

A GENOMIKÁTÓL A PROTEOMIKÁIG ÉS A MOLEKULÁRIS DINAMIKÁIG

Balog Erika

tudományos főmunkatárs, Semmelweis Egyetem Biofizikai és Sugárbiológiai Intézet
és MTA Biofizikai Kutatócsoport, Budapest

Fidy Judit

egyetemi tanár, Semmelweis Egyetem Biofizikai és Sugárbiológiai Intézet
és MTA Biofizikai Kutatócsoport, Budapest – judit@puskin.sote.hu

Az utóbbi évek egyik legnagyobb tudományos szenzációja kétségtelenül az ember genetikai kódjának megfejtése volt. Az első, a *genom* csaknem 100 %-ára vonatkozó leírást 2001-ben publikálták (Lander et al., 2001; Venter et al., 2001), és további két év kellett a mintegy tizenhárom évig tartó projekt befejezéséhez. Ez az emberi fehérjeállomány genetikai kódját jelentő kb. háromezilliárd DNS-bázispár sorrendjének ismeretét, és az általuk meghatározott fehérje-kódszakaszok (gének) azonosítását jelentette. Az eredményeket hatalmas lelkesedés fogadta, és a felfedezés jelentőségét ma sem tartjuk kisebbnek. A jelen kutatási időszakot szokás *postgenomic era*-ként, azaz a genom ismerete utáni időszaknak nevezni. Ez nem időbeliséget jelent elsősorban, hanem arra utal, hogy a génállomány ismerete után még sok a tennivaló, amíg valóban eljutunk az egyénekre specializált, molekuláris szintű terápiai beavatkozások sikeréhez.

A genetikai ismeretek gyakorlati, terápiai alkalmazásához tisztázni szükséges, hogy egy patológiás esetben milyen ponton térnek el az anyagcsere-folyamatok háttérben álló biokémiai reakciók a normálistól. Felelősként gyakran téves funkciójú, azaz téves szerkezetű fehérjéket találnak. De hol kell beavatkozni a probléma megoldásához? Ha

megbecsüljük, hogy egy élőlény teljes életideje alatt hányféle fehérje vesz részt az életfolyamatokban (ez a teljes fehérjeállomány, a „proteom”), akkor igen nagy számot kapunk (ez emberre kb. 400 ezer) a fehérjekódoló gének számához (emberre kb. 22 ezer) képest. Azaz a genom ismerete nem adja meg a proteom ismeretét, ahogy korábban gondolták. A jelenség ennél sokkal bonyolultabb; vagyis a fehérjék szintézise és anyagcsere-folyamatai során még eddig fel nem tárt, igen sokféle módosulás történik, aminek útja más lehet a szervezet különböző szöveteinél, az életkortól és külső – fizikai és kémiai – tényezőktől is függően.

Ezek az ismeretek a kutatók figyelmét a patológiai problémáért felelős molekulák – fehérjék – felismerésére és a *molekuláris szintű kölcsönhatások megismerésére* irányították. Ennek megfelelően kialakult egy intenzíven művelt új tudományág, a *proteomika*, amely egyfajta sejt/szövet/szervezet teljes fehérjeállományának felderítését célozza meg a következő lépéseken át:

1. A fehérjék szeparálása.
2. Az izolált fehérjék azonosítása főbb jellemzőik szerint.
3. Az egyes frakciók mennyiségi jellemzése.
4. Az aminosavsorrend (szekvencia) meghatározása.

5. Szerkezeti proteomika: az egyes fehérjék atomi részletességű térbeli szerkezetének meghatározása röntgenkristallográfiával és/vagy mag mágneses rezonancia (NMR) spektroszkópiával.
6. Kölcsönhatási proteomika.
7. A fehérjeszerkezet módosulási útjának leírása.

