dmenyhard_394_25

Kölcsönhatási hálózatok és dinamikai sajátságok vizsgálata élettani szempontból jelentős fehérjékben

Karancsiné Menyhárd Dóra







Eötvös Loránd Tudományegyetem, Kémia Intézet
Szerkezeti Kémia és Biológia Laboratórium
HUN-REN-ELTE Fehérjemodellező Kutatócsoport

2025

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés 3
2. Alkalmazott módszerek 4
2.1. Molekulamechanika 4
2.2. Kvantumkémia és molekulamechanika együttes alkalmazása 7
2.3. Röntgendiffrakciós szerkezetvizsgálat 8
2.4. Kriogén elektronmikroszkópia 11
3. Eredmények 15
3.1. Hem fehérjék vizsgálata 15
3.1.1. A nitrogén-monoxid szintáz elektrontanszfer folyamatai 15
3.1.2. A nitrophorin 4 pH-függő nitrogén-monoxid affinitásának vizsgálata ... 19
3.1.3. Hem fehérjék, mint kétatomos gázok érzékeny szenzorai 21
3.2. Betegségokozó mutációk hatása egy pszeudouridináz működésére 25
3.3. Onkogén mutációk hatása K-Ras szerkezetére és dinamikájára 39
3.4. A podocin szerepe a vese szűrőrendszerében 52
3.5. Multimerizáció és flexibilitás hatása az acil-aminoacil peptidázok működésére 68
4. Összegzés 109
A dolgozat alapjául szolgáló közlemények 110
Referenciák 112

1. Bevezetés

Több mint hatvan évvel ezelőtt Max Perutz, John Kendrew és munkatársaik a Cambridge-i Egyetemen röntgenkrisztallográfia módszerét alkalmazva elsőként határozták meg fehérjék – a hemoglobin és a mioglobin – molekuláris szerkezetét[1,2]. Megállapították, hogy mindkét molekula a Linus Pauling által vizionált alfa-hélixekből épül fel, de jóval kompaktabb és komplexebb módon pakolódva, mintsem várták volna. A szerkezeti információk birtokában meg tudták magyarázni, hogyan köti és szabadítja fel a hemoglobin az oxigént és hogyan adja át a raktár fehérjeként is funkcionáló mioglobinnak. A felfedezés és az igen hamar elterjedté váló módszer mára közel 200000 makromolekuláris szerkezetet eredményezett.

A meghatározott szerkezetek lenyűgöző sokasága és sokfélesége, a szervezet működésébe való egészen új betekintés lehetőségének hatása alatt a biológiai makromolekulák dinamikus természetének vizsgálata egy időre háttérbe szorult. Azonban a különböző spektroszkópiai módszerek, valamint a kisszögű röntgen-szórás kísérletek eredményei, majd a makromolekulák vizsgálatára is fokozatosan alkalmassá váló NMR technikák és a krio-elektronmikroszkópiás módszerek alkalmazásával megfigyelt szerkezetsokaságok, egyensúlyi körülmények közt egymás mellett előforduló eltérő konformerek és asszociációk meghatározása különösen is világossá tette, hogy milyen alapvető jellemzője a makromolekuláris rendszereknek a változékonyság. Valójában e rendszerek természetét és térbeliségét a feltekeredési mintázat és a mintázatra épülő képlékeny, fluktuáló felszínek, váltakozó csatornarendszerek és belső terek, pH- és ionerősség-szenzitív kölcsönhatási hálózatok szinergizmusa alakítja ki, funkcionalitásukat pedig leginkább a kölcsönhatásra való - szintén dinamikusan változó - hajlamuk.

Munkám célja e belső világ felderítése volt: azokat a kölcsönhatási mintázatokat és mozgásformákat szerettem volna vizsgálni, melyek a szerkezet ismeretében, sokszor csak számításos módszerekkel érhetők tetten, de alapvetően befolyásolják a szervezetünket alkotó molekulák működését. Szerettem volna megérteni egészséges működésük legfontosabb szerkezeti és dinamikai vonatkozásait, valamint hogy hogyan romolhatnak el és esetleges korrekciójukra miként lehet lehetőség.

A dolgozatban bemutatott munkák időrendben szerepelnek, amely azért is bizonyult különösen hasznosnak, mert rávilágít a tudományos életutam során bekövetkezett szemléletváltásra is: míg az első fejezetben összegyűjtött munkák során az irodalomban fellelt érdekes kérdésekre fókuszáltunk, irodalmi adatsorokat, kísérleti eredményeket kíséreltünk meg értelmezni, ez később megváltozott. Hamar világossá vált ugyanis, hogy egy kérdést igazán jól körüljárni a kísérleteket végző kollégákkal szoros együttműködésben, vagy a kísérletek aktív résztvevőjeként lehet, amikor a számítások eredményei alapján mód nyílik kísérletek tervezésére, és azok eredményei alapján pedig az elméleti modellek pontosítására vagy újra-alkotására. Ezekben az esetekben a modellező „történet-mesélési” szerepkörbe kerülhet, ő lehet az, aki a kísérleti eredmények és az azokat reflektálni képes modellek alapján általános mondanivalókat fogalmazhat meg. Nagyon hálás vagyok, hogy ilyen típusú kutatásokban is részt vehettem, és ezek közül mutatok be néhány példát a dolgozat lényegi részét alkotó fejezetekben.

2. Alkalmazott módszerek

2.1 Molekulamechanika (az „Ezerarcú fehérjék" című 14. fejezetének (Fehérjemodellezés – Z. Gáspári, G. Gyimesi, T. Hegedűs, DK. Menyhárd)[3] általam írt szövegrészlete)

„Egy célfehérje konformációs terének *in silico* feltérképezése akkor lehetséges, ha ki tudjuk számítani az adott molekulához tartozó potenciális energiafelszín (PES – *Potential Energy Surface*) alakját, azt a „domborzati térképet" amely megadja az egyes atommag-elrendeződések energiáját, az elrendeződést meghatározó koordináták függvényében. A PES rangsorolja a konformációkat, minimumhelyei a stabil elrendeződéseknek, a minimumokat elválasztó gerincek átmeneti állapotoknak felelnek meg. A PES leírásához egy olyan függvény szükséges, amely a molekula minden lehetséges elrendeződéséhez egy energiaértéket rendel. Mivel a makromolekuláknak sokféle kémiailag releváns, azaz alacsony (relatív) energiájú elrendeződése lehetséges, az energiaszámításnak pillanatszerűnek kell lenni ahhoz, hogy a PES feltérképezése valószerű lehetőség legyen. Ezért az erőforrásigényes kvantumkémiai eszközök ebben az esetben nem alkalmazhatók, helyettük a potenciális energia értékeit egy egyszerűsített modellrendszer és számítási protokoll alkalmazásával számítjuk. Ezt az eljárást hívjuk molekuláris mechanikának (MM)[4,5].

A Born-Oppenheimer közelítés jegyében az MM potenciális energia (konformációs energia) a rendszert alkotó atomok relatív helyzetének függvényében értelmezett. Az MM „atom" tartalmazza az elektronokat is – együtt, egy tömeggel, mérettel és töltéssel rendelkező gömbszerű testet alkotva. A relatív atompozíciókat belső koordinátákkal (kötéshosszak, kötésszögek és torziós szögek) írjuk le. A konformációs energiát úgy számítjuk, hogy egyrészt kiértékeljük, hogy a vizsgált elrendeződésben az egyes belső koordináták megfigyelt értékei mennyiben térnek el a rájuk vonatkozó „ideális" értékektől, és az eltérés mértékében egy büntetőpotenciált alkalmazunk (kötő kölcsönhatások); másrészt az atomsugár és parciális töltés értékeinek felhasználásával van der Waals illetve elektrosztatikus kölcsönhatási energiát számítunk a kötésben nem lévő atompárok között (nem-kötő kölcsönhatások). Az energiakifejezés alakja tehát alapvetően a következőképp alakul:

$$V_{MM} = \sum_{i,j} k_{nyújtás}\left(r_{ij} - r_{ij}^0\right)^2 + \sum_{i,j,k} k_{hajlítás}\left(\theta_{ijk} - \theta_{ijk}^0\right)^2$$

$$+ \sum_{i,j,k,l} k_{torziós}(1 + cos\left(n_{ijkl}\varphi_{ijkl} - \delta_{ijkl}\right)) + \sum_{\alpha,\beta} A_{\alpha\beta}(\frac{C_{12}}{r_{\alpha\beta}^{12}} - \frac{C_6}{r_{\alpha\beta}^6}) + \sum_{\alpha,\beta} \frac{q_\alpha q_\beta}{D r_{\alpha\beta}}$$

ahol r_{ij} , θ_{ijk} , φ_{ijkl} a vizsgált elrendeződéshez tartozó belső koordináták (kötéshosszak, kötésszögek, és torziós szögek), q_α az atomok parciális töltése, $k_{nyújtás}$, $k_{hajlítás}$, $k_{torziós}$, r_{ij}^0, θ_{ijk}^0 , n_{ijkl} , δ_{ijkl} , $A_{\alpha\beta}$, C_{12} , C_6 és D paraméterek; az i, j, k, l indexek a kötésben lévő szomszédos atomokra, az α, β indexek pedig a kötésben nem lévő atompárokra vonatkoznak. A választott paraméterkészlet és az alkalmazott energiakifejezés pontos alakja határozza meg azt az „erőteret", amelyben a számítások zajlanak. A CHARMM, Amber, Gromos, OPLS3 erőtereket speciálisan bio-molekulákra vonatkozó számításokhoz fejlesztették ki, azaz ezek többsége képes kezelni olyan komplex rendszereket, amelyek fehérjéket, esetleg DNS vagy RNS molekulákat, illetve gyógyszermolekulákat és prosztetikus csoportokat tartalmaznak. Az erőterekkel számított potenciális energiák abszolút értéke nem hordoz információt, az egyes konformerek közti (azonos erőtérrel számított) energiakülönbségek fejezik ki azok stabilitási sorrendjét (az adott megközelítésen belül). Fontos megjegyezni, hogy az energia kifejezés nagyon egyszerű alakjából következően az erőterekkel számított potenciálisenergia-különbségek csak az egyensúlyi

elrendeződések közelében lesznek megbízhatóak, erősen torzult geometriákat, kötésfelhasadásokat, töltésátrendeződéseket, stb. ezzel a módszerrel nem lehet leírni. Az MM metodológia tehát a fehérjemolekulák stabil konformációinak felderítésére, átrendeződéseinek, dinamikai sajátságainak, ligandumkötési folyamatainak vizsgálatára alkalmazható.

A rendszerhez tartozó legmélyebb PES minimumot globális minimumnak (GM) hívjuk. A legtöbb MM számítás célja a GM-hoz tartozó konformáció felderítése és tulajdonságainak elemzése. A kiindulási konformációhoz legközelebb eső lokális minimumhely felderítése energiaminimalizációs eljárással lehetséges – a PES lokális meredekségét (gradiensét) követő algoritmusokkal. A GM azonosítása érdekében azonban konformációs keresést kell alkalmazni, amely a PES elegendően nagy területét „bebarangolva" azonosítja a lokális minimumhelyek közt a legalacsonyabb energiájút.

Szisztematikus keresésről akkor beszélünk, ha valamely kiválasztott belső koordináta értékét szisztematikusan elléptetve kiszámítjuk az összes elrendeződés energiáját (általában úgy, hogy a többi koordináta mentén energiaminimalizációt hajtunk végre). A GM megtalálásához—még igen jó minőségű kiindulási szerkezet birtokában is—általában számos belső koordináta optimalizációja szükséges, ezért ez az eljárás csak egészen egyszerű esetekben vezet sikerre. A sztochasztikus konformáció-keresések közül talán legnépszerűbb eljárás a Monte Carlo Multiple Minimum (MCMM) keresés[6]. Ez a módszer számításigénye miatt inkább kisebb részrendszerek optimalizálására alkalmas, például ligandumok a fehérje aktív zsebébe való illesztése során keletkezett lokális feszültségek relaxációjára, felszíni hurokrégiók, kisebb domének szerkezetanalízisére. Az optimalizáció alapvetően a torziós szögek terében történik. Az eljárás során az optimalizálandó molekularészlet összes szabadon forgatható torzióját (vagy azoknak a felhasználó által érdekesnek ítélt részét) egy egyéni, véletlenszerű értékkel megváltoztatjuk, majd az így előállított torzult konformáció energiáját minimalizáljuk (ezt hívjuk egy lépésnek). Amennyiben a vizsgált rendszer több önálló molekulát foglal magába (pl. enzim és liganduma), a lépések során ezek relatív helyzetét is megváltoztatja az algoritmus, egy véletlenszerű értékkel elforgatva illetve elmozgatva azokat egymáshoz képest. Az algoritmus az alacsony energiájú (a pillanatnyi legalacsonyabb energiájú szerkezet energiáját egy energia-ablakon belül megközelítő) elrendeződéseket tárolja, valamint azonosítja azt az esetet is, amikor egy már korábban megtalált elrendeződést állított ismét elő. Az energia-ablakon kívül eső konformációk is megtartásra kerülhetnek, ha a vizsgált szerkezet és a pillanatnyi GM energiakülönbségéből képzett Boltzmann faktor ($\exp(-\Delta E/kT)$) nem nagyobb, mint egy 0 és 1 közé eső véletlen szám – azaz minél kisebb ez az energiakülönbség, annál nagyobb valószínűséggel. Az algoritmus az így összegyűjtött konformációs sokaságból választja ki a további lépésekhez kiindulási szerkezetet, úgy hogy az a legkevesebbszer megtalált konformációk közül kerüljön ki. Ha már számos lépés során sem merül fel új, alacsony energiájú szerkezet, akkor mondhatjuk, hogy az algoritmus konvergált. Egy sikeres MCMM keresés végeredménye tehát egy konformációsokaság lesz, amely a globális minimumhoz tartozó szerkezetet és a választott energiaablakon belüli összes lokális minimuhoz tartozó szerkezetet tartalmazza.

Kísérleti módszerekkel meghatározott makromolekuláris szerkezetek relaxációjának, konformációs átalakulásainak tanulmányozására, dinamikai sajátságok felderítésére talán legalkalmasabb konformációs keresés egy determinisztikus módszer, a molekuláris dinamikai (MD) szimuláció. Az MD szimuláció során a klasszikus, newtoni mozgásegyenleteket oldjuk meg, kis integrációs lépésekben. Az atomokra ható lokális erő az erőtér energiafüggvényét felhasználva az összes koordináta mentén számítható:

$$F_i = -\frac{\partial V}{\partial r_i} \quad \text{és} \quad F_i = m_i \frac{d^2 r_i}{dt^2}$$

A gyorsulást egy választott időlépésen (Δt) belül állandónak tekintve, sebességet rendelhetünk a rendszert alkotó atomokhoz például a következőképpen:

$$v_i\left(t+\frac{\Delta t}{2}\right)=v_i\left(t-\frac{\Delta t}{2}\right)+\frac{F_i(t)}{m}\Delta t$$

Ha az atomokat Δt ideig elmozdulni engedjük, akkor egy új konformációt kapunk:

$$r_i(t+\Delta t)=r_i(t)+v_i\left(t+\frac{\Delta t}{2}\right)\Delta t$$

(a fenti példa a legelterjedtebb, ún. Leap-frog eljárást mutatja be, ahol az algoritmus stabilitásának megőrzése érdekében a sebességeket és a koordinátákat egymástól fél időlépéssel (Δt/2) elcsúsztatva számítjuk.)

Az eljárás így lokális energiagátakon való átkelést eredményezhet (a Δt idő alatt az atomok a PES alakjától függetlenül a kijelölt irányban haladnak). Az időlépést úgy kell megválasztani, hogy a leggyorsabb, még megfigyelni kívánt mozgásnál rövidebb legyen, a szimuláció teljes időtartamát pedig a leglassabb tanulmányozni kívánt átalakulás időtartamához kell igazítani (1. táblázat). A választott időlépés tehát leggyakrabban 1-2 fs, a szimulációk teljes időtartama pedig a ns-ms tartományban mozog.

időskála (sec)	***molekuláris mozgások***
10^{-15}–10^{-12}	kötésnyújtás, kötésszög hajlítása
10^{-12}–10^{-9}	aminosav-oldalláncok mozgásai, lokális átrendeződések, loop mozgások, kollektív mozgások
10^{-9}–10^{-6}	doménmozgások, másodlagos szerkezetek átalakulásai
10^{-6}–1	feltekeredés, letekeredés

1. táblázat. Különböző molekula-mozgások időtartamai

Az oldószerkörnyezet figyelembe-vételéhez legelterjedtebb módszer az explicit vízmolekulák és a periodikus határfeltételek használata. A szimulációs rendszert (a tanulmányozni kívánt molekulát, az azt szolvatáló vizet és ionokat) ekkor egy dobozba foglaljuk, majd végtelen számú azonos dobozzal vesszük körbe, periodikus rendszert hozva létre. A szimuláció a központi dobozban fog zajlani, a környezet pedig azt replikálja, ami két okból is igen kedvező. Egyrészt garantálja a szimuláció során az anyagmegmaradást, azaz ha egy atom „kiúszik" a központi dobozból, akkor a szomszédos replikából az ellentétes oldalon „be fog úszni" egy másolata. Továbbá lehetőséget ad az elektrosztatikus kölcsönhatás lassan lecsengő, esetleg a doboz határain is túlnyúló komponensének összegzésére.

Mivel a számítás során az atomok mozognak, a rendszerhez kinetikus energia, hőmérséklet és nyomás rendelhető, így energia, entrópia, és átlagos geometriai deszkriptorok számíthatók a megfelelő sokaságok előállítása mellett. A szabadenergia számításához például kanonikus sokaságot (NPT sokaság) kell előállítani, amihez termosztátot és barosztátot is kell alkalmazni—olyan algoritmusokat, amelyek a hőmérséklet és a nyomás várható értékét állandó értéken tartják. A statisztikus mennyiségek akkor számíthatók, ha a rendszer egyensúlyba jutott, azaz jelentős változások már nem történnek a konformációban, és a potenciális energia is egy állandó érték körül fluktuál. A teljes ekvilibráció akkor következik be, ha az összes lokális minimumhely elégségesen mintavételezett, ami nagy, komplex rendszerek mellett igen hosszú időt is igényelhet. A számítás ebben az esetben is egy konformáció-sokaságot eredményez, melyet az egyensúlyba jutott rendszer „pillanatfelvételei" (snapshot-ok: adott időközönként tárolt konformációk) alkotnak, együttesen írva le a rendszer adott hőmérsékleten elérhető különböző elrendeződéseit és azok betöltöttségét.

A szimulációs időtartam növelése mellett az algoritmus hatékonyabbá tehető több módon is. A replikakicseréléses molekuláris dinamikai (REMD) szimuláció során például több párhuzamos szimuláció zajlik a molekula több példányán (replikáján), jól megválasztott, kissé eltérő hőmérsékleteken. Rövid időközönként az algoritmus kísérletet tesz arra, hogy az aktuális konformációt az egyik replikából a másikba átemelje. Az eljárás a PES felderítetlen területeinek mintavételezését eredményezi azáltal, hogy lehetővé teszi az alacsonyabb (mondjuk: fiziológiás) hőmérsékleten zajló szimulációban feldúsult, magasabb energiájú elrendeződések potenciálisenergia-gátakon való átkelését egy magasabb hőmérsékleten történő szimulációban.

2.2 Kvantumkémia és molekulamechanika együttes alkalmazása

Számos esetben lehet szükség azonban arra, hogy egy makromolekuláris rendszer energiáját pontosa(bba)n tudjuk kiszámolni, vagy, hogy a molekulamechanika által nem leírt kémiai átalakulások vagy nem klasszikus kölcsönhatások alakulását kövessük. Ekkor az eltérő pontosságú módszereket alkalmazhatjuk egymás után vagy egymásba ágyazva. 1976-ban jelent meg Warshel és Levitt cikke[7], amelyben a lizozim aktív helyén megkötött N-acetil-glukózamin-hexamer lebomlásának első lépését modellezték úgy, hogy a kötésfelhasadásban közvetlenül érintett szubsztrát és enzim atomokat (körülbelül 20 atomot) kvantumkémiai módszerrel, míg a többi atomot és a komplexet körülölelő vízburkot molekuláris mechanikai (MM) eszközökkel tárgyalták.

Ez a — ma már QM/MM módszerként ismert — eljárás lehetővé teszi, hogy a biológiai makromolekulák működése során zajló olyan folyamatokat, amelyeket az MM eljárások nem tudnak tárgyalni racionális erőforrások alkalmazása mellett, a reakciókat befolyásoló alapvető környezeti hatások elhanyagolása nélkül vizsgálni lehessen[8]. Ide tartoznak például a kémiai reakciók, töltésátrendeződések, elektrongerjesztési folyamatok, melyeket MM energia-függvény, mely az egyensúlyi (nyugalmi állapotú) geometria jellemző értékeihez „húzza vissza" a belső koordináták értékeit, nem tud leírni. A tárgyalni kívánt átalakulás szempontjából legfontosabb régiót a legnagyobb pontosságú módszerrel (leggyakrabban valamilyen kvantumkémiai eljárással), a rendszer többi atomját kevésbé rigorózus módon (egyszerűbb kvantumkémiai, szemiempirikus vagy MM eljárást alkalmazva) kezeljük. A részrendszereket úgy célszerű meghatározni, hogy a részletesen tárgyalt ún. belső régió minél kisebb, de lehetőség szerint elektrosztatikusan semleges legyen, valamint, hogy lehetőleg ne nyúljanak át kovalens kötések a rendszerhatárokon.

Ha a QM/MM rendszerhatár egy kovalens kötést szel ketté, akkor mind a QM, mind az MM régió csonkolt lesz, amely műtermékek megjelenéséhez vezethet. A probléma egy lehetséges kezelésmódja, hogy új (az MM régió számára láthatatlan), ún. linker atomokat vezetünk be a határrégióban, melyek a kötés megszűnésekor felszabaduló vegyértékeket telítik (például egy –CH_2–CH_2– kötés felszakításakor szabadon maradt –CH_2 csoportot egy hidrogénatom bevezetésével –CH_3 csoporttá alakítva). A kötésfelhasadást úgy is lehet kezelni, hogy az elvesztett kölcsönható partnert egy pszeudopotenciállal helyettesítik, olyan elektrosztatikus és kémiai környezetet szimulálva a QM atomok számára, amely az intakt molekulára leginkább hasonlít. A probléma kezelésének legfejlettebb módja a lokalizált, befagyasztott (nem optimalizálódó) elektronpályák bevezetése a QM régió elvesztett kötéseinek mentén. Ily módon sem új atomok, sem új elektrosztatikus terek bevezetésére nincs szükség, viszont a számításokhoz speciális QM eljárásokat kell alkalmazni.

Amennyiben a rendszer partícionálása megtörtént, egy QM/MM számítás alapvetően kétféle stratégiát követhet: lehet különbség-képző vagy additív. Tekintsünk egy két alrendszerből álló

számítást valamely választott QM és MM stratégia mellett. Ebben az esetben a különbségképző eljárás során három energiatagot kell kiszámítani: a teljes rendszer energiáját az MM módszerrel, és a belső régió energiáját mind a QM, mind az MM módszerrel. A rendszer teljes energiáját ilyenkor az első két tag összegéből a harmadikat kivonva kapjuk meg. A legismertebb, különbségképző stratégiát követő programcsomag az ONIOM[9,10], míg a többi gyakran használt QM/MM szoftver az additív megközelítést alkalmazza. Ekkor a külső régió MM módszerrel számított energiáját, egy csatolási energiatagot és a belső rendszer QM módszerrel számított energiáját összegezzük. E második csoportba tartozó programcsomagok eltérő mivolta a csatolási tag különbözőképpen való számításából ered. Míg a csatolási energia kötési és van der Waals tagját egyszerűen a választott MM módszert alkalmazva számítják, a két részrendszer közti elektrosztatikus csatolás mértékét és hatását több módon is lehet kezelni. Leggyakrabban az „elektrosztatikus beágyazás" nevű eljárást alkalmazzák, amely során az MM régió ponttöltéseit a QM rendszer energiájának kiszámításakor figyelembe veszik—a rendszer energiaállapotát leíró Hamilton-operátorába foglalva azt, tehát az MM régió polarizálja a QM atomcsoportot. Az így előállított QM/MM energiafüggvény felhasználható makromolekuláris rendszerek potenciálisenergia-felszínének felderítésére, akár energia-minimalizáció, akár Monte Carlo vagy molekuláris dinamikai szimulációk alkalmazásával. A QM régión belül a kémiai reakciók mechanizmusa követhető. Ezek a számítások általában a „makroiteráció-mikroiteráció" sémát követik. A makroiterációs lépés a QM régió (és esetleg néhány fontos MM atom) stacionárius elrendeződésének számítását jelenti a merev MM atomok terében, míg a mikroiterációs lépések során a környezet „relaxálódik" (adiabatikus módon) a központi régióban történt változásokhoz."

2.3 Röntgendiffrakciós szerkezetvizsgálat

A kémiai krisztallográfia hosszú távú rendezettséget mutató por vagy egykristályos minták és röntgen foton-, elektron- vagy neutron-nyaláb kölcsönhatásából származó szóródási (diffrakciós) mintázatot vizsgálja, hogy a mintát felépítő anyag térszerkezetét meghatározza. A háromdimenziós diffrakciós mintázat detektálása során azonban általában csak a szórt nyaláb intenzitását tudjuk mérni, a fázisinformáció elvész. Ez a krisztallográfia „fázisproblémá"-ja: a fázis-információ hiányában a szerkezetmeghatározás iterációs lépésekből áll, amely során olyan egy olyan modellt építünk a kristály szórócentrumaiban (rácspontjaiban) elhelyezkedő anyag szerkezetére vonatkozólag, amely a kísérletileg meghatározott diffrakciós mintázathoz leginkább hasonló szóródást eredményezne.

Atomi felbontású szerkezetmeghatározásához olyan sugárzást kell alkalmazni, amelynek hullámhossza megegyezik az atomok közötti távolság nagyságrendjével vagy annál kisebb. A röntgensugarak hullámhossza megfelel ennek a kritériumnak, azonban a vizsgált rendszerek elektronfelhőjével való kölcsönhatásának hatáskeresztmetszete kicsi. Ezért egyszerre nagy számú molekulát kell vizsgálni: ezt úgy lehet elérni, hogy egykristályt használunk, amely szabályos rácsban a vizsgált rendszer nagyszámú másolatát tartalmazza és a rendezettség miatt egyes irányokban egymást erősíteni képes szórt sugarak (reflexiók) helyzetét és intenzitását detektáljuk. Az egykristály diffrakcióval történő szerkezetmeghatározás végeredménye a vizsgált rendszer háromdimenziós modellje mellett az azt befogadó kristály szerkezete is. Ezért a relatív atompozíciók és azok változékonysága, kötési távolságok, szögek és egyéb geometriai paraméterek mellett információt adhat a hosszú távú kölcsönhatásokról, korrelációkról és kiralitásról. Más analitikai módszerektől eltérően azonban a teljes diffrakciós mintázatra szükség van a szerkezetmegoldáshoz (nem lehetséges a szórási kép egy kis része alapján a rendszer egy részletéről modellt építeni) és a technika jó minőségű egykristályokat igényel.

Röntgendiffrakciós mérés esetén, a kölcsönhatás természete miatt, a kísérleti eredmény egy elektronsűrűségi térkép lesz. A mért szórási kép és az elemi cella elektronsűrűsége egymás Fourier transzformáltjai. Az intenzitások négyzetgyökével arányos szerkezeti tényező ($\mathbf{F}_{hkl}$), amely tartalmazza az amplitúdót (F_{hkl}) és a fázist (α_{hkl}) is, az elemi cella tartalmának ismeretében számítható:

$$\mathbf{F}_{hkl} = F_{hkl}\exp(i\alpha_{hkl}) = \sum_j f_j \exp\left[2\pi i\left(hx_j + ky_j + lz_j\right)\right]$$

(ahol f_j az atomi szórástényező (az egyes atomok szórási kapacitása), a *hkl* indexhármas pedig a reflexiók a szórási kép rácsozatában elfoglalt pozícióját adja meg). A fázisok ismeretében pedig az elektronsűrűség számítható a következőképp:

$$\rho(xyz) = \frac{1}{V_{cella}}\sum_{hkl}|\mathbf{F}_{hkl}|\ \exp(i\alpha_{hkl})\exp[-2\pi i(hx + kj + lz)].$$

Azaz a modellt tökéletesítve egyre javíthatók a számított fázis-értékek, és a mért intenzitásokból és a számított fázisokból egyre jobb minőségű térképek állíthatók elő, amelyek az atompozíciók (és a hibájuk vagy varianciájuk) finomhangolását teszik lehetővé. Ez az iteratív folyamat egy idő után konvergál és az így kapott modellt nevezzük a meghatározott szerkezetnek. A modell és a kísérleti adatkészlet illeszkedését jósági tényezőkkel, az R faktorokkal jellemezzük.

$$R = \frac{\left||F_{mért}| - |F_{számított}|\right|}{\sum|F_{mért}|}$$

A szerkezetfinomítás során az R faktor csökkenése jelzi, hogy a modellt a helyes irányban módosítottuk. Azért, hogy a túlillesztés elkerülhető legyen, „szabad" R-faktort is szoktak számítani (R_{free}). Ez egy kis, véletlenszerűen kiválasztott adathalmaz alapján történik, amelyet erre a célra különítenek el, és nem vesznek figyelembe a finomítás során. Az R_{free} általában nagyobb, mint finomításhoz tartozó R-faktor, de a két statisztika hasonló kell, hogy legyen, mivel a helyes modell alapján *minden* reflexió egyenletes pontossággal kellene, hogy jósolható legyen.

A kismolekulás és makromolekuláris rendszerek vizsgálata módszertanukat tekintve alapvetően különböző. A kismolekulás kristályok rendezettebbek és nagyobbra növeszthetők, ezért ezeknek a rendszereknek esetében a mérési adatok száma sokszorosan meghaladja meghatározni kívánt paraméterekét. Ekkor a fázisprobléma megoldása szinte egzakttá tehető. A leggyakrabban használt ún. direkt módszerek alapjául szolgáló fázisviszonyok az elemi cella elektronsűrűségére kimondható olyan megkötéseken alapulnak, mint például, hogy az mindenhol pozitív legyen, vagy hogy különálló atomcsúcsokba csoportosuljon. Néhány erős reflexió fázisának (akár véletlenszerű) becslése után a többi reflexióhoz a fázisviszonyok alapján rendelhetők csatolt értékek. Az intenzitás és fázisok ismeretében kiszámítható az elektronsűrűség, amely alapján az atompozíciók nagy pontossággal meghatározhatók.

Makromolekuláris krisztallográfia esetén a kristályosítás önmaga is óriási kihívás. A fehérjék viszonylag tömény (~ 10 mg/mL koncentrációjú) és nagy tisztaságú oldatát, kis térfogatú cseppek zárt térben történő lassú bepárlásával kíséreljük meg kristályosodásra bírni. A kisméretű és nem tökéletesen egykristály-szerű mintákról sokszor nem lehetséges olyan sok relflexiót detektálni, ami a vizsgált rendszer nagyszámú atomjának pozícióját (és azok kristályrácsbéli apró eltéréseit) leíró paraméterek egyértelmű meghatározását lehetővé tenné. A kismolekulás szerkezetmegoldás kiindulási feltételezést nem igénylő, direkt módszerei itt nem alkalmazhatóak, helyettük vagy kísérletileg meghatározott közelítő fázisokkal vagy egy becsült kiindulási modell alkalmazásával lehet a szerkezetfinomítási folyamatot megkezdeni.

Például, az ismeretlen fázisokról lehet információt szerezni úgy, hogy ismert változást hajtunk végre az elemi cella tartalmában, és megmérjük annak hatását a diffrakciós mintázatra. A gyakorlatban ez azt jelenti, hogy a fehérje kristályszerkezetébe nehézfémionokat vagy nagy-elektronszámú gáz atomokat (pl. Xe) diffundáltatunk, a szerkezet jelentős megzavarása nélkül – ezt a módszert ezért az izomorf helyettesítés módszerének hívják. Mivel a nehéz atomok erősebben szórnak, mint a szerkezet többi atomja (az atomi szórástényező az elektronszámmal nő), a nehéz atomok helyzetét általában direkt módszerekkel meg lehet meghatározni. Miután a nehéz atomok helye ismert, kiszámítható az azokhoz tartozó szóródás amplitúdója és fázisa. Ezután a nehézatom jelenlétében és távollétében mért intenzitások összevetése alapján a natív kristályról gyűjtött adatkészlet fázisai is becsülhetők, ám ehhez általtában több nehézatom származék vizsgálata is szükséges.

A legyakrabban használt eljárás makromolekulák szerkezetmeghatározására a molekuláris helyettesítés módszere, ami akkor alkalmazható, ha a vizsgált molekula hasonló egy ismert szerkezetű másikhoz, vagy rendelkezésre áll egy jó minőségű kiindulási modell. Ekkor először el kell helyezni a modellt az elemi cellában, rotációs és transzlációs keresést végrehajtva, azaz meg kell határozni, hogy milyen orientáció és helyzet mellett eredményez az a kísérletileg meghatározotthoz leginkább hasonló szórás-képet. Ha a helyes orientáció és transzláció azonosítható, akkor egy kezdeti elektronsűrűségi térkép előállítható a modellszerkezet fázisainak és a vizsgált rendszer (súlyozott) intenzitásainak felhasználásával és a szerkezetfinomítás folyamata elindítható[11].

A kísérletileg meghatározott adatkészlet minőségét a felbontás értékkel szoktuk jellemezni. Az adatkészlet felbontását az határozza meg, hogy a szórási képeken a centrumtól számítva milyen messze tudunk még reflexiókat detektálni – ez függ a méréshez használt sugár intenzitásától és a kristály rendezettségétől is. A szórási kép detektálási határához valós térben tartozó távolságot hívjuk felbontásnak, ez az érték jelzi, hogy milyen részletgazdagságot várhatunk el a számított térkép esetében. Minél kisebb ez a szám, annál kisebb távolságra elhelyezkedő entitások különböztethetők meg egymástól. A makromolekulák szórási képének kísérleti meghatározása történhet laboratóriumi berendezések használatával, de a megfelelő felbontás eléréséhez szükség lehet nagyobb fényintenzitású és fókuszáltabb nyalábok használatára – ekkor szinkrotron források vehetők igénybe. Mindkét esetben szükséges a minta megóvása a sugárzás okozta károsodástól, amelynek leggyakrabban használt módja az alacsony hőmérsékleten való mérés. A kristályokat folyékony nitrogénben tároljuk és 100 K körüli hőmérsékleten, nitrogénáramban mérjük.

A makromolekulák irreguláris alakja miatt kristályszerkezetükben nagy csatornák és üregek is találhatók, amely általában a kristályosításhoz használt oldószer molekuláit tartalmazzák. A fehérje-kristályok víztartalma például 27% és 65% térfogatszázalék között mozog, átlagosan 45-50%. Ez a víz elengedhetetlen a fehérje szerkezetének stabilizálásához, egy része rendezett klasztereket és hálózatokat képez a fehérje felületén és az üregekben. Ezek az oldószermolekulák, ha a kötődés specifikus, a meghatározott szerkezetekben is feltűnnek.

A meghatározott makromolekuláris szerkezeteket és elektronsűrűségi térképeket a Fehérje Adatbázis (Protein Database, PDB) tárolja és rendezi (a név történeti eredetű, az adatbázis nem-fehérje makromolekulákat is tartalmaz).

2.4 Kriogén elektronmikroszkópia[12-14]

Kriogén körülmények közt előállított minták elektronmikroszkópos vizsgálata (krio-EM) során molekuláris vagy szöveti komponensek felnagyított, háromdimenziós képének előállítása a cél. A vizsgálat során fókuszált, nagy energiájú elektronnyaláb és a minta töltésűrűsége lép kölcsönhatásba, és a képalkotás rugalmasan szóródó elektronok segítségével történik. Az élettudományok területén a krio-EM alkalmazások széles spektruma elérhető, szöveti metszetekről és merítéssel fagyasztott sejtekről készült képektől, az egyes baktériumok, vírusok és fehérjemolekulák szerkezetének meghatározásáig. A krio-elektron-tomográfia, az egyrészecske (SPA) krio-EM és az elektronkrisztallográfia mind a módszercsalád aldiszciplínái, amelyeket sikeresen alkalmaznak önállóan vagy hibrid megközelítésekben, akár röntgenkrisztallográfiai vagy NMR spektroszkópiás módszerek eredményeivel kiegészítve.

Az elmúlt fél évszázadban a szerkezeti biológiában leginkább elterjedt szerkezetmeghatározási módszer a röntgenkrisztallográfia volt. Azonban ez a módszer néhány alapvető kihívással is küzd. Például, vannak olyan fehérjék/bio-makromolekuláris rendszerek, amelyek nagyon nehezen vagy egyáltalán nem kristályosíthatók. Ilyenek a membránfehérjék, a glikozilált fehérjék, nagyon mozgékony vagy több állapotot is mintavételező rendszerek. Továbbá a kristályban, bár a részlegesen szolvatált állapotot a rácsban jelenlévő oldószermolekulák fenntartják, mégsem oldatbéli a molekulák konformációja, és a molekulák közti kristály-kontaktusok is megváltoztathatják azok szerkezetét. A reflexiókat létrehozó pozitív interferencia a rácsban található összes molekulából származó információt összesíti, ami megnehezíti a szerkezeti sokféleség meghatározását, valamint a mozgékonyabb régiók egyszerűen nem jelennek meg a meghatározott térképen.

A krio-EM egyértelmű előnnyel rendelkezik ezeken a területeken. A kísérletekhez szükséges mintaelőkészítési eljárás lényegesen egyszerűbb - bizonyos mértékű szennyeződést jelenlétét is tolerálja - nem igényel kristályosítást. A krio-EM mintákat hirtelen üvegszerű jégbe fagyasztják, ami a molekulákat szinte az oldat-, vagy szövet-béli állapotukban tartja. Több különböző állapotot mintavételező rendszerek egyes formái – optimális esetben – külön vizsgálhatók. A krio-EM módszer egyik legsúlyosabb hátránya viszont, hogy kisméretű rendszerek (< 38 kDa), a jel-zaj arány drasztikus leromlása miatt, nem vizsgálhatók.

A krio-EM adatok jel-zaj aránya (SNR) két ok miatt nagyon alacsony. Egyrészt a mikroszkópos felvétel kontrasztja alacsony – az oldószer és a tanulmányozott molekulák töltéssűrűsége nem tér el jelentősen egymástól. Másrészt a sugárzás okozta igen gyorsan bekövetkező és drasztikus károsodás minimalizálása érdekében, a biológiai makromolekulákat alacsony dózisterhelés mellett vizsgálják. A krio-EM legnagyobb kihívása, hogy ebben az alacsony SNR-környezetben kell megbecsülni a 3D-szerkezetet, úgy, hogy fagyasztott mintában a molekulák elhelyezkedése és orientációja véletlenszerű, és a detektált képeken megjelenő 2D vetületek relatív orientációja sem ismert. A 3D rekonstrukcióhoz azt az összefüggést használják fel, hogy a 2D-vetület Fourier-transzformációja az alapul szolgáló szerkezet 3D Fourier-transzformációjának (az origón áthaladó) központi szelete, a vetület iránya pedig merőleges a szeletre. Ezért, ha ismerjük több 2D-s vetület irányát, akkor a megfelelő 2D-s Fourier-szeleteket elhelyezhetjük a 3D-s transzformációban, és az inverz Fourier-transzformáció kiszámításával megkaphatjuk az eredeti 3D-s szerkezetet. Ennek leggyakoribb kivitelezési módja a „vetületillesztés” algoritmusok alkalmazása, amikor a 2D vetületek Fourier transzformáltjait egy alacsony felbontású referencia 3D-modell vetületeivel vetik össze. A referencia modellek általában hasonló szerkezetekből származnak, vagy ab initio módszerekkel generálhatók.

A 3D-rekonstrukció egy iteratív folyamat, amelyben minden új rekonstrukció referenciamodellként szolgálhat a következő ciklushoz. Minden új ciklus az orientációk

hozzárendelésének pontosságát igyekszik javítani, és a pontosabb orientációk nagyobb felbontású térképeket eredményeznek. Több ciklus után a rekonstrukciós feladat eléri azt a pontot, ahol az egymást követő iterációk már nem eredményeznek jelentős változásokat az orientációk hozzárendelésében és a rekonstrukció felbontásában. A feladat „konvergáltnak" minősül, és a végső térkép létrehozásával befejeződik.

A leggyakrabban használt rekonstrukciós algoritmusok az úgynevezett „arany standard" megközelítést alkalmazzák, amelyben az adatkészleteket két részre osztják, és mindkét felét függetlenül dolgozzák fel. Az egyes fél-adatkészletekből számított rekonstrukciók, az ún. „fél térképek" keresztkorrelációját térbeli frekvencia (vagy Fourier héjak) függvényében minden iteráció után kiszámítják: ezt nevezik Fourier héj korrelációnak („Fourier Shell Correlations" vagy FSC). Azt a frekvenciaértéket, amelynél az FSC átlépi a 0,143-as küszöbértéket, valós térdimenzióra átváltva kapunk egy, a krisztallográfiai adatkészletek információtartalmával összemérhető felbontás értéket. A fél térképek, az FSC=0,143 küszöbértékű felbontásra szűrve, a 3D-rekonstrukció következő iterációjának új modelljeként használhatók. Az eljárás konvergenciája után a fél térképeket egyesítik és így kapják kimenetként a végső térképet. Fontos hangsúlyozni, hogy egy rekonstrukcióhoz egyetlen névleges felbontás hozzárendelése gyakran nem elegendő és néha pontatlan módszer a térkép minőségének értékeléséhez, mivel a rekonstrukció jól felbontott és rosszul rendezett komponensek keverékéből állhat. Ezért általában a szerkezetekhez környezetfüggő, lokális felbontás-eloszlást szoktak rendelni. Így azonban nehéz első pillantásra megbecsülni, hogy mennyire megbízható az adatkészletekhez tartozó szerkezetek részletgazdagsága. Ennek a problémának a kezelésére vezették be 2020-ban a Q-metrikát[15], amely ma már a EMDB-ben (elektronmikroszkópos adatbázis: https://www.ebi.ac.uk/emdb/) elhelyezett szerkezetre automatikusan számításra kerül. A Q-pontszám az atomok feloldhatóságát számítja úgy, hogy összeveti az egyes atomok körüli térképértékek hasonlóságát egy jól feloldott atomra vonatkozó Gauss-szerű függvénnyel. Az 1-es Q-pontszám azt jelzi, hogy a hasonlóság tökéletes, míg a 0-hoz közelebb eső értékek alacsony hasonlóságot jeleznek. Ha az atom nem megfelelő helyen található a térképen, akkor az negatív Q-pontszámot fog eredményezni.

A makromolekuláris rendszerek SPA krio-EM méréseihez leggyakrabban használt mintahordozók kis (általában 3 mm átmérőjű), korong alakú Cu vagy Au rácsok (grid). A rácsozat ~ 60μm-es nyílásokat hoz létre. A rácsot általában lefedik egy lyukacsos, 10-12 nm vastagságú szén fóliával („holey carbon") – ennek a fóliának néhány μm-es mélyedései, vagy lyukai, lesznek a mintatartók. A minta részecskéi szénfelület közelében gyülekeznek és ez elszigeteli őket a levegő-víz határfelülettől, ahol könnyen destabilizálódnának. A krio-EM mérés legtöbbször úgy kezdődik, hogy a vizsgálandó oldatot a korongra pipettázzák, az oldat-felesleget leitatják (blottolják), majd a korongot hirtelen folyékony etánba merítik: ezt a módszert hívjuk vitrifikációnak. A fagyasztás több szempontból is előnyös. Egyrészt, a mintát a mintatartóra rögzíti, így az a mikroszkóp belsejében uralkodó vákuumba érve nem fog rögtön elpárologni. A fagyott állapot azonban segít lassítani a sugárzás okozta károk tovaterjedését is. A fagyasztás nagy hirtelenséggel való kivitelezését a jégképződést megakadályozása teszi szükségessé, mert az szétroncsolná a minta molekuláit. Ezzel az eljárással az oldószer üveg-szerű (vagy vitrifikált) állapotba kerül, a vizek intermolekuláris szerkezete megőrzi az oldatbélihez hasonló mintázatát. Az üvegesített jégnek a lehető legvékonyabbnak kell lennie, úgy, hogy közben magába foglalja a szolvatált részecskéket is, ez általában ~ 100 nm-es mintavastagságot jelent. Fagyasztó-robotok segítségével a vitrifikáció paraméterei – a hőmérséklet, a páratartalom, a blot erő és a blot idő – szabályozhatóvá és reprodukálhatóvá tehetők. A mintát ezután a mikroszkópban, ~ −170 °C -on vizsgálják.

2010-es évektől kezdődően a krio-EM, módszertan és műszerpark robbanásszerű fejlődésen ment keresztül, ami igen nagyszámú új, nagy felbontású szerkezetet eredményezett. Számos tényező hozzájárult a „felbontás forradalmának" nevezett fejlődési folyamathoz. Jelentős tényező volt a közvetlen elektron detektorok (DED) megjelenése, melyek – a CCD kamerákkal ellentétben – nem alakítják át az elektronokat fotonokká. A DED drámai módon javította a képminőséget és az SNR-t. Ezek a detektorok nagy kimeneti képsebességgel rendelkeznek, ezáltal a mikrográfokat több képkockából álló „filmek" formájában lehet rögzíteni, amely módot ad több hibafolyamat korrekciójára. Ezenkívül a legújabb hardverfejlesztések lehetővé tették hatalmas mennyiségű adat rögzítését, gyors továbbítását és tárolását, ami a CPU-k és GPU-k erőforrásaihoz való könnyű hozzáféréssel együtt elősegítette a terület fejlődését.

Az adatgyűjtési munkamenet általában egy „atlasz" rögzítésével kezdődik, amely feltérképezi a mintatartó korong rácsozatán belül feltárható területeket. Az atlasz több, egymást átfedő, alacsony nagyítású kép rögzítésével készül, amelyeket összeillesztenek, hogy átfogó képet kapjanak a rácsról. A rácsatlaszok lehetővé teszik a rács legígéretesebb területeinek azonosítását és az adatgyűjtő szoftverek is használják őket a rács egyes négyzeteihez való navigáláshoz. Ideális esetben minden rácstérfogat több tucat vagy akár több száz, adatgyűjtésre alkalmas lyukat tartalmaz. Egy átlagos adatgyűjtési munkamenet során általában több ezer lyukat vizsgálnak végig. Az adatgyűjtési munkafolyamat egy úgynevezett „alacsony dózisú" megközelítést alkalmaz, amely három mód között váltakozik: keresés, fókuszálás és rögzítés. A „keresés" mód a képalkotási terület középpontjának azonosítására szolgál. A terület középpontba állítása után egy fókuszálási lépés következik, amelynek során beállítják a kép célzott defókuszálását (az optimális kontraszt elérése végett). A fókuszálást a lyuktól távolabb végzik el, hogy megvédjék a részecskéket a sugárzás káros hatásától. A defókuszálás beállítása után több másodperces expozíciót rögzítenek a cél-lyuk felett, rövid film formájában. Minden film több képkockát tartalmaz, amelyeket feldolgoznak és egyetlen képpé egyesítenek. A keresés-fókuszálás-rögzítés folyamatot ezután megismétlik a következő lyuknál, amíg az összes cél-lyukat képét rögzítik.

A krio-EM adatok feldolgozásának első lépése a részecskék elmozdulásának korrekciója. Az elmozdulás valószínűleg a hirtelen fagyasztás során a mintába zárt feszültségek enyhítésére történik. Amint az elektronnyaláb eléri a fagyasztott mintakorongot az egy kis mértékben felmelegszik és „felpúposodik" – így a molekulák az expozíciós idő alatt elvándorolnak. A DED detektorok által rögzített képkockákat azonban az elmozdulás mentén egymáshoz lehet igazítani és az igazított képkockákat egyetlen, éles képben egyesíteni. A másik fontos korrekció a surgár-károsodás hatásának mérséklésére irányul. A krio-EM képalkotás során használt elektronnyaláb az expozíció során károsítja a biológiai anyagot. A mikrográfok legkorábbi képkockái tartalmazzák a torzítatlan rendszerre vonatkozó információkat, de az ezekben a képkockákban a kontraszt még alacsony. Az elektronok felhalmozódása magasabb kontrasztú képeket eredményez a későbbi képkockákban, de a nagy felbontású információk (finom részletek) gyorsan romlanak a sugárzási károsodás miatt. A modern algoritmusok dózis súlyozást vagy expozíció szűrést alkalmaznak, amely a filmképkockák nagy felbontású tartalmát a felhalmozódott dózisok függvényében alacsonyabb súlyozással kezeli. Ennek következtében a korai képkockák megőrzik nagy felbontású tartalmukat, míg a későbbi képkockákból begyűjtött információk az alacsony felbontású tartalomra korlátozódnak. A tipikus elektron dózisok 20-60 elektron/Å^2 tartományban mozognak, de hatékony expozíciós szűrés még ennél magasabb dózisok esetén is elvégezhető.

A krio-EM képeken a fáziskontrasztot a képfelvétel során enyhe defókuszálással lehet elérni. Az optimális defókuszálási tartomány a nagy felbontású információk megőrzése mellett a részecskék azonosításához szükséges kontrasztot is garantálja. Ha a mikroszkópos felvétel túl

közel van a fókuszhoz, akkor a részecskék láthatatlanok lehetnek. Ha a mikroszkópos felvétel túl messze van a fókusztól, akkor a nagy felbontású információk csökkennek. A kisebb részecskéknél nagyobb defókuszálási beállításokra lehet szükség a megfelelő kontraszt elérése érdekében. A fehérjék krioEM adatkészleteit általában minimális, -0,5 és -1,0 μm közötti, defókuszálással gyűjtik, de ha a részecskék nehezen láthatók, akkor magasabb defókuszálási beállítások is indokoltak lehetnek.

Az elektronmikroszkóppal rögzített összes kép a valódi objektum torzított vetülete. A torzítások a térbeli frekvencia függvényében az információtartalom egyenetlen átvitelét okozzák, amelyet kontrasztátviteli függvény (CTF) ír le. A standard TEM-képalkotásban a CTF alacsony térbeli frekvenciáknál közel nulláról indul, és pozitív és negatív maximális értékek között oszcillál (amelyek pozitív, illetve negatív kontrasztátvitelnek felelnek meg), a nullaátmenetek pedig a nulla információt tartalmazó frekvenciákat jelzik. A CTF-et tovább módosítják a burkológörbe-függvények az elektronnyaláb térbeli és időbeli inkoherenciájának eredményeként, ami magas térbeli frekvenciáknál csillapítja a CTF-et. A CTF számos tényező függvénye, beleértve az elektron hullámhosszát (amelyet a mikroszkóp gyorsító feszültsége határoz meg), a mikroszkóp gömb-aberrációját (C_s) és a kép defókuszálását. Egy kriogenikus EM adatkészleten belül az elektron hullámhossza és a C_s tényezők állandóak, de a defókuszálás változó. Ezért a CTF becslés legfontosabb feladata az egyes képek valódi defókuszának meghatározása. Ha egy kép CTF-je ismert, akkor a kép hiteles változata helyreállítható.

3. Eredmények

Az eredmények bemutatásakor minden fejezetcím mellett feltűntettem azokat a saját publikációkat (S1, S2…), amelyeknek eredményeit az adott fejezet taglalja. A szövegben ezeket nem idéztem újra, mert sokszor egymásba fonódott az egyes témák bemutatása. Csak azok a saját munkák vannak referálva a szövegből, amelyekre nem épült tézispont, de mégis relevánsak voltak a diszkusszióhoz. Ezeket a referenciákat egyszerű számmal jelöltem és ezek az általános referenciajegyzékben kaptak helyet. Így kezeltem a podocin témához kapcsolódó elkészült, de jelenleg még publikálás alatt álló kéziratot is.

3.1 Hem fehérjék vizsgálata

PhD munkám során hem prosztetikus csoportot tartalmazó fehérjék (hem fehérjék) szerkezet-funkció összefüggéseit vizsgáltam elméleti módszerekkel, így ezek a rendszerek azóta is különösen érdekesek számomra, a PhD időszakot követő évek során is többször visszatértem vizsgálatukhoz. Dolgozatomat ezeknek a munkáknak rövid bemutatásával kezdem, amikor nagyon egyszerű számításokat végezve igyekeztünk kiszűrni ezeknek a csodálatosan összetett rendszereknek működésével kapcsolatban felvetett elképzelések közül azokat, amelyek teljességgel lehetetlenek és így alkossunk olyan modelleket, amelyek akár megfelelhetnek a valóságnak is. A pusztán kvantumkémiai megközelítés mellett, hogy a reaktív centrumokat körülölelő fehérje mátrix hatását is egyre inkább figyelembe tudjuk venni, ezekben a munkákban már fokozatosan megjelentek a molekulamodellezési módszerek is.

3.1.1 A nitrogén-monoxid-szintáz elektrontranszfer folyamatai [S1,S2]

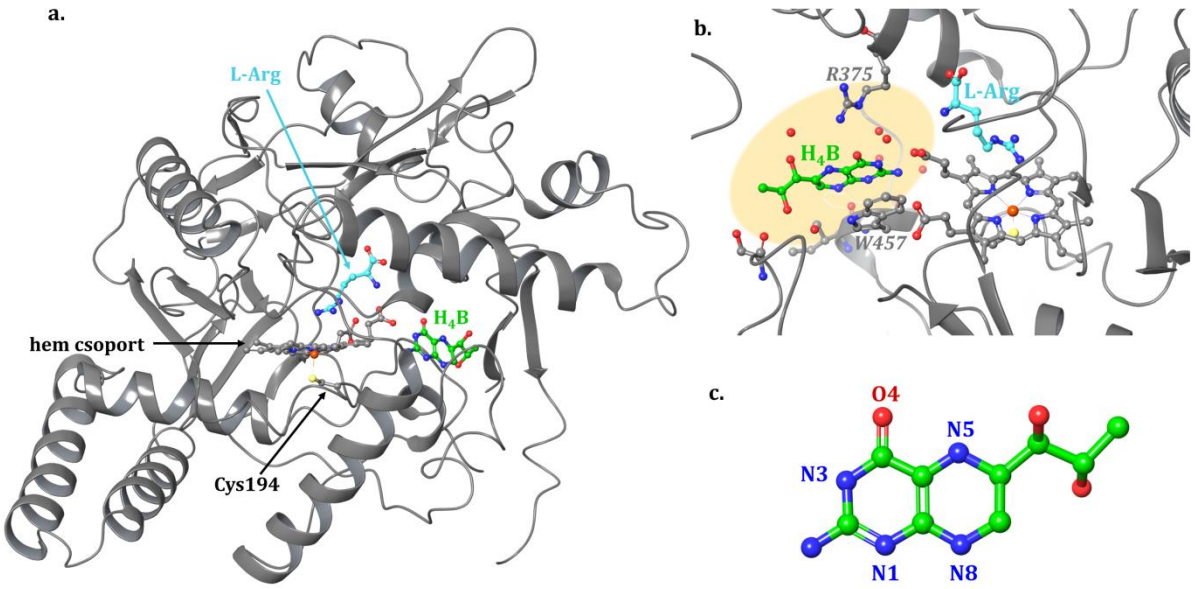
A nitrogén-monoxid kulcsfontosságú hírvivő és védelmi citotoxin az ideg-, izom-, szív- és érrendszerben, valamint az immunrendszerben[16]. A nitrogén-monoxidot L-argininből nitrogén-monoxid-szintázok (NOS-ok) állítják elő. A NOS-ok C-terminális reduktív doménje koordinálja az FMN, FAD és NADPH kofaktorokat, az N-terminális oxidatív domén pedig a proximális Cys oldallánc által horgonyzott hem csoportot és az esszenciális tetrahidrobiopterin (H_4B) kofaktort. A NOS-ok kétlépcsős mechanizmussal katalizálják a nitrogén-monoxid szintézisét. Az első lépésben az L-Arg szubsztrát Nω-hidroxi-L-argininná (NHA) alakul, amiből, egy második oxidációs lépés során képződnek az NO és L-citrullin termékek:

$$\text{L-Arg} + 2\ O_2 + 1{,}5\ \text{NADPH} + 2H^+ \rightarrow \text{L-citrullin} + \text{NO} + 2\ H_2O + 1{,}5\ \text{NADHP}^+$$

A reakció részleteiről, számításaim idején, a következőkben ismertetett információk álltak rendelkezésre. Az L-Arg átalakulásának első lépése során a nyugalmi állapotú (Fe^{3+}) enzim a redukáló doménből származó elektronáramlás hatására redukálódik, majd megköti az O_2 –t és létrejön a vas-oxi köztitermék. A vas-oxi köztitermékből ezután redukált és protonált Fe^{3+}–O_2H species képződik[17] – a proton vagy az L-Arg szubsztráttól származik[18], vagy a szubsztrát és egy vízmolekula által alkotott [guanidínium–víz] hálózatból[19]; az elektron elsődleges forrása a H_4B, a hem közvetlen közelében kötődő esszenciális kofaktor, amely az NO-képződés első lépése során radikalizálódik[18]. A vas-oxi köztitermék bomlási sebessége megegyezik a kofaktor radikalizációjának (gyök-képződési) sebességével[20]. EPR mérések alapján a megjelenő gyököt trihidrobiopterin gyöknek[21], $^{\cdot}H_3B$-nek nevezték el, azonban még nem volt tisztázott, hogy a keletkező gyök kation vagy semleges species lesz-e. Az általam végzett számítások célja az volt, hogy megkíséreljem leírni az ismeretlen szerkezetű vas-oxi köztiterméket, és modellezni a H_4B kofaktor és a vas-oxigén csoport közötti elektronátviteli folyamatot.

A hem környéki aktív hely és a tetrahidrobiopterin kofaktor közti elektron- és protontranszfer folyamatokat sűrűségfunkcionál módszerrel elemeztem (a korábbi munkában B3LYP, a későbbi

esetében pedig UB3LYP és UBP86 funkcionálokat és LAVCP**, LACV3P** és 6-31G** bázist alkalmazva). Mivel a számítások idején még a mindkét centrumot tartalmazó modellek optimalizálása – méretük miatt – kihívást jelentett, két részre bontottam a problémát: a hem és a



1. ábra. A nyugalmi állapotú iNOS szerkezete (PDB: 1nod[22]). a.) Az oxidatív domén a hem csoporttal, látható továbbá az L-Arg szubsztrát és a H_4B kofaktor. **b.)** A kofaktor-kötő régió közelképe, ahol a sárga ellipszoid jelzi a kofaktorral kölcsönható aminosavak és vizek helyzetét – ezeket foglaltam bele a számítási modellbe is. **c.)** A H_4B kofaktor.

kofaktor környezetét külön optimalizáltam majd egyesítettem a két modellt, és az egyes protonálódási mintázatokhoz tartozó végső hullámfüggvényt rögzített atompozíciók mellett számítottam (1. ábra). Külön vizsgáltam a nyugalmi állapotot és az esetleges elektron transzfer folytán létrejött „radikalizált" (vagy gyökös) formákat. A hem centrum jellemzésére kialakított kisebb modell a hem, a proximális C194 oldalláncot modellező SH^- csoport, a Fe-hoz koordinált O_2 molekula, az L-Arg szubsztrát és egy vízmolekula együttese volt, geometria-optimálása során a hem egyik propionát csoportja mindvégig protonált volt (hogy a H_4B kofaktorral kialakított szoros H-híd hatása a kofaktor távollétében is némileg érvényesülhessen) és a protoporfirin atomok nem mozoghattak. (Ez utóbbi kényszerfeltétel hatását egy kiválasztott modell esetében ellenőriztem; az eredmények szerint ez a megkötés nem okoz jelentős változást, viszont garantálja, hogy a fehérjemátrix távollétében is azzal térben kompatibilis rendszereket vizsgáljunk.) Ezt a modellt használtam a vas-oxi komplex szerkezetének számításához. A kofaktor környezetet leíró modell a vizsgált kofaktoron kívül a hem propionát helyén egy acetát csoportot, a kofaktort stabilizáló R375 guanidinium csoportját és a W457 indol gyűrűjét is tartalmazta, valamint 9 vízmolekulát, melyek közül 3 a kofaktorral H-híd kölcsönhatásokat kialakító fehérje atomok helyén szerepelt, további 6 pedig a kristályszerkezetekben található oldószer molekuláknak megfelelő pozíciókban (a hem propionátot, az R375 és W457 aminosavakat, illetve a kölcsönható partnereket modellező vizek oxigén atomjait a számítások során helyhez rögzítettem). Ezt a modellt a H_4B kofaktor nyugalmi állapotának jellemzésekor semleges, illetve az N3 és N5 atomokon (duplán) protonált formában optimalizáltam. Azt találtam, hogy míg az N3-as protonáció nem stabil, a semleges és N5-n protonált formák geometriája egymáshoz és a kristályszerkezetekhez is hasonló és jól illeszkedik a környezeti modellbe. Mivel azonban az N3-n protonált forma relaxációja folytán keletkezett, a protont az acetáton hordozó H_4B-H^+ forma jóval kedvezőbb energiájú volt, mint a protonált kofaktort tartalmazó modell, a legvalószínűbbnek a kofaktor semleges kötődését találtam. A

radikalizálódott (vagy gyökös) állapot jellemzésére a kofaktor modellt a három vizsgált kofaktor – H_4B, 5-metil-H_4B és 4-amino-H_4B – 19 különböző protonációs/tautomer mintázata mellett dublett állapotban optimalizáltam, hogy a gyökképződést leginkább elősegítő konformációkat megtaláljam. Ezt a 19 gyök-modellt a hem centrum modelljével egyesítve, mind a 19 elrendeződéshez számítottam hullámfüggvényt szingulett, triplett és kvintett állapotban, UB3LYP és UBP86 funkcionálokat alkalmazva.

A H_4B kofaktor esetében két elrendeződés eredményezett elektrontranszfert a kofaktor és a hem centrum között. Mindkettő a kofaktor N5 atomjának deprotonálásával állt elő, egyik esetben a proton a hozzá térben legközelebb eső karbonil csoporton található (3-as modell (2a. ábra); ekkor a kofaktor atomok spinsűrűség értékeinek összege 0,31 a legkedvezőbb energiájú hullámfüggvény esetében), a másik esetben pedig a hem propionáton (4-es modell, ahol a kofaktorhoz tartozó spinsűrűség 0,48). Ez utóbbi egyben a legalacsonyabb energiájú H_4B-t tartalmazó modell. A kofaktorról elmozduló elektronsűrűség a hem centrumban, a Fe-O_2 környezetben jelent meg (a kísérleti eredményekkel összhangban).

a.

		B3LYP				BP86			
		Relative energy	Spin density cofactor	heme	Fe..O_2	Relative energy	Spin density cofactor	heme	Fe..O_2
1.	S	10.1	**0.00**	0.06	-0.04	31.1	**-0.21**	0.42	0.61
	T	27.5	**0.00**	0.06	1.99	25.0	**0.18**	0.26	1.43
	Q	131.0	**0.00**	0.07	3.99	123.2	**0.27**	1.52	2.02
2.	S	96.7	**0.00**	0.06	-0.03	104.8	**-0.21**	0.47	0.62
	T	107.6	**0.00**	0.04	2.02	107.5	**0.21**	0.24	1.41
	Q	210.6	**0.00**	0.12	3.68	217.9	**0.36**	1.46	1.98
3.	S	32.7	**-0.20**	0.19	0.03	23.5	**0.11**	0.43	0.26
	T	28.3	**0.31**	0.03	1.63	18.5	**0.17**	0.26	1.44
	Q	110.9	**0.63**	1.34	2.00	125.7	**0.36**	1.50	1.96
4.	S	18.6	**0.75**	0.42	-1.16	2.5	**0.62**	0.52	-1.09
	T	**0.0**	**0.48**	**-0.08**	**1.57**	**0.0**	**0.54**	**0.23**	**1.18**
	Q	88.0	**0.76**	1.22	2.01	78.9	**0.58**	1.32	1.92
5.	S	56.6	**0.00**	0.07	-0.04	63.0	**0.29**	0.32	-0.79
	T	74.0	**0.00**	0.07	1.99	64.1	**0.28**	0.33	1.30
	Q	174.5	**0.00**	0.29	3.78	162.2	**0.36**	1.48	1.99
6.	S	23.2	**0.00**	0.06	-0.18	7.3	**0.35**	0.45	-0.78
	T	73.8	**0.00**	-0.02	2.13	5.3	**0.32**	0.23	1.35
	Q	143.8	**0.00**	0.09	3.97	104.6	**0.43**	1.42	1.97
7.	S	22.0*	0.00	-0.22	0.30				
	T	0.0*	0.00	0.00	1.93				
	Q	135.3*	0.00	1.96	2.01				

b.

		B3LYP				BP86			
		Relative energy	Spin density cofactor	heme	Fe..O_2	Relative energy	Spin density cofactor	heme	Fe..O_2
1.	S	11.1	**0.00**	-0.08	0.05	11.1	**-0.13**	-0.48	0.54
	T	20.6	**0.00**	0.00	2.01	6.9	**0.15**	0.28	1.44
	Q	135.5	**0.01**	0.61	3.01	119.9	**0.33**	1.50	1.99
2.	S	24.3	**0.00**	0.05	-0.08	16.2	**-0.24**	-0.46	0.64
	T	26.5	**0.14**	0.11	1.72	10.0	**0.24**	0.24	1.39
	Q	139.5	**0.14**	0.55	2.95	116.5	**0.43**	1.45	1.94
3.	S	**0.0**	**-0.17**	**0.02**	**0.20**	**0.0**	**-0.27**	**-0.46**	**0.66**
	T	5.0	**0.23**	0.07	1.67	4.3	**0.26**	0.23	1.38
	Q	130.8	**0.57**	1.36	2.14	109.6	**0.48**	1.43	1.90

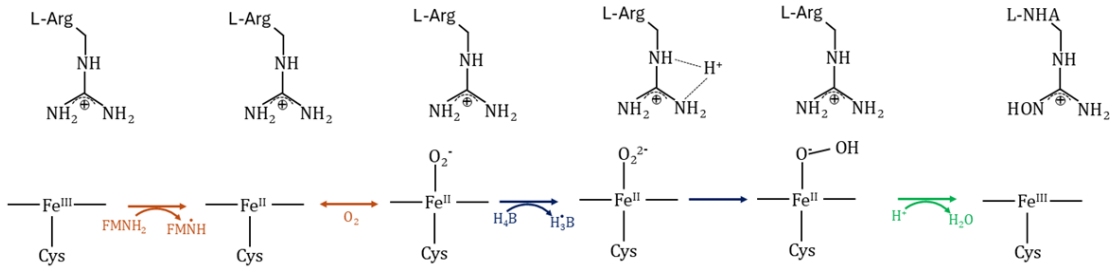
2. ábra. A hem és a H_4B (a.) és 5-metil-H_4B (b.) kofaktorok közti elektrontranszfer folyamat leírásának céljából vizsgált (egyesített) modellrendszerek és a hozzájuk tartozó hullámfüggvényekből származtatott értékek. Az relatív energia értékek kJ/mol-ban vannak megadva.

Az 5-metil-H_4B szintén aktív kofaktora a NOS enzimnek, de itt az N5-os atomhoz nem kapcsolódik mozgatható hidrogén. Itt azonban azt tapasztaltam, szemben a H_4B esetében megfigyeltekkel, hogy az 5-metil-H_4B N3-as atomjának protonját a propionát közeli (2b. ábra, 2. modell) majd távolabbi oxigénjére mozgatva (3. modell) gyökképződés váltható ki, azaz a kísérleti megfigyelésekkel összhangban ez a kofaktor is lehet elektron-donora a katalitikus folyamatnak. Mindkét aktív kofaktor esetében tehát a gyökképződést és elektronvándorlást a kofaktor deprotonálódása váltotta ki, ami arra utal, hogy ezek a kofaktorok nem csak elektron, hanem proton forrásként is funkcionálhatnak, bár a két régiót összekötő teljes protontranszfer útvonal nem szerepelt még az egyesített modellben sem.

Azért, hogy ellenőrizzem, hogy az egyesített modellre vonatkozó rögzített atompozíciók mellett végzett számítások nem okoznak-e nagyon nagy torzulásokat a számított spinsűrűség és töltéssűrűség értékekben, a H_4B kofaktort tartalmazó rendszer legkedvezőbb energiájú

állapotához tartozó elrendeződés (2a. ábra, 4. modell) szerkezetét részlegesen optimalizáltam, úgy, hogy a kofaktor, a körülötte található vizek, a Fe és az O_2, valamint a L-Arg szubsztrát és a hem közeli víz

molekula szabadon elmozdulhatott. Míg a töltés- és spinsűrűség sem a kofaktor esetében, sem pedig a Fe-O_2 környezetben nem változott jelentősen, a hem centrumban történt egy karakterisztikus szerkezeti változás. Az L-Arg szubsztrát egyik hidrogénatomja átvándorolt a vashoz kötött oxigén molekulára, ami arra utal, hogy az elektronátadás és a protontranszfer a hem centrumon is csatolt folyamatok lehetnek (3. ábra). Azt is ellenőriztem, hogy a központi modell kiragadása a fehérje mátrixból vagy esetleg a porfirin atomok rögzítése eredményezheti-e az eredmények eltolódását. Ezért, szintén a H_4B kofaktor négy különböző modelljéhez tartozó rendszer hullámfüggvényét a környezet kiterjedtebb módon való figyelembevételével is kiszámítottam, úgy, hogy a kofaktort 12 Å-n belül megközelítő összes aminosav atomjai helyére az AMBER* erőtérből átemelt parciális töltések kerültek. Az egyesített modellen kívül eső fehérjeatomok elektrosztatikus terének jelenlétében számított töltés- és spinsűrűségek azonban ismét nem mutattak jelentős változást, ami arra utal, hogy sikerült a modellbe foglalni mindazon részleteket, amelyek ezekre a tulajdonságokra közvetlen hatással vannak. Hasonlóan, a porfirin-atomok optimalizálása sem hozott lényegi átrendeződést, viszont a rögzítés a modellek összevethetőségét és a fehérje-környezettel való térbeli kompatibilitás megőrzését segítette.



3. ábra. Az eredmények alapján feltételezett reakciómechanizmus. Az itt bemutatott munkák a reakcióút narancssárga és kék nyilakkal jelzett lépéseire vonatkoznak. A narancssárga nyilak a „nyugalmi állapotú" rendszerhez vezető lépések – a számítások során is be kellett a kristályszerkezetbe (amely az első ábrának megfelelő állapotra vonatkozik) építeni az O_2 molekulát. A vizsgált elektrontranszfer folyamatok pedig a kék nyilakkal jelzett átalakulásokra vonatkoznak.

Az elsőként vizsgált két aktív kofakotrral szemben, a 4-amino-H_4B kofakor esetében azt találtuk, hogy bár a kofaktor radikalizációja kiváltható protontranszferrel is (4. ábra, 5.-9. modellek), ezek az elrendeződések jelentősen kedvezőtlenebbek, mint a protontraszfer nélkül történő elektron-átadás (3.-4. modellek). Ez az eredmény is összhangban van a kísérleti tapasztalatokkal miszerint a 4-amino-H_4B kofaktort tartalmazó NOS enzim esetében a hemhez kötött oxigén redukciója után megreked a katalitikus folyamat[23], azaz, hogy a 4-amino-H_4B kofaktor a NOS inhibitora.

Bár mások is jutottak hasonló konklúziókra[23,24], nehéz lenne tagadni, hogy az általam számított eredmények nincsenek tökéletes összhangban a témában általánosan elfogadott paradigmával. A kritikus kérdés az, hogy az elektrontranszport folyamathoz valóban közvetlenül csatolódik-e protontranszfer is, vagy - kísérleti

		Relative energy	Spin density cofactor	heme	Fe..O_2
1.	S	92.8	0.00	-0.13	0.12
	T	93.7	0.01	0.11	1.89
	Q	201.8	0.00	0.20	3.78
2.	S	31.2	0.00	0.01	0.02
	T	47.2	0.02	0.06	1.97
	Q	147.8	0.00	0.20	3.77
3.	S	19.1	-0.09	-0.01	0.04
	T	0.0	0.14	0.07	1.76
	Q	117.8	0.50	1.47	1.99
4.	S	27.0	-0.23	0.07	0.20
	T	18.9	0.35	0.00	1.61
	Q	114.9	0.63	1.34	2.00
5.	S	90.1	-0.62	-0.58	1.19
	T	61.2	0.31	-0.01	1.68
	Q	176.5	0.74	1.22	1.98
6.	S	85.5	-0.66	-0.53	1.18
	T	56.4	0.36	-0.06	1.68
	Q	146.2	0.67	1.29	2.00
7.	S	138.1	0.63	-0.36	-0.30
	T	110.1	0.70	-0.14	1.41
	Q	190.1	0.84	1.12	2.00
8.	S	89.1	-1.01	-0.28	1.27
	T	53.7	0.54	-0.11	1.55
	Q	128.7	0.75	1.22	2.00
9.	S	98.2	-1.01	-0.27	1.27
	T	65.7	0.58	0.03	1.53
	Q	139.9	0.77	1.20	2.00

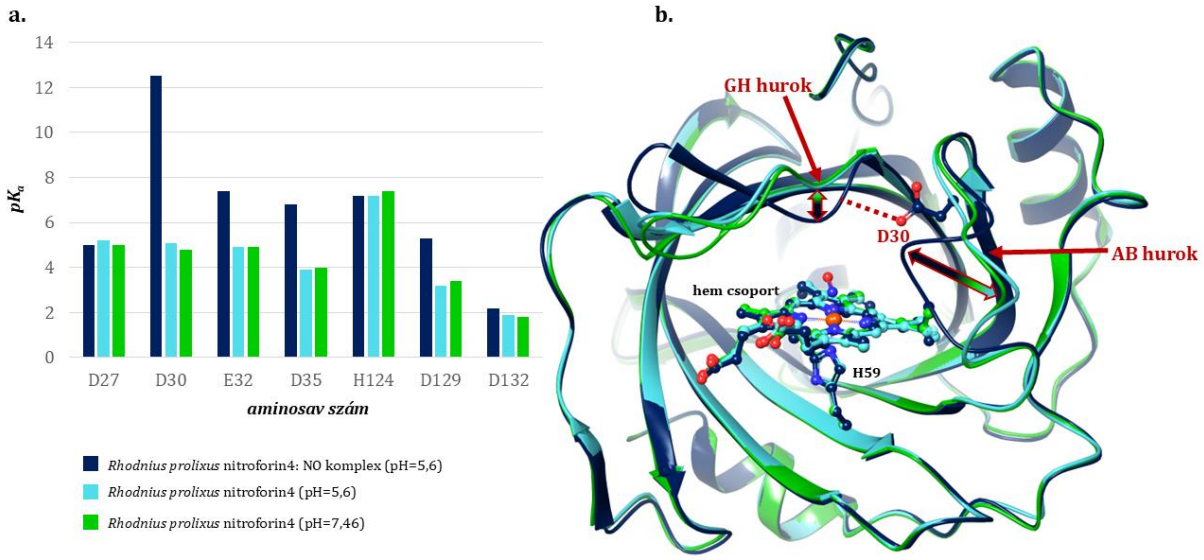
4. ábra. A hem és a 4-amino-H_4B kofaktor közti elektrontanszfer folyamat leírásának céljából vizsgált modellrendszerek. A relatív energia értékek kJ/mol-ban vannak megadva.

szempontból megfogalmazva - hogy a kialakult kofaktor gyök semleges vagy pozitív töltésű. Bár az enzim jelenlétében mért EPR jel hiperfinom csatolódási mintázata jelentősen eltér az oldatfázisú kation-gyök esetében tapasztaltaktól, mégis inkább ezt a formát valószínűsítik a mérési eredmények alapján[25]. Ez azonban nincs egészen ellentétben az én eredményeimmel, hiszen én is megfigyeltem részleges elektrontranszfert a H_4B kofaktor esetében pusztán belső átprotonálódás következményeként is (3. modell). Az én állításom annyiban tér el konszenzustól, hogy érzésem szerint ez az állapot úgy stabilizálódik, hogy a proton is átvándorol a hem környezetébe, ahol az L-Arg szubsztrát fogadja azt, majd közvetíti a hemhez kötött O_2 felé. Azt, hogy a kofaktor protonforrásként is funkcionálhat a NOS katalitikus ciklusa során, senki nem vonja kétségbe[25-27], inkább a két folyamat időbelisége és csatoltságuk mértéke a vitatott. Érdemes megjegyezeni, hogy az általan javasolt mechanizmus a 4-amino-H_4B kofakor inhibitor voltára is magyarázattal szolgál, amire, tudomásom szerint más modell eddig még nem született. Ezzel együtt, az alkalmazott módszerek és modellrendszerek egyszerűsége folytán az is lehetséges, hogy valóban máshogy zajlik ez a folyamat, mint ahogy én felvázoltam. Pont az ilyen tapasztalatok indítottak arra, hogy a tanulmányozott rendszereket teljesebb mértékben leírni képes módszerek elsajátítása felé tegyek lépéseket és a kísérleteket végző kollégákkal szorosabb együttműködést keressek, hogy a hipotéziseket és részeredményeket már a munkafolyamat során, közvetlenül tudjuk ütköztetni és egyeztetni.

