

Sejtszintű biológiai szabályozás

Kis G fehérjék – P-loop ATPázok



2018 ősz

Mit kell megjegyezni?

- Számos jelátvivő, időzítő és motor enzim (P-hurok NTPázok) közös nukleotid-kötő és -hidrolizáló (NTPáz) enzim-őstől származtatható
 - Miozin
 - Kinezin
 - G-fehérjék
 - Adenilát-kináz
 - DNS-módosító enzimek (RecA)
- A nukleotidkötő zsebet felépítő konzervált motívumok szerkezete és topológiája (térbeli elrendeződése) hasonló ezekben az enzimekben
- Divergens evolúció révén ezek az enzimek változatos biológiai funkciók ellátására szakosodtak
- E funkciók mindegyikének alapja az NTP (leggyakrabban ATP vagy GTP) –hidrolízis, amely energetikailag kedvező (folyamatok hajtóerejéül szolgálni képes) reakció
- Az NTP-hidrolízis minden esetben „be van fogva” valamilyen módon, azaz valamilyen kapcsolt reakcióban jön létre az információ-továbbítás (jeladás, irányított elmozdulás)
- A kapcsoltság allosztérikus mechanizmusok révén, partnerfehérjékkel kölcsönhatva jön létre
- Az NTPázok önmagukban lassú enzimek, biológiai hatásuk a partnerfehérjék (GAP, GEF=GGRP=NEP, egyéb effektorok) általi aktiváció által jön létre
- A partner-aktiváció nélkül az NTPáz működés energiapazarló ciklusokhoz vezet(ne)
- A biológiai funkcióhoz elengedhetetlen a különböző reakcióutak közötti szabályozott választás
- E választás termodinamikai és/vagy kinetikai kapcsoltsági mechanizmusok révén jöhet létre

P-hurok NTPázok közös szerkezeti magja

Miozinok Kinezinok G-fehérjék

- Kis GTPázok (jelátvitel: differenciáció, növekedés, tápanyag-érzékelés, vezikulumtranszport)

- Ras (p21^{ras})

- Rho

- Arf

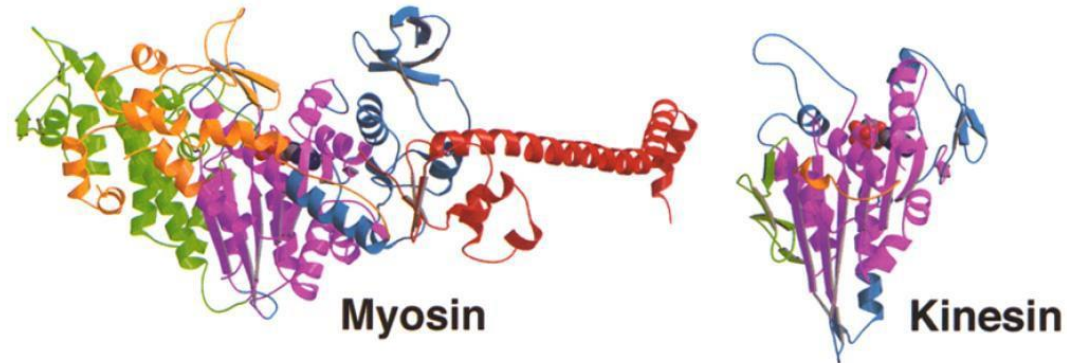
- Transzláció-iniciációs és -elongációs faktorok

- EF-Tu

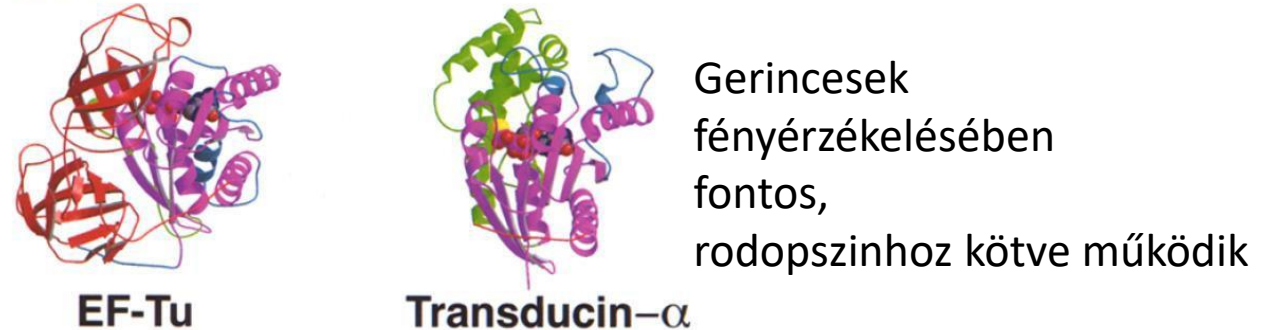
- Heterotrimer jelátvivő G-fehérjék α -alegysége

Egyéb családok

Motor Proteins



G Proteins



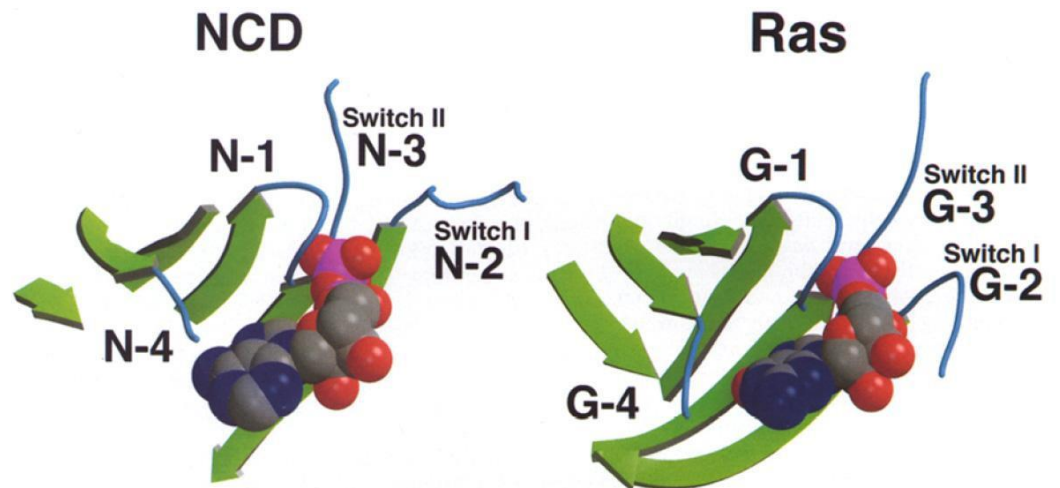
Lila: közös szerkezeti mag
Kék: egyedi funkciókat biztosító hurkok
Zöld, narancs: miozinok és kinezinok közös inszerciói
Piros: csak a miozinra jellemző erőtovábbító (erőkar)