Kutatócsoportunk hosszú ideje folytat vizsgálatokat abban a kérdéskörben, hogy az életfolyamatokat meghatározó kölcsönhatásokban és a fehérjék enzimatikus aktivitásában milyen szerepet játszik a fehérjeszerkezet vázát képező sok aminosavból álló polipeptid lánc speciálisan feltekeredett térszerkezete, különös tekintettel a hőmérsékletből adódóan kialakuló belső mozgások, az ún. *konformációs dinamika* szerepére (proteomika: 4., 5., 6. lépések). Az, hogy a térszerkezet alapvetően fontos a fehérjék funkciói szempontjából, régóta ismert volt. A feltekeredést természetesen a genetikai kódból származó aminosavsorrend határozza meg. Az így egymás közelébe kerülő atomcsoportok között azonban több nagyságrendet átfogó kötése erősségű, többféle kötés lehetséges, és így ma még a szekvencia alapján nem mondható meg biztonsággal, hogy adott külső feltételek mellett (például ionos környezet, koncentráció stb.) a feltekeredés milyen „úton” megy majd végbe, és milyen térszerkezethez vezet. A térszerkezet fontossága mellett azonban már a 70-es évek végétől egyes kutatók felhívták a figyelmet arra, hogy a mérésekből a minta egyes molekulaszerkezeteinek *átlagát* kapjuk meg, és az atomok az átlagnak megfelelő helyzet környezetében a fehérjefunkció szempontjából igen fontos mozgásokat végeznek. Az első példa az izomzatban az oxigénszállítást végző mioglobinnal röntgenkristallográfiával nyert szerkezete volt (Kendrew et al., 1958), amellyel kapcsolatban felhívták a figyelmet arra, hogy ha a molekula minden időpillanatban a mérési adatokból származtatott szerkezetben

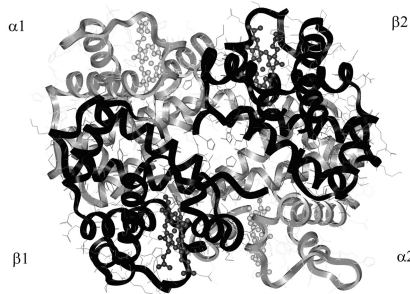
lenne, akkor az oxigénmolekula nem férne be a szerkezetbe a korábban már bizonyított kötőhelyre (Case – Karplus, 1979). A térszerkezet/konformáció dinamikai természetét a röntgendiffrakciós eredmények további elemzése, majd a területen megjelenő NMR spektroszkópia eredményei is alátámasztották, azonban ezek a módszerek a mérési eljárások természete miatt nem alkalmasak arra, hogy konkrét fehérjék konformációs dinamikáját a biológiai reakciókra jellemző, natív környezeti körülmények között részleteiben feltárják. A közelmúltban megjelent új modern mikroszkópiai módszerek már olyan eredményeket szolgáltatnak, amelyek egyetlen fehérjemolekula valamely szerkezeti paraméterének fluktuációját közvetlenül jelenítik meg (Weiss, 1999). Ezek a módszerek azonban szintén speciális körülményeket jelentenek, és egyelőre széleskörűen még nem érhetőek el. Ugyanakkor egyre több kísérleti eredmény születik, ami azt mutatja, hogy a konformációs dinamikának a molekuláris kölcsönhatásokban meghatározó szerepe van. A belső mozgások révén nyílnak meg kötőhelyek, szubsztrátokat a reakciócentrumokhoz szállító csatornák, sőt a reakciópartnerek mozgását is a konformációs dinamika teszi lehetővé. Lehetséges, hogy a dinamikai változás a fő oka egy-egy funkció sérülésének.