3.1.2 A nitrophorin 4 pH-függő nitrogén-monoxid affinitásának vizsgálata [S3]

1837-ben Charles Darwin sajnos nem csak felfedezésekkel gazdagodva, hanem egy Chagas-kór nevű betegséggel küszködve tért vissza történelmi jelentőségű dél-amerikai expedíciójáról. A *Trypanosoma cruzi* parazita által okozott, a szívet és az idegrendszert károsító fertőzést – amely ma is számtalan áldozatot követel – vérszívó rovarok (pl. a *Rhodnius prolixus*) terjesztik. Ezek a rovarok kifinomult mechanizmust fejlesztettek ki az áldozat vérzéscsillapító reakciójának leküzdésére, a vérszívó tevékenységet megkönnyítendő. A rovar nyálában található hem fehérjék, a nitroforinok ennek a rendszernek a kulcsfontosságú elemei. A nitroforinok a vas-hem központhoz kötve nitrogén-monoxidot szállítanak a rovar nyálából az áldozat szövetébe, ahol az felszabadul és értágulatot indukál, valamint gátolja a vérlemezkék aggregációját, míg a megüresedett hem hisztamint megkötve késlelteti az immunválaszt.
Az nitrogén-monoxid szoros kötődését a rovar nyálában, valamint annak könnyű felszabadítását az áldozatban az nitroforinok (*Rhodnius prolixus* esetében a nitrophorin 4) és a nitrogén-monoxid közti affinitás pH-érzékenysége biztosítja (a rovar nyála lényegesen savasabb (pH 5,6), mint az áldozat vére (pH= 7,4)), azonban sem a prosztetikus csoport redox potenciálja[28], sem a komplex spektrális tulajdonságai[29] nem változnak a pH-függvényében. Az asszociációs sebességi állandók szintén nem függnek a pH-tól, azonban a disszociációs sebességi állandó pH-függőnek bizonyult; a nitrogén-monoxid felszabadulása magasabb pH-értékeknél sokkal gyorsabb. A pH megváltozása tehát nem közvetlenül a hem csoport működését, hanem az azt befogadó fehérjemátrix viselkedését módosítja; a pH-érzékenységet egy vagy több ionizálható aminosav pH=6,5 körül bekövetkező deprotonálódásához kötötték.
A nitrophorin 4 katalitikus ciklusa során a fehérje jelentős szerkezeti átalakuláson megy keresztül, egy nyitott és egy zárt forma között (5. ábra). A zárt forma alacsony pH-n (pH 5,6) biztosítja a nitrogén-monoxid csapdázódását - a fehérje apoláros oldalláncai elzárják a ligandum-kötő üreget a külvilágtól - míg magas pH-n (pH 7,4) nitrogén-monoxid távollétében a katalitikus zseb oldószer-hozzáférhetővé válik, két mozgékony hurok (az AB és GH hurkok) átrendeződésével. FTIR-vizsgálatok eredményei[30] és nagy felbontású kristályszerkezetek[31,32] alapján kijelenthető, hogy a nitrophorin 4 zárt és nyitott formái minden kísérleti körülmény

között egyszerre vannak jelen, azonban a nitrogén-monoxid megkötődése és távozása, vagy a pH változása az egyes szerkezeti formák betöltöttségének eltolódását eredményezik. A nitrophorin 4 esetében tehát egy nagyon specifikus kérdést lehetett megfogalmazni az enzim működésével kapcsolatban: vajon melyik, vagy melyek, azok az aminosavak, amelyek pH= 6,5 körül bekövetkező protonálódása vagy deprotonálódása kiváltja a szerkezet átrendeződését.
A ZAP program[33] segítségével kiszámítottuk a nitrophorin 4 minden Asp, Glu, His, Arg és Lys oldallánc titrálási görbéjét és meghatároztuk ezekből a hozzájuk tartozó pK_a értékeket az alacsony pH-n vizsgált NO-komplex és szabad forma, valamint a pH=7,4-n meghatározott ligandummentes állapot szerkezeteit (1erx, 1d3s, 1d2u[31,32]) használva. A ZAP a CHARMM22[34] erőtér paramétereit használja, amelybe bele kellett foglalnunk a Fe(III)-hem rendszer paramétereit is. 7 olyan aminosavat találtunk, amelyek pK_a-ja 6,5 közelébe esett vagy amelyek a három szerkezet közti képzeletbeli transzformáció közben áthaladnak ezen a régión – ezek mind a szerkezetátalakulásban aktív szerepet játszó AB illetve GH hurkokhoz tartoznak (5. ábra). A három állapot között a pK_a-változás leginkább az AB hurok három szomszédos aminosava, az D30, E32 és D35 esetében jelentős, és ezek közül a D30 pK_a értéke a legérzékenyebb a szerkezet megváltozására. A D30 az NO-komplexben szinte teljesen protonált, az NO távozásával ez ~30%-ra csökken és ha a pH 7,4-re emelkedik akkor a D30 teljesen deprotonálódik.

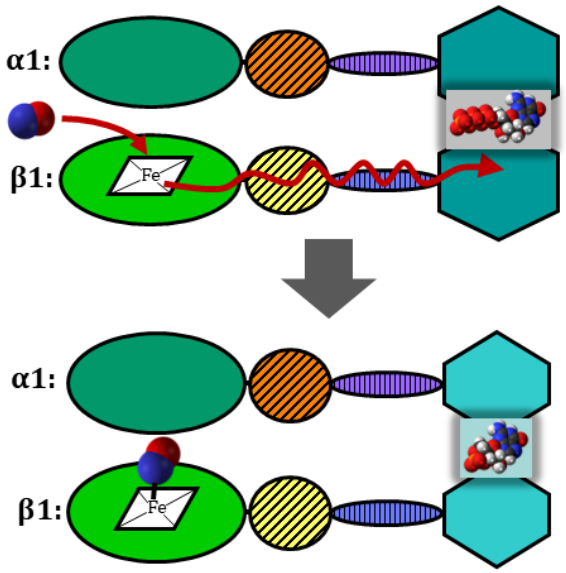


5. ábra. A nitrophorin 4 flexibilis AB és GH hurok régióihoz tartozó protonálható aminosavak számított pKa értékei (a.) és a számítások alapjául szolgáló három kristályszerkezet (1erx, 1d3s, 1d2u) (b.). A hem csoport, az azt rögzítő proximális H59 és az átalakulásokban leginkább érintett D30 aminosav látható. Szaggatott vonal mutatja a D30 (AB hurok) és és a L130 (GH hurok) gerinc karbonil-oxigén atomja között kialakuló H-híd kötést, a színes nyilak pedig a felszíni hurkok ligandumkötés/eleresztés és pH változás hatására bekövetkező átrendeződését.

Az eredmények alapján úgy gondoltuk, hogy a D30 a zárt forma kapcsaként funkcionálhat, hisz protonált formában az AB és GH hurkokat összekötő D30-L130 H-híd kötés proton-donora lehet. A zárt forma úgy jöhet létre, hogy a hem csoporthoz semlegesen kötődő – és onnan a vashoz koordinált vízmolekulát kiszorító – nitrogén-monoxid maga köré rendezi a mozgékony felszíni hurkok hidrofób oldalláncait. A zárt forma alacsony pH-n a nitrogén-monoxid távollétében is részlegesen fennmarad, a D30 részleges protonáltságának köszönhetően. Ebben az állapotban nagyon könnyen lejátszódhat a nitrogén-monoxid meg- vagy vissza-kötődése. Amikor a pH 7,4-re növekedik, a D30 deprotonálódása folytán a D30-L130 kötés megszűnik és a szerkezeti sokaság döntő része a nyitott formát veszi fel.

Elképzelésünk alátámasztása végett molekuladinamikai szimulációkat végeztünk. Kiindulási szerkezetként az alacsony pH-n meghatározott NO-komplex kristályszerkezetét használtuk, melyet az első számítás során a pH=5,6-hoz tartozó, számított pK_a értékeknek megfelelően protonáltunk. Ekkor a kristályszerkezethez képest csak jelentéktelen eltéréseket figyeltünk meg. A második szimuláció során a D30-at deprotonáltuk, de a NO-t a hemhez rögzítettük. A deprotonálódás hatására, a rendkívül rövid szimulációs idő (5 ns) ellenére, az AB és a GH hurkok átrendeződése megfigyelhető volt – a nyitott konformáció irányában mozdult el mindkettő. Az eredmények tehát arra utaltak, hogy a nitrophorin 4 esetében a pH változást a szerkezet felé a felszíni AB hurok D30 aminosava „közvetíti": protonálódása illetve deprotonálódása döntő szerepet játszik a nitrogén-monoxid tárolását és szállítását vagy éppen a gyors felszabadítását elősegítő szerkezeti átrendeződésekben.

3.1.3 Hem fehérjék, mint kétatomos gázok érzékeny szenzorai [S4,S5]



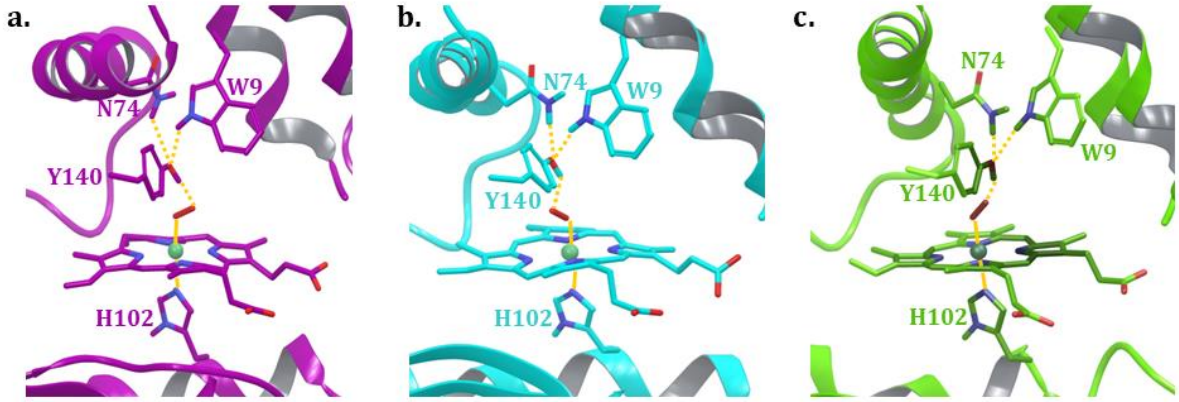
6. ábra. Az sGC felépítése és aktivációja. Az aktív sGC két hasonló felépítésű, de nem azonos fehérjelánc heterodimere. A NO-kötő domén a β1 láncon, a katalitikus egységektől távol helyezkedik el. Az NO kötődése a teljes molekula szerkezetére kihat, felgyorsítja a GTP → cGMP átalakulást.

A kétatomos gázmolekulákat, mint az O_2, NO és CO, hem fehérjék kötik meg, aktiválják, szállítják és tárolják a szervezetünkben. Az NO, mint már korábban említettem, fiziológiánk egyik legfontosabb jelátviteli molekulája. Receptora az oldható guanilát-cikláz (sGC). Az sGC GTP-ből cGMP-t állít elő, ezt a katalitikus folyamatot teszi az NO jelenléte kétszázszor hatékonyabbá (6. ábra). A cGMP szintén egy hírvivő molekula, több létfontosságú folyamat iniciátora – aktivációs jelének specificitása tehát döntő jelentőségű. Az sGC szempontjából ez azt jelenti, hogy az NO-t ezerszeres O_2 túlsúly mellett, a két molekula méret és összetétel-beli hasonlósága ellenére is, szelektíven és hatékonyan kell megkötnie. Meglepő módon azonban az sGC egy His oldallánc által horgonyzott, protoporfirin IX vázat tartalmazó hem csoport révén koordinálja a kétatomos gázmolekulákat, amely a globinok (mioglobin, hemoglobin) aktív centrumával azonos. (Vizsgálódásaimat közel egy évtizeddel az sGC szerkezetmeghatározása előtt végeztem, de ez már akkor is tisztázott volt.) A globinok azonban az O_2 fő tároló- és szállítófehérjéi, szerkezetük tehát specifikusan az oxigénnel való kölcsönhatásra optimalizált. Az O_2-kizárás molekuláris részleteinek jobb megértése felé igen jelentős lépés volt, amikor 2004-ben két kutatócsoport is párhuzamosan meghatározta, a Tengcong-i hőforrásban akkor néhány éve felfedezett baktériumból (*Thermoanaerobacter tengcongensis*)[35] származó hem-tartalmú domén szerkezetét[36,37], amiről bebizonyosodott, hogy az sGC-hez hasonló, de korábban nem ismert feltekeredési mintázattal (fold) rendelkezik. A fehérjét H-NOX-nak, hem tartalmú, nitrogén-monoxid/oxigén kötő fehérjének, nevezték el. Mivel az sGC megfelelő szakasza és a *Tt* H-NOX közti szekvencia homológia nagyon alacsony, szerkezeti modellt nem sikerült építeni, de a topológiai hasonlóság alapján kijelenthető volt, hogy az sGC NO-kötő doménjének aktív zsebe valószínűleg teljesen apoláris. Ezt a tulajdonságát határozták meg az O_2-kizárás alapjaként, hisz a O_2 kötődésekor parciális negatív töltés keletkezik a

ligandumon, míg az NO-komplexben a megkötött ligandum semleges. A *Tt* H-NOX-ban a hemhez kötött O_2 részleges negatív töltését a katalitikus zseb egy Tyr oldallánca (Y140) stabilizálja, amely minden ismert anaerob sGC-homológban jelen van, míg az sGC-ben és fakultatív aerob variánsainak esetében hiányzik – az sGC-ben egy Ile oldallánc található ezen a helyen. A *Tt* H-NOX is anaerob fajból származik, levegőn stabil oxi-komplexet képez, míg az sGC (aerob) nyugalmi állapota ötös koordinációs állapotú, vas-dezoxi forma[38]. A fentiek alapján kialakított szelektivitási modell tehát a megkötött ligandum közelében található proton-donor jelenlétére vagy hiányára fókuszál, amely stabilizálhatja a hemhez kötött oxigént. A képet azonban komplikálja, hogy egy másik H-NOX fehérje, a *Clostridium botulinum* (*Cb*) H-NOX, amely 39% szekvencia-azonosságot mutat a *Tt* H-NOX-szal, bár tartalmazza a kérdéses Tyr oldalláncot, mégis három nagyságrenddel gyengébben köti az O_2-t, mint az NO-t, valamint, hogy a *Tt* H-NOX magasabb hőmérsékleten elveszíti oxigénkötő képességét és O_2 jelenlétében is stabil NO komplexet képez[36,39]. Ezek a megfigyelések közvetlenül ellentmondanak az eredeti hipotézisnek - így tehát munkám kezdetekor továbbra sem volt világos, hogy előfeltétele-e a Tyr (vagy bármely más H-kötés donor) jelenléte a disztális hem zsebben az O_2 kötődésének és hogy esetleges hiánya garantálja-e a szelektivitást.

A jelenséget három különböző modell-rendszerben, két eltérő állapotra vonatkozólag vizsgáltam: a *Tt* H-NOX 300 K és 400 K hőmérséklethez tartozó elrendeződéseit, valamint a *Cb* H-NOX (homológia-modellezéssel előállított) szerkezetét 300 K-en – oxi-komplex és ligandummentes formában. 25 ns-os szimulációkat végeztem CHARMM27[40] erőteret használva, melyet kiegészítettem a hem csoport atomjaira és az oxigén ligandumra vonatkozó paraméterekkel, QM/MM számítások eredményeire támaszkodva.

Az O_2-komplexeket úgy hoztam létre, hogy az oxigént kovalensen rögzítettem a Fe-hoz, így ezek a számítások nem az adott species oxigén affinitását vizsgálták, hanem azt, hogy a fehérje mátrix hogyan alkalmazkodna az oxigénmolekula jelenlétéhez, ha az kötődne. Bár a globális konformáció mutatott jellegzetes eltéréseket, különösen a hurok régiókban, az aktív hely és az oxigén koordináció módja, meglepő módon, nagyon hasonlónak bizonyult mindhárom rendszerben (7. ábra). Akárcsak az oxy-*Tt* H-NOX (300 K) kristályszerkezetében[36] az aktív zseb Y140 (*Tt* H-NOX szerinti számozás) oldallánca és a hemhez kötött O_2 közti H-híd kötés fennmaradt az egyensúlyi trajektória pillanatfelvételeinek 94,0%, 87,4% és 98,6% -ában, az oxi-*Tt* H-NOX (300 K), az oxi-*Tt* H-NOX (400 K) és az oxi-*Cb* H-NOX rendszerek esetében. A Y140 helyzetét a szomszédos N74 és W9 aminosavak rögzítik.



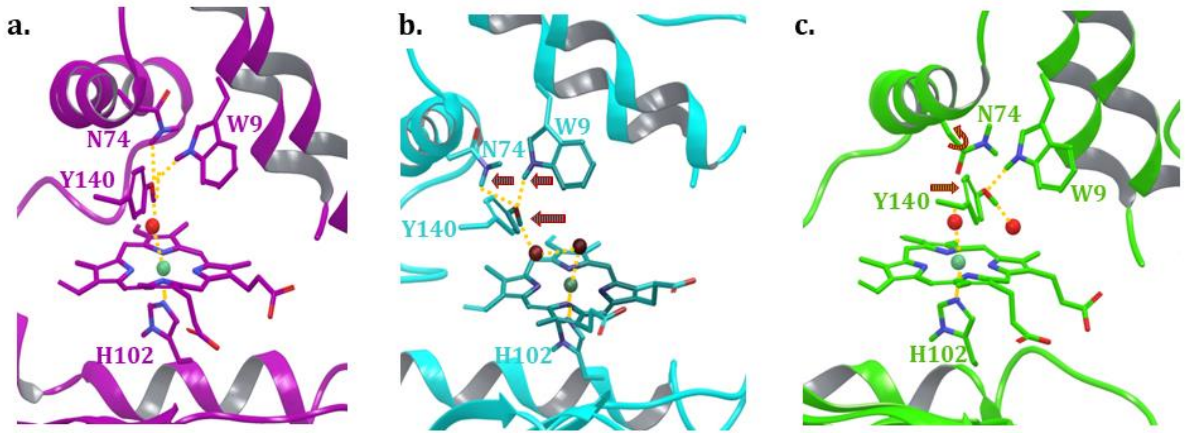
7. ábra. H-NOX rendszerek O_2 komplexeire vonatkozó MD szimulációk eredménye. Az **a.)** oxi-*Tt* H-NOX (300 K), **b.)** az oxi-*Tt* H-NOX (400 K) és **c.)** az oxi-*Cb* H-NOX (300 K) szimulációk átlagszerkezetére leginkább hasonlító pillanatkép.

A nyugalmi állapotú rendszerek (ligandum-mentes forma) vizsgálatakor mindhárom modell esetében ~ 8 ns szimulációs idő után egy vízmolekula koordinálódott a hem vas atomjának hatodik, axiális ligandumaként – amint az a Fe(III) *Tt* H-NOX (300 K) ligandummentes forma kristályszerkezetében is megfigyelhető. (A szimuláció kiindulási szerkezetében a fehérje szolvátburka nem nyúlik be az eltemetett aktív zsebbe – ezért azt a szimuláció során fokozatosan töltik fel a vízmolekulák.) Ezek a vízmolekulák a *Tt* H-NOX (300 K) és a *Cb* H-NOX esetében a szimuláció (meglehetősen korlátos) ideje alatt kötve maradtak, míg a *Tt* H-NOX (400 K) esetében, bár a hatodik ligandumkötési pozíció szinte mindig betöltött maradt (a pillanatképek 99,9%-ában), a vízmolekulák gyorsan cserélődtek – ritkán töltöttek hosszabb időt a vashoz kötve, mint 1 ns. A hemhez kötődő vízmolekula a pillanatképek 78,5%-ában H-kötéssel kapcsolódik az Y140-hez, ami az esetek ~40%-ában proton-donorként (I. állapot) viselkedik (ezek jobban hasonlítanak a kristályszerkezetre), míg a többi esetben proton-akceptorként (II. állapot). Ekkor az N74 átfordul és a karbonil oxigén atomja fogadja az Y104 felől érkező proton-donációt. A *Tt* H-NOX (300 K) I. és II. állapota azonban meglehetősen hasonló gerincszerkezettel rendelkezik (rmsd: 1,0 Å), és a trajektória mentén a két állapot egymásba alakul. A *Tt* H-NOX (400 K) esetében egy másik helyzetet találtam. Itt legalább egy további vízmolekula csapdázódik a hem-vas és az Y140 környezetében. Mind a vashoz közeli, mind a Tyr hely betöltöttsége nagyon magas volt (99,9%, illetve 90,5%), azonban a vízmolekulák mindkét helyen gyorsan cserélődtek. Azok az oldószer molekulák, amelyek eljutottak a vas atomhoz, általában ideiglenesen az Y140-hez is kötődnek, akár a vas felé közeledve, akár onnan távozóban. Ebben az esetben tehát a Tyr kiszorult a hemhez kötött ligandum H-hidas hatótávolságából, azaz nem járul közvetlenül hozzá a ligandum stabilizálásához.

A *Cb* H-NOX esetében szintén azt találtam, hogy az első víz érkezése után egy második is megjelenik, ebben az esetben azonban ez második víz-kötő hely a hem egyik pirrol gyűrűje felett található. A *Tt* H-NOX esetében ez a niche nem áll rendelkezésre, mert egy Ile (I5) eltakarja. A *Cb* H-NOX esetében ebben a pozícióban egy Val található, amely egy metil-csoporttal kisebb lévén elegendő helyet hagy a víz koordinációjához. Érdemes megjegyezni, hogy az I5 a *Tt* H-NOX katalitikus zsebének egyetlen olyan oldallánca, amely még egy kristályszerkezeten belül is jellegzetesen eltérő konformációkat vesz fel (mind az 1u55, mind az 1u56 A és B láncában), és egyes feltételezések szerint ez az oldallánc játszik meghatározó szerepet a hem, H-NOX fehérjék esetében tapasztalt, torzult konformációjának kialakításában. A *Cb* H-NOX esetében a hem feletti víz lett az Y140 elsődleges H-híd kötés partnere (az egyensúlyi szakaszhoz tartozó szerkezetsokaság 98,0%-ban). Az Y140 a vashoz kötött vízzel csak a pillanatképek 9,8%-ában alakított ki H-híd kölcsönhatást, míg a legtöbb esetben (69,1%) ez a víz a N74 oxigénjéhez való kölcsönhatása által stabilizálódott. Ez a kölcsönhatás úgy jött létre, hogy az N74 elmozdult és megfordult; amid oxigénje behatolt a ligandum-kötési zónába. Az így kialakult aktív hely azonban meglehetősen kedvezőtlen az O_2 kötődés számára, mivel ebben az elrendeződésben a vashoz kötődő ligandumon kialakuló részleges negatív töltés az N74 karbonil oxigénjének szintén negatív töltésfelhőjével találná szemben magát (8. ábra).

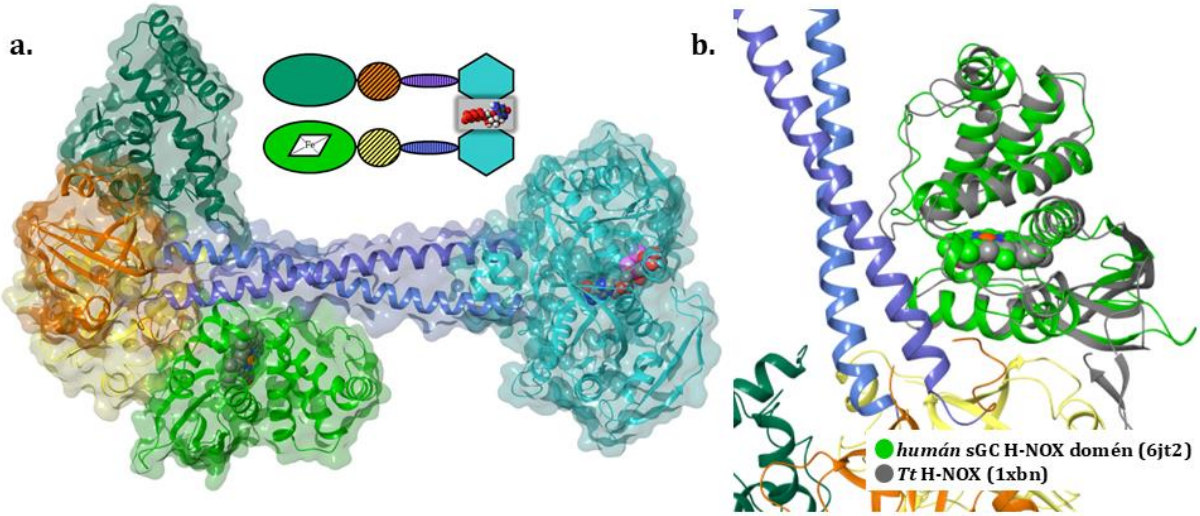
A számított szerkezeteket és az egyes formák O_2-affinitására vonatkozó kísérleti eredményeket összevetve megállapítható, hogy az egyetlen sikeres O_2-kötő (és egyben a legeredménytelenebb O_2-kizáró), a Tt H-NOX (300 K), ugyanúgy koordinálja a hemhez kötött vízmolekulát ligandummentes állapotában, mint az oxi-komplexe a ligandumot. Ez azt jelenti, hogy az O_2 kötődése ebben a rendszerben a kötőzseb lényegi átalakulása nélkül is meg tud valósulni – tehát a folyamat nem az indukált illeszkedés, hanem a konformációs szelekció mechanizmusát követi. A H-NOX domént tartalmazó fehérjék – azaz például az sGC - esetében tehát, eredményeim szerint, a ligandumkötő zsebben jelenlévő H-híd donor szükséges, de nem elégséges feltétele az O_2 kötődésének; ehelyett a követelmény egy jól elhelyezkedő proton donor jelenléte és egy

egyensúlyi szerkezetsokaság, amely olyan konformációkat is mintavételez, amihez az O_2 minimális adaptáció mellett is hozzá tud kötődni.



8. ábra. H-NOX rendszerek ligandummentes állapotára vonatkozó MD szimulációk eredménye. A **a.)** *Tt* H-NOX (300 K) – I. állapot, **b.)** a *Tt* H-NOX (400 K) és **c.)** a *Cb* H-NOX (300 K) szimulációk átlagszerkezetére leginkább hasonlító pillanatkép. A piros gömbök a vízmolekulák oxigén atomjának pozícióját mutatják, a nyilak pedig a *Tt* H-NOX (300 K) I. állapothoz képesti legjelentősebb átrendeződéseket.

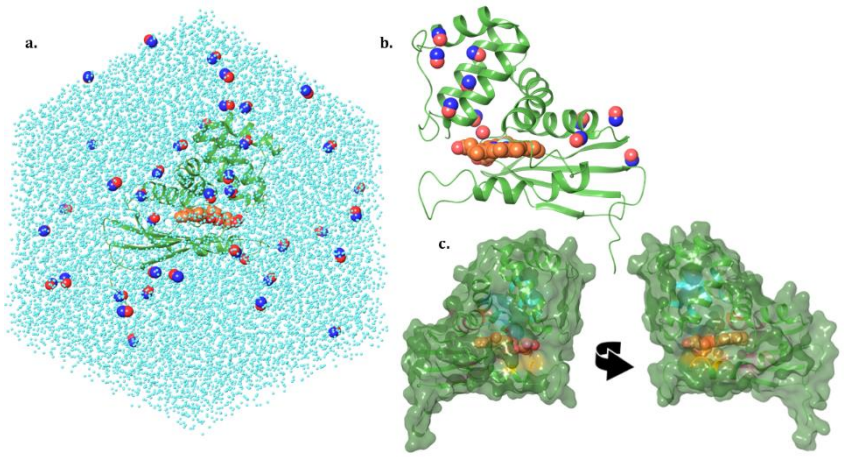
A humán sGC szerkezetét azóta krio-EM módszerrel meghatározták[41]. A komplex szorosan egymásba csavarodott szerkezete meglepetésnek számított, de nagy megnyugvást okozott, hogy a H-NOX domén feltekeredése – legalábbi topológiájában – valóban hasonlít a bakteriális variánsokhoz (9.ábra), annak ellenére, hogy a szekvencia-homológia ezek közt a rendszerek közt nagyon alacsony, valamint, hogy a hem domén önálló működése szintén fenntartható hipotézis.



9. ábra. A humán sGC szerkezete. a.) Az általam használt sematikus modell és a krio-EM mószerrel meghatározott szerkezet (6jt2), a modell szerint színezve. **b.)** Az sGC és a *Tt* H-NOX domének összevetése.

A H-NOX fehérjékhez közel egy évtized múltán ismét visszatértünk. Korábban Oláh Juliannával (BME) és Jeremy Harvey-val (KU Leuven) együttműködve kidolgoztunk egy olyan MD szimulációkon és QM számításokon alapuló eljárást, amelynek segítségével a fehérje mártixon belül történő (klasszikus) diffúzió és az aktív helyhez való (kvantummechanikai) kötődés egyszerre vehető figyelembe és így a kötődési folyamat átfogóan vizsgálható[42]. A módszert a NO

és a CO mioglobinhoz való kötődésének összevetésére használtuk elsőként, de aztán a H-NOX fehérjék esetében történő ligandumvándorlás és kötődés vizsgálatára is. Három bakteriális H-NOX fehérjét (a *Kordia algicida* (*Ka*), egy Nostoc cianobaktérim (*Ns*) és az azóta *Caldanaerobacter subterraneus*-nak (*Cs*) átnevezett *Thermoanaerobacter tengcongensis* baktériumokból származó fehérjéket) vizsgáltunk és tanulmányoztuk ezekben az O_2, NO és CO gázok és a NO-O_2 gázelegy migrációját. A szimulációkat itt úgy végeztük, hogy a kiindulási szolvatált rendszer 40 véletlenszerűen kiválasztott vízmolekuláját kétatomos gázmolekulákra cseréltük és ezeknek a gázmolekuláknak az útját követtük a fehérjemátrixon belül, 300-500 ns-os szimulációk során (10. ábra). Ezzel a módszer jellemezni lehet, hogy milyen gyorsan érik el az egyes gázok az adott fehérjén belül az aktív helyet és milyen hosszan időznek a disztális zsebben. Megállapítottuk, hogy az aktív helyig tartó diffúzió sebességi állandója mindhárom fehérjemátrixon belül az O_2 > NO > CO sorrendben csökken, míg adott ligandum esetében *Ns* > *Ka* > *Cs* sorrendben. A *Ka* és *Ns* fakultatív anaerob baktériumok, NO-szenzorok, amelyek gyengén kötik oxigént. Ezen két fehérje esetében a fehérjében tárolt gáz mennyisége NO > O_2 > CO sorrendben csökken, míg a *Cs* (vagy *Tt*) H-NOX, amely kötelezően anaerob ezért nem védekezik az oxigént megkötődése ellen, az O_2-t részesíti előnyben. Hasonló következtetések vonhatók le az egyes gázmolekulákra vetített összesített fehérje-kontaktusok átlagos számából is. A fehérje-kontaktusok/gázmolekulák arány



10. ábra. Gázmolekulák migrációjának vizsgálata H-NOX fehérjékben. a.) A szimulációhoz összeállított kiindulási model a *Cs* H-NOX + NO rendszer esetében. A hem csoportot narancs-sárgára színeztem, a szolvát-burok vízmolekuláinak oxigén atomjait világos-kékre. **b.)** A szimuláció egy pillantaképe, ahol a fehérje mátrixban az adott pillanat-ban tartózkodó gázmole-kulák láthatók. **c.)** A Cs H-NOX molekula felszíne, ahol a specifikus kötőzsebeket különböző színek jelölik.

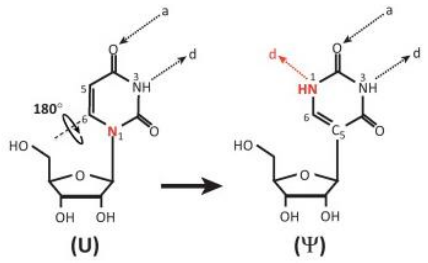
megnövekedése azt jelenti, hogy a gázmolekulák a mátrix mélyebben eltemetett zsebeiben esnek csapdába; ez az érték a *Cs* H-NOX esetében volt a legmagasabb, míg a *Ka* és *Ns* H-NOX-ok esetében kevésbé tágas zsebek és sűrűbben pakolódott fehérje-mátrix fogadja a ligandumokat és így azok hamarabb odatalálnak a tágas aktív zsebbe. A fehérjekontaktusok térbeli csoportosítása révén pedig kötőzsebek és csatornarendszerek azonosíthatók, amelyekhez átlagos tartózkodási idő is rendelhető.

Ebben a témában azért volt számomra nagy öröm részt venni, mert egészen új szemszögből ismerhettem meg ezeket a korábban már vizsgált rendszereket. A fehérjemátrix ebben a megközelítésben jóval komplexebb mivoltában mutatkozik meg, nem pusztán a katalitikus zseb szerkezeti integritásáért felelős vázstruktúraként, vagy a reakciót elektrosztatikus mintázatán keresztül befolyásolni képes tömbfázisként - minden zeg-zug, felszíni árok és váratlan kis fluktuáció jelentőséget nyerhet.

3.2 Betegségokozó mutációk hatása egy pszeudouridináz működésére S6-S8

Az uridin pszeudouridinné (Ψ) történő izomerizációja az RNS leggyakoribb poszttranszkripciós módosulása, olyannyira, hogy a Ψ-t gyakran az "ötödik nukleotidként" emlegetik. Ez a módosítás különböző típusú RNS-ekben, tRNS-ekben, rRNS-ekben, snRNS-ekben és mRNS-ekben fordul elő, és alapvető fontosságú - több ribonukleoprotein (fehérje-RNS) komplex, például a riboszóma és a spliceoszóma hatékony működéséhez elengedhetetlen az RNS komponensek bizonyos pontjain szelektíven lejátszódó pszeudouridiláció[43,44].

A pszeudouridilációs U → Ψ átalakulás során a cukor egység és az uracil gyűrű közti C-N kötés felhasad, a bázis elfordul és egy C-C kötést kialakítva kötődik vissza. Az izomerizáció egy további H-híd donort, egy imino-csoportot hoz létre, ami módosítja a nukleotid által kialakítható kölcsönhatási mintázatokat (11. ábra). Ezek a nem klasszikus irányultságú extra kölcsönhatások fokozzák az RNS-ek szerkezeti- és hő-stabilitását, és elősegítik az összetett térszerkezetek és kötőzsebek kialakítását[45]. Így a Ψ-ek gyakran az RNS-ek funkcionálisan fontos régióiban, elágazásokban, aktív helyek közelében találhatóak[46]. Érdekes módon a Ψ jelenléte az RNS-ekben jelentősen hozzájárul a Toll-szerű receptorok és a protein-kináz R által kiváltott immunválasz elkerüléséhez is[47-49], ezért a Ψ-eket (és Ψ-származékokat) gyakran építik be mRNS-vakcinákba.

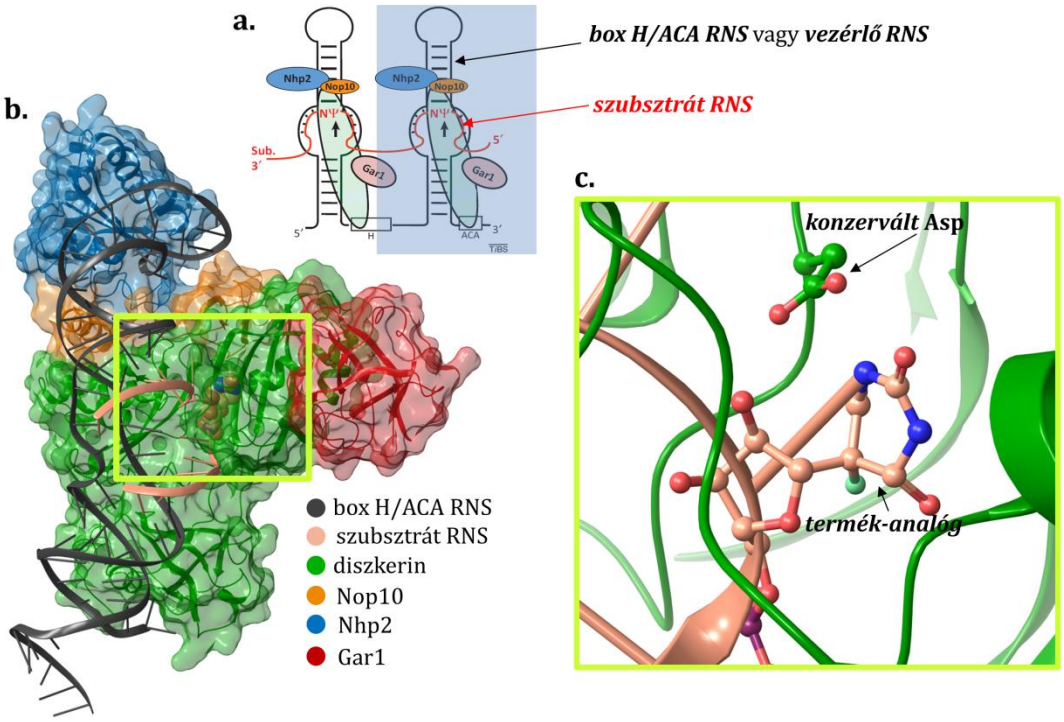


11. ábra. A pszeudouridin (ψ).

A pszeudouridiláció enzimkatalizált folyamat, pszeudouridilázok (PSUk) végzik. Léteznek önálló (egy fehérjeláncból felépülő) PSU enzimek[50] és összetett ribonukleoprotein PSU enzimek is, úgynevezett box H/ACA PSU-k, melyek négy fehérjeláncból (diszkerin, Nop10, Nhp2, Gar1) és egy vezérlő RNS-ből épülnek fel[51]. A szubsztrát-RNS-ek koordinációját és pozícionálását ezekben az enzimkomplexekben a vezérlő RNS, egy kis sejmagvacska RNS (snoRNS) végzi, a katalitikus izomerizációt pedig a fehérjekomponensek. A vezérlő RNS evolúciósan konzervált hajtű-csukló-hajtű-láncvég topológiájú, a H-box (ANANNA) szekvenciát a csukló régióban, az ACA triplettet (ACA box) a 3′ láncvégen hordozza. A vezérlő RNS szerepe a pszeudouridiláz reakcióban, hogy bázispárosító kölcsönhatások révén felismerje a szubsztrát RNS-t és pozícionálja azt a katalitikus diszkerin aktív centrumában[52]. Maga a katalitikus apparátus minden PSU családban (beleértve az önálló enzimeket is) erősen konzervált. A diszkerint három további, esszenciális fehérje, a Nop10, az Nhp2 és a Gar1 veszi körül, amelyek mind szükségesek az optimális enzimműködéshez. Az Nhp2 feltételezhetően a vezérlő RNS-t stabilizálja és a szubsztrát orientációját segíti, míg a Nop10-el kapcsolatban mi mutattuk meg, hogy az kölcsönhatásban áll a diszkerin aktív centrumával, annak szerkezetét és működését is befolyásolni képes. A Gar1, amely az aktív centrumtól távolabb kötődik a komplexhez, megkönnyítheti a termék felszabadulását[52] (12. ábra).

Bár a box H/ACA és a különböző önálló PSU enzimek aktív helyei hasonlóságot mutatnak, a box H/ACA PSU enzimkapacitása két nagyságrenddel alacsonyabb, mint az olyan egy-komponensű Ψ-szintázoké mint a TruB, RluA vagy TruA[53]. Rögtön felmerülhet tehát a kérdés e kevésbé hatékony, de lényegesen összetettebb enzim szerepével és céljával kapcsolatban, amely tehát négy fehérje és két RNS együttműködését igényli egy olyan feladat elvégzéséhez, amelyet egyetlen fehérje hatékonyabban tud kivitelezni. A TruB, a TruA, RluA és a Pus10 azonban, egy kiterjedt fehérje-RNS kölcsönhatási felületet használ és szigorú szekvencia-követelményeket támaszt a szubsztrátok azonosításakor[54-55]. A box H/ACA PSU komplex gépezete alapvetően más megközelítést tesz lehetővé; itt a szubsztrát RNS-eket szinte kizárólag a vezérlő RNS koordinálja,

egy viszonylag rövid, 12 bázispárból álló szakaszon. A box H/ACA PSU tehát minden olyan uridin izomerizációjára alkalmas, amelyhez rendelkezésre áll egy, az enzimhez koordinálódni képes vezérlő RNS, egy olyan box H/ACA szál, amely a központi régiójában komplementer szekvenciát hordoz a kiválasztott uridin közvetlen környezetével.



12. ábra. A box H/ACA PSU szerkezete: a.) sematikus ábrázolásban, **b.)** a *Pyrococcus horikoshii* eredetű variáns 5Å felbontású kristályszerkezete (3hay). és **c.)** a diszkerin katalitikus centrum, a koordinált (nem reaktív) termék-analóggal.

Box H/ACA PSUk a sejtmagvacskában és a Cajal-testekben találhatóak és a változatos RNS-ek pszeudouridilációja mellett a telomerek fenntartásában játszanak szerepet[51]. A komplex mutációit korábban a telomerek megrövidüléséhez köthető nyálkahártya- és fejlődési rendellenességek kialakulásával hozták kapcsolatba. Együttműködő partnereink azonban a box H/ACA PSU komplex két fehérjéjének olyan mutációit azonosították melyek vese-, szem-, bél- és hallási problémákkal jellemezhető fenotípussal társulnak. Ezt a kórképet elsőként írtuk le, majd igazoltuk, hogy ez a fenotípus az rRNS-ek pszeudouridilációs hibájából eredő riboszóma diszfunkció következménye. Azaz olyan mutációkat azonosítottunk, amelyek a pszeudouridiláció hatékonyságát csökkentik, és ezáltal okoznak betegséget.

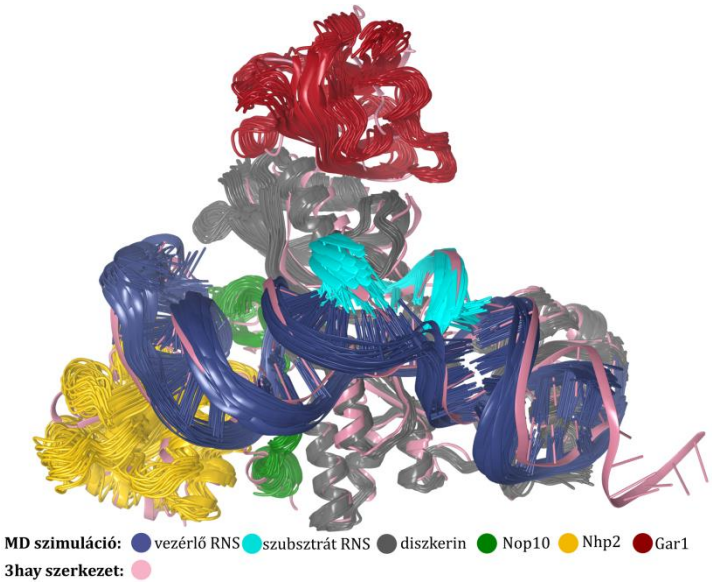
A betegségokozó mutációt hordozó variánsok és a vad típusú (wt) rendszer összevetésének lehetősége jól definiált keretrendszert hozott létre a box H/ACA PSU katalitikus mechanizmusának tanulmányozásához. A kísérleti eredmények értelmezését, tesztelhető funkcionális modellek felállítását és a végső következtetések levonását ebben az esetben is számítások támogatták.

A box H/ACA PSU komplex a pszeudouridiláció mellett kritikus szerepet játszik a telomer szintézisben. Ez utóbbi funkció az, amely összekapcsolja a dyskeratosis congenita (DC) betegséggel[52], amelyet nyálkahártya-rendellenesség és csontvelő-elégtelenség jellemez, valamint annak súlyosabb formájával, a Hoyeraal-Hreidarsson-szindrómával (HH), amely méhen belüli növekedési rendellenességgel, mikrokefáliával, kisagyi hipoplasiával és ritka esetekben enteropátiával jár. Bár az önálló PSUk esetében leírtak pszeudouridilációs hibákkal összefüggő

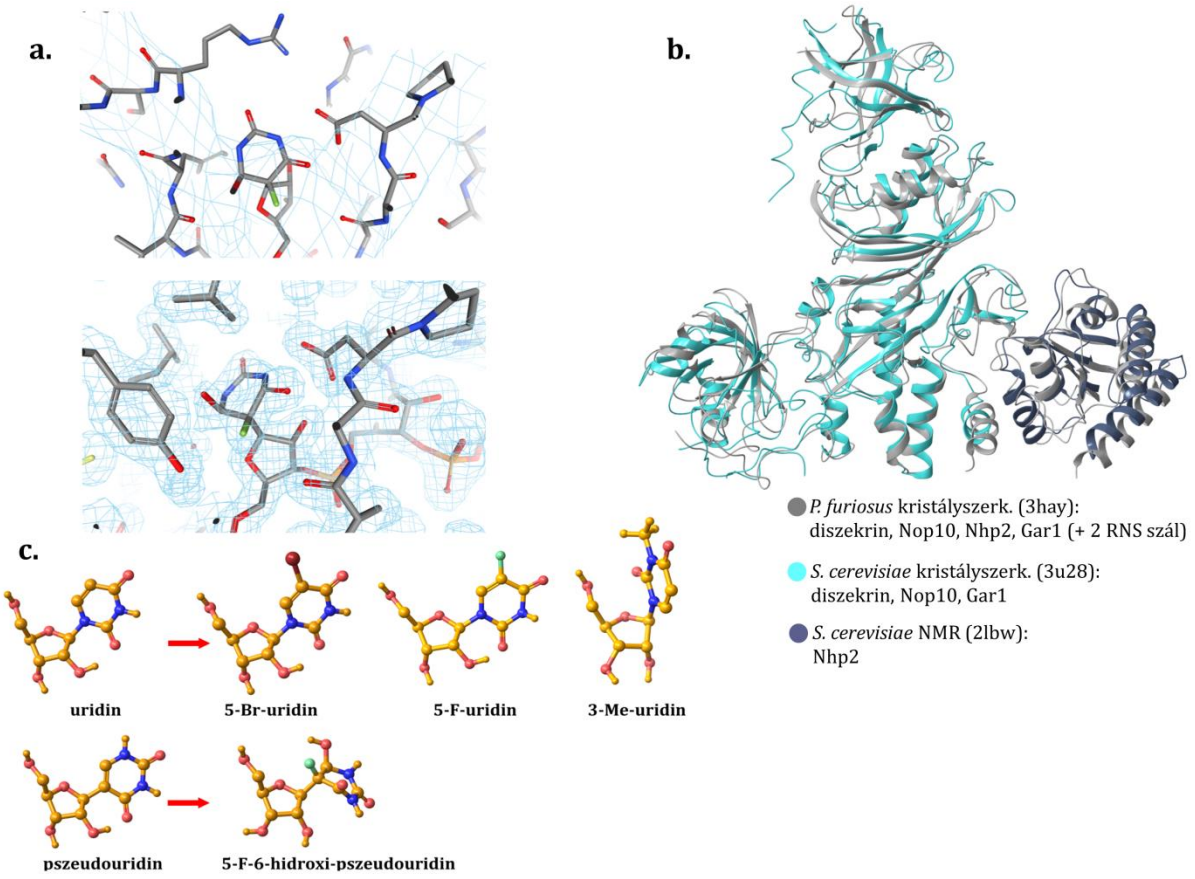
humán rendellenességeket is[53-55], korábban nem volt olyan ismert kórkép, amit a box H/ACA PSU pszeudouridilációs funkciójához kötöttek volna.

Együttműködő partnereink kapcsoltsági analízis és teljes exom-szekvenálás segítségével, azonosították a diszkerin és a Nop10 olyan mutációit, melyek gyermekkorban elkezdődő, korai halálozással járó, szteroidrezisztens nefrózis, szürkehályog, szenzorineurális süketség és enterokolitisz tünetcsoportot mutató betegséget okoznak. Minimális átfedés volt a megfigyelt fenotípus és a HH fejlődési rendellenességei vagy a DC diagnosztikus bőr-nyálkahártya elváltozásai (dyskeratosis, leukoplákia és körömdisztrófia) között, bár a telomerek az újonnan leírt betegség páciensei esetében is rövidültnek bizonyultak, akárcsak a DC esetében. Ennek alapján ezt a megbetegedést egy önálló kórképnek tekintettük és a tünetek alapján azt a feltételezést tettük, hogy a mutációk az enzim pszeudouridilációs kapacitását korlátozzák. A következő lépésben azt szerettük volna megérteni, hogy milyen szerkezeti és funkcionális hatásai vannak az azonosított mutációknak, hogy ezt a feltételezést alátámaszthassuk.

A humán box H/ACA PSU szerkezete nem ismert, ezért a szerkezeti analízis megkezdéséhez a rendszer homológia-modelljét kellett előállítanunk. A kutatásunk idején egyetlen ismert teljes pszeudouridináz komplex szerkezet volt hozzáférhető, a *Pyrococcus furiosus* (*Pf*)-ból származó H/ACA PSU (3hay)[56]. Ennek a komplexnek a fehérje komponensei azonban alacsony szekvencia-homológiát mutatnak a humán variánsokkal (29-43%) és a kísérletileg meghatározott szerkezet nagyon alacsony felbontású (5Å). Ezért a modell felépítéséhez felhasználtuk még a *Pf* jobb felbontású, de részleges PSU komplexeinek szerkezeteit (3hjw[57] és 3lwq[58]) és *Saccharomyces cerevisiae* (*Sc*) eredetű fehérje-komponensek szerkezeteit (2lbw[59] és 3u28[60]). Az *Sc* fehérje-komponensek szekvencia-homológiája a humán rendszerrel (56-70%) jóval nagyobb a *Pf* rendszerekénél. A különböző forrásból származó és eltérő komplex-formákban vizsgált szerkezetek jelentős különbségeket is mutatnak, de az általános szerkezetük hasonló, ezért jól illeszthetők egymáshoz. Az egyes fehérjekomponenseket tehát több szerkezet alapján modelleztük, a komplex „össze-szereléséhez" pedig a *Pf* eredetű teljes szerkezetet használtuk templátként. A homológia-modell stabilitását MD szimulációkkal ellenőriztük: a wt humán rendszer modellje és a *Pf* kristályszerkezet jó topológiai hasonlóságot mutatott (13. ábra). A közöttük kialakult és a szimuláció során stabilizálódott ~2.5 Å (fehérje gerinc-atomokra számolt) rmsd egyrészt a nagyfokú szekvencia-eltérésekből másrészt pedig abból eredhet, hogy a kristályosításhoz felhasznált szubsztrát RNS az U helyett egy attól jelentősen eltérő termék-analógot (5-F-6-hidroxi-pszeudouridint) tartalmazott. Ez egy általános probléma a kísérleti szerkezetekkel való összehasonlítások során, A PSU esetében a mai napig egy olyan szerkezet sem áll rendelkezésre, amely a fiziológiás szubsztrátot vagy terméket tartalmazza, helyettük különböző mértékben eltérő analógok találhatók a meghatározott szerkezetekben (14. ábra).



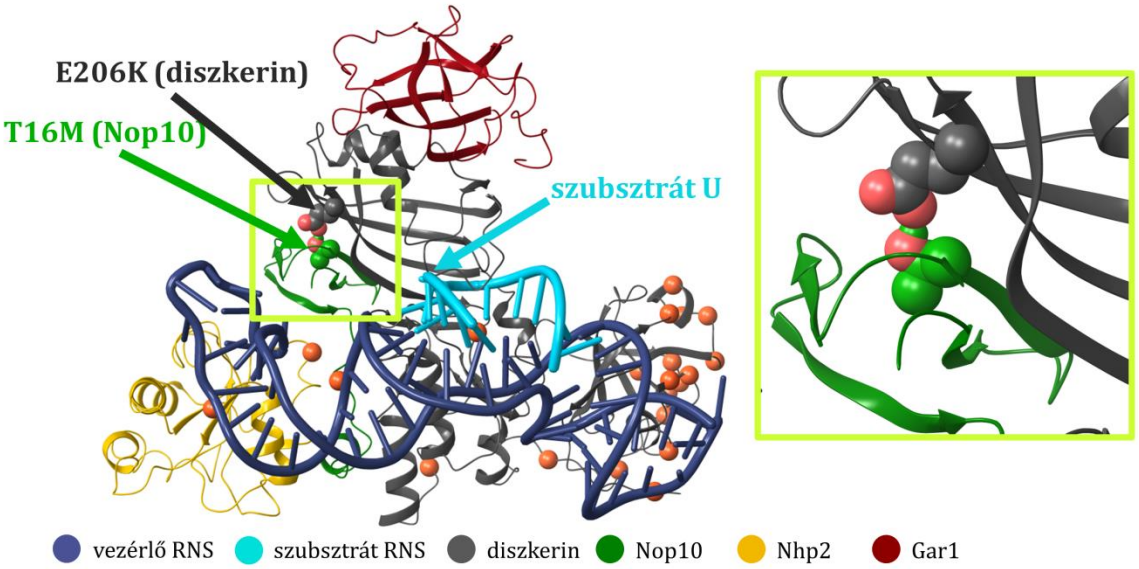
13. ábra. Az MD szerkezeti sokaság összevetése a kristályszerkezettel



14. ábra. A homológia modell építése során tapasztalt kihívások. a.) Az alacsony felbontás miatt a *P. furiosus* eredetű PSU komplex szerkezete nem volt alkalmas közvetlen templátként. A panel felső részén a 4,99 Å felbontású *P. furiosus* box H/ACA PSU szerkezet (3hay) központi régiója látható, középen a nem-reaktív termék-analóggal, alul pedig az 1,85 Å felbontású *E. coli* TruB PSU (1k8w) hasonló régiója, melyen az oldalláncok konformációja és helyzete is világosan kivehető. **b.)** Az eltérő módszerrel meghatározott, különböző komplex formában található és eltérő forrásból származó PSU szerkezetek jól illeszthetőek. **c.)** A kísérletileg meghatározott szerkezetekben található U- és ψ-analógok.

A számításokhoz az AMBERff99SBildnp*[61] erőtér kiegészített változatát alkalmaztuk, amely a Steinbrecher és munkatársai által kidolgozott foszfát-észter paramétereket is tartalmazta[62]. Ez utóbbi kiegészítés azt a nehézséget hívatott enyhíteni, hogy az RNS cukor-foszfát gerincének nagy negatív töltése miatt a foszfát-oxigének közelében nem-realisztikus módon összesűrűsödött vízmolekulák az RNS mozgását korlátozhatják. OPC vízmodellt használtunk, a rendszer teljes töltésének semlegesítését, és a fiziológiás só-koncentrációt beállítását Mg^{2+} és Cl^- ionok hozzáadásával valósítottuk meg. A modellek így összesen ~160 000 atomot tartalmaztak. Az előállított humán wt box H/ACA PSU komplex modell alapján azonnal fontos megfigyeléseket tehettünk (15. ábra). A DC leírt esetei olyan mutációkhoz kapcsolódnak, amelyek többnyire a vezérlő RNS kötésében szerepet játszó aminosavakat érintik: ilyenek a diszkerin N- vagy C-terminálisa közelében található mutációs helyek, a Nop10 R34-es aminosava, vagy az Nhp2 R61, P87 és V126 aminosavai. Kivételt a diszkerin R158 és S280 mutációs pozíciói jelentenek, de ezek sem esnek messze a vezérlő RNS-től. Ezzel szemben az általunk azonosított diszkerin^{E206K} és a Nop10^{T16M} mutációk a dyskerin-Nop10 határfelületen találhatóak, távol mindkét RNS-komponenstől és a diszkerin aktív helyétől is (az aktív helyen kötött U és a diszkerin^{E206}/Nop10^{T16} tömegközéppontjainak távolsága ~24 Å). A DC-hez kapcsolódó és az általunk azonosított mutációs helyek jó elkülönülése alátámasztotta azt az elképzelésünket, hogy a két csoport valóban különböző mechanizmus mentén módosítja az enzim működését. A modell azt is sugallja, hogy a diszkerin^{E206K} vagy a Nop10^{T16M} mutáció lehetséges, hogy hasonló

szerkezeti hatást vált ki – ahogy az általuk kiváltott kórképek is szinte azonosak – hiszen a dyskerin-Nop10 határfelület azonos pontján, egymással szemben helyezkednek el. A diszkerin aktív helyétől való nagy távolságuk azonban kissé kétségbe vonta, hogy a diszkerin^{E206K} vagy a Nop10^{T16M} esetében valóban a katalitikus, pszeudouridilációs lépés fog másképp lejátszódni, mint a wt komplex esetében.

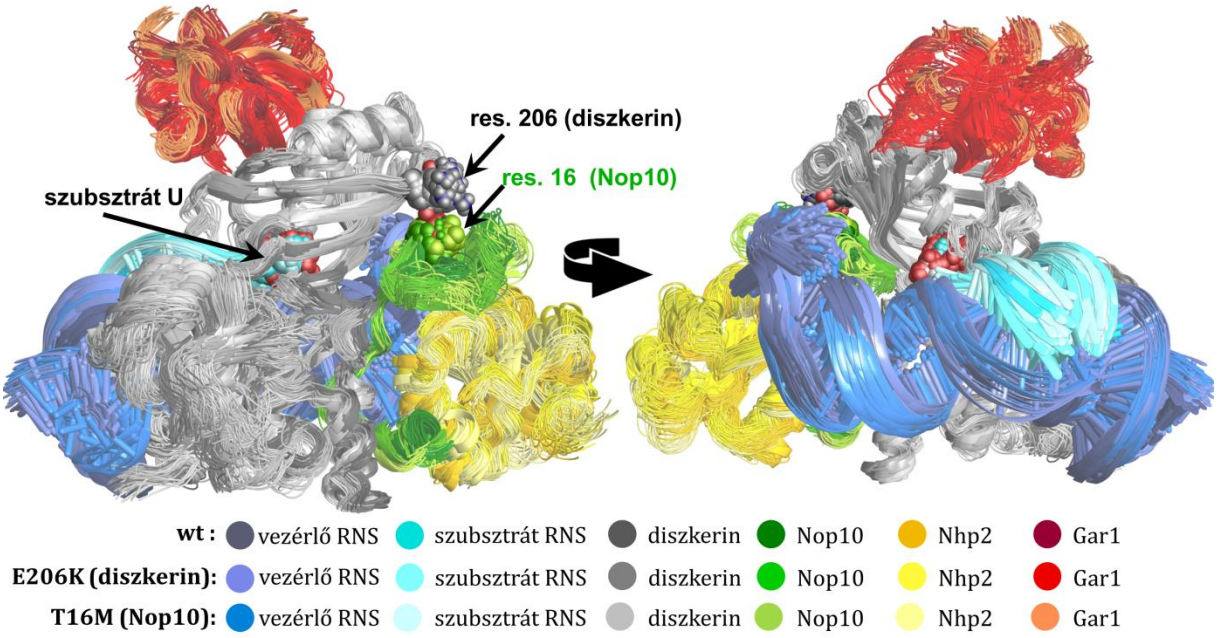


15. ábra. A humán wt box H/ACA PSU komplex homológia modelljének szerkezete. A narancssárga gömbök jelzik a DC mutációk helyét, szürkével és zölddel az általunk azonosított mutációk oldalláncait jelöltem.

Konfokális mikroszkópiát, illetve reciprok ko-immunprecipitációs kísérleteket alkalmazva igazolták munkatársaink, hogy diszkerin^{E206K} variáns sejten belüli lokalizációját a mutáció nem változtatta meg. Továbbá, a diszkerin^{E206K} és a Nop10^{wt}, valamint a diszkerin^{wt} és a Nop10^{T16M} közti kölcsönhatás is fennmaradt. Mindkét esetben megváltozott azonban a komplexeik disszociációs állandója (a diszkerin^{wt}/Nop10^{wt} párhoz képest), melyet nyomás-függő fluoreszcencia spektroszkópia mérésekkel követtünk.

A wt és a mutáns komplexek MD szimulációi azt az eredményt szolgáltatták, hogy bár a mutációk megjelenése nem okoz globális szerkezet változást (16. ábra), a diszkerin/Nop10 kölcsönhatási felszínen bekövetkező aminosav-cserék a pszeudouridilációs zseb átrendeződését váltják ki. Két karakterisztikus különbség alakult ki: a mutációt hordozó PSU komplexekben a diszkerin katalitikus D125 oldallánca és a szubsztrát U közti kölcsönhatás megszűnik, és az U koordinációs geometriája is megváltozik (17. ábra). Ez meglepő megfigyelés volt, annak fényében, hogy a két helyszín milyen messze helyezkedik el egymástól, azonban a szerkezetek részletesebb analízise során azonosítottunk a mutációs helyek és a katalitikus centrum között két különböző kölcsönhatási útvonalat is. Az egyik a mutációs hely szomszédságában található Nop10^{Y15} és a diszkerin^{R247} közti H-híd, amely azért lehet fontos, mert ennek az orientációja és erőssége hatással lehet a diszkerin^{R248} konformációjára, amely a szubsztrát uridin foszfát-csoportját koordinálja. A másik egy bonyolult, H-kötésekből és hidrofób kölcsönhatásból felépülő láncolat, mely a Nop10 16-18-as szegmensét és a katalitikus diszkerin^{D125}-t hordozó 122-131-es hurkot köti össze: a Nop10^{T16} és Nop10^{K18} oldalláncai H-kötéseket képeznek a diszkerin^{E206} és diszkerin^{E208} aminosavakkal, amelyek közül az utóbbi szintén H-kötést képez az diszkerin^{R211}-el, mely a ezen kívül a Nop10^{F2} aromás gyűrűjével is stacking kölcsönhatást alakít ki. A Nop10^{F2} egy olyan zsebbe nyúlik, amelyet a diszkerin diszkerin^{R158}, diszkerin^{L213}, diszkerin^{Q244} és diszkerin^{E245} aminosavai határolnak. A diszkerin^{E245} H-kötéssel kapcsolódik a Nop10^{H31}-hez, amelyet a

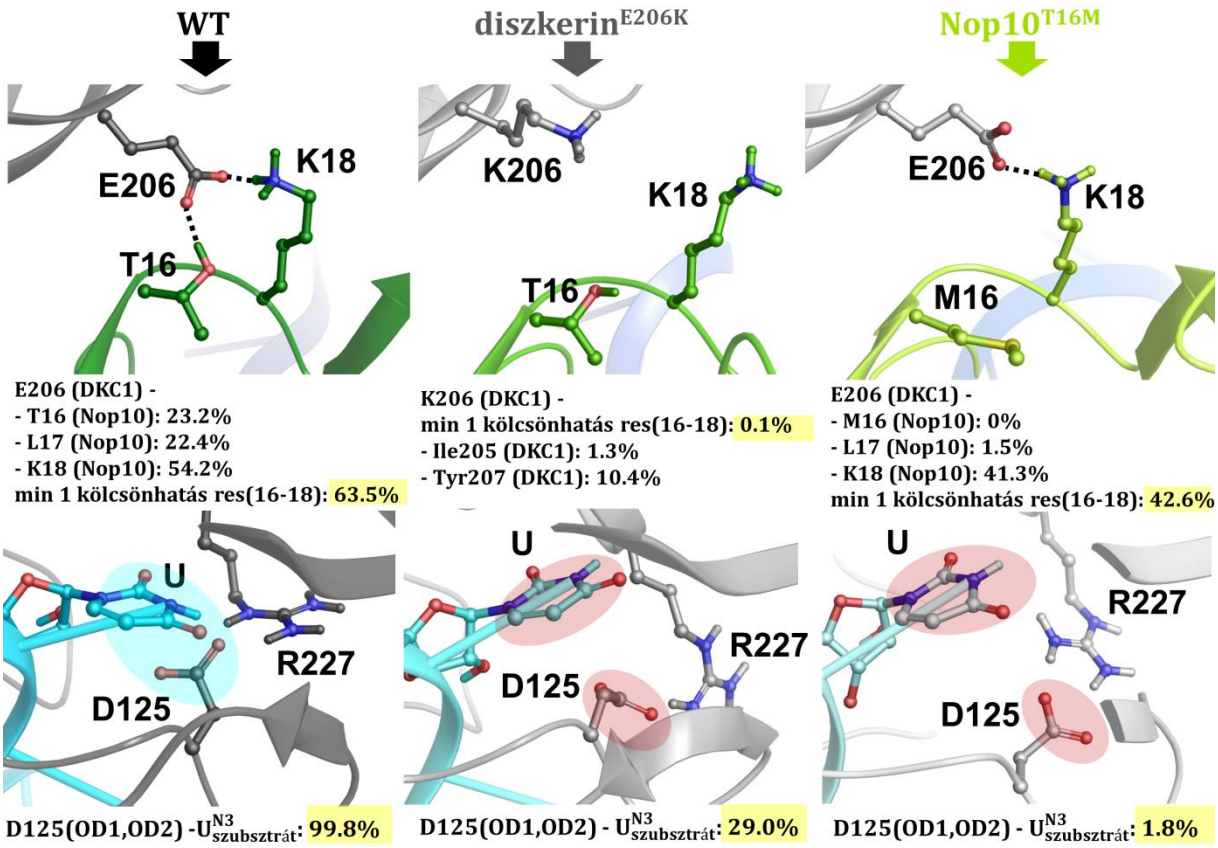
diszkerin^{T129} is koordinál, ami viszont az aktív diszkerin^{D125}-t hordozó hurokban helyezkedik el. A két fehérje e fogaskerék-szerű kiterjedt érintkezési felülete lehetővé teszi a kommunikációt a távol fekvő mutációs- illetve aktív-hely között. A modellezés eredménye tehát megerősítette azt a hipotézisünket, hogy az diszkerin^{E206K} és a Nop10^{T16M} mutációk a pszeudouridilációs kapacitást csökkentik, melyet aztán *in vivo* zebrahal modellben történő vizsgálatokkal és a páciensekből nyert minták analízisével támasztottunk alá.



16. ábra. A mutációk globális hatása. Az MD szimulációk tanulsága szerint a diszkerin^{E206K} és Nop10^{T16M} mutációk nem okoznak jelentős változást a komplex szerkezetében. Az ábra az egyes rendszerek szimulációinak egyensúlyi sokaságának reprezentatív elemeit mutatják, a szerkezetek >90%-át tartalmazó klaszterek középszerkezeteit.

A választott zebrahal modell dkc1 (diszkerin) génjének CRISPR/Cas9 közvetített mutációja révén hoztak létre kutatótársaink két null variánst. A homozigóta null mutáns halak 5 nappal a megtermékenyítés után elpusztultak, a humán betegségnek megfelelő fenotípussal. A lárvák szemmetszetei a zebrahal szürkehályog-modellekhez hasonló átlátszatlan lencsét mutattak. A proliferációs markerek fokozott festődését figyelték meg a retinában és a látóidegben, a magas dkc1-expressziójú területeken, ami sejtciklus-hibára utal. A belső fül fejlődése károsodott, a bélrendszer bélkompartmentumai pedig differenciálatlanok maradtak, sőt a differenciálódási markerek kifejeződése általánosan csökkent a null variánsok esetében. Vérképzőszervi rendellenesség is megfigyelhető volt, a korábbi dkc1 és nop10 null zebrahal modellekben leírtak szerint. A dkc1 hiánya hibás állkapocs-porc fejlődést és rendezetlen tobozmirigyet is okozott, amit a női diszkerin^{E206K} betegek esetében is megfigyeltünk. A nullmutánsok mentesíthetőek voltak wt humán dkc1 mRNS zigótikus injekciójával. A dkc1 p.E206K mRNS-sel sokkal gyengébb mentést lehetett elérni, ami a szintén ennek a variánsnak - némi korlátozott funkció melletti - patogenitását jelzi.

A telomerek biogenezise a zebrahalban hasonló az emberéhez. A dkc1 null állatokban azonban nem figyeltünk meg telomer-rövidülést. Mivel már korábban megmutatták, hogy a diszkerin kiütése (többek között) a riboszomális RNS (rRNS) pszeudouridilációjának >50%-os csökkenését eredményezi[63] azzal a feltételezéssel éltünk, hogy a tapasztalt differenciálódási problémák hátterében is ez állhat. Azt találtuk, hogy a null mutáns állatokban az 18S rRNS mennyisége alacsony volt a 28S rRNS-hez képest és jelentősen csökkent pszeudouridilációjának

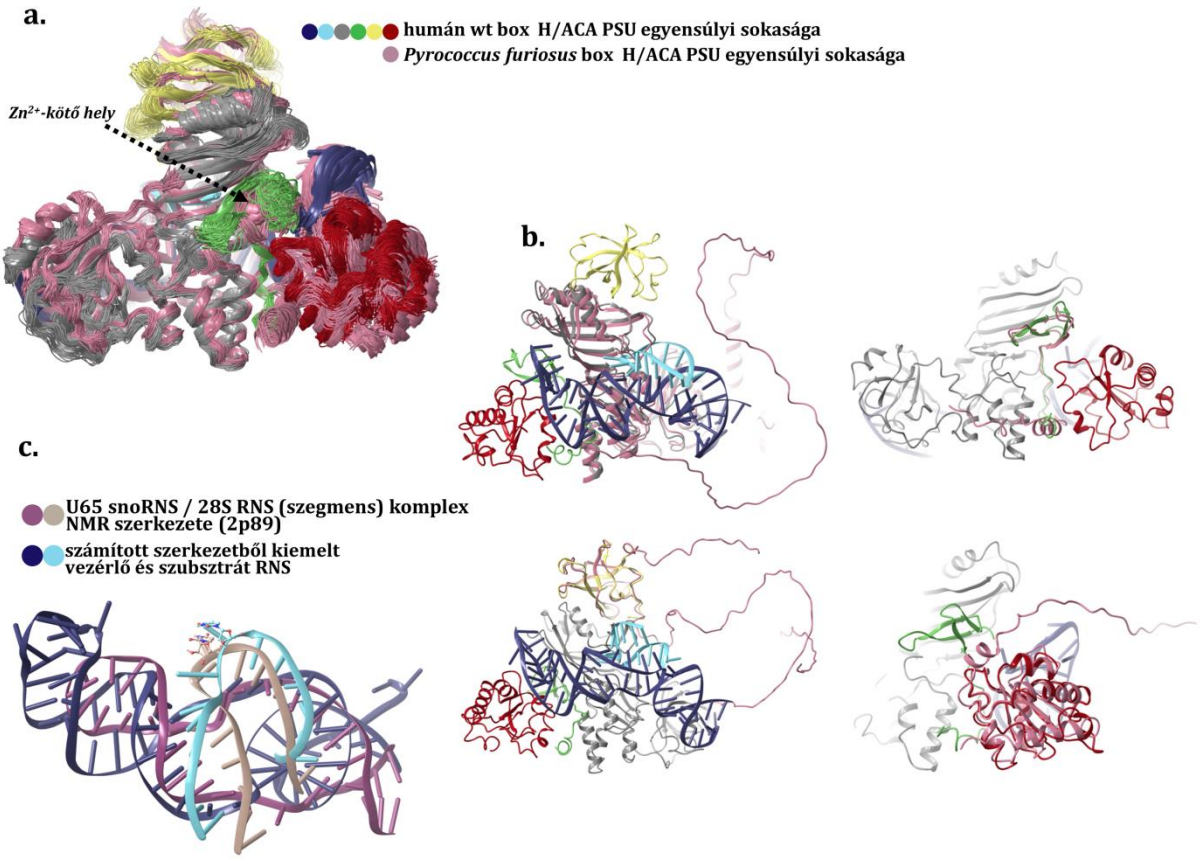


17. ábra. A mutációk szerkezeti hatása: lokális hatások a diszkerin/Nop10 határfelületen (felső sor) és a távol fekvő diszkerin aktív helyen (alsó sor). Az első oszlop a wt rendszert mutatja be, a másik kettő pedig a betegség-okozó mutációk hatását. Az ábrák az MD trajektóriák egyensúlyi szakaszainak leggyakrabbak előforduló konformációit (legpopuláltabb klaszterek középszerkezeteit) mutatják.

mértéke is (a mérésekhez az RNS mintákat perifériás vérből és bőrből izoláltuk, és a Ψ- és U-tartalmukat HPLC/MS módszerrel határoztuk meg). Megvizsgáltuk a Ψ/ U arányt humán betegek perifériás vér mononukleáris sejtjeiben is (immun-Northern blot alkalmazásával), ahol hasonló változásokat tapasztaltunk – pszeudouridilációs hibák egyértelmű jeleit. Mivel a dkc1 null mutáns zebrahalak a humán fenotípushoz hasonló elváltozásokat szenvedtek normális telomer-hossz mellett riboszómális diszfunkcióval, arra a következtetésre jutottunk, hogy a fenotípus fő hajtóereje a mutációk által a Nop10/diszkerin határfelületen kiváltott szerkezeti változás, amely a diszkerin aktív helyét is módosítja és így a box H/ACA PSU pszeudouridilációs kapacitását csökkenti.

