

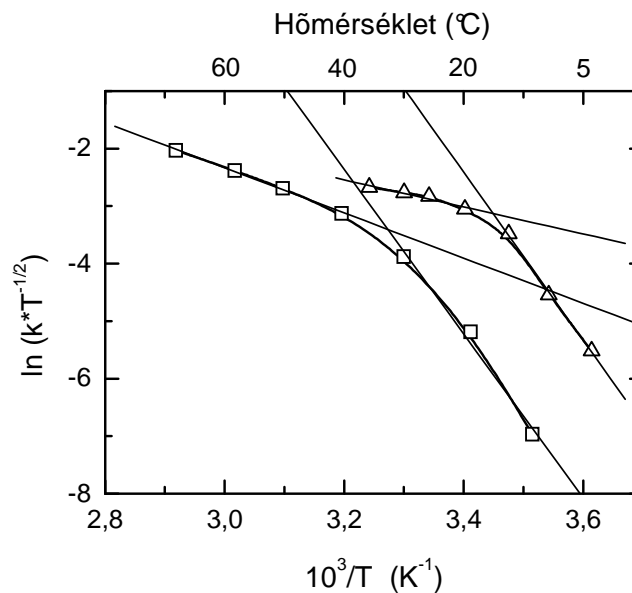
Összefüggés a fehérjék stabilitása, konformációs flexibilitása és működése között (OTKA T046412 sz. pályázat)

SZAKMAI BESZÁMOLÓ

A hőkedvelő mikroorganizmusokból izolált enzimek hődenaturációval szemben ellenállóak. Alacsony hőmérsékleten viszont többségüknek igen alacsony az enzimatis aktivitása, annak ellenére, hogy a térszerkezet és az aktív hely felépítése olyan, mint a mezofil fehérjében. Az aktivitás hőmérsékletfüggése nem követi az Arrhenius-összefüggést. A jelenség oka az esetek többségében nem hidegdenaturáció. A térszerkezet teljes hőmérséklet tartományban változatlan, az ok tehát máshol keresendő. A termofil organizmusok mezofil és hidegkedvelő homológjai hasonlóan működnek, így felmerül a kérdés, hogy a hőmérséklethez való adaptáció pontosan milyen fizikai jelenségeken alapul.

Flexibilitás és hőstabilitás kapcsolata gliceraldehyd-3-foszfát dehidrogenáz esetében

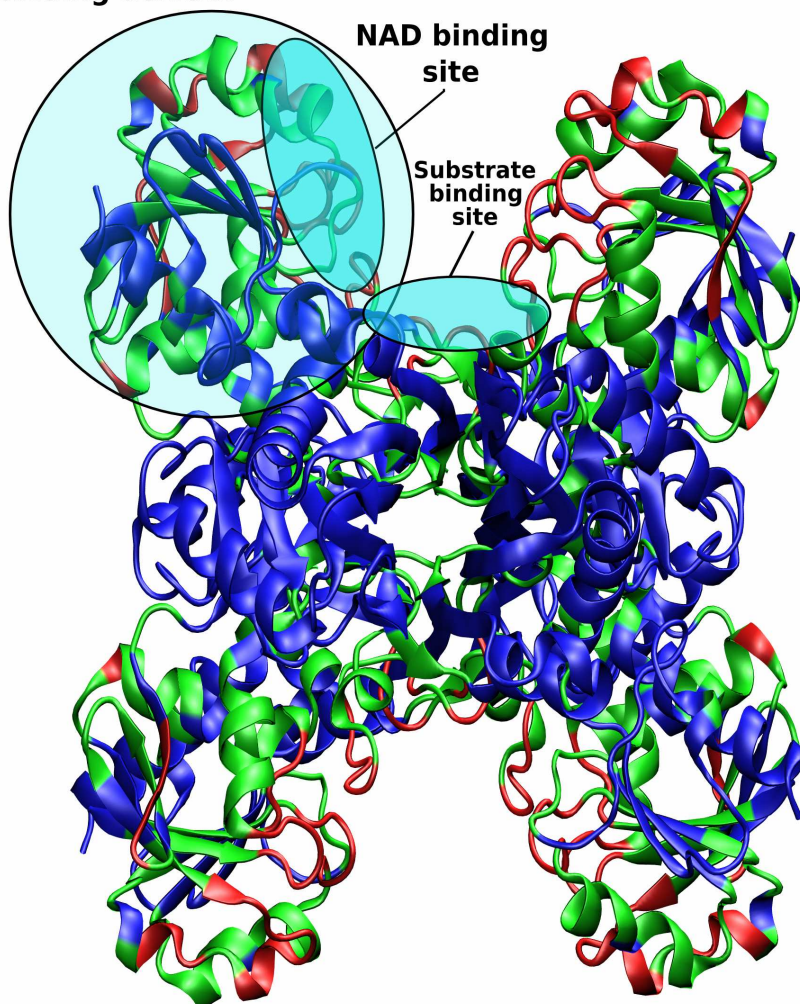
Első vizsgálatainkat a korábban jellemzett, *Thermotoga maritima*-ból származó D-gliceraldehyd-3-foszfát dehidrogenáz (GAPDH) enzimen és nyúlizomból izolált homológ változatával végeztünk. Megfigyeltük, hogy az enzimek katalitikus hatékonyságának hőmérsékletfüggését leíró Arrhenius-ábrázolás mindkét enzim esetén határozott törést mutat (1. ábra).



1. ábra: *Thermotoga maritima* (négyzet) és nyúlizom GAPDH (háromszög) katalitikus aktivitásának hőmérsékletfüggése ábrázolása Arrhenius szerint. A két görbe egymáshoz képest 20°C-kal tolódott el, és egyaránt az aktiválási energia hőmérsékletfüggő csökkenését mutatja.

A két fehérje konformációs flexibilitását hidrogén-deutérium kicserélődés módszerével vizsgálva szobahőmérsékleten, illetve az élőlény optimális működési hőmérsékletén azt tapasztaltuk, hogy bár szobahőmérsékleten jelentősen flexibilisebb a nyúlizomból származó GAPDH, azonban a működési hőmérsékleten a két fehérje konformációs flexibilitása megegyezik. A flexibilitásban tapasztalható különbségeknek a fehérjeszerkezeten belüli lokalizálása céljából, a megfelelő kristályszerkezetek B-faktorait is vizsgáltuk, ugyanis ezt a két kristályszerkezet hasonlósága (RMSD=1,31 Å), és felbontásuk hasonlósága (2,4, ill. 2,5 Å) lehetővé tette. Az összehasonlításból kiderült, hogy a legnagyobb különbség a NAD-kötő doménben, és a szubsztrátkötő régióban, tehát a működéshez közvetlenül szükséges régiókban mutatkozik egy alegységen belül (2. ábra). (Hajdú et al, közlésre elküldve.)

NAD binding domain

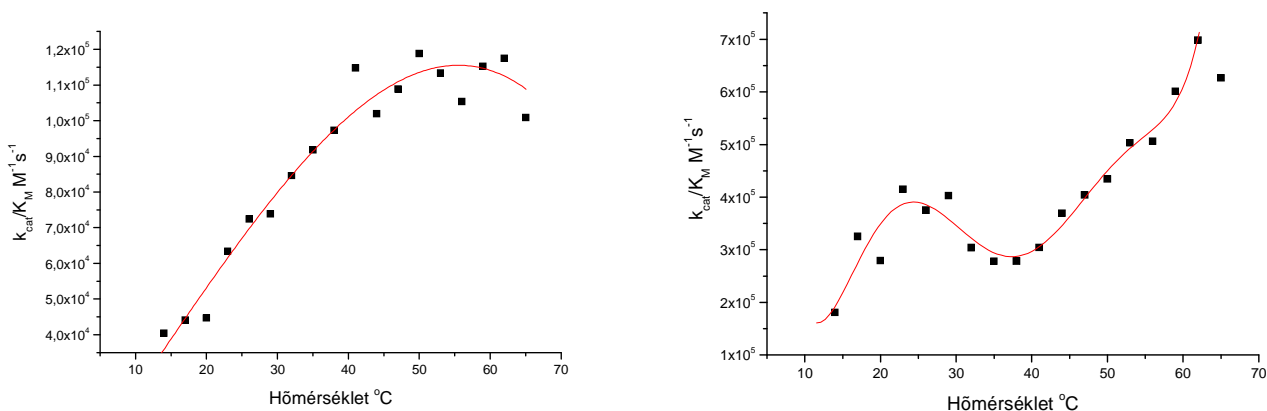


2. ábra: Nyúlizom GAPDH tetramer háromdimenziós szerkezete. A színezés a nyúlizom és *Thermotoga maritima* GAPDH szerkezetek C_{α} B-faktorainak eltérése alapján történt. $\Delta B = B_{nyúlGAPDH} - B_{TmGAPDH}$. Kék: $\Delta B < 9$; zöld: $9 < \Delta B < 20$; piros: $\Delta B > 20$. Regions showing the highest difference in flexibility are colored red; these include the NAD binding and substrate binding sites, highlighted in one of the subunits. A legnagyobb flexibilitás különbséget mutató pirossal színezett régió a NAD-kötő, és a szubsztrátkötő kötéshelyeket foglalja magába.

