

BIOMOLEKULÁK HATÁSMECHANIZMUSÁNAK TANULMÁNYOZÁSA SZIMULÁCIÓS ÉS BIOINFORMATIKAI MÓDSZEREKKEL

A genetikai információ megőrzése, átadása, valamint a szervezetben zajló kémiai folyamatok rengeteg molekula összehangolt tevékenységét igénylik. Ez a biomolekulák hatékony működését, kommunikációját feltételezi, továbbá azt is, hogy a molekulák mindenkor képesek a környezetükhöz dinamikusan alkalmazkodni, annak ingereire megfelelő választ adni.

A biomolekulák hatásmechanizmusának értelmezése elsősorban azon a feltételezésen alapul, hogy egy adott funkció meghatározott szerkezetet igényel, ez a szerkezet-funkció paradigma. Ezt az elképzelést közel 60 000 - elsősorban röntgen-krisztallográfiai módszerrel meghatározott - szerkezet támasztja alá¹. Fehérjék esetén azonban számos adat utal arra, hogy a molekula működése a statikus szerkezet módosulását, változását igényli. Ez lehet egy, a szervezetben katalizáló enzim katalitikus helyének megváltozása², de lehetnek jelentősebb konformációs változások is, pl. domének átrendeződése allosztérikus fehérjék-nél³. Vannak olyan fehérjék is, melyek nem vesznek fel kitüntetett szerkezetet, csak konformációs sokaságként jellemezhetők⁴. Ez a szerkezeti változatosság (konformációs diverzitás) bonyolult funkciókat tehet lehetővé, pl. kölcsönhatást többféle partnerrel⁵. Manapság egyre több kísérleti megfigyelés utal arra, hogy ezek a stabil szerkezettel nem rendelkező, ún. rendezetlen fehérjék, gyakoriak az élő szervezetben, és kulcsfontosságú folyamatokban, mint jelátvitel, transzkripció, sejtciklus szabályozás vehetnek részt^{6,7}. Ezen fehérjék működése megkérdőjelezi a klasszikus szerkezet-funkció paradigmát, molekuláris hatásmechanizmusuk értelmezése újfajta elveket igényel. Ezek kidolgozásával minden eddiginél teljesebb képhez juthatunk a fehérjék működéséről. Fontos megemlíteni továbbá, hogy ezek a molekulák a kóros folyamatokba történő beavatkozás, gyógyszertervezés új célpontjai lehetnek.

Vizsgált kérdések. Munkám során elsősorban a molekuláris működések elméleti leírásával foglalkoztam. Ezen belül a molekulák viselkedésének dinamikus vonatkozásai érdekeltek, az enzimekben lezajló kémiai reakciókat kísérő kisebb átrendeződésektől kezdve egészen a rendezetlen fehérjék kölcsönhatásainak leírásáig. Ezen belül három fő területet fogok tárgyalni, melyek a „dinamikai” skála három különböző pontját képviselik: (1) Enzimatis reakciók mechanizmusának leírása. Milyen elemi lépésekből állnak az enzimekben lezajló kémiai folyamatok? Melyek a reakcióban kulcsfontosságú szerepet játszó oldalláncok? Hogyan lehet az enzimatis reakciót befolyásolni, módosítani? (2) Specifikus molekuláris felismerési folyamatok jellemzése. Hogyan képesek molekulák kölcsönható partnereiket kiválasztani? Milyen külső tényezők hatnak a felismerési folyamatra és hogyan? Mi határozza meg a kialakuló komplex viselkedését? (3) Rendezetlen fehérjék vizsgálata. Milyen elvek alapján teremthetünk kapcsolatot a szerkezeti sokaság és a rendezetlen fehérjék működése között? Milyen fizikokémiai tulajdonságok, motívumok vagy szerkezeti elemek határozzák meg a

rendezetlen fehérjék partner-felismerő tulajdonságait? Mi jellemzi a rendezetlen fehérjék komplexeit?