Vale 1996

A nukleotidkötő zsebet alkotó konzervált motívumok

Nucleotide Binding Motifs

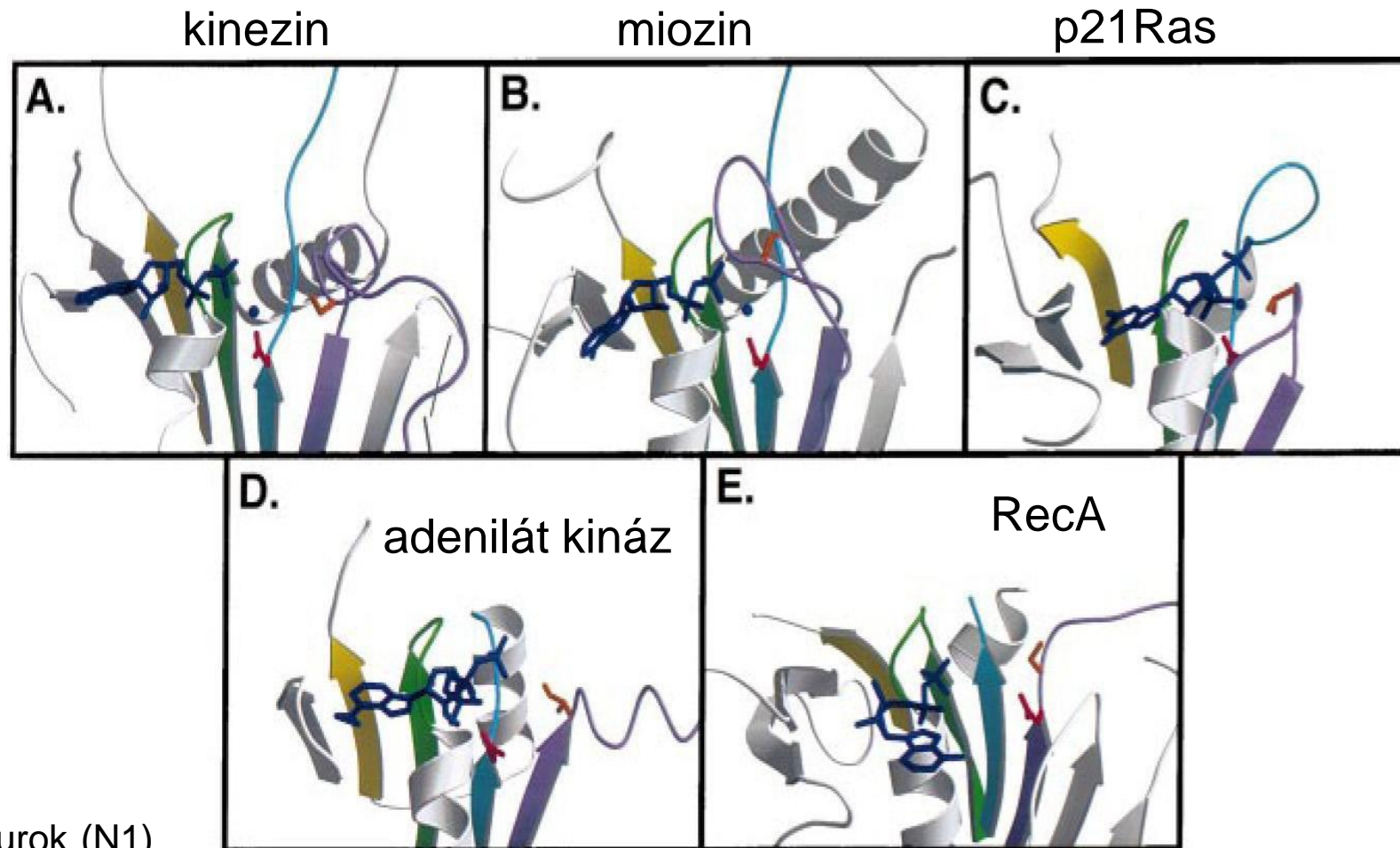
	$\alpha, \beta\text{-PO}_4$ <u>N-1</u>	$\gamma\text{-PO}_4$ <u>N-2</u>	$\gamma\text{-PO}_4$ <u>N-3</u>	Purine <u>N-4</u>
G Proteins	GxxGxGKS/T	T	DxxG	NKxD
Kinesins	GQTxxGKS/T	NxxSSR	DxxGxE	RxRP
Myosins	GESxxGKS/T	NxxSSR	DxxGxE	NP



Nevezéktan

- N-1 = G-1 = P-hurok = Walker A motívum
- N-2 = G-2 = switch 1
- N-3 = G-3 = switch 2

