

FIZIL ÁDÁM–GÁSPÁRI ZOLTÁN–BATTÁ GYULA

Egy gombaellenes gombafehérje

PAF, a bűvös hatóanyag

A gyógyászatban alkalmazott terápiás szerek ellen kialakuló rezisztencia miatt egyre nagyobb az igény az új antimikrobiális hatóanyagok fejlesztésére és alkalmazására. Tudjuk, hogy a Föld biomasszájának mintegy fele gomba. Ezek egy része kórokozó, így az általuk okozott fertőzések célzott és hatékony kezelése nem mindennapi kihívás.

Egy az elmúlt években létrehozott nemzetközi, osztrák és magyar kutatócsoportok között kialakult együttműködés eredményeként néhány olyan új gombaellenes fehérjét fedeztek fel és jellemeztek molekuláris szinten [1], melyeknek szerepe lehet bizonyos gombafertőzések okozta betegségek gyógyításában. Érdekes módon ezeket a fehérjéket is gombák termelik. Ám a nyilvánvaló szerkezeti hasonlóság ellenére a különböző fehérjék eltérő hatásmechanizmussal pusztítanak egyes gombafajokat. Írásunkban a fehérjecsalád általunk legbehatóbban tanulmányozott képviselőjének, a PAF-nak atomi felbontású szerkezetét és belső dinamikáját feltáró vizsgálatainkat foglaljuk össze.

A PAF (*Penicillium Antifungal Protein*), mint neve is mutatja, a *Penicillium chrysogenum* gomba által termelt gombaellenes fehérje, amely többek között az *Aspergillus* törzsek növekedését gátolja. Az emlőssejtekre nincs hatása, így terápiás alkalmazása távlatilag ígéretesnek mondható. Hatásmechanizmusáról jelenleg annyit tudunk, hogy a megtámadott gombaszervezetben programozott sejthalált (apoptózist) okoz, azonban ennek részletei, így pl. a fehérje támadáspontja nem ismert. Érdekes, hogy a PAF legismertebb rokona, az *Aspergillus giganteus* által termelt AFP fehérje hatásmechanizmusa más. Reményeink szerint a PAF atomi szintű szerkezetének és belső dinamikájának (molekuláris mozgások) vizsgálata közelebb vihet bennünket működésének megértéséhez.

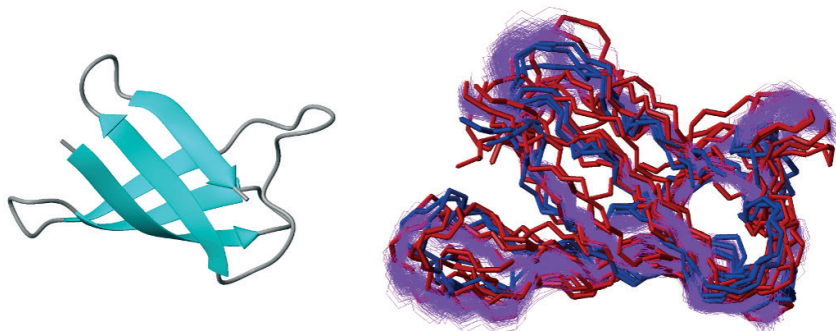
Az 55 aminosavból felépülő PAF rendkívül stabil. Emiatt kiválóan alkalmas oldatfázisban végezhető NMR- (mágneses magrezonancia) spektroszkópiai méréseken alapuló szerkezeti és dinamikai vizsgálatokhoz. A legújabb kutatások azt igazolják, hogy a fehérjéknek nem csupán a háromdimenziós szerkezete, hanem annak különböző időskálán történő változása, azaz a fehérjék dinamikája is döntő mértékben meghatározza a működés, vagyis a biológiai szerep betöltésének mechanizmusát. Célunk ezért a térszerkezet tisztázása mellett a belső mozgások leírása és azok szerepének értelmezése is volt.

