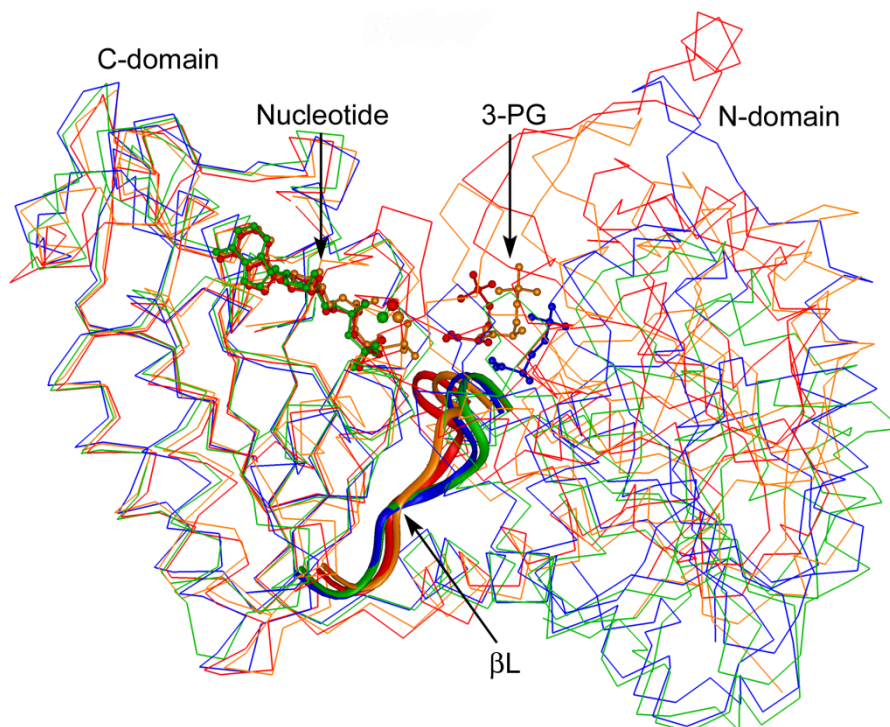


## Kutatási eredmények összefoglalása

A két doménből felépülő, monomer foszfoglicerát kináz (PGK) elsődleges szerepe a glikolízis hatodik enzimeként az 1,3-biszfoszfoglicerát 3-foszfogliceráttá alakítása, miközben ADP-ből ATP-t termel. Ezen túlmenően valószínűleg igen sokrétű feladatot lát el a sejt különböző kompartmentjeiben. A citoplazmában feladata van a  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -pumpa működése során, ahol ATP-t szolgáltat a pumpa működéséhez. Az X kromoszómán öröklődő mutációja összefüggésbe hozható a hemolitikus anémiával. A sejtmagban szerepet kap a DNS szintézisének és fontos „átkapcsoló” a DNS replikációs és a javító mechanizmusa között is. Az utóbbi időben megfigyelték a daganatos sejtekben az extracelluláris PGK diszulfid-reduktáz aktivitását. Ez a szerepe abban áll, hogy részt vesz a plazmin redukciójában, mely következtében a proteolízis során a plazminból az angiogenezis folyamatát gátló angiosztatin keletkezik. A PGK-nak fontos a szerepe a tumor, valamint a HIV és a Hepatitis B vírusok elleni terápiában is, mivel új, ígéretes gyógyszerként alkalmazható L-dezoxi nukleotid analógok szelektív foszforilációját katalizálja. Ennek során a farmakológiailag aktív trifoszfát analógot állítja elő, mely sejtbeli koncentrációjának megfelelő szinten tartásában alapvető szerepet játszik. Sokrétű sejtbeli funkciója és különösen a rák- és vírusellenes terápiában lehetséges szerepe miatt a PGK működési mechanizmusának a jelenleginél részletesebb megismerése igen kívánatos.