Flexibilitás és működés kapcsolata különböző hőstabilitású IPMDH enzimeknél

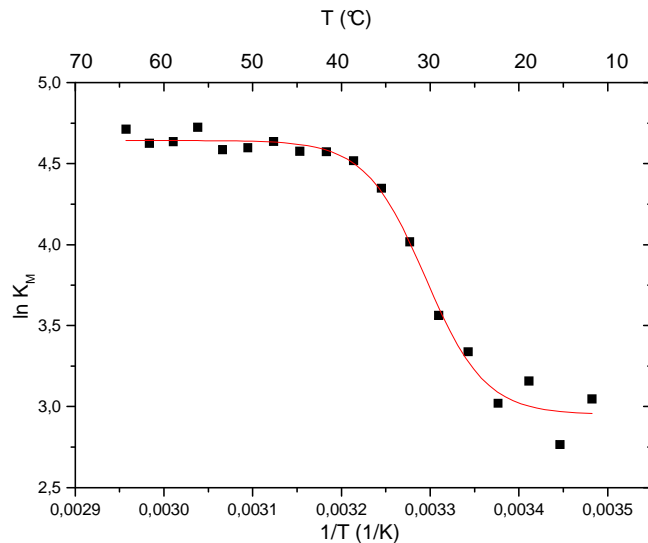
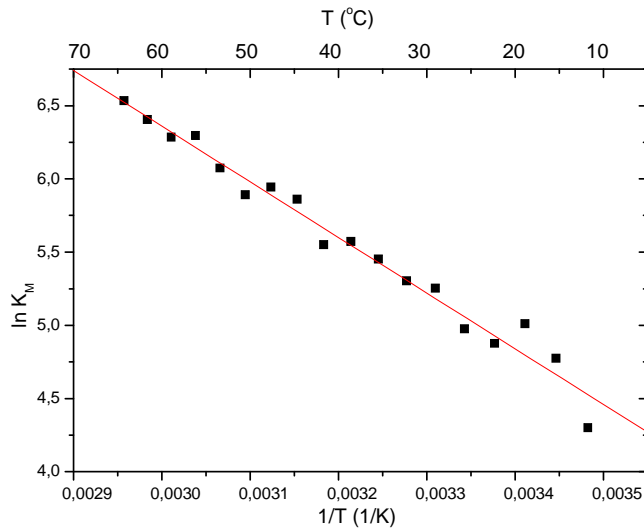
Másik modellenzimünk az izopropil-malát dehidrogenáz (IPMDH) volt, amely a baktériumok és növények anyagcseréjében a leucin bioszintézisben játszik szerepet. Kutatásainkhoz az enzim *E. coli*, *Thermus thermophilus* és *Vibrio sp. I5* organizmusokból származó variánsait használtuk, amelyek különböző hőmérsékletekhez adaptálódtak. Vizsgálataink elsődleges célja volt az enzimatis aktivitás rendhagyó hőmérsékletfüggésének vizsgálata, valamint azoknak a fizikai-kémiai eseményeknek a megismerése és megértése, amelyek ezt okozzák. Munkahipotézisünk szerint a termofil enzimek a hőstabilitást szolgáló csökkent szerkezeti flexibilitás következtében veszítik el aktivitásukat szobahőmérsékleten, mivel a katalitikus aktivitáshoz szükséges szerkezeti fluktuációk korlátozottak. Ezen a ponton tehát megtalálható a direkt összefüggés a flexibilitás és a működés között.

A kísérleteket mindhárom enzimvariánsan elvégeztük. *E. coli* változat esetén a katalizált reakció kinetikai paramétereit a hőmérséklet függvényében ábrázolva szembevetve, hogy a k_{cat}/K_M érték nem lineáris Arrhenius-ábrázolást eredményez (3. ábra).



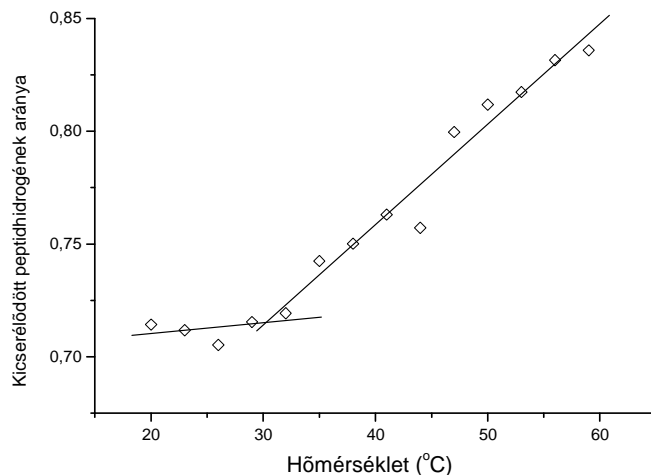
3. ábra: A katalitikus hatékonyságot leíró k_{cat}/K_M hőmérsékletfüggése az *E. coli* IPMDH által katalizált reakció esetén IPM szubsztrátra jelentősen eltér a lineáristól (jobbra), míg a NAD^+ koenzimre közel lineáris (balra).

A k_{cat} értékeket Arrhenius szerint ábrázolva olyan görbét kapunk, amely a kinetikailag komplex reakció elemi lépéseinek különböző hőmérsékletfüggésére hívja fel a figyelmet, és az aktiválási energia hőmérsékletfüggését is mutatja, amely 60 kJ/mol értékről folyamatos átmenettel 30 kJ/molra csökken (a kísérleteket 14 és 65 °C között végeztük). A K_M értékek hőmérsékletfüggését leíró van't Hoff ábrázolás NAD -ra vonatkoztatva lineáris, IPM esetén viszont szigmoid lefutású volt, K_M értéke 29 és 38 °C az ötszörösére növekedett (20→100 μM) (4. ábra).



4. ábra: Az *E. coli* IPMDH által katalizált reakció Michaelis-Menten állandójának hőmérsékletfüggése Van't Hoff ábrázolásban. A NAD esetén tapasztalt lineáris hőmérsékletfüggés a fluktuációs illeszkedésre (fent), míg az IPM esetén a szigmoid alakú görbe (lent) hőmérsékletfüggő konformációváltozásra, doménzáródásra utal.

Vizsgáltuk a nemlineáris hőmérsékletfüggés lehetséges térszerkezeti okait. Cirkuláris dikroizmus spektroszkópiával, mely a fehérje másodlagos és harmadlagos szerkezetéről ad információt, nem találtunk semmilyen változást a kérdéses hőmérsékletintervallumban. A fehérje konformációs flexibilitását Fourier-transzformált infravörös spektroszkópiával (FTIR) követett hidrogén/deutérium (H/D) kicserélődés mérésével vizsgáltuk. Az apoenzim flexibilitása az alacsony hőmérsékleti régióban a hőmérséklet emelésével kis mértékben nő, majd kb. 30 °C felett vélhetően új konformációs fluktuációk belépése révén jelentősebben növekszik (5. ábra). Ez összefüggésbe hozható a K_M érték jelentős növekedésével.