Miután a natív körülményekre jellemző dinamikai tulajdonságok leírásának igénye felmerült, de erre kísérleti lehetőség nem mutatkozott, egy szellemes ötlet jelent meg a tudományban a probléma elméleti/számítógépes megközelítésére (McCammon et al., 1977). Ez a számítógépes *molekuladinamikai szimuláció (MDS)* módszercsalád. Röviden, az ötlet az volt, hogy induljunk ki az atomi részletességű szerkezetmeghatározás adataiból, és próbáljuk meg e távolságokkal, szögekkel és paraméterekkel felírni egyszerű függvények formájában az egyes atomok közötti kovalens és nem kovalens kölcsönhatási

energiákat. A molekula állapotának számítógépes kezelése így lehetőséget ad arra, hogy a molekula natív környezetét (hidrátburok; környezeti ionok; oldószer mint közeg) is belefoglaljuk a modellünkbe (sőt, a kristályosítás érdekében végzett módosításokat is mód van korrigálni). A kapott sok tagból álló energiafüggvénynek első lépésként az atomi koordináták változtatásával megkereshetjük a minimumát. Ez már a kiindulási szerkezet közelítését jelenti a natív helyzethez, de még a mozgást nem tartalmazza. Az atomi mozgásokat a hőmérséklettel az ideális gáz analógiájára az átlagos kinetikus energián keresztül kapcsoljuk össze. Ez az analógia azt is megszabja, hogy milyen tartományban, milyen súllyal forduljanak elő atomi sebességek, és ezeket véletlenszerűen kiosztjuk az atomok között. Az energiafüggvény alapján ki tudjuk számítani az atomok között ható erőt, így egy alacsony hőmérséklet (például 100 K) és kezdősebesség-kiosztás után elindulhat az atomi helykoordináták változásának számítása az első időtartam (például 1fs) alatt. A megváltozott szerkezet az energiafüggvényen keresztül visszacsatolódik, és így a helyzet lépésenként módosul, amíg az energiafüggvény értéke stabilizálódik. Ekkor lehet a hőmérsékletet kis lépéssel megemelni, és az eljárást ismételni addig, amíg a natív állapotnak megfelelő helyzetet el nem érjük. Ebben az állapotban azután hosszú ideig lenne célszerű hagyni a rendszert, mert ekkor jellemző a dinamika a molekula tényleges viselkedésére. Több ns is szükséges lehet ahhoz, hogy számunkra érdekes kis valószínűségű lokális fluktuációk is bekövetkezzenek. A számítógépes futtatás időtartama a molekula méretétől és a számítógépes kapacitástól függően alakul ki (például egy közepes nagyságú fehérje 1 ns-os dinamikája egy hatprocesszoros számítógépen három napig tart). Ezt a komoly korlátot próbálják úgy is feloldani, hogy az energiafüggvényt nem atomi részletesség-

gel, hanem egyes atomcsoportokat, kisebb összetevőket, molekula-komponenseket egy egységként felfogva adják meg. Így az adott számítógép-kapacitás hosszabb idejű futtatásokat tesz lehetővé, a durva közelítések viszont problémákat jelentenek. Kutatócsoportunk azt az utat választotta, hogy inkább kevesebb rendszert vizsgálunk egyidejűleg, azonban atomi részletességű közelítésben. Fehérjék területén a legismertebb ilyen típusú molekuladinamikai programcsomag a CHARMM (Brooks et al., 1983), nukleinsavakkal dolgozók inkább az azonos elven működő AMBER (Weiner–Kollmann, 1981) csomagot használják.

Az MDS számítások eredménye egy hatalmas adathalmaz: minden atom egyedi koordinátái az idő függvényében. Ha ide elérkezett egy munka, akkor az a probléma merül fel, hogy miként lehet ezen adathalmazból a legfontosabb információkat kinyerni, illetve továbblépni, a nagyobb egységek mozgását, azaz a funkció szempontjából különösen fontos korrelált mozgásokat felderíteni. A továbbiakban röviden összefoglalva két területről mutatunk be saját eredményeket,



1. ábra • A hemoglobin röntgenkristallográfiával meghatározott szerkezete. A „szalag” reprezentáció a polipeptid-lánc vonulatát mutatja az aminosavak szerkezete nélkül. Az oxigént kötő hem-csoportok szerkezetét alegységként feltüntettük. Sötétebb tónussal a β , világosabbal az α alegységeket jelöltük.

ezzel szemléltetve a lehetőségeket és egyben a jelenlegi kutatási témáinkat.