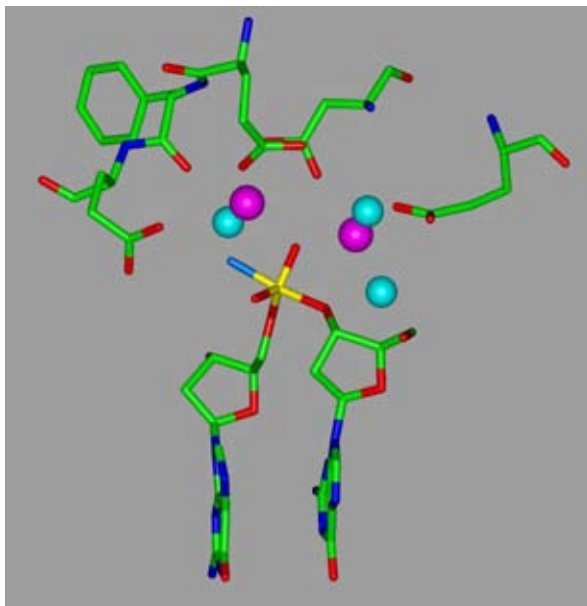
Az elméleti módszerek számos olyan kérdés tanulmányozását teszik lehetővé, melyet kísérletileg nehezen, vagy egyáltalán nem vizsgálhatók. Munkám során elsősorban szimulációs és bioinformatikai eljárásokat alkalmaztam, de a számításokkal nyert eredményeket mindig kísérleti adatokkal támasztottam alá.

Enzimatis reakciók mechanizmusának leírása. Az élő szervezetben lezajló kémiai folyamatok sebessége több mint tíz nagyságrenddel meghaladja a vizet közegben lejátszódó folyamatokét⁸. Az enzimatis katalízis magyarázatára sokféle elmélet született. Munkám során különböző kémiai reakciókat katalizáló enzimek, mint pl. xilóz izomeráz^{9,10}, citokróm c3¹¹, acetilkolin észteráz¹², endonukleáz V¹³, BamHI¹⁴⁻¹⁶, Uracil-DNS glikoziláz¹⁷, dUTPáz hatásmechanizmusát vizsgáltam szimulációs eljárásokkal, elsősorban hibrid kvantumkémiai/molekulamechanikai módszerekkel, illetve a kritikus oldalláncok protonáltsági állapotának vizsgálatával. Ezen számítások világosan megmutatták, hogy a katalízis hajtóereje minden esetben az átmeneti állapot stabilizációja, elsősorban elektrosztatikus kölcsönhatásokon keresztül. Ezek a kölcsönhatások még akkor is dominálnak, ha az aktív hely elsősorban apoláros oldalláncokat tartalmaz, mint azt az acetilkolin észteráz esetén igazoltuk¹². Ennek alapján sikerült megmagyarázni, hogy bizonyos reakciókhoz miért szükséges Mg^{2+} vagy Mn^{2+} ionok jelenléte, és miért lehet az ugyanabban a pozícióban elhelyezkedő Ca^{2+} ion gátló hatású.

Hasonló elvek alapján sikerült megmagyarázni, hogy a PD ...D/ExK endonukleázok esetén az aktív centrumban látott két fémion különböző szerepet játszik a DNS hasítási reakció során, így katalitikus hozzájárulásuk is különböző^{18,19}. Így azok az enzimek, ahol két, illetve egy fémion található a kristályszerkezetben, nem szükségszerűen más mechanizmussal működnek, lásd 1. ábra. A számítási eredmények megmutatták, hogy a katalízishez a legnagyobb hozzájárulás a reorganizációs energia csökkentéséből származik. Ez azt jelenti, hogy az enzim szerkezete úgy változik a reakció során, hogy folyamatosan optimális kölcsönhatást alakíthasson ki a reakcióban részt vevő és átalakuló csoportokkal. Ez azt is jelenti, hogy az enzim flexibilitása, a dinamikus hatások jelentősen lecsökkentik a reakciók energiagátját. A T4 endonukleáz V DNS javító enzim esetében megmutattam, hogy a reakcióhoz szükséges protonáltsági állapotok kialakulásához pl. elengedhetetlen az enzim konformációjának változása¹³. A feltárt mechanizmusok alapján több esetben mutánsokat terveztem. Az enzimatis folyamatok tanulmányozására munkatársaimmal többféle módszert is fejlesztettünk²⁰⁻²², melyek remélhetőleg nagymértékben hozzájárulnak majd más enzimek hatásmechanizmusának felderítéséhez.

