

FEHÉRJE MATRIX DINAMIKÁJA ÉS AZ ENZIMFUNKCIÓ KÖZÖTTI KAPCSOLAT

DAMJANOVICH SÁNDOR, SOMOGYI BÉLA és TRÓN LAJOS

Debreceni Orvostudományi Egyetem Biofizikai Intézete

Bevezetés

A különböző fehérjefunkciók (katalitikus, receptor stb. tulajdonságok) megértéséhez nyilvánvaló feltétel a struktúra tisztázása. A tudomány fejlődésének, az adott funkcionális tulajdonságokról felhalmozódó ismereteknek ugyanakkor az a következménye, hogy időről-időre változik a kutatásban a különböző strukturális tulajdonságok súlyozása.

Jól felismerhető ez a tendencia az enzimfehérjék katalitikus sajátosságainak vizsgálatát célzó kutatásokban is. Az enzimek katalizáló képességét leíró első elméletek csaknem kizárólag az enzimek aktív centrumában lezajló jelenségeket vizsgálták (l. pl. LAIDLER 1965), míg az enzim további részeit úgy tekintették, mint amelyek az aktív centrum atomcsoportjainak megfelelő konformációs állapotáért felelősek. Ezt a rigid-enzim képet látszottak alátámasztani a fehérjék és más makromolekulák kristályos szerkezetéről származó adatok, amelyek többek között Bernal, Perutz és Kendrew munkásságának köszönhetőek.

Az enzim funkcionális struktúrájának plasztikusabb képe akkor kezdett formálódni, amikor LINDERSTRØM-LANG a fehérjékben a H—D kicserélődés kinetikáját tanulmányozva azt találta, hogy annak sebességét a fehérjestruktúra plaszticitása, motilitása határozza meg, s ez a motilitás konformáció-érzékeny (LINDERSTRØM-LANG, SCHELLMAN 1959).

Tekintve, hogy a klasszikus elméletek szinte mindegyike az enzimek aktív centrumára lokalizálta az enzimek katalitikus hatását, érthető, hogy kezdetben a flexibilisebb enzimstruktúrát feltételező elméletek is az enzimek ligandkötő centrumát, vagy annak környezetét vizsgálták. Ilyen volt KOSHLAND „induced fit” elmélete, amely feltételezte, hogy az enzimhez kötődő szubsztrát deformálja az enzim „plasztikus” kötőcentrumát (KOSHLAND 1958). A MONOD és mtsai (1965) allosztéria elmélete, valamint a STRAUB és SZABOLCSI (1964) által megfogalmazott, az enzimek ligandkötését leíró ún. „fluktuációs fit” elmélet már túllépett ezen a szemléleten is, amennyiben az enzim molekulákat úgy tekintette, mint amelyek sok, szabadenergia-szintben egymáshoz közelálló konformációs állapotot is felvehetnek. Ezen konformációs állapotok egy része alkalmas egy adott szubsztrát megkötésére, míg mások nem. Az enzim molekulák tehát konformációs fluktuációt végeznek, és a

ligandok az alkalmas konformációs állapotú molekulához kötődve stabilizálják az adott állapotot, eltolva ily módon a konformációs egyensúlyt.

Ezek, a bizonyos mértékig önkényesen kiragadott példák is illusztrálják, hogy az enzimek katalitikus tulajdonságának vizsgálata során hogyan került fokozatosan előtérbe az enzimmolekulák struktúrájának dinamizmusa.

A fehérje matrix dinamikájának elméleti és kísérletes vizsgálati lehetőségei

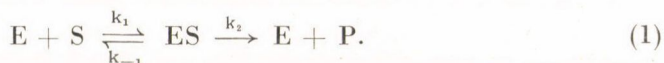
Arra a kérdésre, hogy a fehérje matrix struktúrájának dinamizmusa milyen szerepet játszik az enzimek katalitikus képességében, igen nehéz minden részletében alapos választ adni. Ennek oka részben az, hogy a fehérje, mint makromolekula dinamikájának atomi szintű leírása tulajdonképpen a klasszikus soktest-problémákba ütközik. Tovább bonyolítja a képet, hogy már a többé-kevésbé részletes leíráshoz is figyelembe kell venni, hogy a fehérjemolekulák a környezetükkel intenzív, és a dinamikus sajátosságokra nézve legalábbis részben meghatározó energetikai kapcsolatban vannak. Tekintve, hogy az enzimek fiziológiai környezetete vizes oldat, s a víz mint folyadék dinamikai szempontból önmagában is problematikus, a vizes oldatban lévő fehérjékben lezajló transzportfolyamatok explicit, részletes leírása — legalábbis jelenleg — nem valósítható meg.