A nukleotidkötő zseb konzervált szerkezete



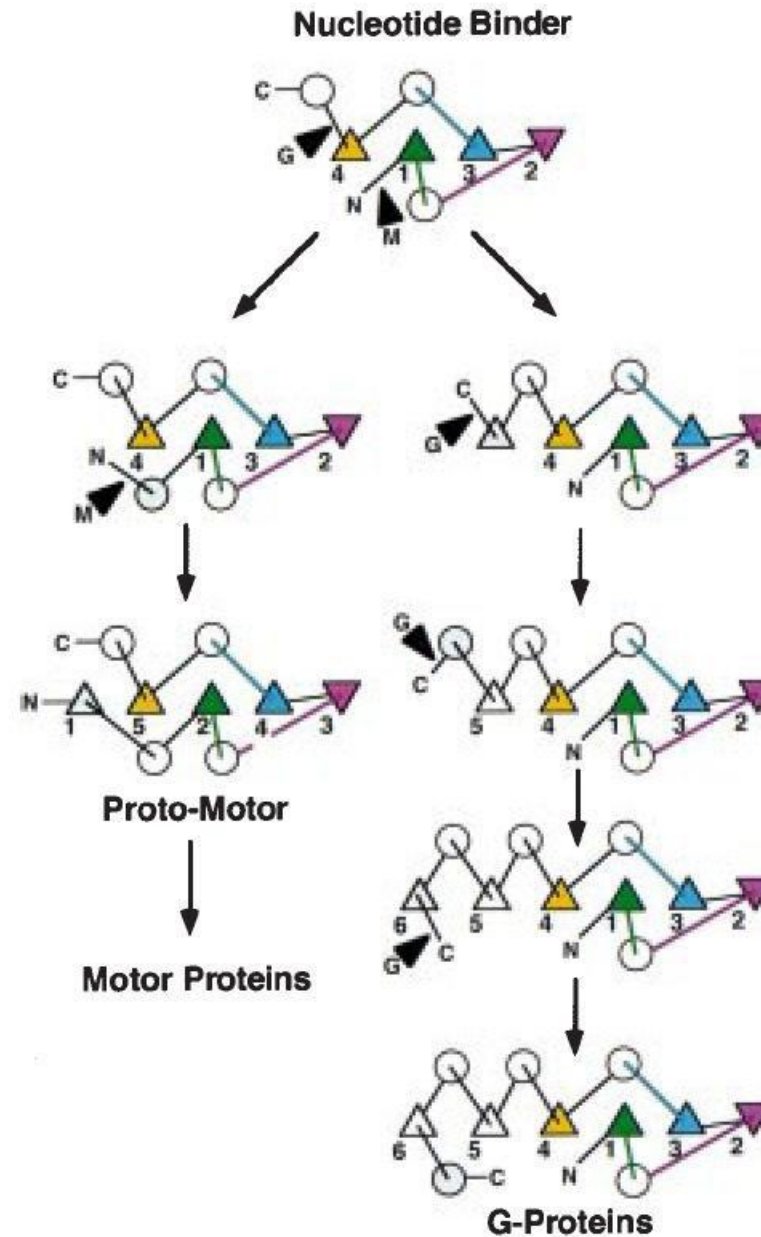
Zöld: P-hurok (N1)
Lila: switch-1 (N2)
Kék: switch-2 (N3)
Sárga: konzervált β -szál

Piros: konzervált Asp (Mg-koordináció)
Narancs: Konzervált Ser/Thr (γ -foszfát koordináció)

Kull 1998

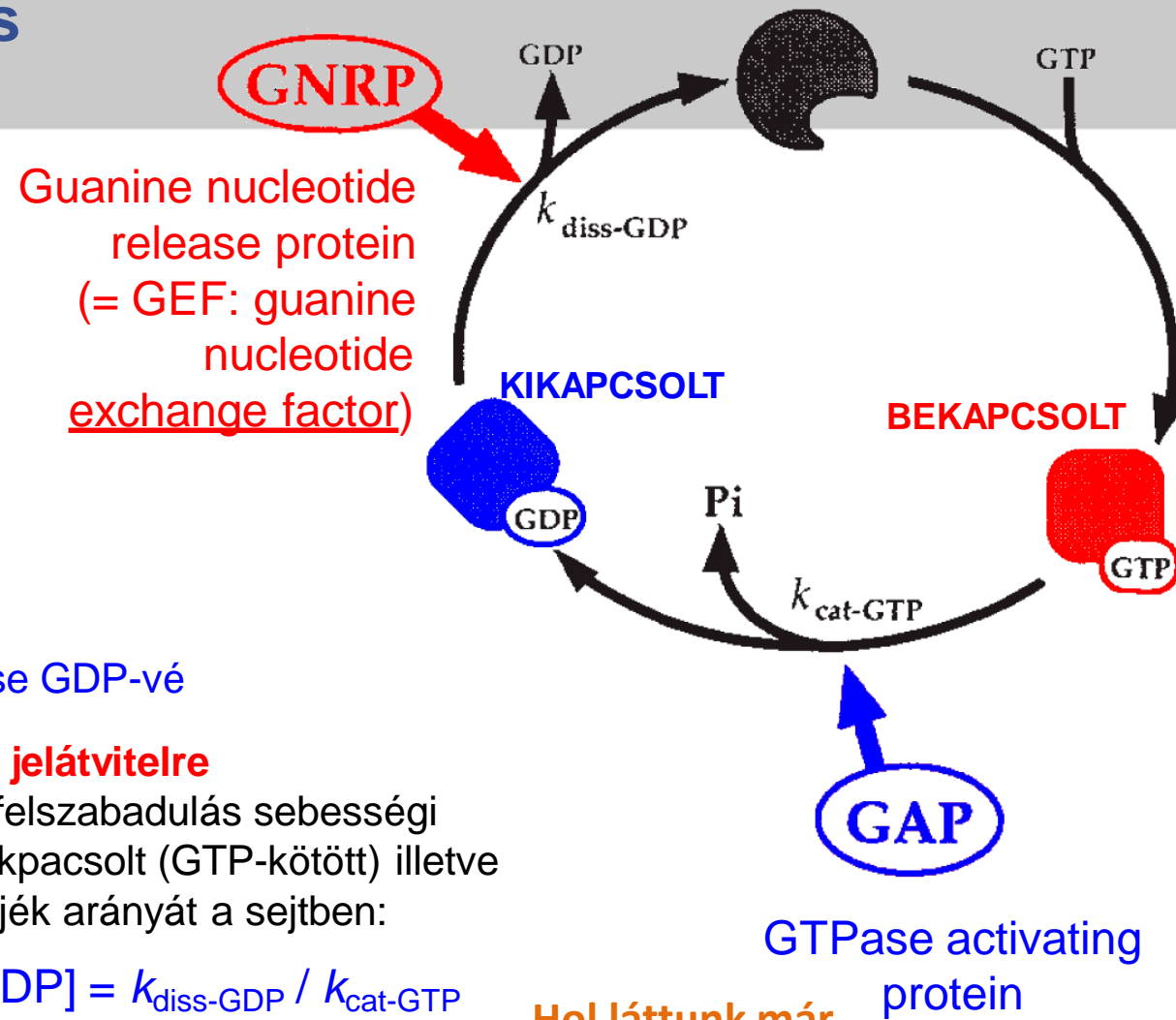
Az NTPáz doménmag topológiájának evolúciója