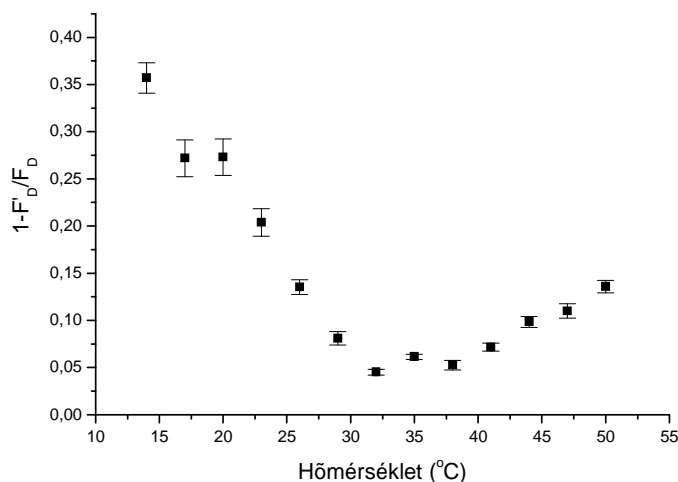


5. ábra: *E. coli* IPMDH konformációs flexibilitásának hőmérsékletfüggése. A 30°C-nál található törés új konformációs fluktuációk belépésére utal.

A ligandumok hatását a rendelkezésre álló szerkezeti információ alapján értelmeztük, tekintetbe véve, hogy a NAD kötőhelye az egyik domén külső felszínén helyezkedik el, az IPM kötőhelye pedig a két alegység két doménje közötti szűk árok, amelynek a kialakulásához a domének relatív elmozdulása, záródása szükséges. A ligandumok szerkezetstabilizáló hatását pásztázó mikrokolorimetriával (DSC) vizsgálva azt tapasztaltuk, hogy a NAD (gyakorlatilag) nem okoz hőstabilitásváltozást, míg az IPM szignifikánsan megnöveli az enzim hőstabilitását. Ez az eredmény alátámasztja azt a megállapítást, hogy az IPM kötéséhez a domének elmozdulása szükséges, ami a zárt konformáció felé történő konvergenciát jelenti, s ellentétben áll azzal a korábban publikált megállapítással, miszerint a NAD és IPM kötése egyaránt egy nyitott-zárt állapot közötti átmeneti konformáció megjelenését okozza. A különböző ligandumállapotú enzimek konformációs flexibilitását is jellemeztük szobahőmérsékleten. Ennek alapján látható, hogy az IPM nem gyakorol hatást a konformációs flexibilitásra, a NAD kötődése viszont csökkenti a fehérjemátrix flexibilitását. A nem produktív terner komplex (IPMDH+NADH+IPM) a legkisebb flexibilitású (s egyben a leginkább hőstabilis) állapot.

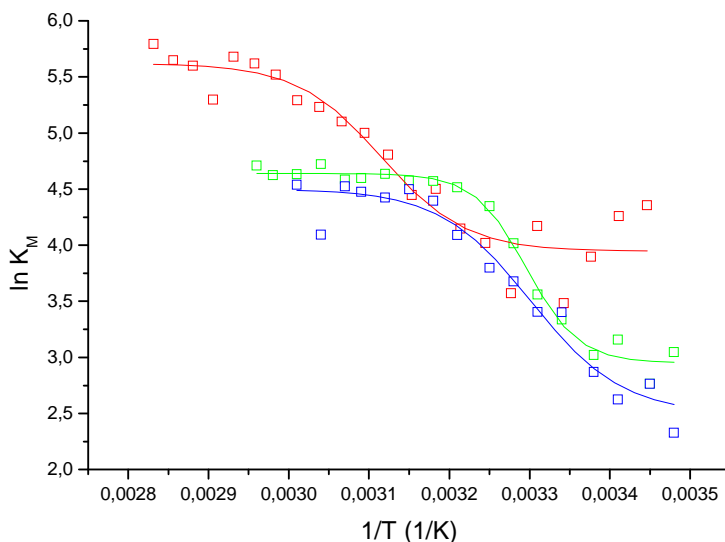
A K_M hőmérsékletfüggésével kapcsolatos megállapításaink értelmezésénél zavaró, hogy e paraméter fizikai jelentése nem jól körülhatárolt. Bizonyos feltételek mellett a ligandum disszociációs állandója (K_d) megfelel a kinetikai K_M értéknek. A disszociációs állandót FRET (fluorescence resonance energy transfer) mérés útján meghatároztuk a kinetikai méréseknek megfelelő hőmérsékleteken. Eredményeink alátámasztották a Michaelis-állandó és a disszociációs állandó megegyezésére vonatkozó feltételezést. A K_M hőmérsékletfüggésében tapasztalt szigmoid jellegű átmenetnek tehát valódi fizikai jelentése van: a szubsztrát affinitása az enzimhez egy szűk hőmérsékletintervallumban jelentősen lecsökken. A FRET mérésekből további információhoz is jutottunk: a FRET jel hőmérsékletfüggése 30 °C-on minimumot mutat (6. ábra), ami arra utal, hogy a kromofórok (Trp és NADH) távolsága ekkor a legnagyobb, míg alacsonyabb hőmérséklet felé haladva a FRET hatásosságának növekedése a kisebb távolságot jelzi. A vizsgálatokat az IPMDH-NADH biner komplexen vizsgáltuk,

amelynek konformációs állapota a korábbi méréseink alapján az apoenzimének felel meg. Ebből következően a szubsztrátaffinitás változását alapvetően a hőmérsékletindukált doménzáródással magyarázhatjuk, vagyis alacsony hőmérsékleten az enzim úgy kompenzálja a lassabb fluktuációkat, hogy az egyensúlyi konformáció közelebb helyezkedik el a katalízishez szükséges zárt állapothoz, így csökkent fluktuációkkal is képes a kémiai reakció katalízisére (Hajdú et al, közlésre előkészítve).



6. ábra: A FRET effektus hőmérsékletfüggése *E. coli* IPMDH enzim esetén IPM-mentes állapotban. A csökkenő transzfer érték a működési hőmérséklet alatt hőmérsékletfüggő doménmozgásra utal, alacsony hőmérsékleten doménzáródás tapasztalható, amely elősegíti a katalízist, és megmagyarázza a szubsztrát nagyobb affinitását alacsony hőmérsékleten.

A kísérleteket mindhárom enzimvariánsban elvégezve az eredményeink hasonlóak. Az Arrhenius-ábrázolások lefutása és az azok alapján számítható aktiválási energiák megegyeznek. A van't Hoff-ábrázolások NAD esetén egyaránt lineárisak, IPM esetén pedig szigmoid alakúak (7. ábra).



7. ábra: A Michaelis-állandók hőmérsékletfüggése van't Hoff-ábrázolásban *Thermus thermophilus* (piros), *E. coli* (zöld) és *Vibrio sp. 15* (kék) IPMDH esetén IPM szubsztrátra értelmezve. Mindhárom görbe szigmoid alakú, ami az azonos típusú, hőmérsékletfüggő doménzáródással járó kötődésre utal.

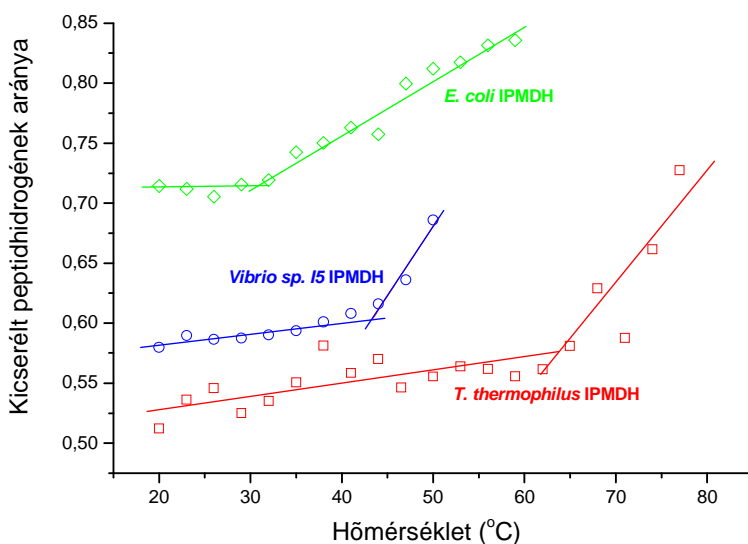
A legszembevetőbb különbség az adatsorok között a hőmérséklet eltolódása. A hőmérsékleti adatokat táblázatos formában foglaltuk össze (1. táblázat).