A hemoglobin kooperatív oxigénkötésének és alloszterikus viselkedésének vizsgálata

A hemoglobinmolekula (Hb) két-két azonos és egymáshoz is hasonló alegységből épül fel, amelyek mindegyike közel centrális helyzetben „hem”-csoportot tartalmaz, ahol az oxigénmolekula megkötése történik. (1. ábra)

A kooperatív viselkedés azt jelenti, hogy ha már az egyik hem-csoport oxigént kötött meg, akkor a következő, szomszédos alegységben már könnyebben kötődik meg a következő oxigén. Az alloszterikus viselkedés azt jelenti, hogy bizonyos molekulákat (ún. heterotróp effektorokat) a tetramer szerkezet képes megkötni a centrális üregben, és ezáltal az oxigénmolekulák kötése erőssége az alegységek hem-csoportjainál módosul. Mindkét effektus azt mutatja, hogy az alegységek a határfelületeken keresztül a centrális helyzetű hem-csoportokig kommunikációs láncsal rendelkeznek. A kommunikáció titkának megértése a szerkezet oxigénellátottságának regulálását tenné lehetővé, így a területen hosszú ideje intenzív kutatómunka folyik. A nagyszámú publikáció szerkezetvizsgáló módszerekkel nyert adatai az oxigént kötő (R) és az oxigénmentes (T) állapotra, mutánsokra és az effektorokkal alkotott komplexekre vonatkozóan mutattak ugyan határozott szerkezeti változásokat, azonban nem adtak magyarázatot az alapkérdésre, és nem voltak összhangban az oxigénasszociációs mérések eredményeivel. Munkánk során elsőként végeztünk el MDS vizsgálatokat a teljes tetramer szerkezeten, natív környezeti feltételek mellett, mind az R, mind a T állapotban, valamint több effektorral alkotott komplex esetében (Lalberge et al., 2005). A dinamika átlagaként nyert szerkezetek már érdekes eltéréseket mutattak a röntgenkristallográfiával nyert adatokhoz képest: egyes konkrét kötések változása he-

lyett az alegységek határfelületének egészét érintő változásokat mutattak. Az effektorok globális hatása alapján sikerült az oxigénaffinitás-mérések eredményeivel (Yonetani et al., 2002) is összhangot találni. A dinamika részletes elemzése pedig azt mutatta, hogy az effektorok kötése az alegységek dinamikáját specifikus módon módosítja. Eredményeink azt jelzik, hogy a molekuladinamika az a tulajdonság, amely közvetíteni képes az oxigénkötő helyek és az effektorok kötés helyei között. A problémakört tovább vizsgáljuk a korrelált mozgások elemzésével.

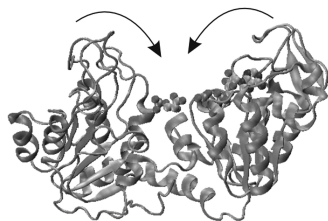
A foszfoglicerát kináz domén-mozgásának vizsgálata

A foszfoglicerát kináz (PGK) egy két doménből álló monomér enzim, amely a glikolízis egyik lépéseként az ADP foszforilációját katalizálja. A reakció két szubsztrátja az 1,3-foszfoglicerát és az ADP. A szerkezet problematikus pontja, hogy a kölcsönható molekulák túl távol vannak egymástól ahhoz, hogy a reakció végbemehessen. Kísérleti eredmények fiziológias körülmények között arra utaltak, hogy a szubsztrátok jelenlétében a két domén valószínűleg összezárul. Húszt évig tartó erőfeszítés után sikerült egy *speciess* esetében a reakciókomplexet kikristályosítani és szerkezetét meghatározni (Bernstein et al., 1997). Ez valóban zárt szerkezetnek felelt meg. Ma még mindig nem rendelkezünk szerkezeti leírásról ugyanazon *speciess* nyitott (szubsztrátkötő) és zárt (foszforiláló) szerkezetéről, és a szubsztrátok által indukált, a két szerkezetet összekötő konformációs mozgás részletes ismerete is hiányzik.