A kutatásunk következő szakaszában célunk az volt, hogy tisztázzuk a pszeudouridilációs reakció molekuláris részleteit, azonosítsuk a reakciót befolyásolni képes szerkezeti elemeket, valamint a vezérlő RNS-ekre vonatkozó szekvenciális követelményeket. A reakciómechanizmus kulcsfontosságú lépéseit MD szimulációk majd a tanulságok alapján létrehozott modellekkel végzett vegyes kvantummechanikai /molekulamechanikai (QM/MM) számítások segítségével vizsgáltuk. A wt humán box H/ACA PSU komplex modelljét két formában tanulmányoztuk (a kiindulási és termék-állapotokban), és emellett létrehoztuk négy inaktív (vagy gyengén aktív) variáns modelljét is, hogy feltárjuk, hogyan befolyásolják a mutációk a komplex szerkezetét és katalitikus aktivitását.

Elsőként molekuladinamikai (MD) szimulációkat végeztünk a wt kiindulási és termék állapot, és részlegesen vagy teljesen inaktiválódott mutáns enzimkomplexek estében: a wt/U, wt/Ψ, diszkerin^{E206K}/U és Nop10^{T16M}/U, valamint a diszkerin^{D125A}/U, diszkerin^{D125N}/U rendszerekre (a /U és /Ψ jelölés a diszkerin katalitikus helyére ékelődő szubsztrát mibenlétére utal, azaz ezek a kiindulási és termék állapotoknak felelnek meg). A szubsztrátkötő konformáció a box H/ACA PSUk esetében úgy alakul ki, hogy a vezérlő RNS-hez koordinálódott, U-alakban meghajlított szubsztrát RNS szál az izomerizálandó uridin helyén kifordul, a szubsztrát uridint a diszkerin katalitikus zsebébe kényszerítve. A szubsztrát szál összes többi nukleotidja szabályos Watson-Crick bázispárokat alakít ki a vezérlő RNS nukleotidjaival, csak az átalakítandó U (vagy az izomerizáció során kialakult Ψ) marad párosítatlanul és egyedül ez a bázis nyúlik be mélyen az aktív helyre. Modellépítés során a vezérlő és a szubsztrát RNS-eket a *Pf* box H/ACA RNP-jének kristályszerkezetéből emeltük ki, azt a variánst (és szerkezetet) választva, amely a natív szubsztrát legközelebbi analógját tartalmazza a katalitikus pozícióban: 3-metil-uridint szubsztrátot hordozó (de a Gar1-t nem tartalmazó, részleges komplex) szerkezetet (3lwq).



18. ábra. A humán wt box H/ACA rendszer MD szimulációkból származó szerkezetének összevetése kísérleti eredményekkel. a.) A *Pf* PSU (3hay) kristályszerkezettel szerkezettel való egyezést a 13. ábrán már bemutattam. Mivel azonban a *Pf* PSU rendszerre is végeztünk szimulációt, az összevetését úgy is elvégeztük, hogy az MD-vel származtatott szerkezeti együtteseket illesztettük egymásra. A Nop10 konzerválódott másodlagos és harmadlagos szerkezete különösen érdekes, mivel e rövid - és szabad formában strukturálatlan - fehérje archeális változata tartalmaz egy cink-ion kötőhelyet, amely a humán formában nincs jelen. **b.)** Az egyes fehérjekomponensek MD-el származtatott konformációja és az AlphaFold által becsült szerkezeteik (rózsaszín) egymásra illesztése (felülről (az óramutató járásával megegyező irányában): diszkerin, Nop10, Nhp2, Gar1). **c.)** A teljes humán wt PSU komplex MD trajektóriájának egyensúlyi sokaságából kiemelt vezérlő és szubsztrát RNS-ek és a humán U65 snoRNS/28S rRNS komplex NMR-szerkezetének összehasonlítása.

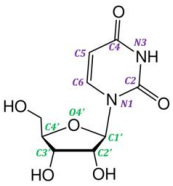
Amint már korábban is, az újabb modellek esetében is azt találtuk, hogy a humán box H/ACA PSU szerkezeti együttese megtartja a *Pf* eredetű rendszer topológiáját; a legjobb illeszkedést a központi, katalitikus régióban figyeltük meg. Az AlphaFold előrejelzésekkel is jelentős egyezést

találtunk, annak ellenére, hogy ezeket az egyes fehérjék önálló (nem komplex-beli) formáira hozták létre. Továbbá, a teljes komplexben a vezérlő és a szubsztrát RNS-ek az MD szimulációból származó konformációi hasonlóságot mutatnak a humán U65 snoRNS (vezérlő) és a 28S rRNS (szubsztrát) szegmens (enzimmentes) komplexének oldószerbeli NMR módszerrel meghatározott szerkezetével is. A megfigyelt hasonlóság azt is illusztrálja, hogy a kötési topológiát és a szubsztrát uridin átfordulását a két RNS-szál komplexképzése önmagában biztosítja (18. ábra).

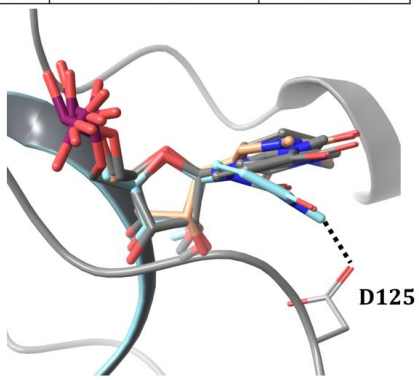
A számítások során azt találtuk, hogy wt/U rendszerben – egyedülálló módon – a szubsztrát bázis N3 atomja H-hidat alakít ki katalitikus D125 oldalláncával (a szerkezetek 99,5%-ában), amely a nukleotid jelentős torzulásával jár együtt (19. ábra). A többi vizsgált rendszerben ilyen kölcsönhatás nem (vagy csak részlegesen) alakul ki: az Asp125(OD1, OD2)---N3 H-kötés a wt/Ψ, diszkerin^{D125A}/U, diszkerin^{D125N}/U és diszkerin^{E206K}/U komplexek szerkezeteinek 1,6, 0, 14,3 és 29,0%-ában volt jelen. Tehát sem a katalitikus Asp helyén a mutánsokban megjelenő Asn vagy Ala, sem a natív Asp melletti Ψ termék nem indukálta a nukleotid elhajlását. A D125 katalitikus zsebben való jelenléte mellett sztérikus okok is hozzájárulnak a wt /U komplex torzulásához. A wt box H/ACA PSU komplex diszkerinjéhez való kötődésekor a szubsztrát egy nagyon sekély katalitikus zsebbel találkozik, amelynek méretét a V128, I226 és L246 oldalláncok által létrehozott „hidrofób blokk" korlátozza (20. ábra). A feszült szubsztrát-kötő konformáció a jelentőségét a későbbi QM/MM számításaink is alátámasztották. A QM/MM modellben ugyan a D125 helyzete kissé eltolódik az U szubsztráthoz képest, a bázis orientációja és torzulása a zsúfolt aktív zsebben megmaradt. Ebben az elrendeződésben az U^{N3} atomjához való közvetlen H-híd kötést egy víz-közvetített közvetett kölcsönhatás váltja fel, miközben az D125 elég közel került a cukor 2′ hidroxil csoportjához egy direkt H-híd kialakításához (ez a kölcsönhatás az MD-szerkezetek kisebb hányadában (4,4%) is jelen van). Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a box H/ACA PSU enzim a szubsztrátkötés feszült geometriáját a glikozil kötés gyengítésére és az izomerizáció elősegítésére, valamint a szubsztrátok felismerésére használja.

a.

	orientáció ↓ $\lvert\chi\rvert$ (O_4'-C_1'-N_1-C_2)**/ °	*gyűrűtorzulás* ↓ C_4'-C_1'-O_4 / °
WT/U	174.5±4.1	107.2±4.0
E206K (dysk)/U	131.0±15.0	143.1±8.3
T16M (Nop10) / U	153.8±11.6	124.0±5.1
D125N (dysk)/U	145.7±9.5	141.9±5.0
D125A (dysk)/U	132.2±11.3	148.3±4.7
WT/Ψ	144.8±12.0	159.1±6.9
Watson-Crick referencia	156.7±11.1	129.2±4.8



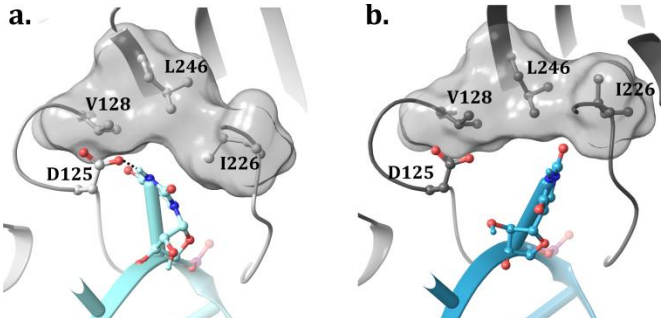
b.



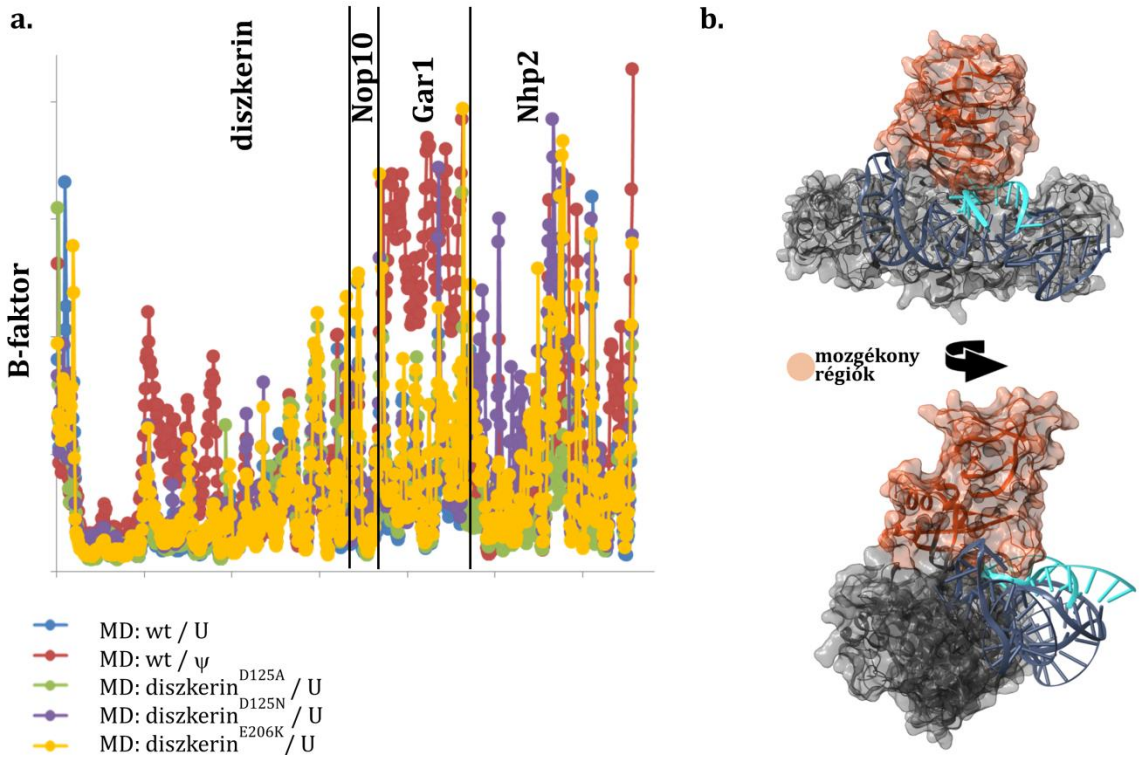
19. ábra. Ligandum-kötődést kísérő szerkezet-torzulás az MD szimulációk egyensúlyi sokaságaiban. a.) A bázis-gyűrű orientációjának és síkjának torzulása a tanulmányozott rendszerekben. Világoskék sor a wt box H/ACA PSU komplex kiindulási állapotára, a narancssárga a wt termék-komplexre vonatkozik, a szürke sorok pedig a katalitikus helyen uridint tartalmazó (kiindulási állapotú) hatékonyság-csökkentő mutációkat hordozó variánsokra vonatkozó adatokat tartalmazzák. **b.)** A felsorolt rendszerek (táblázattal azonos módon színezett) szerkezetei: az egyensúlyi trajektóriák leggyakrabbak előforduló konformációi (legpopuláltabb klaszter középszerkezetei).

A termékállapotú wt/Ψ PSU komplexben és a mutáns enzimek esetében a bázisok másik irányú torzulása volt megfigyelhető. Ezekben a rendszerekben az D125-U^{N3} kapcsolat hiányában az aktív centrumhoz kötött nukleotid szokatlanul függőleges helyzetbe fordul. Ez a függőleges helyzet és az N1-H1 új H-kötés donor megjelenése a Ψ gyűrűn lehetővé teszi, hogy a

termékállapotú komplex pszeudouridinje új H-híd kötéseket képezzen a diszkerin felső régiójával, amely a Nop10-el és a Gar1-el is kommunikál, és amely a termék felszabadulásának elősegítéséért felelős. Az aktív helyen kötött Ψ az MD sokaság szerkezeteinek több mint 75%- ában az N1-H1 H-kötéseket képez vagy a Y153 oldallánc hidroxilcsoportjával, vagy a T224 gerincoszlop karbonil oxigénjével, úgy pozícionálva a gyűrűt, hogy az O2 (az újonnan képződött C1′-C5 kötéssel szemben) elérje az I226 és R227 gerinc amid-csoportjait. A komplexek számított B-faktorainak összehasonlítása e kölcsönhatások váratlan következményét tárta fel: a pszeudouridin-kötött rendszerben a diszkerin felső régiója („fluktuáló domén": 150-252 régió) és a teljes Gar1 molekula mozgékonyabbá válik, mint bármely más itt vizsgált rendszerben. Az D125-U^{N3} kapcsolat elvesztése önmagában e régiók konformációs heterogenitásának enyhe növekedéséhez vezet, ahogyan azt a D125A/U, D125N/U és E206K/U rendszerek esetében láttuk, de a pszeudouridin-kötött forma esetében a hatás jóval jelentősebb (21. ábra).



20. ábra. A hidrofób blokk és az aktív hely elrendeződése a reakció kiindulási (**a.**) és termékállapotában (**b.**).

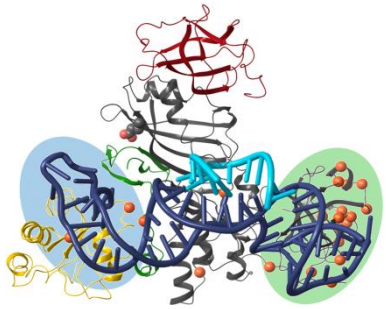


21. ábra. A szimulációk során tapasztalt mozgékonyság-beli különbségek az egyes tanulmányozott rendszerek közt. a.) Aminosavanként összegzett B-faktorok a PSU komplexek fehérje-komponensei esetében. **b.)** A legmozgékonyabb régió: a diszkerin fluktuáló doménje és a Gar1 által alkotott együttes.

A mintavételezett konformációk a felső diszkerin régió összehangolt billenését írják le. Úgy tűnik tehát, hogy a pszeudouridin gyűrű lazább, függőlegesebb helyzetbe való elmozdulása egyszerre enyhíti a konformációs feszültséget és kínál új kölcsönhatási lehetőségeket a Ψ gyűrűn kialakult N1-H1 H-kötés donorja számára. Ehhez azonban a „fluktuáló domén" enyhe elmozdulása és a „hidrofób blokk" átstrukturálódása szükséges. A termék felszabadulása ezek szerint akár úgy is

történhet, hogy a hátrabillenő régió „lehámozza” a hozzá szorosan koordinálódott, Ψ-t tartalmazó termék RNS-t a vezérlő snoRNS-ről.

Megvizsgáltuk a vezérlő- és a szubsztrát/termék RNS-ek és a box H/ACA PSU fehérje-komponenseinek kölcsönhatását, hogy feltárjuk ezek – esetlegesen szekvencia-specifikus – szerkezeti követelményeit. (Úgy találtuk, hogy ezek a kölcsönhatások minden vizsgált rendszerben közel azonosak; ezért az itt bemutatott számok a leghosszabb futási idővel rendelkező wt/Ψ komplex szimulációjából származnak). Összesen ~ 52 H-kötés jön létre a vezérlő RNS és a box H/ACA PSU különböző fehérjekomponensei között, ezekben azonban leginkább a vezérlő RNS cukor-foszfát gerince érintett. Ebből ~ 20 H-kötés szekvencia-specifikus (nukleobázis--fehérje típusú), míg a többi a cukor-foszfát gerinc és a fehérje atomjai között jön létre. A bázis-specifikus kölcsönhatások közül ~8 az ACA-motívum (és környezetének) a diszkerin PUA régiójához való koordinációját szolgálja, ~ 10 pedig a vezérlő RNS hajtű régiója és az Nhp2 között jön létre. Így a RNS által kialakított pszeudouridilációs zseb és az enzim aktív centruma között mindössze 2,5 ± 0,6 szekvencia-specifikus kölcsönhatást található. Ez utóbbi H-híd kötések a diszkerin^{E104}, diszkerin^{K144} és diszkerin^{Q147} hosszú, rugalmas oldalláncaihoz kapcsolódnak, amelyek nem támasztanak szigorú szekvencia követelményt a vezérlő RNS szállal szemben, nem úgy, mint például az ACA-motívum felismerését és kötődését irányító H-híd kötések, melyeknek több mint felében a fehérje főlánc atomjai, azaz a PSU gerinc-szerkezet maga vesz részt. A szubsztrát/termék RNS és a fehérje komponensek között egyáltalán nem találtunk bázis-specifikus kölcsönhatásokat. A szubsztrát és a diszkerin között (a diszkerin a PSU komplex egyetlen olyan tagja, amivel a szubsztrát/termék RNS kölcsön hat) kialakuló ~ 16 H-híd kötés közel 80%-a cukor-foszfát gerinc és a fehérje között jön létre; az izomerizálandó uridin az egyetlen nukleobázis, amely bázis-specifikus kölcsönhatást alakít ki a fehérjemátrixszal. Ezek az eredmények együttesen azt sugallják, hogy azok a vezérlő snoRNS-ek, amelyek képesek a topológiát fenntartva igazodni a box H/ACA PSU enzimhez, és a diszkerin-PUA és Nhp2 doménekhez való kötődésükön keresztül aktiválni azt, meglehetősen szabadon variálhatók a pszeudouridilációs zseb régiójában (23. ábra). Ez azt jelenti, hogy a pszeudouridiláció a legkülönbözőbb RNS szubsztrátokban kiváltható a box H/ACA PSU apparátus segítségével. Ezért ebben a munkánkban felvetettük, hogy a box H/ACA PSU az RNS-szerkesztés ideális eszköze lehet, mely gyógyászati alkalmazhatóságát is előrevetíti: mRNS-ek pszeudouridilációja ugyanis alternatív aminosavak beépítését és a korai stop-kódonok (PTC-k) átolvasását eredményezheti[64,65]. Mivel a patogén humán mutációk jelentős része (~11%) a PTC-knek tulajdonítható, a célzott pszeudouridiláció klinikailag releváns stratégiát kínálhat e mutációk korrekciójára. Az endogén box H/ACA PSU rendszerre támaszkodva csak a megfelelő vezérlő snoRNS-eket kell előállítani és szállítani. A bejuttatás a mikroRNS-terápiákhoz nemrégiben kifejlesztett módszerekkel megvalósítható és minimális immunogenitást okoz[66,67]. Azóta két csoport részletesebben is feltárta ezt a lehetőséget, de mindkét esetben arra jutottak, hogy a hatás nagyon kontextusfüggő és viszonylag gyenge[68, 69]. Ez azonban csupán azt jelenti, hogy kicsit más úton kell majd az indukált pszeudoruidiláció terapeutikus felhasználását megközelíteni.



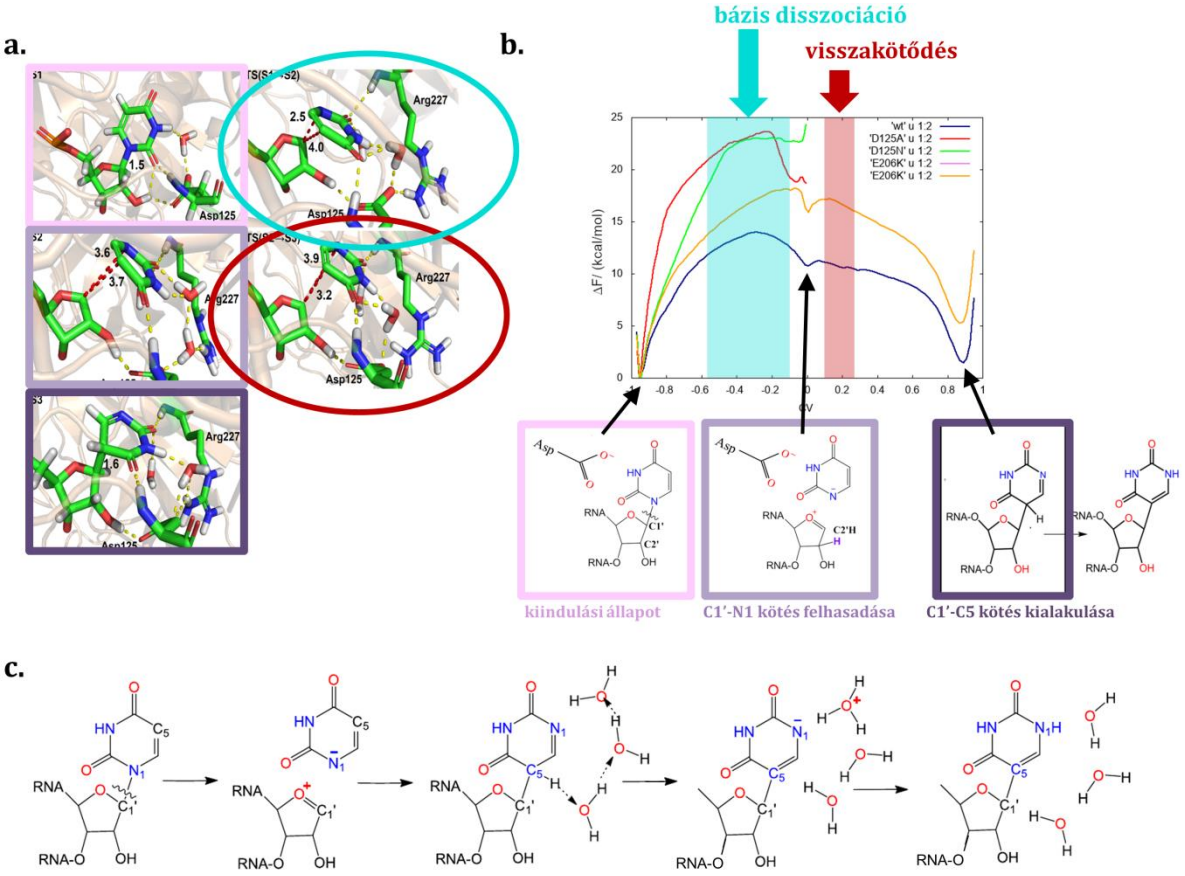
23. ábra. A vezérlő RNS szál két szekvencia-specifikus „horgony”-régiója: a diszkerin PUA domén (zöld) és az Nhp2 fehérje (kék).

A PSU katalitikus reakciójának mechanizmusát is vizsgáltuk. A pszeudouridilációs reakció első lépése a glikozidos C1′-N1 kötés felhasadása, ezt követi a szabaddá vált bázis elfordulása és az új C1′-C5 kötés kialakítása. A reakció formális leírását egy protonátadási reakció zárja. A

reakciómechanizmus részletes vizsgálatát kis modellrendszereken végzett egyszerű sűrűségfunkcionál számításokkal (QM) kezdtük, és megmutattuk, hogy a bázis lehasadása vagy megelőzi a C2′ deprotonálódást, vagy teljesen deprotonálódási lépés nélkül zajlik. A számítások alapján kizárhatóak voltak a korábban javasolt Michael-addíciós és acilálási mechanizmusok. Az irodalomban javasolt számos mechanizmus közül végül a glikál mechanizmusra fókuszáltunk, mert ezt kísérleti eredmények is alátámasztották, a TruB és RluA PSU enzimek esetében: kinetikus izotóp-effektus méréseket végeztek a fiziológiás szubsztrát jelenlétében és egy olyan mechanizmust javasoltak mely szerint a ribóz glikozidos kötésének felszakadása és a C2′ atom sebesség-meghatározó deprotonálódása egy glikál intermedier kialakulásához vezet[70]. A glikál intermedier planáris jellege miatt a cukor C1′-C2′ közötti kettős kötése mindkét oldalról támadható: ennek szép illusztrációja, hogy TruB / 5-fluoro-uridin komplex kristályszerkezetekben a fő ribo- termék mellett arabino-sztereokémiájú melléktermék is megjelenik. A fiziológiás U szubsztrát esetében azonban csak a ribo termék képződik, ami arra utal, hogy a fluor-szubsztituens jelenléte alapvetően megváltoztathatja a reakciómechanizmust.

A kis modellrendszeren végzett QM számítások tehát a glikál mechanizmust valószínűsítették, azonban a mechanizmus részleteinek felderítése csak a teljes rendszer figyelembevételével volt valószerűvé és relevánssá tehető. Ezért a vázolt reakcióút mentén, klasszikus MD szimulációkkal generált kiindulási modelleket felhasználva, QM/MM molekuladinamikai szimulációkkal követtük végig a reakciót, különösen annak első mozzanataira fókuszálva. Molekuladinamikai szimulációkat fokozott mintavételi módszerekkel és hibrid QM/MM potenciál alapú módszerekkel már 2000es évek eleje óta sikeresen alkalmaznak a DNS-t és RNS-t tartalmazó komplex rendszerek tanulmányozására, de egy olyan nagy rendszer modellezése, mint a teljes H/ACA PSU, még ma is kihívást jelent. A QM régió a szubsztrát uridint, a szomszédos nukleotid foszfátcsoportjával, az D125 oldalláncát, egy vízmolekulát és az azt koordináló Y153 oldalláncát foglalta magába. A QM, valamint a QM/MM metadinamika és esernyő-mintavételezési számításokat Dr. Kiss Dóra Judit végezte, további szerzőtársaim és jómagam a modell-alkotásban és az eredmények kiértékelésében vettünk részt. A szimulációk során egy olyan mechanizmus rajzolódott ki, melynek első – bázis-disszociációs - lépése egy olyan elrendeződéshez vezet, amelyben a bázis a cukorról való lehasadásával egy időben el is fordul, méghozzá úgy, hogy a C5 atomja kerül a cukor C1’ atomjának közelébe. A visszakötődés és a C1’-C5 kötés kialakulása ebből a sekély szabadenergia-minimumból kiindulva nagyon kis energiagáton való átkelést követel csak meg. A QM/MM metodológiát alkalmazva is azt találtuk, hogy míg a wt rendszer esetében a kiindulási komplexben az U feszült konformációban ékelődött a diszkerin aktív zsebébe, a vizsgált inaktív mutáns enzimek (diszkerin^{D125A}, diszkerin^{D125N} és diszkerin^{E206K}) egyikében sem volt ez megfigyelhető, sem pedig a Ψ-t tartalmazó termékállapotú komplexben. A bázis-disszociáció a wt komplexben 14 kcal/mol-os gát mellett zajlik. Ezzel szemben a vizsgált mutációk nagyon megnövelik ennek a lépésnek a gát-magasságát, ami ezeknek a rendszereknek esetében valószínűtlenné teszi a reakciót, összhangban kísérletileg megfigyelt inaktivitásukkal (24. ábra). Az eredmények arra utalnak, hogy az box H/ACA PSU enzim a szubsztrátkötési konformáció torzításával destabilizálja a kiindulási állapotot, így könnyítve meg a C1′-N1 kötés felhasadását. A bázis visszakötődését követő tautomerizációra vonatkozóan magas energiagáttal rendelkező reakció-utakat találtuk csak, amikor azt az aktív helyen belül modelleztük. Ez a térben korlátozott kötőzsebnek tulajdonítható, ahol a vízmolekulákkal kialakított és a bázis C5 és N1 atomjai közötti protonátvitelhez szükséges proton-továbbítási láncolat nem tud könnyen összerendeződni. Ennek a megfigyelésnek alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy egy nyitottabb, a víz számára jóval hozzáférhetőbb aktív hely szükséges e lépés megkönnyítéséhez. Ezért a mechanizmus utolsó lépéseit modellszámításokkal vizsgáltuk a vízben szolvatált QM régióra. Azért választottuk ezt a megközelítést, mert nem sikerült a QM/MM környezetben megbízhatóan modellezni egy olyan részben nyitott fehérje-konformációt, ahol elegendő hely állt

volna rendelkezésre a protonátvitelhez. A tautomerizációs folyamatra így számított energiaprofil tehát egy szélsőérték. A szabadenergia-szimulációk feltárták, hogy a C5-H víz általi deprotonálódása megelőzi az N1 protonálódását. Az első lépés tehát egy deprotonált bázist és egy labilis $H3O^+$ speciest tartalmazó állapothoz vezethet. Az esernyő-mintavételezés 18,9 kcal/mol-s gátat jósolt ehhez a lépéshez. Ez a szintén nagyon magas érték a töltések mozgása miatt drasztikusan megváltozott elektrosztatikus környezettel hozható összefüggésbe. Innen a termékállapot - gyakorlatilag akadály nélkül - érhető el. A teljes reakció a várakozásoknak megfelelően exergonikus, és a teljes szabad energia nyereség közel 9 kcal/mol. Az eredmények tehát alátámasztották azt az elképzelésünket, hogy a termékképződést a komplex szerkezetének fellazulása – vagy felnyílása - kíséri, ami tágasabb kötőzsebet eredményez a katalitikus folyamat utolsó lépéseihez és előkészíti a termék kilépését az aktív helyről (24. ábra).

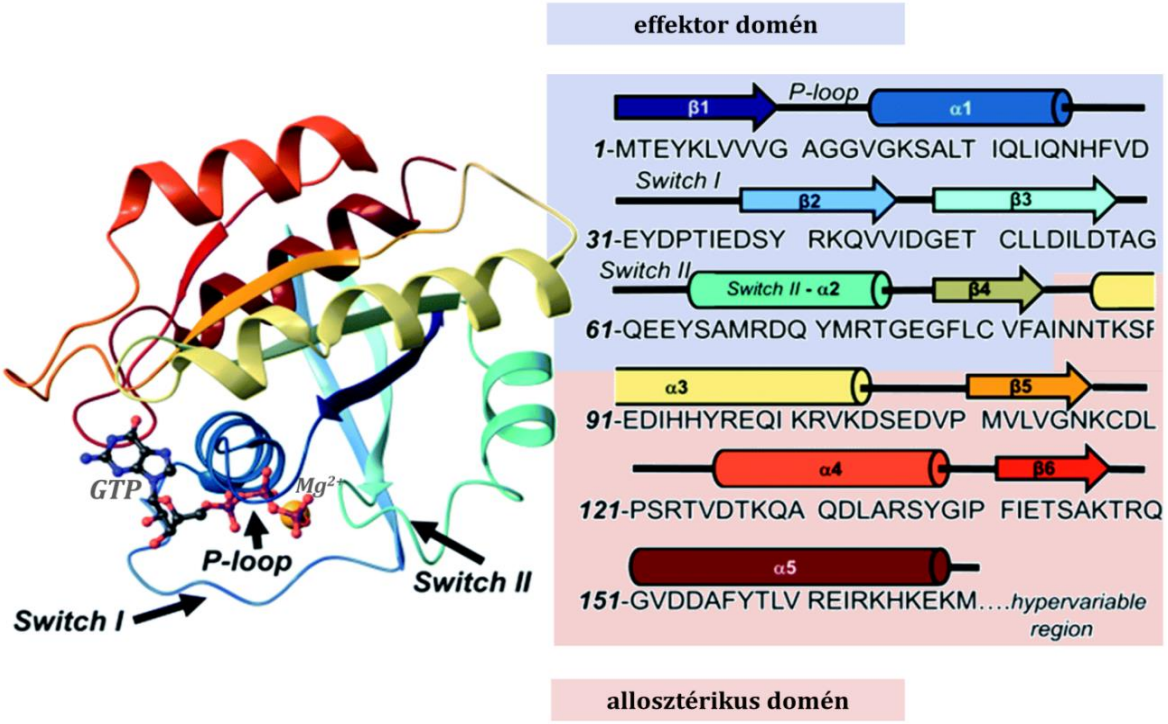


24. ábra. a.) A mechanizmus első felének (bázis-disszociáció, átfordulás és visszakötés) kritikus pontjai és **b.)** az átalakulást leíró energiaprofil (azonos séma szerint színezve). **c.)** A teljes mechanizmus általunk javasolt lépései.

A pszeudouridináz ribonuleo-protein komplexszel kapcsolatos számításaink első felében megmutattuk, hogy az diszkerin/Nop10 határfelületen megjelenő betegség-okozó mutációk az enzim aktív helyén szerkezeti változásokat indukálnak, ezáltal csökkentik annak pszeudouridilációs hatékonyságát, amely a riboszóma tökéletlen összeszerelődését és hibás működését vonhatja maga után. Szerkezeti elemzésünk és reakciómechanizmus-számításaink azt mutatják, hogy az U → Ψ átalakulás kulcslépése az izomerizálandó uridin pozícionálása az enzimkomplexum zsúfolt katalitikus zsebében, hogy a reakciót inicializáló konformációs feszültség kialakulhasson. Ennek elérése érdekében a vezérlő és a szubsztrát RNS között szoros kötődés kell, hogy kialakuljon, a szubsztrát felismerés azonban a központi ~ 12 bázis-pár hosszúságú szakaszra korlátozódik. Így, bár még sok a tisztázandó részlet, eredményeink a box H/ACA PSU-k eddig kiaknázatlan terápiás potenciáljára is ráirányítják a figyelmet.

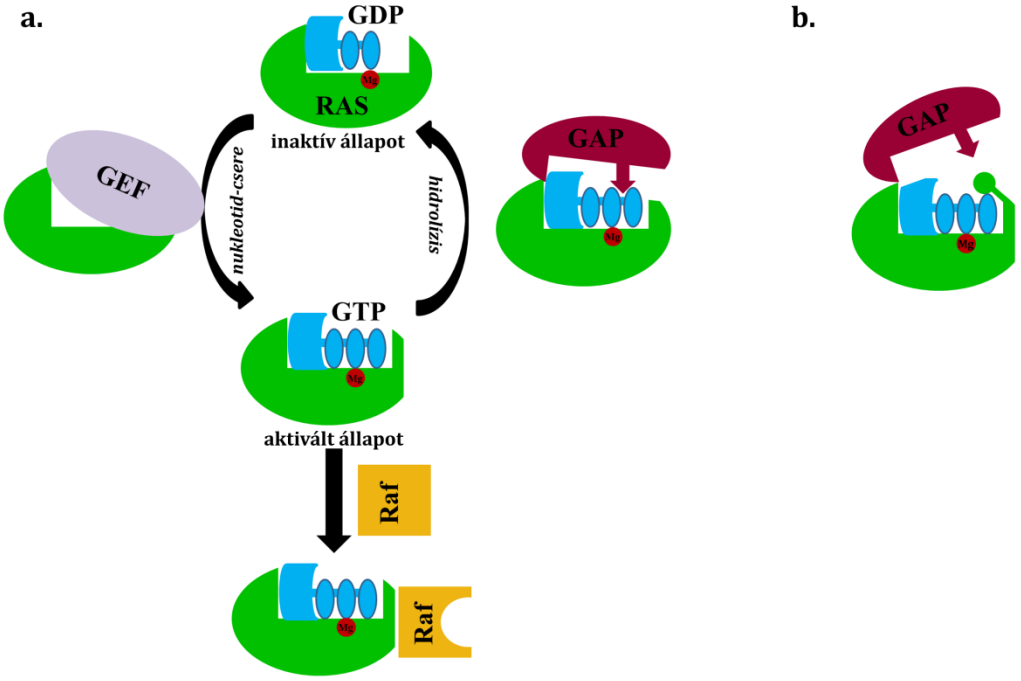
3.3 Onkogén mutációk hatása a K-Ras szerkezetére és dinamikájára [S9-S12]

A Werner H. Kristenről elnevezett Kirsten Ras (K-Ras) az egyik leggyakrabban mutálódó onkoprotein: az emberi rákos megbetegedések ~15%-ában megjelenő mutációi gyakran kísérik vastagbél-, hasnyálmirigy- és tüdőrák kialakulását[71]. Molekuláris kapcsolóként működik, amely a sejtnövekedéssel és a proliferációval kapcsolatos útvonalakat szabályozza. A K-Ras a membrán lokalizált kis GTPázok Ras alcsaládjának tagja, többek között a H-Ras és az N-Ras fehérjékkel együtt. A Ras-ok együttesen a rákos megbetegedések közel 20%-áért felelősek. A Ras-ok felépítése egységes; egy guanozin nukleotid-kötő katalitikus domént (vagy G-domént) és egy rövid hipervariábilis régiót (HVR) tartalmaznak. A G-domén egy Rossmann-fold szerkezet, amely további két jól elkülönülő részre oszlik: az effektor és az allosztérikus régiókra. Az effektor régió kommunikál a downstream partnerekkel, míg az allosztérikus régió a membrán felé nyúlik, és a membránhoz kapcsolódó HVR szegmensben végződik, amely a Ras fehérjét a membránhoz horgonyozza prenilációt (vagy farnezilációt, palmitoilációt) követően (25. ábra). Az egyes Ras-fehérjék közti különbségek leginkább a HVR-ben találhatók (a K-Ras4A, K-Ras4B, H-Ras és N-Ras HVR szekvencia hasonlósága ~8%, míg az effektor régiók teljesen azonosak).



25. ábra. A K-Ras G-domén felépítése és tagozódása

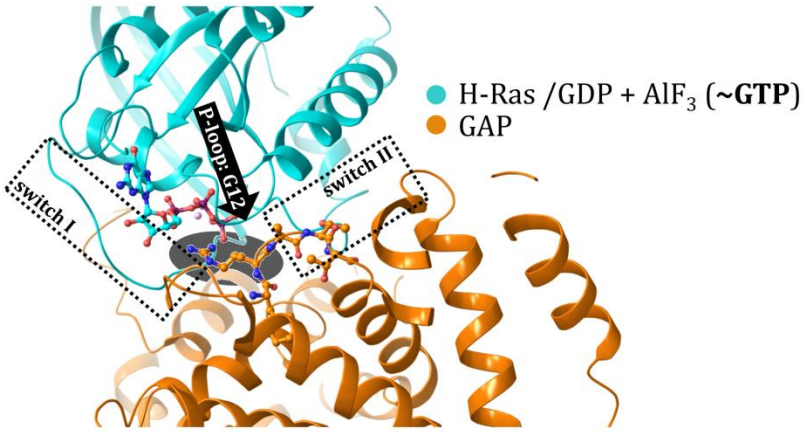
Az effektor régióban található effektor- és nukleotidkötő helyek részben átfednek, a switch I-nek (I. kapcsolónak) nevezett hurok ellentétes oldalain helyezkednek el. A nukleotid koordinálásában a foszfátkötő P-hurok és egy további kapcsoló-hurok, a switch II, vesz még részt, valamint az allosztérikus régió nukleobázis-kötő hurkai. Így a rövid és meglehetősen merev P-hurkot leszámítva az enzim katalitikus helyét elsősorban rugalmas szegmensek alkotják, amelyek - a nukleotiddal való közös asszociációjuk révén - az egyes régiók közötti kapcsolatot is megteremtik. A P-hurok egy másik szempontból is igen jelentős: a K-Ras onkogén mutációinak több mint 80%-a ennek a szegmensnek a G12 pozíciójában fordul elő, ahol a három legfontosabb mutáció a G12C, a G12D és a G12V (az összes betegségokozó G12 mutáció 16%-a, 40%-a és 26%-a)[S10].



26. ábra. A Ras katalízis szempontjából jelentős állapotai. a.) A katalitikus ciklus. **b.)** Az onkogén mutációk megakadályozzák a GAP kötődését és így az aktivált állapotba „fagyasztják" a katalitikus ciklust.

A Ras-fehérjék a receptor-tirozin-kináz jelátviteli útvonalakhoz rendelt molekuláris kapcsoló funkciójukat GDP-kötött inaktív és a GTP-kötött aktív állapot között váltakozva töltik be. A GTP-kötött aktív formában számos effektor molekulával, köztük a Raf, PI3K, Tiam1, RalGDS és PLCk-kel lépnek kölcsönhatásba. Bár a Ras-fehérjék rendelkeznek mind belső nukleotidcsere-kapacitással, mind pedig GTPáz-aktivitással, egyik funkciójukban sem hatékonyak, ezért a Ras-ciklust guanin-nukleotidcsere-faktorok (GEF-ek) és GTPáz-aktiváló fehérjék (GAP-ok) segítik és modulálják. A GEF-fehérjék, mint például az SOS, elősegítik a GDP GTP-re történő cseréjét, ami a Ras aktiválódását eredményezi. A GAP-ok a Ras-fehérjéket a GTP-hidrolízis sebességének jelentős fokozásával inaktiválják (26. ábra). A Ras onkogén mutációi nem okoznak jelentős szerkezeti változást, de gátolják a GAP-okkal való kölcsönhatást (26b. és 27. ábrák), és gyakran az önálló (intrinzikus) GTP-hidrolízis hatékonyságának csökkenését is okozzák, meghosszabbítva az aktív Ras forma élettartamát – azaz megakadályozzák például a növekedési jel kikapcsolódását, ami így proliferációhoz vezet[S10].

A Ras-ok funkció szempontjából jelentős partnerei tehát fehérjék, kölcsönhatásaikat - a nagyszámú Ras kristályszerkezet és NMR vizsgálat tanúsága szerint - leginkább a kapcsoló- vagy switch-hurkok alakítják, belső szerkezetük a katalízis során nem változik lényegesen. Ez azt jelenti, hogy a Ras fehérjék aktív helyei valójában kiterjedt, sekély és fluktuáló fehérje-fehérje kölcsönhatási (PPI: Protein-Protein Interaction) felszínek, melyek még az onkogén mutációk hatására sem változnak meg jól karakterizálható módon: így gyógyszertervezési szempontból igen nagy kihívást jelentenek a Ras célpontok. Ezért is nagyon fontos, hogy szerkezetüket, dinamikai sajátságaikat, tranziensen megjelenő átmeneti állapotaikat minél több megközelítésben és változatos módszerekkel vizsgáljuk, mert csak így lehet remény arra, hogy olyan mutáció-szenzitív viselkedést, vagy potenciális kötőhelyeket fedezünk fel, melyek specifikus és hatékony gyógyszermolekulák tervezéséhez vezethetnek. Jelenleg a gyógyászati

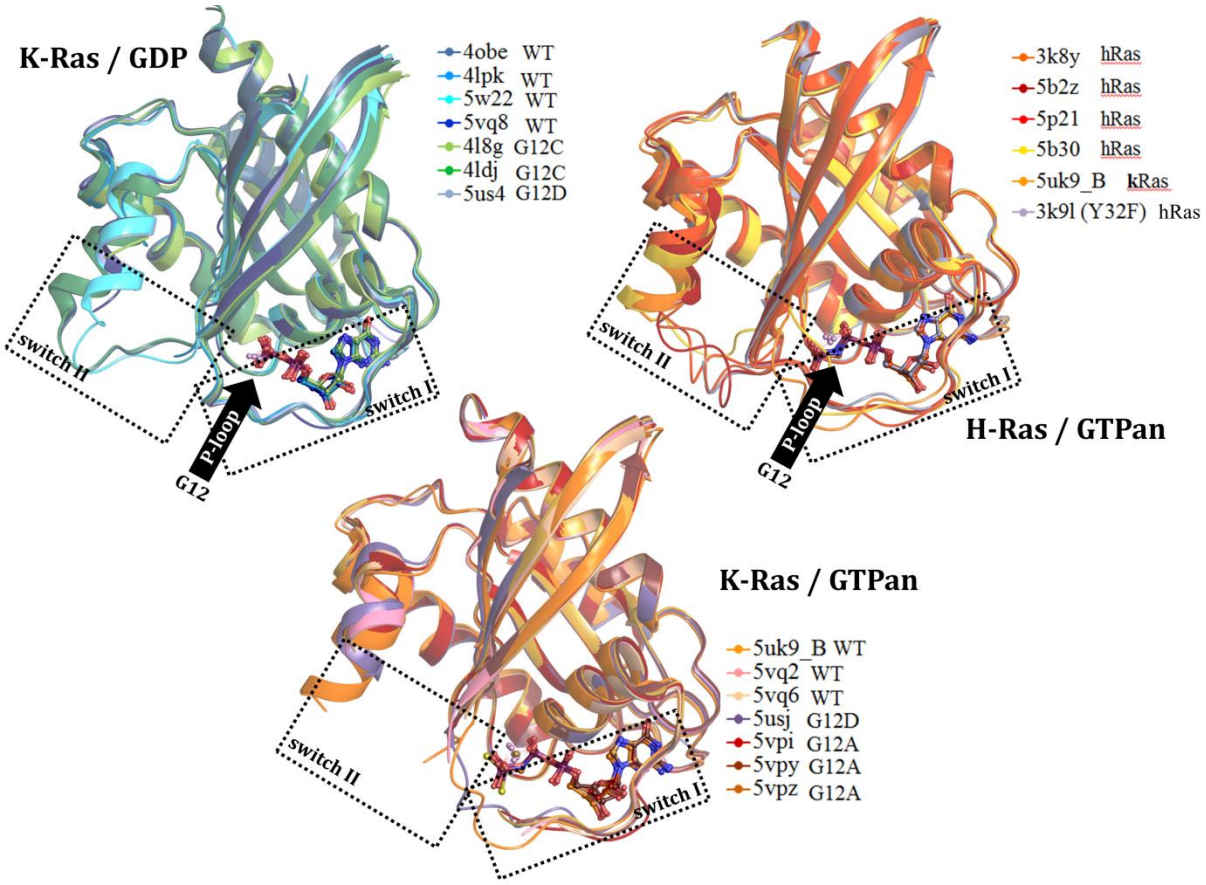


27. ábra. A GAP (GTPáz-aktiváló fehérje) funkciója. Az R789^{GAP} oldalláncot (szürke ovális) az Ras aktív hely közvetlen közelébe pozícionálva a GAP elektrosztatikus stabilizációt szolgáltat a GTP hidrolíziséhez. A szomszédos P-hurok 12-es pozíciójában megjelenő (a wt glicinnél feltétlenül nagyobb térigényű) oldalláncok ezt a szoros Ras/GAP illeszkedést gátolják és így lassítják az inaktiválódást. Az ábra látható modell az 1wq1[72] kristályszerkezet alapján készült, ahol a GTP-t (hogy annak hidrolízisét elkerüljék, de a helyigényét és elektrosztatikus potenciálját reprodukálják) a GDP-AlF_3 párossal helyettesítették.

gyakorlatban csak olyan K-Ras gyógyszerek szerepelnek, melyek a G12C variáns C12 aminosavához kapcsolódnak kovalensen (adagrasib[73] és sotorasib[74]), ezekről azonban sajnos kiderült, hogy alkalmazásuk rezisztencia-mutációk megjelenéséhez vezet, és így nagyon hamar elvesztik hatékonyságukat[75]; alkalmazásuk más terápiákkal kombinációban (farnezilgátlók, vagy a foszforilációt szabályzó enzimeket gátló szerek) lehet talán majd hatásos[76].

K-Ras-al kapcsolatos első vizsgálataink során a GDP-kötött nyugalmi (vagy inaktív) állapot és a GTP-kötött aktivált forma közti különbségek jobb megértésére fókuszáltunk, a wt és a leggyakrabban előforduló G12C és G12D variánsok esetében, amelyek különbözőképpen befolyásolják a belső hidrolízis sebességét: míg a G12C csak mérsékelten, a G12D súlyosan korlátozza a GTP hidrolízist. Így ennek a három rendszernek az összevetése ideális keretrendszert szolgáltatott az inaktiválódás mechanizmusának vizsgálatához és az azt befolyásoló szerkezeti tényezők azonosításához.

A Ras aktiváció/inaktiváció szerkezeti elemzése közismerten nehéz. A rendelkezésre álló nagyszámú röntgenszerkezet és az alapos NMR-vizsgálatok ellenére a switch régiókban végbemenő konformációs átrendeződések értelmezését több tényező is nehezíti. Egyrészt a kristályszerkezetek nem nyújtanak ezekről a régiókról egyértelmű képet, mivel a flexibilis switch I és switch II szegmensek gyakran kristálykontaktusok által formáltak és a kristályon belül korlátozott mozgékonyságúak, vagy, ha nincsenek ilyen kontaktusok, egyszerűen hiányoznak az elektronsűrűség-térképekről (28. ábra). A GTP-kötött aktív formára vonatkozó adatgyűjtést a nukleotid hidrolízise bonyolítja. Ennek elkerülése érdekében a legtöbb esetben GTP-analógokat használnak a kísérletek során, de ezek másképp viselkednek, mint maga a GTP[77]. A Ras-GTP komplexek NMR-alapú szerkezeti jellemzését a switch régiók flexibilitásából eredő közepes időskálájú mozgásokhoz köthető NMR-jelkiszélesedés nehezíti, amely pont a legérdekesebb régiókhoz tartozó jelek kiszélesedéséhez vagy elvesztéséhez vezethet. Így továbbra is nyitott kérdés, hogy milyen konformáció-változások hozzák létre az aktiválódást, az aktivált állapot mely jellemzőit ismerik fel a downstream partnerek és melyek az inaktiválás konformációs kritériumai.



28. ábra. Ras enzimek kristályszerkezeteinek összevetése. A switch régiók szerkezeti sokszínűsége a GDP- illetve GTP(analóg)-kötött állapotokban.

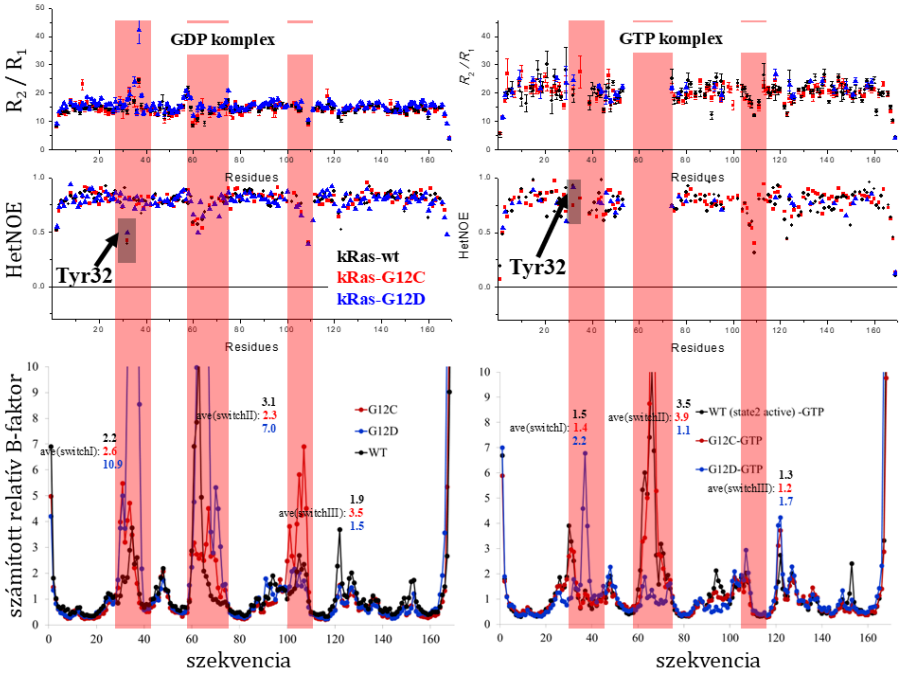
Mi NMR mérésekkel szerettük volna a K-Ras variánsok dinamikai sajátságait tanulmányozni és ehhez a fiziológiás GTP ligandumot terveztük használni (további fehérjepartnerek hozzáadását is elkerülve) – az NMR méréseket Pálfy Gyula (ELTE) végezte és értékelte ki. A mintákhoz EDTA-t adtunk, majd pufferoldattal hígítottuk őket és ezután adtunk GTP-t és Mg^{2+}-t hozzájuk. Az aktivált Ras nukleotid-kötő zsebe a GTP-re optimált, ezért azt jelentősen hatékonyabban is köti, mint akár a GDP-t, akár a nem-hidrolizálható GTP-analógokat, így az EDTA hozzáadásával inicializált nukleotid-destabilizációt követően GTP-t alkalmazva teljessé válhat a nukleotidcsere és homogén minta áll elő.

Először a K-Ras wt, G12C és G12D variánsok GDP komplexének (stabil és korábban már meghatározott és hozzárendelt) $^{1}H,^{15}N$-HSQC spektrumát rögzítettük (GDP-jelkészletet). A ~ 20-szoros feleslegű GTP hozzáadásakor a GDP-jelkészlet mellett egy új mintázat (K-Ras/GTP: GTP-jelkészlet) megjelenését detektáltuk. A mintákat 3 napig inkubálva majd újra megmérve az eredeti, GDP-jelkészlettel jellemezhető, homogén állapotot kaptuk vissza, ami igazolta a K-Ras-hoz kötött GTP GDP-vé történő hidrolízisét a K-Ras önálló GTPáz aktivitásán keresztül.

NMR-dinamikai méréseket is végeztünk; az ezekhez használt mintákhoz Mg^{2+} mellett igen nagy (~100-szoros) feleslegben adagoltunk GTP-t. Az ekkor mért $^{1}H,^{15}N$-HSQC spektrumok csak a GTP-jelkészletet tartalmazták és 3-4 napig stabilak maradtak. Ezzel a módszerrel a nem-prolin jelek ~80%-át azonosítani tudtuk mindhárom rendszer esetében, amely az eddigi legteljesebb jellemzését szolgáltatta a GTP-kötött formának. A $K\text{-}Ras^{G12C}$/GTP esetében például, a P-hurok és a switch I eddig nem észlelt jeleit (G10, C12, G13, K16, I21, V29, Y32, T35, S39, Y40, R41) tudtuk azonosítani, bár néhány esetben a rezonancia még mindig túl széles volt ahhoz, hogy az oldalláncok kémiai környezetéről információt nyerjünk. A K-Ras GTP-hez kötött formájának

rezonancia-hozzárendelését tovább bonyolítja, hogy azt valójában két forma – 1. és a 2. állapot (state 1 és state 2)- konformációs egyensúlya képezi. A két forma közötti fő különbség a switch I régióban jelentkezik, amely az 1. állapotban leválik az aktív centrumról, egy GTP-kötött, de inaktív konformert eredményezve. A közelmúltban megmutatták, hogy az 1. és a 2. állapot relatív populációja mutáció-érzékeny, például az onkogén G12D mutáció az egyensúlyt az aktivált 2. állapot felé tolja el[74]. A két állapot között zajló lassú csere a mi $^{1}H,^{15}N$-HSQC spektrumainkban néhány alacsony intenzitású azonosítatlan csúcs formájában jelentkezett. A GTP-hez kötött formákkal ellentétben a GDP-hez kötött állapotok $^{1}H,^{15}N$-HSQC spektrumában nem tapasztaltunk súlyos vonalkiszélesedést, ami mindhárom változat esetében lehetővé tette a nem-prolin-aminosavak 98-99%-ának jelhozzárendelését.

A spektrális sűrűségfüggvények analízise és hetNOE mérések eredményei alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy a K-Ras fehérjék gyors mozgást végző (ns-ps időskála), kiemelten flexibilis régiói a switch II (60-65), 104-111 és 122-125 szegmensek mind a GDP-mind a GTP-kötött forma esetén, és ezen a mintázaton az onkogén mutációk megjelenése sem változtatott. Egy határozott eltérést találtunk az inaktív és az aktivált komplexek közt, ez pedig a switch I közepén található Y32 aminosav mozgékonyságában mutatkozott. A GDP-komplex esetében az Y32 a környező aminosavaknál és az átlagnál is jelentősen mozgékonyabb, míg a GTP-kötött állapot esetében pont az ellenkező tapasztalható (29. ábra).



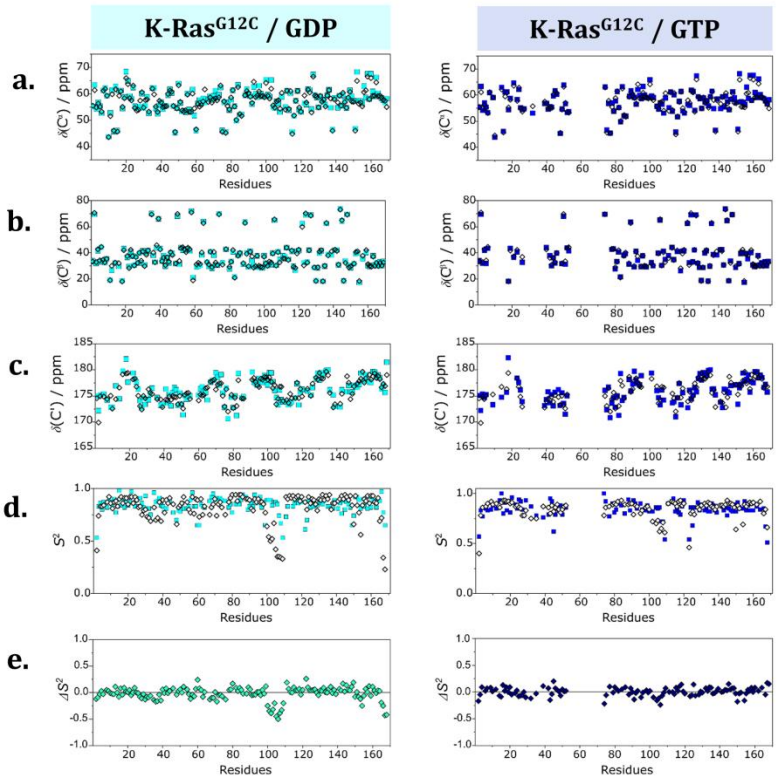
29. ábra. A K-Ras wt, G12C és G12D variánsok NMR mérésekből és az MD szimulációkból származtatott mozgékonyságának összevetése. Pirossal a switch régiókat jelöltem. A mérések (felső két sor), és a számítások (alsó panelek) hasonló mozgékonyság-mintázatot mutattak mind a GDP-, mind pedig a GTP-komplexek esetében. A fekete pontokkal jelölt adatsorok a wt, a piros a G12C, a kék a G12D K-Ras rendszerekre vonatkoznak.

A Y32 oldallánc hatásának tisztázására létrehoztunk egy kettős mutáns rendszert, a G12C/Y32F variánst és összehasonlítottuk a kémiai eltolódásait ($^{1}H,^{15}N$-HSQC spektrumok) a G12C rendszerével, mind GDP-, mind GTP-kötött állapotban. A GDP-hez kötött forma esetében az Y32F csere lokális változásokat okozott csupán, a kémiai eltolódás értékek kevesebb, mint 20%-a változott meg, míg a GTP-komplex esetében a jelek 50%-a mozdult el eredeti pozíciójából és ezekben a változásokban a switch I-től távol eső, a K-Ras ellentétes oldalán lehelyezkedő aminosavak is érintettek voltak. Ez arra utal, hogy az Y32 hidroxil csoportja fontos szerepet tölt be a GTP-kötött aktív forma stabilizálásában. Hasonló következtetésre jutottak Buhrman és munkatársai a wt H-Ras esetében, ahol az Y32F mutáció több mint 2-szeres csökkenést

eredményezett a GTP hidrolízis sebességében - így a katalitikusan kompetens forma destabilizációjához vezetett. Nem-hidrolizálható GTP analóg (GppNHp) jelenlétében kristályosított komplexben az Y32F variáns F32 oldallánca a switch I hurok belseje felé mutat, az 1. inaktív állapotra vagy a GDP-kötött állapotra emlékeztető konformációban, míg a wt H-Ras esetében az Y32 a switch I ellentétes oldalán a GTP-analóg terminális γ-foszfátja közelébe rendeződik[79].

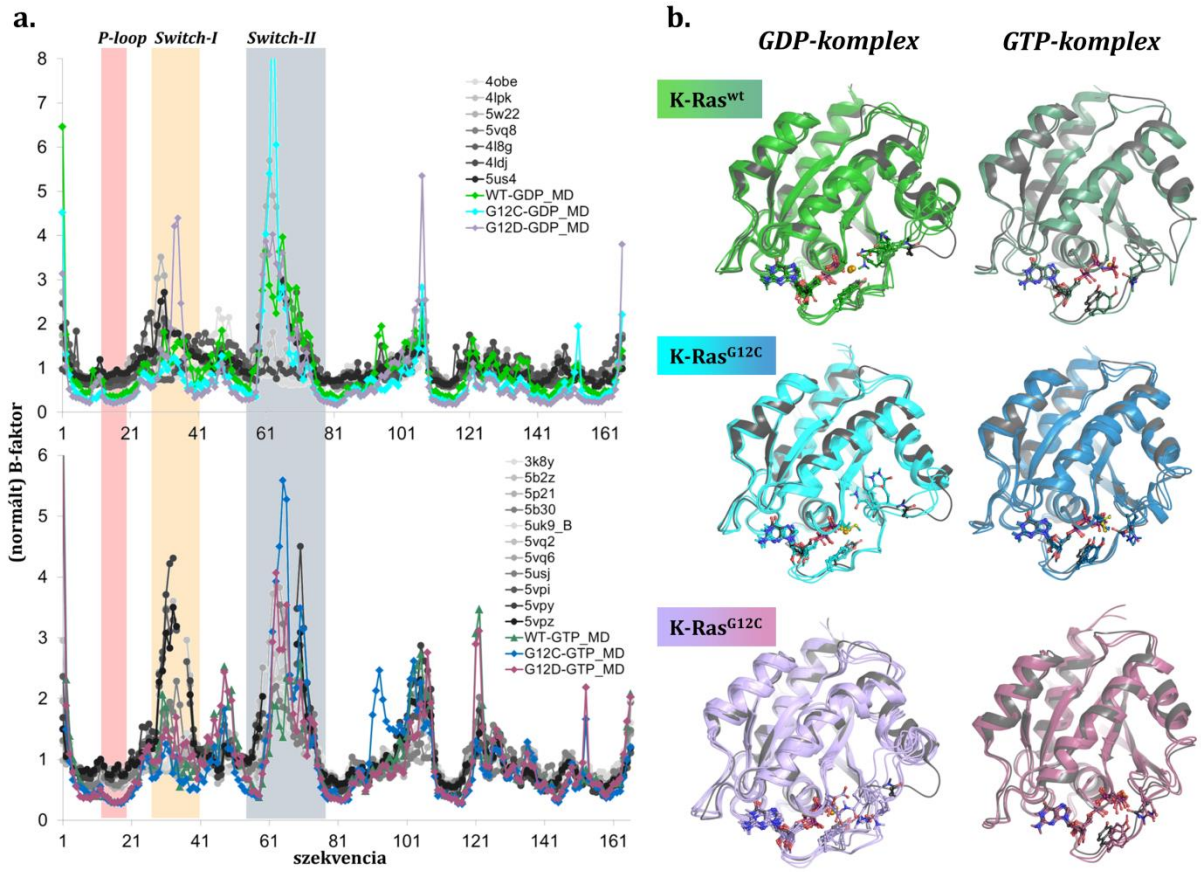
Az Y32 a Ras-fehérjék aktív, GTP- kötött formáiban felvett konformációjával kapcsolatban kevés kísérleti információ áll rendelkezésre, mert a GTP hidrolízise az aktivált forma elemzését ellehetetleníti. A H-Ras/GTP komplex kristályszerkezetét egy huszonöt évvel ezelőtt megjelent elegáns tanulmány írta le elsőként. A szerzők egy csapdázott GTP-származékot (R-1-(2-nitrofenil)-etil-GTP-észter) használtak, amelyből besugárzással szabadították fel a GTP-t a kristályrácson belül. Ez a szerkezet azonban egy sajátos artefaktum miatt mégsem tisztázta a Y32 aktív, oldatfázisú konformációját. A kristályban minden egyes Y32 a nukleotidkötő hely felé fordul, de nem a saját, hanem a kristály-pakolódás által a közelébe helyezett szomszédos monomer GTP molekulájának γ-foszfátjához koordinálódik, szoros H-híd kölcsönhatást alakítva ki annak O1G atomjával (2,7 Å donor-akceptor atomtávolság mellett)[80]. A közelmúltban a K-Ras GTP-hez kötött formáját is tanulmányozták egy átfogó vizsgálatában, mind wt, mind mutáns változatokat használva, GTP illetve különböző nem-hidrolizálható GTP analógok felhasználásával. Ezekben a kísérletekben a GTP-t (vagy analógját) a GDP-kötött K-Ras előre kialakított kristályaiba diffundáltatták be. Ez a megközelítés azonban nem garantálja a teljes nukleotidcserét. Ennek megfelelően a szerkezetek inkább a GDP-hez kötött formából a GTP-hez kötött formába való átmenetet tükrözik, mintsem a végső stabilizált aktivált állapotot. A switch I és a switch II is destabilizálódott és nagyon rosszul látszódott elektronsűrűségi térképeken. Az Y32 konformációja a nukleotidcsere hatására nem változott, azonban (relatív) B-faktorainak közel 2-szeres növekedése azt jelzi, hogy a nukleotidkötő helytől távoli pozíciója – már akár részleges nukleotidcsere mellett is - destabilizálódik[81]. A GTP-kötött állapotra vonatkozó összes kísérleti úton meghatározott szerkezetet áttekintve az Y32-t három különböző pozícióban találjuk: i) a switch I hurokban marad rögzítve, elsősorban a Y40-el kölcsönhatásban (GDP-komplex-szerű állapot), ii) erről a helyről a GTP γ-foszfátjának közelébe fordul, de az oldószer felé mutat, vagy iii) hidroxilcsoportja közvetlen H-kötést képez a γ-foszfát egyik oxigénjével.

A kérdés tisztázása végett, a K-Ras^{wt}, K-Ras^{G12C} és K-Ras^{G12D} GDP- és GTP-kötött formák közvetlenül összehasonlítható modelljeinek létrehozásához MD szimulációkat végeztünk, kristályszerkezetekből kiindulva. A GTP-kötött állapot modellezéséhez egy olyan szerkezetet választottuk, ahol az Y32 közel van a GTP-hez ugyan, de nem közvetlenül a γ-foszfáthoz koordinált (GTP^{O1G}-Y32^{OH} távolság 4,3 Å). A számított és mért mozgékonyságok jó egyezést mutattak a három vizsgált variáns esetében (29. ábra). Az S^2-értékek és a C', Cα és Cβ kémiai eltolódások összevetését az NMR módszerekkel legrészletesebben vizsgált K-Ras^{G12C} esetében végeztük el, hasonlóan megnyugtató eredménnyel (30. ábra).



29. ábra. A kísérleti és a számított (az MD egyensúlyi sokaságból, illetve a CoNSEnsX+ szerver alkalmazásával számítva) kémiai eltolódások a.) Cα, **b.)** Cβ és (C) **c.)** C') és **d.)** S^2 értékek összehasonlítása, valamint a számított (MD-eredmény) és a kísérleti S^2 értékek (ΔS^2) közötti különbség a K-Ras^{G12C} GDP-kötött (balra) és GTP-kötött (jobbra) formájára. A kísérleti értékeket ciánkékkel és kékkel ábrázoltuk (GDP-, illetve GTP-kötött formák), míg a számított formákhoz tartozó értékeket minden ábrán üres rombuszok jelzik.

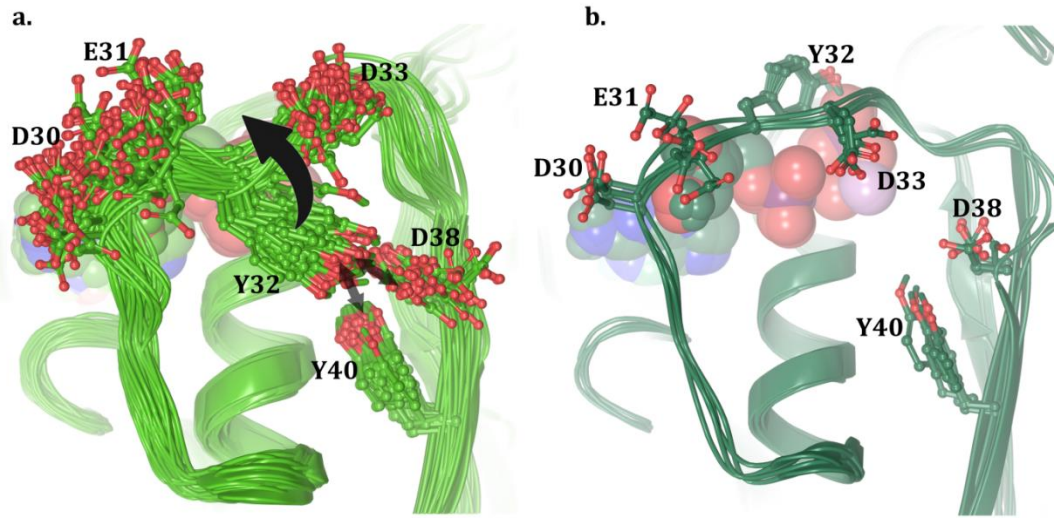
Az MD szimulációkból származtatott atomi mozgástényezők (B-faktorok) és az egyensúlyi szakasz klaszterezése útján meghatározott tipikus konformációk jó egyezést mutattak a különböző Ras kristályszerkezetekkel is (31. ábra), így a számított szerkezeti sokaságokat elfogadtuk a vizsgált rendszerek valószerű modelljeként.



31. ábra. Kristályszerkezetek összevetése az MD szimulációból származó szerkezetekkel. a.) A számított és kísérleti B-faktorok összehasonlítása, illetve **b.)** a szerkezetek összevetése (balra: GDP-, jobbra: GTP-kötött forma; a kiindulási kristályszerkezeteket (4obe, 3k8y) szürkével jelöltem) - az ábra az egyensúlyi trajektória > 90%-át leíró klaszterek középszerkezeteit mutatja (a klaszterezés a főlánc konformáció szerint történt). Az összevethetőség végett min a kísérleti, mind a számított adatsorokat skáláztuk az átlagértékek alapján. Az jobb oldali ábrákon explicit módon megjelenített részletek: GDP/GTP, Mg^{2+}-ion, G12/C12/D12, Y32, Q61.

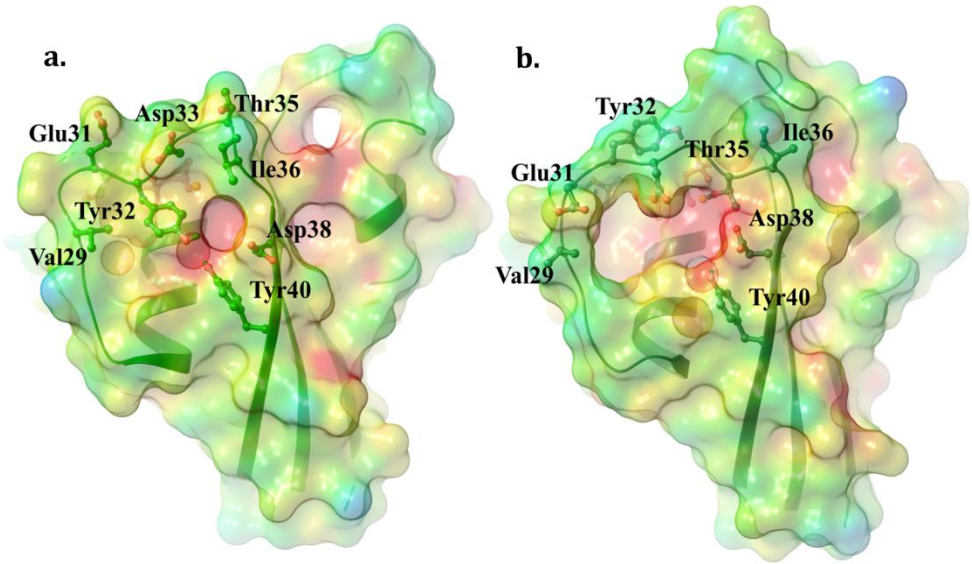
Az NMR mérések során tapasztaltakhoz hasonlóan, a mutációk sem a GDP-, sem a GTP-kötött állapotokban nem okoztak jelentős változást a központi régiójában és feltekeredésében a számított sokaságokban sem. A switch régiók nagyfokú flexibilitása a szimulációkban is tükröződött. A nukleotidcsere hatására jobban meghatározott szerkezetek álltak elő: mind a teljes rendszer, mind pedig switch I régió lokális konformációs heterogenitása jelentősen csökken a GTP-komplexekben (31. ábra).

Mindhárom GDP-komplexben az Y32 a switch I belseje felé mutat és közvetlenül, vagy egy vízmolekulán keresztül, a D38 vagy Y40 oldalláncokkal alakít ki H-híd kölcsönhatást. Ez a hármas, alternáló kölcsönhatás, anélkül, hogy az oldalláncok flexibilitását jelentősen korlátozná, mint egy ajtószárny, elzárja az utat az enzim belsejében található zseb felé, amely a downstream partnerek (effektorok) pozitív töltésű oldalláncait képes felismerni és megkötni (32. ábra). Ebben az elrendeződésben az Y32 amid-hidrogén atomja közel kerül a GDP α-foszfátcsoportjának negatív töltésű oxigén atomjaihoz, és ahogy a switch I fluktuál, az $Y32^{NH}$-$GDP^{O1A/O2A}$ távolságok egy széles tartományon át mozognak (3-7 Å között). Ez a változás, kisebb fluktuációk mellett is, elektrosztatikusan egészen eltérő környezeteket eredményez, míg a szegmens többi aminosavai, melyek inkább az oldószerbe nyúlnak, a konformációváltozások során sem kerülnek nagyon eltérő kémiai környezetbe. Ez lehet az oka annak, hogy a switch I régió flexibilitása (gyors időskálájú mozgása) az Y32-nél volt detektálható: HetNOE mérések eredményei egyértelműen arra utaltak, hogy az Y32 főlánc amid csoportja számos kémiai környezetet mintavételez, sokkal inkább, mint a környezetében található többi aminosav.