Élőlény	<i>Thermus thermophilus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Vibrio sp. 15</i>
Optimális növekedési hőmérséklet	~75 °C	~37 °C	~20 °C
Növekedési hőmérséklet	55 – 80 °C	10 – 45 °C	-1.5 – 30 °C
Az IPMDH-k olvadáspontja	88 °C	74 °C	63 °C
Az IPMDH-k optimális működési hőmérséklete	66 – 84 °C	48 – 65 °C	46- 59 °C
Arrhenius töréspont	53 °C	39 °C	41 °C
Szubsztrátkötés-változás	48°C	30°C	28°C
Flexibilitás töréspont	63 °C	32 °C	41 °C

1. táblázat: Különböző hőmérsékletre adaptálódott IPMDH-k fizikai-kémiai és fiziológiás tulajdonságait jellemző hőmérsékletek.

Megfigyeléseink és adataink alapján megállapítható, hogy a katalitikus aktivitást befolyásoló paraméterek elsősorban az organizmus optimális növekedési hőmérsékletével hozhatóak összefüggésbe. A termofil *T. thermophilus* IPMDH esetén a mezofil *E. coli* enzimhez képest kb. 20 °C-kal magasabb hőmérsékleten észlelhető a szubsztrát affinitásának csökkenését okozó változás, viszont a hidegtűrő *Vibrioból* származó enzim esetén nem

található szignifikáns különbség a mezofil homológhoz viszonyítva. Ez is igazolja a hőadaptációnak azt a mechanizmusát, miszerint az optimális működési hőmérséklet közelében jelennek meg olyan (szerkezeti, flexibilitásbeli) változások, amelyek az enzimaktivitás változását okozzák. A hidegtűrő enzim esetén fontos megemlíteni, hogy az nem obligát hidegkedvelő, hanem csupán hideggel szemben toleráns organizmusból származik, ezért optimális működési hőmérséklete nem különbözik jelentősen a mezofil enzimétől, azonban alacsony hőmérsékleten is magas aktivitást mutat. További meglepő észrevétel, hogy a flexibilitás nincs egyenes arányban az enzimek optimális működési hőmérsékletével, mivel a hidegtűrő változat a H/D kicserélődés mérés tapasztalatai alapján a teljes vizsgált hőmérsékletintervallumban merevebbnek mutatkozott a mezofil enzimnél (8.ábra). Megjegyzendő, hogy az aktivitáshoz nem feltétlenül szükséges a teljes enzim optimális flexibilitása, ez kompenzálható az aktív hely fellazítása útján, így feltételezhető, hogy a flexibilis aktív helyvel rendelkező enzimben a szerkezetért felelős régiók pontosabb rögzítése a funkció nagyobb hőmérsékletintervallumban megtartásához szükséges.



8. ábra: *Thermus thermophilus*, *E. coli* és *Vibrio sp. 15* IPMDH konformációs flexibilitásának hőmérsékletfüggése.

Konformációs flexibilitásukban módosított mutáns enzimek vizsgálata

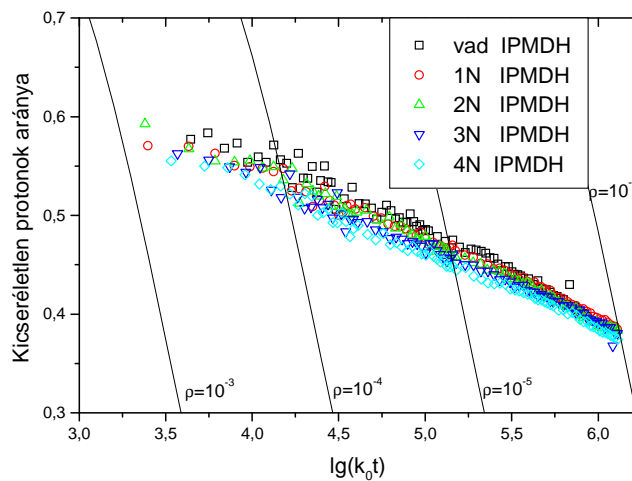
Az IPMDH hőstabilitása és flexibilitása közötti korreláció további elemzése céljából tervezett mutációk révén flexibilitási sort állítottunk elő. Egy fehérje flexibilitásának növelésére kézenfekvő módszer a prolinok glicinre cserélése. Esetünkben a kiindulási enzim a *Thermus thermophilus* organizmusból származó IPMDH volt, melyben a mezofil homológokhoz viszonyítva szokatlanul magas számú, 25 prolin fordul elő. Első lépésként ezek közül kiválasztottuk a kevésbé konzervált, és a katalízisben nem esszenciális prolinokat: négyet találtunk alkalmasnak pontmutáció céljára. Az alkalmas prolinokat két csoportba soroltuk konzerváltságuk, illetve glicinnel való helyettesíthetőségük szerint. Az ismert IPMDH-szekvenciák többszörös összerendezése alapján megállapítható, hogy a Pro40 és Pro56 a legkevésbé konzervált prolinok, glicin pedig leggyakrabban a Pro267 és Pro325 helyén fordul elő. A következő mutációkat terveztük meg:

- Egyszeres mutációk: P40G; P56G, P267G, P325G
- Kétszeres mutációk: P40G+P56G (röviden: 2K); P267G+P325G (röviden: 2N)
- Háromszoros mutációk: P40G+P56G+P267G (röviden: 3K); P56G+P267G+P325G (röviden: 3N)
- Négyszeres mutáció: P40G+P56G+P267G+P325G (röviden: 4NK)

Azon a két pozíción, ahol a glicin a legkevésbé preferált aminosav a szekvenciaösszerendezés alapján, a leginkább preferált aminosavakra történő mutációkat is elvégeztük (P40L, P56E).

A mutáns enzimek konformációs flexibilitását hidrogén-deutérium (H/D) izotópkicserélődési reakció követésével vizsgáltuk. A mérés során Fourier-transzformált infravörös spektroszkópia (FTIR) segítségével követjük a H/D kicserélődési reakciót, amelynek során a fehérje globális flexibilitásáról nyerünk információkat.

A méréseket különböző hőmérsékleten elvégezve azt az eredményt kaptuk, hogy a mutációk számával arányosan növekszik a globális flexibilitás minden vizsgált hőmérsékleten, megerősítve hipotézisünket, hogy a Pro→Gly mutációk flexibilitásnövelő hatásúak (9. ábra).



9. ábra: Többszörös prolin-glicin mutációkat tartalmazó *Thermus thermophilus* IPMDH mutánsok konformációs flexibilitása relaxációs spektrum formában ábrázolva, 30 °C-on. A görbék folyamatos eltolódása a beépített glicinek számával arányos konformációs flexibilitás növekedését mutatja

A módosított flexibilitású IPMDH-mutánsok hőstabilitását differenciális pásztázó mikrokalorimetriával (DSC) és cirkuláris dikroizmus spektroszkópiával (CD) vizsgáltuk. A DSC-vel végzett mérések alapján megállapítható, hogy a mutációk csökkentették az enzim hőstabilitását, méghozzá a mutációk számával arányos mértékben (2. táblázat). Kivételt csupán a P40G+P56G kettős mutáns hőstabilitása képez, melynek hőstabilitása még a vártnál is némileg alacsonyabb. A hődenaturáció mindegyik mutáns esetében irreverzibilis, hasonlóan a vad típushoz. A CD-vel végzett mérések alapján a különböző másodlagos szerkezeti elemek részaránya az összes mutáns enzim esetében megegyezik a vad típusú enzimmél mérhetővel. A

hőstabilitási értékek összhangban vannak a DSC-vel kapott értékekkel, a P40G+P56G mutáns ezzel a módszerrel is kisebb hőstabilitást mutat (2. táblázat).

	vad	P40G	P267G	P56G	P40L	P56E	2K	2N	3K	3N	4NK
T_m (CD) (°C)	87,4	82,5	82,8	86,5	87,3	87,6	77,1	81,4	77,7	80,2	75,7
T_m (DSC) (°C)	87,5	83,9	84,3	87,1	87,7	88,1	79,0	83,6	79,2	81,8	77,2

2. táblázat: 2. táblázat: Többszörös prolin-glicin mutációkat tartalmazó *Thermus thermophilus* IPMDH mutánsok átmeneti hőmérséklete CD spektroszkópiával és pásztázó mikrokolorimetriával vizsgálva.