A PAF szerkezetére a hidrogénhidakkal stabilizált béta-redőzött másodlagos szerkezet jellemző, ami kedvez a spektroszkópusnak abból a szempontból, hogy az egyes aminosavak kémiai egységeinek (pl. amid NH-csoportoknak) a környezetük különböző, így az NMR-spektrumban a megfelelő jelek jól elkülönülnek, vagyis a jelek feloldhatósága kiváló. A mole-

kula három diszulfidhidat tartalmaz, amelynek mintázata, azaz a résztvevő cisztein aminosavak kapcsolódási sorrendje csak az NMR-mérések alapján nem volt egyértelmű. Ennek pedig oka az, hogy a hatból négy cisztein kénatomjai nagyon közel helyezkednek el egymáshoz, így akár kétféle mintázat is lehetséges. Ezek biztos meghatározása csak a kémiai szintetizált fehérje tömegspektrometriás elemzésével volt lehetséges. Legújabbban írt kutatókkal közös röntgen-kristallográfiai vizsgálatok is alátámasztották ezeket az eredményeket, független megerősítést adva korábbi következtetéseinknek.

A diszulfidhid-mintázat segítségével, az NMR-spektroszkópiai mérésekkel meghatározott oldatfázisú PAF térszerkezetet 2015-ben publikáltuk. [2] Ehhez jó néhány két- és háromdimenziós NMR-spektrumra volt szükség, amit több hetes mérési időt igényelt. A szerkezetet beküldtük a fehérje- (pdb) adatbankba, ami az alapos ellenőrző eljárásokat követően igazolta, hogy a szerkezet jó minőségű.

Az új szerkezeti biológiai szemléletmód szerint a térszerkezet önmagában nem elegendő egy fehérje működési mechanizmusának atomi szintű megértéséhez: ehhez a molekula belső



1. ábra. Balra: a PAF térszerkezeti modellje a béta-szalák kiemelésével (kék nyilak), az őket összekötő hurokrégiók szürkével ábrázolva. Jobbra: a PAF közvetlenül észlelhető formájának sokaságmodellje (lila), valamint a meleg (344 K, piros) és hideg (268 K, kék) állapotokra jellemző, egymástól leginkább különböző szerkezeti modellek. Jól látható, hogy a hideg és meleg forma közötti különbségek a hurokrégiókban a legnagyobbak

mozgásainak feltérképezése is szükséges. A belső mozgások során történő szerkezeti átrendeződések következtében a molekulák alakváltoztatásai határozzák meg azt, hogy milyen partnermolekulákkal tudnak hatásos kölcsönhatást kialakítani. Ez elsősorban – de nem kizárólagosan – a μ s-ms időskálájú belső mozgásokra igaz, míg az ennél gyorsabb mozgások jellemzően a konformációs entrópia (rendetlenség) és annak a kötődés hatására történő megváltozása révén befolyásolják a molekuláris felismerést.

Ezért olyan NMR relaxációs méréseket végeztünk, amelyek a PAF különböző időskálán lejátszódó belső mozgásainak követését lehetővé tették. A gyors, ps-ns időskálájú belső mozgások esetében a PAF viszonylag merev, a mért „rend-paraméte-

rek” nem utaltak változatos dinamikára. Ezért igencsak meglepődünk, amikor a hőmérséklet függvényében felvett egyszerű spektrumok kiértékelésébe kezdünk. Azt találtuk, hogy a molekula mind magas, mind alacsony hőmérsékleten jelentős változáson megy át. Ez a változás azonban csak a molekulák összességének szintjén értelmezhető. Arról van ugyanis szó, hogy az észlelt jelek a hőmérséklet emelésével és csökkentésével a molekulák egyre kisebb hányadából származtak, azaz egy optimális hőmérséklettől (kb. szobahőmérséklet) távolodva, a molekulák egyre nagyobb hányada vált „NMR-láthatatlanná”. Régóta ismert, hogy a fehérjék szerkezete meleg és hideg hatására is átmehet komoly változásokon, a stabil háromdimenziós szerkezet felbomolhat, kitekeredhet, a PAF esetében tapasztalt változásoknak azonban két meglepő aspektusa is van. Az első, hogy egy igen kompakt, három diszulfidhíddal összekötött szerkezetről van szó, ahol bizonyos, hogy pusztán a hőmérséklet változtatásával a diszulfidhidak nem bomlanak fel, így nem számítotunk hagyományos értelemben vett kitekeredésre, illetve ilyen irányba mutató jelentős szerkezeti változásokra. A második nem várt eredményünkre akkor derült fény, amikor a kitekeredés fizikai