32. ábra. A switch I régió számított szerkezete és mozgékonysága a wt rendszer esetében. a.) A K-Ras^{wt}/GDP és **b.)** K-Ras^{wt}/GTP komplexek. Az ábrák az egyensúlyi trajektória > 90%-át leíró klaszterek középszerkezeteit mutatják (a klaszterezés a 10-48 szakasz (kiterjesztett switch I) főlánc konformációja szerint történt). A GDP-komplex esetén 42, míg a GTP-komplex esetében 5 klaszter reprezentálja a szerkezetek >90%-át, azaz az GDP-kötött állapot jóval nagyobb konformációs heterogenitást mutat.

A GTP-komplexek esetében az Y32 az effektor-kötőhelyen belüli pozíciójából az switch I ellentétes oldalára fordul, és közvetlenül a GTP γ-foszfát-csoportjának O1G atomjához kötődik (az Y32^{OH} - GTP^{O1G} távolságok 2,6±0,1Å, 2,6±0,1Å és 2,7±0.4Å a K-Ras^{wt}, K-Ras^{G12C} és K-Ras^{G12D} GTP-komplexek esetében) (32. ábra). Ez is összhangban volt az NMR méréseinkben tapasztaltakkal: a HetNOE és J(ω_h) értékek által jelzett jelentős Y32 flexibilitás-vesztéssel. Ez az új kölcsönhatás a környező aminosavak átrendeződését is eredményezi, a negatív töltést hordozó D30, E31 és D33 oldalláncok az effektorkötő zseb belseje felé, a hidrofób V29, I36 a zseb belsejéből az oldószer felé fordulnak. A GTP-komplexekben tehát az Y32 távollétében megnyíló partner-kötő zseb bejárata tágasabbá válik, és negatív töltésű csoportok ölelik körül (33. ábra), ami a RAS-hoz pozitív töltésű aminosavakon keresztül dokkoló effektor fehérjék kötődését elősegítheti.

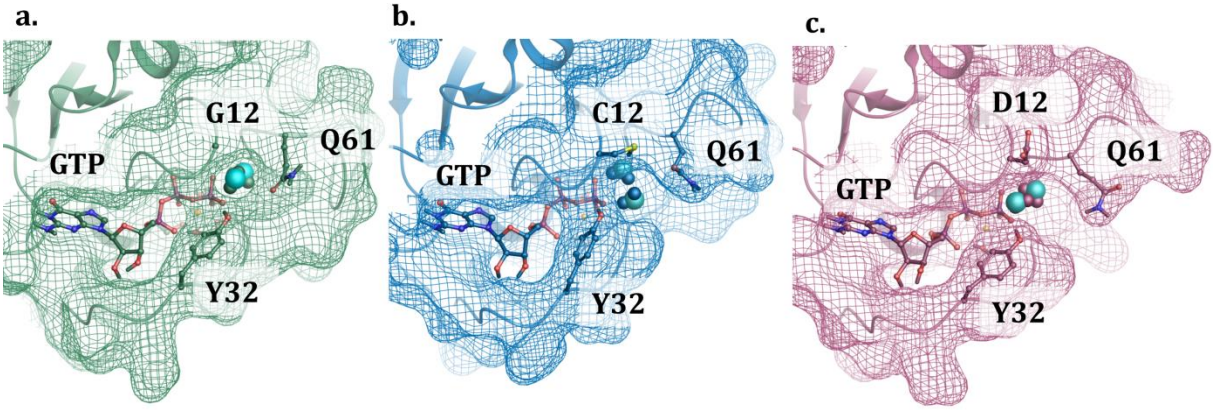


33. ábra. A switch I régió felszínének és elektrosztatikus potenciáljának alakulása az a.) K-Ras^{wt}/GDP és a **b.)** K-Ras^{wt}/GTP komplexek esetében. Piros színnel a negatív töltésű, kékkel a pozitív töltésű régiókat jelöltem.

Az Y32 és a GTP^{O1G} szoros kölcsönhatása egy további jelentős változást is okoz a K-Ras^{wt}/GTP komplex esetében: a katalízishez szükséges vízmolekulák hatékony csapdázódásához is

hozzájárul, azáltal, hogy egy oldószertől szeparált víz-kötő zsebet a „kertel el" a γ-foszfát közelében (34. ábra). Az általánosan elfogadott katalitikus mechanizmus szerint a GTP hidrolízisét két víz segíti: egy nukleofilként szolgáló vízmolekula (katalitikus víz) és egy proton-akceptor, amely bázisként funkcionál[82-84]. A katalitikus víz a GTP γ-foszfát foszfor-atomját támadja meg, amit egy protoncsere lépés követ; a P-O kötés kialakulásakor felszabaduló proton az akceptor-víz (amelyet a Q61 aktivál) közvetítésével a kétszeresen protonált $H_2PO_4^-$ távozó-csoporthoz kerül. A vizeket koordináló kis zseben belül az egyik víz-kötőhely (amely mindárom szimuláció teljes (egyensúlyi) időtartama alatt betöltött) a katalitikus vizet a GTP γ-foszforatomjától 3,3±0,1 Å távolságra pozícionálja. Ez a víz elsősorban a switch II G60 és Q61 aminosavak gerinc amid-csoportjaival alakít ki H-híd kölcsönhatást. A második vízmolekula az elsőtől 2,8±0,1 Å távolságban, a γ-foszfát O1G oxigénje, a $Q61^{OE1}$ atomja és a Y32 hidroxil-csoportja között rögzül, H-kötést képezve ezekkel a centrumokkal a szerkezetek 100% (γ-foszfát O1G), 68,6% ($Q61^{OE1}$), illetve 97,4%-ában (Y32 hidroxil). Így ez a második víz ideális helyzetben van ahhoz, hogy a katalitikus víztől egy protont vegyen át és továbbítsa azt a leváló γ-foszfátnak.

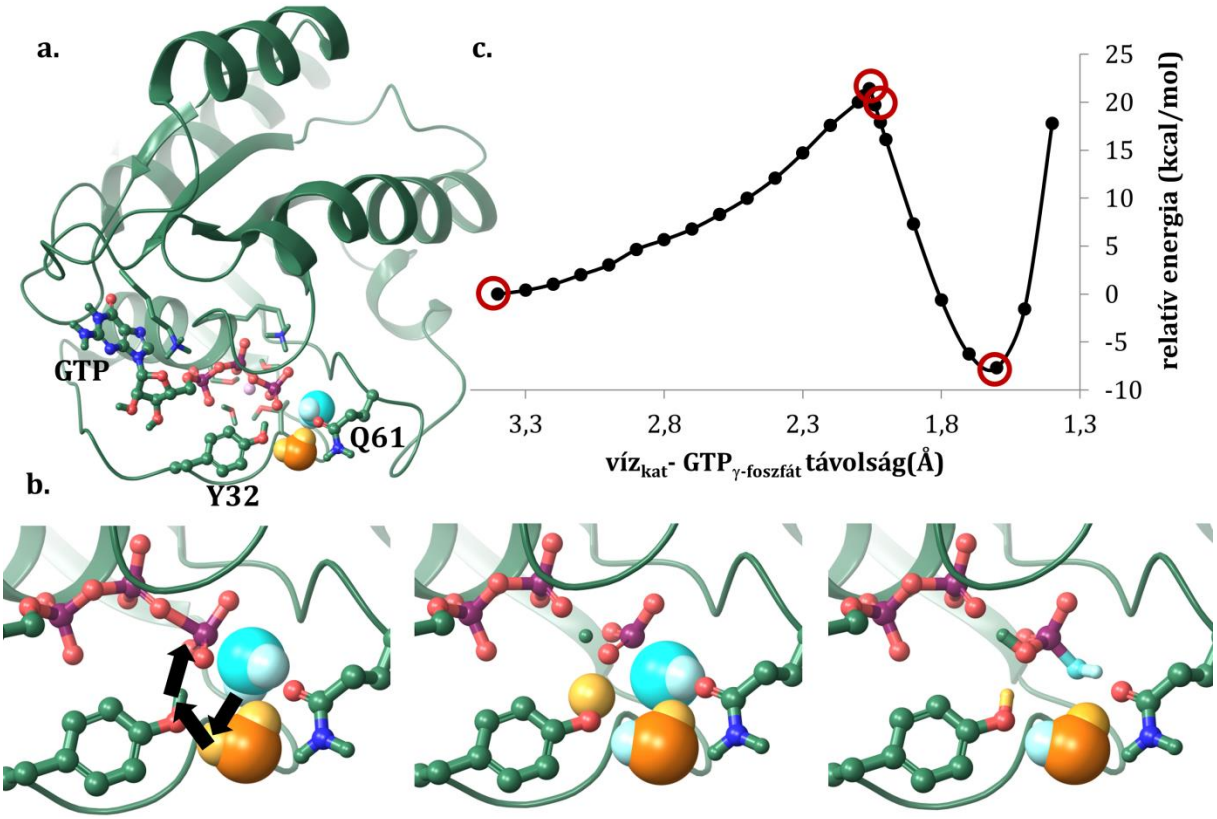
A mutánsok esetében a helyzet kissé eltérő. A 12. pozícióban megjelenő bármilyen oldallánc kiszorítja a Q61 oldalláncot eredeti pozíciójából, amely így ~1 Å-rel eltolódik (a GTP^{PG}-$Q61^{CD1}$ távolság K-Ras^{G12C}/GTP és K-Ras^{G12D}/GTP komplexekben 6,5±0,6Å-ról 7,3±0,7 Å-ra nő), ami a switch II 61-67-es szegmensének átrendeződését váltja ki, megnyitva az aktív hely zsebét az oldószer felé. Mindkét katalitikus vízpozíció betöltött marad a K-Ras^{G12C}/GTP és K-Ras^{G12D}/GTP komplexekben is, azonban folyamatos cserében. A K-Ras^{wt}/GTP rendszer esetében a két vízmolekula az egyensúlyi szakasz több mint 80%-át az aktív hely zsebében tölti, ami ezen vizek esetében a fehérje-atomokéhoz hasonló B-faktorokat eredményez – azaz ezek a vizek a szerkezet részévé válnak. A K-Ras^{G12C}/GTP esetében viszont egy adott vízmolekula által a zsebben töltött leghosszabb időhányad 65,6%, míg a K-Ras^{G12D}/GTP esetében 43,9%. A két mutáns viselkedése között megfigyelhető különbség valószínűleg annak köszönhető, hogy a K-Ras^{G12C}/GTP C12 oldallánca a szerkezetek közel harmadában (32,6%) H-kötést létesít a katalitikus vízzel, ami



34. ábra. A GTP közelében csapdázódott vízmolekulák. Az MD szimulációk során a GTP γ-foszfátja mellett kialakuló víz-kötő zsebek és a csapdázott vízmolekulák elhelyezkedése **a.)** a K-Ras^{wt}, **b.)** a K-Ras^{G12C} és **c.)** a K-Ras^{G12D} rendszerek esetében.

további stabilizációt biztosít számára a zsebben. A K-Ras^{G12D}/GTP komplex D12 oldallánca az oldószerbe nyúlik (a szerkezetek 59,6%-ában a karboxilát résznek nincs egyetlen fehérje-kontaktusa sem) így nem nyújt asszisztenciát a katalitikus vizek csapdázásához (34. ábra). Ezeket az eredményeket összevetve a három forma önálló hidrolízisének sebességével ($6{,}8\cdot10^{-4}$ s^{-1}, $5{,}0\cdot10^{-4}$ s^{-1} és $1{,}9\cdot10^{-4}$ s^{-1} a K-Ras^{wt}, K-Ras^{G12C} és K-Ras^{G12D} esetében)[85], arra következtethetünk, hogy a Q61 aktív centrumtól való eltávolodása és a katalízisben résztvevő vízmolekulák destabilizálódása lehet az oka a katalitikus hatékonyság csökkenésének.

Az aktivált állapothoz alkotott modellünk alátámasztására QM/MM számításokat végeztünk. A GTP-hidrolízist követtük végig – elsőként vizsgálva az aktív hely közelébe horgonyzott Y32 jelentőségét és hatását. A wt H-Ras és a K-Ras enzimek kísérletileg meghatározott belső hidrolízis sebessége $2{,}1\cdot10^{-4}$ s^{-1} és $6{,}8\cdot10^{-4}$ s^{-1} között változik, ami körülbelül 22 kcal/mol aktiválási energiának felel meg. A $K\text{-}Ras^{wt}$ aktív helyének MD szimulációból származtatott elrendezését használva a GTP γ-foszfát foszforatomjához közelítettük a katalitikus vízmolekulát, egyszerű távolság-pásztázást alkalmazva: a $GTP^{PG(\gamma\text{-foszfát})}$- $víz_{kat}{}^{OW}$ távolságot 3.4 – 1.4 Å között léptetve. Az aktivációs energia ebben a modellben 21,4 kcal/mol –nak adódott, 2,06 Å távolságnál, ami egyben a PG-O3B kötés (a γ-foszfátot a GDP törzshöz rögzítő kötés) 1,98 Å-ra való meghosszabbodását is eredményezi. A víz további előretörése hármas proton-átadást eredményezett, ami a $H_2PO_4^-$ távozó-csoport és a GDP különválása által kialakított termékállapothoz vezetett. Az Y32 a proton-transzfer lépésben vesz részt: a katalitikus víz



35. ábra. A GTP hidrolízis QM/MM vizsgálata $K\text{-}Ras^{wt}$/GTP esetében. a.) Kiindulási konformáció melyet az MD szimuláció legnagyobb betöltöttségű főlánc klaszter-osztályának közép-szerkezetéből építettük. Minden olyan vizet megtartottunk, amely bármely fehérjeatom 12 Å-s környezetén belülre esik. A kvantum régiót a teljes GTP, az Mg^{2+} ion, 4 vízmolekula (katalitikus és akceptor vizek, valamint az Mg^{2+} ion által koordinált 2 víz) és a K16, S17, Y32, T35, Q61 és K117 aminosavak oldalláncai alkották. Az MM régiót két részre osztottuk: a 11-40, 55-76 és 117 szegmensek, valamint a GTP és az Mg^{2+} ion által alkotott centrum 6 Å-s környezetén belüli összes víz szabadon mozogtak az optimalizálás során, míg a rendszer többi része kiindulási pozíciójához volt rögzítve. **b.)** A katalitikus átalakulás jelentős köztes állapotai, melyeket a grafikonon ki is emeltünk. A hidrolízisreakciót úgy modelleztük, hogy a katalitikus víz és a GTP γ-foszfát csoportj foszfor atomjának távolságát (OW-GTP^{PG}) 3,4 Å és 1,4 Å között 0,1 Å lépésekben változtattuk (a lépésközt 0,02 Å-ra csökkentettük a TS-szerű szerkezet ±1 Å környezetén belül). **c.)** A távolság-pásztázást többször is megismételtük mindkét reakció-irányban és ezekből szelektáltunk egy minimum energiájú útvonalat a kiindulási és termékállapotok közt. A számításokat B3LYP/LACV3P* szinten, OPLS3-alapú molekulamechanikával kombinálva végeztük.

protonja átkerül az akceptor vízhez, amely viszont protonálja a Y32-t, kiváltva a γ-foszfát Y32-általi protonálását- egyetlen lépésben. QM/MM számításaink tehát azt mutatták, hogy az Y32 közvetlen kötődése a GTP γ-foszfáthoz egy olyan elrendeződést eredményez, amely az enzim GTPáz funkciójával összehangban áll: a feltételezett mechanizmus szerinti, energetikai szempontból is racionális katalízis játszódik le (35. ábra).

Az Y32 katalízist támogató szerepének vizsgálatához egy elméleti (*in-silico*) mutánst hoztunk létre, az Y32-OH csoportját egy hidrogénatomra cserélve, úgy, hogy a rendszer többi részét változatlanul hagytuk. Ez a „nagyon lokális", pusztán számítási mutáció nem okozott jelentős változást a reakcióprofilban (22,1 kcal/mol aktiválási gát adódott ebben az esetben), de kevésbé stabil termékállapotot eredményezett - demonstrálva, hogy a hidrolízis az Y32 távollétében is lehetséges. Az is világosság vált, hogy bár az Y32 hidroxil-csoportja nagyon hasonlóan helyezkedik el, mint a GAP Arg-ujja, amely elektrosztatikus támogatást nyújt a katalízishez és jelentősen felgyorsítja a reakciót, a Y32 esetében ez nem így van; a Y32-GTP kapcsolat jelentősége abban rejlik, hogy olyan helyi környezetet hoz létre, amely megköti és aktiválja a katalitikus és asszisztáló vizeket, és elősegíti a termékképződést.

Munkánk eredményeképp tehát világosabb képet kaptunk a Ras aktiváció folyamatának szerkezeti vonatkozásairól és azokról a fontos konformációs átrendeződésekről, melyek előkészítik az effektor-kötést és jeltovábbítást. Az onkogén mutációkat hordozó állapotok csökkent katalitikus hatékonyságára is találtunk magyarázatot, de azt is megállapítottuk, hogy – mint azt a kísérleti eredmények is bőségesen alátámasztják – a mutációk nem okoznak jelentős, jól megcélozható változásokat a GDP- és GTP-kötött állapotok topológiájában. Ezért a következő kutatásainkban ezeknek az állapotoknak a dinamikai sajátságaira fókuszáltunk.

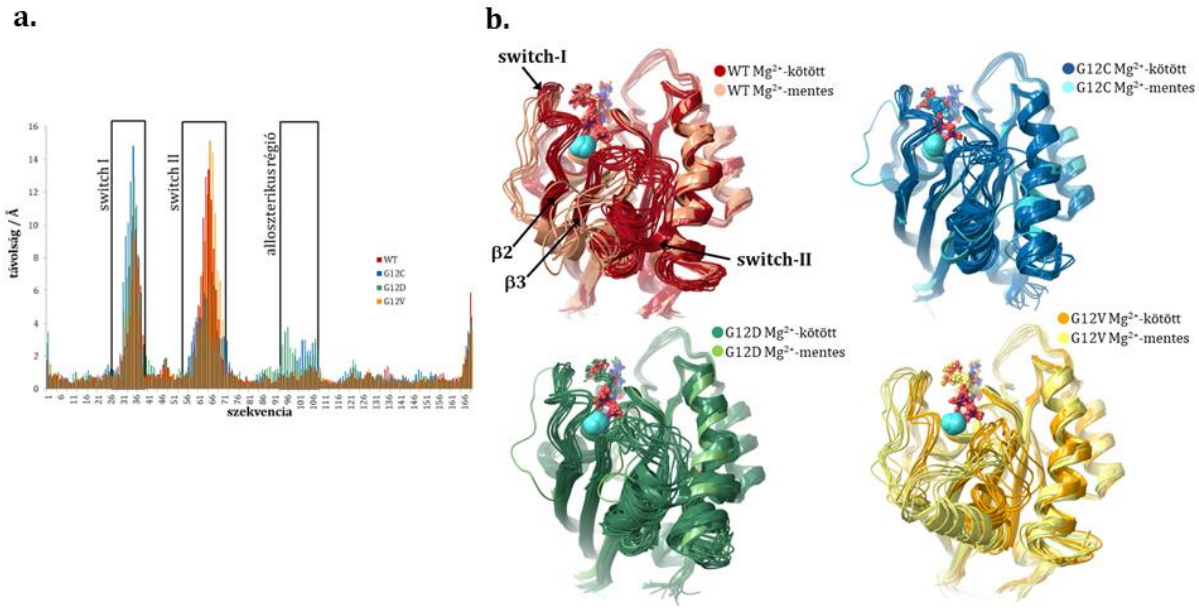
A fehérjék funkcionálisan releváns belső dinamikáját gyakran lassú mozgások uralják, amelyek hozzájárulnak a tranziensen megjelenő kötőhelyek és kommunikációs hálózatok kialakulásához, valamint a kötő régiók képlékenységéhez. Korábbi munkákban a lassú időskálán történő mozgásokat nem vizsgáltuk NMR méréseink során, ezért most ezekre fókuszáltunk és kibővítettük a tanulmányozott rendszerek körét is: a korábban már vizsgált wt, G12C és G12D variánsok mellet a G12V rendszert is vizsgáltuk. Az alkalmazott Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) relaxációs diszperziós és CEST (^{15}N chemical shift exchange saturation transfer) NMR-módszerek biomolekulák ms időskálájú konformációváltási folyamatainak és az alacsony betöltöttségű, közvetlenül nem detektálható gerjesztett állapotainak jellemzését teszik lehetővé, amelyek a legtöbb biofizikai módszer számára láthatatlanok.

A GDP-kötött állapotok vizsgálatakor azt találtuk, hogy a lassú mozgások intenzívebbek a K-Ras^{wt} és K-Ras^{G12D} rendszerek esetén, mint a K-Ras^{G12C} és K-Ras^{G12V} variánsokban. A mozgást két állapotot feltételezve lehetett jól modellezni, amelyek közül az egyik betöltöttsége igen alacsony (1.5-2.8% között mozog), erre az állapotra a minor formaként fogok referálni. A két állapot közti kicserélődés a K-Ras^{G12D} variáns esetében a leggyorsabb és a K-Ras^{G12C} forma esetében a leglassabb, az átrendeződések a P-hurok, a switch I és switch II egyes szegmenseit érintik, de nem ugyanazokat az aminosavakat minden rendszer esetén. Az NMR méréseink eredményei szerint tehát a K-Ras rendszerek lassú dinamikája mutáció-szenzitív.

Az alapállapot és a minor forma közti átalakulás során érintett molekularészletek a nukleotid és a Mg^{2+}-ion koordinálásában vesznek részt. Hogy azonosítani tudjuk, hogy ezek közül melyek járulhatnak inkább hozzá a kétállapotú egyensúly kialakulásához, EDTA hozzáadásával előállítottuk a K-Ras^{G12C} Mg^{2+}-mentes állapotát (tömegspektrometriás mérésekkel igazolva, hogy a GDP továbbra is része a komplexnek, de az ion már nincs jelen) és meghatároztuk ennek a rendszernek a kémiai eltolódásait. Az alapállapotú K-Ras^{G12C}/GDP/Mg^{2+} eltolódásaival

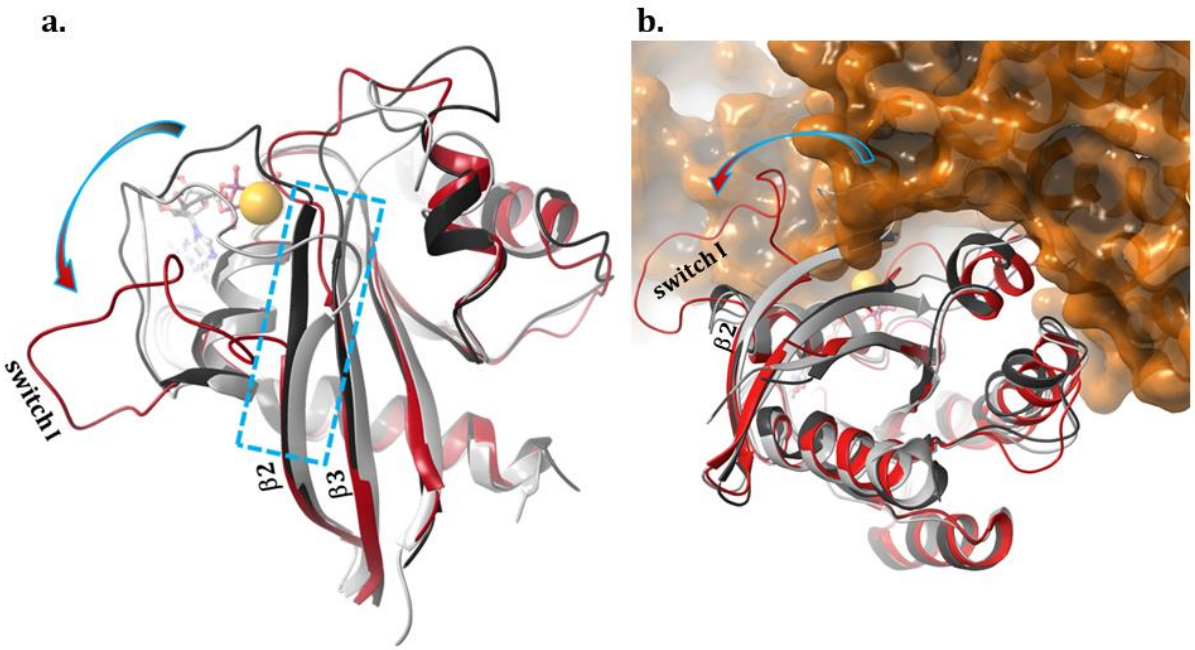
összevetve ezeket megállapítottuk, hogy a Mg^{2+}-vesztés a P-hurok G13-as aminosavának kémiai környezetén túl leginkább a β2 és β3-szálakat, valamint a switch I és II egyes régióit érinti.

A K-Ras^{G12C}/GDP/Mg^{2+} állapotához tartozó minor forma és a Mg^{2+}-mentes állapot különbözősége az alapállapottól annyira hasonló mintázatot mutatott, hogy arra gondoltunk, hogy ennek a két állapotnak a konformációja is hasonló lehet. A Mg^{2+} távollétében kialakuló szerkezetek modellezéséhez a négy variáns Mg^{2+}-kötött és Mg^{2+}-mentes formáit MD-szimulációjával vizsgáltuk. A két állapothoz tartozó egyensúlyi sokaságokat összevetve arra a következtetésre jutottunk, hogy a Mg^{2+} elvesztése minden variáns esetében a β2 és β3-szálak megrövidülését, és a switch-I régió részleges felszabadulását eredményezi. Mivel a switch I a nukleotid-kötő zseb külső falát képezi, a tapasztalt átalakulások az alapállapot és a GEF-hez kötött nukleotid- és ion-mentes állapot közti átmenetként jellemezhetők (36. ábra): a GEF ugyanis úgy katalizálja a nukleotidcserét, hogy egy hélixet beékelve a switch I és az enzim-törzs közé, leválasztja azt a G-doménről és eközben kiszorítja a GDP-t a nukleotid-kötőhelyről. Megfigyeltük azt is, hogy a Mg^{2+}-vesztést kísérő szerkezeti átalakulások valóban azokat a régiókat érintik, amelyek a GDP-(és Mg^{2+})-kötött állapot minor formáját az alapállapottól megkülönböztetik. Ezek az eredmények tehát arra utaltak, hogy a Mg^{2+}-kötő centrum fellazulása vezethet a minor forma kialakulásához.



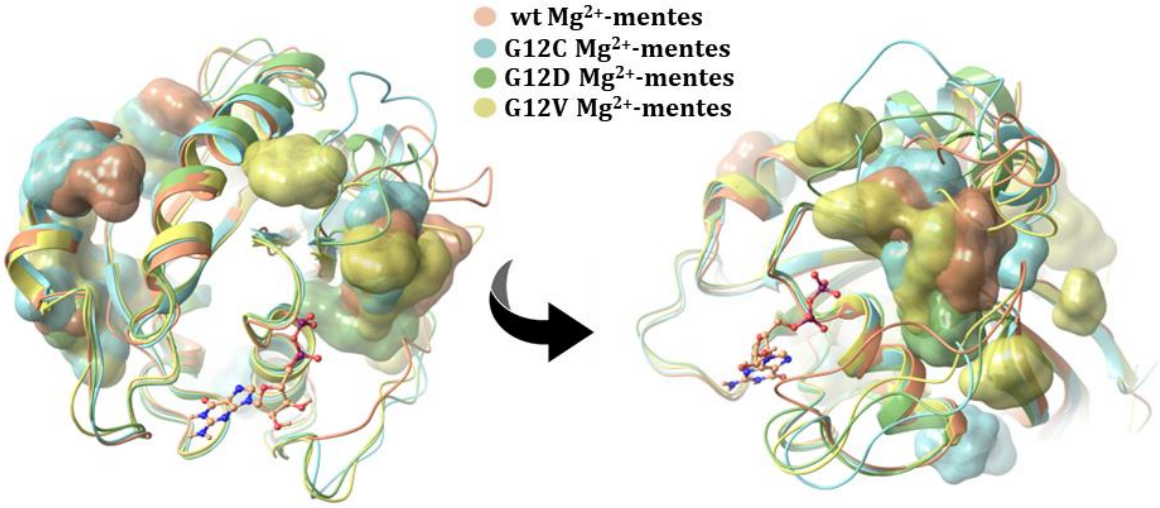
36. ábra. Különböző K-Ras variánsok Mg^{2+}-kötött és Mg^{2+}-mentes állapotainak MD analízise. a.) Az egyensúlyi szakaszhoz tartozó konformációk átlagos eltérése a Mg^{2+}-kötött és Mg^{2+}-mentes állapotban (a főlánc N-atomoknál mérve) jelzi, hogy az ion elvesztése leginkább a switch szegmensek és az azokkal átellenes oldalon található alloszterikus régiók elrendeződésében okoz változást. **b.)** Az egyes állapotokhoz tartozó szerkezeti sokaságok. Az ábrák az egyensúlyi trajektória > 90%-át leíró klaszterek középszerkezeteit mutatják.

Elképzelésünk szerint tehát GDP-kötött állapothoz tartozó minor forma a Mg^{2+} eleresztéséhez készíti elő a rendszert, ami aztán nukleotid-kötőhely destabilizációján keresztül a nukleotidcserét, illetve a GEF kötődését könnyítheti meg (37. ábra). Így tehát a katalitikus ciklus következő lépéséhez tartozó átalakulások „kódolva" vannak a GDP-kötött állapot dinamikai sajátságaiban.



37. ábra. Mg^{2+}-vesztés és a GEF-kötődés hatásának összevetése. a.) Az MD szimulációkból származtatott GDP-kötött (alapállapotú) forma (fekete), a Mg^{2+}-mentes állapot (világos szürke) és a GEF-kötött, nukleotid és ion-mentes rendszer kristályszerkezetének (PDB:1xd2 (csak a H-Ras molekulát ábrázolva), piros) összevetése. Jól látható a β2 és β3 béta szálak megrövidülése és a switch I fokozatos elválása az enzim-törzstől. **b.)** Ugyanez egy másik nézetből. A GEF felszínét narancssárgával mutatva.

A mutáció-szenzitivitás az MD szimulációk során is tükröződött; a Mg^{2+}-mentes formák topológiai hasonlóság mellett karakterisztikus lokális eltéréseket is mutattak, melyek a felszínen található, kismolekulák számára is megközelíthető zsebek méretében és helyzetében is okoztak változásokat (39. ábra) – igazolva azt az elképzelésünket, hogy a tranziensen megjelenő formák szelektívebb gyógyszertervezési célpontként szolgálhatnak, mint akár a GDP- akár a GTP-kötött alapállapot.



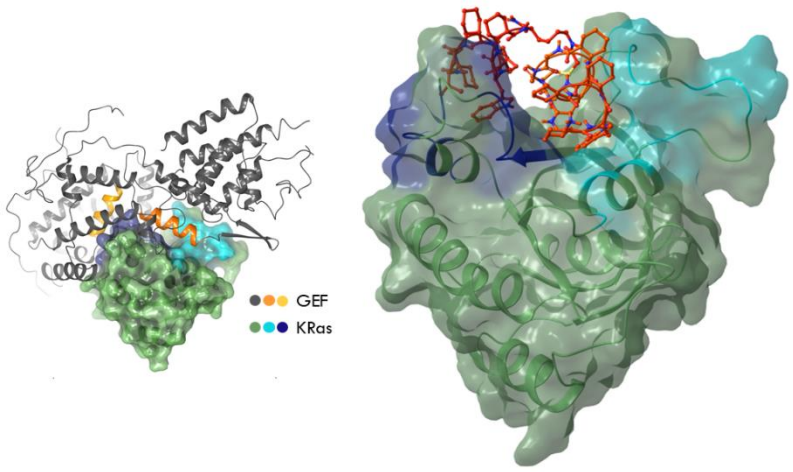
38. ábra. Kismolekulás kötőhelyek a Mg^{2+}-mentes K-Ras variánsok felszínén. A kötőhelyeket az FTMap Server-el számítottuk[86].

A GTP-kötött állapotok lassú dinamikájának analízisét megnehezítette a súlyos jelkiszélesedés. Itt is egy kétállapotú egyensúly jelenlétére engedtek az eredmények következtetni. Az alapállapot és a gerjesztett (vagy minor) forma közti kicserélődés a K-Ras^{G12C} variáns esetében a

leggyorsabb, majd a K-Ras^{wt} és K-Ras^{G12D} rendszereket követve, K-Ras^{G12V} esetében a leglassabb. A minor forma betöltöttsége itt 4.5-8.4% között mozog. A legnagyobb kémiai eltolódás változást a K-Ras^{G12C} rendszernél tapasztaltuk. Az alapállapotból a minor formába való átalakulás a switch I teljes hossza mentén érint egyes aminosavakat, valamint az enzim átellenes oldalán elhelyezkedő α3 és β5 környezetében. Ez utóbbiak a membránkötés és dimerizáció folyamataiban vesznek részt és alloszterikus összeköttetésben állnak a katalitikus hellyel. Mivel az eredményeink szerint a minor formába való átalakulás túlnyomórészt a switch I átrendeződésével jár, feltételezhető, hogy ez az állapot azonos a korábban már megfigyelt és jellemzett, GTP-kötött de inaktív 1. állapottal. A switch I ebben az esetben is az enzim-törzstől elszakadva helyezkedik el, tehát erre az állapotra úgy is tekinthetünk, mint a nukleotidcsere egy közbenső állomására. A GEF által leszorított switch I, a GEF távozása és a GTP megkötődése után vissza kell, hogy térjen az enzim felszínétől távoli pozíciójából: ez a lépés azonos lehet a minor formából az alapállapotba való átrendeződéssel. Tehát a GTP-kötött forma lassú dinamikája szintén egy katalitikusan releváns tranziens állapotot mintavételez.

Eredményeink arra utaltak tehát, hogy a tranziens állapotok jobb megismerése gyógyszertervezési és fehérjetudományi szempontból is érdekes lehet. A Mg^{2+}-mentes állapot, mind önmagában, mind pedig mint a minor formák modellje különös fontossággal bír. NMR mérésekkel szerettük volna kiegészíteni a MD szimulációkkal modellezett térszerkezetet a K-Ras^{wt}, K-Ras^{G12C}, K-Ras^{G12D} és K-Ras^{G12V} Mg^{2+}-mentes állapotai esetében. A mérések kiértékelését megnehezítette – ellehetetlenítette - hogy pont a legérdekesebb switch régiókra vonatkozó adatkészletek igen hiányosak a nagyfokú flexibilitás miatt. A NOE kényszerfeltételek meghatározásán függő hagyományos szerkezetmeghatározási eljárás nem volt tehát alkalmazható, ezért kidolgoztunk egy olyan számítási protokollt, amely pusztán a kémiai eltolódás értékekből – egy a mérési eredmények alapján módosított erőtér alkalmazásával – MD szimulációk segítségével állít elő az NMR eredményekkel összhangban lévő szerkezeti sokaságot. Az eljárást a K-Ras^{G12C} Mg^{2+}-mentes állapot szerkezet-meghatározásán keresztül mutattuk be, a további variások szerkezet-analízise jelenleg is folyamatban van. Ebben a munkában az NMR méréseket Gadanecz Márton végezte és értékelte ki, a számítási protokoll kidolgozásához pedig Fazekas Zsolt nyújtott szakértő segítséget.

A Ras szerkezetének és kölcsönhatásainak jobb megértése lehetővé tette azt is, hogy egy széleskörű kooperációba bekapcsolódva részt vehessünk fehérjék felszínét és kötőhelyeit feltérképezni képes foldamer rendszerek tervezésében és tesztelésében is. Együttműködő partnereink spontán helikalizálódó foldamer egységekből (2-aminociklopentánkarbonsav)



39. ábra. Foldamer kötőhely a nukleotid-mentes K-Ras felszínén. Bal oldalon az MD szimuláció kiindulási szerkezetének felépítéséhez használt kristályszerkezet (1bkd) látható. A Ras switch régiókat világos- és sötétkék, a GEF 2 kölcsönható hélixét sárga és narancssárga szín jelöli. Jobb oldalon a 2μs-os MD szimuláció eredménye látható: a VW-S-WQ foldamer (lsd. Ref. 87) stabilan meg tud kötődni a GEF hélixek által is elfoglalt árokban.

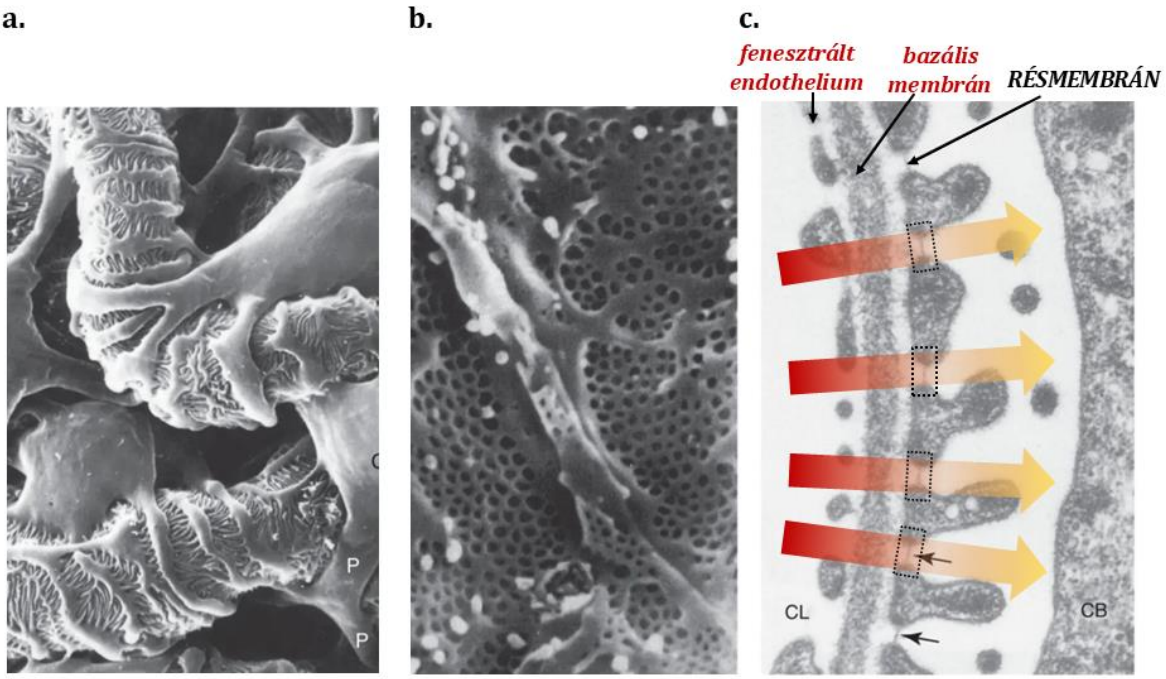
felépülő molekuláris „felszín-szondákat" hoztak létre melyek természetes aminosavakat és egy

fénnyel aktiválható horgonypontot (foto-metionin aminosavat: 2-amino-5,5-azo-hexánsav) is tartalmaznak. Az így kialakított reaktív ligandumok helikális szerkezetének igazolása részben az általam elvégzett molekuladinamikai szimulációkkal történt. Ehhez parametrizáltam mind a foldamer, mind pedig a fotometionin csoportokat a CHARMM és az Amber erőterek számára. Kötődésüket MS/MS és NMR módszerekkel követve, fehérjekötésre is alkalmas, sekély kötőhelyeket lehetett azonosítani a K-Ras feszínén, melyek akár gyógyszer-célpontként is szolgálhatnak – hiszen a Ras-ok aktiváló faktorai és effektor partnerei is mind fehérjék. A K-Ras felszínen egymás közelében kötődő foldamerek összekötésével pedig olyan mini-fehérje ligandumot állítottak elő a Szegedi Tudományegyetem munkatársai, amely a GEF nukleotid-cserét elősegítő hatását mimikálni tudta. MCMM keresést követő MD szimuláció alkalmazásával a kötődés lehetséges modelljét is létrehoztam[87].

A K-Ras-al kapcsolatos vizsgálódásaink során a számítások a modell-építést szolgálták: az eredmények rendszerezéséhez, a katalízis részleteinek szerkezet-alapú értelmezéséhez járultak hozzá. Megértettük, hogy a Ras enzimek esetében a funkciót dinamikai sajátságok, kommunikációs hálózatok alakítják ki, a képlékeny kapcsoló-régiók szerkezeti sokféleségén keresztül és sikerült azonosítanunk olyan szerkezeti változásokat, amelyek funkcionálisan is relevánsak. Megmutattuk, hogy az onkogén mutációk, annak ellenére, hogy nem okoznak topológiai változást a szerkezetben és meg sem jelennek az aktív helyen, mégis beleszólnak az enzim finomhangolt belső kommunikációjába, a felszín hozzáférhetőségének és az egyes al-domének csatolódásának megváltoztatásán keresztül gyakorolnak hatást a katalízisre.

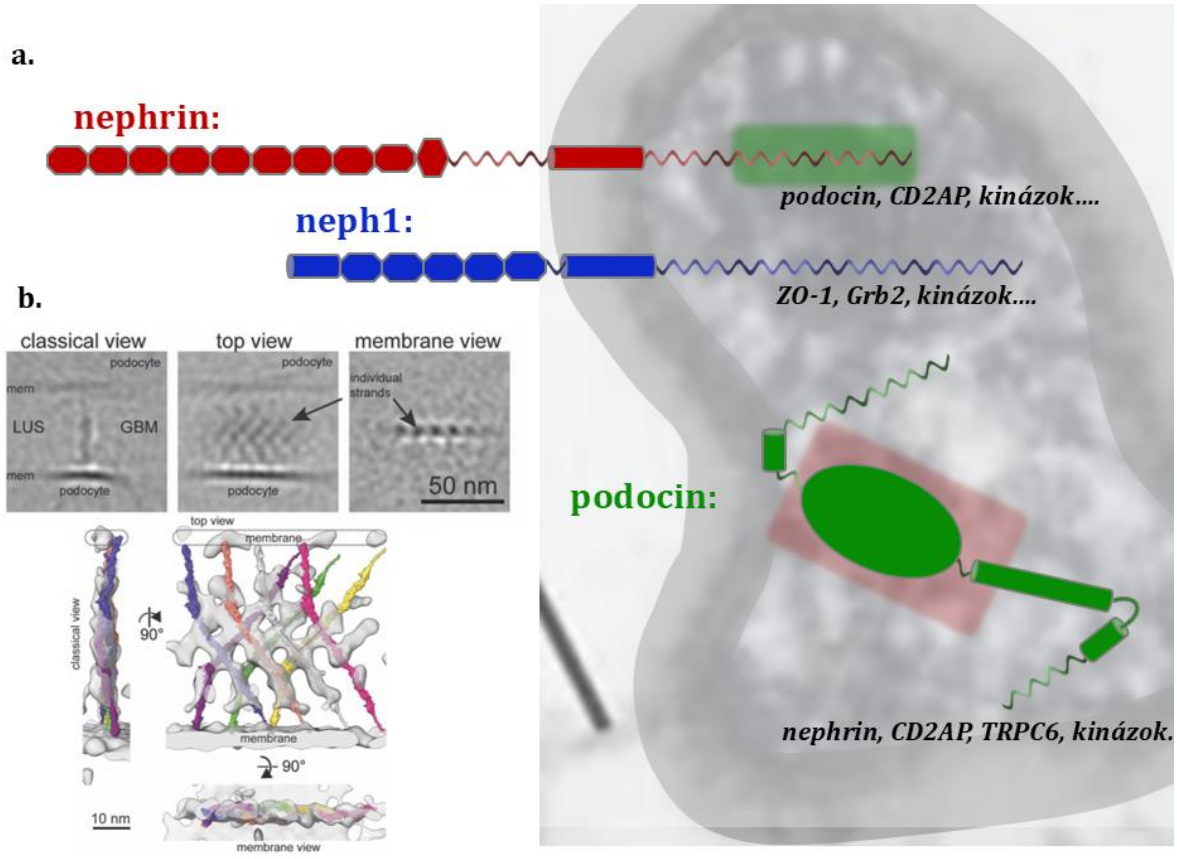
3.4 A podocin szerepe a vese szűrőrendszerében S13-S15

A vese glomerulusai gömb alakúvá csavart hajszálerekből állnak, amelyeket a Bowman-kapszula vesz körül. Itt történik a vér ultraszűrése, a vizelettermelés első lépése. A szűrőgát három komponensből áll: a glomeruláris kapillárisok endotélsejtjeiből, a glomeruláris bazális membránból és a podocita sejtekből. A podociták nagymértékben differenciált epiteliális sejtek, melyek hosszú, fenyő-ág jellegű lánynyúlványai a szomszédos sejtek lábnyúlványaival összekapaszkodva alkotják a glomerulusok külső burkolatát. A podocita sejtek lábnyúlványai közt résmembrán feszül. Ez a struktúra gátolja meg az albumin és más nagy molekulák vérből az elsődleges vizeletbe jutását (40. ábra).



40. ábra. A glomerulusok és a résmembrán[88]**. a.)** A glomerulusok felszínét borító podocita sejtek. **b.)** A fenesztrált endothélium. **c.)** A teljes – három komponensű – szűrőrendszer. A résmembránt fekete téglalapok keretezi, a szűrés irányát a színes nyilak jelzik. A vízmolekulák jelentős részét már a bazális membrán visszatartja, a résmembránon a fehérje komponensek szűrése történik.

A résmembrán bonyolult szerkezetét nagyszámú fehérje együttese tartja fenn: a podocin, nefrin, CD-2-vel asszociált fehérje (CD2AP), tranziens receptorpotenciál kationcsatorna alcsalád C-tag 6 (TRPC6), zonula occludens-1 (ZO-1) és a nefrinszerű fehérje (NEPH1) makromolekuláris komplexe. A podocin egy intracelluláris, membránhoz horgonyzott szerkezeti fehérje, amely rögzíti a résmembrán szűrőhálóját kialakító nefrin szálakat. A nefrin podocinhoz kötődő intracelluláris része felelős azért is, hogy soktagú fehérje komplexum a podocita sejtek citoszkeletonjához kapcsolódjon, valamint jelátviteli platformként is szolgál (41. ábra). A podocin és a nefrin betegség-okozó mutációi közül némelyek e fehérjék az endoplazmatikus retikulumban való visszatartását eredményezik, míg mások a membránhoz kötött podocin-nefrin párosok rendeződését zavarják meg - mindkettő súlyos, gyakran halálos következményekkel jár[88,89].



41. ábra. A résmembrán szerkezete és legfontosabb molekuláris komponensei. a.) A nefrin, neph1 és a podocin topológiai felépítése és elhelyezkedése a (szürkével jelölt) podocita sejtekben. A nefrin mögötti zöld téglalap annak feltételezett podocin-kötő szegmensét, a podocin mögötti piros téglalap pedig a podocin nefrin-kötő régióját jelzi. **b.)** A résmembrán szerkezete a legfrissebb kísérleti eredmények szerint: a krio-elektron-tomográfiás módszerrel meghatározott szerkezet egymást keresztező nefrin szálakat mutat, melyek dőlés-szögét valószínűleg a rövidebb neph1 szálak szabályozzák[90].

A podocin fehérjét 2000-ben azonosították, a vese szűrési hatékonyságában bekövetkezett változások okozta betegségek molekuláris hátterét kutatva. Ekkor már ismert volt, hogy a nefrin Finn típusú frame-shift mutációja például, mely a molekula intracelluláris szegmensének elvesztéséhez vezet, vese-elégtelenséget okoz, de az is világossá vált, hogy más fehérje-komponensek mutációi is részt vesznek a megfigyelt kórképek kialakításában. Így fedezték fel C. Antignac és munkatársai, pozicionális klónozás technikáját alkalmazva, az NPHS2 gént és az általa kódolt fehérjét, melyet podocinnak neveztek el[91].

A vese-elégtelenséggel járó betegségek (nefrotikus szindrómák) a filtrációs gát tökéletlenségéből kifolyólag súlyos proteinuriát, hipoalbuminémiát, ödémát és hiperlipidémiát okoznak. A nefrotikus szindróma szteroid-rezisztens formája (SRNS) gyakran végstádiumú vesebetegséghez vezet. Az SRNS monogén formáiban több mint 20 gén mutációit azonosították, amelyek többsége podocita fehérjéket kódol. Ezek között leggyakrabban a podocint kódoló NPHS2 szerepel, melynek öröklött mutációi az SRNS esetek 12–18%-áért felelősek. Az NPHS2 mutációval rendelkező egyéneknél jellemzően 6 éves koruk előtt alakul ki az SRNS, amely aztán életük első évtizedében válik végstádiumúvá.

A podocinnak létezik egy polimorf módosulata, az R229Q variáns, mely 15x gyakrabban fordul elő, mint az összes többi betegségokozó mutáció. Ezt a polimorf variánst egyértelmű kapcsolatba hozták a nefrotikus szindróma egy enyhébb lefolyású változatának megjelenésével – olyan [R229Q];[mut] transz asszociációk esetében, ahol a [mut] egy úgynevezett társult mutáció. Ekkor

a páciens az egyik szülőtől a polimorf módosulatot, a másiktól meg egy szintén mutációt hordozó allélt örököl. A tapasztalt fenotípus ebben az esetben kevésbé súlyos: a betegség megjelenéséhez tartozó medián életkor 13 év (tartomány: 0–39 év), és 26 éves korig kitolódik a végstádium kialakulásának medián életkora (tartomány: 10–50 év).

A betegpopuláció részletesebb vizsgálata azonban meglepetésekkel szolgált:

- az R229Q variáns sem a vad típussal társulva, sem homozigóta állapotban nem okoz SRNS-t,
- a polimorf módosulat elterjedtségéhez képest a késői kialakulású, enyhébb fenotípus meglepően ritka, ami arra utal, hogy az [R229Q];[mut] társulások jelentős része szintén nem okoz megbetegedést,
- míg a [mut];[mut] genotípusú, súlyos SNRS-hez vezető mutációk a NHPS2 gén 1-6 exonjait érintik, az enyhébb lefolyású [R229Q];[mut] betegség-okozó párosítások a 7-es és 8-as exonokat,
- nem minden, a 7-es és 8-as exonhoz tartozó [R229Q];[mut] párosítás okoz megbetegedést: például az A284, A288, R291, A297, E10, L327 és Q328 pozíciók mutációi általában patogének, míg az [R229Q];[V290M] párosítás benignus,
- a 7-es és 8as exonhoz köthető mutációk esetében, [wt]; [mut] társulás szintén nem okoz megbetegedést.

Ezek a megfigyelések képezték munkánk kiinduló-pontját: az, hogy egy mutáció hatását a transz asszociációban megjelenő másik mutáció döntő módon befolyásolja arra utalt, hogy ezekből a fehérje-variánsokból vegyes párok alakulnak ki, amelyek a vad típusú pároktól eltérő tulajdonságokkal bírnak, azaz feltételezhetően más szerkezetűek. A gyógyászati gyakorlatban tapasztaltak és együttműködő partnereink sejtbiológiai eredményei alapján azt a szerkezeti hipotézist alakítottuk ki, hogy a podocin oligomerek azon túl, hogy rögzítik a transzmembrán nefrin szálak intracelluláris szakaszát, stabilitást biztosítva a szűrőrendszert kialakító molekulák számára, egyúttal azok szabályos rendeződéséért és méretezéséért is felelnek, szabályos közönként bocsájtva útjára egy-egy nefrin szálat; a podocin oligomerizációja által szabályzott pozíciókba rendezett nefrin szálak a szomszédos lábnyúlvány nefrin szálaival összefonódva alakítják ki a szűrőhálót (41. ábra) Ezt a rendet zavarhatják meg a podocin 7-es és 8-as exonjaiban bekövetkezett változások, ha azok a polimorf módosulás partnerei. Célunk az volt, hogy ennek az összetett struktúrának szerkezetét, rendező-elveit felderítsük, valamint, hogy a betegségokozó mutációk hatásmechanizmusát értelmezzük és esetleges korrekciójukra javaslatot tegyünk.

A podocin az SPFH (stomatin-prohibitin-flottinin-HflK/C) fehérjék családjába tartozik, integráns membránfehérje, mely valószínűleg homo-oligomer formában halmozódik fel a lipid raft mikrodoménekhez kapcsolódva. Szerkezetét eleddig nem sikerült kísérleti úton meghatározni. A család tagjai közül legnagyobb szekvenciális homológiát a sztomatinnal mutatja.

podocin (124-353) vs.	azonosság	hasonlóság	szakadás
sztomatin (53-282)	48%	72%	0%
prohibitin (39-293)	17%	37%	10%
flotillin (1-407)	12%	23%	43%
E.coli HflC (19-329)	19%	36%	26%
E.coli HflK (96-390)	14%	31%	23%

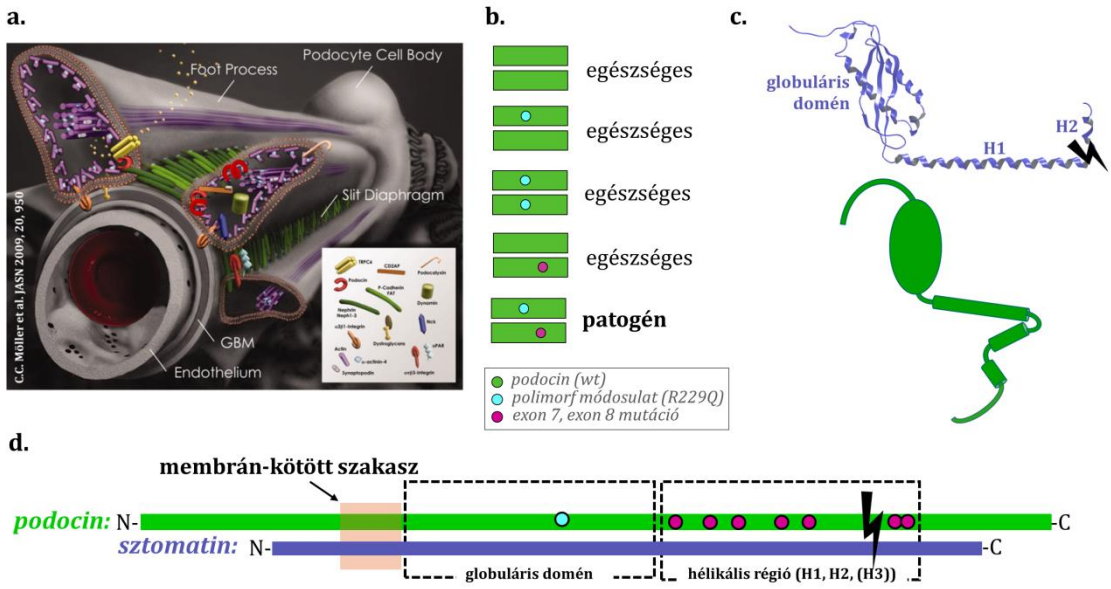
1. Táblázat. Szekvencia-homológia az SPFH családon belül.

A sztomatin vörösvérsejtek és más sejttípusok sejtmembránjában lokalizálódik, ahol ioncsatornákat és transzportereket szabályozhat, de pontos funkciója a mai napig tisztázatlan.

Mindkét fehérje szerkezete három topológiai szegmensre osztható: a szekvencia egy rövid intracelluláris szakasszal kezdődik, melyet egy membránba ágyazott - de nem transzmembrán - régió követ, majd a szintén intracelluláris C-terminális régió zárja azt. Ez utóbbi tovább tagolható: a globuláris „fej"-domént (SPFH (vagy PHB) domén) helikális szegmensek követik, majd a szekvenciát egy rendezetlen szakasz zárja. Mind a sztomatin, mind a podocin esetében a C-terminális régió felelős a homo-asszociációért[92]. A sztomatin az SPFH család egyetlen olyan tagja, amelynek kristályszerkezete vizsgálataink megkezdésekor ismert volt[93]. A molekulamodellezési feladatokhoz, a két fehérje szekvencia-homológiáját kihasználva, a sztomatin szerkezete alapján hoztuk létre a podocin szerkezeti modelljét (42. ábra).

A nefrin egy hosszú, lineáris, lánc-szerű molekula. Extracelluláris, N-terminális része nyolc imunnoglobulin és egy fibronektin III típusú „gyöngy"-domént tartalmaz, melyet egy rövid rendezetlen régió köt a transzmembrán szegmenséhez, amelyhez végül a C-terminális rendezetlen szakasza kapcsolódik. A nefrin (kísérleti úton meghatározott) szerkezete szintén nem ismert, vizsgálatához szintén egy szekvencia-homológián alapuló modell-rendszert hoztunk létre.

A modelleket felhasználva vizsgáltuk először a podocin monomer szerkezeti sajátságait, majd dimer/oligomer képzési potenciálját, végül pedig a nefrinnel való kölcsönhatását. Az előállított szerkezeti modellek alapján kísérleteket terveztünk és hajtottunk végre a modellek megerősítése és a rendszer jobb megértése végett. Valamivel több, mint egy évtizede fedezték fel, hogy a podocin valószínűleg a vér/here gát kapcsolati hálójában (tight junction) is feltűnik és a Sertoli-



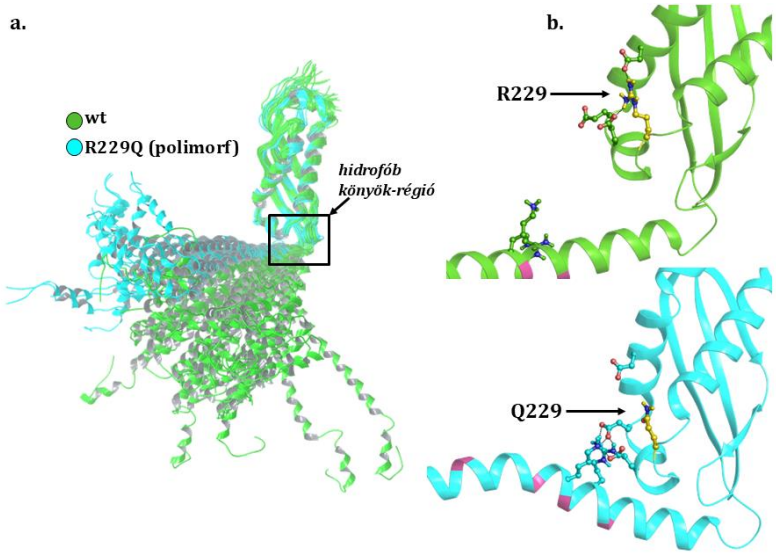
42. ábra. Podocin fellelhetősége, patogenicitása és felépítése. a.) Podocin és nefrin elhelyezkedése a podocita lábnyúlványok belsejében és a köztük feszülő résmembránban: a vizsgálataink megkezdésekor uralkodó elképzelés szerint. A podocint piros patkó alakok, a nefrint zöld szalagok reprezentálják. (C. C. Möller et al. JASN, 2009, 20, 950) **b.)** Egészséges és patogén podocin társulások. **c.)** A *Pyrococcus horikoshii* sztomatin kristályszerkezete (PDB kód: 3bk6, kék) és a podocin sematikus modellje (zöld). **d.)** A podocin és a sztomatin szekvenciáinak illesztése, domén-határok és mutációs helyek feltüntetésével. Világoskékkel az R229Q polimorf mutációt, lilával a 7-es és 8-as exonra eső mutációk helyzetét jelöltem.

sejtek membránjában szintén megtalálható nefrinnel együtt alakít ki sejt-sejt csomópontokat – hasonlóan a podocita sejtek esetében tapasztalttal. A podocin jelenlétének funkcionális jelentősége is lehet: a csak Sertoli-sejtes szindrómás betegeknél a herék (de nem a vese) podocin mRNS-ének teljes down-regulációját észlelték, azaz az azoospermiás betegeknek nincs podocinja. Mivel a Sertoli-sejtek közti kötések dezorganizációját kísérletes és klinikai

vizsgálatokban egyaránt összefüggésbe hozták a spermatogenezis sérülésével, a podocin-nefrin komplex hiánya vagy károsodása hozzájárulhat a férfi meddőség patogeneziséhez[94,95]. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a podocin-nefrin molekuláris csomópontok a korábban gondoltnál akár általánosabb szerepet játszanak a sejt-sejt kapcsolódások szerkezeti integritásának fenntartásában, tehát e két fehérje szerkezetére és kölcsönhatásuk feltérképezésére vonatkozó vizsgálatok jelentősége a vese működésének és betegségeinek megértésén is túlmutathat.

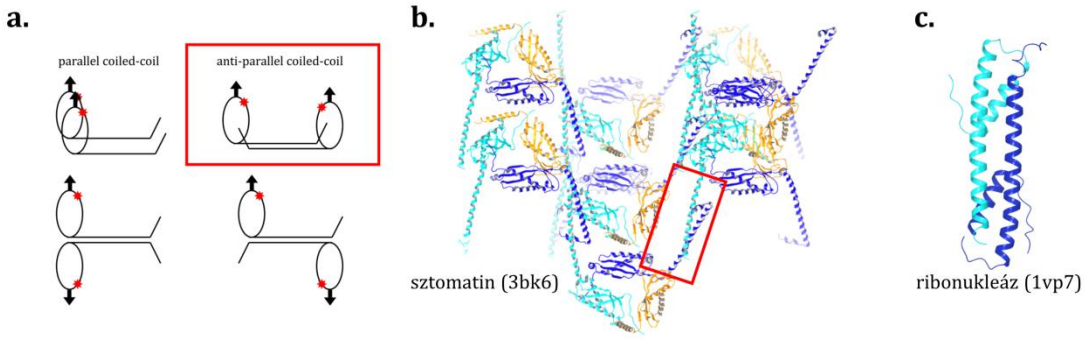
A humán podocin monomer C-terminális intracelluláris rendezett szakaszának (161-332 aminosavakra vonatkozó) modelljét a *Pyrococcus horikoshii* sztomatin kristályszerkezete alapján hoztuk létre (3bk6[93]), homológia-modellezés módszerét alkalmazva. Az első meglepő megfigyelésünk az volt, hogy míg a polimorf R229Q mutáció pozíciója az SPFH doménre esik, míg a 7es és 8-as exonokban bekövetkező változások az azt követő helikális szakaszok aminosavait módosítják (42. ábra). A transz asszociációban megjelenő mutációk tehát úgy képesek egymásra hatást gyakorolni, hogy egymástól távol, szerkezetileg jól elkülönülő szegmensekben helyezkednek el. Fontos azt is felidézni, hogy két polimorf módosulást hordozó szál homodimerizációja nem vezet betegségokozó elváltozásához, valamint a vad típusú, mutációt nem hordozó szál és egy asszociált (exon 7,8) mutációt hordozó variáns heterodimerizációja sem. Ennek alapján azt feltételeztük, hogy az R229Q csere valamilyen szerkezetileg csekély, de hatásában tovaterjedő változást hoz létre.

MD szimulációk alkalmazásával vetettük össze a vad típusú és a polimorf variáns monomer szerkezetét és azt találtuk, hogy míg a domének szerkezetében nem következik be jelentős változás, addig azok relatív elhelyezkedése jóval rögzítettebbé válik az R229Q csere hatására. Az R229 a globuláris SPFH domén magjában legalább két H-híd kötést alakít ki a környezetében található D244, E233 és E237 oldalláncaival. Ugyanebben a pozícióban a polimorf variáns Q229 aminosava nem alakít ki kölcsönhatást a E233 és E237 aminosavakkal, amelyek így a H1 hélix pozitív töltésű aminosavaival (R286, K289) hatnak kölcsön, ezáltal korlátozva a domének (relatív) fluktuációját. A flexibilitás inherens tulajdonsága a vad típusú rendszernek – a globuláris SPFH domén és a többnyire helikális C-terminális szakasz relatív elhelyezkedését csupán egy hidrofób könyök-régió orientálja (melyet a globuláris domén egy leucinban gazdag szakasza (225-236) és a H1 hélix összekötő- és kezdeti aminosavai alkotnak), így a helikális régió fluktuációja nem gátolt. A polimorf módosulat viszont, a két domén közt kialakuló kölcsönhatások miatt, kevésbé heterogén konformációjú, kevésbé képlékeny rendszer (43. ábra).



43. ábra. Podocin monomerek homológia modellezéssel és MD szimulációkkal előállított szerkezetei. a.) A wt podocin és a polimorf variánsa esetében számított szerkezeti sokaságok (az egyensúlyi szakaszhoz tartozó konformációk >97%-át magába foglaló klaszterek középszerkezetei). **b.)** Az SPFH domén és a H1 hélix közt kialakuló kölcsönhatások a két vizsgált rendszerben. A 229-es aminosavat sárgával, a helikális régióban megjelenő asszociált mutációk helyét rózsaszínnel jelöltem.

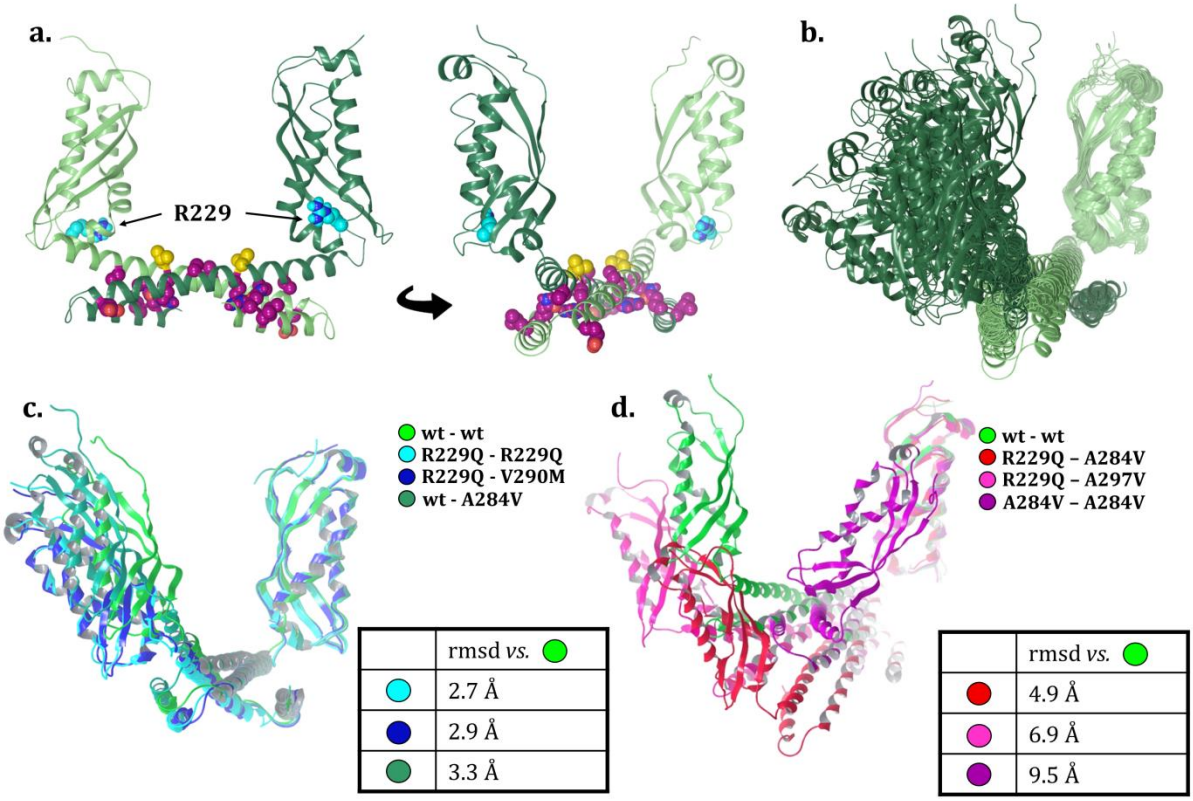
A vizsgálataink e kezdeti szakaszának idején ismert betegségokozó mutációk egymástól 3-4 aminosavnyira (vagy ezek többszöröseire) helyezkednek el többnyire a H1 hélix mentén, ezért azt feltételeztük, hogy a podocin pár-képződése a helikális régiók coiled-coil asszociációja révén valósulhat meg és az érintett kölcsönhatási központok ennek a csavarodó érintkezési felszínnek különböző pontjain okoznak torzulást vagy kevésbé optimális illeszkedést. Több lehetséges topológiát is megfontoltuk; ezek közül legvalószínűbbnek a H1 hélixek azon antiparallel asszociációját találtuk, amely a palmitoilációs helyeket (C158[96]) és az intramembrán szegmenseket egymás közelébe rendezi. Antiparallel elrendeződésben találkoznak össze a sztomatin kristályszerkezetében a rétegek közt átnyúló H1 hélixek is, ez az asszociáció azonban nem szolgáltatott megfelelően kiterjedt kölcsönhatási felszínt, ezért a CC+ coiled-coil adatbázisban[97] szereplő rendszereket is összevetettük a podocin hélixek szekvenciájával és topológiájával és így választottuk ki végül az exo-deoxi-ribonukleáz VII kisebb alegységének coiled-coil szakaszát (1vp7), mint szerkezeti templátot a dimer modellezéséhez (44. ábra).



44. ábra. A podocin dimerizáció feltételezett coiled-coil asszociációjának modellezése. a.) Dimerizációs topológiák (az ovális alakok az SPFH domének sematikus reprezentációi, az egyenes szakaszok a helikális régiókéi). A megvastagított nyíl a membránba-ágyazott szegmens felé mutat, a piros csillag a palmitoilációs helyet jelöli. **b.)** A sztomatin kristályszerkezetében fellelhető antiparallel hélix-hélix kapcsolódási geometria. c.) Az exo-deoxi-ribonukleáz VII-ben található antiparallel coiled-coil asszociáció.

Patogén és nem-patogén társulásokhoz tartozó dimer modelleket hoztunk létre, optimáltunk (MD szimulációkat alkalmazva) és hasonlítottunk össze, hogy a nem megfelelő funkcionalitás

hátterében meghúzódó szerkezeti különbségeket azonosítsuk. A wt-wt dimer a monomer flexibilitását részben megőrizve egy sokszínű szerkezeti sokasággal jellemezhető. A betegség-okozó mutációk pozíciói a nagyobbrészt hidrofób aminosavakból felépülő hélix-hélix kölcsönhatási felszínre esnek, ami különösen a H1 hélix mentén bekövetkező Ala→Val cserék esetében (A284V, A288V, A297V), a megnövekedett oldallánc méret és hidrofobicitás miatt, a mutációt hordozó komplex torzulását vetíti előre. A V290, melynek metioninra való mutálódása benignus, a H1 hélix oldószer-hozzáférhető, szabad felületén található a wt-wt dimer szerkezetében, így könnyen elképzelhető, hogy az ezen a ponton bekövetkező aminosav csere nem fogja átrendezi a dimer szerkezetét (45. ábra).

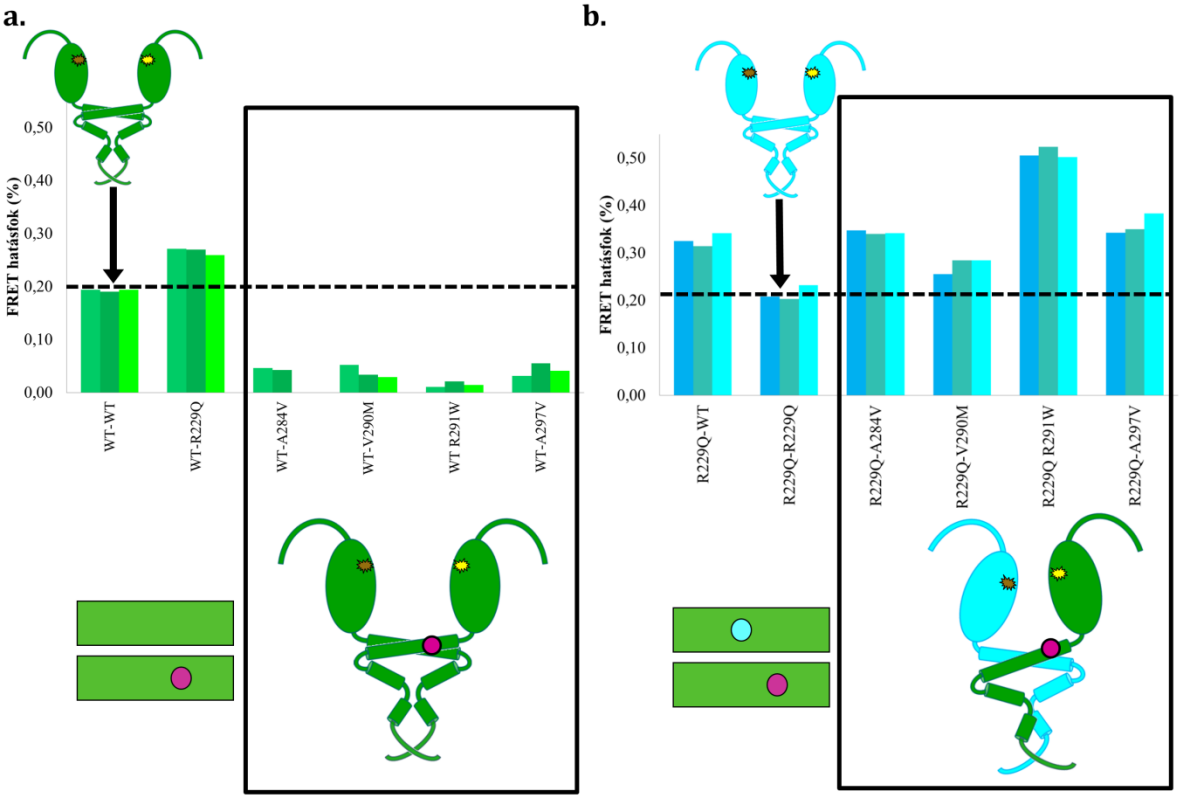


45. ábra. Podocin-dimerek szerkezetek: MD szimulációk eredményei. a.) wt-wt dimer szerkezete (az egyensúlyi trajektória-szakaszhoz tartozó konformációkat klasztereztük a gerinc-atomok szerkezetére vonatkozólag – az ábra a legnagyobb betöltöttségű klaszter középszerkezetét mutatja). A polimorf változat mutációs helyét (R229) világoskékkel, az asszociált mutációk helyzetét (A284, A288, A297, E310, L327, Q328) lilával és egy, a H1 hélixre eső, de nem patogén mutációs helyet (V290) pedig sárgával jelöltem. **b.)** A wt-wt dimer szerkezeti sokfélesége (az egyensúlyi szakaszhoz tartozó konformációk >97%-át magába foglaló klaszterek középszerkezetei). **c.)** Nem–patogén és **d.)** patogén társulásokhoz tartozó dimerek legnagyobb betöltöttségű klasztereinek középszerkezetei. A táblázatokban az egyes párok a wt-wt dimerhez viszonyított általos rmsd értékei szerepelnek.

Hat különböző mutációkat hordozó dimer rendszert vizsgáltunk. Ezek közül a nem-patogén párosítások (R229Q-R229Q, R229Q-V290M, wt-A284V) a wt-wt dimerhez hasonló szerkezetű sokaságot szolgáltattak a 100ns-os MD szimulációk során, a patogén társulások (R229Q-A284V, R229Q-A297V, A284-A284V) viszont jelentősen eltérő szerkezetűeket. Ez különösen érdekes, ha a wt-A284V és R229Q-A284V párosokat vetjük össze. A két dimer rendszer közt mindössze az egyik globuláris SPFH doménen megjelenő R229Q aminosav csere a különbség, mely az egymásra fonódó H1, H2 hélixektől távol esik, és mégis jelentős változást indukál a dimer szerkezetében. Azaz, a képlékenységét elveszítő R229Q variáns jelenléte felerősíti a helikális régióban történő A284V csere hatását, míg a wt rendszer elég flexibilis ahhoz, hogy a lokális diszlokáció ellenére, a kölcsönhatási felszín többi részén a wt-wt rendszer esetében talált elrendeződés alakulhat ki – jóval visszafogottabb globális szerkezet-torzulás mellett (45. ábra).