A PGK C-terminális doménja a nukleotid szubsztrátot, a MgATP-t vagy a MgADP-t, az N-terminális doménja a 3-foszfoglicerátot (3-PG) vagy az 1,3-biszfoszfoglicerátot (1,3-BPG) köti (1. ábra). A PGK-nak számos kristályszerkezete ismert, amelyek közül több is laboratóriumunk közreműködésével készült. A korábban közölt ún. nyitott konformációjú szerkezetek azt sugallták, hogy a két szubsztrát reaktív csoportjai csak a domének összezáródásával kerülhetnek a kémiai reakcióhoz szükséges közelségbe. Oldatkísérletek is ezt valószínűsítették, míg végül bizonyítékot szolgáltatott erre a zárt konformációjú kristályszerkezet. A nyitott és zárt szerkezetek nagymértékű konformációs különbségét jól szemlélteti az 1. ábra.



1. ábra

Zárt és nyitott szerkezetű kristályok összehasonlításából megállapítást nyert, hogy a domének rigid testként fordulnak el egymáshoz képest (kb. 32°-ot) és a doménzáródásnál néhány fontos csukló-régió játszik szerepet. Korábban feltételezték, hogy a molekula fontos csukló-régiói a két domént összekötő 7-es hélix két végén helyezkednek el. Laboratóriumunk a molekula legfontosabb csukló-régióját a 13-as és a 14-es hélixeket összekötő  $\beta$ L-redőnél vélte azonosítani, ugyanis e redő nagyfokú konformációs változása a két domént egymáshoz lényegesen közelebb hozza. A 13-as hélix a C-domén integrált részét alkotja, míg a 14-es hélix az N-doménét. A doménzáródáshoz a 7-es hélixbeli csukló-régiók elmozdulása is szükséges, mivel e nélkül a fehérjelánc széttörne, azonban ez feltehetően csupán következménye a  $\beta$ L-redő konformációváltozásának.

A szubsztrátok kötődési módja a különböző krisztallográfiás szerkezetekből már elég jól ismert. Míg a 3-PG gyakorlatilag azonos módon, a nukleotidok vagy analógjainak  $\beta$ - és  $\gamma$ -foszfátja különbözőképpen kötődnek a kristályszerkezetekben. Míg az AMP-PNP foszfátlánc az ADP-hez hasonlóan a 13-as hélix N-terminális vége felé hajlik, addig az AMP-PCP  $\beta$ - és  $\gamma$ -foszfátja egy alternatív kötőhelyhez, a 8-as hélix N-terminálisán lévő Lys 215-höz kötődik. Ez a Lys a nyitott konformációjú kristályszerkezetben az aktív centrumon kívül helyezkedik el, azonban érdekes módon a MnAMP-PNP\*3-PG terner komplexet tartalmazó kristályszerkezetben az aktív centrumba kerül be. Az oldatban analógjaival megegyező módon viselkedő MgATP foszfátlánc a kristályban viszont a fenti két szélső pozíció között helyezkedik el. Ennek alapján feltételeztük, hogy a katalízis során a nukleotid foszfátlánc valószínűleg a két kötőhely között mozog, ily módon segítve a doménzáródást azzal, hogy a 8-as és 13-as hélix N terminálisait közelíti egymáshoz.

Posztdoktori kutatómunkán során két fő kérdésre kerestem a választ:

