

# FEHÉRJÉK TÁNCA

Gáspári Zoltán

PhD, ELTE Kémiai Intézet Szerkezeti Kémia és Biológia Laboratórium, Budapest  
szpari@chem.elte.hu

Az élőlények, bár tudományos alaposágú meghatározásuk nem könnyű feladat, általában felismerhetőek néhány alapvető jellegzetességük alapján. Az egyik legfontosabb tulajdonságuk, hogy mozognak: másznak, futnak, repülnek, úsznak, vagy éppen lassan növekednek formájuk megváltoztatásával egyidejűleg. A mozgékonyág eredete után kutatva megfigyelhető, hogy az élő anyag szerveződésének hierarchiájában egyre lejjebb és lejjebb hatolva minden szinten megtaláljuk az arra jellemző mozgásformákat: az izmok összehúzódhatnak, a testnedvek keringenek, a sejtek egymáshoz képest eltolódhatnak vagy elvándorolhatnak, a sejtek belseje nem szűnő, folyamatos áramlásban van. A sejten belül a sejtalkotók és a makromolekulákból álló összetett struktúrák, komplexek világában is találunk számos „mozgó alkatrészt”. Jelen írásomban az ezen képleteket felépítő molekulák, melyek többségükben fehérjék, belső mozgékonyágának jelentőségébe és vizsgálatába kívánok rövid betekintést nyújtani.

A fehérjék húsz különböző fajta aminosav elvben tetszőleges sorrendben és hosszúságig való összekapcsolódásával jönnek létre. Az aminosavak sorrendje, szekvenciája jellemző az adott fehérjemolekulára, és összetett módon meghatározza annak biológiai feladatát. A klasszikus biokémiai nézet alapján a fehérje a szekvencia által meghatározott, háromdi-

menziós térszerkezetet vesz fel, amely célszerű alakjával és a meghatározott helyeken „felkínált” különböző kémiai részletekkel, csoportokkal együtt határolja be és teszi lehetővé az adott molekula biológiai szerepét.<sup>1</sup> Ez a szerep lehet például (messze a teljesség igénye nélkül) más molekulák átalakítása (enzimek), környezeti anyagok érzékelése (receptorok), gének ki/be kapcsolása (transzkripció faktorok), más fehérjék aktivitásának szabályozása, a sejtek alakjának és alakváltozásainak, mozgásainak meghatározása, illetve kivitelezése (a sejtvázas fehérjéi, illetve motorfehérjék). Minden fehérjére igaz ugyanakkor, hogy „társas lény”, azaz mindig van (legalább) egy partnermolekula (mely lehet fehérjetermészetű vagy egyéb), amelyen keresztül a funkció megjelenik (ha más fehérje/nukleinsav/cukor vagy egyéb molekula nem is, a minden fehérjét fiziológias körülmények között körülvevő víz szolgál partnerként, mint például a fagyásgátló fehérjék esetében).

A háromdimenziós alak és a molekuláris funkció kapcsolata az első fehérjeszerkezetek meghatározása, azaz a XX. század 50-es évei óta jól ismert a kutatók számára, elviekben pedig lényegesen régebbre (19. század vége)

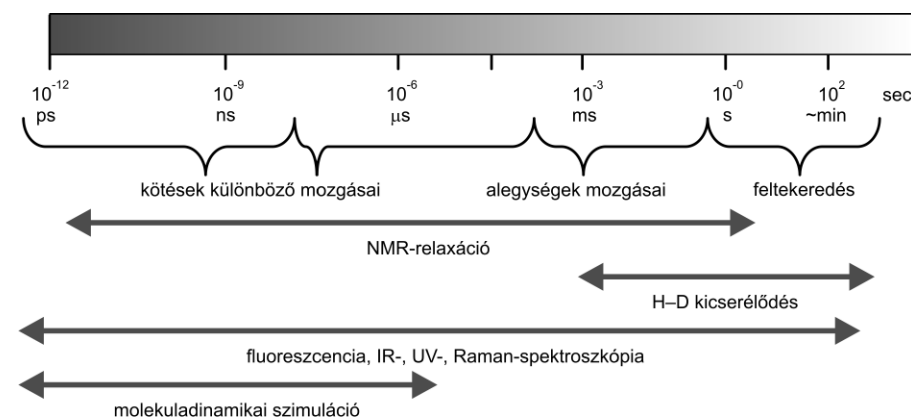
<sup>1</sup> Az utóbbi években felfedezett és egyre jelentősebbnek tartott, önmagukban határozott térszerkezettel nem rendelkező, ún. funkcionálisan rendezetlen fehérjékről Tompa Péter írása szól.

tekint vissza az Emil Fischer által megfogalmazott kulcs–zár elmélet formájában. Eszerint a partnermolekulák tökéletesen illeszkednek a fehérje által felkínált bemélyedésbe, kötőzsebbe, és ez képezi a molekuláris felismerés és funkció alapját. Ebbe a képbe merev, alakjukat egyáltalán nem változtató fehérjemolekulák illenek bele.