Azt találtuk tehát, hogy a dimer egyik partnerének helikális szakaszára eső specifikus mutációk csak akkor okoznak számottevő szerkezeti változást, ha a másik komponens az R229Q polimorf módosulást hordozza, és ennek a szerkezeti változásnak a bekövetkezése összefüggésbe hozható a patogenicitással. Másképp fogalmazva, szerkezeti magyarázatot tudtunk szolgáltatni ahhoz a klinikai megfigyeléshez, hogy az R229Q-t kódoló, viszonylag gyakran előforduló NPHS2 allél csak akkor válik patogénné, ha specifikus mutációkkal társul, azaz egy olyan autoszomális-recesszív rendellenességet azonosítottunk, amely esetében az egyik allél patogenitása a másik allélétől függ – hasonlóra eddig még nem volt példa.

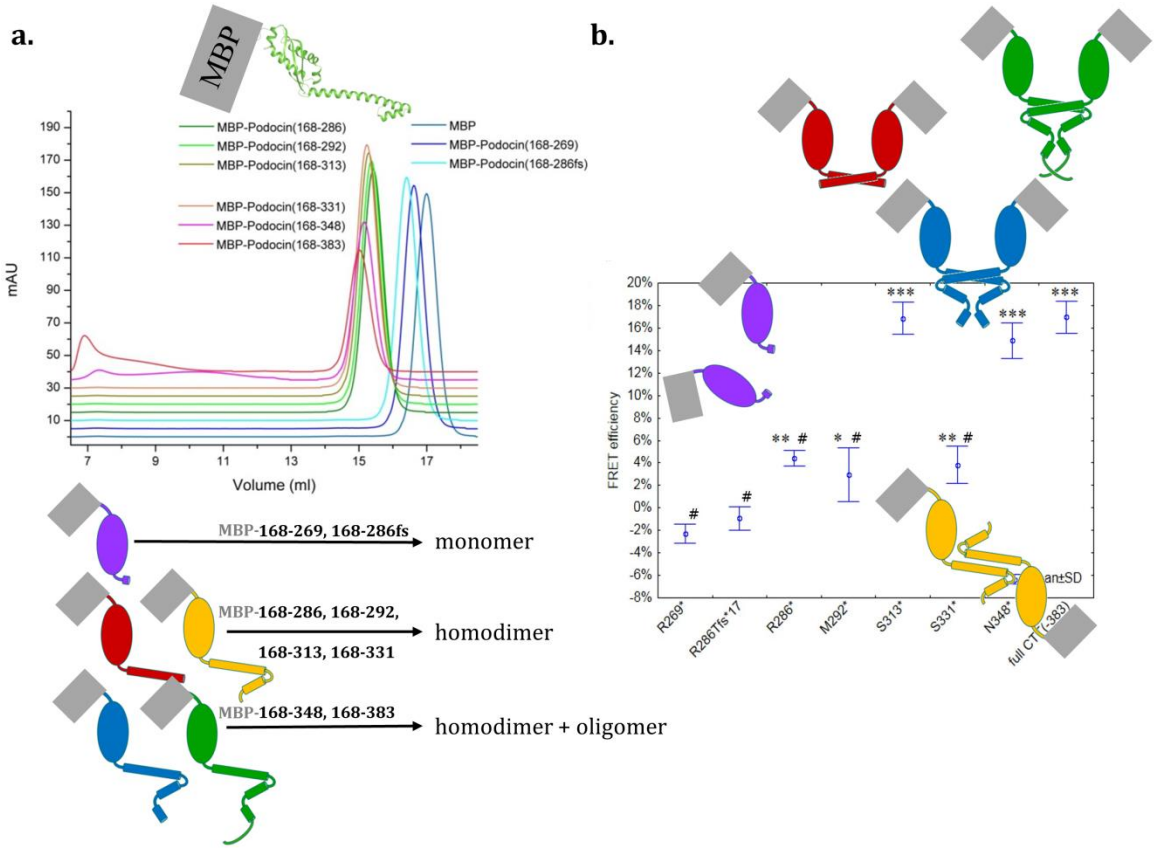
A dimer-képzés során bekövetkező szerkezeti változás befolyásolhatja a podocin stabilitását, szállítását, membránhoz kapcsolódását vagy a membrán mentén kialakult oligomerek szerkezetét. Mind a wt, mind a polimorf variáns homozigóta formában, illetve – kölcsönösen – a másik jelenlétében, eljut a membrán-régióba. C-terminálison GFP-el jelzett podocin variánsokat használva viszont megmutattuk, hogy míg az A284V variáns jelenlétében a wt podocin eljut a podocita sejtek membránjába, az R229Q módosulat a transz-asszociált A284V jelenlétében a sejt belsejében reked. Ezek a megfigyelések arra utaltak, hogy a különböző dimer-pároknak eltérő a stabilitása. Ennek a kérdésnek felderítésére FRET méréseket végeztünk először teljes hosszúságú podocin variánsok esetében[98], amelyek igazolták, hogy a wt podocin az asszociált mutációt hordozó variánsokkal képzett komplexei jelentősen kevésbé stabilak, mint a wt-wt párok, ugyanakkor az R229Q polimorf variáns az asszociált mutációkkal képzett torzult dimer szerkezetei erősebben kötöttek, mint akár a R229Q-wt, akár az R229Q-R229Q párok (46. ábra).



46. ábra. Podocin-dimerek FRET analízise. Az SPFH globuláris domén Cys254-es oldalláncán (sárga és barna csillagok) két különböző jelzőmolekulával ellátott vegyes párok közt mért FRET hatásfok (3 párhuzamos mérés) **a.)** wt- és **b.)** R229Q-podocint tartalmazó párosok esetén (donor festék: Alexa Fluor 488 C5 Maleimide, akceptor: Alexa Fluor 555 C2 Maleimide). A mért 10%-ot meghaladó értékek egyértelműen bizonyítják a párok létrejöttét, de az általánosan alacsony FRET hatásfok arra utal, hogy a globuláris domének nincsenek egymás közvetlen közelségében.

Következő célkitűzésünk a dimerizációs felszín pontos helyzetének kísérleti megerősítése volt. Ehhez, Dr. Stráner Pál meghatározó közreműködésével, maltóz-kötő fehérjével (MBP) képzett

kiméra konstrukciókat hoztunk létre, különböző hosszúságú podocin variánsokkal. A legrövidebb változatok csak a globuláris domént (168-269), a hosszabbak a H1 hélix egyre növekvő szakaszait (168-286, 168-292, 168-313), majd a H2 hélixet (168-331) és a H3 hélixet (168-348) is tartalmazták, valamint vizsgáltuk a teljes C-terminális helikális régiót tartalmazó variánst (168-383) is. Ezek úgy kerültek kiválasztásra, hogy legyenek köztük olyanok is, amelyek hosszúságukban hasonlóak azokhoz a frameshift mutációk által létrehozott, csonkolt podocin formákhoz (R286Tfs*17, A314Lfs*31, F344Lfs*4), melyeket változó súlyosságú nefrózis szindrómában szenvedő betegek vizeletéből izoláltak. Ezek a vizsgálatok igazolták, hogy a helikális régió távollétében nem alakulnak ki oligomerek, és azt is, hogy a H1 megjelenésével a dimer forma válik uralkodóvá, valamint, hogy a H3 hélix megjelenése szükséges a magasabb tagszámú homo-oligomer formák kialakulásához (47. ábra). A teljes helikális/rendezetlen C-terminális szegmenst tartalmazó rendszer dimer és oligomer formák keveréke. Ezek az eredmények úgy interpretálhatók, hogy a H1 hélix coiled-coil asszociációja által létrejött dimer párok valóban lehetséges építőkövei a podocin oligomerizációnak – alátámasztva a szerkezeti modellt, melyet a klinikumban megfigyeltek alapján hoztunk létre.

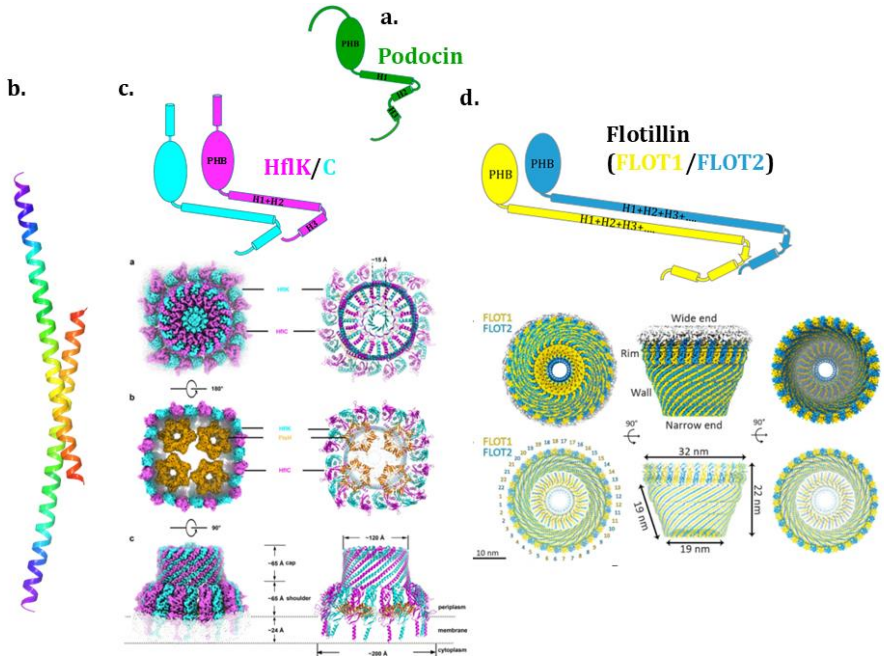


47. ábra. Különböző hosszúságú podocin variánsok analízise. a.) MBP (Maltóz-kötő fehérje) kiméra konstruktok méretkizárásos kromatográfia eredményei. **b.)** Ugyanezen variánsokra vonatkozó FRET mérések (a 46. ábránál leírtak szerint), és az eredmények alapján javasolt topológiai modellek. A szürke téglalapok az N-terminálishoz konjugált MBP-t jelzik.

Ezt a szerkezeti modellt használtuk fel egy olyan protokoll kidolgozására, amely az ismert SNRS betegségokozó mutációk egyre bővülő körét is magába foglalva tesz ajánlást az R229Q polimorfiát hordozó egészséges szülő-jelöltek genetikai tanácsadására. A molekuláris biológiai és biofizikai karakterizálás és a szerkezeti modellezés alapján kijelenthető volt, hogy a korábbi gyakorlattól eltérően, a polimorf podocin változatot hordozó egyedek bátran vállalhatnak gyermeket, ha a partnerük nem az NPHS2 gén 7-es vagy 8-as exonján hordoz valamilyen mutációt – illetve ezen belül is nagy valószínűséggel jósolhatóvá vált az asszociált mutáció

veszélyeztető, illetve benignus volta. Azok a mutációk jelentenek különösen nagy veszélyt, amelyek az asszociációs felszínre esnek, vagy nagymértékben megváltoztatják a coiled-coil külső felszínének töltéseloszlását.

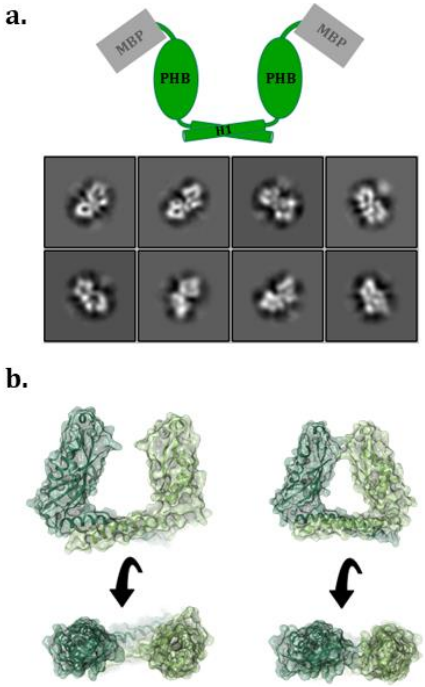
A szerkezeti modell kritikai vizsgálata, a megalkotása óta eltelt évek során felhalmozódott kísérleti eredmények tükrében újra aktuálissá vált. A szintén az SPFH családba tartozó prohibitin közelmúltban történt vizsgálatai során kiderült, hogy a podocinéhoz hasonló helikális régiója felelős a mitochondriális membránhoz való rendezett kapcsolódásáért és a kölcsönhatási hálózatának kialakításáért; valamint, hogy HEK293 sejtekben a prohibitin két formája (PHB1 és PHB2) - mind a gyakrabban előforduló PHB1/PHB2 hetero-, mind pedig a PHB2/PHB2 homo-asszociációk során - szintén a helikális régiókon keresztül kapcsolódik egymáshoz. A PHB2 helikális régiójának H1 és H2 szakaszát tartalmazó modell-rendszer helikális, antiparallel coiled-coil komplexek formájában kikristályosodott és szerkezetét sikerrel meghatározták: a szerkezet a H1 hélixek páronként rendezett struktúrája; a H2 hélixek, fokozott mozgékonyságuk miatt, nem voltak azonosíthatóak az elektronsűrűségi-térképen[99] (48b. ábra). Ezek az eredmények alátámasztják a podocin dimer modell antiparallel coiled-coil topológiáját, és hogy ez a kölcsönhatás javarészt a H1 régióra korlátozódik. Közvetlenül a podocin oligomer szerkezetére vonatkozó eredmények is születtek, melyek szerint az inklúziós testből refoldálással visszanyert podocin 126-350 szegmense (globuláris domén és a H1, H2 és H3 hélixek) többféle oligomerizációs állapotban stabilizálódik, melyek közül a 16-tagú homo-oligomerek a legstabilabbak[96]. Az utóbbi években az SPFH család néhány tagjának szerkezetmeghatározása is sikerrel járt. Elsőként az E.coli-ból származó fehérjepáros, a hetero-oligomerizálódó HflK/HflC rendszer szerkezetére derült fény. Bár a szekvencia-azonosság a két fehérje és a podocin között csekély (HflK, HflC vs. podocin: 14, 19%) a topológiai felépítésük hasonló. Krio-EM módszerrel, két függetlenül munkálkodó csoport is arra a megállapításra jutott, hogy 12 HflK/HflC heterodimer együttesen formál egy hatalmas kürtő alakú komplexet, amely a periplazmatikus oldal felől merül a citoplazma membránba, és mérete és alakja folytán rendezi és orientálja a belső terében csapdázódott négy metallo-proteáz enzimet[100, 101]. Hasonló felépítésű, de még hatalmasabb kürtőt formál a család egy másik tagja a flotillin is, a FLOT1 és FLOT2 izoformák heterodimereiből építkezve[102] (szekvencia hasonlóság FLOT1, FLOT2 vs. podocin:~ 0%), valamint a prohibitin izoformái (a PHB1 és a PHB2)[103], amennyiben heteromultimer párokba rendeződnek. Sőt a sztomatinnal kapcsolatban is megmutatták, hogy 2 különböző kornformere szintén össze tud rendeződni egy kürtőszerű makrostruktúrába[104]. Ezek a szerkezetek mind úgy épülnek fel, hogy a fehérjék helikális szegmensei parallel orientációban pakolódnak egymás mellé, ezáltal a globuláris fej-domének is szorosan egymás mellé rendeződnek.



48. ábra. SPFH fehérjék oligomer formái. a.) A podocin monomer felépítése. **b.)** A prohibitin H1 és H2 szegmenseit tartalmazó rendszer kristályszerkezete: a H1 hélixek antiparallel homodimerizációja (PDB kód: 6iqe). **c.)** Az HflK és HflC fehérjék moduláris felépítése és a krio-EM módszerrel meghatározott hetero-oligomer struktúrájuk (PDB kód: 7vhp, 7wi3). **d.)** A flotillin két izoformájának (FLOT1, FLOT2) moduláris felépítése és a krio-EM módszerrel meghatározott hetero-oligomer struktúrájuk (PDB kód: 9bq2).

Ez az elrendeződés nagyon különbözik az általunk javasolt podocin modell szerkezetétől, de be kellett látnunk, hogy egy ilyen típusú komplex is szolgálhatna rendezett templátként a nefrin-szálak számára. Azonban ezt a körkörös topológiát nagyon nehéz összeegyeztetni a résmembránról készült krio-ET rekonstrukciók lineáris szerkezetével és a ~70-100Å -s nefrin-nefrin szeparációval, amit ott megfigyeltek[90,105] (41. ábra).

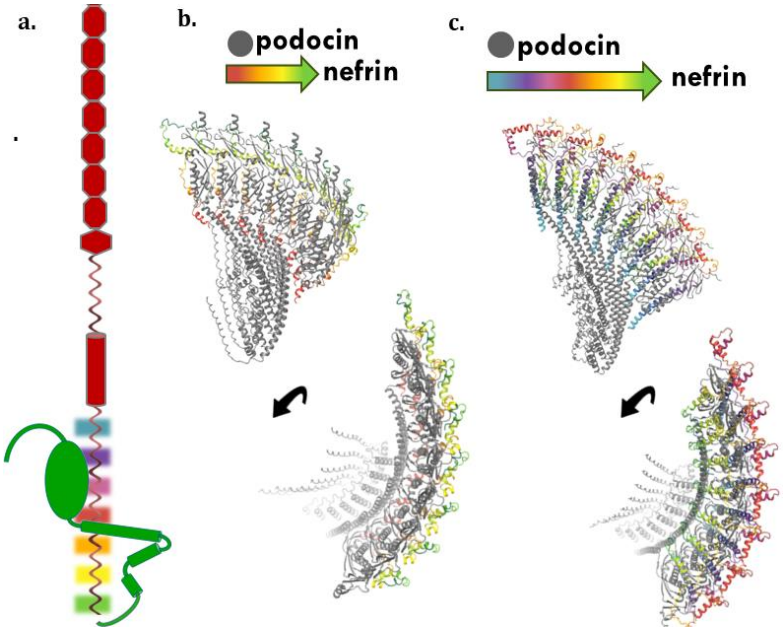
A podocin, illetve a podocin-nefrin komplex szerkezetének meghatározása természetesen régi álmunk. A nehézséget az okozza, hogy nem sikerült eddig – sem nekünk, sem másoknak[106] – oldatban stabil podocin konstrukciót létrehozni. Az MBP-kiméra változatok ugyan jól kezelhetők, de nem világos, hogy milyen mértékben befolyásolják az MBP szegmensek a dimerizáció/oligomerizáció folyamatait és hogy nem blokkolják-e a podocin legpotensebb kölcsönhatási felszíneit. A rendszer nagyfokú mozgékonysága miatt a kristályosítási kísérletek nem jártak sikerrel, sikerült azonban a legerősebben dimerizálódó MBP-podocin(168-313) rendszerről krio-EM felvételeket gyűjtenünk (49. ábra). A szerkezetmegoldás nem volt ugyan kivitelezhető, de a tájékozódó mérések során összegyűjtött részecskék antiparallel dimer topológiájúnak tűntek. A flexibilis összekötő szakasszal konjugált MBP nem látszik a képeken, de a podocin-dimer központi régiója azonosítható és



49. ábra. a.) MBP-podocin(168-313) kiméra rendszerről készült krio-EM felvételeken azonosított részecskék. **b.)** A podocin(168-313) homodimer rendszer MD szimulációjának egyensúlyi trajektóriájából kiemelt pillanatképek.

hasonló elrendeződést mutat, mint amit a podocin(168-313) dimer rendszerre vonatkozó MD szimulációnk pillanatszerkezetei (49b. ábra). Egyenlőre azonban nem kizárható, hogy a podocin esetében az antiparallel homodimer párok szolgálnak hasonló szerkezetépítő alapegységként, amelyekből esetleg a podocin is végül valamilyen körkörös makrostruktúrába rendeződik. Ezért, bár az MBP-kiméra rendszerekkel tovább folytatjuk a kísérletezést, a szerkezetvizsgálat területén a krio-elektrontomográfia (krio-ET) módszer alkalmazása felé is tettük lépéseket. A C-terminálison eGFP-el jelölt podocin variáns és a C-terminálison illetve az extracelluláris domén membránhoz legközelebbi szegmensén YPet-el illetve mRuby3/mCherry-vel jelölt nefrin konstrukciókat használva reméljük HEK293 sejtekben vizsgálni a két molekula komplexének szerkezetét – integrált fluoreszcens mikroszkópia (iFLM) által irányított in-situ krio-ET segítségével (a Diamond Light Source (Oxfordshire, UK) munkatársaival kooperálva).

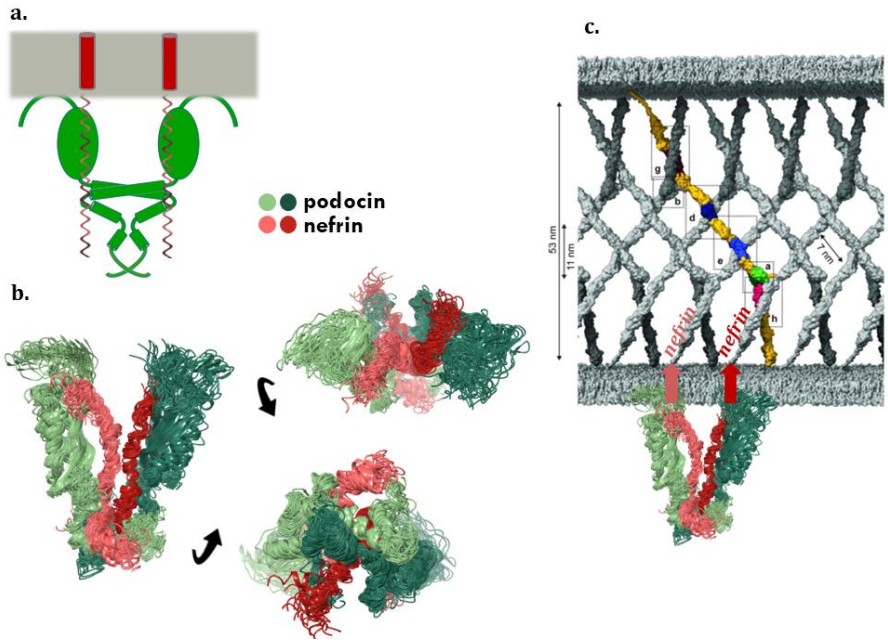
Mivel podocin homomultimer szerkezetnél még nagyobb jelentőségű – és a patogenezishez is szorosabban kapcsolódik - a podocin-nefrin komplex szerkezete, párhuzamosan elkezdtük



49. ábra. Podocin-nefrin AlphaFold3 modellek (8 podocin-8 nefrin sztöchiometria). a) A kacsolódó szegmensek sematikus rajza: az intracelluláris podocin (zöld) és a nefrin hozzá kacsolódó szintén intracelluláris szakasza (szivárvány színekben). **b.)** A podocin (szürke) és a nefrin azon C-terminális szakasza, amit Huber és mtsai. megjelöltek, mint annak podocin-kötő régióját[92] (színezés az a.) panel szerint) **c.)** A teljes intracelluláris nefrin szegmenssel kialakított komplex. A két modellt összevetve látszik, hogy a nefrin-szál meghosszabbítása ellentétes topológiájú modellt eredményezett (pl. a piros szegmens a b.) modellben belül, míg a c.) modellben a felszínen található).

ennek a rendszernek a vizsgálatát is. Az AlphaFold3 szerver segítségével sokféle elrendeződést megvizsgáltunk, de azt tapasztaltuk, hogy az eredmények nagyon függtek attól, hogy hány elemből építettük fel a modellrendszert és hogy milyen hosszú volt a nefrin-szakasz amit használtunk. A szerkezetek még topológiai hasonlóságot sem mutattak (a podocin által koordinált nefrin szakaszok sem szekvenciálisan sem irányultságukban nem voltak hasonlóak). A makrostruktúra alakja azonban minden modell esetében görbült héjszerkezetű volt (50. ábra). Ez önmagában csodálatos eredmény, hiszen az AlphaFold3 betanítása idején az SPFH család különböző tagjainak krio-EM szerkezeteit a PDB adatbázis még nem tartalmazta, azonban a modellek nagyfokú eltérése arra enged következtetni, hogy a podocin-nefrin komplex szerkezete nem jól jósolható az eddigi ismereteink alapján.

A két podocinból és két nefrin-szegmensből felépülő heterotetramer komplex szerkezetét fehérje-fehérje dokkolás és MD szimulációk alkalmazásával is próbáltuk modellezni. Ezek a számítások szintén csak nagyon vázlatos képet nyújthatnak, hiszen még az sem tisztázott, hogy pontosan melyek a két fehérje kölcsönható szakaszai és hogy nem vesznek-e részt további, a



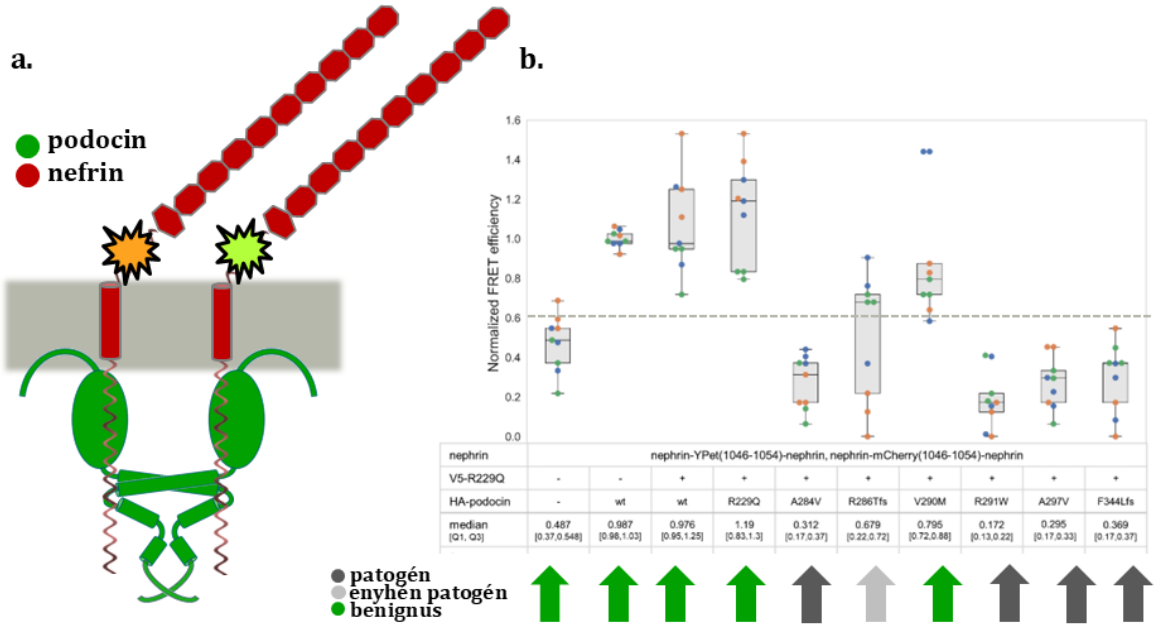
51. ábra. A podocin-nefrin heterotetramer modellje. a.) Sematikus ábra. **b.)** Egy, a számtalan számított modell közül. A nefrin szálak (1171-1241 szegmens) a PHB domén felszínén található árokban helyezkednek el, de ráfonódnak a coiled-coil struktúrába rendeződött helikális szegmensekre is. A nefrin C-terminális rendezetlen szakasza részben helikalizálódik a komplex-képzés hatására. **c.)** A modell összevetése az A. N. Birtasu et al. által meghatározott résmembrán szerkezettel[90, 105].

komplex szerkezetét befolyásolni képes, más fehérjék is a kölcsönhatásban. Az általunk előállított heterotetramer egységek méretei azonban összemérhetőnek bizonyultak a résmembrán kísérletileg meghatározott dimenzióival (51. ábra).

Elképzelésünk szerint tehát a podocin dimer-egységekből felépülő oligomereket képez és ehhez a struktúrához kötődnek hozzá a nefrin szálak. Podocin-dimer modellünkben a globuláris domének közötti távolság (~ 60-70 Å) nagyjából megfelel a nefrin láncok extracelluláris oldalon tapasztalt távolságának (51. ábra), ami arra utal, hogy a podocin szabályozhatja a nefrin extracelluláris láncolatai közötti rendet és távolságeloszlást azáltal, hogy egyenletes „dokkoló rácsozatot" biztosít az intracelluláris szegmenseik számára. Ezt a feltételezésünket HEK293 sejtekben kifejezett podocin és nefrin variánsok közti FRET mérésekkel szerettük volna alátámasztani. EGFP-el jelölt podocin variánsok és mRuby3-al jelölt nefrin szálak közti FRET mérésekkel igazoltuk, hogy az R286Tfs*17, amelyből teljesen hiányzik a helikális régió – bár eljut a membránba – nem köti a nefrint, míg a wt, a polimorf variáns, és különböző patogén mutációkat hordozó variánsok különböző mértékben ugyan, de képesek voltak rezonancia energia transzferre a nefrinnel, azaz asszociáció alakult ki a két molekula között. Ez alátámasztja azt a podocin/nefrin heterotetramer modellünkben is megfigyelhető sajátságot, hogy a helikális régió nem csak a dimerizáció/oligomerizáció, hanem a nefrin kötés szempontjából is esszenciális. Létrehoztunk négy olyan nefrin konstrukciót is melyeket YPet-el és mCherry-vel jelöltünk a szekvencia két különböző pontján: az intracelluláris C-terminálison, illetve a 1046-1054 szegmenst helyettesítve, ami a membrán közvetlen közelébe helyezi ezeket a kromofórokat, az extracelluláris oldalon. Ezeket a molekulákat arra használtuk, hogy megvizsgáljuk, hogy különböző podocin variánsok és variáns-párok miképp befolyásolják a nefrin-nefrin távolságot. Megmutattuk, hogy a podocin távollétében a membránhoz kötött nefrin szálak rendezetlenül helyezkednek el, míg a podocin megjelenésével a nefrin-nefrin távolság egységessé válik, amit a láncok közti FRET kölcsönhatás hatékonyságának megnövekedése jelez. Azt is sikerült igazolnunk, hogy a patogén variánsokat (R138Q, A284V, R286Tfs*17) illetve társulásokat (R229Q/A284V, R229Q/A297V, R229Q/R291W, R229Q/F344Lfs*4) tartalmazó

rendszerek nem képesek a nefrin szálakat egymás közelébe rendezni. Azonban a wt rendszer mellett a benignus, vagy enyhe fenotípust eredményező társulások (R229Q/wt, R229Q/R138Q, R229Q/R229Q, R229Q/R286Tfs*17, R229Q/V290M) jelenlétében egyenletes nefrin-háló alakult ki. Egyértelmű összefüggést találtuk tehát a podocin mutációk patogenicitása és a nefrin-háló rendezettsége között, azaz megmutattuk, hogy a podocin mutációi közvetlenül a háló szerkezeti integritását veszélyeztetik. A patogén és benignus asszociációk hatása olyan élesen elkülönült, hogy ez a módszer a jövőben az ismeretlen R229Q asszociációk patogenicitásának becslésére is alkalmas lehet – a nefrin-nefrin távolságok a leírt módon való monitorozása egy kísérleti eszköz lehet, amely egyértelműen megmutatja, hogy az adott variáns-párt hordozó potenciális szülőpár esetében hordoz-e fokozott nefrózis-szindróma veszélyt a gyermekvállalás [108-110] (52. ábra).

Az is világossá vált, hogy amennyiben a hetero-dimerizációt/oligomerizációt sikerül blokkolni vagy kedvezőtlenné tenni egy olyan társulás esetében, ahol egy funkcionális variáns is jelen van– amely homo-oligmerizálódva képes a nefrin-háló horgonyául szolgálni - akkor valószínűleg nem alakul ki, vagy kevésbé súlyos lefolyású lehet a betegség. Erre szép példa a R229Q/R286Tfs*17 társulás esete, ahol az R286Tfs*17 podocinok eljutnak ugyan a membránba, ott azonban nem oligomerizálódnak és nem kötik a nefrint sem, de nem is akadályozzák meg az R229Q podocin molekulákat a homo-multimer struktúra kialakításában, amely így a résmembrán felépülését támogatni tudja. Az R286Tfs*17 variáns jelenlétének lassan felépülő, enyhe betegségokozó hatása valószínűleg abból ered, hogy csonkolt változat a podocin-megkötésre alkalmas pozíciók egy részét elfoglalja, de nem vesz részt a szűrőháló kialakításában. Az a feltételezésünk alakult ki tehát, hogy a dimerizációs/oligomerizációs felszínek szerkezetét megismerve, és azokat mutáció-szelektíven gátolva (egy „decoy"-partnerrel, például) lehetőség nyílhat a patogén társulások okozta betegségek enyhítésére.



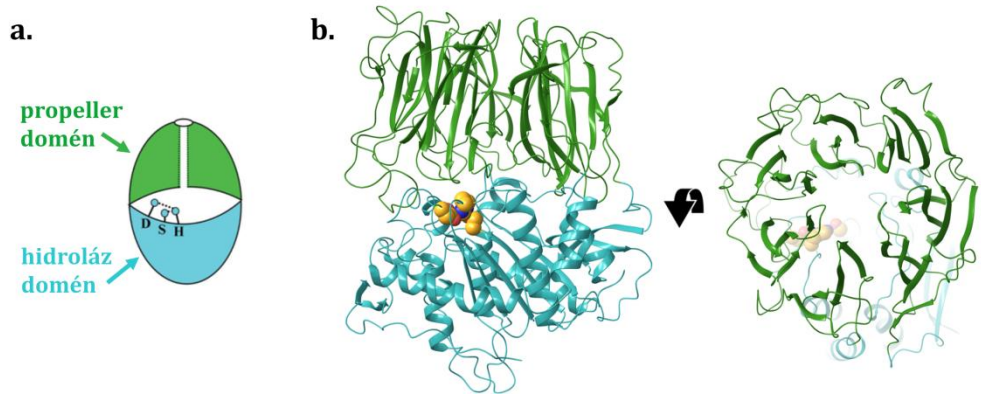
52. ábra. Podocin-nefrin komplexek. a.) A podocin-nefrin hetero-tetramer modell sematikus képe. A csillagok a beépített kromofórok pozícióját mutatják. **b.)** Különböző podocin társulások jelenlétében mért nefrin-nefrin FRET hatásfok (a táblázat alatt látható nyilak az adott pár patogenicitása szerint vannak színezve).

A podocin és nefrin esetében a molekulamodellezési eszköztárat szerkezeti modellek létrehozásához használtuk és a létrehozott modellek alapján értelmeztünk klinikai megfigyeléseket, tettünk javaslatot újfajta beteggondozási stratégiákra. Kísérleteket is terveztünk és valósítottunk meg, melyek a modellek korrekcióját és megbízhatóságának

becslését szolgálták. A számítások legfontosabb tanulsága az volt, hogy a podocin és nefrin hatékony kölcsönhatásához a podocin képlékenysége, szabad fluktuációra való képessége szükséges, amely a polimorf variáció által létrehozott egyetlen aminosav csere által is alapvetően sérül. Eredményeink itt arra szolgáltattak példát, hogy miként fejtheti ki fiziológiai szempontból is igen jelentős hatását egy markáns szerkezeti változást nem okozó szerkezeti tényező, a rendszer dinamikai sajátságainak megváltoztatásán keresztül.

3.5 Multimerizáció és flexibilitás hatása acil-aminoacil peptidázok működésére S16-S21

A humán acil-aminoacil peptidáz (AAP; vagy APEH: acilpeptid hidroláz, esetleg OPH: oxidált fehérje hidroláz, netán VGH: valproát glukuronid hidroláz – néhány név amivel e fehérjét ideig óráig illették) egy homotetramer szerin-proteáz enzim, amely a szervezetünkben elsősorban a rosszul feltekeredett vagy oxidatív károsodást szenvedett fehérjék lebontásában játszik szerepet. Az enzim az oligopeptidáz család (S9 proteázok) tagja, melyek a klasszikus szerin proteázoktól (mint például a kimotripszinszerű és szubtilizinszerű proteázok) leginkább a méretükben (~80 kDa, szemben a tripszin és a szubtilizin 25-30 kDa-jával) és a szelektivitásukban különböznek: legtöbb oligopeptidáz csak a legfeljebb 30 aminosavból álló (oligo)peptidek hasítását végzi. Az oligopeptidázok moduláris szerkezetűek, egy hidroláz és egy propeller doménből állnak. A harmadlagos szerkezetük hasonló, bár szekvencia-homológiájuk alapvetően a katalitikus triád Ser-His-Asp aminosavait is tartalmazó hidroláz doménre korlátozódik. A hidroláz-domén magja a szekvencia C-terminális szakaszából áll, de általában tartalmazza az N-terminális egy rövidebb szegmensét is, amely a hidroláz felszínéhez kapcsolódó hurkokat vagy hélix-hurok-hélix motívumot alkot[111] (53. ábra).



53. ábra. Az oligopeptidázok szerkezeti felépítése: a.) sematikus ábrázolásban és **b.)** a család tagjai közül elsőként meghatározott, sertés-agyból származó prolil-oligopeptidáz szerkezetén (1h2w) keresztül. A 7-„lapát"-os propeller domént zölddel, a hidrolázt kékkel jelöltem, a katalitikus triád aminosavainak C-atomjait sárgával.

Az oligopeptidázok funkcionális formája a monomertől a dimeren, tetrameren át a hexamerig terjed. A homo-multimerizációs kölcsönhatási központ a katalitikus domén felszínén található β-él - a hidroláz magját alkotó 8 szálú β-redő legkülső tagja. Ez a β-él általában erősen kölcsönhatásra hajlamos, amiloidogén szekvencia-motívumokat hordoz. Azonban ezeknek az asszociációs motívumoknak a pontos szekvenciája és a kölcsönhatásba lépő monomerek relatív orientációja jelentősen eltérhet.

A fehérjék multimerizációjának módja és célja a mai napig vita tárgyát képezi. A fehérjék nagy része homodimer formában aktív[112], de gyakori a homo- és heteroasszociáció magasabb foka is, míg a humán enzimek csak kb. 1/4-ének aktív formája monomer[113]. A multimerizáció számos

előnnyel jár, amelyek részben a felület és a térfogat arányának csökkenéséből erednek: visszaszoríthatja a denaturációt és a nem-specifikus asszociációkat, növelheti az aktív helyek stabilitását a belső mozgás csökkentésével és térbeli védelmük megerősítésével, csökkentheti az aggregációs hajlamot a kölcsönhatásra hajlamos régiók leárnyékolásával, valamint lehetővé teszi a kooperativitást és az allosztériát[114-116]. A homo-multimer állapot a multimerizáció egy speciális esete, mely a kölcsönhatásra hajlamos felületeket tartalmazó monomer egységek önasszociációjának eredménye - szemben bármely más fehérje (vagy nem fehérje) partnerrel való társulással; kialakulásához jelentős entrópikus hátrányt kell a rendszernek leküzdeni. Ehhez homomer kontaktfelületek nagyfokú szelektivitására van szükség, amelyet a belső dinamika, az inzerciók és deléciók, valamint a kölcsönhatási felületektől távoli régiók finomhangolnak és modulálnak a különböző funkciók kialakítása érdekében[117,118]. Ugyanakkor olyan példákat is könnyen találhatunk, ahol elérő topológiájú vagy tagszámú homo-multimer formák azonos funkciót töltenek be. Ezekben az esetekben az asszociációs felületek sokszor sem konzerváltak vagy rögzítettek, a monomerek külső felülete mentén eltolódhatnak[116]. A multimer formák komplexitása tehát lehet specifikus funkciók kialakításának eszköze, vagy lehet semleges esetleg adaptív evolúciós folyamatok eredménye is.

Az oligopeptidázok szerkezetének - mint az enzimek nagy részének - két, egymással ellentétes kritériumnak kell megfelelni: a szelektivitást a katalitikus apparátus elrejtésével, míg a hatékonyságot az aktív központhoz való akadálymentes hozzáférés biztosításával lehet garantálni. Első ránézésre az oligopeptidázok topológiája kiválóval alkalmas e feladatokra: a két domén közti tágasabb üregben elhelyezkedő aktív helyet a propeller domén leárnyékolja, de a propeller domént átszelő központi csatorna formájában a szubsztrát be- és a termék kilépése számára egy modulálható méretű és polaritású útvonalat is biztosít. Ez a csatorna azonban, a legtöbb oligopeptidáz esetében annyira szűk, hogy csak teljesen letekeredett, legfeljebb egy tucat aminosavból álló peptideket tud befogadni - ami aligha hatékony. Így a hidrolízis helyszínéhez további útvonalaknak kell vezetniük[111].

Egyes oligopeptidázok esetében a monomer forma felszínén, a két domén érintkezési felülete mentén további bejáratok találhatók, amelyet a propeller domén megrövidült vagy torzult konformációjú lapátjai hagynak szabadon. A DPP-IV esetében például az 1. és 2. lapát görbülete alakít ki tágas oldalsó nyílást[119]. A család más tagjai, mint például a prolil-oligopeptidáz és az oligopeptidáz B esetében viszont azt találták, hogy a monomer egységek a propeller és hidroláz domének csukló-szerű mozgása révén szétnyílhatnak[120],[121], így nyitva utat a katalitikus centrum felé. Mindkét stratégia esetén azonban ismét felmerül a szelektivitás kérdése – ha könnyen megközelíthetővé válik a tágas zsebben elhelyezkedő proteáz apparátus, akkor vajon miként válogatják ki ezek az enzimek a hasítandó szubsztrátokat az összes többi oligopeptid és fehérje közül. Elsődleges kérdésünk az AAP enzimekkel kapcsolatban tehát az volt, hogy a doménmozgások kínálta flexibilitás és a multimerizáció foka és mintázata összefügg-e, valamint hogy együttműködésük vagy akár versengésük hogyan befolyásolja a szubsztrát-szelekciós folyamatokat és hatással van-e a katalízis hatékonyságára.

Az AAP, szerkezetének összetettségén túl, fiziológiánk szempontból is igen érdekes enzim. A humán, tetramer AAP mindenekelőtt exopeptidáz, az N-acetilezett (N-Ac) aminosavak eltávolítását katalizálja oligopeptidek és fehérjék N-terminusáról[122]. A fehérjék N-Ac motívumának eltávolítása jelentős változásokat eredményez olyan alapvető fizikai-kémiai tulajdonságaikban, mint például a töltés, megváltoztathatja a térszerkezetet, a szervezeten belüli lokalizációt és a fehérje-fehérje kölcsönhatásokat, de talán az a legfontosabb hatása, hogy befolyásolja az ubikvitinációt és - ezen keresztül - a fehérje lebontásának helyszínét és időpontját[123,124]. Bár a fehérjék élettartamának a terminális N-Ac hozzáadásával vagy eltávolításával történő szabályozása még korántsem tisztázott, az AAP jelentős szerepet játszik a

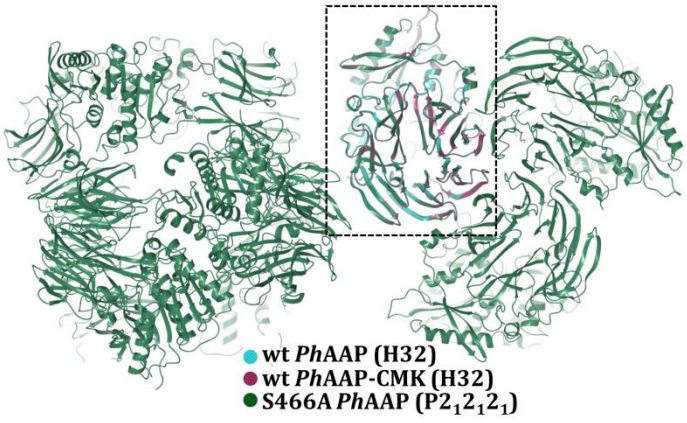
fehérjék érési és lebontási folyamataiban, valamint a proteaszóma kulcsfontosságú upstream modulátora. Az AAP downregulációja az ubikvitin-proteaszóma rendszer (UPS) megzavarása révén a hibásan feltekeredett, oxidatív károsodást szenvedett fehérjék felhalmozódásához vezet[125,126]. Az UPS összetevőinek gátlását rákellenes terápiás stratégiaként alkalmazzák, és intenzíven kutatják a lehetséges további célpontokat. Így az AAP-t is farmakológiai célpontként jelölték meg a petefészek[127]-, csont[128,129]-, bőr[130]-, vastagbél-, tüdő[131]-, vese[132]- és prosztatarák[133] bizonyos típusaiban, és az érintett betegek sugárterápiájának sikerében is szerepet játszik[134].

Az emlős AAP szubsztrát-köre - az acetilált fehérje vagy peptid terminusokon túl is - nagyon tág és változatos. Kísérleti eredmények utalnak arra, hogy az AAP képes amiloid aggregátumok hasítására és ezen keresztül a kognitív fejlődési folyamatok modulátora lehet[135]. Hozzájárul a DNS-károsodások javítási mechanizmusaihoz[136] és az onkogén K-Ras fehérje membránlokalizációjához, valószínűleg a foszfatidil-szerinnel való kölcsönhatása révén[137]. Irreverzibilisen gátolható karbapenem antibiotikumokkal[138] és organofoszfát peszticidekkel[135] és hasítani képes egyes glukuronát metabolitokat[139] és foszfonsav-antibiotikumok lipofil észtereit is[140].

Vizsgálataink során fehérje-krisztallográfiai és krio-elektronmikroszkópos kísérleteket végeztünk majd az eredményeket, klasszikus molekulamodellezési számítások és QM/MM számítások segítségével értelmeztünk – ez a téma adott számomra lehetőséget a fehérje kristályosítás, és röntgendiffrakciós és krioelektronmikroszkópiás mérések, valamint a szerkezet-meghatározás feladataiban való részvételhez. Az emlős eredetű (sertésmájból tisztított) AAP kristályosítási kísérleteivel párhuzamosan, két másik, könnyebben kristályosítható, ősbaktérium eredetű rendszert is vizsgáltunk – egy dimer és egy hexamer AAP-t, melyek az emlős AAP tetramer szerkezetével később kiegészülve egyedülálló lehetőséget biztosítottak a multimerizáció folyamatainak tanulmányozásához.

A *Pyrococcus Horikoshii* AAP (*Ph*AAP) hexamer formában aktív. Bár a hexamer elrendeződés egyedülálló a klasszikus szerin proteázok között, az intracelluláris proteázok tágabb családján belül magas tagszámú, homo-multimer aktív formája van például a Gal6/bleomicin hidroláznak, a trikornis proteáznak, a Lon proteáznak vagy a proteaszómák komplex rendszereinek.

A *Ph*AAP hexamer kristályszerkezetét 3 verzióban határoztuk meg, melyek két különböző kristályformában kristályosodtak. Két adatkészlet R32 szimmetriájú kristályokból származik, ahol a hexamert felépítő hat monomer kristálytanilag egyenértékű – azaz szerkezetük azonos. Ezek közül az egyik az enzim natív (wt *Ph*AAP) szubsztrátmentes formáját tartalmazza, míg a másik az aktív centrum Ser és His aminosavaihoz kovalensen kötött klórmetil-keton-inhibitorral (CMK) kialakított komplexet (wt *Ph*AAP-CMK). A harmadik szerkezet ortorombos szimmetriájú, két szubsztrátmentes S466A *Ph*AAP (a katalitikus szerin lecserélésével előállított inaktivált variáns) hexamert tartalmaz az aszimmetrikus egységben, a hexame-ren belüli monomerek szimmetriájára és topológiájára vonatkozó krisz-tallográfiai korlátozások nélkül. Mivel nem állt rendelkezésre molekuláris helyettesítés módszerének alkalmazá-sát lehetővé tevő, megfelelően hasonló kristályszerkezet, nehézfém sóval származékolt kristályokat használtunk



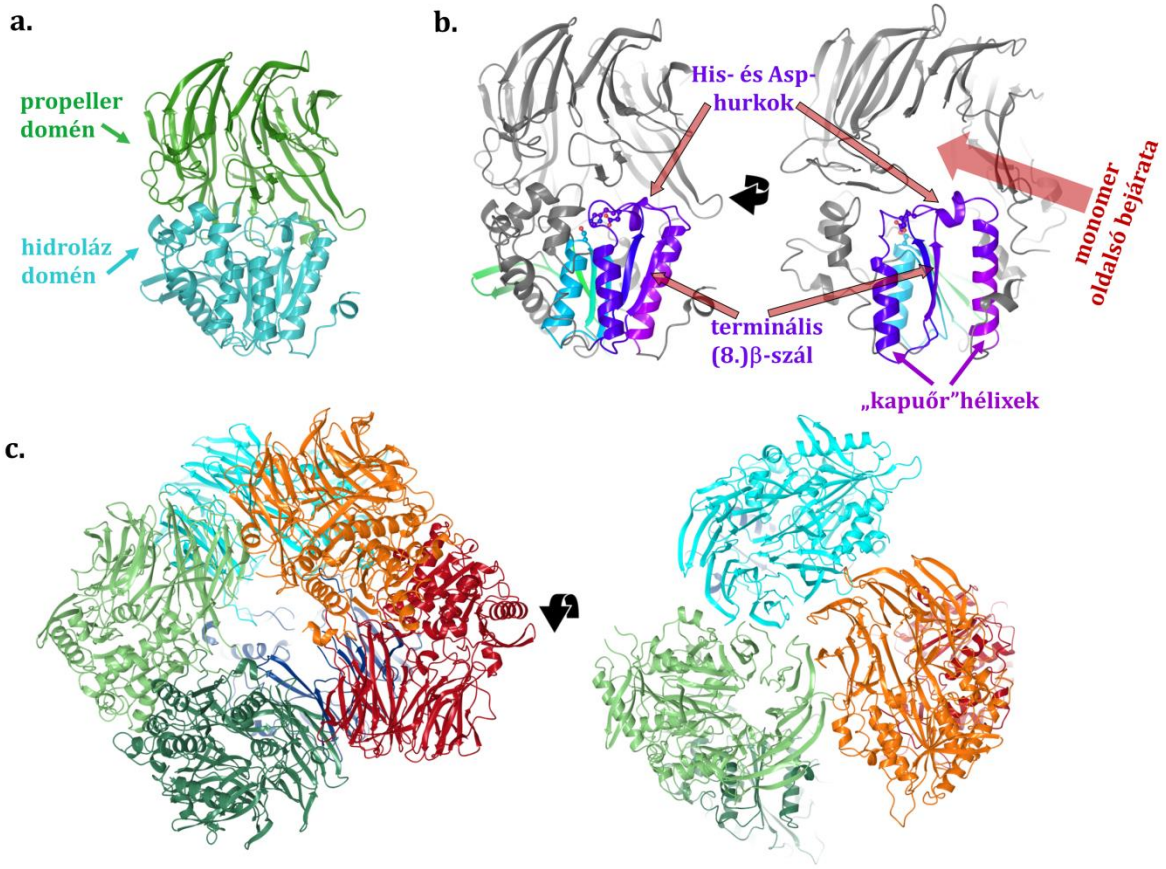
54. ábra. A három meghatározott szerkezet, a szaggatott vonallal bekeretezett monomer-egységek illesztése után.

a fázismeghatározáshoz. A méréseket a laboratóriumunkban található diffrak-tométer segítségével, valamint szinkrotron forrásoknál (Deutsches Elektronen-Synchrotron (DESY) és European Synchrotron Radiation Facility (ESRF)) végeztük.

Az egyes hexamereken belül és a különböző szerkezetek között is, a *Ph*AAP monomer egységei nagyon hasonlóak voltak: a szubsztrát-mentes szerkezetre való illesztés után a C_α atomok rms eltérése a wt *Ph*AAP-CMK szerkezet esetében 0,23 Å, az S466A *Ph*AAP szerkezet 12 molekulája esetében pedig 0,25 és 0,41 Å között volt. Továbbá az általános hexamer forma is meglehetősen hasonló mindhárom szerkezetben, ami azt jelzi, hogy a *Ph*AAP hexamer egy jól meghatározott szerkezetű, szimmetrikus objektum; sem a katalitikus triád elvesztése, sem a szubsztrátkötődés nem okoz karakterisztikus változásokat (54. ábra).

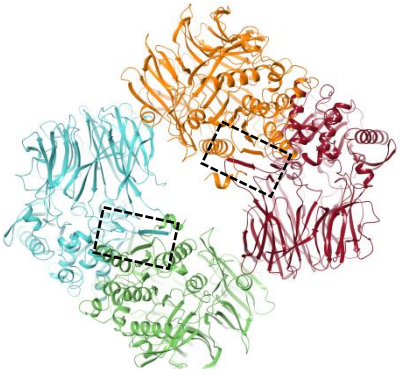
Az *Ph*AAP monomer szerkezetét érdemes kicsit részletesebben áttekinteni, hogy a később felmerülő további szerkezetek referenciájaként is lehessen használni. A monomer egy kupola alakú, hét lapátos β-propeller doménből és az α/β-hidroláz feltekeredési mintázatot mutató katalitikus doménből áll. A β-propeller domén minden egyes lapátja négy antiparallel β-szálat tartalmaz. A két domén között egy nagy (körülbelül 22 Å átmérőjű) üreg található, amely az aktív helyet is tartalmazza. A két domén határfelületén egy oldalsó nyílás (12 × 16 Å) található (a 2. lapát alatt), amelyet az 1. és 3. lapát szegélyez. A 2. lapát ~ 7 Å-el rövidebb, mint más oligopeptidázokban és el is van tolódva felfelé. A katalitikus S466 egy - rövidsége és topológiája miatt merev - hurkon helyezkedik, mely el egy β-szálat (a domén szerkezeti magját alkotó nyolcszálú β-redő 5. szála) és egy hélixet köt össze. Az S466 gerinckonformációja így a Ramachandran-térkép optimumán kívül esik, tehát a fehérje fold maga (is) aktiválja a katalitikus aminosavat, nem csak a Ser-His-Asp triádban elfoglalt pozíciója. Ez a tulajdonság konzervált az oligopeptidázok között, mint ahogy az is, hogy a katalitikus triád másik két tagja a szomszédos, hosszabb hurkokon (His-hurok/Asp-hurok) helyezkedik el. Ezek a hurkok szintén a központi a β-redő szálairól (a 7.-ről és a 8.-ról) indulnak ki és abban a két hélixben végződnek, melyek a központi redő szélén, mint két oszlop, „őrt állnak". Így a His- és Asp-hurkok közvetlen kapcsolatot teremtenek az eltemetett katalitikus Ser és a domén felszíne között.

A *Ph*AAP esetében az Asp-hurok jól strukturált, 4 hurkon belüli H-híd kötéssel, hasonlóan a család többi tagjának hasonló szegmenseihez. A *Ph*AAP His-hurkának jól meghatározott jellege azonban egyedülálló; 6 intra-loop H-híd kötés járul hozzá a belső stabilitásához. Az oligopeptidázok között ilyen merev His-hurok egyetlen másik fehérjében található csupán, a DPP IV (dipeptidil peptidáz IV) esetében, ahol ebben a régióban 4 H-híd kötés található. A többi oligopeptidáz szerkezetében 0-2 intra-loop H-híd kötés található a megfelelő His-hurkokban – ezekben a rendszerekben a His-hurkok konformációját elsősorban a szomszédos Asp-hurkokkal kialakított, és a domének közti (hidroláz-propeller típusú) kölcsönhatások határozzák meg. A *Ph*AAP-ban a His-hurkot és az Asp-hurkot a katalitikus H578-D546 kölcsönhatáson kívül öt H-híd kötés köti össze egymással, de sem a His-, sem az Asp-hurok nem alakít ki közvetlen doménközi kölcsönhatásokat a propeller doménnel. Ez azért van így, mert érdekes módon ez a két hurok a propeller rövidített 2-es lapátjával szemben helyezkedik el és a belépőnyílást szegélyezi, így a katalitikus reakcióban való részvétel mellett ezek a hurkok a szubsztrátok szűrésében és irányításában is részt vehetnek (55. ábra).



55. ábra. A meghatározott *Ph*AAP szerkezetek sajátságai. a.) A *Ph*AAP monomer domén-szerkezete. **b.)** A PhAAP monomer hidroláz domén felépítése: a központi β-redőt, valamint a rövid Ser-kanyarhoz, a His- és Asp-hurkokhoz tartozó helixeket színekkel kiemeltem (A katalitkus triád aminosavanak atomjait gömbökkel jelenítettem meg, a katalitikus S466 középkék, a H578 sötétkék, az D546 pedig lila). **c.)** The PhAAP hexamer: dimerek trimere, azaz 3 dimer-párból épül fel (világoszöld-sötétzöld, világoskék-sötétkék és narancs-piros).

A *Ph*AAP hexamerek dimerek trimereiként alakulnak ki, azaz itt 3 dimer-pár asszociációjáról van szó, ahol a dimereken belül mind az eltemetett felületek nagysága, mind a dimerizáció szabadentalpia-hozzájárulása kedvezőbb, mint a trimereké. A dimer kölcsönhatási felszín két β-szál antiparallel orientációjú egymáshoz illeszkedése révén jön létre. A hidroláz domének amiloidogén terminális β-szála mellé a szomszédos monomerek propeller doménjének egy nyúlványa koordinálódik: a propeller 3. lapátjához csatlakozó hosszú inzerció (26 aminosavat tartalmazó „betoldás") egy β-konformációjú szakasza (56. ábra).



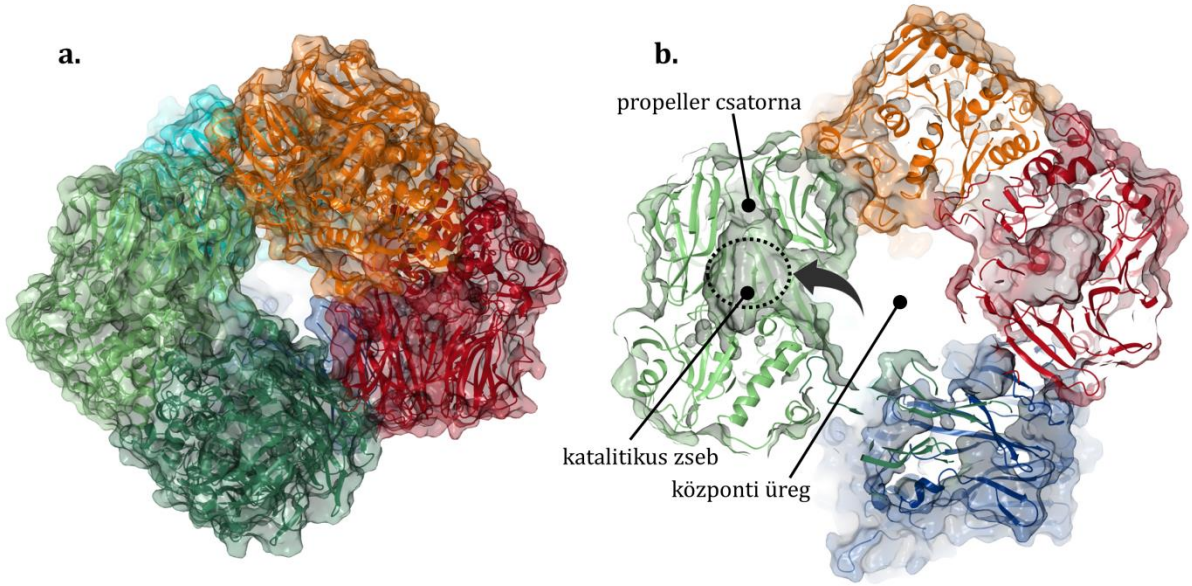
56. ábra. A PhAAP dimer felszínei: szaggatott vonallal bekeretezve

A hexamer felületén három nagy, kb. 20 × 30 Å méretű nyílás található, amelyek csatornákként folytatódnak és a hexamer közepén egy nagy üregben egyesülnek. Az egyes monomerek úgy helyezkednek el, hogy a domének közti belépő nyílások befelé fordulnak és szintén a hexamer e központi üregéhez kapcsolódnak.

A hexamerizáció tehát egy duplán „kapuzott", kompartmentalizált belső teret hoz létre. A két egymást követő nyílás – a hexamer felszínén, illetve a monomerek oldalán található - és a köztük lévő komplex csatornarendszer elegendőnek tűnik a szubsztrátok szűréséhez: azok a szubsztrátok jutnak el a katalízis helyéhez és fognak ott proteolízist szenvedni, amelyek elég

kicsik ahhoz, hogy a felszíni nyíláson keresztül belépjenek központi üregbe, és elég flexibilisek ahhoz, hogy a monomer-nyílásokon is áthaladjanak.

*Ph*AAP esetében tehát egy merev homomultimer struktúra épül fel. Az aktív hely jól definiált – a rövid, feszült hurkon elhelyezkedő aktív Ser oldalláncot az intra-domén H-hidakkal kimerevített His-hurok által pozícionált triád His koordinálja. A monomer egységek permanens oldalsó bejáratait a hexamerizácó rejti el, és a hexamerizáció nyújt elrejtettséget a hidroláz domén felszínén található amiloidigén szálnak is (57. ábra). Nehéz itt ok-okozati összefüggés megállapítani – de úgy is tekinthetjük ezt a folyamatot, hogy a hidroláz domén „ragadós" β-élei irányítják a monomerek egymáshoz-rendeződését és a szubsztrátszelekciós csatorna-rendszer kialakulását.



57.ábra. A *Ph*AAP szerkezeteket tagoló nyílások és csatornák. a.) A *Ph*AAP hexamer szerkezete a felszíni „beléptető-kapuval". **b.)** A hexamer belsejében található tágas, központi üreg és a befelé forduló monomeregységek oldalsó nyílása. Ebben a nézetben a zölddel jelölt monomer oldalsó nyílása látható: ezt jelzi a széles fekete nyíl mely a (bekarikázott) katalitikus zsebbe (a propeller és hidroláz domének közé zárt térrészbe, mely az aktív hely található) vezet és szintén látható a zsebet a „külvilággal" összekötő szűk propeller csatorna.

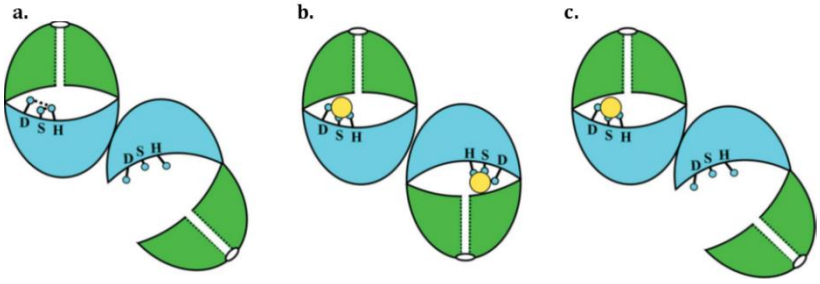
A másik általunk (is) tanulmányozott ősbaktérium eredetű AAP (*Aeropyrum pernix* AAP: *Ap*AAP) homodimer formában aktív. Korábban meghatározott szerkezetei kompakt, zárt konformációt mutattak, amelyben propeller domén megakadályozza a szubsztrát hozzáférését mindkét alegység aktív centrumához[141]. Nekünk sikerült, nagyon hasonló kristályosítási körülményeket használva, egészen másfajta szerkezeteket megfigyelnünk. Munkánk első szakaszában az *Ap*AAP ligandum-mentes állapotának szerkezetét tanulmányoztuk, a wt enzim mellett két mutáns variáns szerkezetét is vizsgálva, amelyekben a katalitikus Asp oldalláncot Ala (D524A) illetve Asn (D524N) oldalláncra cseréltük. A meghatározott 4 szerkezet nyitott és zárt monomerekből felépülő „felemás" dimerpárokat, illetve egy esetben egy nyitott/nyitott dimert tartalmazott. A szerkezetek egymáshoz nagyon hasonlóak voltak, így arra a következtetésre jutottunk, hogy a korábbi zárt/zárt dimerektől eltérő konformációk nem pusztán a mutációk hatására jönnek létre, hanem ezek az *Ap*AAP robusztusnak tekinthető, stabil állapotai.

Az *Ap*AAP szerkezetének felnyílása a hidroláz és a propeller domén egy kagylóhéj ~ 30°-os felnyílásához hasonló merev-test elmozdulása. A „sarokpánt"-ot (vagy zsanért) a hidroláz domén D376 aminosava alakítja ki, amely öt doménközi H-kötést képez, amelyek a nyitott formában is megmaradnak. Az *Ap*AAP zárt formáját további kiterjedt domén-közi H-híd hálózat

stabilizálja, azonban ezeknek a kölcsönhatásoknak nagy része a felnyíláskor elveszik. Leginkább a sarokpánt régióval átellenes oldalon, a legnagyobb felnyílásnál található régió érintett a felnyíláshoz köthető átrendeződésekben; itt egy propeller domén-beli hurok és a vele szemben elhelyezkedő, a katalitikus His-t hordozó hidroláz hurok kölcsönhatása alakít ki szoros kapcsot zárt állapotban. A katalitikus triád D524 (a mutánsok esetében A524, vagy N524) aminosavát hordozó Asp-hurok szintén hozzájárul az enzim zárt konformációjának stabilizálásához, így a szerkezet felnyílásakor ez is átrendeződik. Az *Ap*AAP nyitott formájában az Asp/Ala/Asn-hurok csupán eltolódik, míg a His-hurok jelentős konformációs változáson megy keresztül, és teljes egészében oldószer-hozzáférhetővé válik. Az Asp/Ala/Asn-hurok gerincszerkezeti atomjaihoz tartozó B-faktorok (azaz a mozgékonyság) növekedése 20-30%-os, míg a His-hurok esetében 40-50%-os. Bár ez utóbbi nem jól felbontható az elektronsűrűségi-térképeken fokozott rugalmassága miatt, a gerincvonala azonosítható, így megállapíthattuk, hogy a katalitikus His Cα atomja a különböző szerkezetekben 3,4-5,0 Å-t mozdul el a szerkezet felnyílása következtében. Ez a merev monomerekből építkező hexamer *Ph*AAP esetével épp ellentétes, ott a hurkokon belüli H-hidak formálják ezeket a fontos szegmenseket, míg az *Ap*AAP esetében inter-domén kölcsönhatások. A His-hurok átrendeződése funkcionális jelentőséggel bír, a nyitott forma esetében tapasztalt elmozdulása és destabilizációja a katalitikus triád széteséséhez vezet. Mindezek alapján arra a elképzelésre jutottunk, hogy bár az *Ap*AAP nyitott formája hozzáférhetővé teszi az aktív helyet, az enzim csak azokat a ligandumokat fogja elhasítani, amelyre rá tud záródni, azaz amelyek kompatibilisek a zárt konformer térbeli és elektrosztatikai mintázatával.

Az *Ap*AAP felnyílásakor oldószer-hozzáférhetővé váló felületek majdnem ugyanannyi hidrofób, mint hidrofil aminosavat tartalmaznak (55, illetve 45%). Mivel a nyitott és zárt formák három esetben is 1:1 arányban jelentek meg a kristályszerkezetekben, úgy tűnik, hogy ennek a két konformációnak az energiája nem tér el jelentősen. Így, bár a nyitott formában az eredeti (inter-domén) kapcsolatok nagy része elvész, a poláris oldalláncok szolvatációja valószínűleg kompenzálja az ehhez tartozó energiaveszteséget. Figyelembe véve azt is, hogy méréseink szerint az enzim nagyon hatékony katalizátor (amit a magas, ~ 8 $\mu M^{-1}s^{-1}$-es k_{cat}/K_m értéke is jelez), arra a következtetésre jutottunk, hogy az enzim egyensúlyi állapota, a nyitott és zárt formák gyors, dinamikus egyensúlyaként képzelhető el.

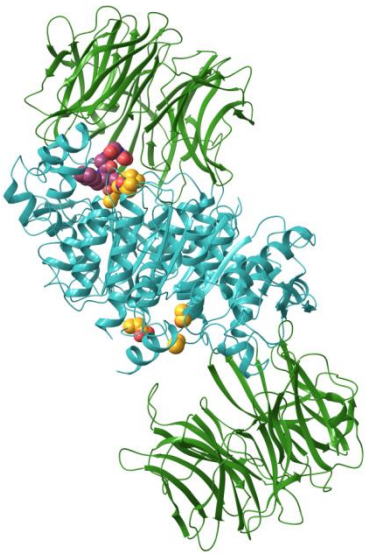
Feltételezésünk alátámasztásához az enzim specifikus inhibitorokkal képzett komplexeinek szerkezetét is meghatároztuk. A komplexeket két eltérő megközelítést alkalmazva állítottuk elő: az egyik esetben együtt kristályosítottuk az *Ap*AAP és a benziloxokarbonil-Gly-Gly-Phe-klorometil-keton (BzGGF-CMK) inhibitor 1:2.5 arányú keverékét, a másik esetben az *Ap*AAP nyitott/zárt vegyes-dimereit tartalmazó kristályokat áztattunk be az inhibitort tartalmazó oldatba. Az első eljárás zárt/zárt topológiájú *Ap*AAP-inhibitor dimer-párokat eredményezett, míg a második esetben a nyitott/zárt dimereknek csak a zárt monomeréhez kötődött hozzá a



58.ábra. Az *Ap*AAP dimer általuk meghatározott szerkezeteinek sematikus képe. a.) A *Ap*AAP ligandummentes állapotának nyitott/zárt topológiájú szerkezete. **b.)** Az ApAAP/BzGGF-CMK komplex zárt/zárt szerkezete. **c.)** A nyitott/zárt topológiájú komplex. A sárga gömbök az inhibitort jelölik.

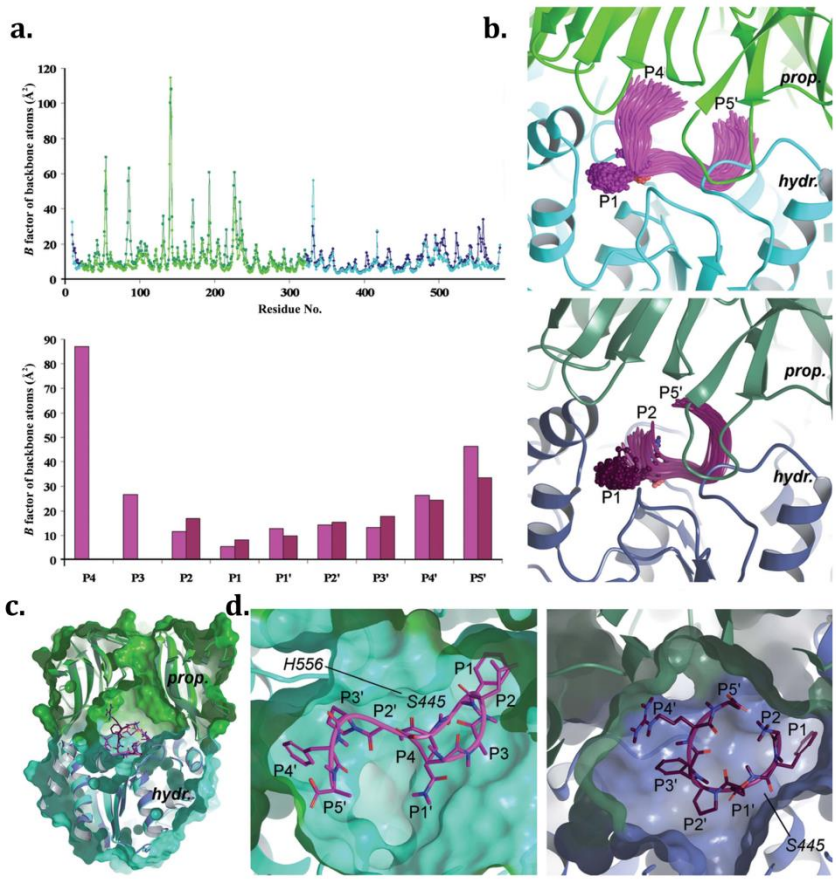
kovalens inhibitor (58. ábra), így nem csak konformációjukra, de összetételükre nézve is felemás dimereket kaptunk. (59. ábra).

Ezek eredmények alátámasztották az a feltételezésünket, hogy az *Ap*AAP nyitott formája inaktív konformáció. A meghatározott kristályszerkezetek alapján az is kijelenthető volt, hogy a zárt forma kis ligandumok számára áthatolható: az előre elkészített kristályhoz adott inhibitor képes volt elérni a zárt monomerek aktív centrumát, amit csak úgy lehet elképzelni, hogy a propeller domén szűk csatornáján keresztül haladva tette ezt – hiszen a kristályszerkezet pakolódása nem teszi lehetővé, hogy a zárt forma átmenetileg felnyíljon (vagy jelentősen átrendeződjön) alternatív hozzáférési útvonalakat hozva létre.



59. ábra. A *Ph*AAP-BzGGF-CMK komplex nyitott / zárt szerkezete: az előreformált apo-kristály beáztatásával nyert hibrid struktúra (alul az inaktív, ligandummentes nyitott monomer, felül a zárt ás ligandum-kötött monomer látható (az aktív hely aminosavainak C atomjait sárgával, az inhibitort lilával jelöltem, a hidroláz domén világoskék, a propeller domén zöld).

Azért, hogy jobban megértsük a *Ap*AAP ligandumkötési-kapacitását, két ismert peptid-szubsztrátjával képzett komplexének szerkezetét vizsgáltuk MD szimulációk segítségével: az egyik 9 aminosav hosszúságú (EALFQGPFA; a továbbiakban L1), a másik 7 aminosav hosszúságú (GFEPFRA; a továbbiakban L2). Az *Ap*AAP az oligopeptid szubsztrátjait Phe (és - lényegesen kisebb aktivitással - Leu) oldalláncok után hasítja. Az L1 esetében az elsődleges hasadási hely a F4, míg az L2 esetében az F2. A szubsztrátokat a zárt *Ap*AAP-monomer ligandumkötő zsebébe építettük be úgy, hogy az elsődleges hasadási helyük P1-oldalláncai a kristályszerkezetben található CMK-inhibitoréval legyenek átfedésben. Ezután MCMM módszerrel optimáltuk a szubsztrátok helyzetét és konformációját, majd az előállított komplexek 200 ns-os MD-szimulációja következett, mely során a szubsztrátok a domének közötti tágas üregben stabil kötőhelyet találtak anélkül, hogy az enzim zárt formájának szerkezetét megzavarták volna: az *Ap*AAP monomer kristályszerkezetek-beli és a szimulációval származtatott gerincszerkezetét 1,1 és 1,2 Å közötti rmsd értékekkel lehetett illeszteni. Az oxi-anion zseb gerinc-amid csoportjaival kialakított két konzervált H-híd és a P1 Phe oldallánccal kompatibilis S1 zsebbel kialakított kölcsönhatások a szubsztrátokat a katalitikus triád közelében tartják (a katalitikus S455 Oγ1 és a hidrolizálandó peptid kötés karbonil C atomja közötti távolság 3,4±0,2 és 3,3±0,2 Å volt, az ApAAP-L1 és az ApAAP-L2 esetében) kényszerfeltételek alkalmazása nélkül is. Azonban ehhez a domének közelsége is szükséges, melyet a zárt konformáció garantál: a P2, P4’ és P5’ pozíciókban található oldalláncokat befogadó zsebek kialakításában a hidroláz és a propeller domén aminosavai egyaránt részt vesznek (60. ábra).