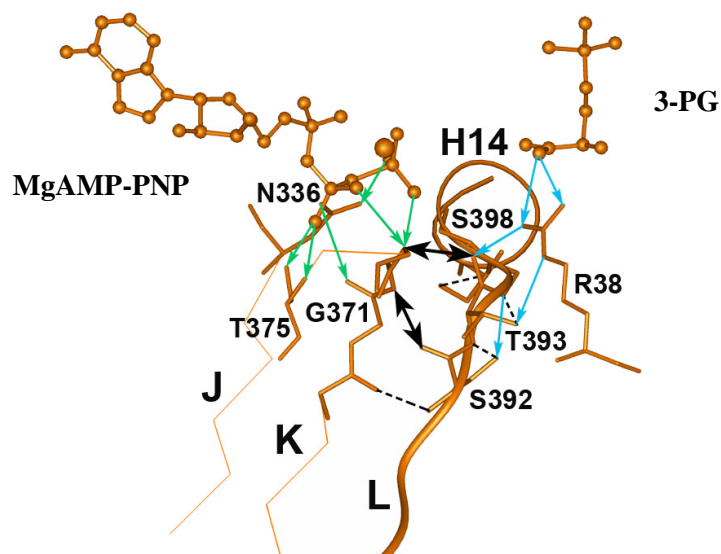
- ❖ Bizonyításra vár, hogy valóban a  $\beta$ L redő képviseli-e a fő csukló-régiót, mely a doménzáródás alapvető mozgatórugója és a csukló-régiók mozgása hogyan, mely oldallánc-kölcsönhatásokon keresztül valósul meg. Szintén nem tudjuk még, hogy a szubsztrátok kötődése hogyan, milyen molekuláris mechanizmus által indítja el a doménzáródás folyamatát és miért szükséges mindkét szubsztrát egyidejű kötődése a doménzáródáshoz.
- ❖ Kérdés az is, hogy az általunk felfedezett alternatív nukleotidfoszfát kötőhely, ill. az ott elhelyezkedő konzervatív Lys 215 (és más oldalláncok), valóban köti(k)-e a valódi szubsztrát, a MgATP foszfátjait. További kérdés, hogy a Lys 215 oldallánc, amely a nyitott inaktív konformációban, a reakcióban átadódó foszfo-csoport helyétől nagyon távol helyezkedik el, hogyan kerülhet az aktív centrumba a szubsztrátok által szabályozott doménzáródás során.

Munkám kezdetekor még főként sertésizomból preparált fehérjével dolgoztunk, ezért a könnyebb előállítás céljából PET 11c vektorba klónoztam a humán PGK-t kódoló génszakaszt és *E. coli* BL21 (DE3) C+RIL törzsben termeltem a fehérjét. Ez lehetővé tette mutáns fehérjék előállítását is.

A szubsztrátok hatását először biofizikai mérésekkel vizsgáltam. Differenciális pásztázó mikrokalorimetriás (DSC) kísérleteimben a MgATP, MgADP ill. 3-PG jelenléte 2,6; 4,6 ill. 5,2 °C-kal emeli az olvadási hőmérsékletet és a terner komplex, azaz MgADP\*3-PG jelenléte tovább stabilizálja a fehérjét és az olvadási hőmérsékletet összesen 6,8 °C-kal emeli. A vizsgált PGK-nak csak az egyik, C-doménja tartalmaz 4 triptofánt. Ha a két domén külön-külön tekeredik le, fluoriméterben elvégzett felfűtési kísérletekben a DSC mérésektől eltérő olvadási hőmérsékletet mérhetünk. A szubsztrátok hatását a DSC mérésekkel azonos felfűtési körülmények között fluoriméterben is meghatároztam és

nem tapasztaltam különbséget az olvadási hőmérsékletek között, ami a domének nagyfokú együttműködésére utal. Különböző kristályszerkezetek molekuláris grafikai összehasonlítása alapján megállapítottuk, hogy bármelyik szubsztrát kötődése stabilizálja a másik domént is. Legstabilabb a terner komplex, amiből arra következtettünk, hogy a konformációs stabilitás és a doménzáródás szorosan összefügg.

