Egy oligopeptidáz méretszelektivitásának, szubsztrátkötésének és katalitikus mechanizmusának tanulmányozása röntgendiffrakcióval és in silico módszerekkel

Orgován Zoltán

ELTE TTK Kémiai Intézet, Szerves Kémiai Tanszék

Témavezetők: **Dr. Harmat Veronika** egyetemi adjunktus
Dr. Karancsiné Menyhárd Dóra tudományos főmunkatárs
ELTE TTK, Kémiai Intézet, Szerkezeti Kémiai és Biológiai Laboratórium

Az Aeropyrum pernix acilaminoacil-peptidázt (ApAAP) vizsgáltam, amely a prolil-oligopeptidáz enzimcsalád tagja. A család több tagja is biológiai hatása miatt gyógyszercélpont fehérje. Vizsgálataim fő célját annak a még ma sem tisztázott problémakörnek a vizsgálata képezte, hogy a szubsztrát milyen úton jut el a molekula belsejében lévő aktív helyhez. Az enzimcsalád több tagjánál is megállapították, hogy nyitott, illetve csukott konformációt is felvehet. Nyitott állapotban az ún. propeller és hidroláz domén eltávolodik egymástól, így lehetővé téve a szubsztrát bejutását, ekkor azonban az aktív hely szerkezete eltorzul (a katalitikus hisztidint hordozó hurok elmozdul) ezzel lehetővé téve, hogy a reakció csak akkor játszódhasson le, ha az enzim rácsukódik a szubsztrátra, kiszelektálva a túl nagy szubsztrátmolekulákat. Csukott állapotban az aktív hely és a külvilág közötti kapcsolatot egyedül a propeller doménen lévő szűk pórus biztosítja.

Célom egyrészt a szubsztrátkötés és a hisztidin hurok visszarendeződése közti kapcsolat felderítése volt egy kisméretű szubsztrát-analóg inhibitor segítségével, fehérjekrisztallográfiával, másrészt egy nagyobb, oligopeptid szubsztrátnak az enzim üregében való elhelyezésével és kötődésével a ki/bejutás lehetőségének a vizsgálata molekuladinamikai szimuláció segítségével.

A kísérletek során az ApAAP fehérje kristályait kovalensen kötő inhibitort tartalmazó oldatba áztattuk, ezzel egy olyan dimert előállítva, melynek egyik tagja nyitott és komplexálatlan, másik tagja pedig zárt és komplexált állapotban van jelen. Ez az eredmény arra enged következtetni, hogy a szubsztát kötődése nem elegendő a hisztidint tartalmazó hurok konformációjának helyreállításához, másképpen nem a szubsztrát kötődése indukálja az aktív hely „regenerációját”. A szerkezet és a felhasználásával végzett számítások eredménye azt mutatta, hogy kis szubsztrát belépése a csukott monomerbe a propeller doménen lévő póruson keresztül lehetséges. A molekuladinamikai szimuláció pedig azt mutatta, hogy a szubsztrát N-terminálisa a propeller doménen lévő pórus nyílása felé orientálódik.