A fehérjékről azonban az atomi és magasabb szintű szerkezetük meghatározására kifejlesztett módszerekből tudjuk azt is, hogy számos esetben többféle konformációval (egymásba könnyen átalakuló térbeli szerkezettel) rendelkeznek, aminek sok biológiai folyamatban nagy szerepe van. Jól ismert például, hogy a kalmodulin nevű, általánosan előforduló  $Ca^{2+}$ -szenzor fehérje kötőpartnertől függően többféle térszerkezetet vehet fel. A glikolízis egyik enzime, a hexokináz ma már tankönyvi példája az átalakítandó molekula (szubsztrát) kötése által indukált „bezáródásnak”. A sejtek felszínén található, sejt–sejt és sejt–mátrix (sejtközötti állomány) kapcsolatokért felelős integrin nevű fehérjék a villamos áramszedőjéhez hasonlóan rendelkeznek egy inaktív, behajlított és egy aktív, nyújtott tér-

szerkezettel, melyben a partnermolekula megkötésére képesek. Ezen fehérjék esetében a különböző működési állapotokhoz tartozó szerkezeteket külön kísérlet során, egymástól függetlenül határozták meg, azaz statikus képeket vettek fel a molekula különböző konformációiról. Természetesen a kutatókat az egyik szerkezetből a másikba való átalakulási folyamat mechanizmusa és időskálája is foglalkoztatja, mind elméleti, mind gyakorlati (például hatékonyabb gyógyszerfejlesztés) szempontból, ez azonban már jóval nehezebben vizsgálható kérdés.

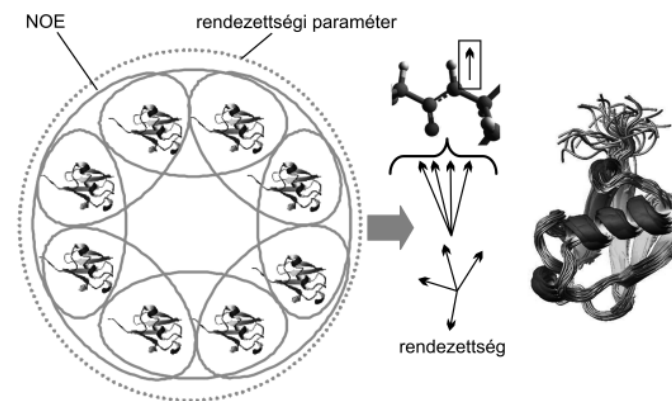
A ma elfogadott kép szerint a fehérjék igen széles időskálán dinamikusak: mozgásaik a minden molekulára jellemző kötővibrációktól a feltekeredési folyamatokig (amikor a „kitekertett” fehérjelánc felveszi a biológiai funkcióhoz szükséges háromdimenziós térszerkezetét) több mint tizennégy nagyságrendet ölelnek fel, ami nagyobb különbség, mint ami egy szívdobbanás és egy emberi élet hossza között van. Az eltérő időskálájú mozgásformák különböző kísérleti (főleg spektroszkópiai) és elméleti módszerekkel vizsgálhatóak (1. ábra).



1. ábra • A fehérjék mozgásainak időskálája és néhány (tovább nem részletezett) vizsgálati módszer alkalmazhatósági tartománya