A közelmúltban négy nanomásodperc tartományban végzett molekuladinamikai szimulációval és kovariancia analízissel kimutattuk, hogy a két domén egymással korrelált és ellentétes fázisú mozgást végez, azaz egymáshoz közeledik, illetve távolodik (lásd nyílik a 2. ábrán). Ez a statikus szerkezetek alapján feltételezett mozgás valóban létezik

a molekulában, a szerkezet konformációs dinamikai tulajdonsága. Ez a merev testszerű mozgás valóban egymáshoz közel viszi a két szubsztrátot, lehetővé téve így a reakciót.

Az előzőekben alátámasztani kívántuk a fehérjék konformációs dinamikájának alapvetően fontos szerepét, és röviden bemutattunk néhány ismeretet, amelyet erről a kérdéskörrel számítógépes módszerekkel nyertünk. A megközelítésben ugyan csak *szimuláljuk* a konformációs mozgást, a kísérleti eredményekkel való egyezés azonban igazolja, hogy jó úton járunk. És bár csak a nanomásodperces skálájú mozgásokat tudjuk jellemezni, azonban azt tapasztaljuk, hogy ezen adathalmazra építve a korrelált mozgások és kollektív rezgések meghatározásával a hosszabb időskálájú, valóban funkcionális jelentőségű mozgások jellegére elég nagy biztonsággal következtethetünk. A számítógépes molekuladi-



2. ábra • A foszfoglicerát kináz röntgendifrakciós szerkezete ligandumkötő helyekkel. Nyílakkal a doménmozgásokat szemléltettük.

namikai szimuláció tehát mindinkább az élettudományok más technikákkal egyelőre nem kiváltható, alapvetően fontos fizikai módszerévé válik.

Kulcsszavak: szerkezeti proteomika, DNS, fehérjék, konformációs dinamika, molekula dinamika

IRODALOM

- Bemstein, E. Bradley – Michels, P. M. A. – Hol, W. G. J. (1997): Synergistic Effects of Substrate-Induced Conformational Changes in Phosphoglycerate Kinase Activation. *Nature*. 385, 275-278.
- Brooks, Bernard R. et al. (1983). CHARMM: A Program for Macromolecular Energy, Minimization and Dynamics Calculations. *Journal of Computational Chemistry*. 4, 187–217.
- Case, David A. – Karplus, Martin (1979). Dynamics of Ligand Binding to Heme Proteins. *Journal of Molecular Biology*. 132, 343–368.
- Kendrew, John C. et al. (1958). A Three-Dimensional Model of the Myoglobin Molecule Obtained by X-Ray Analysis. *Nature*. 181, 662–666.
- Labege, Monique et al. (2005), R-State Hemoglobin Bound to Heterotropic Effectors: Models of the DPG, IHP and RSR13 Binding Sites. *FEBS Letters*. 579, 627–632.
- Lander, Eric S. et al. (2001): Initial Sequencing and Analysis of the Human Genome. *Nature*. 409, 860-921.
- McCammon, J. Andrew – Gelin, J. A. – Karplus, M. (1977), Dynamics of Folded Proteins. *Nature*. 267, 585–590.
- Venter, J. Craig et al. (2001), The Sequence of the Human Genome. *Science*. 291, 1304–1351.
- Weiner, Paul W. – Kollmann, Peter A. (1981), AMBER: Assisted Model Building with Energy Refinement. A General Program for Modelling Molecules and Their Interactions. *Journal of Computational Chemistry*. 2, 287–303.
- Weiss, Shimon (1999), Fluorescence Spectroscopy of Single Biomolecules. *Science*. 283, 1676–1683.
- Yonetani, Takashi et al. (2002): Global Allostery Model of Hemoglobin. Modulation of O₂ Affinity, Cooperativity, and Bohr Effect by Heterotropic Allosteric Effectors. *Journal of Biological Chemistry*. 277, 34508–34520.