

## MTA-ELTE FEHÉRJEMODELLEZŐ KUTATÓCSOPORT

<http://www.chem.elte.hu/departments/protmod/>

**PERCZEL ANDRÁS**, az MTA doktora  
1117 Budapest, Pázmány Péter sétány 1/A.

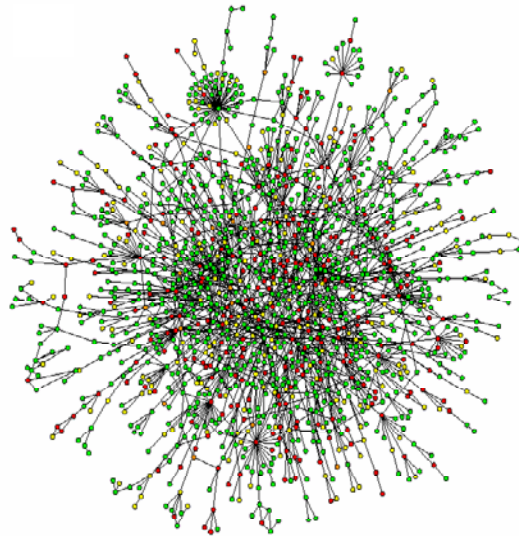
Tel: (1) 2090555

Fax: (1) 3722592

E-mail: [perczel@chem.elte.hu](mailto:perczel@chem.elte.hu)

### Rendezetlen fehérje kötődésvizsgálata: kalpain/kalpasztatin rendszer

A biokémia egyik legfontosabb alapvetése a fehérje szerkezet-hatás összefüggés feltételezi, hogy a funkció a fehérjeszerkezeti motívumok segítségével valósul meg. Ezt a tételt erősítette az a tény is, hogy sokáig elválasztási nehézségek miatt csak globuláris fehérjéket izoláltak, csupán az 1980-as évektől azonban sikerült térszerkezettel nem rendelkező fehérjéket előállítani. A humán genom feltérképezése világított rá igazából a rendezetlen fehérjék (intrinsically unstructured protein, IUP) biológiai jelentőségére. Szerkezetjósító módszerekkel kimutatták, hogy az ismert rendezetlen vagy részben rendezetlen fehérjeszakaszok előfordulása a fejlettebb élőlényekben meghaladja a 30 %-ot [1,2]. Szerkezeti adottságaikból kifolyólag az IUP-k a fehérje-kölcsönhatási hálózatok ún. HUB fehérjei között nagy gyakorisággal fordulnak elő (1. ábra).



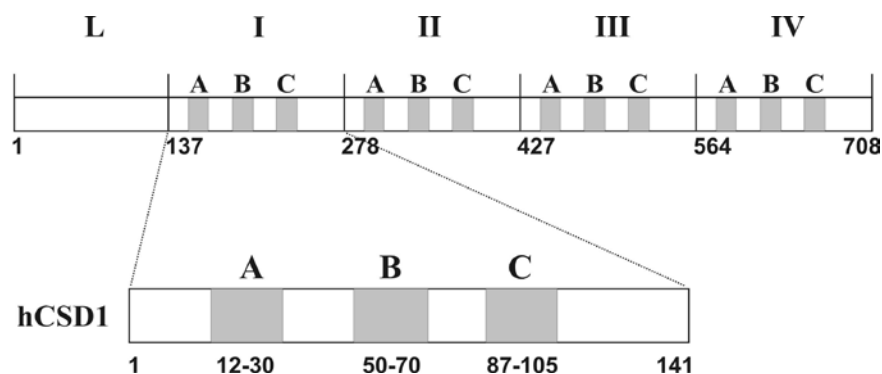
**1. ábra** Az élesztő gomba fehérje kölcsönhatási hálózata. Az élesztőgomba fehérjeinterakom hálózatában a teljes fehérjeállomány majd 30%-a rendezetlen. A rendezetlen fehérjesszakaszok gyakoribbak, az ún. HUB fehérjék között. Ezeknek a fehérjéknek jellemzője, hogy több partnerrel képesek kölcsönhatásba lépni.