A fehérjék térszerkezetének atomi szinten történő vizsgálatára ma leginkább két módszert használnak a kutatók: röntgenkristallográfiát és NMR-spektroszkópiát (NMR – nuclear magnetic resonance, azaz mágneses magrezonancia) Előbbi kristályos fázisban képes a molekula adott konformációjáról/konformációiról igen pontos és részletgazdag, ám statikus képet adni. Az NMR-spektroszkópia ugyanakkor oldatfázisban vizsgálja a molekulákat: itt a fehérjék a kristállyal ellentétben nagy konformációs szabadsággal rendelkeznek, következésképpen a mért spektroszkópiái paraméterek – legalábbis a gyors mozgásokra vonatkozóan – a mintacsőben található konformációs sokaság átlagát tükrözik. A biomolekulák térszerkezet-meghatározása során rutinszerűen a hidrogénmagok távolságáról információt adó nukleáris Overhauser-effektust (NOE) használjuk fel, amely a fentiek értelmében, flexibilis molekulákról lévén szó, egy-egy adott atomtávolság esetében igen bizonytalan (átlag)érték, azaz nem feltétlenül igaz az, hogy az összes mért távolság egyszerre teljesül egy adott molekula esetében. Elegendően sok ilyen atomi távolság felhasználásával azonban kaphatunk egy jól jellemezhető konformert. A ma rutinszerűen alkalmazott térszerkezet-meghatározó eljárások során számos térszerkezetet generálunk, majd ezek közül kiválasztjuk azokat, amelyek egymáshoz hasonlóak, és lehetőleg minden NOE-alapú távolság jellegű kényszerfeltételt kielégítenek. Ezek a szerkezetcsaládok, bár természetesen a szerkezetre/működésre vonatkozóan értékes biokémiai adatokat szolgáltatnak, a röntgendiffrakció precizitását a NOE-adatok pontatlansága miatt nem képesek elérni, ugyanakkor a számítás módja miatt nem tükrözi a molekula valós dinamikáját sem.

A modern NMR-spektroszkópia a NOE-adatok mellett számos egyéb paraméter mérésére, meghatározására alkalmas, és ezen paraméterek némelyike közvetlen kapcsolatban áll a molekulák belső dinamikájával. A tipikusan heteroatomok ( $^{15}\text{N}$ ,  $^{13}\text{C}$  izotópok) relaxációs tulajdonságai (gerjesztés után az alapállapotba való visszatérés mikéntje) alapján számolt rendezettségi paraméterek (a szakirodalomban elterjedt nevükön  $S^2$  értékek) az adott atom és a kapcsolódó hidrogén által meghatározott kötésvektor piko- és nanoszekundum időskálájú mozgásának kiterjedtségéről adnak képet (a 2. ábra jobb oldalán). Mivel ez az információ viszonylag könnyen lefordítható térbeli heterogenitásra, néhány éve megjelentek olyan szerkezetfinomító számítási eljárások, amelyek explicit módon figyelembe tudják venni az  $S^2$  értéket. Ezek közül az egyik legújabb módszer a MUMO (Minimal Under-restraining Minimal Over-restraining, Richter et al, 2007), amely esetében lehetőség van arra, hogy a különböző típusú paramétereket más-más méretű sokaságon vegyük figyelembe a szerkezetfinomítás során. A bemutatott példán (2. ábra) nyolc molekula párhuzamos molekuladinamikai szimulációja során az NOE-alapú kényszerfeltételeket páronként, míg a rendezettségi paramétereket mind a nyolc példányra egyidejűleg próbáljuk meg teljesíteni. Ezáltal megfelelően annak a kívánalomnak, hogy a NOE-adatokat kettőnél nagyobb sokaságra nem átlagoljuk, tehát nem engedjük meg a konformerek túlzott eltávolodását egymástól (elkerülve a túllillesztést vagy túlságosan laza megkötést), egyúttal a nyolc példány elegendő teret biztosít a rendezettségi paraméterek által jellemzett heterogenitás megjelenésének (minimális alulillesztés, illetve nem túlságosan szoros megkötés). Egy így



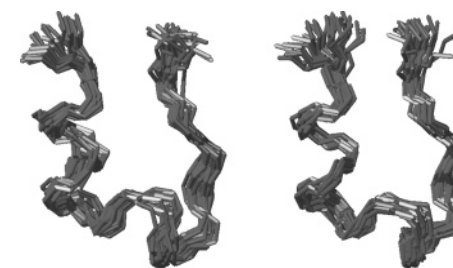
2. ábra • A MUMO-eljárás vázlatja és az eredményül kapott, a kötések dinamikáját térbeli heterogenitás révén tükröző szerkezeti sokaság (az ubiquitin nevű fehérje példáján)

előállított konformációs sokaságtól azt várjuk, hogy az egyes konformerek közötti különbségek a molekula valós dinamikájából adódnak, tehát egy időbeli jellemző biológiailag releváns térbeli leírását hoztuk létre.