Vajon hogyan érintik ezek a flexibilitásnövelő, hőstabilitás-csökkentő mutációk az enzim aktivitását? E kérdés megválaszolására enzimkinetikai méréseket végeztünk a mutáns enzimeken, a 20-80°C hőmérséklettartományban, 5°C-os lépésenként (3. táblázat). Az egyszeres mutánsok esetén az aktivitás gyakorlatilag nem különbözött a vad típusétól, kivéve a P325G mutáns melynek aktivitása a vad típusénak mintegy 50%-a. A kétszeres mutánsok közül a P267G+P325G aktivitása minimális volt, melynek valószínűsíthető magyarázata az, hogy a 325-ös pozícióban elvégzett mutáció a NAD⁺-kötést gátolja. A P40G+P56G mutáns aktivitása meghaladta a vad típusét, ez a vártnál nagyobb mértékben csökkent hőstabilitással összefüggésbe hozható. A P40G+P56G+P267G mutáns aktivitása mintegy fele a vad típusénak. A további mutánsok mind P325G mutációt tartalmaznak, aktivitásuk minimális (3. táblázat).

k_{cat}/K_M $M^{-1}s^{-1}$	VAD	P40G	P267G	2N	2K	3N	3K	4N	P40L	P56G	P56E
25 °C	1,04E+05	9,67E+04	1,02E+05	5,20E+03	1,19E+05	2,08E+03	7,49E+04	3,12E+03	1,12E+05	1,14E+05	1,29E+05
40 °C	1,40E+05	1,16E+05	1,13E+05	8,40E+03	1,50E+05	4,20E+03	7,56E+04	2,80E+03	1,12E+05	1,33E+05	1,32E+05
60 °C	2,00E+05	1,42E+05	1,08E+05	6,00E+03	1,98E+05	4,00E+03	6,20E+04	4,00E+03	2,06E+05	2,16E+05	2,16E+05

3. táblázat: Többszörös prolin-glicin mutációkat tartalmazó *Thermus thermophilus* IPMDH mutánsok katalitikus hatékonyságát leíró k_{cat}/K_M értékei néhány hőmérsékleten.

A kontrollként vizsgált mutációk (P40L, P56E) esetében sem a hőstabilitásban, sem az aktivitásban nem tapasztaltunk szignifikáns eltérést a vad típustól.

Összegzésképpen, az eredmények arra utalnak, hogy az enzimváltozatok csökkent hőstabilitása összefüggésben áll a flexibilitás növekedésével. Noha az enzimaktivitás a mutációk többségénél csökkent, egy esetben növekedést tapasztaltunk, és figyelemre méltó módon éppen annál a mutánsnál, amelynél a legnagyobb volt a hőstabilitás-csökkenés.

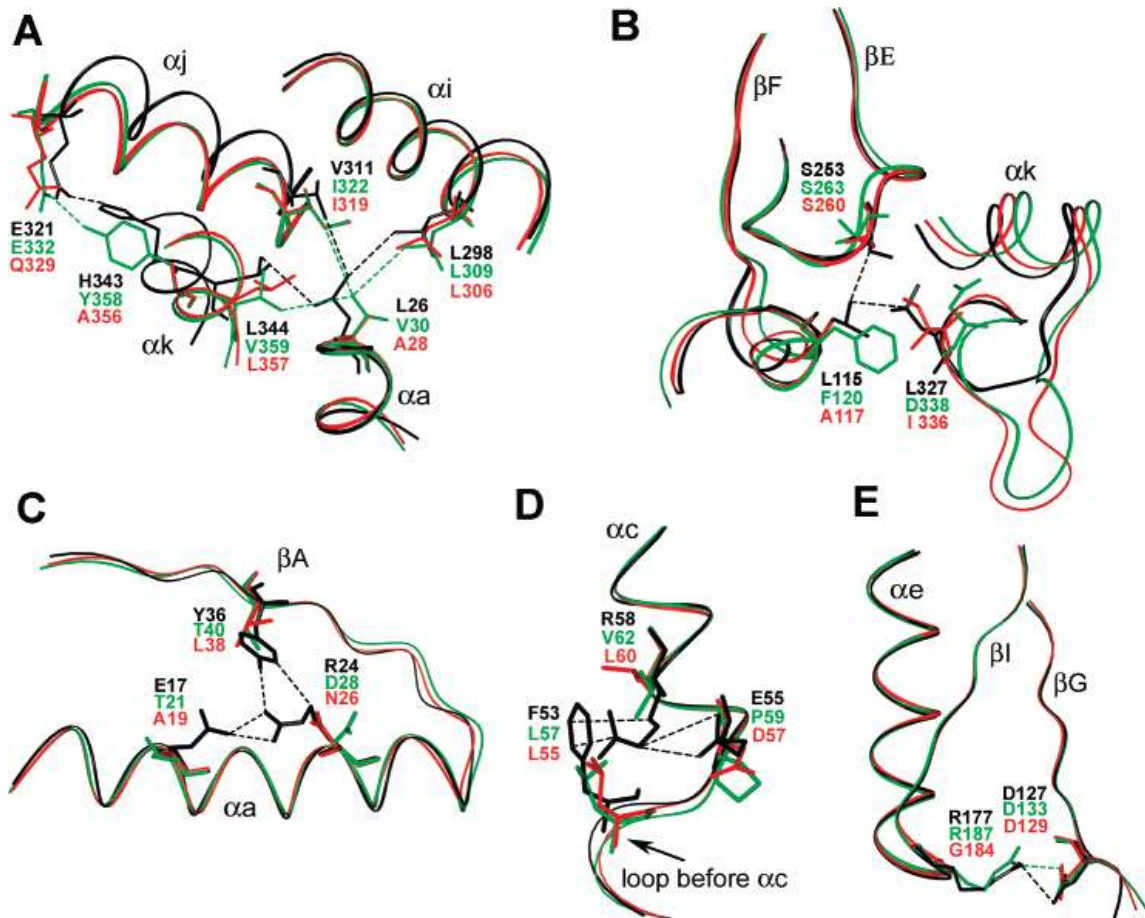
Megfelelően kiválasztott mutációkkal tehát az enzimaktivitás növelhető a hőstabilitás rovására. Fontos észrevétel, hogy a változások eléréséhez glicinek beépítésére volt szükség, más aminosav beépítése a prolinok helyére nem volt elégséges (Hajdú et al., közlésre előkészítve).

Az eredmények egy lehetséges utat mutatnak egy, a biotechnológiában felmerülő problémára. Ha egy enzimatis konverziós lépéshez nagy hőstabilitású enzim szükséges, de az ilyen enzim aktivitása nem elegendően nagy, akkor kismértékben destabilizáló mutációkkal megnövelhető az aktivitás, ami feltétlenül egyszerűbb megoldás, mint az aktív fehérjék hőstabilitásának jelentős növelése.

A hőstabilitás alapjainak dinamikus vizsgálata a fel- és legombolyodás sebessége alapján

A különböző hőmérsékletekhez adaptálódott organizmusokból származó, egymással homológ enzimek saját termodinamikai stabilitása általában tükrözi az élőlények jellemző környezeti hőmérséklete alapján várható értékeket. A natív és a letekeredett állapot közötti szabadentalpiakülönbség azonban a fel- és legombolyodás aktiválási szabadentalpiájának különbségeként áll elő, ezért a termodinamikai stabilitásban mérhető eltérések önmagukban nem adnak választ arra a kérdésre, hogy két enzim eltérő stabilitása a fel- vagy a legombolyodás sebességének eltérésére vezethető-e vissza. A molekuláris szintű hőmérsékleti adaptáció mechanizmusának pontosabb megértése céljából tehát a fel- és legombolyodás kinetikai jellemzésére is szükség van az eltérő hőstabilitású fehérjék esetében.