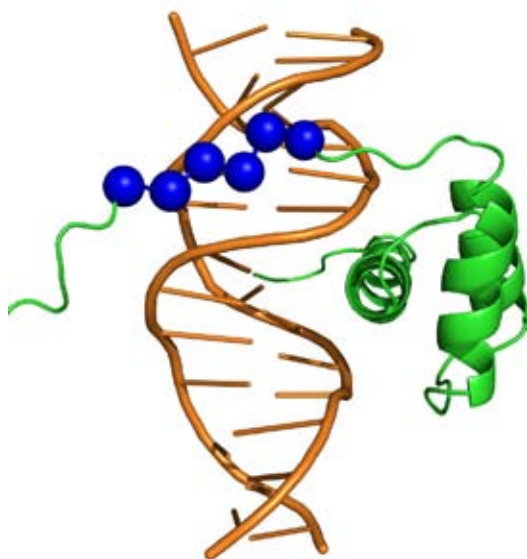
Specifikus molekuláris felismerési folyamatok jellemzése. A molekulák kommunikációjának alapvető feltétele, hogy egymással specifikus kölcsönhatásokat létesítsenek. Korábban úgy gondolták, hogy ehhez az előre kialakult molekuláris felszínek szerkezeti és elektrosztatikus komplementaritása szükséges (kulcs-zár modell, domén-domén kölcsönhatások). Később felvetették az indukált fit mo-

dellet, melynek során egyik, vagy mindkét partner szerkezete változik a felismerés során. Mind DNS-sel (T4 Endonukleáz V²³, UDG¹⁷, dUTPáz²⁴, BamHI^{25,26}),



1. ábra. A BamHI enzim aktív helyének átmeneti állapota kvantumkémiai-molekulamechanikai szimulációk alapján. Az aktív helyen lévő Mg²⁺ ionokat ciklámen, a hozzájuk kötődő vízmolekulákat világoskék, a támadó hidroxid iont pedig középkék szín jelöli. A katalízishez legnagyobb mértékben a hidroxid ionhoz kötődő A fémion járul hozzá.

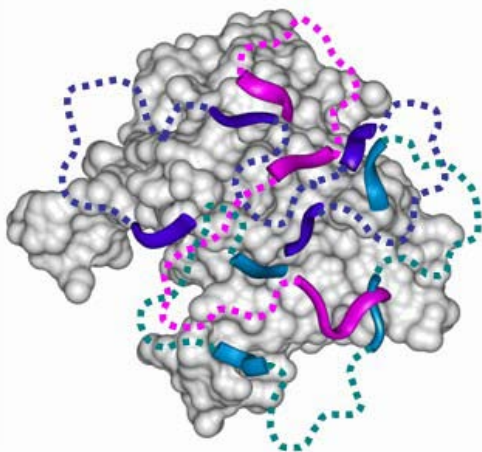
mind pedig kismolekulás szubsztráttal kölcsönható fehérjék (prolil oligopeptidáz²⁷) esetén rámutattunk, hogy a konformációs változások önmagukban még nem magyarázzák meg a szelektivitást. Ehhez szükséges a dinamikus tulajdonságok figyelembevétele, mely ezekben az esetekben szinte kizárólagosan felelős a specifikus partner kiválasztásáért (2. ábra).



2. ábra. Az NK-2 homeodomén specifikus kölcsönhatása DNS-el (a szerkezet PDB kódja 1nk2). A kötődésben kulcsszerepet játszó rendezetlen N-terminális töltéssel rendelkező aminosavait kék szín jelöli.

DNS javító enzimek esetén pl. a DNS hibák megváltoztatják a DNS flexibilitását és elősegítik a hibás, eltávolítandó bázis kifordulását²³. Prolil oligopeptidáz esetében a szubsztrát aktív helyre történő bejutását a molekula dinamikus tulajdonságai teszik lehetővé²⁷. Rámutattunk továbbá külső tényezőkre, mint a felismerendő molekulát körülvevő víz szerkezetének és a benne jelenlevő kétértékű fémionoknak a szelektivitást befolyásoló hatására és ennek okaira^{25,26}.