2005 nyarán lehetőségem nyílt Hamburgban, az EMBL központban Dmitri Svergun vezetésével a vad típusú és mutáns fehérjék kisszögű röntgen szórásképének (SAXS) felvételére. A módszer segítségével képet alkothatunk a fehérje alakjáról oldat formájában, így detektálhatjuk a doménzáródás bekövetkeztét is. Először a vad típusú enzim szórásképét vettük fel szubsztrátmentes, 3-PG, MgADP és MgATP biner- ill. MgADP\*3-PG abortív és a működő MgATP\*3-PG terner komplexekben. Az így kapott szórási képeket összevetettük a kristályszerkezetek alapján számolt „elméleti” szórási képekkel, azaz megnéztük, hogy az adott mért görbe melyik elméleti görbével egyezik leginkább. Ezek alapján megállapítottuk, hogy a szubsztrátmentes fehérje doménjei teljesen nyitott állapotban vannak, a biner komplexek egyformán kismértékben záródnak és csak a terner komplexek esetében jön létre a zárt konformáció. Ez a kísérletsorozat tehát egyértelműen bizonyította, amit a kristályszerkezetek és a fenti DSC-méréseim is valószínűsítettek, hogy mindkét szubsztrát együttes kötődése szükséges a doménzáródáshoz. A kristályszerkezeti adatok részletes molekuláris grafikai elemzésével és a  $\beta$ L fő csukló régió atomi kölcsönhatásainak leírásával magyarázatot is tudunk adni arra, hogyan is működhet egy ilyen molekulári csukló. (2. ábra). A két szubsztrát külön-külön kötődésekor a megfelelő biner komplexekben új kötések jönnek létre (3-PG kötés hatására a kék, míg a nukleotid kötés következtében a zöld kapcsolat), amit a doménzáródáskor a csak terner komplexekre jellemző (fekete) kötések erősítenek. Tehát, látszólag meglepő módon, csak ennek a kevés számú további kötésnek a kialakulása vezet a domének összezáródásához. Ennek az a valószínű magyarázata, hogy a két szubsztrát együttes kötődésekor a biner komplexekben már részlegesen kialakult H-híd kötés-láncolat könnyen kiterjedhet, úgy, hogy a  $\beta$ L-t is magában foglalja, hiszen ez energetikailag kedvező.

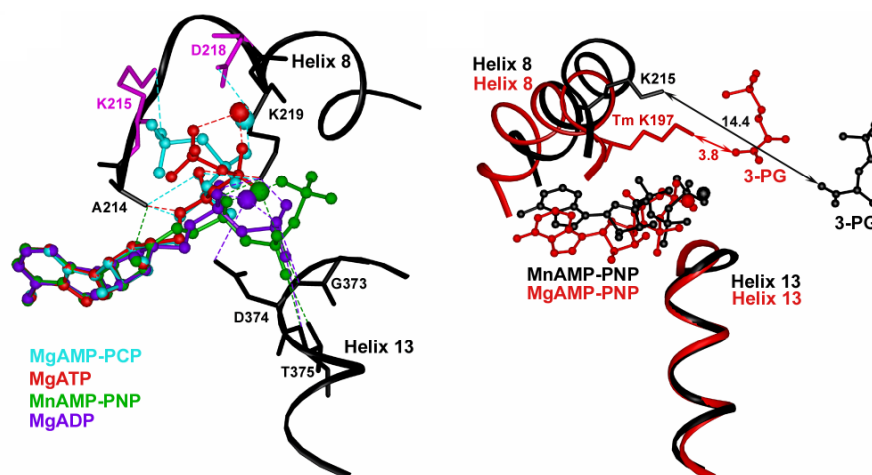


2. ábra

*Trypanosoma bruce* PGK\*3-PG\*MgAMP-PNP terner komplexet tartalmazó kristályszerkezetének részlete. Az oldalláncok jelölésekor a humán fehérje számozását használtam.