A kalpain egy kalcium aktivált intracelluláris ciszteinproteáz, két alegységből álló heterodimer fehérje. A papain-szerű katalitikus domén a 80 kDa-os nagy alegység része, míg a 28 kDa-os kis alegység szabályozó funkciót lát el. A molekula több mint száz fehérje aktivitását szabályozza azáltal, hogy elhasítja őket (limitált proteolízis). Ezzel fontos szerepet játszik a sejtosztódási és differenciálódási folyamatokban valamint a sejt mozgásában. A

kalpain szabályozásának hibás működése számos betegséget eredményezhet (muscle dystrophy, diabetes).

A kalpain egyetlen ismert specifikus fehérje-inhibitora a kalpasztatin [3]. Ez egy nem szövet-specifikus, rendezetlen fehérje. Az emberi kalpasztatin 708 aminosavból épül fel, 5 doménje van, melyből 4 (I,II,III,IV) homológ, ezek egy-egy kalpain molekula gátlására képesek. Az első domén (L) funkciója egyelőre ismeretlen (2. ábra).

A gátló doménekben belül három szekvenciálisan konzervált rövidebb szakasz ismerhető fel (A, B, C szubdomén). Részletes biokémiai vizsgálatok bizonyították, hogy elsősorban ezek a szakaszok felelősek a kalpasztatin kalpainhoz való kötődéséért, és az enzim gátlásáért. A három szubdomén közül az A és C kalciumfüggő módon kapcsolódik a kalpainhoz és feltehetően a kalpasztatinmolekula lehorgonyzásáért felelős. A gátlást a B szubdomén fejt ki: az enzim aktív centrumához kötődve gátolja a szubsztrátok hozzáférését (2. ábra).

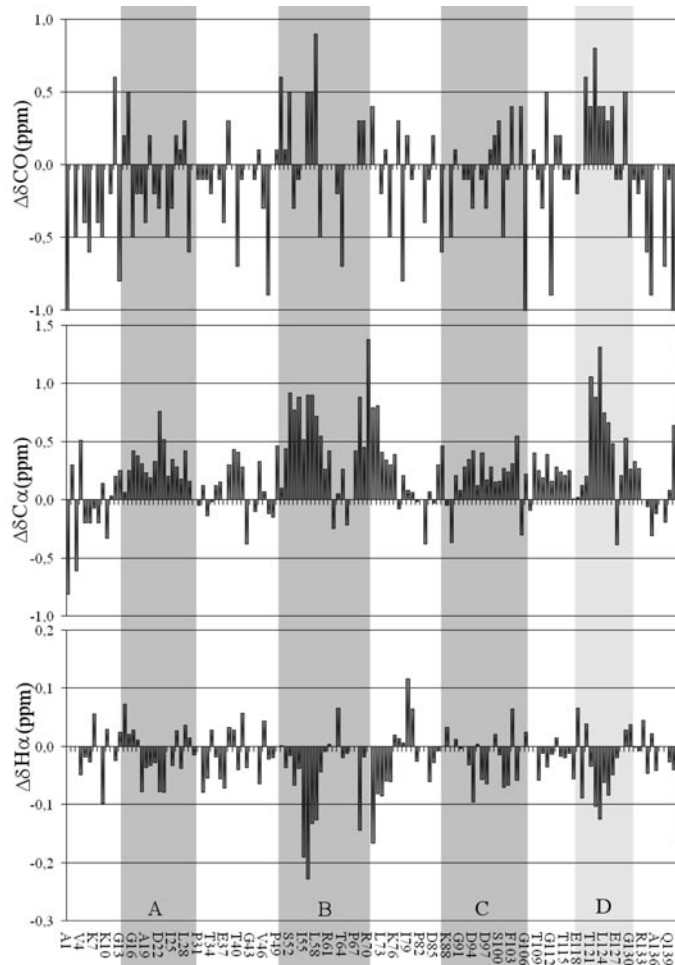


**2. ábra.** A humán kalpasztatin domén szerkezete. Az L domén funkciója nem ismert. Az I. II. III. IV. domének egyenként képesek gátolni egy-egy kalpain molekula működését. Mind a négy inhibitor domén három szekvenciálisan konzervált régiót tartalmaz. Az A és C a molekula kalpainhoz való kötődéséért felelős, a B az inhibíciós hatást fejt ki.