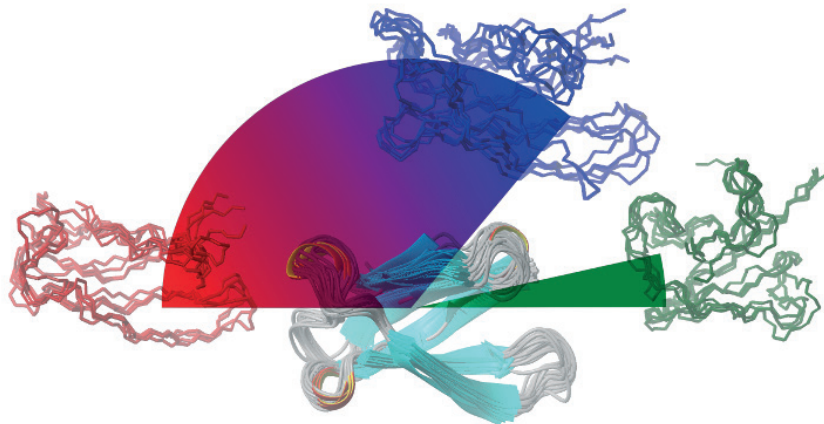
gúl, de nem utolsósorban, természetesen maguknak az egyes állapotoknak a pontos szerkezeti jellemzőit is ismernünk kellene. Ekkor, a kutatók által csak részben megértett okokból, előfordulhat, hogy a molekulák egy része az adott mérési eljárás segítségével nem detektálható. A hőmérséklet változtatása a fennálló dinamikus egyensúlyt eltolja, ezért a nem észlelhető állapotok aránya is megváltozhat.

Ha a vázolt kép minden lényeges vonását ismernénk, akkor rendelkezésünkre állna a dinamikus egyensúly teljesnek tekinthető leírása. Ez azonban több okból sem tekinthető reális célkitűzésnek. A valós rendszerben a molekulák száma olyan nagy, hogy azt még megközelítőleg sem tudjuk már csak tárolási kapacitás szintjén sem leírni, ennél 10–12 nagyságrenddel kevesebb fehérjeszerkezet számítógépes reprezentációja sem tekinthető még rutinnak. Emellett ismernünk kellene a molekula által felvehető lehetséges térszerkezeteket, ami még ennél is komolyabb problémát jelent: az elméletileg lehetséges összes konformáció száma csillagászati, a mi 55 aminosavas fehérjénk esetében minimálisan 3^{55} -ra, azaz kb. 10^{26} -ra tehető (a fehérjefeltekeredés Levinthal-paradoxona szerint). Végül pedig ezen csillagászati számú állapot közötti lehetséges átmenetek részleteit, valószínűségét is ismernünk kellene, amihez szükség lenne nem csupán az állapotok, hanem a köztük átvezető átalakulási útvonalak energetikai viszonyainak feltérképezésére is.

Az ilyenfajta teljes leírás helyett ezért olyan modellek felállítása lehet a reális cél, amely az egyes főbb állapotok lényeges vonásait tükrözi, és megmutatja, hogy a molekula mely részeinek átalakulása járulhat hozzá jelentős mértékben az észlelt jelenségekhez. Ehhez a legmegfelelőbbek az utóbbi 10–15 évben terjedni kezdő ún. sokaságalapú leírások, amelyek a hagyományos szerkezeti modellekkel szemben nem várják el, hogy az észlelt kísérleti paramétereknek való megfelelést egyetlen szerkezeti modell segítségével érjük el, hanem az egyes jellemzőket sok különböző szerkezet átlagaként értelmezik. [3] Az ilyen modellek természetüknél fogva közelebb állnak a valósághoz, hiszen a mérések során is sok molekuláról kapunk

azok átlagának megfelelő információt, ugyanakkor felvetik az ún. túlllesztés lehetőségét, amikor a paramétereknek való megfelelés tetszőlegesen sok, de nem feltétlenül biológiailag releváns szerkezet segítségével is elérhető. Ezért fontos az előállított sokaságok független elemzése, az előállításukhoz nem felhasznált paraméterekkel való összevetése, akár annak konkrét vizsgálata, hogy kevesebb szerkezettel megkapható-e ugyanolyan vagy jobb megfelelés.