Rendezetlen fehérjék vizsgálata. A stabil térszerkezettel nem rendelkező fehérjék tanulmányozása a szerkezeti biológia fiatal, nagyon gyorsan fejlődő területe. Ezek a fehérjék gyakran molekuláris felismerési folyamatokban vesznek részt és igen specifikus komplexeket hoznak létre. Megállapítottuk, hogy a konformációs sokasággal jellemezhető fehérjék/szegmensek kitüntetett szerkezeti elemek vagy specifikus motívumok által képesek partnerükkel gyorsan kölcsönhatásba lépni^{28,29}. Ezek lehetnek tranziens másodlagos szerkezettel bíró részek, legtöbbször α -hélixek, melyek a komplexben megőrződnek, ami azt bizonyítja, hogy a rendezetlen fehérjék nem random polimerként működnek. Ilyen, ún. „preformed” elemeket több mint 20 esetben kísérletileg is sikerült azonosítani. Rendezetlen fehérjék kölcsönhatásait közvetíthetik olyan motívumok is, melyek jelentősen eltérnek a környezetüktől. Ide tartoznak a fehérje-fehérje kölcsönhatásokat közvetítő lineáris motívumok is, melyeknek sikerült a rendezetlenséggel való kapcsolatát feltárni³⁰. Rendezetlen fehérjék gyakran feltekerednek a felismerési folyamat során, és a komplexben stabil térszerkezetet vesznek fel. Rámutattunk, hogy a komplexekben megmaradhat a szerkezeti sokféleség, mely alapvető fontosságú lehet a felismerési folyamat során. Tompa Péterrel (MTA Enzimológia Intézet) közösen bevezettük a bolyhos (fuzzy) komplexek fogalmát erre az esetre, és definiáltuk ennek kategóriáit³¹ (3. ábra). Ezek a rendezetlen komplexek a fehérjék működésének egészen újszerű értelmezését igénylik, és egy rendezetlenség-funkció paradigmához vezetnek³².



3. ábra. A bolyhos (fuzzy) komplexek random modellje. A rendezetlen fehérje rövid motívumokkal kötődik a partnerhez, melyek térben és időben változhatnak. Az őket összekötő linker régiók rendezetlen szerkezetűek. Ilyen például az elasztin vagy a T sejt receptor ζ lánc is, mikor homodimert képez.

A képlékeny szerkezet funkcionális sokféleséget is eredményezhet. Ezért ezek a fehérjék gyakran fordulnak elő a különböző szabályozó folyamatokban. Ezek közül a rendezetlen fehérjéknek a transzkripció szabályozásában betöltött szerepét

tanulmányoztam részletesen³³. Rámutattam, hogy a szabályozás minden lépése rendezetlen fehérjék kölcsönhatásán alapul és nagy konformációs változásokat igényel. A rendezetlenség szerepét részletesen vizsgáltam a Mediátor komplex fehérjéin³⁴. Itt megállapítottam, hogy a rendezetlenség az alacsony szekvenciális hasonlóság ellenére megőrződhet, mint szerkezeti tulajdonság. Továbbá, a felismerésben kitüntetett motívumok megléte és hasonlósága funkcionális hasonlóságokra enged következtetni. A Mediátor esetében a rendezetlenség evolúciós vonatkozásait is elemeztük. Javaslatot tettünk a rendezetlenség konzerváltóságának mértékére³⁵. Rámutattunk, hogy evolúciósan konzervált egységek, domének is lehetnek rendezetlenek³⁶. Vizsgáltam a rendezetlenség és a specifikus DNS szekvenciák felismerésének összefüggéseit is, melyeknek a transzkripciós folyamatokban szintén nagy szerepe van³⁷.

Eredményeink egyértelműen rámutatnak a fehérjék konformációs diverzitásának funkcionális fontosságára, és utalnak arra is, hogy a fehérjék fejlődése során ezek a flexibilis vagy rendezetlen részek kitüntetett szerepet játszhatnak. A jövőben szeretnék ezen a területen, a rendezetlen fehérjék evolúciójának problémáján dolgozni.