A kapott, úgynevezett dinamikus konformációs sokaságok alkalmasak tehát arra, hogy az elvont, számszerűen megkapott rendezettségi paramétereket „lefordítsuk” a teljes molekulában megvalósuló mozgások „pillanatképekkel” jól jellemezhető szintjére, némileg hasonlóan ahhoz, amikor például a ló vágató mozgását gyors egymásutánban felvett állóképek segítségével jellemezzük. Az alábbiakban két, kutatócsoportunkban vizsgált fehérjét mutatok be példaként.

A leírói által Tc5b-nek keresztelt molekula az egyik legkisebb olyan fehérje, amely vizes oldatban jól meghatározott térszerkezetet vesz fel (Neidigh et al, 2002). (A hozzá hasonló méretű fehérjék általában nagyszámú, egymástól jelentősen eltérő konformációval jellemezhetőek.) Éppen ezért jól használható modell a nagyobb fehérjék stabilitásának és dinamikájának megértéséhez (gyakorlati jelentőségét pedig az mutatja, hogy egy szárma-

zeka 2008 óta cukorbetegség gyógyítására forgalomba hozott gyógyszer). Csoportunkban sikerült egyetlen apró kémiai módosítással az eredeti Tc5b egy továbbstabilizált változatát létrehozni (Hudáky et al, 2008). A Tc5b és az előállított Tc6b térszerkezete kissé mértékben különbözik, ami együtt jár a belső dinamika megváltozásával is. A Tc6b esetében megfigyelhető, hogy a belső mozgások valamivel egyenletesebbek és a molekula végei kisebb mértékű heterogenitást mutatnak, mint az eredeti molekula esetében (3. ábra). A stabilitás, a térszerkezet és a dinamika megváltozása tehát elválaszthatatlan egymástól.



3. ábra • Az eredeti Tc5b (jobbra) és stabilizált változatának (balra) dinamikus sokaságai a molekulagerinc sematikus ábrázolásával

Mint arról korábban már szó volt, a fehérjék mindig más molekulákkal kölcsönhatásba lépve fejtik ki biológiai szerepüket. Az általunk vizsgált kisméretű proteázinhibitorok nevüknek megfelelően fehérjéket lebontó enzimek gátlása révén hatnak. Az SGCI rövidítéssel jelölt fehérje kísérleteink alapján igen dinamikusnak mutatkozott: a benne stabilizáló szerepet betöltő három diszulfidhíd (a molekulalánc mentén távoli kénatomjai között létrejövő kovalens kapcsolat) jelenléte ellenére a kapott rendezettségi paraméterek jelentősen elmaradnak a nagyobb fehérjékre általában jellemző értékektől (Szenthe et al, 2004). Ezzel első ránézésre nehezen hozható összhangba, hogy az SGCI kiváló enzimgátló, hiszen ezt a funkciót tipikusan merevebb fehérjéknek és egyéb (például jóval kisebb gyógyszer-) molekuláknak tulajdonítják. Az

SGCI enzimmel való kölcsönhatását NMR-spektroszkópiával vizsgálva az inhibitor egészében látunk változásokat, nem csupán a partnermolekulával közvetlenül kölcsönhatásba lépő, viszonylag kis kiterjedésű részletében (Gáspári et al, 2006). Az SGCI dinamikus sokaságát előállítva fény derült arra, hogy az igen dinamikus molekulának szabad formában felvett konformációi között olyanok is vannak, amelyek igen közel esnek a kötött állapotban megvalósuló szerkezethez. Bár az észlelt szerkezeti változások nem látványosan nagyok, ez a megfigyelés, összevetve az NMR-spektroszkópiával észlelt nagyobb léptékű változásokkal azt sugallja, hogy az enzim nem „a maga képére formálja”, hanem mintegy csupán kiválasztja a megvalósuló sokaságból a kötött állapotnak megfelelő formát, egyúttal megváltoztatva az egyes konformációk

egymásba alakulásának egyensúlyát. A megfigyelt, teljes molekulára kiterjedő változások eszerint tehát nem térbeli, hanem elsősorban dinamikai jellegűek (4. ábra). Egyéb adatokkal együtt az a kép bontakozik ki, hogy a molekuláris partnerek között nem csupán geometriai, hanem mozgékonyági megfelelés, illeszkedés is megvalósul.