- Minden konzervált elem visszavezethető az „ős-NTPázra”
- A motoroknál főleg az N-terminuson, a G-fehérjéknél főleg a C-terminuson történtek inszerciók



Zöld: P-hurok (N1)
Lila: switch-1 (N2)
Kék: switch-2 (N3)
Sárga: konzervált β -szál

GTPáz enzimciklus



- Bekapcsolás: GTP-kötés
- Kikapcsolás: GTP hidrolízise GDP-vé

Az enzimműködés hatása a jelátvitelre

- A GTP hidrolízis és a GDP-felszabadulás sebességi állandói meghatározzák a bekapcsolt (GTP-kötött) illetve kikapcsolt (GDP-kötött) fehérjék arányát a sejtben:

$$[\text{GTPáz.GTP}] / [\text{GTPáz.GDP}] = k_{\text{diss-GDP}} / k_{\text{cat-GTP}}$$

Partnerfehérjék allosztérikus aktiváló hatása

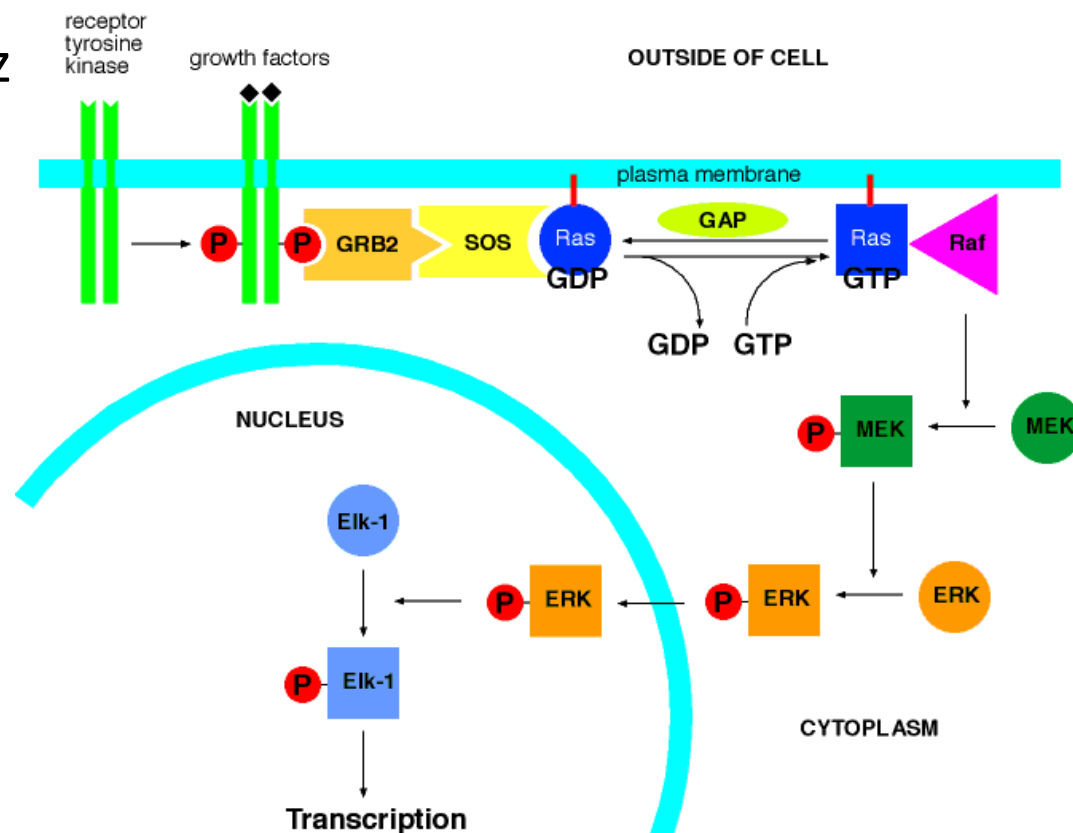
- GAP: GTP-hidrolízist aktiválja
- GNRP vagy GEF: GDP-felszabadulást aktiválja

Hol láttunk már
ilyesmit? (egyensúlyi
állandó és sebességi
állandók?)