A kísérleti adatoknak megfelelő sokaságok alapvetően kétféle módszerrel állíthatók elő. Az első módszer a kísérleti megközelítést felhasználó molekuladinamikai szimuláció, ahol a molekulák belső mozgásait korlátok közé szorítva biztosítjuk a kísérleteknek való megfelelést oly módon, hogy egyidejűleg több molekulát szimulálunk és a paramétereket az egyidejűleg számolt molekulákra vonatkoztatott átlagaként értelmezzük. A második módszer esetében egy előre létrehozott, nagy szerkezeti változatosságot mutató molekulahalmazból szelekciós eljárással választunk ki egy olyan sokaságot, alhalmazt, amely összességében megfelel a mérési eredményeknek. Az első módszert általában akkor alkalmazzuk, amikor viszonylag kisebb léptékű elmozdulásokat, azaz egy jól



2. ábra. A PAF szerkezeti formáinak dinamikus egyensúlyi rendszere. Alul középen a szobahőmérsékleten észlelhető fő forma, pirossal a magas, késsel az alacsony hőmérsékletre jellemző részlegesen kitekeredett formák, zölddel pedig a fő formával szobahőmérsékleten kicserélődésben lévő állapot. A dinamikus egyensúlyban részt vevő formák egy részéről jelenleg nincs információ

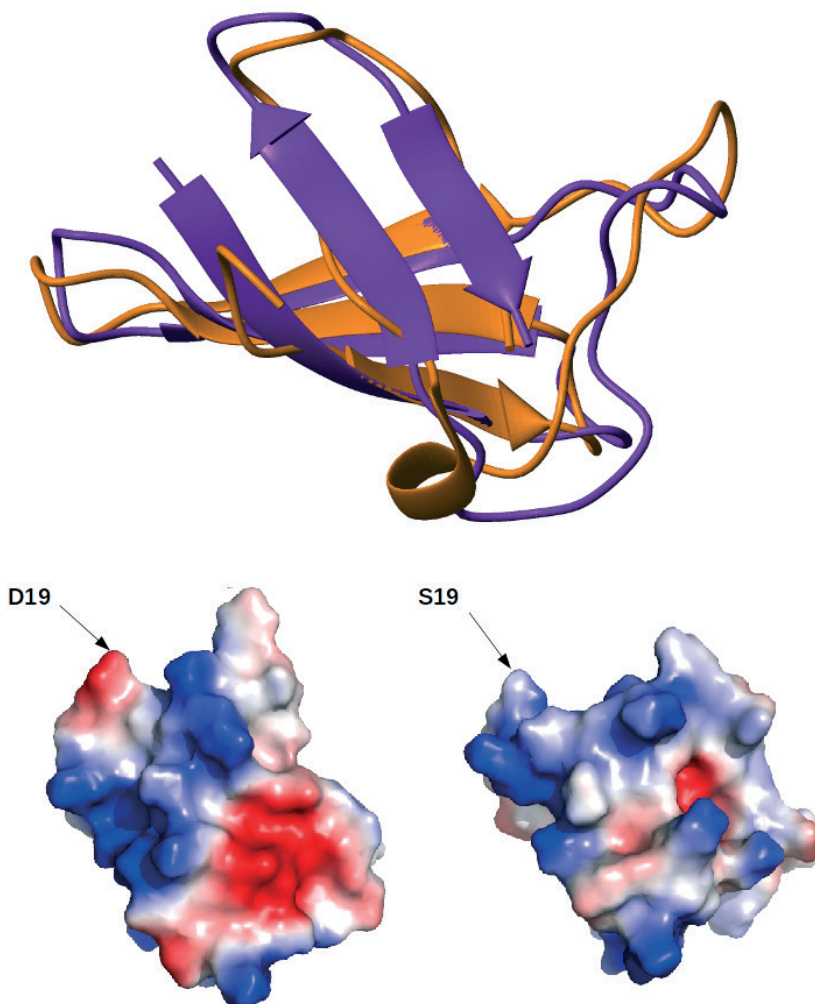
modelljét leíró egyenleteket ráillesztettük a mért adatainkra. Ennek alapján ugyanis még a maximális stabilitás hőmérsékletén is, tehát amikor a mintában lévő molekulák legnagyobb része „látható”, még mindig mintegy 20–30%-ra becsülhető a „láthatatlan” molekulák aránya. Ez az érték hasonló, illetve nagyobb az egyéb fehérjék esetében publikált értékeknél, és értelmezése nem egyszerű.