Három, különböző hőmérsékletre adaptálódott IPMDH enzimen végeztük el a fel- és legombolyodás kinetikai jellemzését. Szobahőmérsékleten a fel- és legombolyodás időfüggését több fizikai-kémiai módszerrel (CD spektroszkópia, fehérje- és ANS-fluoreszcencia, tiol-reaktivitás, enzimaktivitás) vizsgálva azt tapasztaltuk, hogy a felgombolyodás (folding) sebessége a három enzimvariáns esetén megegyezik, azonban a legombolyodás (unfolding) időfüggésében nagyságrendi különbségek találhatók. A hidegtűrő (*Vibrio*) IPMDH legombolyodásának féléletideje néhány másodperc, a 37°C-on élő *E. coli* enzimje esetén a féléletidő néhány perc, míg a hőkedvelő *Thermus* enzim esetén 1 óra. A kísérletek alapján kijelenthető, hogy az IPMDH enzimek hőstabilitását a legombolyodás sebessége határozza meg. A fehérjék szerkezetének vizsgálatával azonosítani lehetett azokat a nemkonzervált oldalláncokat, amelyek által kialakított kölcsönhatások felelősek a stabilizáló hatásért (10. ábra, Gráczer et al, 2007). Eredményeink összhangban vannak azzal az általános megfigyeléssel, hogy a felgombolyodás sebességét elsősorban a fehérjeszerkezet topológiája határozza meg, amely mindhárom enzim esetén azonos. Ebből következően a stabilitást szükségképpen csak a legombolyodás sebességének változtatásával lehet hatásosan modulálni.



10. ábra: Különböző hőstabilitású IPMDH-k térszerkezetében található jellemző különbségek. A *Thermus thermophilus* (fekete), *E. coli* (zöld) és *Vibrio sp. 15* (piros) szerkezeteket a β -lemezek Ca atomjai alapján rendeztük össze. Az A, C és D ábrák az 1. domén, a B ábra az interdomén régiót, míg a E ábra a 2. domén részletét mutatja.

Szerkezet és hőstabilitás összefüggésének vizsgálata xilanáz enzimeken

A xilanázokat két glikozid-hidroláz családba (GH10 és 11) sorolhatjuk. A 10-es családba tartozó xilanázok, mint amilyenek a modellrendszerünket alkotó, *Thermotoga maritima* eubaktériumból származó xilanáz A katalitikus domén (TmxAcet) és xilanáz B (TmxB), $(\beta/\alpha)_8$ -hordó szerkezetűek. A növényi sejtfalban található hemicellulóz fő alkotóelemének, a xilánnak a hidrolízisét végzik a xilanázok, amely a papír- és élelmiszeripar, valamint az állattakarmányozás szempontjából érdekes terület. Ezen ipari enzimek fontos jellemzője a hőstabilitásuk. A szerkezet-hőstabilitás összefüggés vizsgálatához a már említett termofil TmxAcet és hipertermofil TmxB enzimet használtuk modellrendszerünkben.

A hőstabilitás szerkezeti hátterének vizsgálatához irányított family shuffling módszerrel állítottunk elő kiméra enzimeket. A kiméra enzimek előállításához a *Thermotoga maritima* MSB8 eubaktérium genomjából klónoztuk a TmxAcet és TmxB fehérjéket kódoló xynAcet és xynB géneket. A xilanáz A fehérje katalitikus doménjét határoló N- és C-terminális

aminosavakat a BLAST program segítségével választottuk ki. A két gén klónozásához a következő primereket használtuk:

TmxB_forw - GCG CATATG TCT CAG AAT GTA TCT CTG AGA GAA CT
 TmxB_rev - GCG GGATCC TCA TTT TCT TTC TTC TAT CTT TTC TCC
 TmxAcat_forw - GCG CATATG ATA CCT GCT CTG AAA GAA GTA CTA AAA GA
 TmxAcat_rev - GCG GGATCC TCA CTC AGG TGC CAC TAT CGC

A két gén szekvenciáját összerendeztük az ExPASy SIM program segítségével BLOSUM62 összehasonlítási mátrixot használva. A szekvencia összerendezés segítségével kijelöltük azokat a DNS-szegmenseket, amelyekben a szekvenciák nagyfokú homológiát mutatnak. Öt olyan, húsz bázispár hosszú DNS-szegmenst találtunk, amelyekben a különbséget mutató nukleotidok száma nem több, mint kettő (11. ábra).

```

xynAcat 3 GATACCTGCTCTGAAAGAAGTA-CTAAAAGACT--ACTTCAAAG
xynB    9 GAATGTATCTCTGAGAGAACTCGCAGAAAAGCTGAACATCTATA
          **          ***** ** * * * * * * * * *
44 TCGGAGTTGCA-CTGCCGTCCAAGGCTTCTCTCAACCCGA-----AGGACA
53 TTGGTTTTGCCGCAATCAACAACCTTTGGTCTCTTCCGACGCAGAAAAGTACA
   ** ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
89 TAGAACTCATCAGAAACACTTCAACAGCATCACCGCTGAAAACGAGATGAAAC
107 TGGAAGTTGCAAGAAGAGAATTCAACATCCTGACCCTGAAAACCAGATGAAG-
    * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
143 CAGAGAGCCTGCTCGCGGCATCGAAAACGGTAAGCTGAAGTTCAGGTTTGAAG
160 -TGGGATACGATT-----CATCCAGAAAG--AGACAGA--TACAATTCACTC
    * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
197 CAGCAGACAAATACATTCAGTTCGTCGAGGAAAACGGCATGGTTATAAGAGGTC
203 CCGCTGAAAACACGTTGAGTTTGCAGAAGAAAACGACATGATCGTGCATGGAC
   * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
251 ACACACTGGTGTGGCACAACCAGACACCCGACTGGTTCCTCAAAGACGAAAACG
257 ACACACTTGTCTGGCACAACCAGCTTCCTGGATGGATC--ACTGGTAGAGAATG
    ***** ** ***** ** * * * * * * * * * * * * * *
305 GAAACCTCCTCTCCAAAGAAGCGATGACGGAAAAGACTCAAAGAGTACATCCACA
309 GA-----CAAAGGAAGAACTTTGAACGTTCTTGAAGACCACATAAAAA
    ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
359 CCGTTGTCGGACACTTCAAAGGAAAAGTCTACGCATTGGGACGTGGTGAACGAAG
353 CGGTGGTGTCTCATTTCAAAGGTAGAGTGAAGATCTGGGATGTGGTGAACGAAG
   * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
413 CGGTGCATCCGAACCAGCCGGATGGACTGAGAAGATCCACCTGGTACCAGATCA
407 CGGTGAG--CGATTCTG--GAACCTACAGGGAAAG--CGTGTGGTACAGACGA
    ***** ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
467 TGGGCCTGACTACATAGAACTCGCCTTCAAGTTCGCAAGAGAAGCAGATCCAG
455 TCGGTCTCTGAATACATTGAAAAGCGTTCAGATGGGCAAAAGAAGCCGATCCAG
   * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
521 ATGCAAAACTCTTCTACAACGACTACAACACATTCGAGCCCA--GAAAGAGAGAT
509 ATGCGATTCTCATCTACAACGACTACAGCATAGAAGAAATCAACGCAAAATCGAA
    ***** ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
574 AT-CATCTACAACCTCGTGAAGGATCTCAAGGAGAAGGGA--CTCATCGATGGG
563 CTTCTGCTACAACATGATAAAAGAGCTGAAAAGAAAAGGGAGTACCTGTGATGGA
   * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
625 ATAGGCATGCAGTGTACATCAGTCTTGCAA--CAGACATCAAACAGATCGAAG
618 ATAGGATTTAGATGCACAT-AGACTACAGAGGGCTCAATTATGACAGTTTCAGA
    ***** ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
677 AGGCCATCAAAAAGTTCAGCACCATACCCGGTATAGAAATTCACATCACAGAACT
672 AGGAATTTGGAGAGATTTGCG--AAACTCGGTCTTCAATTTACATCACAGAAAT
    *** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
732 GGATATGAGTGTCTACAGAGATTCCAGTTCCAACCTACCCAGAGGCACCGAGGACG
725 GGATGTGAGA-----ATTCT-----CTCAGTGGTTCGGAGGAGT
    ***** ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
  
```

```

787 GCACTC--ATCGAACAGGCTCACAAAATGATGCAGCTCTTTGAGATTTTCAAGAA
770 ATTATTTGAAAAAACAGGCTGAAGTTTGTGCGAAGATCTTCGATATATGCTTGGA
      *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *
840 GTACAGCAACGTGATCACGAACGTACATTCTGGGGTCTCAAGGACGATTACTCC
825 CAACCCTGCAGTTAAAGCGA---TCCAGTTTGGGGATTACAGACAAATACTCC
      **   ** *   ***   **   **   *****   ***   *** *   *****
895 TGGAGAGCAA-----CAAGAAGAAACGACTGGCCGCTCATCTTCGACAAAGATC
877 TGGGTTCCCGGCTTTTCAAAGGGTACGGGAAAGCGTTGCTCTTCGATGAGAATT
      ***   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *
944 ACCAGGCGAAACTCGCTTACTGGGCGATA---GTGGCACCTGAG
932 ACAACCCCAAGCCTTGTATTACGCGATAAAAAGAGGTGCTGGAG
      ** *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *

```

11. ábra: A *xynAcat* és *xynB* gének szekvencia összerendezése. A vastaggal kiemelt szekvenciák azok a DNS-szegmensek, amelyek nagyfokú homológiát mutatnak. Ezen szegmensek mentén cseréltük ki a termofil és hipertermofil enzim egymásnak megfelelő fragmentumait.

