

Fidy Judit

## A fehérje konformációs dinamika szerepe fehérje-nukleinsav felismerési jelenségekben

Idestova 30 évvel ezelőtt Karplus és McCammon globuláris fehérjék ligandkötését tanulmányozva röntgenkristallográfiai eredmények (Debye-Waller-faktorok analízise), és molekuladinamikai szimulációs módszerek eredményei alapján felhívták a figyelmet arra, hogy a makromolekulák funkcionális kölcsönhatásaiban a fehérje atomjainak termikus mozgásformái, összefoglaló néven a konformációs dinamika, meghatározó szerepet tölt be (1). Ez a felismerés ma már nemcsak biofizikusok egy szűk csoportjának meggyőződése, hanem kezd ismertté és elfogadottá válni az élettudományi kutatások tágabb területén is. Az 1980-as évek közepén kerültem kapcsolatba a fehérje konformációs dinamikai vizsgálatokkal, amikor még kevesen tulajdonítottak jelentőséget ennek a kérdésnek. Ekkor még igen kevés ismeret állt rendelkezésre a konformációs dinamika speciális vonásairól és biokémiai reakciókban betöltött szerepéről. A fizikai gondolkodás szempontjából még az is kérdés volt, hogy egyáltalán milyen anyagsaládba lehet besorolni a fehérjéket. Amerikai, német és észt együttműködések során kifejlesztett nagyfelbontású (lézeres és alacsony hőmérsékletű) spektroszkópos kísérletekkel kapott eredményeink aláhúzták a konformációs dinamika jelentőségét a fehérje működésben (2,3). A megfigyelések igazolták a téma fontosságát, folyamatos aktualitását, és rámutattak a spektroszkópiai megközelítések relevanciájára. Az utóbbi években megteremtettük a feltételeket különböző fehérje rendszerek nagy felbontású és igényes konformációs dinamikai vizsgálatához. Mára a spektroszkópiai kísérletek mellett a számítógépes molekuladinamikai szimuláció feltételei is adottak.

Jelenleg a fehérjedinamika szerepét két fontos biokémiai problémával kapcsolatban vizsgáljuk. Az egyik témakör Vértessy Beáta (MTA SzBK Enzimológiai Intézet) kutatómunkájához kapcsolódik, aki már hosszabb ideje tanulmányozza a dUTPáz enzim szubsztrátkötését (4). Az enzim homotrimer szerkezetű fehérje (5), és az alegységek szerveződése a három aktív hely kialakítása céljából önmagában is igen érdekes szerkezeti és fehérjedinamikai kérdéseket vet fel, az enzim-aktivitás gátlása pedig tumor-terápiai lehetőséget jelent. Az elmúlt évben több species esetén



*dUTPáz enzim homotrimer*

vizsgáltuk Trp-mutánsok segítségével a szerveződésben alapvető szerepet betöltő C-terminális kar dinamikai viselkedését a Trp foszforeszcencia kioltás hőmérséklet-függésén keresztül, és érdekes különbségeket állapítottunk meg. Ezeket a felmérés-jellegű előméréseket kívánjuk a közeljövőben megismételni most már a laboratóriumunkban elkészített Trp mutánsokon, és részletes elemzés után a konformációs dinamika szubsztrátkötésben betöltött szerepéről kapunk majd információt.

A másik témakör számunkra teljesen új területet jelent. A DNS replikációban szerepet játszó helikázok és transzlokázok ATP-függő DNS felismerési mechanizmusainak tanulmányozásába kapcsolódunk be Kovács Mihály-al (ELTE Biokémiai Tanszék) és Haracska Lajossal (MTA SzBK) együttműködve. A konformációs dinamika szerepét szeretnénk mind kísérleti, mind számítógépes módszerekkel vizsgálni a különböző DNS struktúrák felismerésében. Ehhez együtt-működő partnereink fluoreszcensen jelzett DNS konstrukciókat állítanak elő, és rendelkezésre bocsátják az enzimek egyetlen triptofán tartalmazó mutánsait. Ez lehetőséget ad a DNS kötés detektálására rezonancia energiáttranszfer segítségével, és a triptofán foszforeszcencia mérésre alapozott dinamikai vizsgálatokra is. Laboratóriumunkban rendelkezésre álló nyomás-regulált mintacellát felhasználva flash-fotolízis segítségével tranzienst ATP kötési kinetikai méréseket tervezünk a nyomás függvényében. Ez a módszer lehetőséget ad arra, hogy az ATP kötés által indukált kötődési reakcióval járó konformációváltozásról becslést adjunk az aktivációs térfogat meghatározásán keresztül.



*E. coli* RecQ helikáz. ATP-analóg mutatja a szubsztrát-kötés helyét

Kovács Mihály csoportja tervezi az *E. coli* RecQ helikáz (6) DNS-kötő doménjének komplex formában történő kristályosítását és röntgenkristallográfiai szerkezetmeghatározást. Amennyiben erre sor kerül, lehetőség nyílik a szerkezet molekuladinamikai szimulációval történő vizsgálatára is.

1. Karplus, M., McCammon, J.A.: The internal dynamics of globular proteins, CRC Crit. Rev. Biochem. (1981) 9 293-349
2. Zollfrank, J., Friedrich, J., Vanderkooi, J.M., Fidy, J.: Proteins and Glasses: a Comparative Study of Spectral Diffusion Phenomena, J. Chem. Phys. (1991) 95 3134-3136
3. Friedrich, J., Gafert, J., Zollfrank, J., Vanderkooi, J.M., Fidy, J.: Spectral Hole Burning and Selection of Conformational Substates in Chromoproteins, PNAS (1994) 91 1029-1033
4. Vértessy, B.G., Larsson, G., Persson, T., Bergman, A.C., Persson, R., Nyman, P.O.: The Complete Triphosphate Moiety of Non-hydrolyzable Substrate Analogues is Required for a Conformational Shift of the Flexible C-terminus in *E. coli* dUTPpyrophosphatase, FEBS Lett. (1998) 421 83-88
5. Varga, B., Barabás, O., Kovári, J., Tóth, J., Hunyadi-Gulyás, É., Klement, É., Medzihradsky, K.F., Tölgyesi, F., Fidy, J., Vértessy, B.G.: Active Site Closure Facilitates Juxtaposition of Reactant Atoms for Initiation of Catalysis by Human dUTPase, FEBS Lett. (2007) 581 4783-4788
6. Bernstein, D.A., Zittel, M.C., Keck, J.L.: High-resolution Structure of the *E. coli* RecQ Helicase Catalytic Core, EMBO J. (2003) 22 4910-4921