A valóság eme pesszimista képe ellenére a hetvenes évek eleje óta egyre gyarapodnak azon elméleti és kísérletes vizsgálatok, amelyek a teljes enzimmolekula dinamikájának, fluktuációs karakterének, s ezek katalitikus aktivitásban játszott szerepének tisztázását célozzák.

Tekintve, hogy célunk főként az e tárgykörbe eső saját vizsgálataink összefoglalása, az elméleti vizsgálatokat illetően itt csak megemlítjük a GREEN és JI (1973) által kidolgozott elektro-mechano-kémiai elméletet, CASERTA és CERVIGNI (1974) piezoelektromos elméletét, valamint KRAMER 1940-ből származó elméletének GAVISH és WERBER (1979) által történő felelevenítését és átdolgozását mint olyan elméleteket, amelyek az enzimmolekula egészét mint fluktuáló, energiátranzfer folyamatokban aktívan résztvevő, a környezetével energetikai egységet képező katalitikus egységet kezelik.

Hasonló szemléletű enzimmodelt dolgoztunk ki intézetünkben 1971-től kezdődően (SOMOGYI, DAMJANOVICH 1971, 1975; DAMJANOVICH, SOMOGYI 1973, 1978).

Vizsgálatainkban a legegyszerűbb, Michaelis-féle enzimreakciót tárgyaltuk:



Bár a valóságos enzimreakciók ennél jóval bonyolultabbak, a k_1 , k_{-1} és k_2 sebességi állandókkal jellemzett folyamatok univerzálisak, amennyiben

valamennyi enzimreakció bármely részlépése ezen sebességi állandók valamelyikével leírható folyamatként kezelhető.

Az ES komplex aktiválását eredményező folyamatokat illetően feltételezzük, hogy a komplex a környezetével állandó energiacsereben állva, a környezettől felvett energia egy részét fordítja az ES, ill. EP állapotokat elválasztó energiagát leküzdésére. A különböző típusú energiaforgalmat megvizsgálva azt találtuk, hogy a katalízisben az ún. $T \rightarrow V$ átmenetek játszanak meghatározó szerepet, vagyis azon folyamatok, amikor a környezet különböző molekulái (puffer, különböző nagyságú víz-asszociátumok stb.) a komplex felületére ütközve translációs energiájuk egy részét átadják az ES komplexnek úgy, hogy a felületi atomcsoportok vibrációs szintjeit gerjesztik. Ezen energiák egy része eljuthat egészen a komplex belsejébe is, más része azonban visszacsatolódik a környezethez. A komplexet a fehérjestruktúra által meghatározott speciális csatolású oszcillátorrendszerrel modellezve belátható, hogy a felületi csoportok vibrációs energiája a struktúra által meghatározott „energiautakon” az enzim aktív centrumába kerülhet. Feltételezzük, hogy a komplex aktiválásához annak kitüntetett felületi pontjain megfelelő időrendben energiát kell felvennie, vagyis az aktiváláshoz egy megfelelő „ütközési minta” szükséges. Nyilvánvaló, hogy a statisztikusan előforduló ütközések között a megfelelő ütközési minta előfordulási valószínűsége az enzimre specifikus, amennyiben az enzimre jellemző kitüntetett felületi pontok számától, helyétől, s az ugyancsak enzimfüggő időrendtől függ. Ez a valószínűség függ továbbá — a $T \rightarrow V$ átmenetekre fennálló kvantumfizikai megkötések miatt — a környező molekulák tömegeloszlásától is (STRETTON 1969).