Irodalomjegyzék

1. Berman, H.M. et al. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res* **28**, 235-42 (2000).
2. Henzler-Wildman, K.A. et al. A hierarchy of timescales in protein dynamics is linked to enzyme catalysis. *Nature* **450**, 913-6 (2007).
3. Boehr, D.D., Nussinov, R. & Wright, P.E. The role of dynamic conformational ensembles in biomolecular recognition. *Nat Chem Biol* **5**, 789-96 (2009).
4. Wright, P.E. & Dyson, H.J. Intrinsically unstructured proteins: re-assessing the protein structure-function paradigm. *J Mol Biol* **293**, 321-31 (1999).
5. Dunker, A.K. et al. Protein disorder and the evolution of molecular recognition: theory, predictions and observations. *Pac. Symp. Biocomputing* **3**, 473-484 (1998).
6. Tompa, P. Intrinsically unstructured proteins. *Trends Biochem Sci* **27**, 527-33 (2002).
7. Tompa, P. The interplay between structure and function in intrinsically unstructured proteins. *FEBS Lett* **579**, 3346-54 (2005).
8. Warshel, A. et al. Electrostatic basis for enzyme catalysis. *Chem Rev* **106**, 3210-35 (2006).
9. Fuxreiter, M. et al. Role of electrostatics at the catalytic metal binding site in xylose isomerase action: Ca(2+)-inhibition and metal competence in the double mutant D254E/D256E. *Proteins* **28**, 183-93. (1997).
10. Fuxreiter, M., Farkas, O. & Naray-Szabo, G. Molecular modelling of xylose isomerase catalysis: the role of electrostatics and charge transfer to metals. *Protein Eng* **8**, 925-33. (1995).
11. Martel, P.J. et al. Comparative redox and pKa calculations on cytochrome c3 from several *Desulfovibrio* species using continuum electrostatic methods. *J Biol Inorg Chem* **4**, 73-86. (1999).
12. Fuxreiter, M. & Warshel, A. Origin of the catalytic power of acetylcholinesterase. Computer simulation studies. *J. Am. Chem. Soc.* **120**, 183-194 (1998).
13. Fuxreiter, M., Warshel, A. & Osman, R. Role of active site residues in the glycosylase step of T4 endonuclease V. Computer simulation studies on ionization states. *Biochemistry* **38**, 9577-89. (1999).