Az eredmények lehetséges magyarázatához ismét a belső dinamikát kell segítségül hívunk. A fehérjék sokaságát úgy képzelhetjük el, hogy nagyszámú (a konkrét mérésekhez használt mintacsőben 10^{17} – 10^{18} db) molekula folytonos szerkezeti átalakuláson megy keresztül, ahol egyensúly esetén mindig adott számú molekula van bizonyos szerkezeti állapotokban. Az ún. ergodik hipotézisnek megfelelően, minden egyes molekula idejének ugyanakkora részét tölti egy-egy állapotban, amekkorára része az egész sokaságnak egy adott időpillanatban abban az állapotban előfordul. Lényeges szempont, hogy az egyes állapotok közötti átalakulás milyen gyakori, vagyis az adott szerkezeti átrendeződés milyen időskálán megy végbe, ez természetesen függ a konkrét állapotoktól, amelyek között ez megtörténik. Vé-

meghatározott átlagos térszerkezethez közeli szerkezeti állapotokat kívánunk feltérképezni, míg a második akkor kerül előtérbe, amikor változatos, nagyobb léptékű átrendeződéseket kívánunk jellemezni.

A PAF esetében mindkét módszert alkalmaztuk. A gyors, ps-ns időskálájú mozgásokra jellemző paramétereket egy szimulációhoz plusz feltételként hozzáadva olyan sokaságot kaptunk, amely várhatóan jól tükrözi a molekula közvetlenül észlelhető formájának dinamikai változatoságát azon a hőmérsékleten, ahol ezen forma aránya a legmagasabb. [4] Ezután arra voltunk kíváncsiak, hogy a hideg és meleg hatására megjelenő, részlegesen kitekeredett formák mennyire térnek el egymástól, azaz hasonló-e a magas és az alacsony hőmérséklet hatására bekövetkező szerkezeti-dinamikai változás. Ehhez a két szélső hőmérsékleten mért ún. kémiai eltolásadatokat használtuk fel, melyek az egyes atommagok kémiai környezetére jellemzőek, ezáltal a molekula háromdimenziós szerkezetétől is függenek. Egy előre elkészített, változatos konformációs halmazból mindkét hőmérsékleten 10 000-szer megismételtünk egy véletlenszerű elemeket is tartalmazó szelekciós eljárást. Ezután minden egyes szerkezetre megvizsgáltuk, hogy hányszor kerültek be a végső, szelektált sokaságba a két hőmérsékleten. Végül kiválasztottuk azokat a szerkezeteket, amelyek esetében a legnagyobb különbség volt abban, hogy hányszor kerültek be a magas és hányszor az alacsony hőmérsékletre jellemző paraméterek alapján szelektált sokaságokba. Ezáltal olyan szerkezetekhez jutottunk, amelyek esetében a két szélső hőmérsékletre jellemző jellegzetességek közötti különbségek várhatóan maximálisak vagy ahhoz közeliak. Fontos ugyanakkor megjegyezni, hogy ezek a szerkezetmodellek viszonylag kevés adat alapján készültek, tehát megbízhatóságuk valamelyest elmarad a közvetlenül észlelhető formát reprezentáló sokaságtól. A várakozásoknak megfelelően a PAF nem tekeredik ki, a szerkezeti változások a béta-szálak közötti hurokrégiókra koncentrálnak, ám ezek különböznek a hideg és meleg hatására kitekeredett formákban (1. ábra).