A 19. század elején a szerkezeti biológia egyik nagy kihívása a biomolekulák belső dinamikájának feltárása és a biológiai folyamatokban való szerepének tisztázása. Jelenleg képesek vagyunk ezt a dinamikát elsősorban NMR-spektroszkópiai módszerekkel atomi szinten feltárni, és ma már vannak látványos

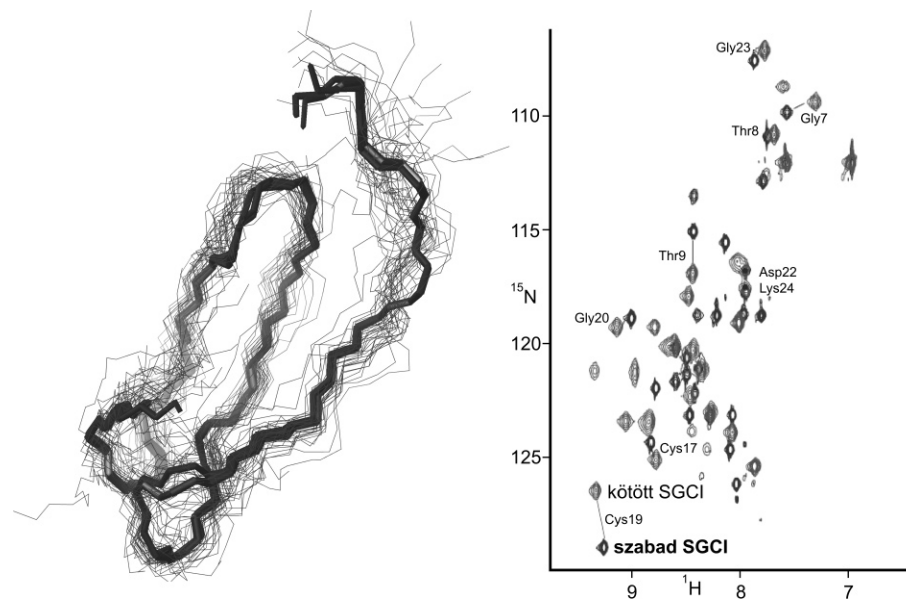
példák arra, hogy ez a dinamika hogyan játszik szerepet például enzimek működésében (Eisenmesser et al., 2005). A dinamika kézzelfogható megjelenítésével, dinamikus sokaságok előállításával pedig közelebb kerülünk a fehérjék valódi természetének leírásához és megértéséhez. Ha megismerjük a fehérjék szülő- és társastáncainak koreográfiáját, valóra válhat az élőlényekben sok tér- és időbeli tartományban jelenlévő mozgás gyökereinek feltárása.

Kulcsszavak: *fehérje, belső dinamika, NMR-spektroszkópia, rendezettségi paraméter, dinamikus sokaság, enzimműködés*

#### IRODALOM

- Eisenmesser, Elan – Millet, O. – Labeikovskiy, W. et al. (2005): Intrinsic Dynamics of an Enzyme Underlies Catalysis. *Nature*. **438**, 117–121.
- Gáspári Zoltán – Szenthe B. – Patthy A. et al. (2006): Local Inding with Globally Distributed Changes in a Small Protease Inhibitor upon Enzyme Binding. *The FEBS Journal*. **273**, 1831–1842.
- Hudáky Péter – Stráner P. – Farkas V. et al. (2008): Cooperation between a Salt Bridge and the Hydrophobic Core Triggers Fold Stabilization in a Trip-cage Miniprotein. *Biochemistry*. **47**, 1007–1016.

- Neidigh, Jonathan W. – Fesinmeyer, R. M. – Andersen, N. H. (2002): Designing a 20-Residue Protein. *Nature Structural Biology*. **9**, 425–430.
- Richter, Barbara – Gsponer, J. – Várnai P. et al. (2007): The MUMO (Minimal Under-restraining Minimal Over-restraining) Method for the Determination of Native State Ensembles Of Proteins. *Journal of biomolecular NMR*. **37**, 117–135.
- Szenthe Borbála – Gáspári Z. – Nagy A. et al. (2004): Same Fold with Different Mobility: Backbone Dynamics of Small Protease Inhibitors from the Desert Locust, *Schistocerca gregaria*. *Biochemistry*. **43**, 3376–3384.



4. ábra • Bal oldalon: az SGCI dinamikus sokaságának (vékony vonalak) és enzimkötött konformereinek (vastag vonalak) sematikus ábrázolása. Jobbra: az SGCI enzimhez való kötődésekor észlelt változások az NMR-spektrumban: a szabad és a kötött formának megfelelő jelsorozatok nagymértékben különböznek