60. ábra. Az *Ap*AAP-L1 és *Ap*AAP-L2 komplexek MD szimulációval számított szerkezetei. a.) A szimuláció 100-200 ns-os időtartományához tartozó (a gerincatomok mozgékonyságát jellemző) B-faktorok (propellerdomén, zöld; hidrolázdomén, cián és kék; ligandum, magenta és lila; a szubsztrát aminosavak jelölése Schechter & Berger (1967) nomenklatúra szerint történt): felül az *Ap*AAP aminosavaira, alul a szubsztrát esetében számított értékek láthatók, a szekvencia függvényében. **b.)** Az egyensúlyi szakaszhoz tartozó szubsztrát konformációk (klaszter közép-szerkezetek) az *Ap*AAP-L1 (fent) és az *Ap*AAP-L2 (lent) komplexek esetében. **c.)** A két komplex összevetése (MD szimuláció során leggyakrabban előforduló konformációban): *Ap*AAP-t molekulafelületeként ábrázolva, a propellercsatorna alatti tágas belső üregben kötött szubsztrátokkal (keresztmetszet; a propellerdomén zölddel, a hidrolázdomén ciánkékkel, az L1 és L2 szubsztrátok magentával, illetve lilával vannak jelölve). **d.-e.)** Közelkép a szubsztrát-kötő üregről. Az L1 (d) P1 Phe-ja az S1 specificitási zsebbe merül, míg a P2 Leu és a P4' Phe a két domén által kialakított hidrofób zsebekbe illeszkedik. Az L2 (e) P4' Arg-oldallánca a hidrofób felülettől a propellercsatorna felé húzódik.

Az *Ap*AAP nyitott formája tehát a lehetséges szubsztrátok „begyűjtőjeként" és előszűrőjeként funkcionálhat, azok tényleges hasítása azonban valószínűleg csak akkor történik meg, ha az enzim képes újra bezáródni, hogy a kötőzsebek és - a His-hurok stabilizációján keresztül - a katalitikus triád is újra-formálódhasson.

Az emlős AAP szerkezetmeghatározási kísérletei hosszú múltra tekintenek vissza. A fehérje előállításáról, tisztításáról és a krisztallográfiai vizsgálatok előzetes eredményei szóló jelentések[142,143] ellenére az emlős AAP szerkezetét a felfedezése[144] óta eltelt több mint négy évtized alatt nem sikerült meghatározni. Az archeális és bakteriális AAP-k szerkezetei nem alkalmasak az emlős AAP szerkezetének modellezésére (különösen a kutatásunk kezdeti szakaszában hozzáférhető homológia-modellező eljárásokat alkalmazva), mivel nem csak alacsony szekvencia-azonosságot mutatnak az emlős enzimmel (13-20%), hanem eltérő oligomer formákat is vesznek fel. Mivel nem járt sikerrel a humán fehérje bakteriális expressziója (kutatócsoportunkban), úgy döntöttünk, hogy optimalizáljuk az AAP sertésmájból való izolációjának és tisztításának protokollját[145], és az így nyert fehérjével (pAAP) fogjuk a

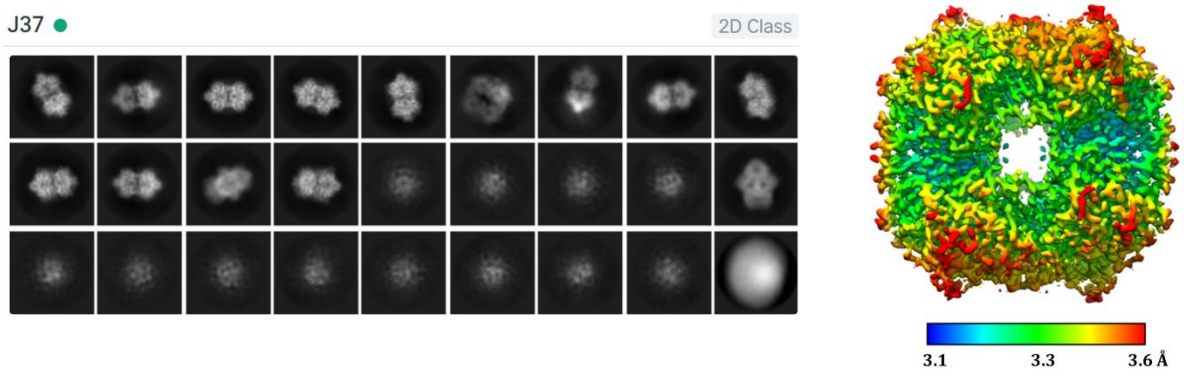
szerkezetmeghatározást megkísérelni. Ezt a munkát javarészt Kiss-Szemán Anna (akkor még) PhD hallgatónk végezte. Számos kristályformát sikerült előállítanunk és a kristályokról a laboratóriumunkban található diffraktométerrel és több európai szinkrotron-forrás specializált mérőállomásinál adatkészleteket gyűjtenünk, de a szerkezetmeghatározás nekünk sem sikerült: a kristályok vagy nagyon vékonyak voltak és így a szórás-képük is - legalább egy irányban - nagyon alacsony felbontású volt, vagy különböző fajta ikrességet mutattak (leggyakrabban merohedrális ikrességet), ami megakadályozta az adatfeldolgozást (61. ábra).



61. ábra. A *p*AAP kristályai és egy tipikus (ikres) szórási kép. A bemutatott kristályokat az Kiss-Szemán Anna PhD hallgatónk állította elő, az általa sertésmájból kivont és tisztított pAAP-t felhasználva.

A nagy áttörést a krio-elekronmikroszkópiás (krio-EM) technikához való hozzáférésünk hozta el, amely a fehérje mérete folytán (krio-EM-el a nagyobb rendszerek jobban vizsgálhatóak) ideálisnak mutatkozott ennek a problémának a megoldásához.

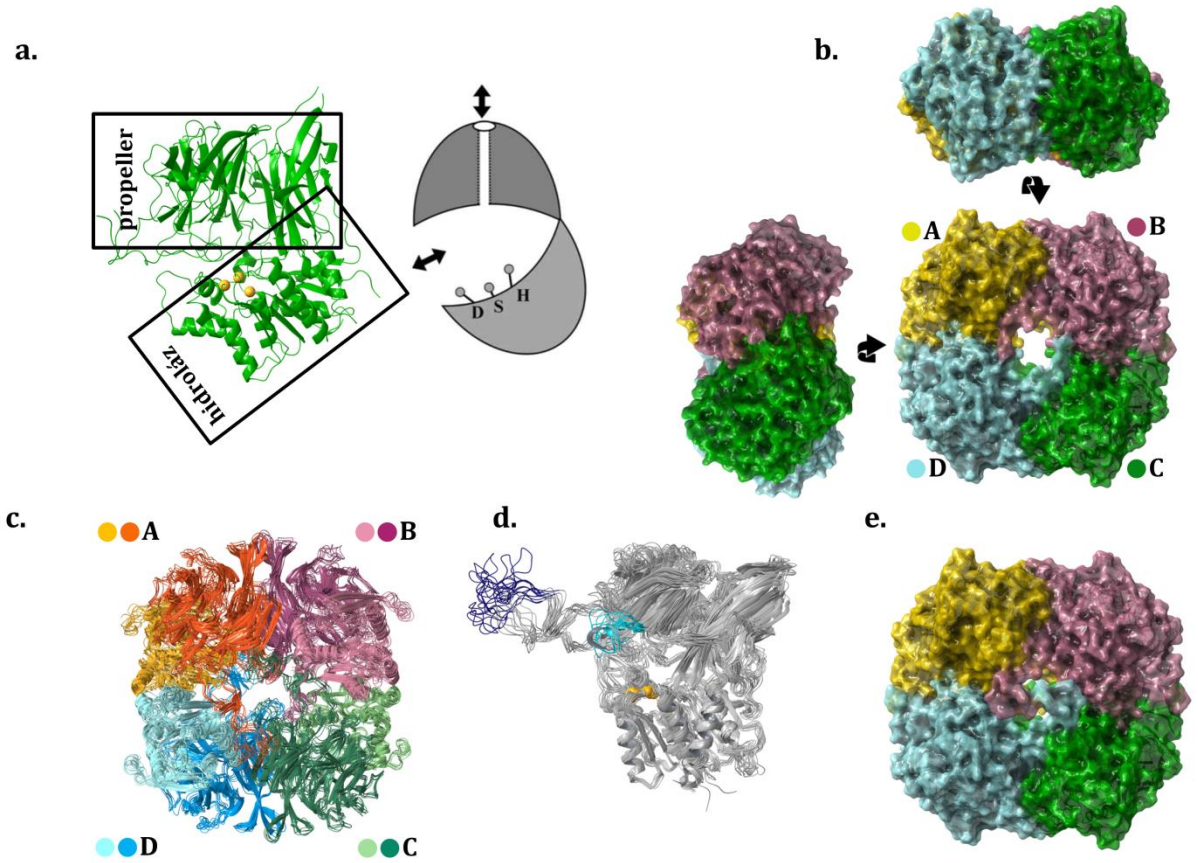
Elsőként a pAAP tetramer ligandum-mentes állapotának szerkezetét határoztuk meg 3,3 Å felbontással (a mérést JEOL CryoARM 300 készülékkel végezték Japánban a JEOL laboratóriumában, 1200 mikrográfot rögzítve – az adatfeldolgozás azonban már csoportunkban történt: a 3D rekonstrukciót (szerkezetmegoldást) Kiss-Szemán Anna PhD hallgatónk végezte, Dr. Harmat Veronika és jómagam a modellalkotás egyes lépéseihez asszisztáltunk (korrekciók, szimmetria- és pixel-méret meghatározás, szerkezet-építés, validáció) – ez a később bemutatásra kerülő AAP krio-EM szerkezetek esetében is így volt. A teljes szerkezet toroid alakú, D2 szimmetriát mutat. Két nagy nyílás található a külső (oldószer-hozzáférhető) felszínen, amelyek egy központi üregbe vezetnek, ahonnan a monomer egységek aktív helyei elérhetők – nagyon hasonló módon, mint a *Ph*AAP hexamer szerkezete esetében (62. ábra, 63. ábra: a,b.).



62. ábra. A ligandum-mentes *p*AAP krio-EM szerkezetmeghatározása. Jobbról egy tipikus részecske kiválasztási lépés (a 3D rekonstrukció végül 50000 2D projekció alapján történt), balról a meghatározott krio-EM térkép látható, felbontás szerint színezve.

A meghatározott szerkezet dinamikai sajátságainak jellemzésére, valamint a krio-EM térképbe nem beépíthető (hiányzó) szakaszok modellezésére számításokat végeztünk, kiindulási

modellként a kísérletileg meghatározott szerkezetet használva. A hiányzó szakaszokat (1-9, 39, 110-115, 183-198, 496-497) manuálisan építettük be a modellbe (és energia-minimalizációs eljárással optimáltuk), majd az új hurkok közül a leghosszabbat (183-198 szegmens) 500 lépéses MCMM-LMOD konformációs keresésnek vetettük alá, a modell többi részét befagyasztva. A keresésből származó alacsony energiájú konformerek közül azt választottuk ki, mely leginkább volt összeegyeztethető a kísérletileg meghatározott krio-EM térképpel. Az így kiegészült szerkezetet használtuk a teljes tetramerre vonatkozó MD szimuláció kiindulási szerkezeteként. A szimuláció egyensúlyi szakaszához tartozó szerkezeteket klasztereztük a modellezett hurkok konformációja szerint, majd a leggyakrabban előforduló hurok-konformációkat (mint sokaságot) építettük be a kísérleti térkép alapján meghatározott szerkezetbe. Ez a végső modell tehát a szekvencia ~95%-a mentén a kísérletileg meghatározott atompozíciókat tartalmazza, a hiányzó szakaszokat pedig a számított sokaságok reprezentálják (63. ábra: c-e.). Ezt a modellt használtuk a szerkezetet átszövő csatornák, kötőzsebek, tetramerizációs felszínek, be- és ki-lépési útvonalak tanulmányozásához.

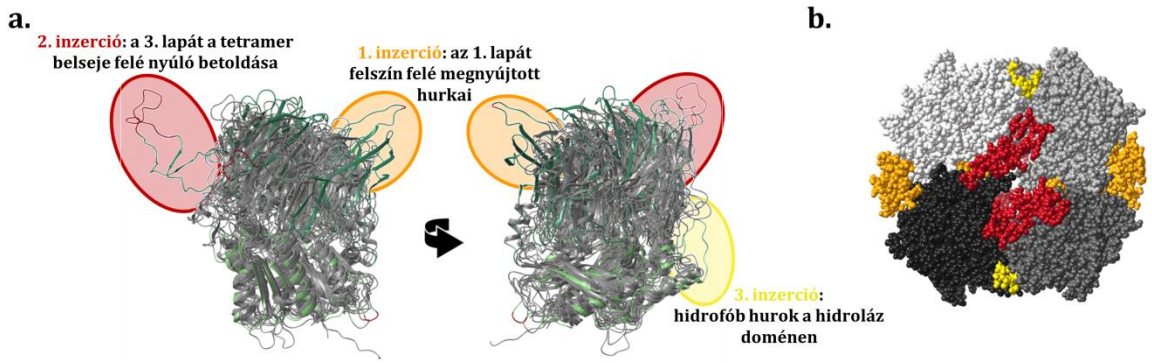


63. ábra. A ligandum-mentes *p*AAP krio-EM szerkezete. a.) A pAAP tetramert felépítő tágas oldalsó nyílással rendelkező monomerek szerkezete. **b.)** Az atomi modellhez tartozó molekuláris felszín – a toroid forma 3 nézetből. **c.)** A tetramer pAAP MD szimulációjának eredménye (az egyensúlyi szakaszhoz tartozó klaszter közép-szerkezetek). **d.)** Az MD szimuláció során előforduló monomer konformációk, kékkel kiemelve a két hosszabb, a kísérleti térkép alapján épített modellből hiányzó szakaszt: a 110-115 szegmens világoskék, 183-198 szakasz sötétkék. **e.)** A kiegészített modell, melyben a felszíni bejáratot akár teljesen el is takarhatja a 183-198 „kapu-őr" szegmens.

A pAAP monomerek nyitott konformációjúak, a propeller és hidroláz doménekˇ 40°-kal nyílnak szét, így a 2. lapát alatti aktív centrum közelében egy tágas bejárat keletkezik, amely a tetramer központi ürege felé fordul. Ez az oldalsó nyílás hasonló méretű, mint az *Ap*AAP nyitott formája esetében. Azonban míg az *Ap*AAP esetében az enzim nyugalmi állapotát inaktivált nyitott és katalitikusan kompetens zárt konformerek dinamikus egyensúlya alakítja, a pAAP tetramert

felépítő monomerek merevek – a domének relatív pozícióját a tetramer kontaktusok rögzítik. A pAAP monomer bejáratát a 3.-5. propeller lapátok hurkai leszűkítik kissé, de így is 20-25 Å a belépési átmérője.

A pAAP monomerének szerkezetét összehasonlítva az S9 család korábban meghatározott tagjainak szerkezetével, három egyedi inzerciót (betoldást – olyan szakaszt, amelynek nincs megfelelője a kanonikus szekvenciában) fedezhetünk fel a felszínén (64. ábra). A 1. lapát mind a négy szála megnyúlt és kitüremkedik a propeller domén külső felszínéből (1. inzerció). A 3. lapát is tartalmaz egy szokatlanul hosszú inzerciót (2. inzerció), amely egy keresztezett hurkot alkot és hozzájárul a tetramer bejáratának kialakításához. Valamint a hidroláz domén szekvenciájában is található egy kiteredt, főként hidrofób oldalláncokat tartalmazó inzerció (3. inzerció).

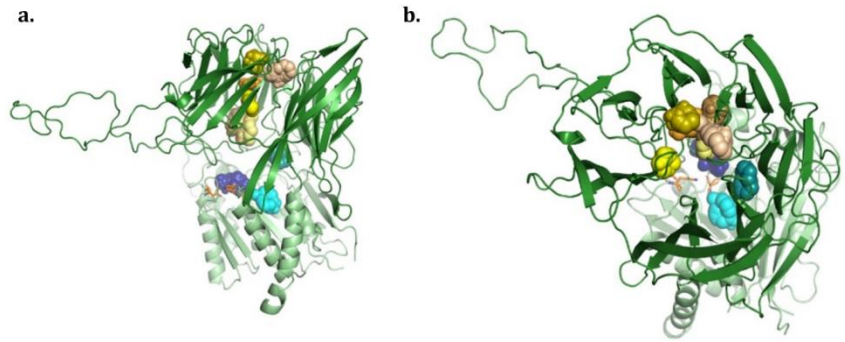


64. ábra. A pAAP emlős-specifikus inzerciói és a tetramer kontakt felszínek. a.) A pAAP monomer (világos és sötétzölddel ábrázolva) és az S9 családba tartozó fehérjék monomereinek szerkezetei (minden kísérletileg meghatározott idetartozó szerkezet – szürkével jelölve) egymásra illesztve. A narancssárga, piros és sárga körök jelölik a pAAP a kanonikus szerkezeten túlnyúló szegmenseit. **b.)** A tetramer forma, melyen az inzerciók az a.) panelnek megfelelően vannak színezve. Látható, hogy az inzerciók jelentős szerephez jutnak a tetramer kontaktusok kialakításában.

A tetramer szerkezetet létrehozó inter-monomer kölcsönhatási felszíneket a PISA szerver[146] segítségével azonosítottuk és rangsoroltuk. Három ilyen felszínt találtunk, melyekre a PISA a következő kölcsönhatási energiákat és komplexképződési szignifikancia pontszámokat (CSS – ez a 0-1ig terjedő érték azt fejezi ki, hogy az adott felszín milyen mértékben járul hozzá a komplex stabilitásához) becsülte: elsődleges felület: -37,9 kcal/mol, CSS=1,0; másodlagos felület: -11,0 kcal/mol, CSS=1,0; harmadlagos felület: -5,7 kcal/mol, CSS=0,08. Mindhárom emlős-specifikus inzert részt vesz a tetramer kulcsfontosságú kölcsönhatási felületeinek kialakításában. Az elsődleges kölcsönhatási felületet többek között a hidroláz domén központi β-redőjének legkülső β-szála, valamint a 2. és 3. inzerciós szegmensek alakítják ki. A másodlagos (az elsődleges felszínre merőleges) kölcsönhatási felületet az 1. inzerciós szegmensek hozzák létre. Ez egy domén-csere kölcsönhatás – a szomszédos monomerek 1. propeller-lapátjai egymásra fonódva, a szomszéd propellerébe illeszkednek. Egy harmadik, jóval kisebb kölcsönhatási felületet is találtunk: a 2. inzert elég hosszú ahhoz, hogy ne csak a tetramer külső felszínét érje el, és a szomszédos egység hidroláz doménje mentén kanyarogjon (az elsődleges felszín részét képezve), hanem a pórus mentén egészen a szemközti oldalon lévő monomerig haladjon, a teljes tetramert egybefűzve. Mivel az 1-3. inzertek csak a pAAP-ban (és a szekvencia-illesztés szerint a humán AAP-ban) jelennek meg, az általunk meghatározott tetramer forma is csak az emlős AAP-k esetében tud felépülni.

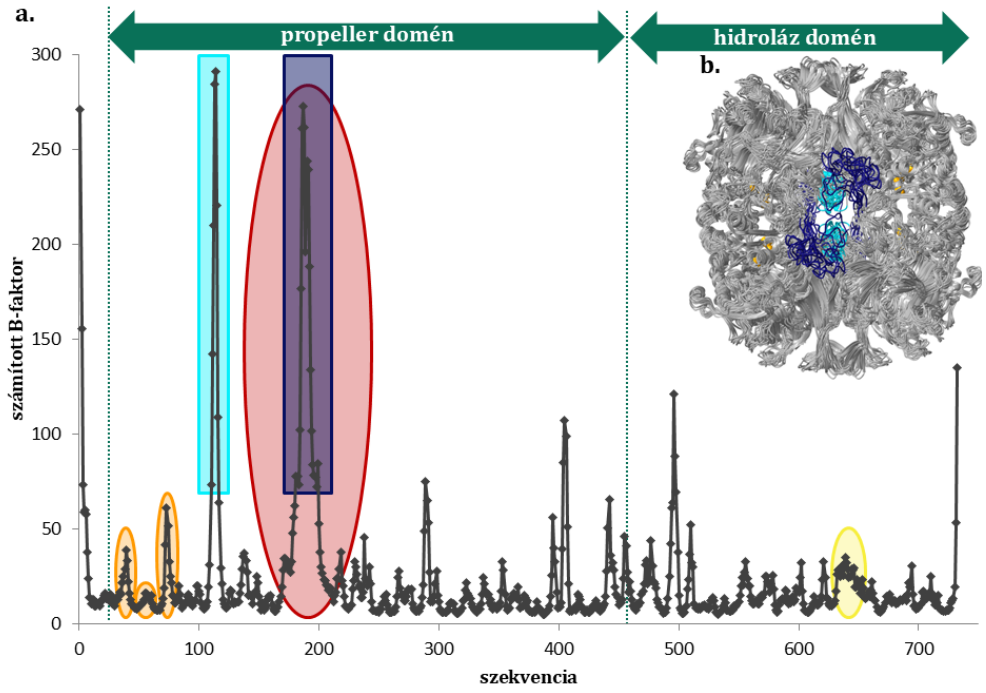
A pAAP tetramer komplex belsejében elrejtett aktív helyekhez két útvonal vezet: a szokatlanul széles propellercsatornán vagy a tetramer póruson és a monomer oldalsó nyílásán át. A propellercsatorna átjárhatóságát az FTMap szerver[86] segítségével igazoltuk, amely kis méretű

ligandumok számára keres alkalmas kötőhelyeket fehérjék felszínén: a propellercsatorna mentén több ilyen kötőhelyet is azonosítottunk (65. ábra).



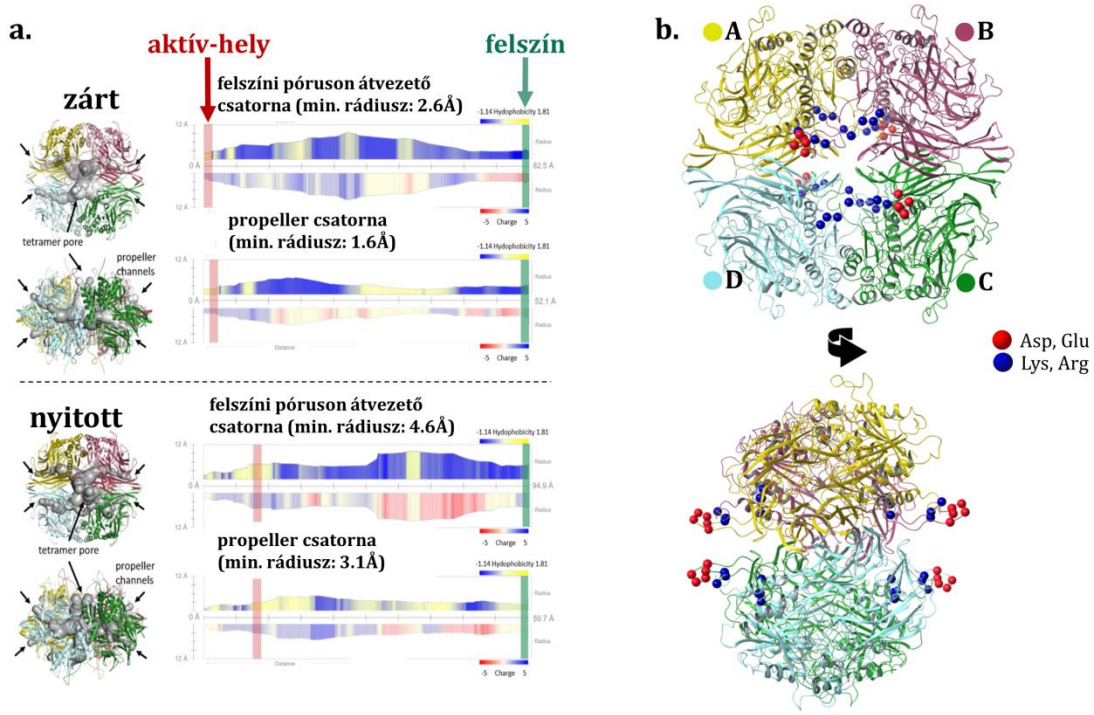
65. ábra. Az FTMap szerverrel[86] azonosított kis-molekulás kötőhelyek a pAAP monomerének propeller-csatornája mentén a.) oldal- és **b.)** felül-nézetből.

Tetramer póruson majd a központi üregen keresztül haladó útvonalak feltérképezését az MD szimulációval előállított trajektória analízisével kezdtük. A krio-EM térképen nem feloldható szegmensek az MD szimuláció során is flexibilisnek bizonyultak. Két különösen mozgékony régiót találtunk. Az egyik az 2. inzert külső szegmense, amely a tetramer két ellentétes felületén a felszíni pórusok alakját és méretét alakítja ki, a másik pedig a 2. lapát 110-117 szakasza, amely a belső üreg felé nyitott monomer egységek bejáratát őrzi, ahol a tetramerizáció révén mind a négy monomer megfelelő szegmensei egymás közelébe kerülnek. Mindkettő megakadályozhatja a szubsztrátok további előrehaladását, így erre a két szegmensre, mint a bejáratot védő sorompókra tekinthetünk (66. ábra).



66. ábra. A pAA tetramer esetében számított sokaság mozgékonyság-vizsgálata. a.) Az gerinc-atomok (aminosavanként átlagolt) mozgékonyságát illusztráló számított B-faktorok. Az inzerciókat ellipszisek jelzik (1. inzert: narancssárga, 2. inzert: piros, 3. inzert: sárga), a kiemelkedően mozgékony régiókat téglalapok: világoskékkel belső-, sötétkékkel a külső „sorompó"-kat alkotó szegmenseket jelöltem. Az 1. és 3. inzertek és a 2. inzert terminális szakaszai, mivel a tetramer-struktúra felépítésében vesznek részt – jól meghatározott szerkezetűek (alacsony mozgékonyság). **b.)** Az MD szimuláció során előállított egyensúlyi sokaság a kapuzáró hurkokkal.

Elvégeztük a hibrid modellünk csatorna-elemzését is, azaz megvizsgáltuk (a MOLE szervert alkalmazva[147]), hogy milyen járatok szelik át a tetramer struktúrát. Azt találtuk, hogy az MD szimuláció által létrehozott sokaságokkal kiegészített kísérleti szerkezet a kapuzáró régiókat tekintve nyitott és zárt konformációk – mint két végpont - között ingadozik. A nyitott szerkezet a tetramer póruson és a központi tágas üregen keresztül egy ~ 80 Å hosszú csatornát biztosít a monomer oldalsó nyílásokhoz és az aktív helyekhez, míg a zárt szerkezet esetében a katalitikus triádot csak egy lényegesen szűkebb (~60% átmérőjű) csatornán keresztül lehet elérni. Ám a külső pórustól az aktív centrumig tartó hosszú csatorna szélessége (legszűkebb pontján 9-10 Å) is csak éppen elégséges ahhoz, hogy a strukturálatlan - vagy letekeredett – fehérjeszakaszok vagy oligopeptidek elérjék a katalitikus apparátust (67. ábra). A külső pórus kinyílása viszonylag gyakori jelenség volt a szimuláció során – az egyensúlyi sokasághoz tartozó szerkezetek 25,3%-a tartozik ebbe az osztályba (míg 24,9%-a zárt kategóriába sorolható, a szerkezetek 49,8%-a pedig valamilyen köztes konformációban hordozza a külső kapuzáró hurkot), és az egyensúlyi trajektória főkomponens-elemzése is ezt a mozgást azonosította a szerkezet legjelentősebb fluktuációjaként. Ezzel szemben a belső kapu teljes felnyílása ritka esemény (a szerkezetek 4,2%-a ilyen). Az eredmények arra utalnak, hogy a pAAP két legrugalmasabb régiója együttesen egy kétkapus sorompó-rendszert alkot, amely azon nagyobb szubsztrátok (pl. oligopeptidek, fehérjeszegmensek) belépését szabályozza, amelyek nem képesek áthaladni a jóval szűkebb (még a legnyitottabb konformerek esetében is csak ~ 6 Å átmérőjű) propellercsatornán.

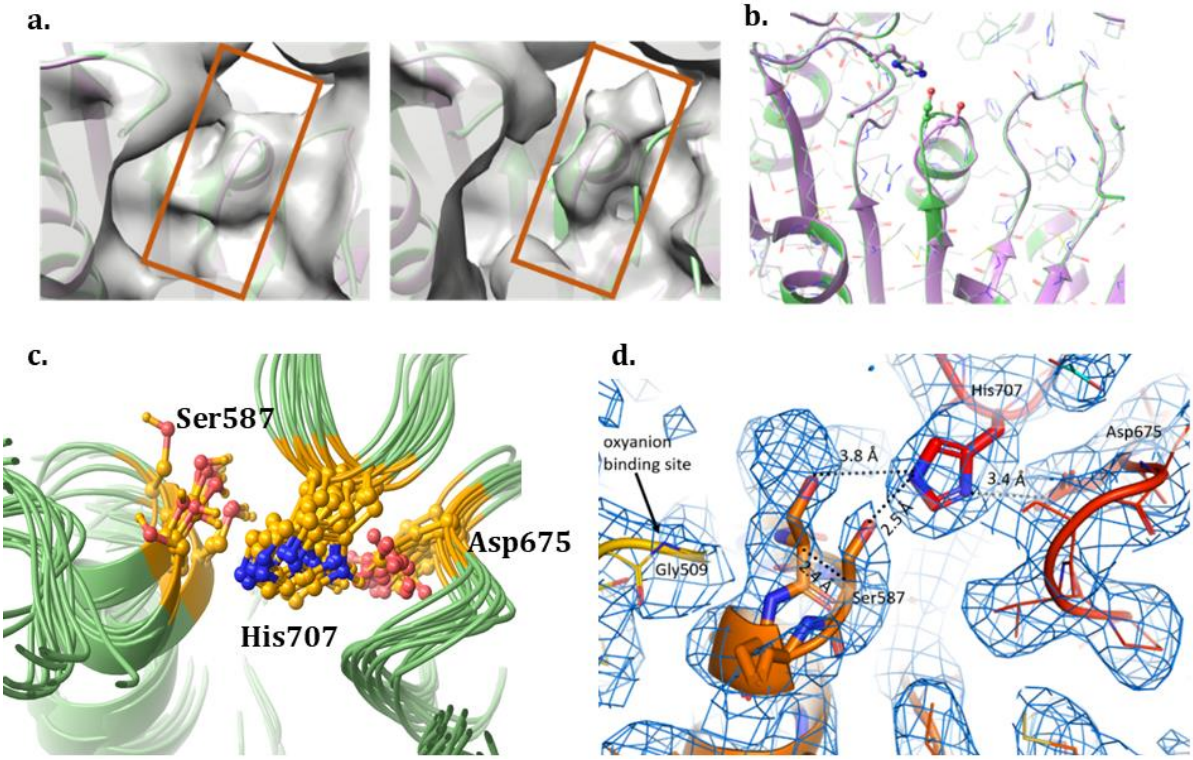


67. ábra. A pAAP kapuzáró (vagy sorompó) régiói által kialakított csatornarendszerek és pórusok. a.) A kapuzáró szegmensek zárt (felül) és nyitott (alul) állapotához tartozó, a „külvilág" -ból és az aktív hely felé vezető csatornák képe (bal oldal, szürke tubulusok) és keresztmetszete (jobb oldal). **b.)** A kapuzáró hurkok töltéssel rendelkező aminosavainak elhelyezkedése (nyitott sorompóállás mellett).

A külső kapuzáró hurkok nagyszámú töltött és poláros aminosavat tartalmaznak, töltés szerint elkülönülő szegmensekben: a ^{168}KKRPK^{172} (pozitív) szakaszt a ^{185}TGSDDE^{190} (negatív) motívum követi, majd egy ^{193}RTKK^{196} (pozitív) szegmens. A belépő szubsztrátoknak két ilyen kapuzáró-hurok között kell áthaladniuk. Arra gondoltunk, hogy ezek az erősen töltött központok a szubsztrátok letekeredéséhez járulhatnak hozzá, azok belső só- és H-híd kölcsönhatásainak lecsatolásával, másodlagos és harmadlagos szerkezetük destabilizálásával. A hosszú hurkok

flexibilitása lehetővé teszi a szubsztrátok széles körével való kölcsönhatást. Figyelemre méltó, hogy ennek a régiónak a közepén, a negatív töltésű szakaszon elhelyezkedő S187-t foszforilációs helyként azonosították (a humán AAP esetében, ahol szintén megtalálható)[148]. Az itt történő foszforiláció még határozottabbá tenné a negatív töltést, ami a két kapuzáró hurok egymást közti és a szubsztrátokkal kialakított kölcsönhatását is befolyásolná, így az AAP működésének lehetséges szabályozási módját kínálja.

Talán a legfontosabb megfigyelésünk a meghatározott pAAP szerkezettel kapcsolatban azonban az volt, hogy az enzim ligandum-mentes formájának aktív helye is konformációs sokszínűséget mutat. A szerkezet-finomítás korai szakaszában már nyilvánvalóvá vált, hogy a katalitikus Ser-t hordozó rövid Ser-hurok – valójában a hidroláz-domén központi β-redőjének 5. szálát és egy hélixet összekötő feszes kanyarulat – a pAAP-ban fellazul. A katalitikus Ser helyén egy különös alakú, a Ser oldalláncnál jóval nagyobb töltéssűrűség volt látható a krio-EM térképen. Az MD szimuláció által létrehozott trajektória klaszterezése is azt az eredményt szolgáltatta, hogy a katalitikus Ser és környezete – leginkább a β-szál utolsó pár aminosava - sokféle konformációt mintavételez. Míg a katalitikus His és Asp oldalláncok megtartották a helyzetüket és a köztük létrejött H-híd is intakt volt az egyensúlyi sokaság szerkezeteinek több mint 97%-ban, a katalitikus Ser és His közti H-hidas kapcsolat csak a szerkezetek 16,3%-ban volt jelen (68. ábra: c.). A szerkezetek jelentős hányadában a Ser a His-től elfordul es elmozdul, és a Ser-hez felvezető β-szál részben letekeredik. Ez az eredmény arra utal, hogy a pAAP ligandum-mentes állapotára is aktív és inaktivált formák egyensúlyaként kell tekinteni, mint ahogy azt az *Ap*AAP esetében is láttuk, de itt nem a doménmozgások (kagylószerű felnyílás és záródás), hanem a katalitikus apparátus szét-csatolódása hozza létre az inaktivált formákat.

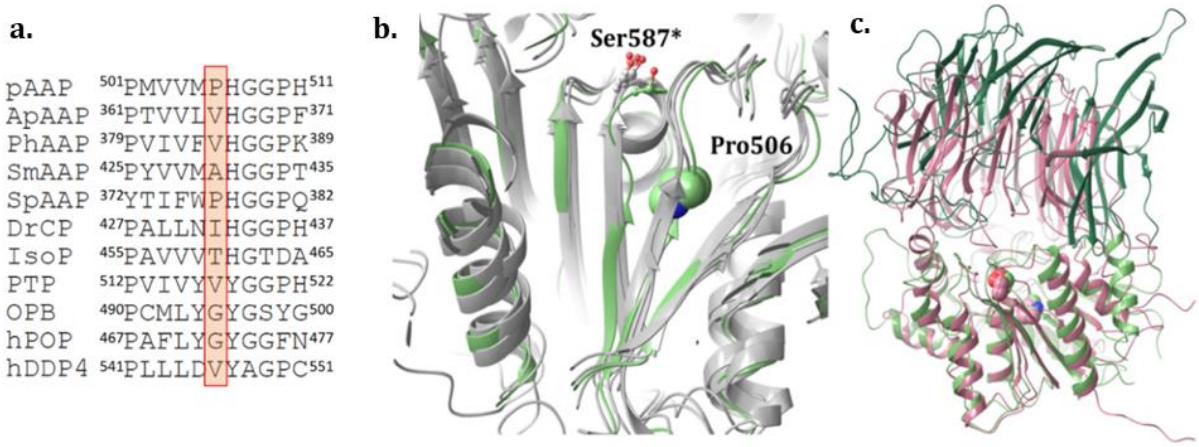


68. ábra. A rendezetlen Ser-hurok a pAAP szerkezetében. a.) 3D variabilitás elemzés felfedte az aktív hely közelében a C1 szimmetriájú térkép változékonyságát (a zöld és magenta gerincvonalak a végső modelleket mutatják (aktív, illetve látens állapotban). **b.)** A két szélső-állapot modellje, azonos nézetből. **c.)** Az MD szimuláció során előállított egyensúlyi sokaságban mintavételezett konformációk: klaszter-középszerkezetek mutatják az aktív hely környékének különböző elrendeződéseit. **d.)** A végső modell a D2 szimmetriájú térképbe építve.

Megkíséreltük ennek a konformációs sokféleségnek a nyomát a krio-EM térképen is fellelni. Bár a végső modell felépítéséhez létrehozott 3D rekonstrukció előállításakor D2 szimmetriát alkalmaztunk, a C1 szimmetriájú rekonstrukcióhoz visszatérve 3D variabilitási analízist végeztünk – azaz egy főkomponens analízisre hasonlító számítás során meghatároztuk a térképben legnagyobb változatosságot mutató régiót és azokat a szélsőséges térkép-variánsokat, amik között az ingadozik. Ez az analízis is azt az eredményt szolgáltatta, hogy a központi régióban a katalitikus Ser konformációja a legváltozékonyabb, és a „szélsőérték-térképeken" felismerhetőek voltak az MD szimulációban azonosított aktív és látens konformációk. Ezeket építettük be végül a végső modellünkbe is, ami így 2 végponti konformációra bontja a katalitikus Ser és közvetlen környezetének (a S587 és az 584-591 szegmens) elrendeződését: az egyik a katalitikus apparátus aktív, a másik pedig látens állapotának tekinthető, konformációjuk és a hozzájuk tartozó H-kötés hálózat alapján. Látens állapotban a katalitikus S587 2,4 Å-el távolabb kerül a katalitikus H707-től (Cα atomok távolságát mérve), ami a Ser-Oγ atomját 3,8 Å-re helyezi a His NE2-jétől, míg az aktív konformációban 2,5 Å-re vannak egymástól (68. ábra).

Mivel az 584-591 szegmens konformációs heterogenitása az egymástól távol eső katalitikus helyekre korlátozódik (amelyek, a közelebb eső párok esetén is több mint 30 Å-re vannak egymástól (Ser587 Cα-nál mérve)) és nem találtuk ezen régiók közt semmiféle (közvetlen) szerkezeti kapcsolatot, ezért ésszerű feltételezni, hogy a Ser-hurok különböző konformációs állapotai egyenletesen oszlanak el az monomerek között (mind időben, mind térben). Ezek a változékony régiók a tetramer szerkezet mélyén vannak elrejtve, az adatfeldolgozás során nem eredményeztek olyan globális szerkezeti különbségeket, amelyek kimutathatók lettek volna, így nem tudtunk a különböző állapotokhoz tartozó 2D vetületeket külön osztályokba gyűjteni, hogy azokból aztán független 3D rekonstrukciókat készíthessünk. A végleges modellt ezért nem a 4,1 Å felbontású C1 szimmetriájú térképbe, hanem a jelentősen jobb felbontású (3,27 Å) D2 szimmetria mentén átlagolt térkép alapján építettük, azaz mind a 4 monomerhez ugyanaz a kiátlagolt térkép tartozott.

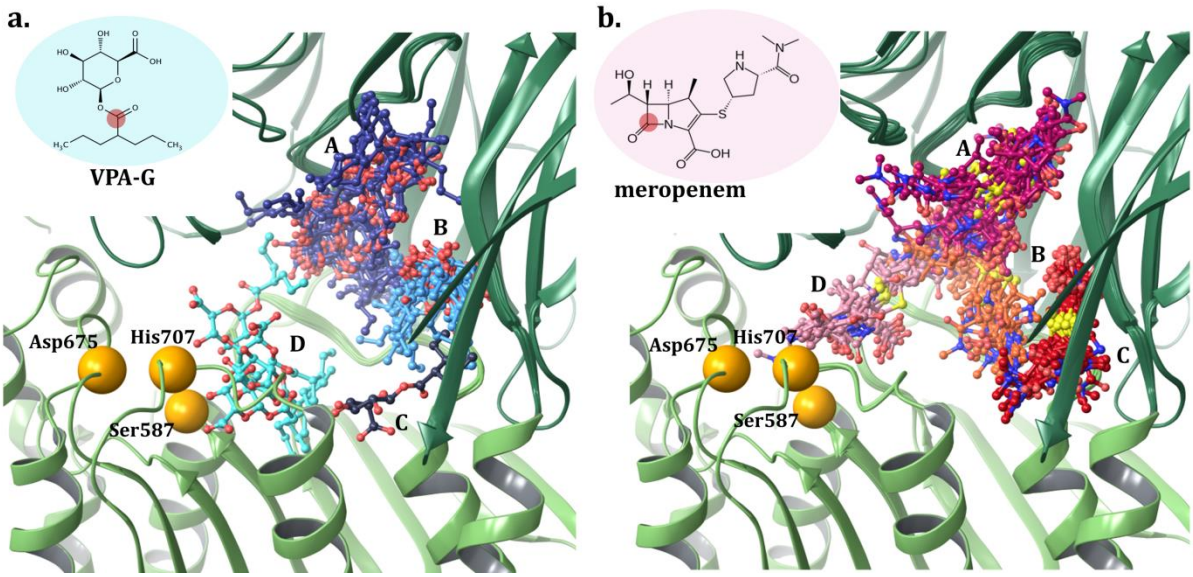
A katalitikus triád inaktiválódására vannak más példák is monomer vagy dimer S9 proteázok nyitott konformereinek esetében[120] (az egyik pont az általunk meghatározott *Ap*AAP szerkezetekben), de ezekben a rendszerekben az inaktiváció a His-hurok destabilizálódásán keresztül valósul meg. Olyan szerin proteázról amely a Ser-hurok több konformációját tartalmazza a legjobb tudomásunk szerint még nem számoltak be. Érdekes kérdés volt tehát, hogy miért pont az emlős AAP esetében tapasztalható a Ser-hurok szerkezetének fellazulása. Az S9 proteáz családba (és a tágabb enzimcsaládba, az α/β-hidrolázok közé) tartozó más szerkezetekkel (és szekvenciákkal) való összevetés alapján azt a megfigyelést tettük, hogy az emlős AAP szekvenciák legkarakteresebb különbsége egy Pro megjelenése a katalitikus Ser-t pozícionáló 5. β-szál mellett futó 4. szálon (P506, mind a pAAP, mind pedig a humán AAP esetében). A legtöbb S9 proteázban ezen a helyen Val, Ile, Ala vagy Gly található. A Pro jelenléte megtöri a 4. β-szálat és megszünteti a szomszédos szálak közötti stabilizáló kölcsönhatást, így nagyobb rugalmasságot biztosít a katalitikus Ser-t tartalmazó szegmensnek. Egy kivételt is találtunk: a *Sporosarcina psychrophila* AAP szintén Pro-t hordoz ebben a kritikus pozícióban, de ebben a pAAP-nél jóval kompaktabb szerkezetű monomer AAP-ben számos interdomén kölcsönhatás járul hozzá a Ser-hurok aktív konformációjának stabilizálásához (itt tehát a Pro jelenlétében is csak aktív konformációt találtak)[149] (69. ábra). A krio-EM és a szimulációs eredmények tehát egyaránt arra utalnak, hogy a pAAP (és a humán AAP) aktív helye – a közelben felbukkanó Pro jelenléte folytán - konformációs szempontból heterogén, és valószínűleg a szubsztrát kötődése szükséges ahhoz, hogy teljesen katalitikusan kompetens állapotba kerüljön.



69. ábra. A katalitikus Ser-hurok konformációjának destabilizálódása a pAAP szerkezetében. a.) Az ismert szerkezetű S9 proteázok központi β-redőjének 4. szálához (és az azt követi oxianion hurokhoz) tartozó szekvenciarészletek összevetése. A pAAP Pro506 aminosava ebben a pozícióban meglehetősen szokatlan (kivétel: *Sp*AAP). **b.)** A Pro506 jelenléte jelentősen lerövidíti a pAAP a 4. β szálát, valamint a katalitikus Ser587-hez vezető szomszédos 5. szálat is (zöld: pAAP (látens konformáció), szürke: az összes többi AAP: *Ap*AAP, *Ph*AAP, *Sm*AAP, *Sp*AAP; PDB azonosítók: 3o4g, 4hxe, 3azo és 5l8s). **c.)** A pAAP (zöld) és az *Sp*AAP (rózsaszín) szerkezetek összevetése azt mutatja, hogy az *Sp*AAP monomer kompaktabb szerkezete stabilizálja a katalitikus Ser-t, míg a pAAP-esetében a jelentősen nyitottabb szerkezet és a stabilizáló propeller-hidroláz kölcsönhatások hiánya a katalitikus Ser-hurok destabilizálódását eredményezi.

A pAAP talán legkülönösebb kölcsönható partnerei a karbapenem antibiotikumok. 1997-ben írták le először, hogy ha a nátrium-valproát (VPA) kezelésben részesülő betegek pulmonális fertőzésének kezelésére párhuzamosan karbapenem antibiotikumot is használnak, a betegek szervezetében a valproát szérumkoncentrációja drasztikusan lecsökken, súlyos állapotromlást okozva[150]. Az epilepszia, migrén, bipoláris zavarok és neuropátiás fájdalom kezelésére széles körben alkalmazott VPA és az egyik leggyakrabban felírt antibiotikumcsalád képviselője közötti gyógyszer-gyógyszer interakciót (DDI) azóta alaposan dokumentálták: bekerült mindkét szer alkalmazására vonatkozó általános iránymutatásokba[151]. A kölcsönhatás olyan gyors és hatékony, hogy a meropenem karbapenem antibiotikumot ma már rutinszerűen alkalmazzák a sürgősségi orvosi gyakorlatban VPA túladagolás esetén, a VPA gyors kiválasztódását indukálva[152]. A DDI kölcsönhatás igazolását követően azonban több mint egy évtizednek kellett eltelnie, míg azonosították a hatásért felelős VPA-glukuronidáz enzimet[139]. A VPA-glukuronidáz, melyet a karbapenemek irreverzibilisen gátolnak, a VPA fő metabolitját, a valproinsav-β-(D)-glukuronidot (VPA-G) deglukuronidációs/hidrolízis reakcióban hasítja és a szabad VPA-t visszajuttatja a keringésbe, lehetővé téve a hatóanyag reabszorpcióját. Egy újabb év elteltével az is kiderült, hogy a VPA-glukuronidáz nem más, mint az AAP[138].

A pAAP szubsztrátkötésének vizsgálatát tehát a pAAP:meropenem és a pAAP:VPA-G elsődleges komplexek, azaz a tényleges kovalens kötődést megelőző állapotok szerkezetének vizsgálatával kezdtük. Elsőként Orgován Zoltán (Gyógyszerkémiai Kutatócsoport, HUN-REN TTK) indukált illeszkedési protokollt alkalmazó dokkolást hajtott végre a hidrolizálatlan (intakt) meropenem és a VPA-G a pAAP teljes katalitikus üregében található kötőhelyeinek felderítése végett (70. ábra). A dokkoláshoz az általunk meghatározott ligandummentes pAAP szerkezet egyik monomerét használta. Ez a megközelítés mindkét kismolekula esetében négy kötőhelyet azonosított. Ezek közül a leggyakrabban mintavételezett kötőhely a propeller-csatorna belső torkolatában helyezkedik el, két további közeli kötőhelyen túl azonban a számítások mindkét molekula esetében azonosítottak egy aktív-hely-közeli kötőhelyet is.

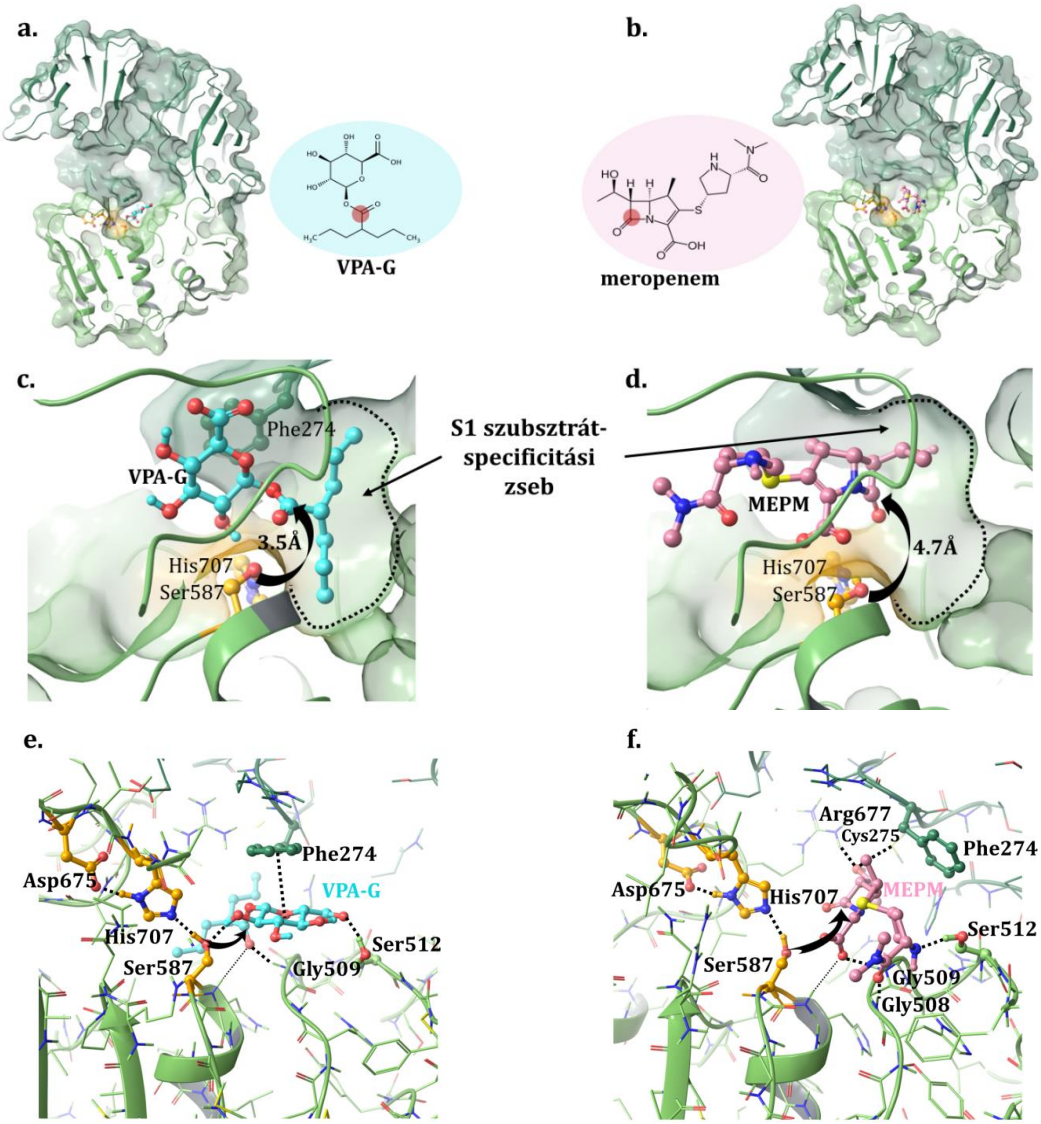


70. ábra. Indukált illeszkedéses dokkolással azonosított kismolekulás kötőhelyek a pAAP monomer interdomén kötőzsebében. a.) VPA-G és a **b.)** meropenem kötőhelyei. A katalitikus triád aminosavainak Cα atomjait sárga gömbök jelölik, a hidroláz domén gerincszerkezete világos- a propeller domén gerince sötétzöld.

Az aktív S587 közelében található kötő-konformációk közül mindkét molekula esetében kiválasztottuk azt, amely a katalitikus reakcióval leginkább összhangban áll (a Ser-OH és a szubsztrát karbonil a lehető legközelebb helyezkednek el) és ezt az elrendezést használtuk kiindulási konformációként MCMM számításokhoz. Az MCMM számítások során semmilyen kényszerfeltételt nem használtuk. Minden egyes Monte Carlo lépés során a VPA-G vagy meropenem összes belső torziós szögének véletlenszerűen kiválasztott részhalmazát véletlenszerű mértékben (0–180° tartományban) elforgattuk, valamint a szubsztrátokat pAAP-hoz viszonyítva véletlenszerűen elmozgattuk (0–3 Å tartományban) és merev test rotációt (0–180° között) is végrehajtottunk. A perturbált szerkezeteket Polack-Ribier konjugált gradiens algoritmussal minimalizáltuk. Az így azonosított komplex szerkezetek közül azokat tároltuk, melyek konformációs energiája a számítás során azonosított legalacsonyabb energia-értéket nem haladta meg jobban, mint 21 kJ/mol, és azokat az elrendeződéseket, amelyek konformációs energiája és az adott pillanathoz tartozó globális energiaérték különbségéből képzett Boltzmann faktor nem haladta meg egy az adott lépéshez generált 0 és 1 közé eső véletlenszerű értéket. A számításokat a Schrödinger Programcsomag segítségével az OPLS3 erőteret használva végeztük el. Az oldószer hatását a GB/SA algoritmussal modelleztük (vizet használva oldószerként). A számítások általában 3000–5000 lépésből álltak, ez a hossz elegendő volt ahhoz, hogy a globális minimum szerkezetet legalább 20-szor újra megtaláljuk.

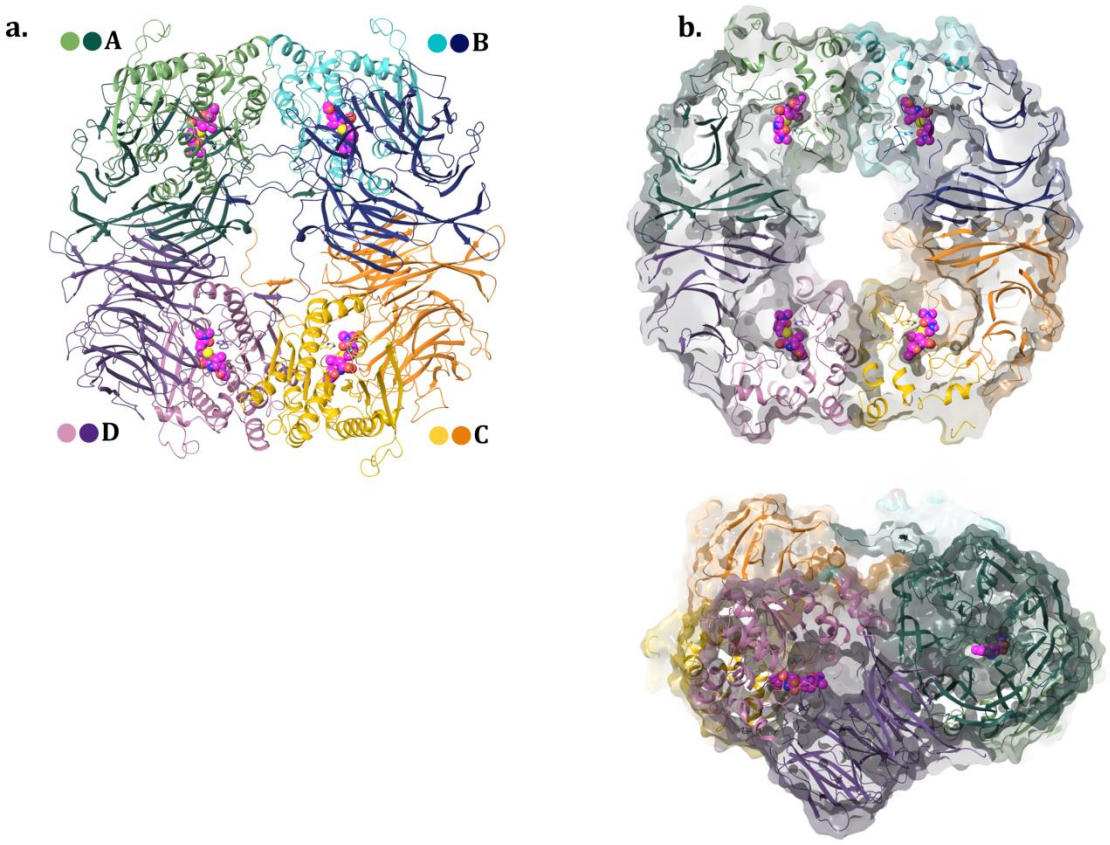
Az MCMM számítás eredményei szerint a VPA-G a pAAP katalitikus zsebében úgy helyezkedik el, hogy a S587 Oγ és a pAAP által megcélzott karbonil-szénatom (a valproát és a glükóz szegmenst összekötő észterben) közötti távolság 3,5 Å, míg a karbonil oxigén H-kötéssel kapcsolódik a G509 gerinc amidjéhez – a pAAP oxianion kötőhelyéhez. A valproát propil láncai, melyek az enzim által preferált Ac-Thr vagy Ac-Met P1 oldalláncokhoz hasonló méretűek, az S1 zsebbe illeszkednek be. Az F274 a glükóz gyűrű felett helyezkedik el, 4,1 Å-es távolságra (a gyűrűk középpontjánál mérve) a cukor síkjához közel párhuzamosan (a két gyűrű közötti sík szöge 11,6°), erős CH-π kötést képezve a cukor axiális C1-H1, C3-H3 és C5-H5 csoportjaival. A cukor C2 hidroxilcsoportja H-híd kötést alakít ki a S587 Oγ atomjával, a C6 karboxilát pedig a S512-vel. Így a VPA-G több erős kölcsönhatás révén koordinálódik egy reaktív pozícióban, készen a hidrolízisre, anélkül, hogy a pAAP aktív helyét átrendezné (71. ábra: a.).

A nem-kovalens pAAP:meropenem komplexben a meropenem karboxilát-szubsztituensét a H588 és G509 gerinc-amidjai által kialakított oxianion zseb koordinálja, a hidroxi-etil csoport a C275 és az R677 oldalláncok, a pirrolidin gyűrű N-atomját a S512, a terminális amid oxigént pedig a G508. A meropenem a pAAP katalitikus zsebébe történő elsődleges dokkolódása azonban nem annyira kedvező, mint a VPA-G esetében. Míg az antibiotikum a kovalens kötés kialakulásának megfelelő orientációban helyezkedik el (a hidroxi-etil szubsztituens az S1 zseb felé mutat, a β-laktámgyűrű karbonilcsoportja pedig olyan orientációban található, amely lehetővé teszi a támadást), a S587 Oγ és a célpont karbonil szén atomja közötti távolság 4,7 Å (71. ábra: b.). A tényleges kovalens-komplexképzési reakció lejátszódásához tehát az aktív hely átrendeződése szükséges, mert a reagálandó partnerek – abban az esetben, ha a fehérje számára csak az energiaminimalizációs lépés során bekövetkező kis mértékű változásokat engedélyezzük – nem tudják elegendően megközelíteni egymást.



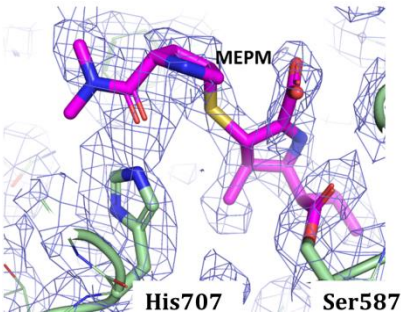
71. ábra. Nem-kovalens aktív hely közeli komplexek kialakulása – MCMM módszerrel követve. a., c., e.) pAAP:VPA-G és a **b., d., f.)** a pAAP:meropenem esetében. Az **a., b.)** ábrák a teljes monomer szerkezetét mutatják (világos-zölddel a hidroláz- és sötétzölddel a propeller domént jelölve, az aktív hely aminosavai sárga színnel kerültek megkülönböztetésre). A **c., d.)** panelek az aktiv S587 és az S1 zseb elhelyezkedését és alakját mutatják, a kismolekulák megfelelő kölcsönható szegmenseit kiemelve, míg az **e., f.)** panelek a további szubsztrát/inhibitor--fehérje kölcsönhatásokat.

A pAAP-meropenem kovalens komplex szerkezetét krio-EM technikával határoztuk meg. A szerkezet igen hasonló a pAAP ligandum-mentes formájához, a komplex kialakulása csak az aktív helyen és annak szorosan vett környezetében okozott szerkezeti változást. A komplexben - amelyet legjobban acil-enzim állapotként lehet leírni – a β-laktám gyűrűn megtámadott antibiotikum a várakozásoknak megfelelően az enzim katalitikus Ser oldalláncához kötődött hozzá kovalensen (72. ábra). Együttműködő partnereink MS mérésekkel igazolták, hogy a komplex sztöchiometriája 1:1 a pAAP monomerekre nézve, tehát a 3D rekonstrukció esetében is minden monomer aktív helyén beépítettük a meropenem molekulát.



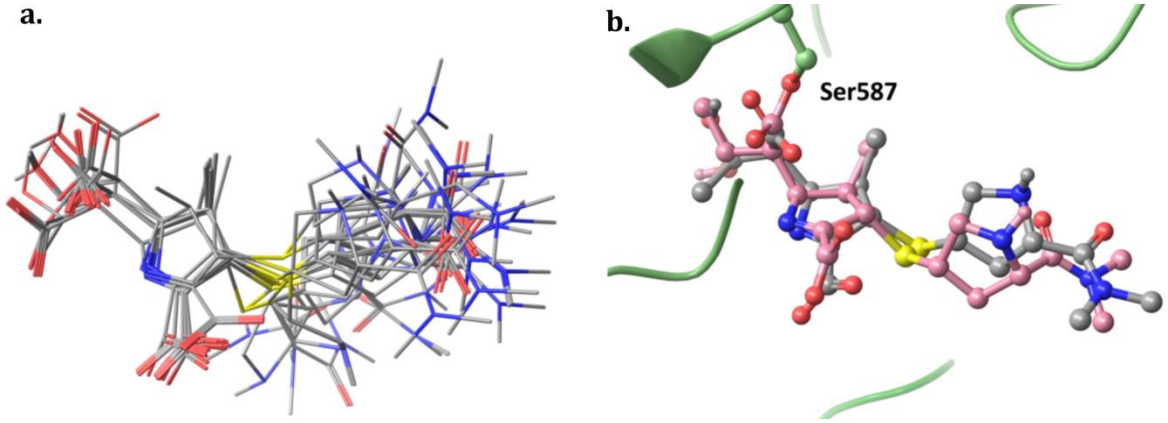
72. ábra. A pAAP-meropenem komplex krio-EM-el meghatározott szerkezete. **a.)** a tetramer szerkezete, valamint **b.)** a molekulafelszín központi metszete és egy külső nézet (ahol a sötétzöld propeller domén csatornáján át látható az aktív helyhez kötött inhibitor) – a meropenem C atomokat élénk rózsaszínnel jelöltem.

A pAAP-meropenem komplexben a meropenem kovalens kötéssel kapcsolódik a katalitikus S587-hez, míg a karbonil csoportját az AAP-k között konzervált oxianion hely köti és orientálja: a G509 és a H588 gerinc amid csoportjai (73. ábra). A dihidropirrol gyűrű karboxilát szubsztituensét a S512 hidroxil csoportja köti. A komplexben mind az R273, mind a F274 elmozdul (3,7 Å illetve 2,4 Å-el, mindkettő Cα atomoknál mérve), helyet teremtve a ligandum disztális szegmensének. A F274 hidrofób kontaktusokat alakít ki a tioéter híd S-atomjával, a pirrolidin gyűrűvel és a terminális amid metil-csoportjaival. A pAAP sekély és hidrofób S1 szubsztrát-specificitási zsebe a meropenem dihidropirrol gyűrűjének hidroxietil-szubsztituensét fogadja be – hasonlóan a nem-kovalens pAAP:meropenem komplex (számított szerkezetének)



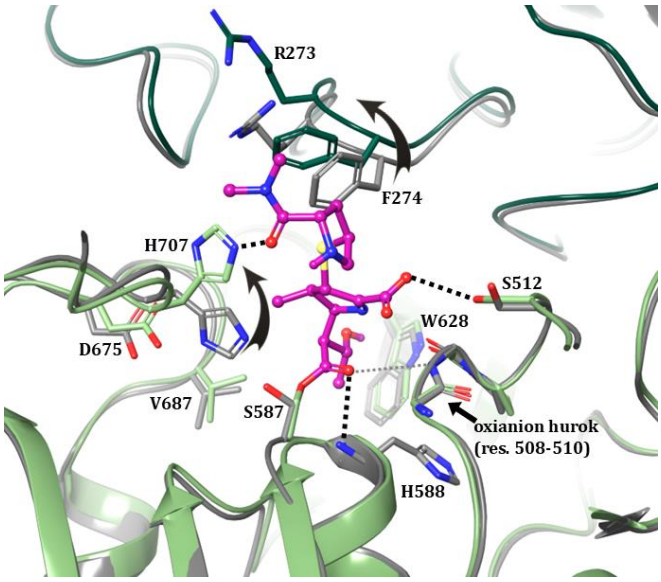
73. ábra. A meropenem kovalens kötődése a *p*AAP aktív S587 oldalláncához. A krio-EM térképet a sötétkék háló mutatja.

esetében tapasztaltakkal. A meropenem az acil-enzim komplexben szinte feszültségmentes konformációban (torzításmentesen) kötődik – a szabad (vízben szolvatált) forma alacsony energiájú elrendeződéseihez (melyeket szintén MCMM konformáció-keresés módszerével vizsgáltunk) hasonló konformációban (74. ábra).



74. ábra. A meropenem elhidrolizált formájának szerkezete. a.) A szabad forma MCMM kereséssel előállított alacsony-energiájú konformer-sokasága. **b.)** A pAAP-meropenem komplexben azonosított kötődési konformáció (rózsaszín) és az ahhoz leginkább hasonló szabad konformer (szürke; a globális minimum elrendeződéshez képest +1.4 kcal/mol konformációs energiájú).

A komplex szerkezetének legmeglepőbb vonása azonban a meropenem terminális amid oxo-csoportja és a katalitikus H707 oldallánca között kialakuló szoros H-híd kölcsönhatás. Ezt a kölcsönhatást egy jelentős átrendeződés teszi lehetővé. A H707~100°-kal elfordul a $\chi 1$ (N-Cα-Cβ-Cβ) torziós szög mentén, kilépve a Ser-His-Asp katalitikus triádból: Nε2-e atomja 7.7 Å távolságra kerül a S587 Oγ-tól (75. ábra). Az EMRinger rotamer-validációs algoritmust[154] használva megerősítettük, hogy a H707 oldallánc kibillentett orientációja alacsony energiájú rotamer, alternatív konformáció nélkül; a másik lehetséges $\chi 1$ rotamernek megfelelő pozícióban (ami az eredeti, a ligandum-mentes állapothoz tartozó szerkezetben megfigyelhető elrendeződésnek felelne meg) található kisebb, maradék töltéssűrűséget egy vízmolekula foglalhatja el. A H707 elfordulását a pAAP esetében az aktív hely szokatlanul nagy konformációs variabilitása segítheti: a ligandum-mentes állapotban megjelenő látens konformációk esetében a katalitikus S587 túl messze van a H707-től ahhoz, hogy H-kötést alakítson ki vele, így a H707

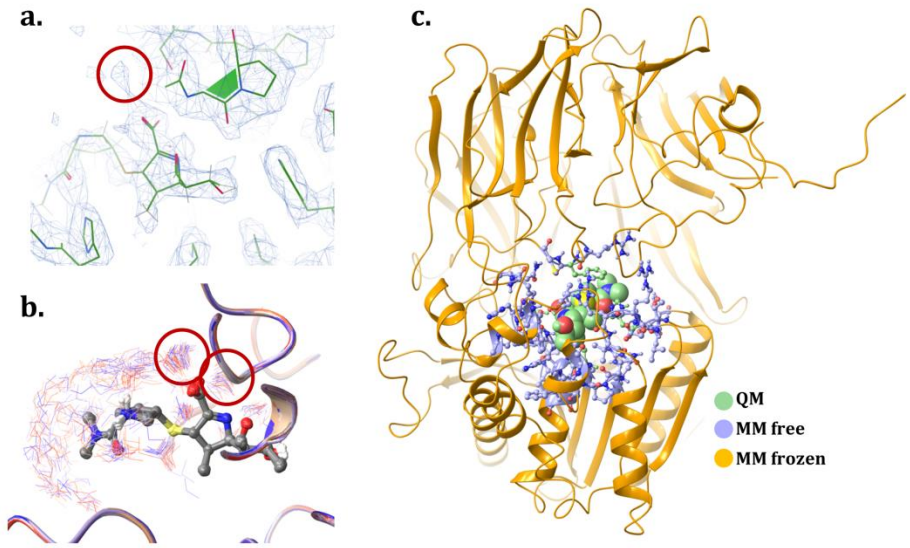


75. ábra. A meropenem elhelyezkedése a pAAP-meropenem komplex krio-EM szerkezetében és a kötődés által indukált szerkezeti változások. A szabad formát szürkével, a komplex hidroláz doménjét világoszölddel, a propellert sötétzölddel jelöltem, a meropenem rózsaszín. Fekete nyilak mutatják a legjelentősebb átrendeződések helyszíneit: a H707 kibillenését és a disztális 268-278 hurok elmozdulását.

elfordulása lényegesen könnyebb, mint más szerin-proteázokban, ahol a Ser-His-Asp triád ligandum-mentes állapotban is intakt.

A komplexben a H707 a meropenem és a E214 közé szorul, duplán protonált állapotban (donor-akceptor távolságok: 2,5 Å és 3,0 Å). A katalitikus központtól való távolsága és protonált mivolta egyaránt megakadályozza abban, hogy részt vegyen az acil-enzim köztitermék hidrolízisében, ahol a szerepe az lenne, hogy a támadó vízmolekula protonakceptora legyen. Ez lehet az elsődleges oka annak, hogy a katalitikus reakció az acil-enzim állapotban megreked, és stabil, kovalensen gátolt komplexet eredményez.

A meropenem és a vele kölcsönhatásban álló aminosavak protonáltsági és tautomér állapotának meghatározásához QM/MM számításokat végeztünk (Schrödinger Suite QSite programját használva). Ehhez egy a tetramerből kiemelt monomert vettünk figyelembe. A QM régió tartalmazta a teljes meropenem molekulát és a S587 aminosavat, az F274, S512 és H707 oldalláncait, valamint két vízmolekulát a dihidropirrol gyűrű karboxilát-szubsztituense és a S512 között. A vízmolekulák beépítését a kezdeti modellek esetében tapasztalt konvergencia-problémák tették szükségessé. A vízmolekulákat a krio-EM térkép modellezetlen „foltjai" alapján építettük be a modellbe, majd MCMM számításokkal finomítottuk, ahol a számítás során csak a vízmolekulák mozoghattak szabadon. Az eredményül kapott szerkezetsokaságból azt a két víz-pozíciót választottuk ki, amelyek stabilnak bizonyultak. A szerkezetszámításhoz a QM régióban B3LYP módszert és LACV3P** báziskészletet használtunk, az MM régióban az OPLS_2005 erőteret (76. ábra). A geometria optimalizálását úgy végeztük, hogy a meropenem és annak 5Å-ös környezetén belül található aminosavak szabadon mozgathattak, míg a modell többit részét befagyasztottuk. Az elektrosztatikus kölcsönhatások csillapítására állandó dielektromos állandót használtunk, ε=10,0 értékkel, amely pAAP tágas, de a tömbi vízfázistól elszigetelt belső zsebét volt hivatott modellezni.



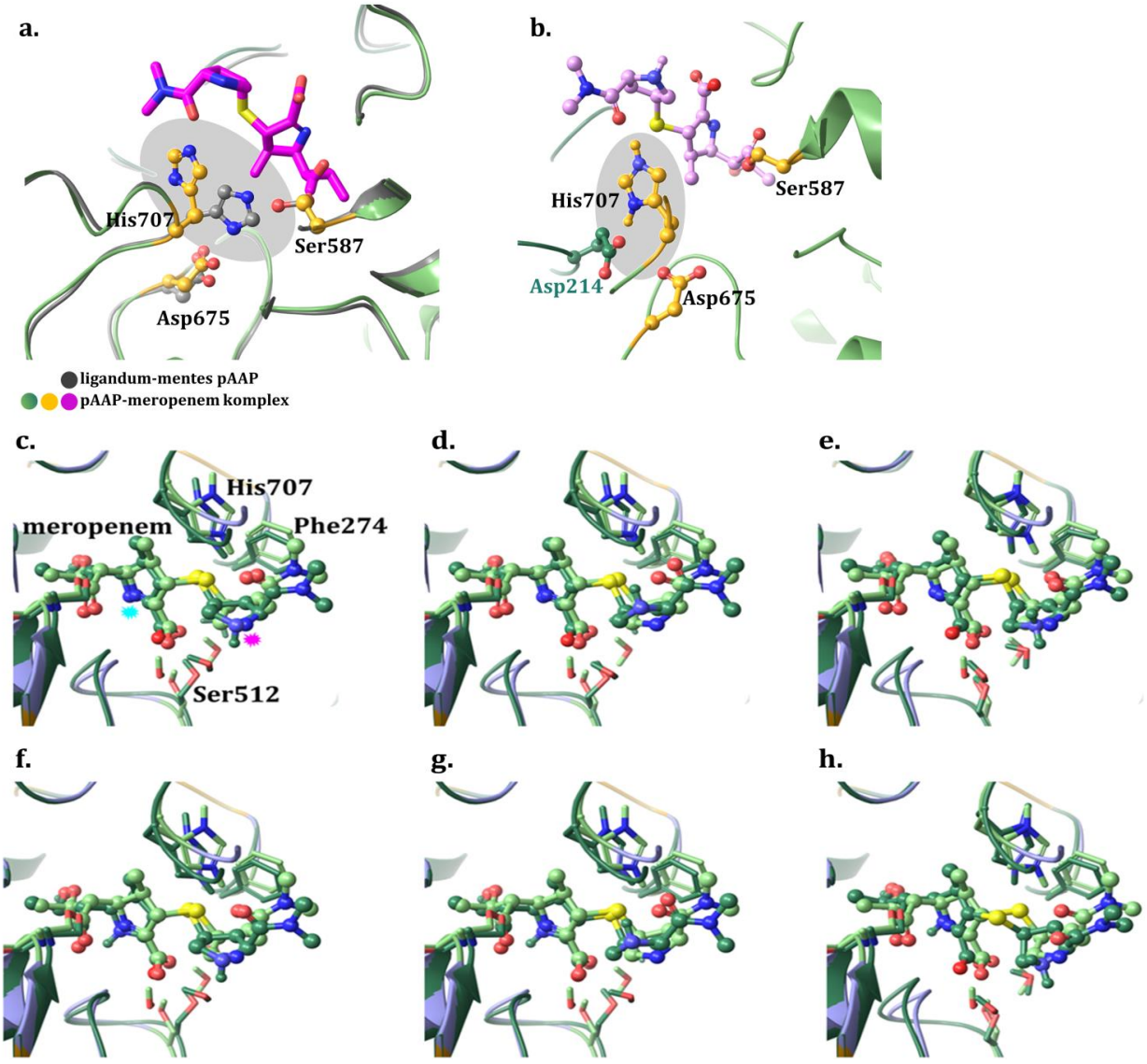
76. ábra. A meropenem protonáltsági mintázatának és tautomer formájának számításához használt QM/MM modell. **a.)** Példa a kísérletileg meghatározott térképen, a meropenem környezetében található, vízmolekula jelenlétére utaló, többlet töltés-sűrűségre (piros karikával jelezve). **b.)** Az MCMM keresés során is megerősített víz-pozíciók. **c.)** A teljes modell, a partíciók bemutatásával.