A kinetikai konstansokat fizikai paraméterekre bontva, a fent bemutatott feltételeket egy, a folyadékokra kidolgozott egyszerű rácsmodell (SOMOGYI 1971) segítségével vettük figyelembe a k_2 és k_{-1} konstansokat felépítő paraméterek további felbontására.

A matematikai tárgyalás végeredménye:

$$k_{-1} = P_s \frac{kT}{\pi \lambda^2 \eta \bar{Q}} \left[e^{-\frac{E_d}{kT}} - \xi e^{-\frac{E_p}{kT}} \right] \quad (2)$$

ill.

$$k_2 = P_s \frac{\xi kT}{\pi \lambda^2 \eta \bar{Q}} e^{-\frac{E_p}{kT}}, \quad (3)$$

ahol

$$e^{-E_d/kT} = \frac{\prod_{i=1}^{k'} \sum_{j=1}^{J_i} c_j V_j \exp\left(-\frac{m_j}{2kT} v\right)}{\sum_{j=1}^{J_i} c_j V_j} \quad (4)$$

és

$$e^{-E_p/kT} = \prod_{i=1}^{k'} \frac{\sum_{j=1}^{J_i} c_i V_j \exp\left(-\frac{m_j}{2kT} (w_i^2 - v_i^2)\right)}{\sum_{j=1}^{J_i} c_j V_j} \quad (5)$$

A (2)–(5) egyenletekben szereplő minden egyes paraméter az ES komplex vagy környezetének molekuláris szintű jellemzője (SOMOGYI, DAMJANOVICH 1975). Modellünk először írta le többé-kevésbé explicit, kvantitatív módon az enzimatikus reakciók kinetikai konstansait úgy, hogy megadta azok molekuláris paraméterekre való felbontását, s alapfeltevésként abból indul ki, hogy a komplex aktiválási folyamatában az enzim és környezete által együttesen meghatározott fluktuációs folyamatok — az ES komplexen belüli energia-vándorlási és szuperpozíciós folyamatok — lényeges szerepet játszanak.

A tárgyalásmód egyenes következménye, hogy a modell egy új enzimszabályozási módot jósol meg, azt ugyanis, hogy a környezet tömegeloszlásának megváltozása — minden más paraméter változatlan értéke mellett is — a k_2 és k_{-1} értékének az enzimre specifikus megváltozását eredményezi.

Azon kérdés kísérletes megközelítése, hogy az enzimfehérjék dinamikus jellemzői milyen szerepet játszanak az enzimatikus tulajdonságok meghatározásában — az elméleti jellegű vizsgálatokhoz hasonlóan —, számos nehézség leküzdését kívánja meg.

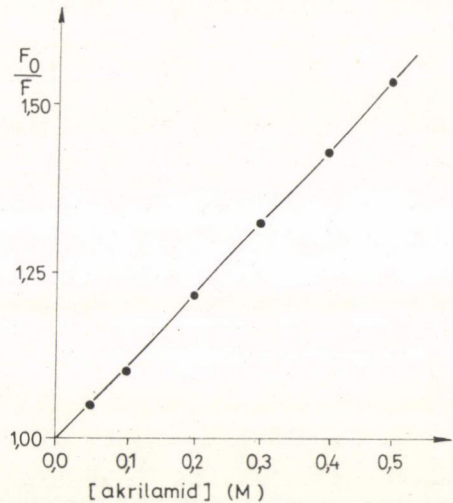
A fehérjeszerkezet belső dinamikájának, fluktuációs karakterének jellemzésére LAKOVICZ és WEBER (1973) a triptofán fluoreszcenciájának oxigén segítségével történő kioltását használták. Később EFTINK és GHIRON (1975, 1976a, 1976b, 1977) hasonló vizsgálatokat végeztek akrilamid segítségével. Mindkét kioltó csak úgy juthat be a fehérje belsejébe, hogy a fehérje matrix szerkezeti fluktuációjának eredményeképpen formálódó tranzienst csatornák, lyukak képződnek, és ezek teszik lehetővé a fehérjén belüli diffúziót. A dinamikus karakterű kioltási folyamat detektálása révén tehát a kioltók fehérjén belüli diffúziójáról nyerhetünk információt.