A molekula rejtett konformereinek feltárása érdekében olyan méréseket is végeztünk, amelyek képesek arra, hogy az észlelhető állapottal adott időskálán dinamikus egyensúlyban lévő szerkezeti változatokról információt adjanak. Ezen mérések segítségével valóban észleltünk egy máshogyan nem dektálható állapotot, mely különbözik a szobahőmérsékleten jellemző, illetve a hideg/meleg hatására részlegesen „kitekeredett” formáktól is. Ez a rejtett állapot azonban a molekulák csupán 0,15%-ára jellemző, messze nem tehető tehát felelőssé a szobahőmérsékleten nem látható mintegy 20–30%-nyit kitevő láthatatlan formáért. Erre a kis hányadban jelenlévő rejtett formára csak egy nagyon közelítő szerkezeti modellt tudunk készíteni, amely pusztán annyit mutat, hogy a molekula – egyébként térben egymáshoz viszonylag közel lévő – két végén történnek jelentősebb térszerkezeti változások. A kapott eredmények alapján egy olyan modellt tudunk felállítani, ahol



3. ábra. Fent: a PAF (lila) és a D19S-változat (narancs) szerkezetének összevetése. Jól látszik a hasonló harmadlagos szerkezet és az egy hurokban való eltérés. Alul: a PAF (balra) és a D19S variáns (jobbra) felszíni töltéeloszlásának összevetése. Piros: negatív, fehér: semleges, kék: pozitív töltés

a közvetlenül észlelhető forma számos más szerkezeti állapottal áll dinamikus egyensúlyban, és ez az egyensúly a hőmérséklet változásával eltolódik (2. ábra). Az egyik ilyen, a láthatóval egyensúlyt tartó forma a molekula végeinek elrendezésében különbözik a fő konformertől, de a közvetlenül nem mérhető formák jelentős részéről jelenleg nem rendelkezünk információval, az „sötét anyag”-nak tekinthető.

Azt jelenleg nem tudjuk megmondani, hogy az észlelt szerkezeti-dinamikai különbségeknek van-e funkcionális szerepe, és ha igen, milyen módon járulnak hozzá a molekula hatásmechanizmusának kialakításához. Bár a PAF-nak nem ismerjük kötőpartnereit, az igen valószínű, hogy a felületén jelenlévő sok pozitív töltésű oldallánc (lizin) szerepet játszik a gombaellenes hatás kialakulásában. Ennek feltérképezésére több olyan variánszt állítottunk elő, amelyek felszínén egy-egy aminosavat megváltoztattunk. Ezek közül az egyik legérdekesebb az, amelyben a 19. pozícióban lévő, negatív töltésű aszparaginsav aminosavat semleges töltésű szerinre cseréltük, ennek neve az aminosavak egybetűs rövidítéseit felhasználva D19S variáns. Funkcionális

oldalról a D19S-változat lényegesen gyengébb gombaellenes anyag, mint a vad típusú PAF, és ez a különbség leginkább abban érhető tetten, hogy növekvő Ca^{2+} -ionkoncentráció hatására hamarabb elveszti hatássűrűségét. Szerkezeti oldalról igen érdekes különbséget látunk a D19S és a vad típusú PAF között: a szerkezet egésze keveset változik, azonban egy hurokrégió konformációja jelentősen más lesz a mutáció hatására, és ez együtt jár a felszíni töltésmintázat megváltozásával (3. ábra). A felszínen lévő, töltéssel rendelkező aminosavak kölcsönhatásainak részletes elemzése arra utal, hogy az ezek közötti kapcsolatok nagymértékben átrendeződnek. Ennek magyarázata, hogy a 19-es pozícióban lévő negatív töltés kiesésével az ugyanannyi pozitív töltésű felszíni oldallánca eggyel kevesebb negatív töltésű oldallánc jut, és a pozitív töltések így inkább azok közé csoportosulnak. A változás ennél annival összetettebb, hogy természetesen a sok pozitív töltés közötti taszítás is szervező erőként jelentkezik. Összességében a funkcionális és szerkezeti változások megerősítik, hogy a felszíni töltéssűrűségnek és -eloszlásnak szerepe van a biológiai hatás megjelenésében. [5]

A PAF tehát ígéretes gombaellenes hatóanyag lehet, azonban működése kapcsán nagyon sok még az ismeretlen tényező. Eddigi erőfeszítéseink ellenére kevés, a PAF fehérjével specifikus kölcsönhatásba lépő molekulát találtunk (membránalkotó foszfátidilinozitolok és membrán kivonatból származó ismeretlen nagy fehérjékkel való kölcsönhatást azonosítottunk eddig). A PAF tehát nagy stabilitása ellenére, természetes állapotában bonyolult dinamikus egyensúlyban létezik és csak részben jellemezhető közvetlenül a nem detektálható szerkezeti formákkal. A felszíni töltéssel való kölcsönhatás szerepe felveti, hogy az egyes szerkezeti átrendeződések összefüggésben lehetnek a hatásmechanizmussal. Annyi jelenleg bizonyosnak látszik, hogy a PAF és variánsai még hosszú ideig elátnak bennünket és egyre több együttműködő partnerünket újabb felderítendő titkokkal és szakmai feladványokkal.