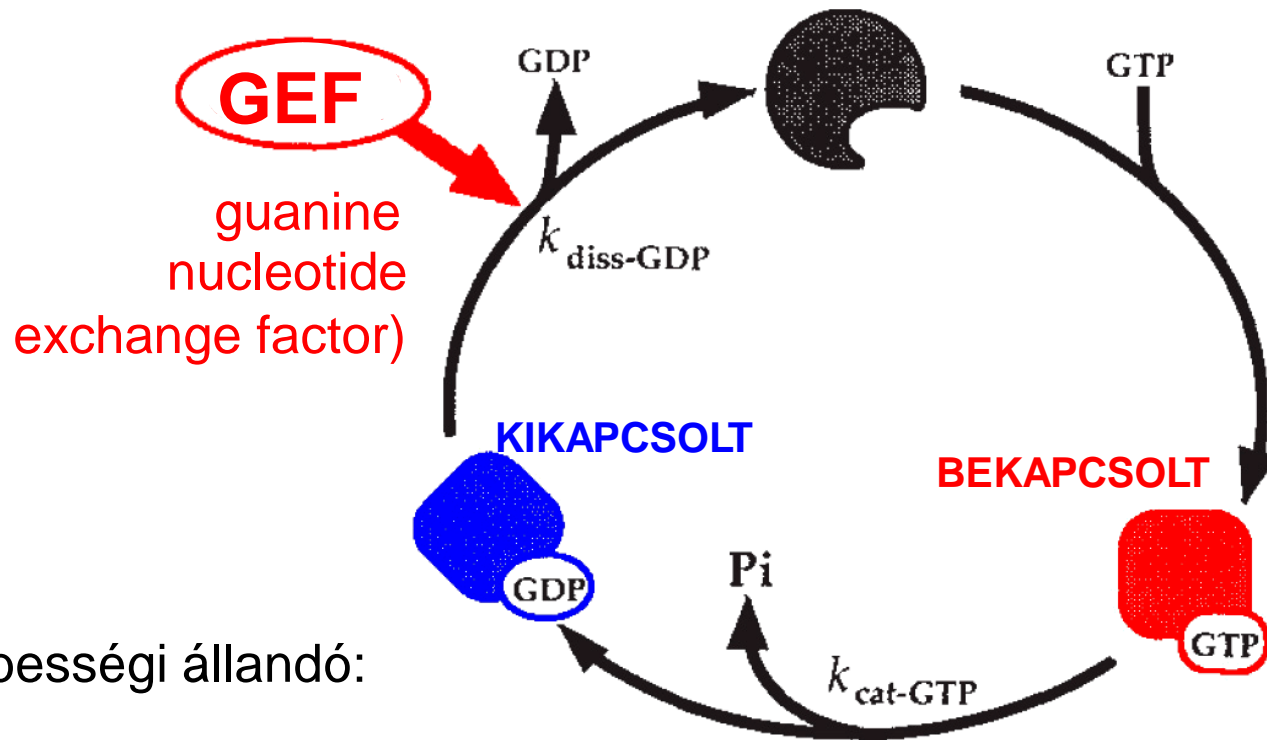
Bourne 1991

RAS fehérjék

- G proteinek családjába tartozó GTPáz fehérje
- A sejtmembrán belső oldalához rögzített (preniláció)
- Sejtnövekedést, sejtciklust, szabályozó jelátviteli folyamatok jeltovábbító molekulája
- Molekuláris kapcsoló: GTP-kapcsolt (aktív) és GDP-kapcsolt (inaktív) forma



G-fehérjék működése általános molekuláris mechanizmus



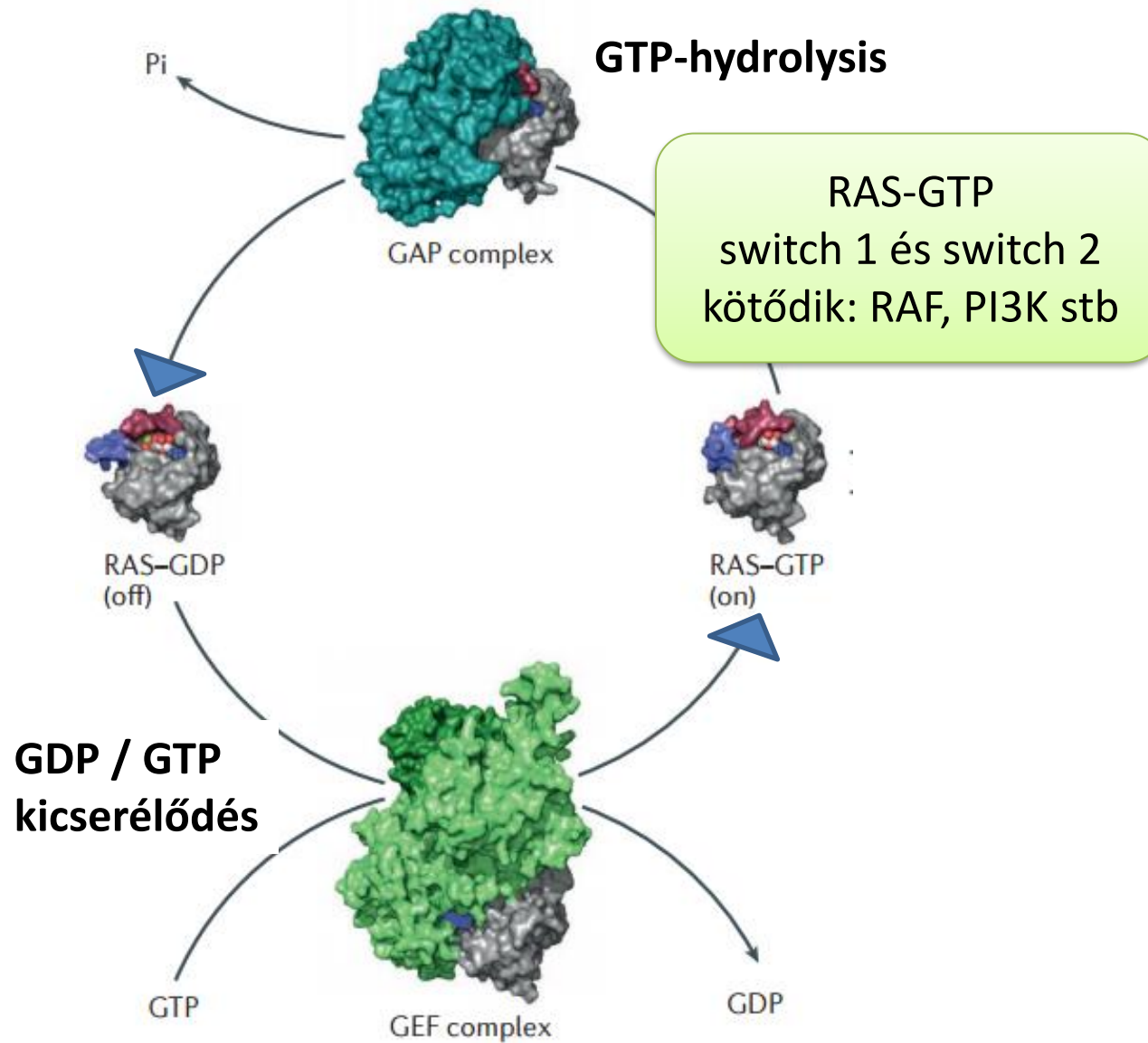
Két fontos sebességi állandó:

k_{cat} GAP-nélküli alapaktivitás NAGYON alacsony

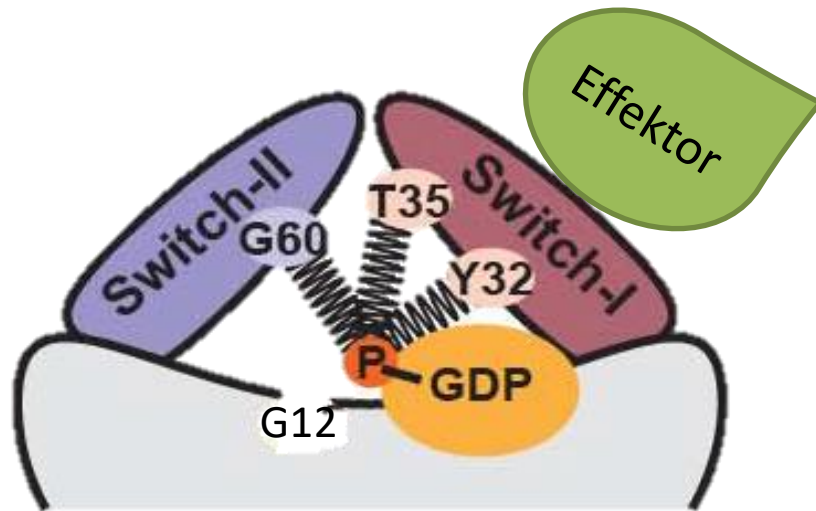
$k_{\text{diss-GDP}}$ GEF-nélküli csere NAGYON lassú

GTPase activating
protein

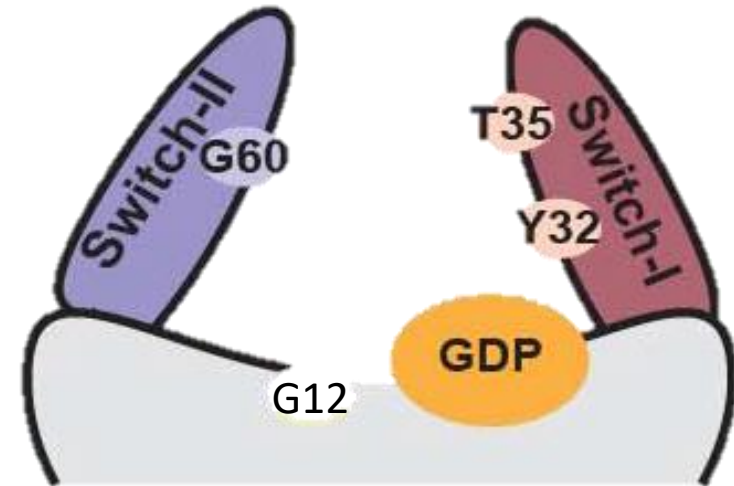
KRAS működése



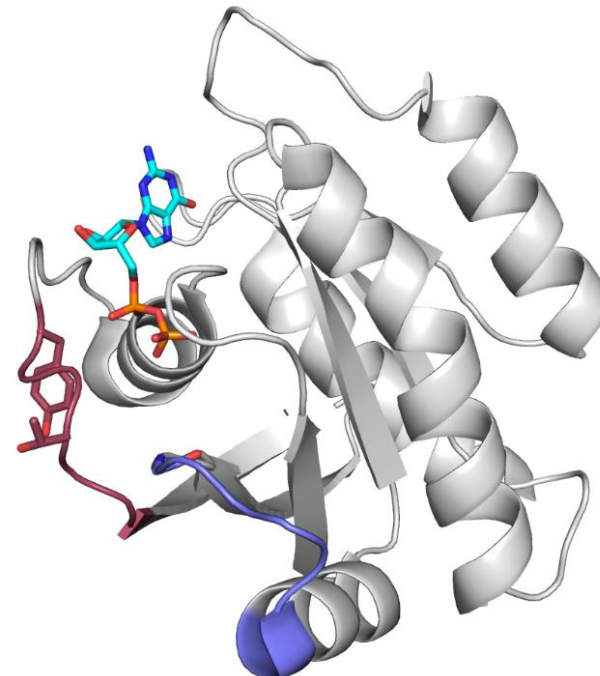
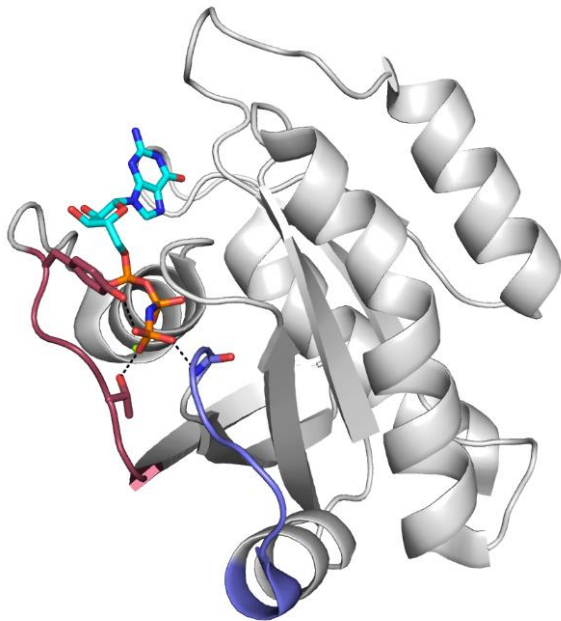
KRAS On / off



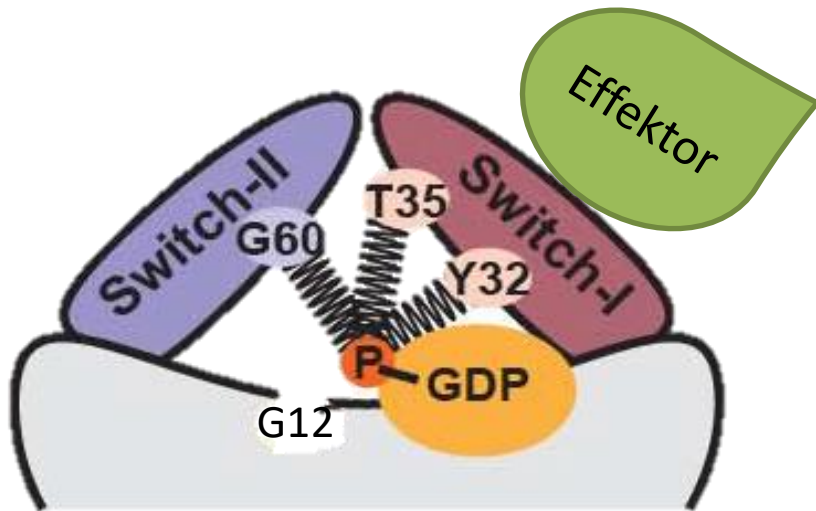
GTP (GDP-P) kötött (ON)