Ennek következtében a  $\beta$ L konformációja jelentősen megváltozik, ami a domének záródását vonja maga után. A  $\beta$ L tehát lényegében egy kettős molekuláris kapcsolónak tekinthető, amelyet a két szubsztrát együttese működtet. A  $\beta$ L konformációváltozása azután továbbítódik a többi fontos csukló régió, pl. a 7-es hélix felé. Az interdomén-régió konzervatív oldalláncai és néhány szubsztrátkötő oldallánc is feltehetően fontos szerepet tölthetnek be a fenti folyamatokban és konformációváltozások közvetítésében a két domén között. Ilyen oldalláncok az Arg38, Phe165, Phe196, Glu192, Lys215, Lys219, Asn336, Glu343Thr375, Ser392, Thr393 és a Ser398. Ezen oldalláncok szerepének tisztázására munkám további részében ezeket irányított mutagenézissel Ala-ra cseréltem és a mutáns fekérvéket funkcionális (enzimkinetika, szubsztrát-kötődés) ill. szerkezeti (CD, DSC, SAXS) vettem alá.

Az általunk felfedezett, a 8-as hélix N-terminálisán elhelyezkedő alternatív nukleotidfoszfát kötőhely létezésének bizonyítására és doménmozgásban esetleg betöltött szerepének vizsgálatára az ott elhelyezkedő konzervatív Lys 215-t kicseréltem Ala-ra és Arg-re (K215A, K215R). Összehasonlításként a már ismert katalitikus oldallánc, az Arg 38 kicserélését Ala-ra ill. Lys-re (R38A, R38K) is elvégeztem. A Lys 215 esszenciális katalitikus szerepét a drasztikus aktivitáscsökkenés mutatja (1500-ad ill. 500-ad részére csökken a K215A ill. a K215R mutáció esetében). A hatás hasonló mértékű az R38A mutációéhoz, melyről korábban már kimutatták, hogy esszenciális a katalízishez. Ellentétben az R38 oldallánccal, a K215 kémiai természetén kívül a térkitöltése is lényeges a katalízis szempontjából. Ezt támasztja alá, hogy az R38K esetében az aktivitás csökkenés csak 1,5-szörös volt. A MgATP és az 1,3-BPG *K<sub>m</sub>* értékei jelentősen megnövekednek, ami azt mutatja, hogy a működő turner komplexben a Lys 215 az átmenő foszfáttal kapcsolatot létesít a reakció mindkét irányában. Kötődési vizsgálatok során megfigyeltem a MgATP *K<sub>d</sub>* értékének növekedését, ami arra utal, hogy a Lys 215 már a biner komplexben is kapcsolatba lép az átmenő foszfáttal. Ezek az adatok alátámasztják, hogy a 8-as hélix N-terminálisán lévő Lys 215 a MgATP lehetséges alternatív kötőhelye. Ez a kapcsolat segítheti a doménzáródás folyamán a 8-as hélix közeledését 13-as hélix felé (3. ábra). A doménzáródás során, tehát a Lys 215 a MgATP  $\gamma$ -foszfátjával együtt mozdul el és valószínűleg ez a csoport pozicionálja az átadódó foszfo-csoportot megfelelő térhelyzetbe a katalízis során.

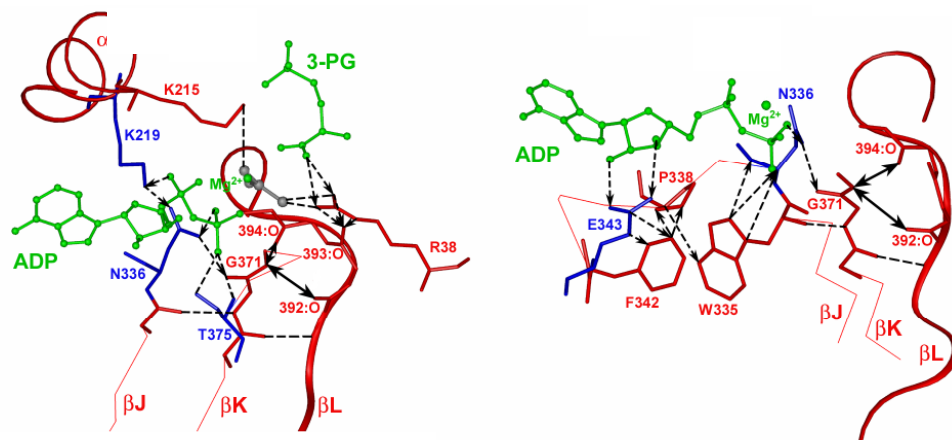


3.ábra

A nukleotid szubsztrát mozgása a 13-as és a 8-as hélix között és a hélixek elmozdulása a doménzáródás során.