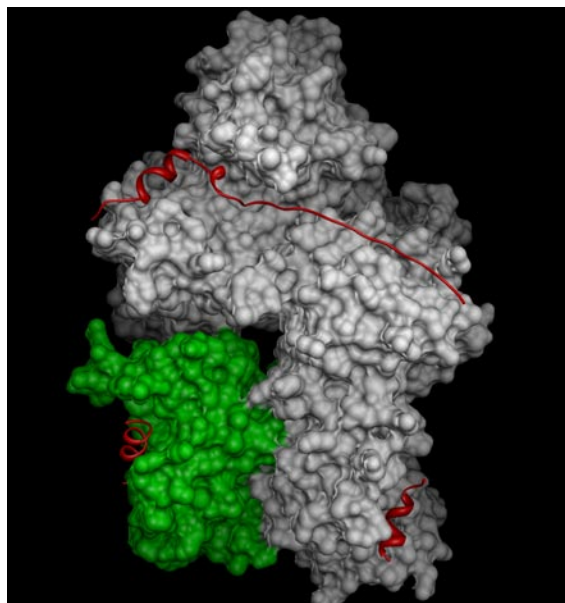
Az MTA Enzimológiai Intézetben Tompa Péter kutatócsoportjával együttműködésben végzett vizsgálataink célja, hogy a kalpasztatin molekula szerkezeti tulajdonságait NMR spektroszkópiával jellemezzük oldatfázisban, szabad állapotban, valamint, hogy a kalpainhoz való kötődésének folyamatát feltérképezzük. Ehhez az első domént tartalmazó hCSD1 molekulát használtuk.

Ismert hogy a molekula szabad formában szerkezeti szempontból rendezetlen, a kötődési állandó értéke és a kölcsönhatás specifikussága azonban feltételezi előre megformált szerkezeti elemek meglétét is. Ezért elvégeztük a hCSD1 molekula NMR analízisét (másodlagos kémiai eltolódás, dinamikai tulajdonságok, pH- és hőmérsékletfüggés). A vizsgálat eredményeként megállapítottuk, hogy a molekula tartalmaz előre kialakult másodlagos szerkezeti elemeket (3. ábra), ezek a funkcionális doménekhez köthetőek, és szerepet játszanak a kalpainhoz való kötődés kinetikájában [4].

A kötődésvizsgálatok során megállapítottuk, hogy a kalpasztatin három különböző ponton kötődik a kalpain molekulához [5]. Ezek a pontok jól átfednek a konzervált szekvencia szakaszokkal, hasonlóan a komplex kristályszerkezetében tapasztaltakhoz (4. és 5. ábra).