Az öt DNS-szegmens 6-6 fragmentumra osztja a *xynAcat* és *xynB* géneket (*xynB*: b1-b2-b3-b4-b5-b6; *xynAcat*: a1-a2-a3-a4-a5-a6). A kiméra enzimeket a megfelelő fragmentumok cseréjével állítottuk elő PCR segítségével. A termofil *TmxAcat* enzim egyes fragmentumait kicserélve a hipertermofil *TmxB* enzim megfelelő fragmentumára, azt vizsgáltuk, hogy ez milyen hatással van a szerkezeti stabilitásra, az optimális működési hőmérsékletre és a kinetikai paraméterekre. A lehetséges 62 kiméra enzimből 21-et állítottunk elő (4. táblázat).

TmxAcat: A1-A2-A3-A4-A5-A6	TmxB: B1-B2-B3-B4-B5-B6
B1-A2-A3-A4-A5-A6	B1-B2-B3-A4-A5-A6
A1-B2-A3-A4-A5-A6	A1-B2-B3-B4-A5-A6
A1-A2-B3-A4-A5-A6	A1-A2-B3-B4-B5-A6
A1-A2-A3-B4-A5-A6	A1-A2-A3-B4-B5-B6
A1-A2-A3-A4-B5-A6	B1-B2-B3-B4-A5-A6
A1-A2-A3-A4-A5-B6	A1-B2-B3-B4-B5-A6
B1-B2-A3-A4-A5-A6	A1-A2-B3-B4-B5-B6
A1-B2-B3-A4-A5-A6	B1-B2-B3-B4-B5-A6
A1-A2-B3-B4-A5-A6	A1-B2-B3-B4-B5-B6
A1-A2-A3-B4-B5-A6	B1-A2-A3-A4-A5-B6
A1-A2-A3-A4-B5-B6	

4. táblázat: A vad típusú enzimek és a kiméra konstrukciók sematikus ábrázolása

A vad típusú és kiméra enzimeket kódoló géneket a PCR lépések után NdeI és BamHI restriktions enzimekkel emésztettük és pET21c vektorba ligáltuk. Az expressziót *E. coli* BL21-CodonPlus-RIL sejtekben végeztük. Egységes tisztítási eljárást dolgoztunk ki valamennyi konstrukcióra, amelynek a sejteltávolítást követő lépései a következők:

- Hőkezelés: 50 °C 30 min
- (NH₄)₂SO₄-os kicsapás. A 40% és 70% telítettség között kicsapódott fehérjét tartottuk meg
- Ultraszűrés YM10 és YM50 membránokkal

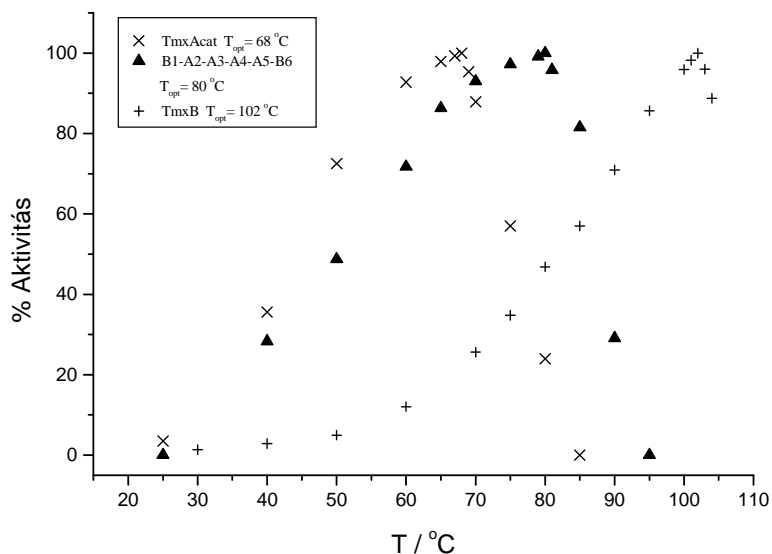
A tisztítási eljárás során kapott fehérjeoldatok minőségét SDS-PAGE módszerrel ellenőriztük. Az így nyert homogenitási fok minden esetben elérte a 80%-os tisztaságot.

Az enzimek aktivitásprofilját dinitro-szalicilsavas aktivitás esszével jellemeztük. Azok a konstrukciók (B1-A2-A3-A4-A5-A6, B1-B2-A3-A4-A5-A6, B1-B2-B3-A4-A5-A6, B1-B2-B3-B4-A5-A6, B1-B2-B3-B4-B5-A6), amelyekben a termofil fehérje bármilyen hosszú N-terminálisát cseréltük le a hipertermofil megfelelőjére, a csere hatására inaktiválódtak. A kiméra konstrukciók jelentős részénél csökkent vagy csak kis mértékben (1-2 °C) növekedett az optimális működési hőmérséklet. Az, hogy a termofil fehérje hőstabilitását nem sikerült a hipertermofil fehérjéből átültetett fragmentumokkal megnövelni, nem is annyira meglepő, hiszen a termofil fehérje az evolúció során olyan optimalizált kölcsönhatás hálózatot alakíthatott ki, amelyen egy-egy fragmentum cseréjével inkább rontunk, mint javítani tudnánk. Mindezek ellenére az irányított family shuffling módszer segítségével sikerült egy hatékony lépést találni a hőstabilitás és az optimális működési hőmérséklet növelésére. Valamennyi konstrukció jellemzőit nem kívánjuk részletezni. Azokat a konstrukciókat emeljük ki, amelyek az enzimtervezés és a hőstabilitás-növelés terén érdemi eredménnyel szolgáltak (5. táblázat).

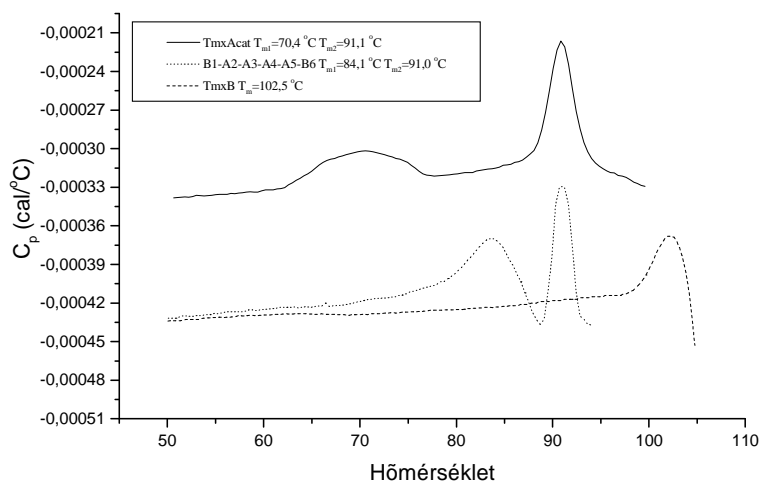
Enzim	T _{ow} °C	T _m (1./2. csúcs) °C/°C
TmxAcat: A1-A2-A3-A4-A5-A6	68	70,4/91,1
B1-A2-A3-A4-A5-A6	inaktív	58,7/69,8
A1-A2-A3-A4-A5-B6	61	63,2/78,3
B1-A2-A3-A4-A5-B6	80	84,1/91,0
A1-B2-B3-B4-B5-B6	71	72,3/85,5
B1-B2-B3-B4-B5-A6	inaktív	65,3/80,8
A1-B2-B3-B4-B5-A6	73	75,5/79,6
TmxB: B1-B2-B3-B4-B5-B6	102	102,5/-

5. táblázat A szerkezeti stabilitás és optimális működési hőmérséklet növelése szempontjából érdekes konstrukciók és jellemzőik. T_{ow}: optimális működési hőmérséklet; T_m: a differenciális pásztázó mikrokolorimetriával (DSC) mért olvadási hőmérsékletek.