A Lys 215 és a MgATP kölcsönhatás doménzáródásban betöltött szerepének közvetlen vizsgálatára SAXS méréseket végeztem. A K215A mutánsban bekövetkezett a doménzáródás mindkét szubsztrát jelenlétében, míg az R38A mutáns esetén ez nem jött létre. Tehát annak ellenére, hogy mindkét mutáns inaktív, a doménzáródásban csak az Arg 38 oldalláncnak van kitüntetett szerepe. Ez szerep a  $\beta$ L redőben elhelyezkedő Thr393 oldalláncsal való közvetlen kapcsolatát tekintve, valóban jól érthető. A Lys 215 oldalláncnak viszont nincs közvetlen szerepe a doménzáródásban, azonban amennyiben azt egy másik mechanizmus (pl. a  $\beta$ L működése) elindítja, akkor a Lys 215 is valószínűleg hozzájárul a zárt szerkezet stabilizálásához.

A nukleotidkötőhelyet alkotó fehérjeoldallancok szerepét is megvizsgáltam a doménzáródási folyamatban, azaz, hogy ezeknek mi a szerepük a nukleotid hatásának a csukló régióhoz való közvetítésében. Ezért a munkát a kristályszerkezeti összehasonlítások alapján fontosnak talált aminosavak, a Lys 219, Asn 336, Glu 343 és Thr 375 oldallancok Ala-ra való cseréjével folytattam. A mutánsok kinetikai és kötődési vizsgálatai alapján a K219A esetében tapasztaltuk a legnagyobb aktivitásvesztést, ami az R38A mutánséval összemérhető. Ez nem volt előre várható, mivel ez az oldallánc a MgATP  $\alpha$ -foszfátjával létesít kapcsolatot, nem pedig az átmenő  $\gamma$ - foszfáttal. A kísérletek tehát felvetik azt a lehetőséget, hogy a Lys 219 oldallánc (a Lys 215-vel együttműködve) katalitikus oldalláncnak tekinthető. Ezt a lehetőséget további (NMR) kísérletekben „transition-state” analógot használva fogjuk ellenőrizni. A kinetikai vizsgálatok alapján az Asn 336 és a Glu 343 Ala-mutánsai is nagymértékben csökkent katalitikus hatékonyságot mutattak. Az eredmények tehát azt valószínűsítették, hogy ez a két oldallánc is részt vesz (a Lys 219 mellett) a doménzáródásban. A kérdés eldöntésére DSC és SAXS méréseket végeztünk. A SAXS mérések a K219A, N336A és a E343A esetén csak részleges doménzáródást mutattak. A kalorimetriás felfűtés során a szubsztrátmentes mutánsok viselkedése nem tért el lényegesen a vad típuséhoz képest. Ezért szubsztrátok jelenlétében is megvizsgáltuk a nukleotidkötőhely környéki és a 3-PG kötésében résztvevő Arg 38 mutáns DSC felfűtési görbéjét. Összhangban a SAXS mérésekkel a Lys 219, az Asn 336 és a Glu 343 részvételét a doménzáródásban a DSC-s mérések is alátámasztják. Úgy gondoljuk, hogy a 2. ábrán bemutatott molekuláris kölcsönhatásokkal összhangban a 3-PG és a nukleotid szubsztrát együttesen hat a  $\beta$ L fő csukló régióra és játszik szerepet a doménzáródás elindításában. Az ismert kristályszerkezeteket összehasonlítva leírtuk a nukleotid szubsztrát által indított mozgás átadódásának lehetséges molekuláris mechanizmusát (4. ábra).



