellene a szubsztrátot hasítani. A gén egyik termékét, a PREPL A proteint, ki tudtuk fejteni *Escherichia coli* baktériumban, majd több kromatográfiás lépésben megtisztítottuk. Kimutattuk, hogy az enzim dimer formában létezik, és nem mutat katalitikus aktivitást. A másodlagos szerkezete hasonló volt az oligopeptidáz B szerkezetéhez, de a differenciális pásztázó kalorimetria szerint a konformációs stabilitása nagyobb volt. Ez összhangban volt azzal a megfigyelésünkkel, hogy a dimer állapotban fordul elő. Jóllehet a PREPL protein a peptideket nem hasította, a katalitikus szerin reagált diizopropil-foszfáttal, ami a szerin fokozott reaktivitására utalt. Sikerült a fehérjét kristályosítanunk, de a kristályok nem voltak alkalmasak a 3-dimenziós szerkezet meghatározására. Szemben a család ismert tagjaival ez a fehérje nem rendelkezik számottevő hidrolitikus aktivitással.

A prolil oligopeptidáz család enzimeinek primer szerkezetét összehasonlítva arra lehetett következtetni, hogy az acilaminoacil peptidáz esetében a katalitikus intermedier stabilizálása eltér a többi peptidázétól. Itt ugyanis az oxianion kötőhelynek megfelelő helyen nem egy tirozint, hanem hisztidint (His507) találtunk az aminosav sorrend összehasonlítása során. A

specifikus sebességi állandó (k_{cat}/K_m) pH-függése nem utalt a His507 aminosavnak a katalízisben való részvételére. Ugyanazon pK értékeket (7.0 és 8.7) kaptuk akkor is, ha a His507-et alaninra cseréltük. A k_{cat}/K_m értéke azonban 85-ször kisebb volt, mint a natív enzim esetében. Ez arra mutatott, hogy a His507 egy fontos aminosav, amelynek a szerepe feltehetően a térszerkezet kialakításában és nem közvetlenül a katalízisben jelentős.

Mivel az emlős acilaminoacil peptidáz térszerkezete nem ismert az oxianion szerepét a termofil *Aeropyrum pernix* acilaminoacil peptidázzal vizsgáltuk, amelynek a kristályszerkezetét az emlős enzimmel kapott eredményeink publikálása után közölték. Az enzimet *Escherichia coli* sejtekben fejeztük ki és kidolgoztuk a tisztítását. A szerkezetből nagy valószínűséggel megállapítható volt, hogy az oxianion kötőhelyen a Gly369 aminosav szerepel, nem pedig a His367, amely megfelel az emlős His507-es aminosavának. Az oxianion kötőhely környezete nagymértékben konzervált a két enzimnél. A H367A variáns aktivitása itt még jelentősebben lecsökkent. Ennek okát a kristályszerkezet meghatározásával állapítottuk meg. Eszerint a mutánsban az alanint tartalmazó hurok számottevően elmozdul és magával húzza a Gly369 aminosavat, ami eltorzítja az oxianion kötőhelyet.

Az *Aeropyrum pernix* acilaminoacil peptidáz esetében kinetikai vizsgálataink azt mutatták, hogy az enzimreakciók sebességi állandója komplex pH-függést mutat a töltéssel rendelkező szubsztrátok esetében, ami az aktív centrum környezetében jelentős elektrosztatikus hatásra utal. Azt találtuk, hogy az enzim nem csak az acilaminosavat képes lehasítani a peptidlánc végéről, amint ezt eddig gondolták, hanem a belső peptidkötéseket is képes hasítani, vagyis az enzim nemcsak exopeptidáz, hanem endopeptidáz is. Kimutattuk továbbá, hogy az enzim nemcsak a nagyméretű hidrofób aminosavak után hasít, mint amilyen a fenilalanin, hanem a jóval kisebb alanin után is. Az enzimnek acetilfenilalaninnal és glicinfenilalaninnal képzett komplexeinek meghatároztuk a kristályszerkezetét. Kimutattuk, hogy az S2 kötőhelyen túl is van lehetőség az enzim és a szubsztrát közötti kölcsönhatásra, ami érthetővé teszi az endopeptidáz aktivitást. A különböző komplexek szerkezetéből kiderült, hogy az S1 kötőhely jelentékeny konformációs különbséget mutat, vagyis számottevő plaszticitással rendelkezik.