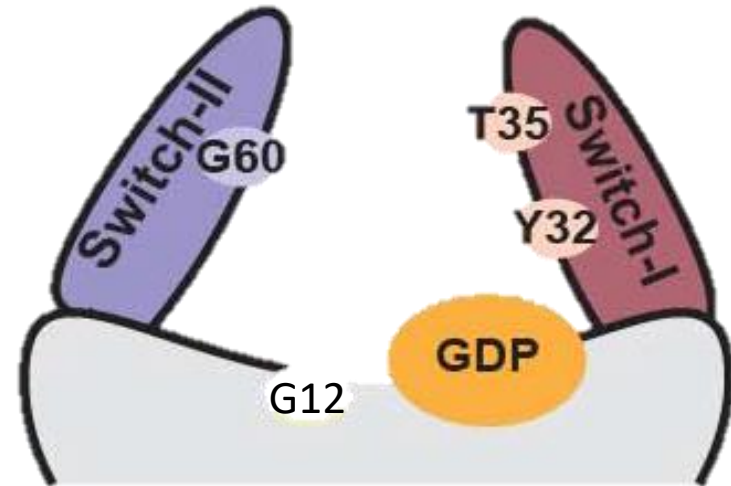
GDP kötött (OFF)



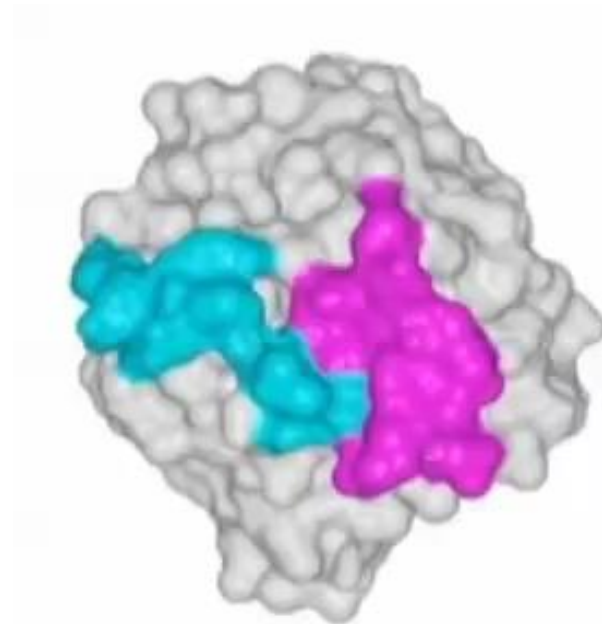
KRAS On / Off



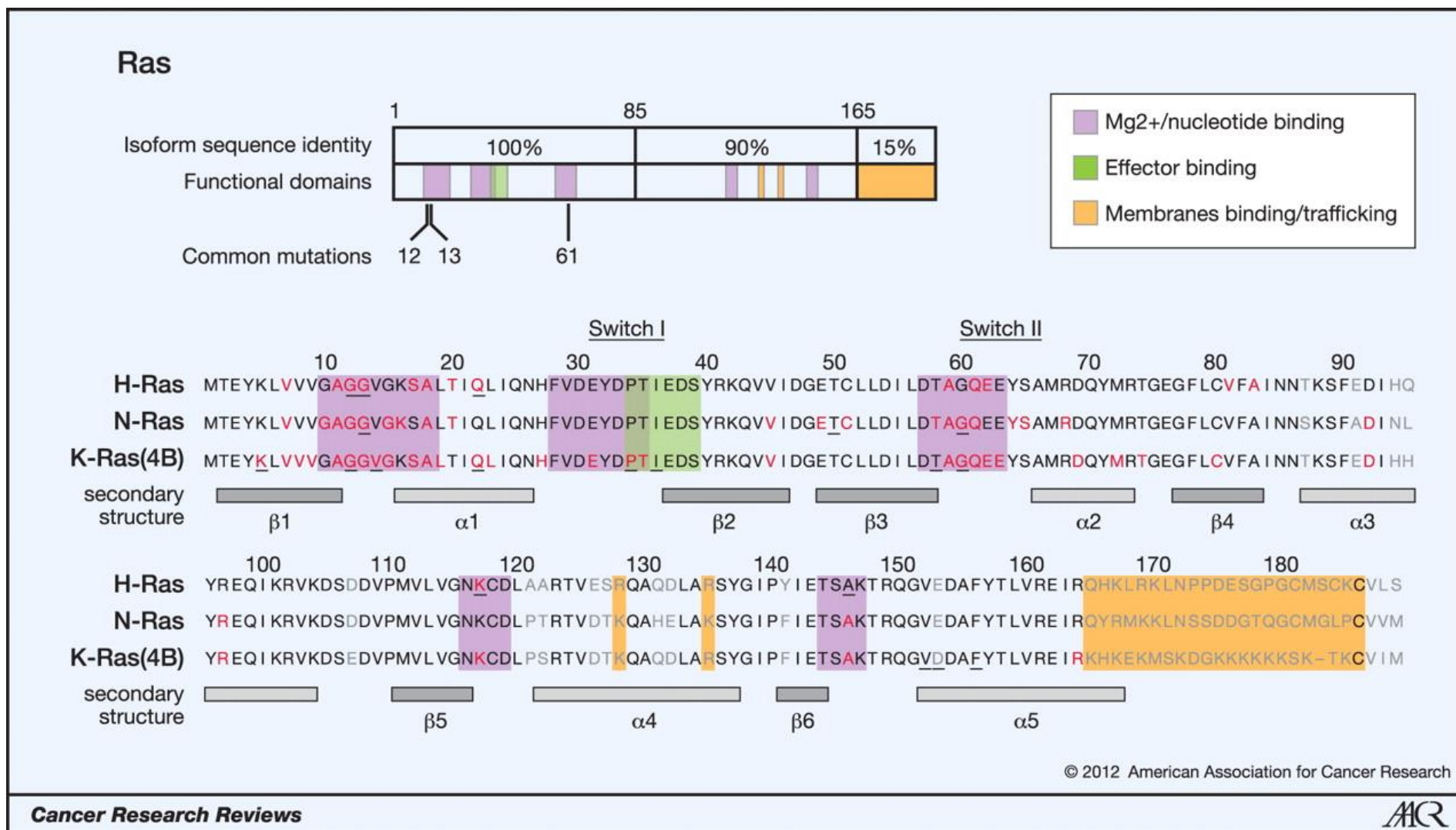
GTP (GDP-P) kötött (ON)