4.ábra

A nukleotid szubsztrát által elindított doménzáródás átadódása az oldallancok között

A doménzáródás szempontjából a  $\beta$ L redő konzervatív oldalláncainak (Thr 393, Ser 392 és Ser 398) központi szerepe lehet a fentebb bemutatott mechanizmusban, melynek feltérképezésére ezek, valamint a környező Phe 165, Glu 192 és Phe 196 Ala-ra való cseréjét is elvégeztem el. Feltételezésem az volt, hogy a  $\beta$ L redőben lévő Ser és Thr oldalláncok hidroxil-csoportjai különböző módokon alakíthatnak ki H-hidakat a mellettük lévő peptid N-atomokkal, mely a  $\beta$ L konformációját, és ezáltal a csukló-régió működését szabályozhatja. A szubsztrátok kötődési állandói alig, vagy egyáltalán nem változtak a mutációk következtében. Kinetikai vizsgálatok során azonban a katalitikus hatékonyság a Thr 393 esetében csökkent a leginkább (két nagyságrendet). A többi mutáns esetében ez nem jelentősen, vagy maximum egy nagyságrendet csökkent. Ez az eredmény alátámasztja azt a korábbi feltételezést, hogy a Thr 393-nak fontos szerepe van a domének közötti kommunikációban, mégpedig azáltal, hogy a 3-PG kötésében részt vevő Arg 38 oldallánccal létesít kapcsolatot a doménzáródás folyamán, így adódik át a 3-PG hatása a  $\beta$ L redőre. A F165A, E192A és F196A fehérjék megnövekedett  $K_m$  értékei (8-10-szeres) arra utalnak, hogy a Thr 393 mellett ezek az oldalláncok is szerepet játszhatnak a doménzáródásban. A kristályszerkezetek vizsgálata valóban arra utal, hogy a Phe 165, Glu 192 oldalláncoknak szintén fontos szerepe lehet a 3-PG indította konformációs hatás továbbításában a csukló régió felé. Másrészt ez a két oldallánc felelős a csukló régió stabilitásáért és ezzel együtt az egész PGK molekula szerkezeti integritásának fenntartásáért is (mutánsaik DSC kalorimetriás olvadáspontjai 5,7 ill. 4,9 °C-kal alacsonyabb a vad típusú fehérjéhez képest). A SAXS mérések a mutánsok részleges doménzáródását mutatták. Mindezt összevetve a kinetikai adatokkal úgy gondoljuk, hogy egyetlen vizsgált oldallánc sem felelős egyedül a molekuláris csukló működtetéséért, hanem ezek együttes kapcsolatrendszere szabályozza azt.

#### **Kapcsolódó publikációk:**

Varga, A., Flachner, B., Gráczer, É., Osváth, S., Szilágyi, A.N. & Vas, M. (2005) Correlation Between Conformational Stability of the Ternary Enzyme-Substrate Complex and Domain Closure of 3-Phosphoglycerate Kinase *FEBS Journal* **272** 1867-1885

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** 16853-865

Varga, A., Flachner, B., Konarev, P., Gráczer, É., Szabó, J., Svergun, D., Závodszy, P. & Vas, M. (2006) Substrate-Induced Double Sided H-bond Network as a Means of Domain Closure in 3-Phosphoglycerate Kinase *FEBS Letters* **580** 2698-2706

Szabó, J., Varga, A., Flachner, B., Konarev, P., Svergun, D., Závodszy, P. & Vas, M. Role of Side-chains in the Operation of the Molecular Hinge of 3-Phosphoglycerate Kinase *FEBS Letters* beküldve 2008 jan. 30.

Szabó, J., Varga, A., Flachner, B., Konarev, P., Svergun, D., Závodszy, P. & Vas, M. Communication Between the Nucleotide Site and the Main Molecular Hinge of 3-Phosphoglycerate Kinase *Biochemistry* beküldve 2007 dec. 21.