Azokat a konstrukciókat választottuk ki, amelyekben az enzim N- vagy C-terminális vagy mindkét terminális fragmentumát cseréltük le. A vad típusú enzimeket és a kiválasztott konstrukciókat részletesen jellemeztük. Meghatároztuk az optimális működési hőmérsékletüket (12. ábra), differenciális pásztázó mikrokolorimetriával (13. ábra) és spektropolarimetriával a szerkezeti stabilitásukat térképeztük fel. A vizsgált konstrukciókra kapott eredményeket a 5. táblázatban foglaltuk össze.



12. ábra: A *TmxAcet*, *TmxB* és a jelentősen megnövekedett hőstabilitású B1-A2-A3-A4-A5-B6 kiméra aktivitásprofilja a hőmérséklet függvényében.



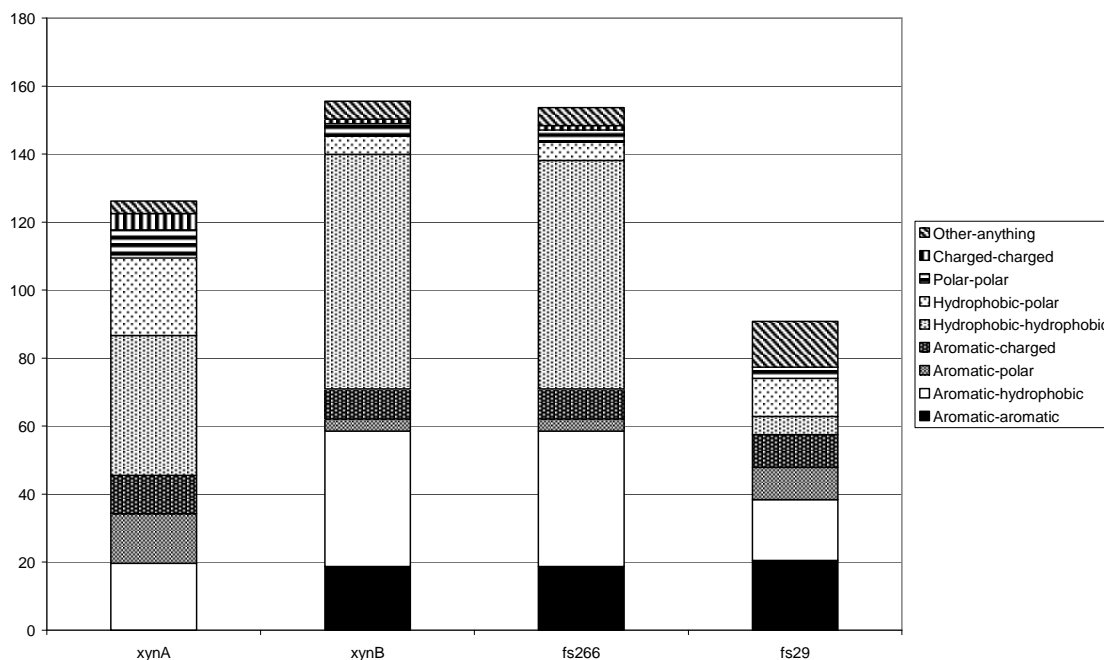
13. ábra: A *TmxAcet*, *TmxB* és a jelentősen megnövekedett hőstabilitású B1-A2-A3-A4-A5-B6 kiméra kalorimetriás görbéje. A kalorimetriával kapott olvadáspontok egyezést mutatnak az aktivitás esszékből nyert optimális működési hőmérsékleti adatokkal.

A *TmxB* enzim kivételével valamennyi esetben két olvadáspontot kaptunk. Az első csúcsokhoz tartozó olvadáspontok egybe esnek az optimális működési hőmérsékletekkel. Ezen hőmérsékletek felett az enzimek gyorsan inaktiválódnak, de a fehérjéknek csak a második olvadási ponthoz tartozó hőmérséklet elérésekor bomlik fel a három dimenziós szerkezete. Az adatokból az a következtetés vonható le, hogy azok a kiméra konstrukciók,

amelyekben azonos enzimből származik a N- és C-terminális fragmentum, magasabb optimális működési hőmérséklettel és nagyobb szerkezeti stabilitással rendelkeznek, mint azok, amelyekben csak az egyik terminális fragmentum lett kicserélve.

Látványos eredményt, mintegy 12 °C-os növekedést eredményezett a hipertermofil N- és C-terminálisok beépítése a termofil enzimbe. Az effektus azzal magyarázható, hogy a $(\beta/\alpha)_8$ -hordó folddal rendelkező enzimek esetében a szerkezet sajátjaiból adódóan az N- és C-terminális szakaszok közel helyezkednek el egymáshoz. Az evolúciós fejlődés során a hipertermofil enzim végei között erősebb kölcsönhatások alakultak ki. Az erősebb kölcsönhatások révén a terminálisokról induló szerkezetfelbomlás csak magasabb hőmérsékleteken kezdődik, mert nagyobb energiagátakat kell leküzdeni, mint a termofil fehérje esetében. Ezeket a hipertermofil végeket a termofil enzimbe átültetve, a végek közötti erősebb kölcsönhatásokat is átvisszük a kisebb hőstabilitású enzimbe, így megnövelve a termofil enzim stabilitását.

E következtetéseket alátámasztják azok az elméleti számítások is, melyek során empirikus energiafüggvény (Miyazawa-Jernigan potenciál) segítségével becsültük meg az N- és a C-terminális szegmens kölcsönhatási energiáját a kiméra enzimek homológiamodellezéssel felépített szerkezete alapján (14. ábra).



14. ábra: Az N- és C-terminális szegmens közötti kölcsönhatási energia negatívja Miyazawa-Jernigan potenciállal számolva. xynA és xynB jelöli a TmxAcet, TmxB, azaz a vad típusú enzimeket. „fs266” jelöli a B1-A2-A3-A4-A5-B6, fs29 pedig az A1-A2-A3-A4-A5-B6 enzimváltozatot. Az oszlopokon belüli blokkok a különféle kölcsönhatások járulékait jelölik.

Korábbi kutatásunk eredménye (láncvégeket összekötő diszulfidhíd beépítése) is alátámasztja, hogy a $(\beta/\alpha)_8$ -hordó szerkezetű enzimek esetében, amelyek számos ipari alkalmazás katalizátorai lehetnek, a terminálisok közötti kölcsönhatások erősítésével lehetőség van az optimális működési hőmérséklet és a szerkezeti stabilitás növelésére.

Összefoglalás

Homológ hőkedvelő, mezofil és hidegtűrő enzimek sorozatainak szerkezeti, szerveződési (folding) és funkcionális (reakciókinetikai) összehasonlító vizsgálatát végeztük el. A katalitikus reakció enzimkinetikai paramétereinek a hőmérséklet és a konformációs fluktuációk (relaxációs spektrum) függvényében történő analízisével megállapítottuk, hogy a gliceraldehid-3-foszfát dehidrogenáz enzim alegységei közötti allosztérikus jeltovábbításban a molekula dinamikus tulajdonságainak meghatározó szerepe van. A két doménből álló izopropil-malát dehidrogenáz esetében feltártuk a doménzáródás atomi szintű lépéseinek összefüggését a katalitikus folyamat egyes elemeivel. A fehérjék folding-refolding folyamatainak kinetikai analízisével több, a hőstabilitás mechanizmusát értelmező új megállapítást tettünk. Vizsgáltuk a *Thermotoga maritima* eubaktériumból származó, hasonlóságot mutató termofil és hipertermofil xilanázok hőstabilitása közötti különbség szerkezeti hátterét. Irányított family shuffling segítségével számos kiméra enzimet állítottunk elő a két vad típusú xilanázból. A termofil xilanáz enzim terminális régióit lecserélve a hipertermofil xilanáz enzim terminális régióira, a termofil enzim hőstabilitását 12 °C-kal megnöveltük. A létrehozott kiméra konstrukciók arra világítottak rá, hogy a terminális régiók közötti kölcsönhatás stabilizálásával megnövelhető azon fehérjék hőstabilitása, amelyek terminális régiói megfelelő közelségben találhatóak.