A kísérletileg meghatározott kötési pozíciót és konformációt a számítások akkor reprodukálták a legjobban, amikor a meropenem dihidropirrol gyűrűje imin volt, és a pirrolidin nitrogénatom nem volt protonált (tehát a gyűrű semleges volt) (77. ábra). Az imin tautomer alacsonyabb energiájú is, mint az enamin forma, 1,02 kcal/mol energiakülönbségük is az imin tautomer

	meropenem rmsd (Å)	QM/MM energia (kcal/mol)
c	0,71	0
d	0,81	1,18
e	0,70	9,88
f	0,85	1,02
g	0,95	1,11
h	0,98	0,02

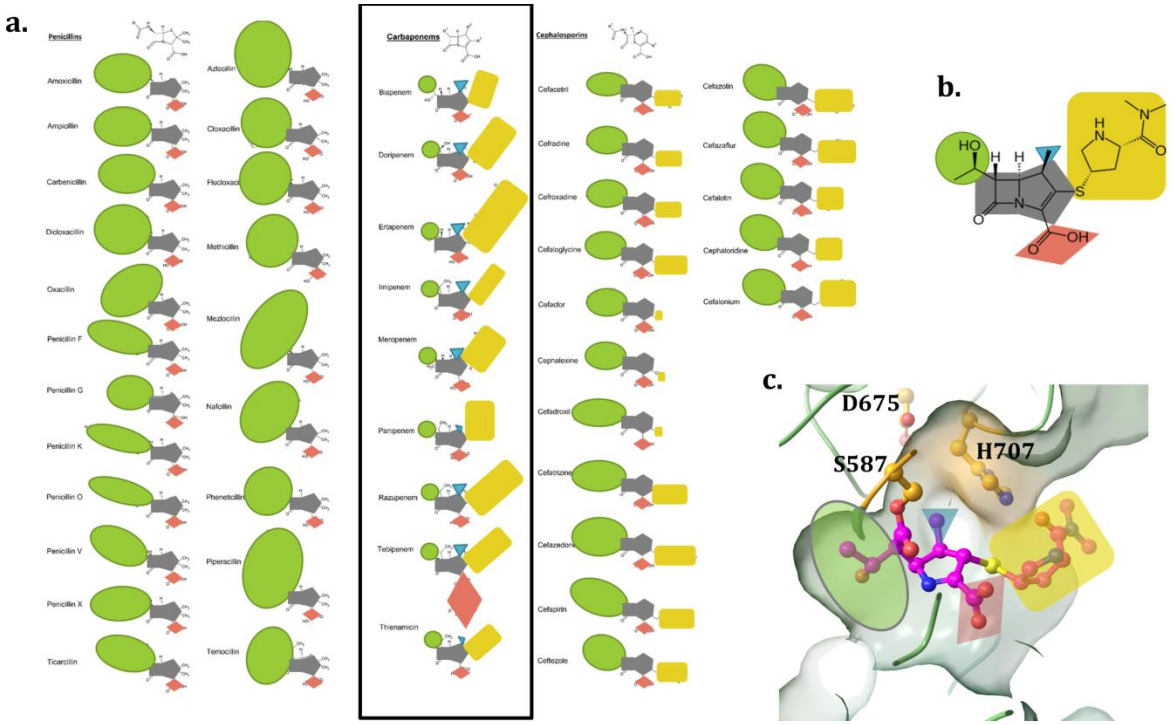
2. Táblázat. A 77. ábrán bemutatott c. - h. elrendeződések rangsorolása. A 2. oszlop a krio-EM szerkezethez való hasonlóságot, a 3. oszlop pedig a modellek relatív energiáját mutatja.

túlnyomó jelenlétét (~85%) sugallja. Ez katalízis szempontjából is jelentős: míg az enamin-tautomer N-H csoportja elősegítheti az acil-enzim köztitermék hidrolízisét azáltal, hogy az acil-karbonil csoporttal H-híd kölcsönhatást alakít ki[155] az imino forma nem nyújt ilyen segítséget. Így a meropenem a pAAP fehérjemátrix által stabilizált tautomer formája is hozzájárulhat a komplex acil-enzim állapotban való csapdába ejtéséhez.



77. ábra. A meropenem és környezetének szerkezete. a.) A krio_EM méréssel azonosított kötő-konformáció (szürkével a ligandum-mentes állapotot jelöltem). **b.)** A QM/MM számításokkal azonosított legvalószínűbb protonálódási mintázat és tautomer elrendeződés. **c.)-h.)** A végső modell kiválasztásához megvizsgált elrendeződések közül a legsikeresebbek (világos-zöld: krio-EM szerkezetnek megfelelő kiindulási állapot, sötétzöld: az aktuálisan vizsgált modell QM/MM módszerrel optimált szerkezete). A modellekhez tartozó szerkezeti torzulás mértékét és a QM/MM energiaértékeket a 2. táblázat foglalja össze.

A szerkezet ismeretében megkísérelhettük, hogy megválaszoljuk a két legalapvetőbb kérdésünket az AAP-antibiotikum kölcsönhatással kapcsolatban: egyrészt, hogy miért pont a karbapenem antibiotikumok kötődnek az AAP-hez, valamint, hogy a szervezetben megtalálható igen nagyszámú szerin proteáz enzim közül miért éppen az AAP az, amelyik erre a kölcsönhatásra képesnek bizonyult. Az első kérdésre a szerkezet azonnali választ szolgáltatott. A szerin proteázok számára könnyen megcélozható β-laktám antibiotikumok közül egyedül a karbapenemek rendelkeznek az AAP S1 zsebével összemérhető méretű szubsztituenssel a laktám gyűrűn (78. ábra). Sem a nagyobb csoportokkal dekorált penicillinek vagy cefalosporinok, sem pedig az ilyen szubsztituenssel egyáltalán nem rendelkező β-laktamáz (a klavulánsav) nem akadályozzák a VPA-szint fenntartását, azaz az AAP gátlásának szerkezeti előfeltétele az S1 zsebbe jól illeszkedő csoport jelenléte: ezt a kritériumot pedig (a β-laktám antibiotikumok közül) a karbapenemek teljesítik egyedül.



78. ábra. A karbapenemek felépítése és az AAP-el való kölcsönhatásuk szerkezeti feltételei. a.) A β-laktám antibiotikumok néhány prominens képviselője. A szubsztituensek a b.)-panelen bemutatott séma szerint vannak színezve. Egyedül a bekeretezett karbapenemek rendelkeznek az AAP S1 zsebével összevethető méretű szubsztituenssel a laktám gyűrűn (zöld). **b.)** A β-laktám antibiotikumok felépítése (a meropenem példáján bemutatva) és szubsztituenseiknek jelölése. **c.)** A szubsztituensek elhelyezkedése az AAP-meropenem komplexben (ahol a meropenem már elhidrolizált formájában látható).

A második kérdés komplexebb. Az a tény, hogy a karbapenemek általánosan jól használható antibiotikumoknak bizonyultak évek hosszú során keresztül, arra utal, hogy kevés olyan esszenciális enzimünk van, amit gátolnának. Elsődlegesen arra gondoltunk, hogy az AAP abból a szempontból biztos, hogy különleges, hogy a tetramer belsejébe rejtett, de mégis tágas aktív helye – akár a teljes domének közti teret ideértve – elegendő tartózkodási időt biztosít a ligandumoknak ahhoz, hogy szub-optimális, vagy átrendeződést igénylő kötődési folyamatok is lejátszódhassanak. Egy másik fontos komponens pedig a katalitikus triádot fellazító Pro (P506) jelenlétéből fakadhat, amely, a már tárgyalt módon, szétcsatolhatja a katalitikus apparátust. A meropenem kötődését is valószínűleg megkönnyíti, hogy a ligandum-mentes állapotban a katalitikus His (H707) az esetek jelentős részében nincs H-hidas kölcsönhatásban a Ser –el

(S587), így a nagy térigényű antibiotikum kötődését megkönnyítő átrendeződése jóval magától értetődőbb. Ha azt is figyelembe vesszük, hogy az AAP az egyetlen humán enzim, ami a VPA-G-t hasítani tudja (hiszen, ha az AAP gátolt, a VPA pillanatszerűen kiürül a szervezetből), egy promiszkuózus enzim képe kezd felsejleni, ahol a klasszikus szerin-proteáz apparátus egyedi módon funkcionál.

Annak érdekében, hogy ezt a sejtést alátámasszuk, elsőként azt a kérdést vizsgáltuk, hogy valóban egyedinek tekinthető-e az AAP szubsztrátprofilja. Három szokatlan szubsztrát-molekulára fókuszáltunk: a VPA-G, a meropenem (vagy általánosabban: a karbapenemek) és a POM-ERJ (egy pivaloil-oximetil-foszfonsav származék) lehetséges cél-fehérjéit igyekeztük azonosítani. Ez utóbbi az AAP-el kapcsolatos egyik legfrissebb felfedezés kapcsán került előtérbe, a malária kezelésében hatásos, új típusú, rezisztenciát elkerülő pro-gyógyszerek fejlesztése során. Kiderült, hogy a gazdaszervezet vörösvérsejtjeit megtámadó malária parazita, a *Plasmodium falciparum,* képes felvenni az emberi AAP-t, amely aktív marad a *P. falciparum* citoszoljában. Megmutatták, hogy az AAP a foszfonsav antibiotikumok lipofil észtereit el tudja hasítani. Mivel a foszfonsav antibiotikumok, metabolikus instabilitásuk miatt, másképp nem juttathatók el a parazita sejtekbe, a stabilizált pro-formából való in situ „kicsomagolásuk" teremt esélyt a felhasználásukra[140].

Elsőként a PubChem adatbázis[156] által javasolt fehérje célpontokat tekintettük át. Az itt talált nagyon kevés humán partner enzim között nem találtunk szerin-hidrolázokat (az AAP kivételével) (3. táblázat). Egy többször is előforduló partnert találtunk a karbapenemek esetében, a dipeptidáz-1 enzimet, amely egy metallo-proteáz és az antibiotikum molekulák lebontását végzi.

	UniProt kód	Fehérje	Rendszertani besorolás	Hatás
Valproic acid glucuronide	P13798	Acil-aminoacil peptidáz (AAP vagy APEH)	Homo sapiens (human)	Inhibitor
POM-ERJ		Oxidoreduktáz		
Meropenem	P24228	D-alanil-D-alanin karboxipeptidáz DacB	Escherichia coli K-12	Inhibitor
Meropenem	P14489	Béta-laktamáz OXA-10	Pseudomonas aeruginosa	Szubsztrát
Meropenem	P16444	Dipeptidáz 1	Homo sapiens (humán)	Szubsztrát
Meropenem			Homo sapiens (humán)	HLA-DOB mRNS gátlás
Meropenem			Homo sapiens (humán)	HLA-G mRNS gátlás
Meropenem			Homo sapiens (humán)	
Ertapenem	P02918	Penicillin-kötő fehérje 1A	Escherichia coli K-12	Inhibitor
Ertapenem	P02919	Penicillin-kötő fehérje 1B	Escherichia coli K-12	Inhibitor
Ertapenem	P44469	Peptidoglikán D,D-transpeptidáz MrdA	Haemophilus influenzae Rd KW20	Inhibitor
Ertapenem	P0AD65	Peptidoglikán D,D-transpeptidáz MrdA	Escherichia coli K-12	Inhibitor
Ertapenem	P45059	Peptidoglikán D,D-transpeptidáz FtsI	Haemophilus influenzae Rd KW20	Inhibitor
Ertapenem	P0AD68	Peptidoglikán D,D-transpeptidáz FtsI	Escherichia coli K-12	Inhibitor
Ertapenem	P24228	D-alanil-D-alanin karboxipeptidáz DacB	Escherichia coli K-12	Inhibitor
Ertapenem	P08506	D-alanil-D-alanin karboxipeptidáz DacC	Escherichia coli K-12	Inhibitor
Ertapenem	P16444	Dipeptidáz 1	Homo sapiens (humán)	Szubsztrát
Ertapenem	P02768	Albumin	Homo sapiens (humán)	Ligandum
Doripenem	P0AC13	Dihydropteroate synthase	Escherichia coli K-12	Inhibitor
Doripenem	P02918	Penicillin-kötő fehérje 1A	Escherichia coli K-12	Antagonista|Inhibitor
Doripenem	P02919	Penicillin-kötő fehérje 1B	Escherichia coli K-12	Antagonista|Inhibitor
Doripenem	P0AD65	Peptidoglikán D,D-transpeptidáz MrdA	Escherichia coli K-12	Antagonista|Inhibitor
Doripenem	P16444	Dipeptidáz 1	Homo sapiens (humán)	Szubsztrát
Doripenem	Q8TCC7	Szerves anion transzporter 3	Homo sapiens (humán)	Szubsztrát
Imipenem	P0AD65	Peptidoglikán D,D-transpeptidáz MrdA	Escherichia coli K-12	Inhibitor
Imipenem	P02919	Penicillin-kötő fehérje1B	Escherichia coli K-12	Inhibitor
Imipenem	P02918	Penicillin-binding protein 1A	Escherichia coli K-12	Inhibitor
Imipenem	P42971	Penicillin-kötő fehérjen 3	Bacillus subtilis subsp. subtilis str. 168	Inhibitor
Imipenem	P52664	Béta-laktamáz	Proteus vulgaris	Aktivátor
Imipenem	P16444	Dipeptidáz 1	Homo sapiens (humán)	Szubsztrát
Imipenem	P0AD63	Béta-laktamáz SHV-1	Escherichia coli	Szubsztrát
Imipenem	P62593	Béta-laktamáz TEM	Escherichia coli	Szubsztrát
Imipenem			Homo sapiens (human)	Csökkenő hidrolízis
Imipenem			Homo sapiens (human)	NR1I2 protein aktiváció
Imipenem			Homo sapiens (human)	
Imipenem	P0AD65	Peptidoglikán D,D-transpeptidáz MrdA	Escherichia coli K-12	Inhibitor

3. Táblázat. **A PubChem adatbázisban található fehérje célpontok a tárgyalt szubsztrátok/inhibitorok esetében**. A humán enzimeket szürkével kiemeltem.

A lehetséges kölcsönhatási partnerek azonosítását predikciós szoftverek alkalmazásával is megkíséreltük. A SwissTargetPrediction[157] 41 lehetséges partnert javasolt a VPA-G, 14 partnert a POM-ERJ és 82 partnert a meropenem esetében, de mindegyik valószínűsége meglehetősen alacsony (4. táblázat). (Bár ez az eljárás nem azonosította az AAP-t, mint lehetséges célpontot egyik molekula esetében sem, a meropenem célpontjainak vizsgálata során a dipeptidil peptidáz enzimeket megtalálta, amelyek - az AAP-hez hasonlóan - szintén az oligopeptidáz család tagjai; ez némiképp növeli az eredményekbe vethető bizalmat.)

VPA-G célpont fehérjék	rövidítés	Uniprot ID	ChEMBL ID	Osztály	Valószínűség
Gamma-szekretáz	PSEN2	P49810	CHEMBL2094135	Proteáz	0,1194
Neprilizin	MME	P08473	CHEMBL1944	Proteáz	0,1115
NAALADáz II	NAALAD2	Q9Y3Q0	CHEMBL2609	Proteáz	0,1115
Kaszpáz-3	CASP3	P42574	CHEMBL2334	Proteáz	0,1115
Glutamát Karboxipeptidáz II	FOLH1	Q04609	CHEMBL1892	Proteáz	0,1115

POM-ERJ célpont fehérjék	rövidítés	Uniprot ID	ChEMBL ID	Osztály	Valószínűség
Mátrix metalloproteináz 9	MMP9	P14780	CHEMBL321	Proteáz	0,1157
Mátrix metalloproteináz 1	MMP1	P03956	CHEMBL332	Proteáz	0,1157
Mátrix metalloproteináz 2	MMP2	P08253	CHEMBL333	Proteáz	0,1157
ADAM17	ADAM17	P78536	CHEMBL3706	Proteáz	0,1157
Mátrix metalloproteináz 14	MMP14	P50281	CHEMBL3869	Proteáz	0,1157
ADAM10	ADAM10	O14672	CHEMBL5028	Proteáz	0,1157
Angiotenzin-konvertáz	ACE	P12821	CHEMBL1808	Proteáz	0,1157

MEROPENEM célpont fehérjék	rövidítés	Uniprot ID	ChEMBL ID	Osztály	Valószínűség
Aminopeptidáz N	ANPEP	P15144	CHEMBL1907	Proteáz	0,1093
Dipeptidil peptidáz IV	DPP4	P27487	CHEMBL284	Proteáz	0,1093
Angiotenzin-konvertáló enzim	ACE	P12821	CHEMBL1808	Proteáz	0,1093
Aminopeptidáz A	ENPEP	Q07075	CHEMBL3439	Proteáz	0,1093
Dipeptidase	DPEP1	P16444	CHEMBL1989	Proteáz	0,1093
Kalpain 1	CAPN1	P07384	CHEMBL3891	Proteáz	0,1093
Leukotrién A4 hidroláz	LTA4H	P09960	CHEMBL4618	Proteáz	0,1093
Aminopeptidáz B	RNPEP	Q9H4A4	CHEMBL2432	Proteáz	0,1093
Metionin aminopeptidáz 2	METAP2	P50579	CHEMBL3922	Proteáz	0,1093
Béta-szekretáz 1	BACE1	P56817	CHEMBL4822	Proteáz	0,1093
ER aminopeptidáz 2	ERAP2	Q6P179	CHEMBL5043	Proteáz	0,1093
Leucin aminopeptidáz	LAP3	P28838	CHEMBL3965	Proteáz	0,1093
ER aminopeptidase 1	ERAP1	Q9NZ08	CHEMBL5939	Proteáz	0,1093
Neprilizin	MME	P08473	CHEMBL1944	Proteáz	0,1093
Karboxypeptidáz B2	CPB2	Q96IY4	CHEMBL3419	Proteáz	0,1093
Plazminogén aktivátor	PLAU	P00749	CHEMBL3286	Proteáz	0,1093
Dipeptidil peptidáz VIII	DPP8	Q6V1X1	CHEMBL4657	Proteáz	0,1093
Dipeptidil peptidáz IX	DPP9	Q86TI2	CHEMBL4793	Proteáz	0,1093
Dipeptidil peptidáz VII	DPP7	Q9UHL4	CHEMBL3976	Proteáz	0,1093
Kaszpáz-3	CASP3	P42574	CHEMBL2334	Proteáz	0,1093
Mátrix metalloproteináz 2	MMP2	P08253	CHEMBL333	Proteáz	0,1093
Karboxypeptidáz B	CPB1	P15086	CHEMBL2552	Proteáz	0,1093
Trombin	F10	P00742	CHEMBL244	Proteáz	0,1093
Véraladási faktor VII	F7	P08709	CHEMBL3991	Proteáz	0,1093

4. Táblázat. **SwissTargetPrediction protokoll által javasolt fehérje célpontok között található proteázok, a tárgyalt szubsztrátok/inhibitorok esetében**. A szerin-proteázokat sötétebb, a cisz-proteázokat világosabb szürkével kiemeltem.

Alkalmaztuk továbbá a Similarity Ensemble Approach (SEA) protokollt is[158], de ez a módszer egyáltalán nem azonosított a lehetséges humán célpontok között proteázokat (5. táblázat).

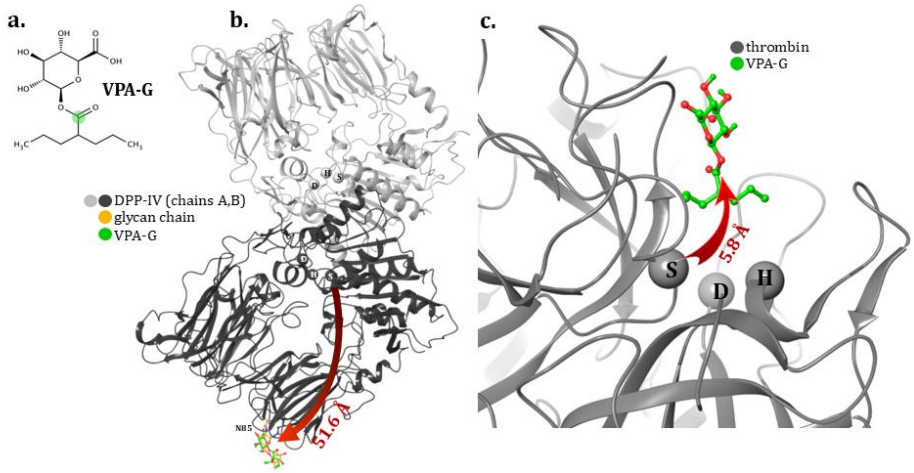
VPA-G célpontok	P-érték	Max Tc	Cut Sum	Z-Score	Rövid név	Név
LYAM3_MOUSE	1.227e-58	0.2899	1.1594	103.5191	Selp	P-szelektin
P79074_9AGAR	7.227e-49	0.3889	0.3889	85.9785	cppg1	Endopoligalakturonase
LYAM1_MOUSE	2.492e-46	0.2899	0.5797	81.4225	Sell	L-szelektin
NPCL1_MOUSE	3.458e-38	0.3023	0.3023	66.8047	Npc1l1	NPC1-szerű intracelluláris koleszterin transzporter 1
LYAM1_HUMAN	4.461e-38	0.3088	2.6118	66.6061	SELL	L-szelektin
LYAM2_MOUSE	1.195e-36	0.2899	0.2899	64.0425	Sele	E-szelektin
MRP3_RAT	6.705e-36	0.2838	0.2838	62.6977	Abcc3	Multispecifikus szerves anion transzporter 2
Q96QA9_HUMAN	6.705e-36	0.2838	0.2838	62.6977	MRP3	Multidrog resisztancia fehérje
MRP2_RAT	2.399e-30	0.3026	1.4693	52.7271	Abcc2	Multispecifikus szerves anion transzporter 1
A0MJA4_CANLF	7.913e-25	0.3056	0.3056	42.8201	NPC1L1	Niemann-Pick C1-like 1 protein
A0MJA5_MACMU	7.913e-25	0.3056	0.3056	42.8201	NPC1L1	NPC1-szerű intracelluláris koleszterin transzporter 1
LYAM3_HUMAN	7.799e-21	0.3088	2.6118	35.6501	SELP	P-szelektin
NPCL1_RAT	1.554e-15	0.3056	0.6079	26.1571	Npc1l1	NPC1-szerű intracelluláris koleszterin transzporter 1
MRP2_HUMAN	3.331e-15	0.3026	0.5938	25.5412	ABCC2	Multispecifikus szerves anion transzporter 1
LUXS_BACSU	4.073e-11	0.2982	0.2982	18.2034	luxS	S-ribozilhomocisztein liáz
FGF2_HUMAN	1.507e-09	0.4000	0.4000	15.3881	FGF2	Fibroblaszt növekedési faktor 2
FGF1_HUMAN	1.636e-09	0.3188	0.3188	15.3242	FGF1	Fibroblaszt növekedési faktor 1
PPM1B_HUMAN	3.648e-09	0.3061	0.3061	14.6988	PPM1B	Protein foszfatáz 1B
P2Y14_HUMAN	1.012e-08	0.2958	0.8792	13.9033	P2RY14	P2Y purinoceptor 14
Q8AWE3_CHICK	1.746e-07	0.3061	0.3061	11.6828		Szerine/treonin-fehérje foszfatáz 2A 55 kDa RSB
SO1A1_RAT	6.013e-07	0.2817	0.2817	10.7185	Slco1a1	Szerves anion transzporter 1A1

Targets of POM-ERJ	P-érték	Max Tc	Cut Sum	Z-Score	Rövid név	Név
BT3A1_HUMAN	8.541E-43	0.4286	1.2142	75.0763	BTN3A1	Butirofilin 3A1
DXR_ECOLI	5.397E-10	0.5	1.0805	16.1886	dxr	1-deoxi-D-xilulóz 5-foszfát reduktoizomeráz
DXR_MYCS2	6.328E-15	0.2826	0.2826	25.0369	dxr	1-deoxi-D-xilulóz 5-foszfát reduktoizomeráz
DXR_MYCTU	1.153E-8	0.5	0.7826	13.8014	dxr	1-deoxi-D-xilulóz 5-foszfát reduktoizomeráz
DXR_PLAF7	7.504E-40	0.5	0.7826	69.7913	DXR	1-deoxi-D-xilulóz 5-foszfát reduktoizomeráz

Meropenem célpontok	P-érték	Max Tc	Cut Sum	Z-Score	Rövid név	Név
D1MIX9_PSEAI	3.253e-14	0.3108	0.3108	33.341	blaGES-13	Béta-laktamáz
A2RP81_CITFR	4.571e-06	0.3108	0.3108	23.765	blaPER-2	Béta-laktamáz
AMPC_ENTCL	7.827e-14	0.4483	2.2151	23.0801	ampC	Béta-laktamáz
BLAT_ECOLX	3.049e-13	0.5	2.1717	22.0199	bla(T)	Béta-laktamáz TEM
LEP_ECOLI	1.507e-19	0.3016	0.3016	12.1047	lepB	Szignál peptidáz I
AMPC_ECOLI	1.016e-07	0.5	0.9521	9.137	ampC	Béta-laktamáz

5. táblázat. **SEA Search protokoll által javasolt fehérje célpontok a tárgyalt szubsztrátok/inhibitorok esetében**. A humán enzimeket szürkével kiemeltem.

Kipróbáltuk még a PharmMapper eljárást is. A PharmMapper, a korábban alkalmazott eljárásokhoz hasonlóan, szintén egy farmakofor-illesztési platform[159], amely azonban nemcsak célpontokat keres, hanem a ligandum legvalószínűbb kötődési módját is becsüli, gyors-dokkolási módszer alkalmazásával. Az 1-nél nagyobb z-értékkel rendelkező találatok között kerestünk ebben az esetben is proteáz enzimeket. A VPA-G esetében összesen 134 célpontot talált a PharmMapper, amelyek közül kettő szerin proteáz: a dipeptidil peptidáz IV (DPP-IV) és a trombin. A DPP-IV esetében a PharmMapper a VPA-G-t egy a propeller domén felszínén található Asn oldallánc glikán láncához illesztette, több mint 50 Å-re az aktív helytől. A trombin esetében viszont a VPA-G elhelyezhető volt az aktív helyen úgy, hogy a hidrolizálható karbonilja 5,8 Å-re helyezkedett el az aktív Ser Oγ atomjától (79. ábra).

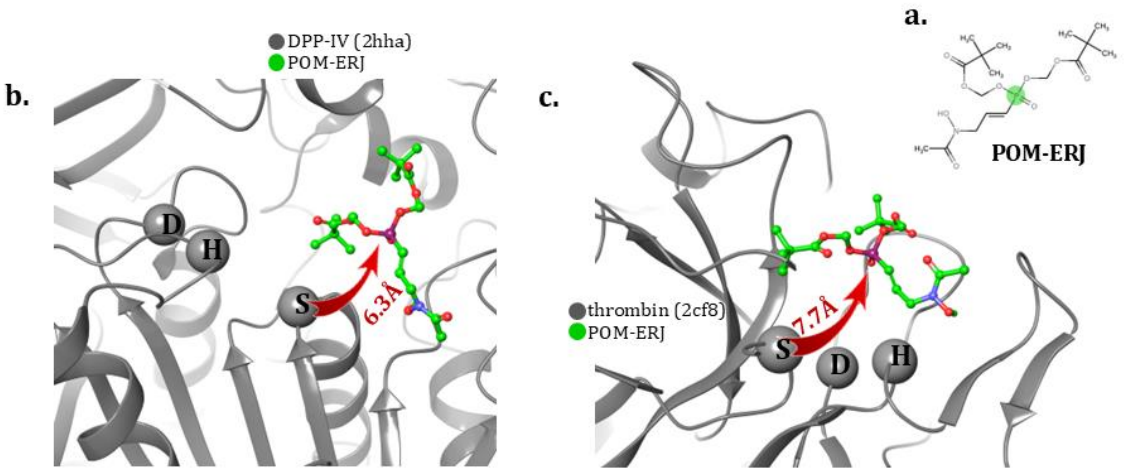


79. ábra. A PharmMapper által azonosított VPA-G célpont-proteázok. **a.)** A VPA-G szerkezete, a hidrolizálható karbonil zöld színnel kiemelve**. b.)** DPP-IV esetében, a N85 glikánláncával egybeeső kötőhely. **c.)** A trombin aktív Ser közelében található kötőhely. A katalitikus triád (Ser-His-Asp) Cα atomjai gömbökkel vannak jelölve. A piros nyilak az aktív Ser -ről kiindulva a hidrolizálható karbonil felé mutatnak.

Ez a távolság elég kicsi ahhoz, hogy ezt az elrendeződést a reakciót megelőző nem-kovalens komplexnek tekintsük, azonban mivel a trombin katalitikus helye egy teljesen vízhozzáférhető, sekély zsebben található, és mivel a VPA-G csak egyetlen H-híd kötést képez a fehérje mátrixszal, várható tartózkodási ideje az aktív hely közelében rövid lesz, így a trombin aktív Ser-je általi sikeres támadás valószínűsége alacsony.

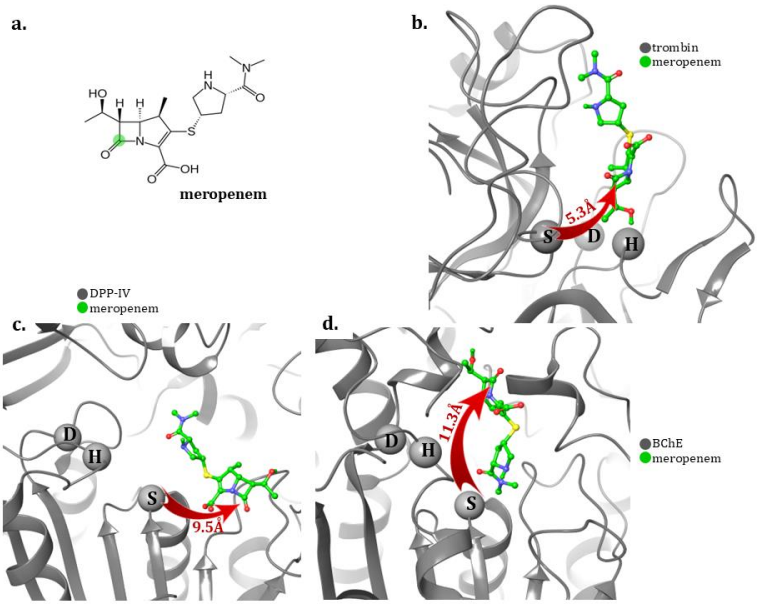
VPA-G-ra vonatkozó eredményeket összefoglalva megállapítható, hogy az AAP mellett nincs más ismert vagy könnyen feltételezhető humán szerin-hidroláz, amely vele reakcióba lépne. Ezt támasztja alá az a tény is, hogy az AAP gátlása a VPA azonnali kiürülését eredményezi, ami csak úgy képzelhető el, hogy az emberi szervezetben nincs másik hidroláz, amely az AAP-hez hasonló módon képes lenne a VPA-G metabolit hasítására, hogy a felszabadított VPA visszajuthasson a cirkulációba.

A DPP-IV és a trombin a POM-ERJ lehetséges szerin proteáz célpontjaiként is felmerültek. A támadási távolság a DPP-IV esetében közel optimális, azonban a dokkolt pozícióban közvetlen ütközés alakul ki a gyógyszermolekula és az enzim Tyr547 aminosavának oldallánca közt (80. ábra).



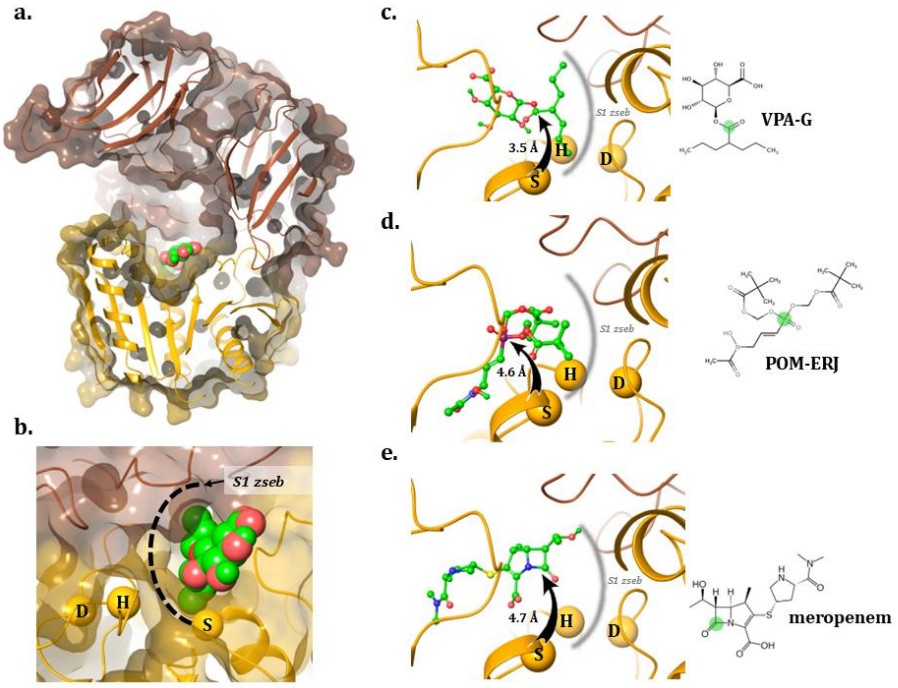
80. ábra. A PharmMapper által azonosított POM-ERJ célpont-proteázok. **a.)** A POM-ERJ szerkezete, a hidrolizálható karbonil zöld színnel kiemelve. **b.)** a DPP-IV **c.)** és a trombin esetében prediktált kötődési hely. A katalitikus triád (Ser-His-Asp) Cα atomjai gömbökkel vannak jelölve. A piros nyilak az aktív Ser -ről kiindulva a hidrolizálható karbonil felé mutatnak.

A meropenem esetében a PharmMapper 3 hidroláz célpontot azonosított. A DPP-IV-meropenem komplexben a β-laktámgyűrű hidrolizálható karbonilja 9,5 Å-re van az aktív Ser Oγ atomjától, míg a butiril-kolinészteráz esetében ez a támadási távolság 11,3 Å. Mindkét távolság túl nagy ahhoz, hogy ezek reakcióra hajlamos elrendeződésnek tekinthessük, azonban az algoritmus a trombin esetében talált (hasonlóan a VPA-G-nél tapasztaltakkal) egy viszonylag kompakt komplexet (81. ábra). Ugyanazok az aggályok merülnek fel itt is, mint a VPA-G esetében – a trombin sekély aktív zsebe és a specifikus kontaktusok alacsony száma – de a meropenem esetében a kísérleti eredmények is igazolják, hogy ilyen kölcsönhatás nem alakul ki. Az aminoglikozid antibiotikumok gyulladáscsökkentő és véralvadásgátló hatását vizsgálva meropenemet használtak kontrollként, és megmutatták, hogy az nem gátolja sem a trombin, sem a PAF-acetilhidroláz által kiváltott aggregációt[160]. (Azt, hogy magát a AAP-t nem azonosította egyik módszer sem, mint a meropenem lehetséges célpontját, azzal lehet leginkább magyarázni, hogy humán AAP szerkezet nem áll rendelkezésre – így egyáltalán nem is szerepel a lehetséges célpontok adatbázisában.)



81. ábra. A PharmMapper által azonosított meropenem célpont-proteázok. **a.)** A meropenem szerkezete, a hidrolizálható karbonil zöld színnel kiemelve. **b.)** A trombin, **c.)** a DPP-IV és **d.)** a butirilkolinészteráz esetében prediktált kötődési hely. A katalitikus triád (Ser-His-Asp) Cα atomjai gömbökkel vannak jelölve. A piros nyilak az aktív Ser -ről kiindulva a hidrolizálható karbonil felé mutatnak.

Összehasonlításképp, a pAAP esetében is modelleztük a reakció-t megelőző, elődleges, nem-kovalens komplexek szerkezetét MCMM módszerrel (ezek közül a meropenem és VPA-G komplexek szerkezetét már korábban is bemutattam), melyek mindhárom esetben a szubsztrát reaktív konformációban való, stabil kötődését mutatták (82. ábra)

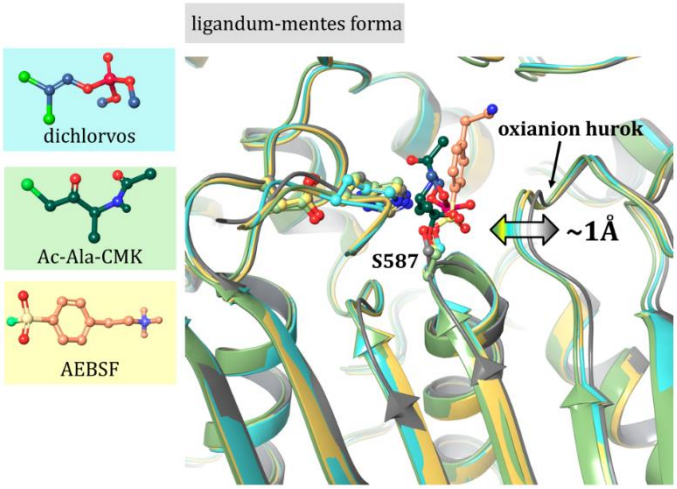


81. ábra. A kiválasztott ligandumok MCMM módszerrel számított kötődési módja a pAAP aktív helyének közelében. a.) Az aktív zseb elhelyezkedése a propeller (barna) és hidroláz (sárga) domének között, a VPA-G molekulával (zöld). **b.)** Az aktív hely és az S1 zseb közelképe**. c.-e.)** Az aktív hely elrendeződése és a Ser587 Oγ atom és a ligandumok támadási helye (a sematikus ábrán zöld ponttal jelölve) közti távolság a VPA-G, POM-ERJ és a meropenem esetében. A katalitikus triád Cα atomjainak pozícióját gömbök jelzik.

Eredményeink tehát azt mutatták, hogy az AAP valóban szélesebb szubsztrátprofillal rendelkezhet, mint szerkezeti és funkcionális homológjai. Munkánk következő fázisában olyan inhibitorok AAP-hoz való kötődését vizsgáltuk, amelyek jól bevált szerin-proteáz partnerek és megpróbáltuk ezekben a szerkezetekben azonosítani az AAP egyediségének szerkezeti összetevőit.

Három pAAP-inhibitor komplex szerkezetét határoztuk meg krio-EM módszerrel: az enzim egy klórmetil-keton (CMK) inhibitorral, egy organofoszfát (OP) rovarölő-szerrel (diklórvos) és egy benzolszulfonil-fluoriddal alkotott komplexét. Mivel az *N*-acetilezett peptidek CMK-származékai az AAP gátlásával apoptózist indukálnak[161], míg az AAP OP-komplexei az OP-expozíció biomarkereiként szolgálhatnak és kognitív folyamatokat befolyásolnak[135], ezek a komplexek fiziológiai jelentőséggel is bírnak, de a szerkezetmeghatározás elsődleges célja az volt, hogy jobban megértsük az AAP ligandumkötési folyamatának molekuláris részleteit.

A CMK-származékok olyan komplexeket képeznek a szerin-proteázokkal, amelyek a katalitikus reakció első köztitermékére, a tetraéderes acil-enzim komplexre hasonlítanak, kovalens kötést képezve a katalitikus tirád Ser és His aminosavaival. Ezért ezeket a származékokat gyakran használják az aktív hely szubsztát-specificitásának felderítésére és a szubsztrát-kötő zsebek elhelyezkedésének és méretének meghatározására[162]. Az Ac-Ala-CMK inhibitor (a klorid-ion távozását követően) kovalens kötéssel kapcsolódott a tetramer pAAP minden monomerének aktív S587 és H707 oldalláncához. A tetraéderes központ oxigén atomját (ami a komplex stabil formájában valószínűleg egy OH-csoport) az oxianion zseb G509 és H588 gerinc-amidjai orientálják, a várakozásoknak megfelelően, azonban egyik távolság sem elég közeli ahhoz, hogy erős koordináció alakuljon ki (3,9 Å, illetve 3,6 Å). Ez meglepő eredmény volt, mivel ez a két H-híd kötés az oxianion zseb meghatározó kölcsönhatása, az α/β-szerin-hidrolázok szubsztrátjaikkal kialakított kölcsönhatásának jellegzetes motívuma. Az inhibitor amid NH-csoportja a G509 karbonil oxigénje felé mutat, ami – ismét – hasonló a szerin proteáz enzimek szubsztrátkomplexeiben megfigyeltekhez, de ez a távolság sem elég közeli (3,8 Å) ahhoz, hogy erős kölcsönhatás alakuljon ki. Az inhibitor kisméretű Ala oldallánca a sekély S1 zsebben helyezkedik el. A pAAP ligandum-mentes szerkezetéhez képest mind az oxianion-, mind pedig a katalitikus H707-t hordozó His-hurok-hurok enyhe átrendeződése figyelhető meg: a G509 gerincének N és Cα atomjai 0,5 Å-rel, illetve 0,6 Å-rel mozdulnak el az inhibitor irányában és a His-hurok is 0,5 Å-rel közelebb kerül az inhibitorhoz. Úgy tűnik, mintha a ligandummentes forma túl tág aktív helye közelebb akarna „lépni" az inhibitorhoz, hogy a megkötéséhez elegendő mértékben felaktiválódjon, de az így kialakult aktív zseb még mindig jóval tágabb, a ligandum pedig kevésbé koordinált, mint a kanonikus kötődési mód esetében (82. ábra).



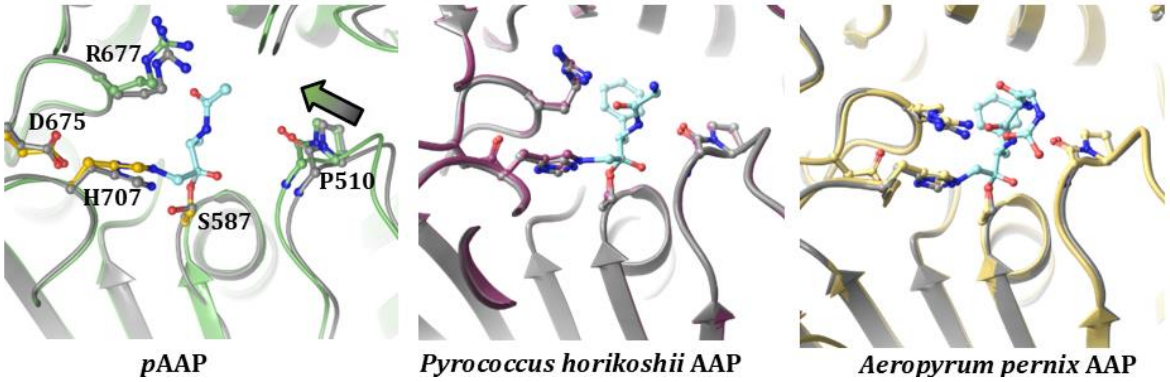
82. ábra. A pAAP klasszikus szerin proteáz inhibitorokkal képezett komplexeinek krio-EM módszerrel meghatározott szerkezete. A komplexképzés hatására az oxianion hurok közelebb mozdul az aktív S587-hez.

A pAAP-dimetoxifoszfát (DMP) komplexet úgy hoztuk létre, hogy a pAAP oldatához diklórfoszt, egy organofoszfát (OP) rovarirtót adtunk. A diklórfosz dimetoxifoszfát (DMP) maradványa szintén kovalens kötéssel kapcsolódik a pAAP aktív S587 Oγ atomjához. A foszfát szabad oxigénje az oxianion zsebben rögzül és orientálódik. Itt – ellentétben a CMK-származékkal képzett komplex esetével – egy szoros H-híd kötés valóban kialakul oxianion-hurokkal (a G509 amid NH-jával), míg a másik kölcsönhatási partner, a H588 amid NH-ja, még mindig túl messze van az erős asszociációhoz. Az organofoszfát egyik metoxi csoportja az S1 kötőzsebbe dokkolódik. Az oxianion- és a His-hurkok eltolódása a ligandum-mentes pAAP szerkezetben található pozícióikhoz képes itt is megfigyelhető: az oxianion-hurok közelebb kerül az inhibitorhoz, a G509 gerincének N és Cα atomjai 0,6 Å-rel, illetve 0,7 Å-rel eltolódnak, azonban a katalitikus His-hurok ellenkező irányba (0,8 Å-rel, a His707(Cα) atomok között mérve) mozdul el, távolodva a katalitikus központtól. Az általunk meghatározott komplex nem mutatja öregedés jeleit, ami azt jelenti, hogy mindkét metoxi-szubsztituensét megőrizte. (Az öregedés egy spontán dealkilezési folyamat, amely gyakran fordul elő a szerin proteázok organo-foszfát komplexeiben, ahol az O-alkil (vagy N-alkil) csoportok fokozatos elvesztése növeli a komplex irreverzibilis jellegét.)

Az OP peszticidek toxicitásának hátterében az áll, hogy irreverzibilisen gátolják az α/β-hidrolázok közé tartozó szerin-proteáz enzim, az acetil-kolinészterázt (AChE) és egy szerin-foszfolipáz enzim, a neuropátiás target-eszterázt (NTE) működését. Az AChE és az NTE gátlása úgy történik, hogy az OP-vegyületek foszforilálják ezeknek az enzimeknek a katalitikus szerin-oldalláncát, hasonlóan a pAAP esetében megfigyelthez. Számos további szerin-hidroláz enzim létezik, többségükben az AAP-hez hasonlóan α/β-hidrolázok, amelyek hasonlóan módosulnak az OP-vegyületek hatására, eddig még nem jellemzett fiziológiai következményekkel. Ezek közül a karboxilészterázok (például CES1) és a butiril-kolinészteráz (BChE) tekinthetők az OP-k elsődleges endogén „eltakarítóinak". Mindkettő az egész szervezetben előfordul, és számos OP-t képes koordinálni anélkül, hogy az káros fiziológiai hatásokat okozna. Ezeken kívül a vérlemezke-aktiváló faktor acetilhidroláz (PAF-acetilhidroláz), a katepszin A és a dipeptidil peptidáz IV (DDP-IV) is kölcsönhatásba lép az OP-kkal[163]. Az AAP azonban mind a vérben, mind az agyban az OP-k érzékenyebb receptorának bizonyult bármelyik másik célpont-fehérjénél, így az AChE-nál is. Az AAP OP-k általi gátlása olyan hatékony és irreverzibilis, hogy egy peszticideknek kitett személy esetében (egy mezőgazdaságban dolgozó munkás, például) az expozíció még hetek múlva is kimutatható a vörösvérsejtek AAP-aktivitásának monitorozásával[164].

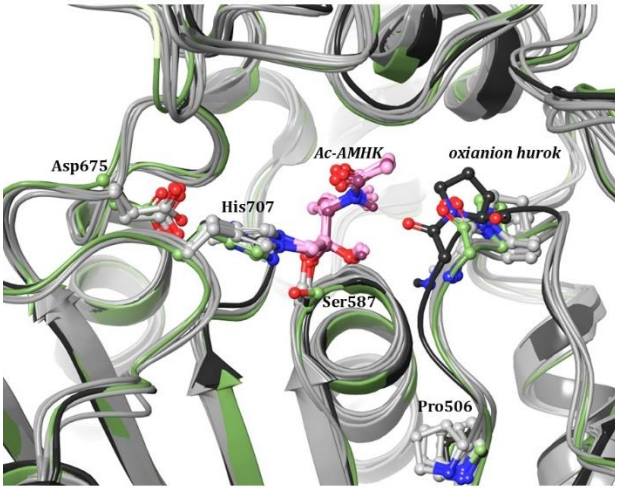
A szulfonil szerin-proteáz inhibitor (AEBSF) pAAP komplexének szerkezete is hasonló átrendeződéseket mutatott, mint az OP-komplex. Az oxianion hurok 0,4 Å-rel a ligandum felé mozdul míg a His-hurok 0,2 Å-rel hátrébb húzódik. A ligandum pozíciójában csak részleges töltéssűrűség volt jelen (helyi felbontás 2,9 Å), ami az inhibitor pontos kötődési módjának értelmezését bizonytalanná teszi. Az azonban biztosan megállapítható volt, hogy a szulfonil vegyület kovalens kötéssel kötődik a katalitikus S587-hez, és az egyik szulfonil-oxigénatom H-kötési távolságon belül található az oxianion zseb egyik vagy mindkét NH-csoportjától.

A pAAP ligandummentes és komplexált formái közti konzekvensen megjelenő különbség tehát a komplex képződésekor bekövetkező szerkezet adaptáció, amelynek legjelentősebb mozzanata az oxianion-hurok eltolódása. Ez az eddig meghatározott AAP szerkezetek közt különlegességnek számít, az AAP ősbaktérium eredetű változatai esetében nem tapasztaltunk ilyet: ezek olyan aktív helyeket tartalmaznak, melyek átalakulás nélkül képesek az inhibitorok/szubsztrátok koordinációjára (83. ábra).



83. ábra. Különböző AAP enzimek aktív helyeinek szerkezeti változásai klórmetil-keton inhibitor kötődése esetén. A kovalens komplexek és a megfelelő ligandummentes formák egymásra illesztett szerkezetei láthatók. A pAAP-AcA-MHK komplex kialakulásakor (bal oldalon, PDB kód: 7px8 és 9gne) az oxianion-hurok az inhibitor kötődésekor eltolódik (szürkés-zöld nyíllal jelölve), míg a *Ph*AAP-(Z)GGF-MHK (középen, PDB kód: 4hxf és 4hxe) és az *Ap*AAP-(Z)GGF-MHK (jobb oldalon, PDB kód: 4re6 és 3o4g) komplexek esetében nem.

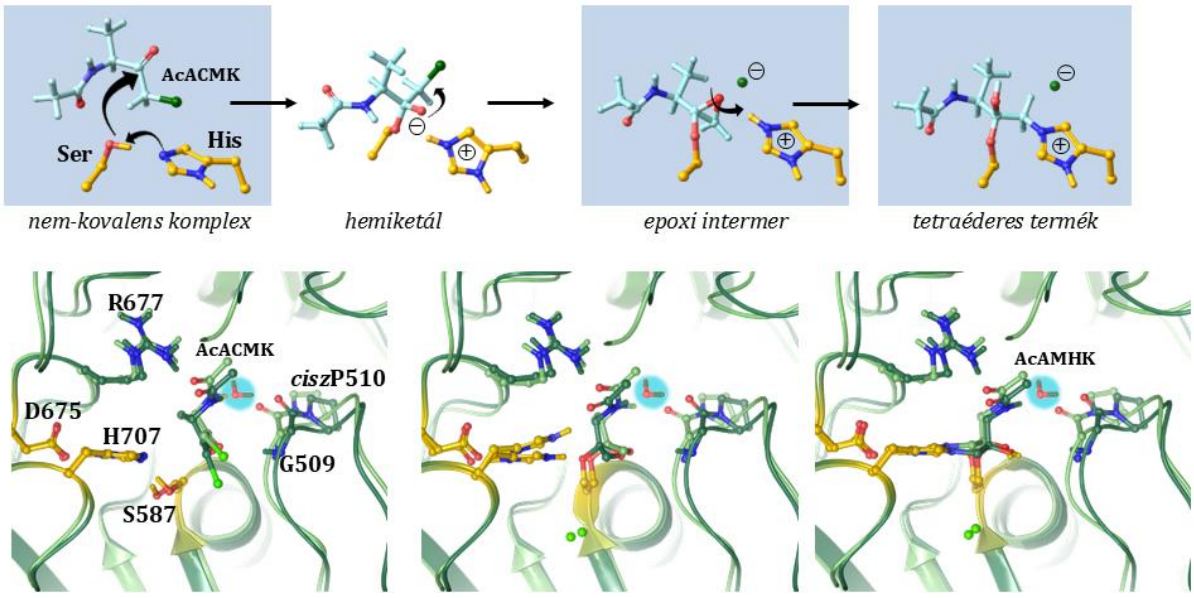
QM/MM számításokat végeztünk annak megállapítására, hogy egy ilyen mértékű elmozdulás rendelkezhet-e a katalízis szempontjából bármi jelentőséggel. Azért, hogy jól összehasonlítható rendszereket tudjunk vizsgálni, azaz, hogy az összehasonlítandó modellek közötti különbségeket az aktív helyre összpontosítsuk, a két vizsgált rendszert egy olyan MD szimuláció trajektóriájából emeltük ki, ahol a pAAP tetramer gerincét a ligandummentes formában talált konformáció közelébe rögzítettük. A szimuláció kiindulási szerkezetét úgy állítottuk elő, hogy a ligandummentes állapot krio-EM szerkezetébe (miután azt kiegészítettük a kísérletileg meghatározott szerkezetből hiányzó szakaszokkal) beépítettük az AcAMKH inhibitort, a kísérletileg meghatározott konformációban. A szimuláció során 100 kJ/mol*nm^2 helyhez-rögzítő kényszert alkalmaztunk minden monomer 9-732 szakaszának gerinc-atomjaira. Az így előállított trajektória tetramer szerkezeteit monomerekre bontottuk és az összes előforduló monomer szerkezetet klasztereztük. Két topológiailag is elkülönülő szerkezetet találtunk: az egyikben közvetlen H-kötés alakult ki a G509 karbonil és az AcAMHK amid csoport között, az oxianion-hurok (a kényszerek jelenlétének ellenére történő) enyhe előre tolódása révén, a másikban, az oxianion hurok távolabb helyezkedik el (a ligandummentes állapotot mimikálva), így viszont az inhibitor és hurok közé egy vízmolekula ékelődik (84. ábra).



84. ábra. A pAAP-AcAMHK komplex MD szimulációja során előállított öt klaszter reprezentatív szerkezetei (klaszter középpontok). Sötét szürke és bordó színűek azok a konformerek, ahol közvetlen H-kötés alakul ki az oxianion hurok és az inhibitor között (1 klaszter, amely a szerkezetek 35,1%-át tartalmazza), míg azokat a szerkezeteket (4 további klaszter) ahol az oxianion hurok a ligandummentes állapotnak megfelelő konformációja volt megfigyelhető, világosabb szürke és rózsaszín színekkel jelöltem. A ligandummentes pAAP (PDB: 7px8) krio-EM szerkezete zöld színnel látható.

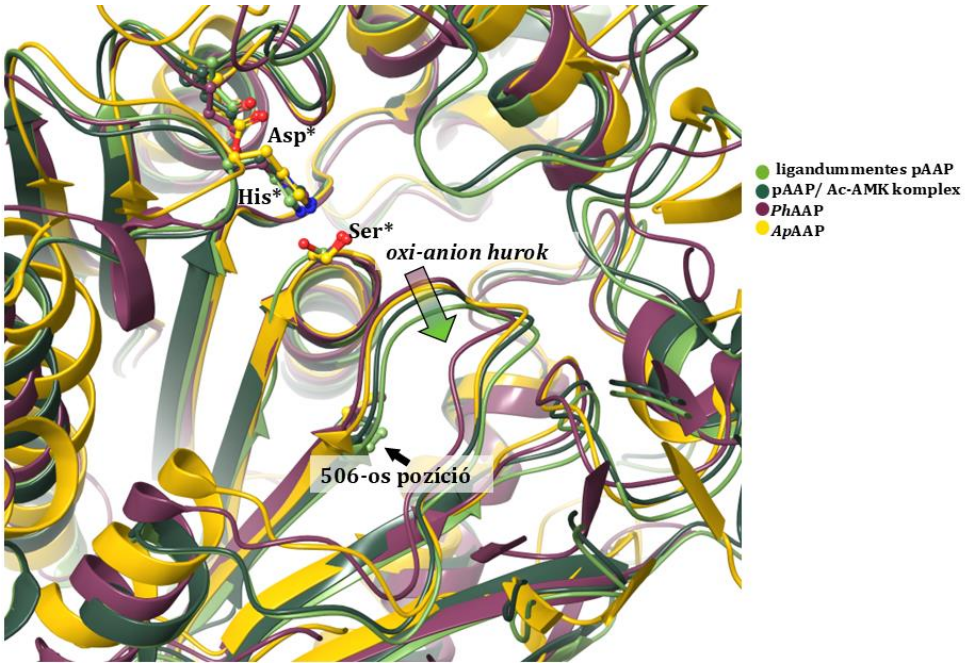
Kiszámítottuk a komplexképződési folyamat javasolt reakcióútja mentén a kritikus állapotok - a kiindulási állapot, az epoxi köztitermék és az acil-enzim-szerű termék állapot - konformációs

energiáit. Megállapítottuk, hogy míg az epoxi intermedier relatív energiája nem változott, a reakció termékállapota az oxianion-hurok távoli konformációja esetén lényegesen kevésbé volt kedvező, mint abban a modellben, ahol közvetlen asszociáció alakult ki a hurok és az inhibitor között (85. ábra). A számítások tehát azt jelzik, hogy még az oxianion-hurok ilyen kis mértékű elmozdulása (1,1 Å, 1,2 Å és 1,0 Å, a G509 amid H-atomnál mérve a reaktáns, az epoxi és a termék állapotok QM/MM-ből származtatott szerkezeteiben) is jelentős változást okoz a pAAP reaktivitásában, így az enzim ligandummentes formája valóban részlegesen inaktivált, vagy látens konformációjúnak mondható.



85. ábra: Kovalens komplex képződése pAAP és AcACMK között. a.) A komplex képződésének lépései – a vizsgált állapotokat kék négyzetek jelzik. **b.)** A reagens állapot (balra), az epoxi köztitermék (középen) és a tetraéderes acil-enzim állapot (jobbra) számított szerkezetei. A modellrendszer, amelyben közvetlen H-híd kötés jön létre az inhibitor és az előre tolódott oxianion-hurok között világosabb zöld színnel, míg azok a konformációk, amelyekben víz van beékelve a kettő közé, sötétebb zöld színnel van jelölve (a katalitikus triád szénatomjait sárga színnel jeleztem, a beékelődött vízmolekulákat világoskék háttérrel emeltem ki). Az epoxi-köztitermék (középen) relatív energiái (B3LYP/6-31G**): 2,4 kcal/mol a közvetlen H-kötéssel rendelkező modell esetében (világos zöld) és 2,6 kcal/mol a vízzel elválasztott modell esetében (sötét zöld); a tetraéderes termékállapotra vonatkozó energiák pedig -17,8 és -44,1 kcal/mol a két modell esetében, ami azt mutatja, hogy a rugalmas oxianion-hurokkal rendelkező, közvetlen H-kötést képező elrendeződés a reakció szempontjából előnyösebb.

Az oxianion hurok alakja és helyzete nem csak abban különbözik az ősbaktérium eredetű AAP variánsok esetében, hogy változatlan marad a komplexképződés során, hanem olyan konformációban található, amely nagyon hasonlít annak a pAAP komplexeiben megfigyelt, előre tolódott állapotához (85. ábra). Így ezek a rendszerek a pAAP olyan funkcionális modelljeiként használhatók, ahol korlátozottabb mozgású és szűkebb a katalitikus hely.



86. ábra. Az archaea AAP-k szerkezetének összehasonlítása a pAAP ligandummentes és komplex állapotú szerkezetével. Az oxianion hurok eltolódását színes nyíl jelzi. (A kép elkészítéséhez használt PDB-szerkezetek: pAAP (ligandmentes): 7px8, pAAP (Ac-AMHK komplex): 9gne, *Ph*AAP: 4hxe, *Ap*AAP: 3o4g.)

Ezért megvizsgáltuk a *Ph*AAP és az *Ap*AAP reaktivitását. Azt találtuk, hogy az archaeális változatok meglehetősen szelektívek a specifikus szubsztrátjuk, az Ac-Leu-pNA (N-acetil-leucil-p-nitroanilid) iránt, és nem képesek hasítani az Ac-Ala-pNA-t, míg a pAAP mindkettőt szinte azonnal processzálja. Továbbá sem az *Ap*AAP, sem a *Ph*AAP aktivitását nem gátolja a meropenem. Az *Ap*AAP és a meropenem ko-kristályszerkezetének előállítására tett kísérletek szintén sikertelenek voltak – ugyanazt a protokollt alkalmazva, amely az *Ap*AAP és a peptidszerű klórmetil-keton inhibitor ko-kristályait eredményezte, a meropenemet használva inhibitorként csak a ligandummentes forma kristályosodott ki. Így arra a következtetésre jutottunk, hogy sem az *Ap*AAP, sem a *Ph*AAP nem képes megkötni az antibiotikumot. Bár a pAAP és az archaeális változatai közötti homológia alacsony, az aktív hely alakja és felépítése hasonló, eltekintve oxianion hurok a pAAP ligandummentes állapotához tartozó relaxált konformációjától, így az ősbaktérium eredetű és emlős forma közötti reaktivitásbeli különbség valószínűleg az utóbbi aktív helyének jobb hozzáférhetősége és nagyobb alkalmazkodóképességének következménye.

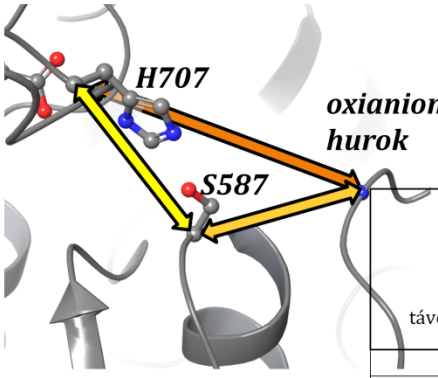
A következő lépésben megvizsgáltuk, hogy a pAAP aktív helyének relaxált ligandummentes állapota a hasonló felépítésű fehérjék körében is szokatlannak mondható-e. Az AAP tágabb családja, α/β hidrolázok hidroláz doménjének szerkezete konzervált: egy β-réteg képezi a vázát, amelyen belül a katalitikus szerin egy éles kanyarban (Ser-hurok) helyezkedik el, összekötve a redő egy eltemetett szálát és az azt követő hélixet. A katalitikus His-hurok és az oxianion-hurok is megtalálható a család legtöbb szerin-hidrolázában, ami megkönnyíti a szerkezeti összehasonlítást. Ezt az OP ligandumok patogenicitásáért felelős AChE enzim példáján



87. ábra. A pAAP (PDB: 7px8) és az egérből származó acetilkolin-észteráz (AChE; PDB: 1j06) hidroláz domének központi régiói hasonló felépítésűek.

mutatom be a 87. ábrán. A központi β-redők hasonlósága szembeötlő, amint az is, hogy a His-hurok és az oxianion-hurok közelebb vannak az aktív Ser-hez az AChE szerkezetekben, mint a pAAP-ben. Az AChE ligandummentes és OP-gátolt formáinak összehasonlításakor az is kiderült, hogy az inhibitorok koordinációja az aktív hely szerkezeti átrendeződése nélkül valósul meg – azaz az AChE ligandummentes formája katalitikusan aktív konformációjú, a ligandum koordinációja nem igényel adaptációt.

Összegyűjtöttük tehát azokat a humán α/β hidroláz enzimeket, amelyeknek mind a ligandummentes, mind az OP vagy CMK-gátolt formájának szerkezete ismert, és összevetettük a pAAP szerkezeteivel (amely egyben a vele 98%-os szekvencia-homológiával rendelkező humán enzim modelljeként is tekinthető) és azt találtuk, hogy a pAAP aktív helye a legtágasabb mind közül. Három távolságot mértünk ennek a tágasságnak a jellemzésére: a C_αSer*—C_αHis* (a csillag a katalitikus triád tagjait jelöli), a C_αSer*—$NH_{oxianion\text{-}hurok}$ (kiválasztva a heteroatomot, amely a Ser nukleofil támadását követően kialakuló negatív töltésű centrumot koordinálja) és az $NH_{oxianion\text{-}hurok}$—$C_\alpha$His* távolságokat. Látható továbbá, hogy a pAAP aktív helye nem csupán a legtágasabb, de ez mutatja a legnagyobb változékonyságot is a ligandumkötés során (88. ábra).



távolságok (d / Å)	C_αSer -- C_αHis d1	C_αSer -- $NH_{oxianion}$ d2	$NH_{oxyanion}$ -- C_αHis d3	C_αSer -- C_αHis d1	C_αSer -- $NH_{oxyanion}$ d2	$NH_{oxyanion}$ -- C_αHis d3	Δd1	Δd2	Δd3
	ligandummentes forma			OP-komplex					
pAAP	**8,5**	**7,2**	**12,6**	**9,1**	**6,5**	**12,9**			
dipeptidil peptidáz IV	8,0	6,1	11,2	7,9	6,4	11,5			
PAF acetilhidroláz	8,1	6,0	11,1	7,9	6,1	11,0			
karboxilészteráz 1	8,2	5,9	10,8	8,4	5,8	11,0			
acetilkolin-észteráz	8,1	5,8	10,3	8,2	5,8	10,4			
katepszin A	7,5	5,8	11,4	7,6	5,9	11,3			
butirilkolin-észteráz	8,2	5,6	10,5	8,5	5,9	10,9			
	ligandummentes forma			CMK-komplex					
pAAP	**8,5**	**7,2**	**12,6**	**8,3**	**6,7**	**11,7**			
ApAAP	8,1	5,8	11,3	8,0	6,0	11,1			
PhAAP	7,7	6,0	11,3	7,7	5,9	11,1			
AlphaFold model: pAAP	8,0	5,2	10,9						
AlphaFold model: hAAP	8,1	5,4	10,9						
	ligandummentes forma			szulfonil-komplex					
pAAP	**8,5**	**7,2**	**12,6**	**8,7**	**6,8**	**12,4**			

rövid — **hosszú** **csökken** — **nő**

88. ábra. Az α/β hidroláz szupercsaládba tartozó szerin-hidrolázok ligandummentes és komplex formáinak aktív helyi dimenziói és azok megváltozása komplexképzéskor. Az egyes aktív helyek méretét három, háromszöget alkotó távolság segítségével írtuk le: a katalitikus Ser* és His* atomok C_α atomjai között mért távolság (d1), a C_αSer* és az oxianion-hurok hidrogén-kötés donor atomja ($NH_{oxianion}$; pAAP esetében a G509) (d2), valamint az $NH_{oxianion}$ és a C_αHis* közötti távolság (d3) (lsd. bal felső sarok). A táblázatban szereplő számok a szerkezetekben szereplő összes láncra számított átlagértékek. Oszloponként, a sötétebb színek a hosszabb, míg a világosabb színek a rövidebb távolságokat jelölik. Az utolsó 3 oszlop az az egyes dimenziók (d1, d2, d3 távolságok) ligandummentes és a komplexált formák közti megváltozásának mértékét mutatják egy pirostól (komplexképzés hatására csökkenő távolság), fehéren át (nincs változás) sötétkékig (komplexképződés hatására megnövekvő távolság) terjedő színskálával jellemezve. (A dipeptidil-peptidáz IV esetében az a/β-hidrolázok jellegzetes oxianion-hurka eltolódik, és

az oxianion koordinációját a Tyr547 hidroxilcsoportja végzi, amely helyettesíti a hurkot, így ebben az esetben a TyrOG1 atomot használtuk a Gly amid hely 3. horgonypontjaként). A felhasznált PDB szerkezetek: 7px8, 9gou (pAAP), 1tk3 (DPP-IV), 3d59, 3d5e, 3f97, 3f98, 3f9c (PAF-AH), 2h7c, 4ab1, 5a7f, 2hrq, 2hrr, 3k9b (CES1), 1j06, 2jgf, 2jgi, 2jgl, 2jgm (AChE), 1ivy, 4mws, 4mwt (CAT-A), 2pm8, 3djy, 3dkk, 1p0q, 1xlw, 2xqj, 2xqk, 4bbz (BChE), 3o4g, 4re5, 4re6 (ApAAP), 4hxe, 4hxf (PhAAP), és AlphaFold3 modellek: AF-P19205-F1-v4, AF-P13798-F1-v4.

Az AlphaFold3[107] szerkezetbecslő (AF3) algoritmus segítségével is elkészítettük mind a humán (hAAP) és sertés AAP (pAAP) tetramer szerkezeti modelljét, majd összehasonlítottuk ezt is a meghatározott pAAP szerkezettel. Mivel az AF3 a 2021-ben a PDB adatbázisban található szerkezetek alapján lett betanítva, ezek a modellek a szerin-hidroláz szerkezetek széles skáláján (is) alapulnak. A fenti táblázatban látható, hogy az AF3 jelentősen alábecsülte a pAAP aktív helyének méreteit – ami ismét arra utal, hogy a pAAP szerkezet aktív helyi elrendeződése meglehetősen szokatlan.

Szerkezeti összevetéseink körét tovább tágítva a szerin proteázok nagy családjában is megvizsgáltuk az aktív hely tipikus méretét és az inhibitor-kötődés során bekövetkező méretváltozásait. A szerin nukleofilt tartalmazó proteolitikus enzimek 13 csoportba sorolhatók, amelyek mind a katalitikus apparátus és a 3D szerkezet különböző konfigurációit képviselik. Ezeken belül, az AAP-t is tartalmazó prolin-oligopeptidáz család (SC) mellett, három további különálló család - amelyeket a tripszin (PA), a szubtilizin (SK) és a ClpP peptidáz (SB) képvisel - használja Ser-His-Asp triádot peptidkötések hidrolízisének katalizálására. A 13-ból 10 klán esetében találtunk olyan reprezentatív szerkezeteket, amelyek az összehasonlítást lehetővé teszik. Ennek a vizsgálatnak az eredményei is azt mutatják, hogy a pAAP szokatlanul tágas és adaptív aktív helyet hordoz (89. ábra).

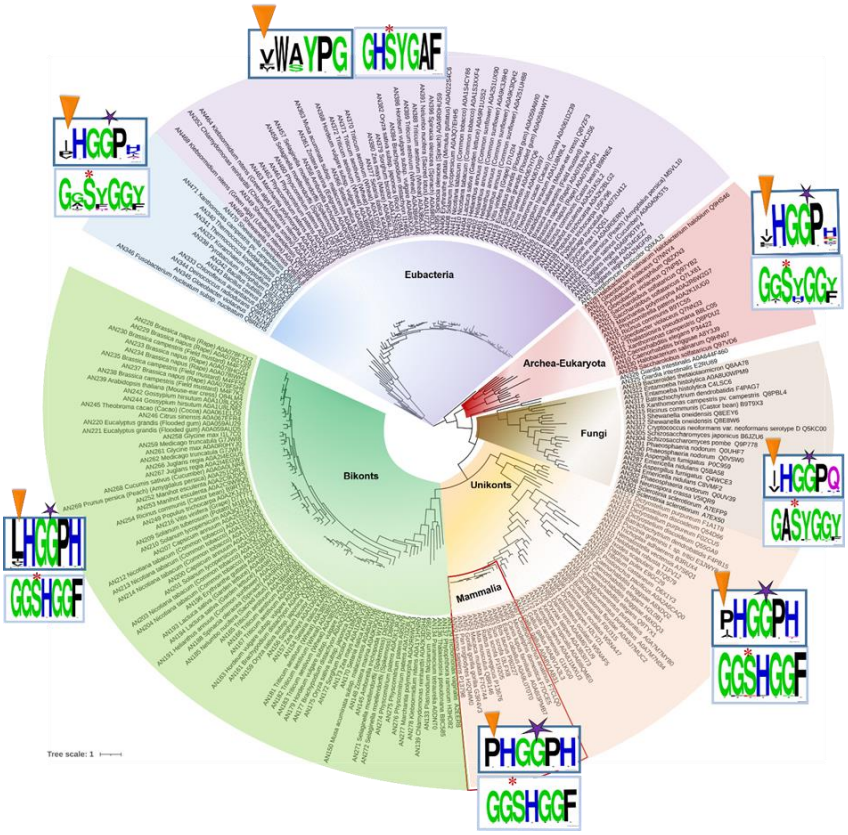
távolságok (d / Å)	C_αSer -- C_αHis d1	C_αSer -- $NH_{oxianion}$ d2	$NH_{oxyanion}$ -- C_αHis d3	C_αSer -- C_αHis d1	C_αSer -- $NH_{oxyanion}$ d2	$NH_{oxyanion}$ -- C_αHis d3	Δd1	Δd2	Δd3
	ligandummentes forma			OP-komplex					
pAAP (SC)	**8,5**	**7,2**	**12,6**	**9,1**	**6,5**	**12,9**			
kimotripszin (PA)	8,3	5,4	11,4	8,2	5,4	11,3			
trombin (PA)	8,4	5,5	11,6	8,3	5,5	11,0			
szubtilizin (SB)	8,5	6,2	11,1	8,2	5,8	10,5			
romboid proteáz GlpG (ST)	7,3	5,7	11,1	7,8	5,7	11,4			
	ligandummentes forma			CMK-komplex					
pAAP (SC)	**8,5**	**7,2**	**12,6**	**8,3**	**6,7**	**11,7**			
trombin (PA)	8,4	5,5	11,6	8,3	5,5	11,2			
P.rabies proteáz pUL26N (SH)	8,4	6,3	12,0	8,5	5,9	12,0			
	ligandummentes forma								
pAAP (SC)	**8,5**	**7,2**	**12,6**						
kallikrein-szerű peptidáz (PA)	**8,6**	**5,4**	**11,6**						
D-Ala-D-Ala karboxipeptidáz (SE)	**5,5**	**5,7**	**11,0**						
LexA peptidáz (SF)	**7,3**	**4,3**	**11,3**						
Clp peptidáz (SK)	**5,8**	**6,2**	**11,0**						
Nucleoporin 98 (SP)	**5,9**	**4,6**	**7,4**						
L,D-karboxipeptidáz (SS)	**7,9**	**5,7**	**10,9**						



89. ábra. Az aktív hely méretének alakulása a szerin-proteázok különböző klánjainak reprezentatív szerkezeteiben. A távolságokat az előző ábrán megfogalmazottaknak megfelelően mértem és ábrázoltam. Az enzimek neve mellett a megfelelő szerin proteáz klán betűjele látható zárójelben. A felhasznált PDB szerkezetek: 2gch, 1gcd, 1gmh (kimotripszin), 1sg8, 1h8i, 1ppb, 1hai (trombin), 5ms3 (kallikrein-szerű peptidáz), 3unx, 1bhb (szubtilizin), 3it9 (D-Ala-D-Ala karboxipeptidáz), 1jhf (LexA peptidáz), 4v07, 4v08 (P.rabies proteáz pUL26N), 1tyf (Clp peptidáz), 2q5x (Nucl. 98), 1zrs (L,D-karboxipeptidáz), 2io8 (romboid proteáz).