Kísérletes vizsgálataink célja az volt, hogy foszforiláz b esetén a triptofán csoportok fluoreszcenciájának akrilamid kioltását megpróbáljuk összefüggésbe hozni az enzim katalitikus vagy regulatorikus tulajdonságaival. Úgy véljük, hogy egy ilyen korreláció ugyan nem közvetlen bizonyítéka a fluktuációs mozgások enzimatikus folyamatokban betöltött szerepének, azonban a jelenlegi kísérletes módszerek segítségével többet állító konklúzióra jutni igen nehéz lenne.

Vizsgálataink során az alábbi eredményeket kaptuk: akrilamid hatására a foszforiláz b triptofánjainak fluoreszcencia intenzitása csökkent. Ezt szemlélteti az 1. ábra, ami a mérési adatoknak a STERN—VOLMER-egyenlet (1919)

szerinti ábrázolását mutatja. A fluoreszcencia kioltás értékére jellemző F_0/F hányados 0,5 M akrilamidkoncentráció értékig lineárisan nő, ami arra utal, hogy a kioltás mechanizmusát tekintve dinamikus. Ezt a fluoreszcencia élettartam méréseink is igazolták.

A módosított STERN—VOLMER-egyenlet alkalmas annak eldöntésére, hogy az összes triptofánmennyiség hányad része hozzáférhető a kioltó számára. Ennek vizsgálatát az tette szükségessé, hogy a foszforiláz triptofán fluoresz-



1. ábra. A foszforiláz b saját fluoreszcenciájának az akrilamid koncentrációtól való függése STERN—VOLMER ábrázolásmódban. A méréseket 30 °C-on végeztük, a fluoreszcenciát 295 nm hullámhosszú fényel gerjesztettük, az emissiót 333 nm hullámhossznál detektáltuk. A minták abszorpciója a gerjesztési hullámhosszon 0,05 volt. F_0 az akrilamidot nem tartalmazó minta fluoreszcencia intenzitása

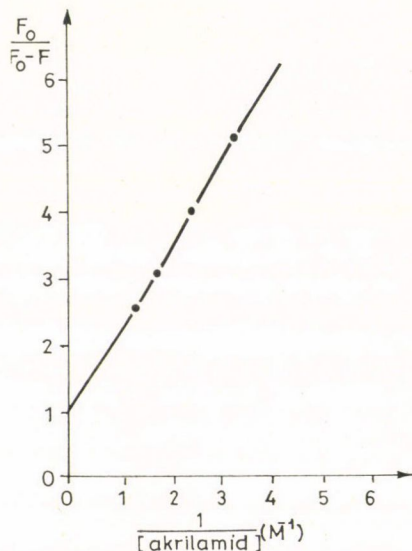
cencia káliumjodid segítségével történő kioltásának analízise arra utalt, hogy a molekulánkénti 12 triptofán közül 3 a felülethez közel, míg 9 az enzimmolekula belsejében helyezkedik el.

A 2. ábra a mérési adatok módosított STERN—VOLMER-egyenletnek megfelelő ábrázolását mutatja. Az ordináta metszet értéke azt mutatja, hogy az akrilamid végtelen nagy koncentrációban az összes triptofánt képes kioltani, azaz a foszforiláz minden triptofán csoportját eléri, tehát valóban bejut az enzimmolekula belsejébe.

Az enzim fluoreszcenciás vizsgálataival párhuzamosan enzimaktivitásmérések is történtek. Ezen vizsgálatok azt mutatták, hogy az akrilamid csökkenti az enzim maximális sebességét, de a szubsztrátkötő képességét nem befolyásolja. Ezt mutatja a 3. ábra, ami különböző glükóz-1-foszfát (G-1-P) és akrilamid-koncentráció mellett végzett aktivitásmérési adatok

Lineweaver—Burk szerinti ábrázolása. A foszforiláz többi ligandjára (glikogén, AMP) is hasonló eredményeket nyertünk.