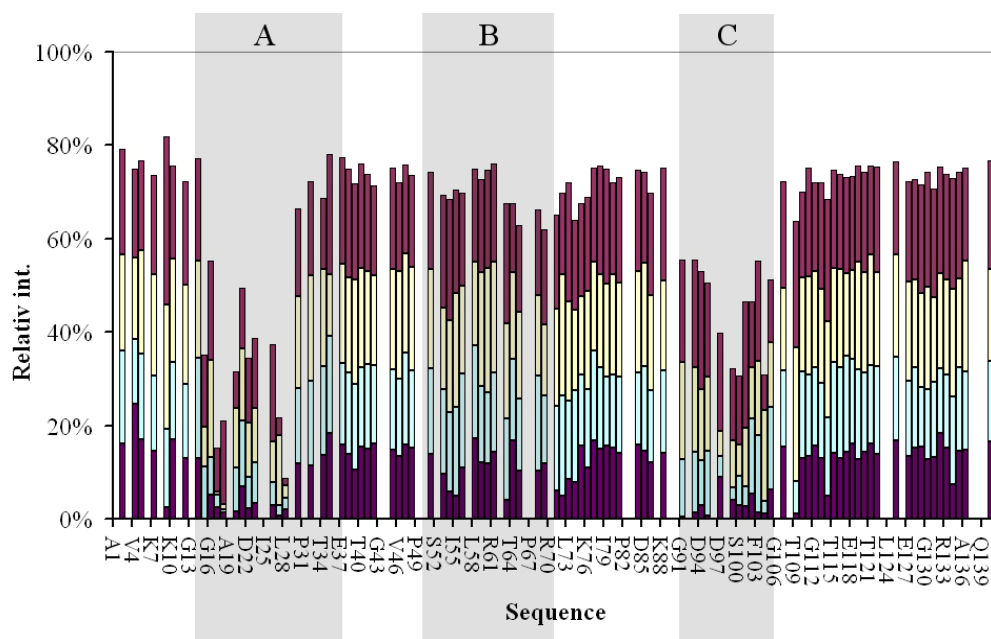


**3.ábra** A másodlagos kémiai eltolódások a hCSD1 aminosavszekvenciájának függvényében. Az árnyékolt szakaszok a funkcionális doméneknek felelnek meg. A nullától tendenciózan eltérő értékek másodlagos szerkezeti preferenciákra, tehát a szerkezet helyi rendeződésére utalnak [4]



**4.ábra** Kalpainhoz kötött kapasztatin kristályszerkezete [6]. A kalpain 80kDa-os alegysége fehér, 25kDa-os alegysége zöld színnel jelölve. Piros szalag jelöli a kötött kapasztatin azonosított részleteit.

A kristályszerkezet részletekkel szolgál a kötődő régiók kölcsönhatásairól, azonban a kötődés során bekövetkező dinamikai változásokról, és a konzervált szekvenciaszakaszok közötti hajlékony összekötő régióknak a kötődésben betöltött szerepéről, és változásairól nem ad információt. Az NMR adatokkal viszont jellemezni tudtuk a krisztallográfia számára láthatatlan szekvencia szakaszok változásait is a kötődés során. A teljes kötődést kiváltó kalciumszintnél alacsonyabb koncentrációt alkalmazva megfigyelhettük azt az átmeneti komplexet, amiben a kalpainhoz csak részlegesen, az A és C régió segítségével kötődik a kalpasztatin (5. ábra).



**5. ábra.** A hCSD1 relatív NMR-jelintenzitás vesztesége kalpain adagolása közben a hCSD1 aminosavszekvenciájának azon régióiról szolgáltat információt, amelyek kölcsönhatásba lépnek a kalpainnal a kötődés során. (A hCSD1:kalpain koncentrációarány a bordó-sárga-világoskék-lila sorrendben nő.) Az NMR adatok azokról a szakaszokról is információt nyújtanak, amelyek a krisztallográfia számára láthatatlanok [5].

Tompa Péter kutatócsoportjával közösen végzett vizsgálataink eredményeképpen sikerült feltérképezni egy rendezetlen fehérje dinamikai tulajdonságait, és jellemezni a kötődésének sajátosságait. Ezek az információk a fehérje alapú racionális gyógyszertervezés során hasznosíthatóak.

## Irodalom

- [1] Tompa, P: Trends Biochem Sci, 27: 527-533 (2002)
- [2] Dyson, HJ, Wright PE: Curr Opin Struct Biol, 12: 54-60 (2002)
- [3] Wendt A, Thompson, VF, Goll, DE.: Biol, Chem, 385: 465-472 (2004)
- [4] Kiss R, Kovacs D, Tompa P, Perczel A: Biochemistry, 47: 6936-6945 (2008)
- [5] Kiss R, Bozoky Z, Rona G, Friedrich P, Dvortsak P, Weisemann R, Tompa P, Perczel A: FEBS Lett, 582: 2149-2154 (2008)
- [6] Hanna RA, Campbell RL, Davies PL Nature 456: 409-412 (2008)