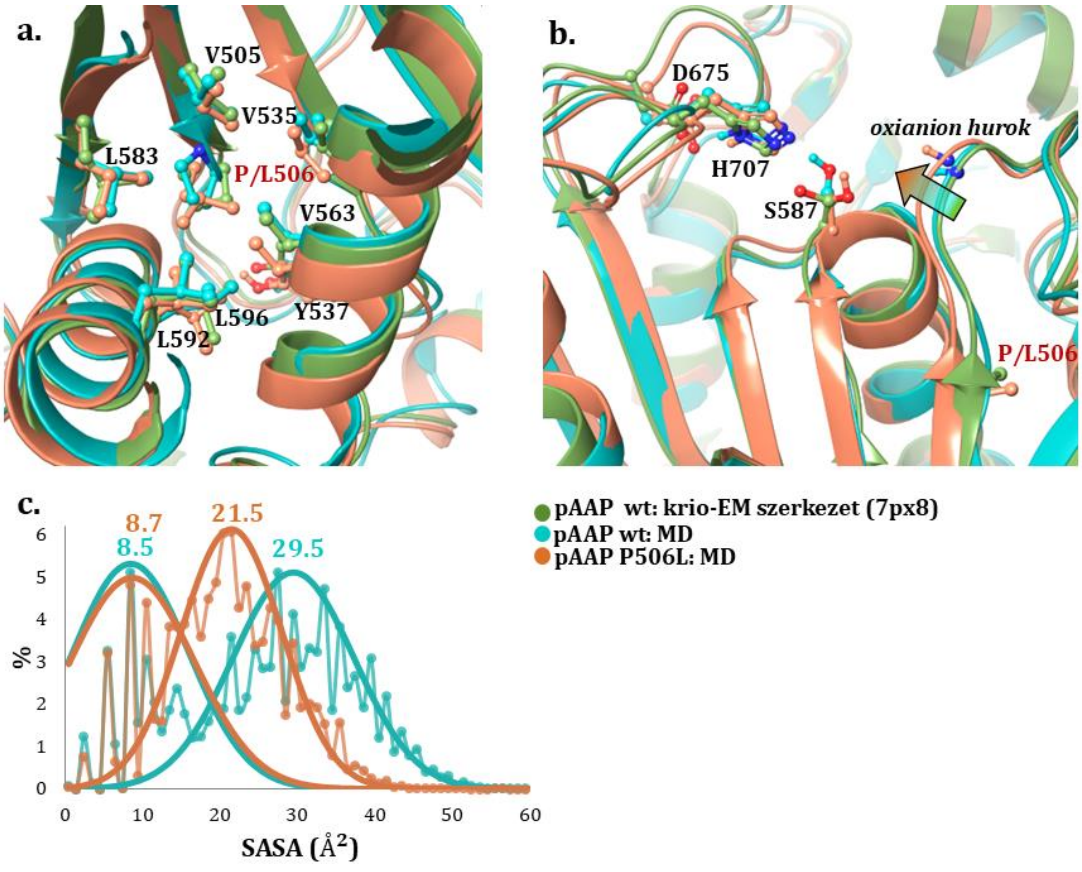
Eredményeink az sugallják, hogy míg a pAAP ligandummentes formájának flexibilis és jól hozzáférhető aktív helye elegendő helyet biztosít az OP-k mellett olyan szokatlan partnerek dokkolódásához is, mint a karbapenem antibiotikumok vagy a VPA-G, úgy tűnik, hogy a megnagyobbodott aktív hely katalitikusan nem elég kompetens azok feldolgozásához. Így, amikor egy szubsztrát/inhibitor kötődik, az oxianion-hurok közelebb húzódik, hogy segítse a kialakuló komplex negatív töltésű oxigénjének koordinációját.

Következő kérdésünk arra irányult, hogy vajon mi lehet az a szerkezeti motívum, ami a pAAP e rendhagyó viselkedését lehetővé teszi. Korábban már ismertettem, hogy a ligandummentes forma aktív-helyi szerkezeti heterogenitásáért a hidroláz domén központi β-redőjén, az aktív Ser szomszédságában található P506-t tettük felelőssé, hiszen a Pro jelenléte folytán megrövidülő 4. β-szál megnövekedett konformációs szabadsága a szomszédos 5. β-szál által támogatott Ser-hurok számára is nagyobb flexibilitást engedélyez. Mivel az oxianion hurok közvetlenül a 4. β-szálat követi mind térben, mind szekvenciálisan, feltételeztük, hogy ugyanez a P506 lehet az oxianion-hurok relaxációjának és képlékenységének legvalószínűbb kiváltója is. A Pro ebben a pozícióban leginkább az emlős eredetű AAP-kben fordul elő (90. ábra), de a tágabb családban is különlegességnek számít – az általunk vizsgált szerin proteázok esetében is nagyon ritkán fordul csak elő – tehát racionális volt feltételezni, hogy az AAP egyedi funkcionalitásának kialakításában is szerepet játszhat.



90. ábra. Az emberi AAP filogenetikai beágyazottsága. Az ábrát, saját kutatásainak eredményire építve, Dr. Kiss-Szemán Anna készítette a Panther21, iTol22 és WebLogo23 segítségével. A logók közül a sötétkékkel keretezett a pAAP P506-nak megfelelő és az azt követő 5 aminosavat mutatja, amelyek az oxianion zsebet alakítják, világoskék keretben pedig a katalitikus Ser közvetlen környezetét. A logókban a narancssárga háromszögek a Pro506 pozíciójában található aminosavat jelzik, a lila csillagok az oxianion-hely H-kötés donorját (ha van ilyen), a piros csillagok pedig a katalitikus Ser-t. (Az *Ap*AAP és a *Ph*AAP nem szerepelnek ebben a fában; ez a humán AAP szekvenciájával mutatott az alacsony homológiának köszönhető, mivel a Panther21 a kereső-szekvenciához képest 30%-os homológiánál kisebb hasonlóságot hordozó rendszereket nem vizsgál.)

A P506 jelentőségét vizsgálandó, *in silico* mutagenezist végeztünk MD szimulációkkal kombinálva. A tetramer, ligandummentes pAAP két változatát vizsgáltuk, a wt és a P506L pAAP-t (a kiindulási modelleket a kiegészített 7px8 szerkezet alapján készítettük), hogy megnézzük, valóban befolyásolja-e az aktív hely szerkezetét a P506 jelenléte vagy hiánya. A Leu-t azért választottuk, mert gyakran ez található az α/β hidrolázok megfelelő pozíciójában. Kényszermentes MD trajektóriák 150-250 ns szakaszát analizáltuk. Azt találtuk, hogy a Pro-t Leu-ra cserélve két, egymás segítő, hatás révén szorosabbá válik a 4. éd 5. β-szálak kapcsolata és ennek következtében beszűkül az aktív hely. Mind a Leu oldallánc bedokkolódása a közeli oldalláncok által kialakított hidrofób zsebbe, mind pedig a (Pro-hoz képest) plusz egy H-donor megjelenése a főláncon, a 4. és 5. β-szál közeledését váltja ki. Az aktív helyen ez az oxianion hurok előre tolódását vonja maga után, ami szépen követhető az aktív S587 oldószer által elérhető felületének (SASA) csökkenésével. A SASA-értékek eloszlása mindkét rendszerben bimodális, mindkét esetben egy hasonlóan kompakt konformáció az egyik uralkodó elrendeződés ~9 Å^2 hozzáférhető felülettel és emellett jelenik meg mindkét esetben egy lazább állapotot, 29,5 és 21,5 Å^2 SASA-val a wt és P506L pAAP rendszerekben – azaz a P506L mutáció a katalitikus aminosav hozzáférhetőségének jelentős csökkenését vonta maga után (91. ábra). Az eredmények tehát arra utalnak, hogy a szál-törő Pro jelenléte a hidroláz domén központi β-redőjében az oxianion hurok relaxációjának és az aktív hely kitágulásának fontos komponense.



91. ábra. A wt és P506L pAAP MD szimulációja. a.) Az 506-os oldallánc körüli hidrofób zseb. A L506 itt kedvezőbb kapcsolatokat hoz létre, mint a wt P506 aminosava. **b.)** Az aktív helyen megfigyelt különbségek: a P506L pAAP változat esetében az oxianion hurok előre tolódik, szűkítve a katalitikus zsebet, akadályozva a hozzáférést a katalitikus S587-hez. Az ábrán a legnépesebb klaszterek reprezentatív szerkezetei (klaszter közép-szerkezetek) láthatók. **c.)** A SASA átlagos értéke a P506L mutáció bevezetésével 26±11 Å^2-ről 20±8 Å^2-re csökken. A trajektória utolsó 100 ns-hoz tartozó SASA-értékek eloszlását a grafikon mutatja. A csúcsok feletti számok az illesztett Gauss-görbék középpontját jelzik, 0,5, 0,6, 0,6, 0,4 σ értékekkel a wt és a mutáns rendszerek 1. és 2. maximuma esetében.

Az AAP-re vonatkozó eddigi legfontosabb megállapításainkat összegezve elmondható, hogy az emlős pAAP egy promiszkuózus enzim, amelynek legvalószínűbb oka, hogy az aktív helye tágasabb és flexibilisebb, mint a szerin proteázok többségének. Ez pedig (legalábbis részben) annak a következménye, hogy egy a hidroláz domén szerkezeti integritásáért felelős központi β-redőbe egy Pro ékelődik, ami mind az aktív Ser-t hordozó huroknak, mind a kötőzseb méretét meghatározó oxianion huroknak fokozott mozgási-szabadságot biztosít. A fehérjemérnökség, azaz a tervezett fehérjék és mesterségesen módosított enzimek korában, különösen izgalmas volt megérteni, hogy a természet (vagy az evolúció) miként szélesítette ki az oly sokat használt szerin-proteáz katalitikus triád szubsztrát-körét anélkül, hogy az enzim elveszítette volna a hatékonyságát.

Kiterjesztve az összegzést az oligopeptidáz családra, a természet „kreatív lustaságát" érhetjük tetten – ebben a családban topológiailag azonos hidroláz és propeller doménekből meglepően sokféle struktúra és funkció épül fel. Különböző mértékű oligomerizáció, különböző szelekciós stratégiák, eltérő mozgékonyság és változatos szubsztrátprofil kialakításához ugyanazt a két, jól bevált építőelemet finomhangolta az evolúció.

Az általános topológia lehetővé teszi valamennyi oligopeptidáz számára, hogy egy indukált illeszkedési lépésben kitágítsa propellerpórusát, multimerizálódjon vagy felnyíljon, ami három alapvetően eltérő szubsztrát belépési/kilépési útvonalat hoz létre a külvilág és a domének közé elrejtett katalitikus hely között. Kutatásainkat végigkísérő egyik legérdekesebb kérdés épp az volt, hogy mely szerkezeti jellemzők kódolják az egyik vagy a másik stratégia kiválasztását.

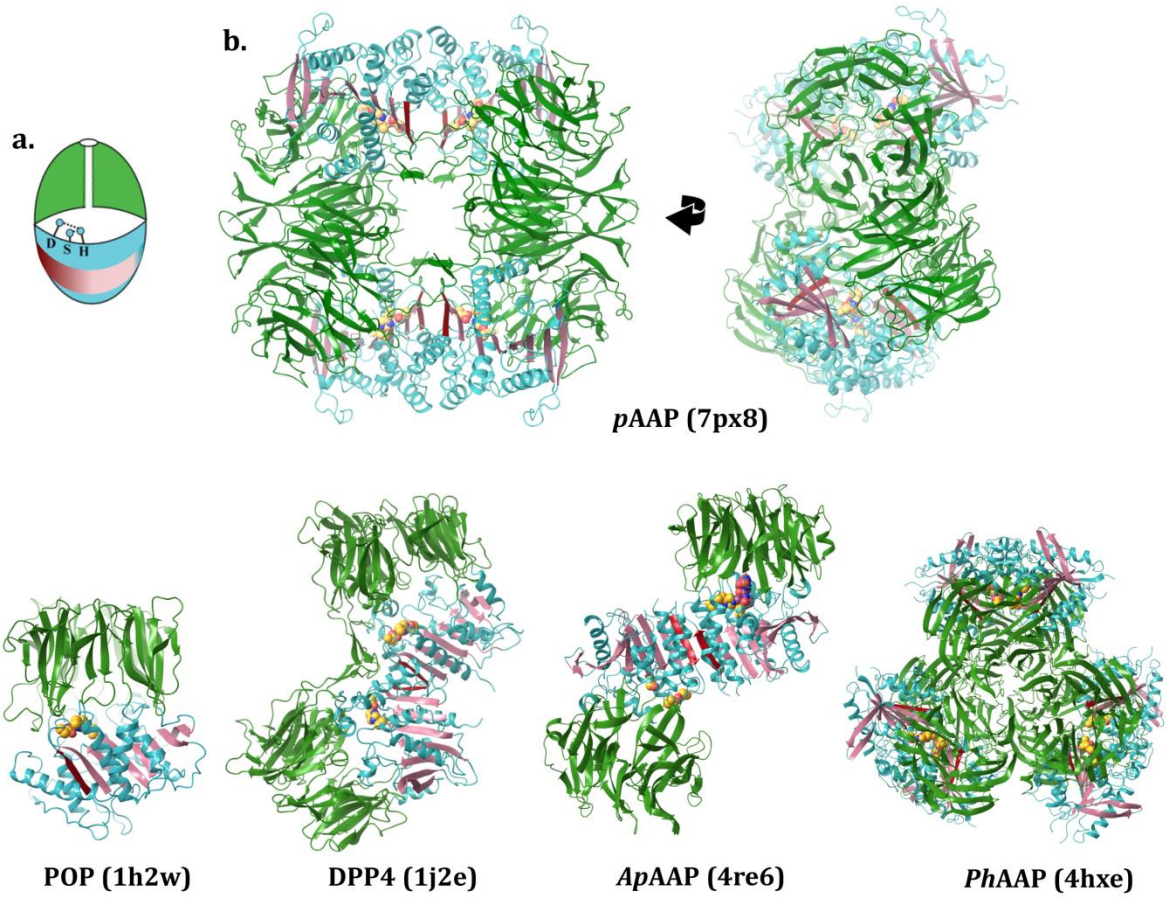
Az egyik döntő fontosságú jellemző a His-hurok rugalmassága. E régió flexibilitása alapvető fontosságú a felnyíló oligopeptidázok esetében, mivel a szelektivitást a nyitott formában az aktív centrum „kikapcsolása" biztosítja a His-hurok destabilizációja révén. Ennek megfelelően a POP, OPB és *Ap*AAP esetében a His-hurok alakját, a katalitikus His helyzetét és orientációját domén-közi kölcsönhatások határozzák meg. Így az aktív hely reakcióképessége a propellerdomén közelségéhez van kötve – annak távollétében a katalitikus apparátus „kikapcsol". Ezzel szemben a két domén közötti állandó bejárattal rendelkező multimer enzimekben (mint például a PhAAP, pAAP és DPP-IV) a His-hurok aktív konformációját intra-domén H-híd hálózat biztosítja, itt a szelektivitást az oldalsó bejárat megközelíthetőségének korlátozásával érik el a megfelelő enzimek, azokat a multimer struktúrák belsejébe rejtve.

Az oligopeptidázok szerkezetében a His-hurok a monomer felszínén található α-hélixet és a hidroláz domén központi β-redőjének terminális β-szálát köti össze (55. ábra). Érdekes módon ez a 6-8 aminosavból álló szélső β-szál minden esetben szabályos, nyújtott konformációjú, nincsenek csavarodások, kitüremkedések vagy olyan töltött aminosavak, amelyek megzavarnák hidrogénkötési potenciálját; így ideális asszociációs felszín. A megfelelő szekvenciákat a WALTZ prediktor[165] nagy valószínűséggel amiloidképződésre alkalmasnak ismerte fel, a *Ph*AAP kapta a legmagasabb, 98,3 pontszámot, de a többi szekvencia is 80-90 amiloid potentciált hordoz[111]. Az amiloid típusú aggregációra való hajlam, azaz β-redős szálak szoros egymáshoz rendeződése által kiváltott szerkezet- és funkció-vesztése a fehérjék általános tulajdonsága, amelyek ezért szerkezeti és szekvenciális adaptációs mechanizmusokat fejlesztettek ki a felszínhez közeli β-szálaik védelmére. Az aggregációra hajlamos konformerekkel szembeni negatív szelekció a feltekeredés és molekulakomplexek kialakulásának egyik meghatározó komponense[166].

A monomer oligopeptidázok (mint például a POP és az OPB) esetében ezt a felszíni, fokozottan kölcsönhatásra-képes β-szálat egy 72, illetve 95 aminosav hosszú N-terminális nyúlvány fedi el. Bár ezek a szegmensek szekvenciálisan propellerek aminosavaihoz csatlakoznak, a hidroláz

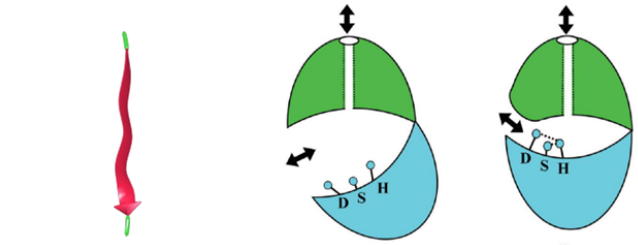
domének mellett futnak, és egy védőpántot alkotnak körülötte. Számos hidrogénkötés jön létre közöttük, amelyek ezt a védelmi szegments a ragadós β-szálhoz és a két oldalán álló kapuőr α-hélixhez rögzíti. Mivel a POP szerkezetét nyitott konformációban is meghatározták, megállapítható, hogy ezek a kölcsönhatások a felnyílás során nem változnak: a védőpántok együtt mozognak a védelmezett szegmenssel. A POP N-terminális szegmensének eltávolítása (felszámolva a ragadós-β-szál védelmét) aggregációt és inaktivációt eredményez az eltávolított szegmens méretétől függően[167].

Az *Ap*AAP, a *Ph*AAP, a DPP-IV és a pAAP esetében a ragadós β-él a monomer felszínén védtelen, ezek az oligopeptidázok tehát multimerizálódnak. Az *Ap*AAP dimerben például a monomerek úgy illeszkednek egymáshoz, hogy az egyik monomer ragadós β-szálát a másik monomer megfelelő szála antiparallel orientációban tökéletesen eltakarja, így a dimerben egy 16-tagú, egybefüggő β-redő jön létre. Ebben az elrendezésben a két aktív centrum ellentétes irányba néz, ami lehetővé teszi, hogy egymástól függetlenül működjenek - akár markánsan eltérő konformációt is felvehetnek, ahogyan azt az *Ap*AAP nyitott/zárt vegyes dimer szerkezetében láttuk. A rugalmasság megmarad, mert csak a hidroláz domének vesznek részt a dimerizációban, ami azért is lényeges, mert az *Ap*AAP monomer zárt formájának szerkezetében nincs olyan oldalsó nyílás, amely lehetővé tenné a szubsztrátok belépését a katalitikus zsebbe (92. ábra).



92. ábra. Multimerizáció és a „ragadós" β-él elrejtése az oligopeptidázok körében. a.) A hidroláz domén (kék) központi β-redője (rózsaszínnel kiemelve) – sematikus ábrázolásban. **b.)** A pAAP, POP, DPP-IV, ApAAP és a PhAAP aktív formája (az a.) panelen bemutatott színezéssel). A központi β-redő legkülső szála (élénk piros) minden esetben el van fedve: a pAAP, DPP-IV, *Ap*AAP és a *Ph*AAP esetében a multimerizáció által, a POP esetében a monomer hosszú, helikális N-terminális szakasza által.

A DPP-IV, *Ph*AAP és a pAAP exponált β-szálaihoz való szabad hozzáférést kis kitüremkedések – „távtartók" – akadályozzák, melyek az *Ap*AAP esetében megfigyelhető fej-fej dimerizációt ellehetetlenítik. A DPP-IV ezért úgy dimerizálódik hogy a dimerben az egyes monomerek központi β-redői közel merőleges irányban találkoznak, a *Ph*AAP esetében a propeller domén egy nyúlványa rendeződik a szomszédos monomer ragadós β-éle mellé és az így képzett dimerek trimerei alkotják funkcionális hexamer formát. A pAAP elsődleges kölcsönhatási felszínének szintén kritikus eleme a ragadós β-él, ami a propeller és a hidroláz domén egy-egy szegmensével alakít ki inter-monomer kontaktusokat. Mivel mindhárom esetben mind a hidroláz, mind a propeller domén részt vesz a multimerizációban, a domének mozgása szükségszerűen korlátozottá válik; így ezeknek az enzimeknek a hatékonyság fenntartásához monomereik felszínén állandó bejárati nyílássokkal kell rendelkezniük. A multimer struktúrák ezeket a bejáratokat elrejtik, valamint belső üregek, csatornák és dinamikusan fluktuáló szűkületek kialakításával járulnak hozzá a szubsztrát-szelekció finomhangolásához (93. ábra).



β-él fedettsége	aktív hely-hurkok inter-domén kölcsönhatásokban	oldalsó bejárat	
✓	✓	✗	**Flexibilis monomer**
✗	✓	✗	**Flexibilis dimer**
✗	✗	✓	**Önszerveződés (tetramer, hexamer)**

93. ábra. Multimerizációt befolyásoló szerkezeti elemek az oligopeptidázok körében.

A topológiailag nagyon hasonló felépítésű oligopeptidázok körében tehát a multimerizáció és önszerveződés módját az inzerciók, az N- és C-terminális nyúlványok mérete és elhelyezkedése és a doménközi kölcsönhatási mintázatok határozzák meg, míg a katalízis hatékonyság és szelektivitás szempontjából döntő fontosságú lehet a kritikus pontokon megjelenő egy-egy aminosav-csere. Ezek mind olyan különbségek, amelyek a közös feltekeredési sémán nem változtatnak, mégis rendkívül változatos szerkezetek és funkciók kialakítására teremtenek módot.

4. Összegzés (zárszó és köszönetnyilvánítás)

Visszatekintve a bemutatott munkákra nem tudok mást mondani, mint amivel elkezdtem – nagyon hálás vagyok ezért a tudományos életútért.

PhD fokozatom megszerzése óta eltelt negyed évszázad folyamán nagyon változatos rendszerek szerkezet-funkció összefüggéseit tanulmányozhattam. Az itt bemutatott munkákon túl részt vettem (a teljesség igénye nélkül) amiloid aggregációra képes peptid hormonok és transzmembrán receptoraik, vírus fehérjék és humán receptoruk, MASP-fehérjék vagy az örökké változó transztiretin vizsgálatában. Egy-egy ilyen témakör kapcsán nem csak a makromolekulákat, hanem a velük dolgozó dedikált kutatócsoportokat is megismerhettem. Köszönöm mindenkinek, aki megosztotta velem eredményeit, hogy együtt gondolkodhattunk, tanulhattunk egymástól és közösen élhettük át a felfedezés örömét - újra és újra rácsodálkozva a teremtett világ rendjére és a rend mögött rejlő, egymást segítő és egymással versengő folyamatok hihetetlen komplexitására.

5. A dolgozat alapjául szolgáló közlemények:

S1. ***Menyhárd* DK.*** *Electron transfer between the heme bound oxygen and the tetrahydrobiopterin cofactor of nitric oxide synthase: a DFT study.* Chem. Phys. Lett. **2004**, 392: 439.

S2. ***Menyhárd* DK.*** *Comparative computational analysis of active and inactive cofactors of nitric oxide synthase.* J Phys Chem B. **2009**, 113: 3151.

S3. ***Menyhárd DK***, Keserű* GM. *Protonation state of Asp30 exerts crucial influence over surface loop rearrangements responsible for NO release in nitrophorin 4* FEBS Lett **2005**, 579: 5392.

S4. ***Menyhárd* DK***. *Conformational selection mechanism governs oxygen ligation to H-NOX proteins.* Bioorg Med Chem Lett. **2011** 21: 3523.

S5. Rozza AM, ***Menyhárd* DK***, Oláh* J. *Gas Sensing by Bacterial H-NOX Proteins: An MD Study*. Molecules. **2020**, 25: 2882.

S6. Balogh E, Chandler JC, Varga* M, Tahoun M, ***Menyhárd DK***, Schay G, Goncalves T, Hamar R, Légrádi R, Szekeres Á, Gribouval O, Kleta R, Stanescu H, Bockenhauer D, Kerti A, Williams H, Kinsler V, Di WL, Curtis D, Kolatsi-Joannou M, Hammid H, Szőcs A, Perczel K, Maka E, Toldi G, Sava F, Arrondel C, Kardos M, Fintha A, Hossain A, D'Arco F, Kaliakatsos M, Koeglmeier J, Mifsud W, Moosajee M, Faro A, Jávorszky E, Rudas G, Saied MH, Marzouk S, Kelen K, Götze J, Reusz G, Tulassay T, Dragon F, Mollet G, Motameny S, Thiele H, Dorval G, Nürnberg P, Perczel A, Szabó AJ, Long DA, Tomita K, Antignac C, Waters* AM, Tory* K. *Pseudouridylation defect due to DKC1 and NOP10 mutations causes nephrotic syndrome with cataracts, hearing impairment, and enterocolitis.* Proc Natl Acad Sci USA. **2020**, 117: 15137.

S7. Kiss DJ, Oláh J, Tóth G, ***Menyhárd DK***, Ferenczy GG. *Quantum chemical calculations support pseudouridine synthase reaction through a glycal intermediate and provide details of the mechanism.* Theor. Chem. Acc. **2018**, 137: 162.

S8. Kiss DJ, Oláh J, Tóth G, Varga M, Stirling A, ***Menyhárd* DK***, Ferenczy* GG *The Structure-Derived Mechanism of Box H/ACA Pseudouridine Synthase Offers a Plausible Paradigm for Programmable RNA Editing.* ACS Catalysis **2022**, 12: 2756.

S9. ***Menyhárd DK***, Pálfy G, Orgován Z, Vida I, Keserű* GM, Perczel* A. *Structural impact of GTP binding on downstream KRAS signaling.* Chem Sci. **2020**, 11: 9272.

S10. Pálfy G, ***Menyhárd DK***, Perczel* A. *Dynamically encoded reactivity of Ras enzymes: opening new frontiers for drug discovery*. Cancer Metastasis Rev. **2020**, 39: 1075.

S11. Pálfy G, ***Menyhárd DK***, Ákontz-Kiss H, Vida I, Batta G, Tőke O, Perczel* A. *The Importance of Mg^{2+} -Free State in Nucleotide Exchange of Oncogenic K-Ras Mutants*. Chemistry. **2022**, 28: e202201449.

S12. Gadanecz M, Fazekas Z, Pálfy G, ***Menyhárd DK***, Perczel* A. *NMR-Chemical-Shift-Driven Protocol Reveals the Cofactor-Bound, Complete Structure of Dynamic Intermediates of the Catalytic Cycle of Oncogenic KRAS G12C Protein and the Significance of the Mg^{2+} Ion.* Int J Mol Sci. **2023**, 24: 12101.

S13. Tory* K, ***Menyhárd DK***, Woerner S, Nevo F, Gribouval O, Kerti A, Stráner P, Arrondel C, Huynh Cong E, Tulassay T, Mollet G, Perczel A, Antignac* C. *Mutation-dependent recessive inheritance of NPHS2-associated steroid-resistant nephrotic syndrome*. Nat Genet. **2014**, 46: 299.

S14. Stráner P, Balogh E, Schay G, Arrondel C, Mikó Á, L'Auné G, Benmerah A, Perczel A, ***Menyhárd DK***, Antignac C, Mollet G, Tory* K. *C-terminal oligomerization of podocin mediates interallelic interactions*. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis. **2018**, 1864: 2448.

S15. Mikó Á, ***Menyhárd DK***, Kaposi A, Antignac C, Tory* K. *The mutation-dependent pathogenicity of NPHS2 p.R229Q: A guide for clinical assessment.* Hum Mutat. **2018**, 39: 1854.

S16. Harmat V, Domokos K, ***Menyhárd DK***, Palló A, Szeltner Z, Szamosi I, Beke-Somfai T, Náray-Szabó G, Polgár* L. *Structure and catalysis of acylaminoacyl peptidase: closed and open subunits of a dimer oligopeptidase*. J Biol Chem. **2011**, 286: 1987.

S17. ***Menyhárd DK***, Orgován Z, Szeltner Z, Szamosi I, Harmat* V. *Catalytically distinct states captured in a crystal lattice: the substrate-bound and scavenger states of acylaminoacyl peptidase and their implications for functionality.* Acta Cryst. D Biol. Crystallogr. **2015**, 71(Pt 3): 461.

S18. ***Menyhárd DK***, Kiss-Szemán A, Tichy-Rács É, Hornung B, Rádi K, Szeltner Z, Domokos K, Szamosi I, Náray-Szabó G, Polgár L, Harmat* V. *A self-compartmentalizing hexamer serine protease from Pyrococcus horikoshii: substrate selection achieved through multimerization.* J Biol Chem. **2013**, 288: 17884.

S19. Kiss-Szemán AJ, Stráner P, Jákli I, Hosogi N, Harmat V, ***Menyhárd* DK***, Perczel* A. *Cryo-EM structure of acylpeptide hydrolase reveals substrate selection by multimerization and a multi-state serine-protease triad.* Chem Sci. **2022**, 13: 7132.

S20. Kiss-Szemán AJ, Takács L, Orgován Z, Stráner P, Jákli I, Schlosser G, Masiulis S, Harmat* V, ***Menyhárd* DK***, Perczel* A. *A carbapenem antibiotic inhibiting a mammalian serine protease: structure of the acylaminoacyl peptidase-meropenem complex*. Chem Sci. **2022** 13: 14264.

S21. Kiss-Szemán AJ, Takács L, Jákli I, Bánóczi Z, Hosogi N, Traore DAK, Harmat V, Perczel* A, ***Menyhárd* DK***. *Ligand binding Pro-miscuity of acylpeptide hydrolase, structural analysis of a detoxifying serine hydrolase.* Protein Sci. **2025**, 34: e70320.

Referenciák

1. Perutz MF, Rossmann MG, Cullis, AF, Muirhead H, Will G, North ACT. *Structure of haemoglobin: a three-dimensional Fourier synthesis at 5.5-A. resolution, obtained by X-ray analysis*. Nature. **1960**,185: 416.
2. Kendrew JC, Dickerson RE, Strandberg BE, Hart RG, Davies DR, Phillips DC, Shore VC. *Structure of myoglobin: A three-dimensional Fourier synthesis at 2 Å resolution*. Nature. **1960**, 185: 422.
3. *Ezerarcú fehérjék.* Semmelweis Kiadó **2018** (Szerk: L. Buday, L. Nyitray. A. Perczel) *14. fejezet: Fehérjemodellezés* – Z. Gáspári, G. Gyimesi, T. Hegedűs, DK. Menyhárd
4. van Gunsteren W, Berendsen H. *Computer Simulation of Molecular Dynamics: Methodology, Applications, and Perspectives in Chemistry*, Angew. Chem. Int. Ed. Engl. **1990,** 29: 992.
5. Karplus M, McCammon JA. *Molecular dynamics simulations of biomolecules*. Nat Struct Biol **2002**, 9(9): 646.
6. Chang, GG, Guida WC; Still WC. *An internal coordinate Monte-Carlo method for searching conformational space.* J. Am. Chem. Soc. **1989**, 111: 4379.
7. Warshel A, Levitt M. *Theoretical studies of enzymic reactions: dielectric, electrostatic and steric stabilization of the carbonium ion in the reaction of lysozyme*. J Mol Biol. **1976,** 103: 227.
8. Senn H, Thiel W. *QM/MM Methods fo Biomolecular Systems* Angew. Chem. Int. Ed. **2009**, 48, 1198.
9. Svensson M, Humbel S, Froese RDJ, Matsubara T, Sieber S, Morokuma K. *ONIOM: A Multilayered Integrated MO + MM Method for Geometry Optimizations and Single Point Energy Predictions. A Test for Diels–Alder Reactions and Pt(P(t-Bu)3)2 + H2 Oxidative Addition* J. Phys. Chem. **1996**, 100: 19357.
10. Vreven T, Byun KS, Komáromi I, Dapprich S, Montgomery JA, Morokuma K, Frisch MJ. *Combining Quantum Mechanics Methods with Molecular Mechanics Methods in ONIOM.* J. Chem. Theory Comput. **2006**, 2: 815.
11. Cowtan K. *Phase Problem in X-ray Crystallography, and Its Solution* **2001.** Encyclopedia of Life Sciences, Macmillan Publishers Ltd, Nature Publishing Group.
12. Nogales E, Scheres SH. *Cryo-EM: A Unique Tool for the Visualization of Macromolecular Complexity.* Mol Cell. **2015** 58: 677.
13. Bendory T, Bartesaghi A, Singer A. *Single-particle cryo-electron microscopy: Mathematical theory, computational challenges, and opportunities*. IEEE Signal Process Mag. **2020**, 37: 58.
14. Shen P, Iwasa J, Brasch J, Thoms J, Mayson P, Thuesen A. *cryoem101.org* **2024**
15. Pintilie G, Zhang K, Su Z, Li S, Schmid MF, Chiu W. *Measurement of atom resolvability in cryo-EM maps with Q-scores.* Nat Methods. **2020**, 17: 328.
16. Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. *Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor.* Nature **1987**, 327: 524.
17. Abu-Soud HM, Gachhui R, Raushel FM, Stuehr DJ. *The Ferrous-dioxy Complex of Neuronal Nitric Oxide Synthase: divergent effects of l-arginine and tetrahydrobiopterin on its stability.* J Biol. Chem. **1997**, 272: 17349.
18. Raman CS, Li H, Martásek P, Král V, Masters BSS, Poulos TL. *Crystal Structure of Constitutive Endothelial Nitric Oxide Synthase: A Paradigm for Pterin Function Involving a Novel Metal Center* Cell **1998**, 95: 939.
19. Davydov R, Ledbetter-Rogers A, Martásek P, Larukhin M, Sono M, Dawson JH, Masters BS, Hoffman BM. *EPR and ENDOR characterization of intermediates in the cryoreduced oxy-*

nitric oxide synthase heme domain with bound L-arginine or N(G)-hydroxyarginine. Biochemistry **2002,** 41: 10375.
20. Wei CC, Wang ZQ, Wang Q, Meade AL, Hemann C, Hille R, Stuehr DJ. *Rapid kinetic studies link tetrahydrobiopterin radical formation to heme-dioxy reduction and arginine hydroxylation in inducible nitric-oxide synthase*. J Biol Chem. **2001** 276: 315.
21. Gorren AC, Bec N, Schrammel A, Werner ER, Lange R, Mayer B. *Low-temperature optical absorption spectra suggest a redox role for tetrahydrobiopterin in both steps of nitric oxide synthase catalysis.* Biochemistry **2000,** 39: 11763.
22. Crane BR, Arvai AS, Ghosh DK, Wu C, Getzoff ED, Stuehr DJ, Tainer JA. *Structure of nitric oxide synthase oxygenase dimer with pterin and substrate.* Science **1998,** 279: 2121.
23. Sorlie M, Gorren AC, Marchal S, Shimizu T, Lange R, Andersson KK, Mayer B. *Single-turnover of nitric-oxide synthase in the presence of 4-amino-tetrahydrobiopterin: proposed role for tetrahydrobiopterin as a proton donor.* J Biol Chem. **2003** 278: 48602.
24. Morao I, Periyasamy G, Hillier IH, Joule JA. *The role of tetrahydrobiopterin in catalysis by nitric oxide synthase* Chem. Commun. **2006**, 33: 3525.
25. S. Stoll, YN Jahromy, JJ. Woodward, A Ozarowski, MA. Marletta, R. DBritt Nitric Oxide Synthase Stabilizes the Tetrahydrobiopterin Cofactor Radical by Controlling Its Protonation State J. Am. Chem. Soc. 2010, 132, 33: 11812.
26. Santolini J. *The molecular mechanism of mammalian NO-synthases: A story of electrons and protons* J. Inorg. Biochem. **2011**, 105: 127.
27. Feng C. *Mechanism of Nitric Oxide Synthase Regulation: Electron Transfer and Interdomain Interactions.* Coord Chem Rev. **2012**, 256: 393.
28. Andersen JF, Ding XD, Balfour C, Shokhireva TK, Champagne DE, Walker FA, Montfort WR. *Kinetics and equilibria in ligand binding by nitrophorins 1-4: evidence for stabilization of a nitric oxide-ferriheme complex through a ligand-induced conformational trap.* Biochemistry **2000**, 39: 10118.
29. Maes EM, Walker FA, Montfort WR, Czernuszewicz RS. *Resonance Raman spectroscopic study of Nitrophorin 1, a nitric oxide-binding heme protein from Rhodnius prolixus, and its nitrosyl and cyano adducts*. J. Am. Chem. Soc*.* **2001**, 123: 11664.
30. Nienhaus K, Maes EM, Weichsel A, Montfort WR, Nienhaus GU. *Structural dynamics controls nitric oxide affinity in nitrophorin 4.* J Biol Chem. **2004**, 279: 39401.
31. Weichsel A, Andersen JF, Roberts SA, Montfort WR*. Nitric oxide binding to nitrophorin 4 induces complete distal pocket burial.* Nat Struct Biol. **2000,** 7:551.
32. Roberts SA, Weichsel A, Qiu Y, Shelnutt JA, Walker FA, Montfort WR*. Ligand-induced heme ruffling and bent NO geometry in ultra-high-resolution structures of nitrophorin 4.* Biochemistry. **2001,** 40:11327.
33. ZAP: OpenEye Scientific Software, Inc. ; Santa Fe, NM 87507, USA
34. MacKerell AD, Bashford D, Bellott M, Dunbrack RL, Evanseck JD, Field MJ, Fischer S, Gao J, Guo H, Ha S, Joseph-McCarthy D, Kuchnir L, Kuczera K, Lau FT, Mattos C, Michnick S, Ngo T, Nguyen DT, Prodhom B, Reiher WE, Roux B, Schlenkrich M, Smith JC, Stote R, Straub J, Watanabe M, Wiórkiewicz-Kuczera J, Yin D, Karplus M. *All-atom empirical potential for molecular modeling and dynamics studies of proteins.* J Phys Chem B. **1998,** 102: 3586.
35. Xue Y, Xu Y, Liu Y, Ma Y, Zhou P. *Thermoanaerobacter tengcongensis sp. nov., a novel anaerobic, saccharolytic, thermophilic bacterium isolated from a hot spring in Tengcong, China.* Int J Syst Evol Microbiol. **2001** 51(Pt 4): 1335.
36. Nioche P, Berka V, Vipond J, Minton N, Tsai AL, Raman CS. *Femtomolar sensitivity of a NO sensor from Clostridium botulinum.* Science. **2004** 306: 1550.
37. Pellicena P, Karow DS, Boon EM, Marletta MA, Kuriyan J. *Crystal structure of an oxygen-binding heme domain related to soluble guanylate cyclases.* Proc Natl Acad Sci USA. **2004** 101: 1285.

38. Stone JR, Marletta MA. *Soluble guanylate cyclase from bovine lung: activation with nitric oxide and carbon monoxide and spectral characterization of the ferrous and ferric states*. Biochemistry. **1994**, 33: 5636.
39. Wu G, Liu W, Berka V, Tsai AL. H-NOX from *Clostridium botulinum, like H-NOX from Thermoanaerobacter tengcongensis, Binds Oxygen but with a Less Stable Oxyferrous Heme Intermediate*. Biochemistry. **2015**, 54: 7098.
40. MacKerell AD Jr, Banavali N, Foloppe N. *Development and current status of the CHARMM force field for nucleic acids.* Biopolymers. **2000-2001**, 56: 257.
41. Kang Y, Liu R, Wu JX, Chen L. *Structural insights into the mechanism of human soluble guanylate cyclase.* Nature. **2019**, 574: 206.
42. Lábas A, **Menyhárd DK**, Harvey JN, Oláh J. *First Principles Calculation of the Reaction Rates for Ligand Binding to Myoglobin: The Cases of NO and CO.* Chemistry. **2018**, 24: 5350.
43. Ge J, Yu Y. *RNA Pseudouridylation : New Insights into an Old Modification.* Trends Biochem. Sci. **2013**, 38: 210.
44. Carlile TM, Rojas-duran MF, Zinshteyn B, Shin H, Bartoli KM, Gilbert WV. *Pseudouridine Profiling Reveals Regulated mRNA Pseudouridylation in Yeast and Human Cells.* Nature **2014**, 515:143.
45. Meroueh M, Grohar P J, Qiu J, SantaLucia J Jr, Scaringe SA, Chow, CS. *Unique Structural and Stabilizing Roles for the Individual Pseudouridine Residues in the 1920 Region of Escherichia Coli 23S rRNA.* Nucleic Acids Res. **2000**, 28: 2075.
46. Charette M, Gray MW. *Pseudouridine in RNA : What , Where , How , and Why.* IUBMB Life **2000**, 49: 341.
47. Karikó K, Buckstein M, Ni H, Weissman D. *Suppression of RNA Recognition by Toll-like Receptors: The Impact of Nucleoside Modification and the Evolutionary Origin of RNA.* Immunity **2005**, 23: 165.
48. Karikó K, Muramatsu H, Welsh FA, Ludwig J, Kato H, Akira S, Weissman D. *Incorporation of Pseudouridine into mRNA Yields Superior Nonimmunogenic Vector with Increased Translational Capacity and Biological Stability.* Mol. Ther. **2008**, 16: 1833.
49. Anderson BR, Muramatsu H, Nallagatla SR, Bevilacqua PC, Sansing LH, Weissman D, Karikó K. *Incorporation of Pseudouridine into mRNA Enhances Translation by Diminishing PKR Activation.* Nucleic Acids Res. **2010**, 38: 5884.
50. Hur S, Stroud RM. *How U38, 39, and 40 of Many tRNAs Become the Targets for Pseudouridylation by TruA.* Mol. Cell **2007**, 26: 189.
51. Collins K, Mitchell JR. *Telomerase in the human organism*. Oncogene. **2002,** 21: 564.
52. Wong JM, Collins K. Telomerase *RNA level limits telomere maintenance in X-linked dyskeratosis congenita.* Genes Dev. **2006**, 20: 2848.
53. Bykhovskaya Y, Casas K, Mengesha E, Inbal A, Fischel-Ghodsian N. *Missense mutation in pseudouridine synthase 1 (PUS1) causes mitochondrial myopathy and sideroblastic anemia (MLASA).* Am J Hum Genet. **2004**, 74: 1303.
54. Shaheen R, Han L, Faqeih E, Ewida N, Alobeid E, Phizicky EM, Alkuraya FS. *A homozygous truncating mutation in PUS3 expands the role of tRNA modification in normal cognition.* Hum Genet. **2016**, 135: 707.
55. de Brouwer APM, Abou Jamra R, Körtel N, Soyris C, Polla DL, Safra M, Zisso A, Powell CA, Rebelo-Guiomar P, Dinges N, Morin V, Stock M, Hussain M, Shahzad M, Riazuddin S, Ahmed ZM, Pfundt R, Schwarz F, de Boer L, Reis A, Grozeva D, Raymond FL, Riazuddin S, Koolen DA, Minczuk M, Roignant JY, van Bokhoven H, Schwartz S. *Variants in PUS7 Cause Intellectual Disability with Speech Delay, Microcephaly, Short Stature, and Aggressive Behavior.* Am J Hum Genet. **2018**, 103: 1045.

56. Duan J, Li L, Lu J, Wang W, Ye K. *Structural mechanism of substrate RNA recruitment in H/ACA RNA-guided pseudouridine synthase.* Mol Cell. **2009**, 34: 427.
57. Liang B, Zhou J, Kahen E, Terns RM, Terns MP, Li H. *Structure of a functional ribonucleoprotein pseudouridine synthase bound to a substrate RNA.* Nat Struct Mol Biol. **2009**, 16: 740.
58. Zhou J, Liang B, Li H. *Functional and structural impact of target uridine substitutions on the H/ACA ribonucleoprotein particle pseudouridine synthase.* Biochemistry. **2010,** 49: 6276.
59. Koo BK, Park CJ, Fernandez CF, Chim N, Ding Y, Chanfreau G, Feigon J. *Structure of H/ACA RNP protein Nhp2p reveals cis/trans isomerization of a conserved proline at the RNA and Nop10 binding interface.* J Mol Biol. **2011,** 411: 927.
60. Li S, Duan J, Li D, Yang B, Dong M, Ye K. *Reconstitution and structural analysis of the yeast box H/ACA RNA-guided pseudouridine synthase.* Genes Dev. **2011**, 25: 2409.
61. Aliev AE, Kulke M, Khaneja HS, Chudasama V, Sheppard TD, Lanigan RM. *Motional timescale predictions by molecular dynamics simulations: case study using proline and hydroxyproline sidechain dynamics.* Proteins. **2014**, 82: 195.
62. Steinbrecher T, Latzer J, Case DA. *Revised AMBER parameters for bioorganic phosphates.* J Chem Theory Comput. **2012**, 8: 4405.
63. Schwartz S, Bernstein DA, Mumbach MR, Jovanovic M, Herbst RH, León-Ricardo BX, Engreitz JM, Guttman M, Satija R, Lander ES, Fink G, Regev A. *Transcriptome-wide mapping reveals widespread dynamic-regulated pseudouridylation of ncRNA and mRNA*. Cell. **2014** 159: 148.
64. Huang C, Wu G, Yu YT. *Inducing Nonsense Suppression by Targeted Pseudouridylation.* Nat. Protoc. **2012,** 7: 789.
65. Karijolich J, Yu YT. *Converting Nonsense Codons into Sense Codons by Targeted Pseudouridylation.* Nature **2011**, 474: 395.
66. Rupaimoole R, Slack FJ. *MicroRNA therapeutics: towards a new era for the management of cancer and other diseases.* Nat Rev Drug Discov. **2017,** 16: 203.
67. Song J, Dong L, Sun H, Luo N, Huang Q, Li K, Shen X, Jiang Z, Lv Z, Peng L, Zhang M, Wang K, Liu K, Hong J, Yi C. *CRISPR-free, programmable RNA pseudouridylation to suppress premature termination codons*. Mol Cell. **2023,** 83: 139.
68. Nir R, Hoernes TP, Muramatsu H, Faserl K, Karikó K, Erlacher MD, Sas-Chen A, Schwartz S. *A systematic dissection of determinants and consequences of snoRNA-guided pseudouridylation of human mRNA.* Nucleic Acids Res. **2022,** 50: 4900.
69. Monroe J, Eyler DE, Mitchell L, Deb I, Bojanowski A, Srinivas P, Dunham CM, Roy B, Frank AT, Koutmou KS. *N1-Methylpseudouridine and pseudouridine modifications modulate mRNA decoding during translation.* Nat Commun. **2024,** 15: 8119.
70. Veerareddygari GR, Singh SK, Mueller EG. *The Pseudouridine Synthases Proceed through a Glycal Intermediate.* J. Am. Chem. Soc. **2016**, 138: 7852.
71. Prior IA, Hood FE, Hartley JL. *The Frequency of Ras Mutations in Cancer.* Cancer Res. **2020**, 80 :2969.
72. Scheffzek K, Ahmadian MR, Kabsch W, Wiesmüller L, Lautwein A, Schmitz F, Wittinghofer A. *The Ras-RasGAP complex: structural basis for GTPase activation and its loss in oncogenic Ras mutants.* Science. **1997**, 277: 333.
73. Hallin J, Engstrom LD, Hargis L, Calinisan A, Aranda R, Briere DM, Sudhakar N, Bowcut V, Baer BR, Ballard JA, Burkard MR, Fell JB, Fischer JP, Vigers GP, Xue Y, Gatto S, Fernandez-Banet J, Pavlicek A, Velastagui K, Chao RC, Barton J, Pierobon M, Baldelli E, Patricoin EF 3rd, Cassidy DP, Marx MA, Rybkin II, Johnson ML, Ou SI, Lito P, Papadopoulos KP, Jänne PA, Olson P, Christensen JG. *The KRAS^{G12C} Inhibitor MRTX849 Provides Insight toward*

Therapeutic Susceptibility of KRAS-Mutant Cancers in Mouse Models and Patients. Cancer Discov. **2020**,10: 54.

74. Hong DS, Fakih MG, Strickler JH, Desai J, Durm GA, Shapiro GI, Falchook GS, Price TJ, Sacher A, Denlinger CS, Bang YJ, Dy GK, Krauss JC, Kuboki Y, Kuo JC, Coveler AL, Park K, Kim TW, Barlesi F, Munster PN, Ramalingam SS, Burns TF, Meric-Bernstam F, Henary H, Ngang J, Ngarmchamnanrith G, Kim J, Houk BE, Canon J, Lipford JR, Friberg G, Lito P, Govindan R, Li BT. *KRAS^{G12C} Inhibition with Sotorasib in Advanced Solid Tumors*. N Engl J Med. **2020**, 383: 1207.
75. Awad MM, Liu S, Rybkin II, Arbour KC, Dilly J, Zhu VW, Johnson ML, Heist RS, Patil T, Riely GJ, Jacobson JO, Yang X, Persky NS, Root DE, Lowder KE, Feng H, Zhang SS, Haigis KM, Hung YP, Sholl LM, Wolpin BM, Wiese J, Christiansen J, Lee J, Schrock AB, Lim LP, Garg K, Li M, Engstrom LD, Waters L, Lawson JD, Olson P, Lito P, Ou SI, Christensen JG, Jänne PA, Aguirre AJ. *Acquired Resistance to KRAS^{G12C} Inhibition in Cancer.* N Engl J Med. **2021**, 384: 2382.
76. Punekar SR, Velcheti V, Neel BG, Wong KK. *The current state of the art and future trends in RAS-targeted cancer therapies.* Nat Rev Clin Oncol. **2022**, 19: 637.
77. Long D, Marshall CB, Bouvignies G, Mazhab-Jafari MT, Smith MJ, Ikura M, Kay LE. *A comparative CEST NMR study of slow conformational dynamics of small GTPases complexed with GTP and GTP analogues.* Angew Chem Int Ed Engl. **2013**, 52: 10771.
78. Parker JA, Volmar AZ, Pavlopoulos S, Mattos C. *K-Ras Populates Conformational States Differently from Its Isoform H-Ras and Oncogenic Mutant K-RasG12D*. Structure. **2018,** 26: 810.
79. Buhrman G, Holzapfel G, Fetics S, Mattos C. *Allosteric modulation of Ras positions Q61 for a direct role in catalysis.* Proc Natl Acad Sci USA. **2010**, 107: 4931.
80. Scheidig AJ, Burmester C, Goody RS. *The pre-hydrolysis state of p21(ras) in complex with GTP: new insights into the role of water molecules in the GTP hydrolysis reaction of ras-like proteins.* Structure. **1999**, 7: 1311.
81. Xu S, Long BN, Boris GH, Chen A, Ni S, Kennedy MA. *Structural insight into the rearrangement of the switch I region in GTP-bound G12A K-Ras.* Acta Crystallogr D Struct Biol. **2017**, 73(Pt 12): 970.
82. Grigorenko BL, Nemukhin AV, Shadrina MS, Topol IA, Burt SK. *Mechanisms of guanosine triphosphate hydrolysis by Ras and Ras-GAP proteins as rationalized by ab initio QM/MM simulations.* Proteins. **2007**, 66: 456.
83. Shurki A, Warshel A. *Why does the Ras switch "break" by oncogenic mutations?* Proteins. **2004**, 55: 1.
84. Kamerlin SC, Sharma PK, Prasad RB, Warshel A. *Why nature really chose phosphate*. Q Rev Biophys. **2013**, 46: 1.
85. Hunter JC, Gurbani D, Ficarro SB, Carrasco MA, Lim SM, Choi HG, Xie T, Marto JA, Chen Z, Gray NS, Westover KD. *In situ selectivity profiling and crystal structure of SML-8-73-1, an active site inhibitor of oncogenic K-Ras G12C.* Proc Natl Acad Sci USA. **2014**, 111: 8895.
86. Kozakov D, Grove LE, Hall DR, Bohnuud T, Mottarella SE, Luo L, Xia B, Beglov D, Vajda S. *The FTMap family of web servers for determining and characterizing ligand-binding hot spots of proteins*. Nat Protoc. **2015,** 10: 733.
87. Wéber E, Ábrányi-Balogh P, Nagymihály B, **Menyhárd DK**, Péczka N, Gadanecz M, Schlosser G, Orgován Z, Bogár F, Bajusz D, Kecskeméti G, Szabó Z, Bartus É, Tököli A, Tóth GK, Szalai TV, Takács T, de Araujo E, Buday L, Perczel A, Martinek TA, Keserű GM. *Target-Templated Construction of Functional Proteomimetics Using Photo-Foldamer Libraries.* Angew Chem Int Ed Engl. **2025**, 64: e202410435
88. Greka A, Mundel P. *Cell biology and pathology of podocytes*. Annu Rev Physiol. **2012**, 74:299

89. Kawachi H, Fukusumi Y. *New insight into podocyte slit diaphragm, a therapeutic target of proteinuria.* Clin Exp Nephrol. **2020**, 24: 193.
90. Birtasu AN, Wieland K, Ermel UH, Arghittu SM, Manger S, Kocylowski MK, Fakler B, Scheffer MP, Covino R, Grahammer F, Frangakis AS. *The kidney slit diaphragm resembles a fishnet.* Kidney Int. **2025** Sep 24:S0085-2538(25)00759-8.
91. Boute N, Gribouval O, Roselli S, Benessy F, Lee H, Fuchshuber A, Dahan K, Gubler MC, Niaudet P, Antignac C. *NPHS2, encoding the glomerular protein podocin, is mutated in autosomal recessive steroid-resistant nephrotic syndrome*. Nat Genet. **2000,** 24: 349.
92. Huber TB, Simons M, Hartleben B, Sernetz L, Schmidts M, Gundlach E, Saleem MA, Walz G, Benzing T. *Molecular basis of the functional podocin-nephrin complex: mutations in the NPHS2 gene disrupt nephrin targeting to lipid raft microdomains.* Hum Mol Genet. **2003**, 12: 3397.
93. Yokoyama H, Fujii S, Matsui I. *Crystal structure of a core domain of stomatin from Pyrococcus horikoshii Illustrates a novel trimeric and coiled-coil fold*. J Mol Biol**. 2008**, 376: 868.
94. Relle M, Cash H, Brochhausen C, Strand D, Menke J, Galle PR, Schwarting A. *New perspectives on the renal slit diaphragm protein podocin*. Mod Pathol. **2011,** 24: 1101.
95. Enatsu N, Miyake H, Chiba K, Fujisawa M*. Candesartan Mediated Amelioration of Cisplatin-Induced Testicular Damage Is Associated with Alterations in Expression Patterns of Nephrin and Podocin.* Biomed Res Int. **2015**, 2015: 273784.
96. Mulukala SKN, Irukuvajjula SS, Kumar K, Garai K, Venkatesu P, Vadrevu R, Pasupulati AK. *Structural features and oligomeric nature of human podocin domain.* Biochem Biophys Rep. **2020**, 23: 100774.
97. Testa OD, Moutevelis E, Woolfson DN. *CC+: A relational database of coiled-coil structures.* Nucleic Acids Res. **2008,** 37(suppl_1), D315-D322.
98. Schay G, Straner P, Balogh E, Arrondel C , Miko A, L'Aune G, Benmerah A, Perczel A, **Menyhard DK**, Antignac C, Mollet G, Tory K. *Podocin Oligomerization Revealed by FRET Analysis: Sites of Interallelic Interactions* Biophys. Journal **2018**, 114: 3 Suppl. 1 pp 60A-60A
99. Yoshinaka T, Kosako H, Yoshizumi T, Furukawa R, Hirano Y, Kuge O, Tamada T, Koshiba T. *Structural Basis of Mitochondrial Scaffolds by Prohibitin Complexes: Insight into a Role of the Coiled-Coil Region*. iScience. **2019**, 19: 1065.
100. Ma C, Wang C, Luo D, Yan L, Yang W, Li N, Gao N. *Structural insights into the membrane microdomain organization by SPFH family proteins.* Cell Res. **2022**, 32: 176.
101. Qiao Z, Yokoyama T, Yan XF, Beh IT, Shi J, Basak S, Akiyama Y, Gao YG. *Cryo-EM structure of the entire FtsH-HflKC AAA protease complex.* Cell Rep. **2022**, 39: 110890.
102. Fu Z, MacKinnon R. *Structure of the flotillin complex in a native membrane environment.* Proc Natl Acad Sci USA. **2024**, 121: e2409334121.
103. Lange F, Ratz M, Dohrke JN, Le Vasseur M, Wenzel D, Ilgen P, Riedel D, Jakobs S. *In situ architecture of the human prohibitin complex.* Nat Cell Biol. **2025**, 27: 633.
104. Stoner J, Li S, Fu Z. *Structural basis for membrane microdomain formation by a human Stomatin complex.* Nat Commun. **2025**, 16: 7439.
105. Moser D, Lang K, Birtasu AN, Grahammer F, Helmstädter M, Scheffer MP, Hermle T, Frangakis AS. *The slit diaphragm in Drosophila exhibits a bilayered, fishnet architecture*. Nat Commun. **2025**,16: 8741.
106. Kuzmuk V, Pranke I, Rollason R, Butler M, Ding WY, Beesley M, Waters AM, Coward RJ, Sessions R, Tuffin J, Foster RR, Mollet G, Antignac C, Edelman A, Welsh GI, Saleem MA. *A small molecule chaperone rescues keratin-8 mediated trafficking of misfolded podocin to correct genetic Nephrotic Syndrome*. Kidney Int. **2024**, 105: 744.

107. Abramson J, Adler J, Dunger J, Evans R, Green T, Pritzel A, Ronneberger O, Willmore L, Ballard AJ, Bambrick J, Bodenstein SW, Evans DA, Hung CC, O'Neill M, Reiman D, Tunyasuvunakool K, Wu Z, Žemgulytė A, Arvaniti E, Beattie C, Bertolli O, Bridgland A, Cherepanov A, Congreve M, Cowen-Rivers AI, Cowie A, Figurnov M, Fuchs FB, Gladman H, Jain R, Khan YA, Low CMR, Perlin K, Potapenko A, Savy P, Singh S, Stecula A, Thillaisundaram A, Tong C, Yakneen S, Zhong ED, Zielinski M, Žídek A, Bapst V, Kohli P, Jaderberg M, Hassabis D, Jumper JM. *Accurate structure prediction of biomolecular interactions with AlphaFold 3*. Nature. **2024**, 630: 493.
108. Schay G, Antal V, Kétszeri M, Csokay K, Kellermayer M, **Menyhárd DK**, Tory K. *Podocin Regulates the Nephrin-Nephrin Distance in the Glomerular Pore* Biophys. J. **2020**, 118, 2576-pos. (konferencia megjelenés)
109. Antal-Kónya V, Pap D, Schay G, Kétszeri M, Ungvári-Veres A, Tulassay T, Kellermayer M, **Menyhárd DK**, Tory K. *High Salt Environment Disrupts the Regulatory Effect of Podocin on the Nephrin-Nephrin Distance* Nephrol. Dial. Transplant., **2022**, 37, Issue Supplement_3, gfac097.002 (konferencia megjelenés)
110. Antal-Kónya V, Schay G, Kétszeri M, Balogh E, Mikó Á, Seidl D, Keszthelyi MT, Bernáth M, Ungvári-Veres A, Dorval G, Saleem MA, Dixit A, Antignac C, Pászty K, Kellermayer M, **Menyhárd* DK**, Tory* K *Pathogenic podocin variants disrupt nephrin arrangement and alter glomerular pore structure* – a javított kézirat elbírálás alatt (Proc. Natl. Acad. Sci.)
111. Kiss-Szemán* AJ, Harmat V, ***Menyhárd DK.*** *Achieving Functionality Through Modular Build-up: Structure and Size Selection of Serine Oligopeptidases* Curr Protein Pept Sci. **2019**, 20: 1089.
112. Marianayagam NJ, Sunde M, Matthews JM. *The power of two: protein dimerization in biology.* Trends Biochem Sci. **2004**, 29: 618.

113. Chang A, Jeske L, Ulbrich S, Hofmann J, Koblitz J, Schomburg I, Neumann-Schaal M, Jahn D, Schomburg D. *BRENDA, the ELIXIR core data resource in 2021: new developments and updates.* Nucleic Acids Res. **2021**, 49(D1):D498-D508.
114. Hochberg GKA, Shepherd DA, Marklund EG, Santhanagoplan I, Degiacomi MT, Laganowsky A, Allison TM, Basha E, Marty MT, Galpin MR, Struwe WB, Baldwin AJ, Vierling E, Benesch JLP. *Structural principles that enable oligomeric small heat-shock protein paralogs to evolve distinct functions*. Science. **2018**, 359: 930.
115. Gwyther REA, Jones DD, Worthy HL. *Better together: building protein oligomers naturally and by design.* Biochem Soc Trans. **2019**, 47: 1773.
116. Lynch M. *Evolutionary diversification of the multimeric states of proteins*. Proc Natl Acad Sci USA. **2013**, 110: E2821.
117. Perica T, Kondo Y, Tiwari SP, McLaughlin SH, Kemplen KR, Zhang X, Steward A, Reuter N, Clarke J, Teichmann SA. *Evolution of oligomeric state through allosteric pathways that mimic ligand binding.* Science. **2014**, 346: 1254346.
118. Hashimoto K, Panchenko AR. *Mechanisms of protein oligomerization, the critical role of insertions and deletions in maintaining different oligomeric states.* Proc Natl Acad Sci USA. **2010**, 107: 20352.
119. Rasmussen HB, Branner S, Wiberg FC, Wagtmann N. *Crystal structure of human dipeptidyl peptidase IV/CD26 in complex with a substrate analog.* Nat Struct Biol. **2003**, 10: 19.
120. Li M, Chen C, Davies DR, Chiu TK. Induced-fit mechanism for prolyl endopeptidase. J Biol Chem. **2010**, 285: 21487.

121. Canning P, Rea D, Morty RE, Fülöp V. *Crystal structures of Trypanosoma brucei oligopeptidase B broaden the paradigm of catalytic regulation in prolyl oligopeptidase family enzymes.* PLoS One. **2013,** 8: e79349.
122. Krishna RG, Wold F. *Specificity determinants of acylaminoacyl-peptide hydrolase.* Protein Sci. **1992**, 1: 582.
123. Hwang CS, Shemorry A, Varshavsky A. *N-terminal acetylation of cellular proteins creates specific degradation signals.* Science. **2010**, 327: 973.
124. Perrier J, Durand A, Giardina T, Puigserver A. *Catabolism of intracellular N-terminal acetylated proteins: involvement of acylpeptide hydrolase and acylase.* Biochimie. **2005,** 87: 673.
125. Shimizu K, Kiuchi Y, Ando K, Hayakawa M,Kikugawa K. *Coordination of oxidized protein hydrolase and the proteasome in the clearance of cytotoxic denatured proteins*, Biochem. Biophys. Res. Commun., **2004**, 324: 140.
126. Palmieri G, Bergamo P, Luini A, Ruvo M, Gogliettino M, Langella E, Saviano M, Hegde RN, Sandomenico A, Rossi M. *Acylpeptide hydrolase inhibition as targeted strategy to induce proteasomal down-regulation.* PLoS One. **2011**,6: e25888.
127. Tangri A, Lighty K, Loganathan J, Mesmar F, Podicheti R, Zhang C, Iwanicki M, Drapkin R, Nakshatri H, Mitra S. *Deubiquitinase UCHL1 Maintains Protein Homeostasis through the PSMA7-APEH-Proteasome Axis in High-grade Serous Ovarian Carcinoma*. Mol Cancer Res. **2021**, 19: 1168.
128. Gogliettino M, Cocca E, Sandomenico A, Gratino L, Iaccarino E, Calvanese L, Rossi M, Palmieri G. *Selective inhibition of acylpeptide hydrolase in SAOS-2 osteosarcoma cells: is this enzyme a viable anticancer target?* Mol Biol Rep. **2021,** 48: 1505.
129. Palumbo R, Gogliettino M, Cocca E, Iannitti R, Sandomenico A, Ruvo M, Balestrieri M, Rossi M, Palmieri G. *APEH Inhibition Affects Osteosarcoma Cell Viability via Downregulation of the Proteasome.* Int J Mol Sci. **2016**, 17: 1614.
130. Bergamo P, Cocca E, Palumbo R, Gogliettino M, Rossi M, Palmieri G. *RedOx status, proteasome and APEH: insights into anticancer mechanisms of t10,c12-conjugated linoleic acid isomer on A375 melanoma cells.* PLoS One. **2013,** 8: e80900.
131. Naylor SL, Marshall A, Hensel C, Martinez PF, Holley B, Sakaguchi AY. *The DNF15S2 locus at 3p21 is transcribed in normal lung and small cell lung cancer*. Genomics. **1989**, 4: 355.
132. R. Erlandsson , F. Boldog , B. Persson , E. R. Zabarovsky , R. L. Allikmets , J. Sümegi , G. Klein and H. Jörnvall , *The gene from the short arm of chromosome 3, at D3F15S2, frequently deleted in renal cell carcinoma, encodes acylpeptide hydrolase*, Oncogene, **1991**, 6: 1293.
133. McGoldrick CA, Jiang YL, Paromov V, Brannon M, Krishnan K, Stone WL. *Identification of oxidized protein hydrolase as a potential prodrug target in prostate cancer.* BMC Cancer. **2014**, 10; 14:77.
134. Brzozowska A, Mlak R, Homa-Mlak I, Gołębiowski P, Mazurek M, Ciesielka M, Małecka-Massalska T. *Polymorphism of regulatory region of APEH gene (c.-521G>C, rs4855883) as a relevant predictive factor for radiotherapy induced oral mucositis and overall survival in head neck cancer patients.* Oncotarget. **2018**, 9: 29644.
135. Richards PG, Johnson MK, Ray DE. *Identification of acylpeptide hydrolase as a sensitive site for reaction with organophosphorus compounds and a potential target for cognitive enhancing drugs.* Mol Pharmacol. **2000**, 58: 577.
136. Zeng Z, Rulten SL, Breslin C, Zlatanou A, Coulthard V, Caldecott KW. *Acylpeptide hydrolase is a component of the cellular response to DNA damage.* DNA Repair (Amst). **2017**, 58: 52.

137. Tan L, Cho KJ, Kattan WE, Garrido CM, Zhou Y, Neupane P, Capon RJ, Hancock JF. *Acylpeptide hydrolase is a novel regulator of KRAS plasma membrane localization and function.* J Cell Sci. **2019**, 132: jcs232132.
138. Suzuki E, Nakai D, Yamamura N, Kobayashi N, Okazaki O, Izumi T. *Inhibition mechanism of carbapenem antibiotics on acylpeptide hydrolase, a key enzyme in the interaction with valproic acid.* Xenobiotica. **2011**, 41: 958.
139. Suzuki E, Yamamura N, Ogura Y, Nakai D, Kubota K, Kobayashi N, Miura S, Okazaki O. *Identification of valproic acid glucuronide hydrolase as a key enzyme for the interaction of valproic acid with carbapenem antibiotics.* Drug Metab Dispos. **2010**, 38: 1538.
140. Sundararaman SA, Miller JJ, Daley EC, O'Brien KA, Kasak P, Daniels AM, Edwards RL, Heidel KM, Bague DA, Wilson MA, Koelper AJ, Kourtoglou EC, White AD, August SA, Apple GA, Rouamba RW, Durand AJ, Esteb JJ, Muller FL, Johnson RJ, Hoops GC, Dowd CS, Odom John AR. *Prodrug activation in malaria parasites mediated by an imported erythrocyte esterase, acylpeptide hydrolase (APEH).* Proc Natl Acad Sci USA. **2025**, 122: e2417682122.
141. Bartlam M, Wang G, Yang H, Gao R, Zhao X, Xie G, Cao S, Feng Y, Rao Z. *Crystal structure of an acylpeptide hydrolase/esterase from Aeropyrum pernix K1.* Structure. **2004**, 12: 1481.
142. Wright H, Kiss AL, Szeltner Z, Polgár L, Fülöp V. *Crystallization and preliminary crystallographic analysis of porcine acylaminoacyl peptidase*. Acta Cryst. Sect F Struct Biol Cryst Commun. **2005**, 61(Pt 10): 942.
143. Feese M, Scaloni A, Jones WM, Manning JM, Remington SJ. *Crystallization and preliminary X-ray studies of human erythrocyte acylpeptide hydrolase*. J Mol Biol. **1993**, 233: 546.
144. Osumi T, Hashimoto T, Ui N. *Purification and properties of acyl-CoA oxidase from rat liver.* J Biochem. **1980**, 87: 1735.
145. Mitta M, Asada K, Uchimura Y, Kimizuka F, Kato I, Sakiyama F, Tsunasawa S. *The primary structure of porcine liver acylamino acid-releasing enzyme deduced from cDNA sequences.* J Biochem. **1989**, 106: 548.
146. Krissinel E, Henrick K. *Inference of macromolecular assemblies from crystalline state.* J. Mol. Biol. 2007, 372: 774.
147. Pravda L, Sehnal D, Toušek D, Navrátilová V, Bazgier V, Berka K, Svobodová Vareková R, Koca J, Otyepka M. *MOLEonline: a web-based tool for analyzing channels, tunnels and pores (2018 update)*. Nucleic Acids Res. **2018**, 46(W1): W368-W373.
148. Zhou H, Di Palma S, Preisinger C, Peng M, Polat AN, Heck AJ, Mohammed S. *Toward a comprehensive characterization of a human cancer cell phosphoproteome.* J Proteome Res. **2013**, 12: 260.
149. Brocca S, Ferrari C, Barbiroli A, Pesce A, Lotti M, Nardini M. *A bacterial acyl aminoacyl peptidase couples flexibility and stability as a result of cold adaptation.* FEBS J. **2016**, 283: 4310.
150. Nagai K, Shimizu T, Togo A, Takeya M, Yokomizo Y, Sakata Y, Matsuishi T, Kato H. *Decrease in serum levels of valproic acid during treatment with a new carbapenem, panipenem/betamipron*. J Antimicrob Chemother. **1997**, 39: 295.
151. Mori H, Takahashi K, Mizutani T. *Interaction between valproic acid and carbapenem antibiotics.* Drug Metab Rev. **2007**, 39: 647.
152. Thomas C, Priano J, Smith TL. *Meropenem as an antidote for intentional valproic acid overdose.* Am J Emerg Med. **2020**, 38(3): 690.e1-690.e2.
153. Suzuki E, Yamamura N, Ogura Y, Nakai D, Kubota K, Kobayashi N, Miura S, Okazaki O. *Identification of valproic acid glucuronide hydrolase as a key enzyme for the interaction of valproic acid with carbapenem antibiotics.* Drug Metab Dispos. **2010**, 38: 1538.

154. Barad BA, Echols N, Wang RY, Cheng Y, DiMaio F, Adams PD, Fraser JS. *EMRinger: side chain-directed model and map validation for 3D cryo-electron microscopy.* Nat Methods. **2015**, 12: 943.
155. Lohans CT, Freeman EI, Groesen EV, Tooke CL, Hinchliffe P, Spencer J, Brem J, Schofield CJ. *Mechanistic Insights into β-Lactamase-Catalysed Carbapenem Degradation Through Product Characterisation.* Sci Rep. **2019**, 9: 13608.
156. Kim S, Chen J, Cheng T, Gindulyte A, He J, He S, Li Q, Shoemaker BA, Thiessen PA, Yu B, Zaslavsky L, Zhang J, Bolton EE. *PubChem 2025 update.* Nucleic Acids Res. **2025**, 53(D1): D1516.
157. Daina A, Michielin O, Zoete V. *SwissTargetPrediction: updated data and new features for efficient prediction of protein targets of small molecules*. Nucleic Acids Res. **2019**, 47(W1): W357-W364.
158. Keiser MJ, Roth BL, Armbruster BN, Ernsberger P, Irwin JJ, Shoichet BK. *Relating protein pharmacology by ligand chemistry.* Nat Biotechnol. **2007,** 25: 197.
159. Wang X, Shen Y, Wang S, Li S, Zhang W, Liu X, Lai L, Pei J, Li H. *PharmMapper 2017 update: a web server for potential drug target identification with a comprehensive target pharmacophore database.* Nucleic Acids Res. **2017,** 45(W1): W356-W360.
160. Tsoupras AB, Chini M, Tsogas N, Lioni A, Tsekes G, Demopoulos CA, Lazanas MC. *In vitro anti-inflammatory and anti-coagulant effects of antibiotics towards Platelet Activating Factor and thrombin.* J Inflamm (Lond). **2011**, 8:17.
161. Yamaguchi M, Kambayashi D, Toda J, Sano T, Toyoshima S, Hojo H. *Acetylleucine chloromethyl ketone, an inhibitor of acylpeptide hydrolase, induces apoptosis of U937 cells.* Biochem Biophys Res Commun. **1999**, 263: 139.
162. Powers JC, Asgian JL, Ekici OD, James KE*. Irreversible inhibitors of serine, cysteine, and threonine proteases.* Chem Rev. **2002**, 102:4639.
163. Casida JE, Quistad GB. *Serine hydrolase targets of organophosphorus toxicants.* Chem Biol Interact. **2005,**157-158: 277.
164. Quistad GB, Klintenberg R, Casida JE. *Blood acylpeptide hydrolase activity is a sensitive marker for exposure to some organophosphate toxicants.* Toxicol Sci. **2005**, 86: 291.
165. Maurer-Stroh S, Debulpaep M, Kuemmerer N, Lopez de la Paz M, Martins IC, Reumers J, Morris KL, Copland A, Serpell L, Serrano L, Schymkowitz JW, Rousseau F. *Exploring the sequence determinants of amyloid structure using position-specific scoring matrices*. Nat Methods. **2010**, 7(3): 237.
166. Richardson JS, Richardson DC. *Natural beta-sheet proteins use negative design to avoid edge-to-edge aggregation.* Proc Natl Acad Sci USA**. 2002**, 99: 2754.
167. Juhász T, Szeltner Z, Polgár L. Truncated prolyl oligopeptidase from Pyrococcus furiosus. Proteins. **2007**, 69(3): 633.