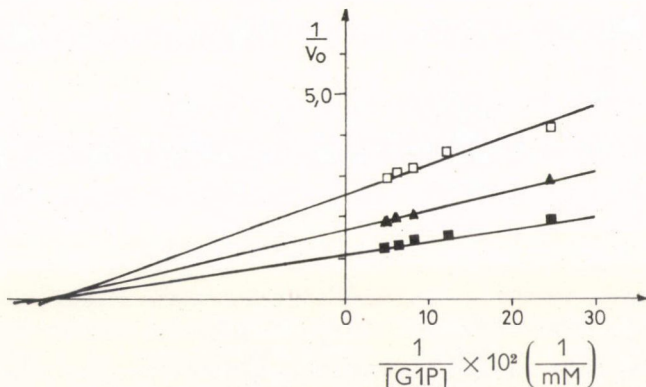
Az akrilamid denaturáló, vagy durva konformáció-változtató hatása ellen szól az a tapasztalatunk, hogy 0,5 M akrilamid-koncentrációig az enzim egyrészt kb. négy órán át változatlan aktivitást mutat, másrészt a triptofán csoportjainak fluoreszcenciás spektruma sem változik. Megvizsgálva az akrilamid hatásának reverzibilitását azt tapasztaltuk, hogy mind a triptofán fluoreszcenciára, mind az enzim aktivitására gyakorolt hatás tökéletesen



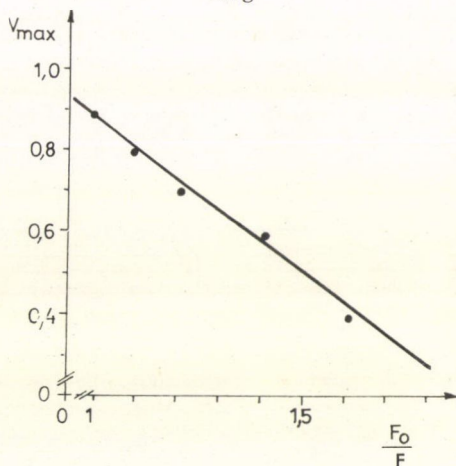
2. ábra. A foszforiláz b saját fluoreszcenciájának az akrilamid koncentrációtól való függése módosított STERN—VOLMER ábrázolásmódban. A mérések feltételei azonosak az 1. ábra szövegében megadottakkal

reverzibilis. Az akrilamid fluoreszcencia kioltó- és aktiváláscsökkentő hatásának korrelációját illetően a 4. ábra nyújt felvilágosítást.

Az ábra tanúsága szerint a korreláció meglepően erős. Eszerint, s a fenti megállapítások alapján eredményeink úgy interpretálhatók, hogy a két hatást kiváltó ok közös: az akrilamidnak az enzimmolekulában való jelenléte, egyrészt a triptofán csoportokkal ütközve azok fluoreszcenciájának ütközéses kioltását, másrészt a molekula atomcsoportjainak mozgási szabadságát (fluktuációját) korlátozva az enzim aktivitásának csökkenését okozza. Interpretációnkat alátámasztja, hogy az akrilamid nem befolyásolja az enzim funkcionális ligandjainak (aktivátor, szubsztrátok) kötődését, ami ellene szól annak, hogy a hatást az akrilamidnak a kötőcentrum konformációját megváltoztató specifikus kötődése produkálná.



3. ábra. A glikogénszintézis kezdeti sebességének a G-1-P koncentrációtól való függése kettős reciprok ábrázolásban. A méréseket 50 mM TRIS, 1,5 mM EDTA, 10 mM MEA pufferben (pH = 6,8) végeztük 30 °C-on. Koncentrációk: [Glikogén] = 1% (w/v); [AMP] = 1 mM; [akrilamid] = 0 (■); 0,4 M (▲); 0,8 M (□). A reakció sebességét önkényes egységekben adtuk meg



4. ábra. A foszforiláz b által katalizált reakció különböző akrilamid-koncentráció mellett mért maximális sebessége és a relatív fluoreszcencia intenzitás reciprokája közötti összefüggés

A vizsgálatok felhasználási lehetőségei

Bár alapszintű kutatások esetén nem hálás dolog az értékmegállapítás, talán nem érdektelen még az előzőekben bemutatott, erősen alapkutatósi probléma esetében sem legalább megkísérelni, hogy a gyakorlati vonatkozásokra is utaljunk. A fehérjék fluktuációja — amennyiben valóban nem csupán egy attributum, de funkcionális jelentése is van — szerepet játszhat a fehérje-fehérje kölcsönhatás során, úgy, hogy az összekapcsolódott fehérje „konglomerátum” már eleve más jellegű funkcionális egységet képezhet, mint az azt felépítő elemek pusztá addíciója. Ennek a multienzim komplexek működésének megértésében igen fontos szerepe lehet.