Köszönetnyilvánítás

A kutatást az NKFI Hivatal ANN110821 és NF104198 azonosítójú pályázatait, valamint a GINOP-2.3.2-15-2016-00008 számú projekt keretében, az Európai Unió támogatásával, az Európai Regionális Fejlesztési Alap társfinanszírozásával valósult meg.

Irodalom

- [1] Nikoletta Hegedüs, Florentine Marx: Antifungal proteins: more than antimicrobials? *Fungal Biol. Rev.* (2013) 26: 132-145.
- [2] Ádám Fizil, Zoltán Gáspári, Terézia Barna, Florentine Marx, Gyula Batta: „Invisible” conformers of an antifungal disulfide protein revealed by constrained cold & heat unfolding, CEST-NMR experiments and molecular dynamics calculations *Chem. Eur. J.* (2015) 21:5136-5144
- [3] Annamária F. Ángyán, Zoltán Gáspári: Ensemble-based interpretations of NMR structural data to describe protein internal dynamics *Molecules* (2013) 18:10548-10567
- [4] Barbara Richter, Joerg Gsponer, Péter Várnai, Xavier Salvatella, Michele Vendruscolo: The MUMO (minimal under-restraining minimal over-restraining) method for the determination of native state ensembles of proteins. *J Biomol NMR* (2007) 37:117-135
- [5] Christoph Sonderegger, Ádám Fizil, Laura Burtscher, Dorottya Hajdu, Alberto Muñoz, Zoltán Gáspári, Nick D. Read, Gyula Batta, Florentine Marx: D19S mutation of the cationic, cysteine-rich protein PAF: novel insights into its structural dynamics, thermal unfolding and antifungal function. *PLoS ONE* (2017) 12:e0169920

FEKETE RÉKA – MOLNÁR V. ATTILA

Az utak hatása az élővilágra

A közutak egyaránt hatással vannak az élő és az élettelen környezetre. Megváltoztatják a táj arculatát és többnyire negatív hatással vannak az élővilágra. Egy útszakasz kiépítése az állatok elgazolásától az élőhelyek feldarabolásáig sokféle következménnyel járhat. Az úthálózatok kiterjedése világszerte egyre növekszik és egyre jelentősebb környezeti gondokat okoz. Az élőlényekre kifejtett negatív hatásait meglehetősen sok tanulmány dokumentálta. Másfelől viszont az egyre intenzívebben hasznosított tájakon az



Az útszegélyek teret adhatnak olyan agresszívan terjedő növényfajoknak, mint a komoly ökológiai, gazdasági és egészségügyi károkat okozó ürömlévelű parlagfűnek

utakat kísérő természetközeli élőhelytöredékek (mezsgyék, árokpartok) az eredeti életközösségek utolsó menedékhelyeiként szolgálhatnak.

A korunkra jellemző globalizáció egyik jellegzetessége, egyszerűen a világméretű kereskedelem és közlekedés növekedésének jellemző mutatója, hogy az Európai Unió tagállamain belül a 2008-ig létesült burkolt utak hossza meghaladta az 5 millió kilométert, az Egyesült Államokban a 4 és fél millió kilométert, Japánban csaknem elérte az 1 millió, Kínában pedig a 3 millió kilométert.

Az utak sokasága negatív összefüggést mutat a legtöbb élőlénycsoport sokféleségével. Az utak legáltalánosabb negatív hatásai közé az élőhelyek feldarabolása, az érintett élőlényközösségek sérülékenyebbé válása, a természetes élőhelyek özönfajok általi könnyebb elérése sorolható.

A vidra Európa-szerte veszélyeztetett faj, visszazorulásának egyik fő okaként a megnövekedett közúti forgalmat tekintik