14. Fuxreiter, M. & Osman, R. Probing the general base catalysis in the first step of BamHI action by computer simulations. *Biochemistry* **40**, 15017-15023 (2001).
15. Mones, L., Kulhanek, P., Florian, J., Simon, I. & Fuxreiter, M. Probing the two-metal ion mechanism in the restriction endonuclease BamHI. *Biochemistry* **46**, 14514-23 (2007).
16. Mones, L., Simon, I. & Fuxreiter, M. Metal-binding sites at the active site of restriction endonuclease BamHI can conform to a one-ion mechanism. *Biol Chem* **388**, 73-8 (2007).
17. Osman, R., Fuxreiter, M. & Luo, N. Specificity of damage recognition and catalysis of DNA repair. *Comput Chem* **24**, 331-9. (2000).
18. Pingoud, A., Fuxreiter, M., Pingoud, V. & Wende, W. Type II restriction endonucleases: structure and mechanism. *Cell Mol Life Sci* **62**, 685-707 (2005).
19. Pingoud, V. et al. On the divalent metal ion dependence of DNA cleavage by restriction endonucleases of the EcoRI family. *J Mol Biol* **393**, 140-60 (2009).
20. Mehler, E.L., Fuxreiter, M., Simon, I. & Garcia-Moreno, E.B. The role of hydrophobic microenvironments in modulating pKa shifts in proteins. *Proteins* **48**, 283-92. (2002).
21. Mones, L., Kulhanek, P., Simon, I., Laio, A. & Fuxreiter, M. The energy gap as a universal reaction coordinate for the simulation of chemical reactions. *J Phys Chem B* **113**, 7867-73 (2009).
22. Solt, I. et al. Evaluating boundary dependent errors in QM/MM simulations. *J Phys Chem B* **113**, 5728-35 (2009).
23. Fuxreiter, M., Luo, N., Jedlovsky, P., Simon, I. & Osman, R. Role of base flipping in specific recognition of damaged DNA by repair enzymes. *J Mol Biol* **323**, 823-34. (2002).
24. Nemeth-Pongracz, V. et al. Flexible segments modulate co-folding of dUTPase and nucleocapsid proteins. *Nucleic Acids Res* **35**, 495-505 (2007).
25. Fuxreiter, M., Mezei, M., Simon, I. & Osman, R. Interfacial water as a „hydration fingerprint” in the noncognate complex of BamHI. *Biophys J* **89**, 903-11 (2005).
26. Solt, I., Simon, I., Csaszar, A.G. & Fuxreiter, M. Electrostatic versus nonelectrostatic effects in DNA sequence discrimination by divalent ions Mg²⁺ and Mn²⁺. *J Phys Chem B* **111**, 6272-9 (2007).
27. Fuxreiter, M. et al. Flexibility of prolyl oligopeptidase: molecular dynamics and molecular framework analysis of the potential substrate pathways. *Proteins* **60**, 504-12 (2005).
28. Fuxreiter, M., Simon, I., Friedrich, P. & Tompa, P. Preformed structural elements feature in partner recognition by intrinsically unstructured proteins. *J Mol Biol* **338**, 1015-26 (2004).
29. Solt, I., Magyar, C., Simon, I., Tompa, P. & Fuxreiter, M. Phosphorylation-induced transient intrinsic structure in the kinase-inducible domain of CREB facilitates its recognition by the KIX domain of CBP. *Proteins* **64**, 749-57 (2006).
30. Fuxreiter, M., Tompa, P. & Simon, I. Local structural disorder imparts plasticity on linear motifs. *Bioinformatics* **23**, 950-6 (2007).
31. Tompa, P. & Fuxreiter, M. Fuzzy complexes: polymorphism and structural disorder in protein-protein interactions. *Trends Biochem Sci* **33**, 2-8 (2008).
32. Fuxreiter, M. & Tompa, P. Fuzzy interactome: the limitations of models in molecular biology. *Trends Biochem Sci* **34**, 3 (2009).
33. Fuxreiter, M. et al. Malleable machines take shape in eukaryotic transcriptional regulation. *Nat Chem Biol* **4**, 728-37 (2008).
34. Toth-Petroczy, A. et al. Malleable machines in transcription regulation: the mediator complex. *PLoS Comput Biol* **4**, e1000243 (2008).

35. Tóth-Petróczy, A. et al. Assessing conservation of disordered regions in proteins. *The Open Proteomics Journal* **1**, 46-53 (2008).
36. Tompa, P. et al. Close encounters of the third kind: disordered domains and the interactions of proteins. *Bioessays* **31**, 328-35 (2009).
37. Toth-Petroczy, A., Simon, I., Fuxreiter, M. & Levy, Y. Disordered tails of homeodomains facilitate DNA recognition by providing a trade-off between folding and specific binding. *J Am Chem Soc* **131**, 15084-5 (2009).



1993-ban végeztem az ELTE TTK vegyész szakán, Pro Scientia aranyérmesként. A PhD fokozatot 1996-ban az ELTE Kémia Doktori Iskolájában szereztem meg. Posztdoktori kutatómunkát az USA-ban folytattam, Arie Warshel, Helen Berman és Roman Osman laboratóriumaiban. 2000-ben tértem vissza Magyarországra, azóta az MTA SZBK Enzimológiai Intézetében, Simon István csoportjában dolgozom. Tanítok az ELTE Kémiai Tanszékcsoportjában, valamint a Szerkezeti Biológia Doktori Iskolában. 2004 óta összesen 7 diplomázó, illetve TDK-s diák, és 2 posztdoktor munkáját irányítom. Kutatási területem a fehérjeszerkezet és funkció közötti kapcsolat vizsgálata elsősorban elméleti módszerekkel. Eredményeimből eddig 40 tudományos közlemény és 4 könyvfejezet jelent meg. Tompa Péterrel közösen szerkesztett, a rendezetlen komplexekről szóló könyvünk 1 hónap múlva kerül nyomdába. Munkámat eddig számos hazai és külföldi díjjal jutalmazták, 2009-ben

Bolyai plakett és L'Oreal-Unesco „Nőkért és a tudományért” elismerésben részesültem.