A sejtmembrán glikoproteidjeinek mozgása, amely immunológiai és még sok egyéb citológiai szempontból is alapvető fontosságú, közvetlen kapcsolatba hozható a fehérje-rész saját fluktuációjával. A közelmúltban kimutatták, hogy a főleg glikoproteidekből felépülő membrán receptorok laterális és rotációs diffúziója szinte kizárólag a fehérje-fehérje kölcsönhatástól függ (NIGG, CHERRY 1979, SCHINDLER és mtsai 1980). A receptorok laterális és rotációs mozgása (amit a fluktuáció befolyásol) a ligand-receptor kapcsolódására is kihathat. Ez utóbbi közvetlen immunológiai, onkológiai, farmakokinetikai jelentősége pedig vitathatatlan. Így túlzás nélkül állíthatjuk, hogy a teljesen elvontnak tűnő fehérjefluktuáció-kutatás némi adaptálás után közvetlen gyakorlati jelentőségre tehet szert.

IRODALOM

1. CASERTA, G., CERVIGNI, T.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA **71**, 4421 (1974).
2. DAMJANOVICH, S., SOMOGYI, B.: J. Theoret. Biol. **41**, 567 (1973).
3. DAMJANOVICH, S., SOMOGYI, B.: Symposia Biologica Hungarica **21**, 159 (1978).
4. EFTINK, M. R., GHIRON, C. A.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA **72**, 3290 (1975).
5. EFTINK, M. R., GHIRON, C. A.: J. Phys. Chem. **80**, 486 (1976a).
6. EFTINK, M. R., GHIRON, C. A.: Biochemistry **15**, 672 (1976b).
7. EFTINK, M. R., GHIRON, C. A.: Biochemistry **16**, 5546 (1977).
8. GAVISH, B., WERBER, M. M.: Biochemistry **18**, 1269 (1979).
9. GREEN, D. E., JI, S.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA **69**, 726 (1972).
10. KOSHLAND, D. E. Jr.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA **44**, 98 (1958).
11. LAIDLER, K. J.: Chemical Kinetics 2nd Edition, McGraw-Hill, London (1965).
12. LAKOVICZ, J., WEBER, G.: Biochemistry **12**, 4171 (1973).
13. LINDERSTRØM-LANG, K. U., SCHELLMAN, J.: in: The Enzymes Vol. 1. p. 443 (Boyer, P. D., Lardy, H., Myrback, K. Eds) Acad. Press, New York (1959).
14. MONOD, J., WYMAN, J., CANCEAUX, J. P.: J. Mol. Biol. **12**, 88 (1965).
15. NIGG, E. A., CHERRY, R. J.: Biochemistry **18**, 3457 (1979).
16. SCHINDLER, M., KOPPEL, D. E., SHEETZ, M. P.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA **77**, 1457 (1980).
17. SOMOGYI, B.: Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung. **6**, 289 (1971).
18. SOMOGYI, B., DAMJANOVICH, S.: Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung. **6**, 353 (1971).
19. SOMOGYI, B., DAMJANOVICH, S.: J. Theoret. Biol. **51**, 393 (1975).
20. STERN, O., VOLMER, M.: Z. Physik **20**, 183 (1919).
21. STRAUB, F. B., SZABOLCSI, G.: Molekularnaja Biologia, Nauka, Moscow (1964).
22. STRETTON, J. L.: in: Transfer and Storage of Energy by Molecules (Burnett, G. M., North, A. M. Eds) Vol. 2, p. 59. Wiley, London (1969).