GDP kötött (OFF)



RAS Izoformák



- Cancer Res. 2012 May 15;72(10):2457-67. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-2612.
- A comprehensive survey of Ras mutations in cancer.
- Prior IA, Lewis PD, Mattos C.
- PMID: 22589270 PMCID: PMC3354961 DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-11-2612



G12 pozíció

KRAS izoformák: G12 – C, D, V



Switch I

Switch II

```

KRAS_4A MTEYKLVVVGAGGGVGVKSALTIQLIQNHVFVDEYDPTIEDSYRKQVVIDGETCLLDILDITAGQEEY
KRAS_4B MTEYKLVVVGAGGGVGVKSALTIQLIQNHVFVDEYDPTIEDSYRKQVVIDGETCLLDILDITAGQEEY
*****

```

```

KRAS_4A SAMRDQYMRTGEGFLCVFAINNTKSFEDIHHYREQIKRVKDSQDPMVPLVGNKCDLPSRTVDTK
KRAS_4B SAMRDQYMRTGEGFLCVFAINNTKSFEDIHHYREQIKRVKDSQDPMVPLVGNKCDLPSRTVDTK
*****

```

```

KRAS_4A QAQDLARSYGIPFIETSAKTRQREDAFYTLVREIRQYRLKKISKEEKTPGCVKIKKCIIM
KRAS_4B QAQDLARSYGIPFIETSAKTRQGVDAFYTLVREIRRKHKEKMSKDGKKKKKSKTKCVIM
*****

```



Nukleotid ill Mg²⁺ kötés

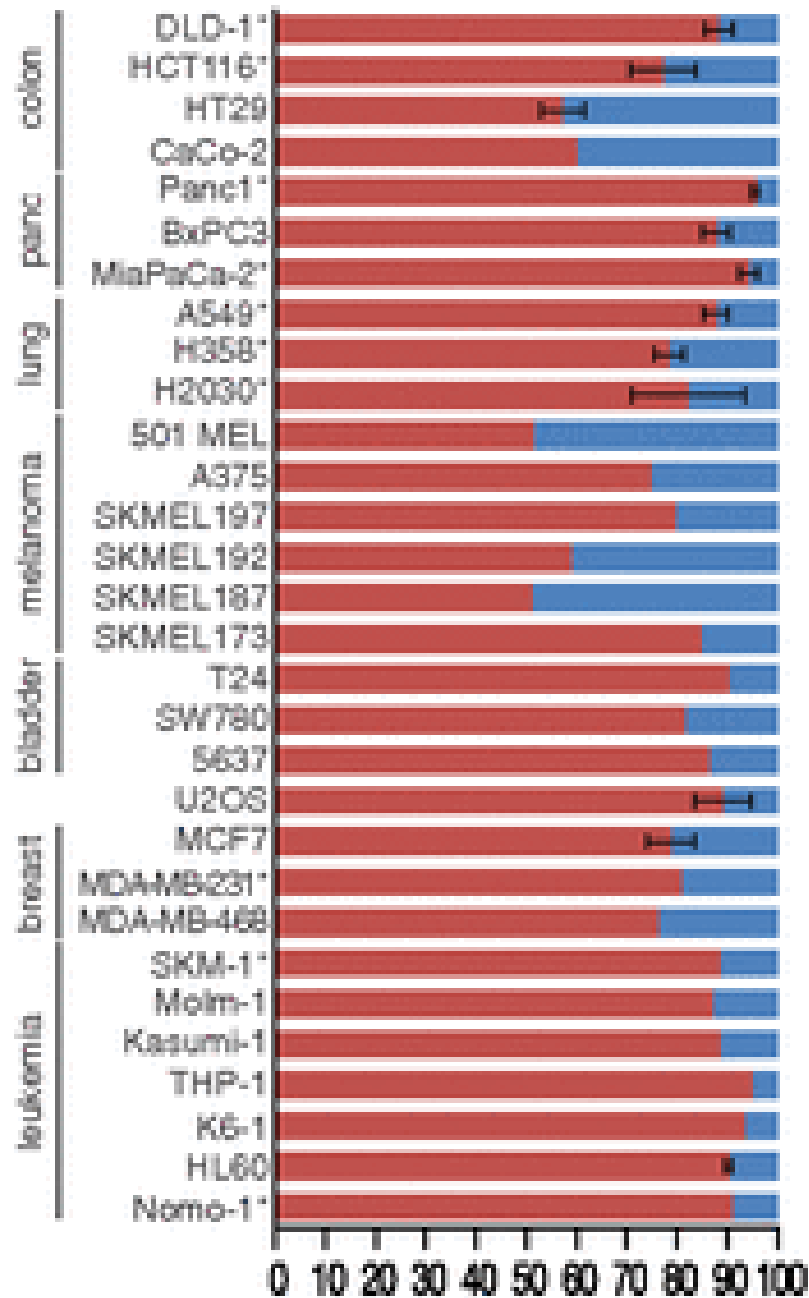


Membrán kötés ill transzport



Effektor kötés

Cancer Res. 2012 May 15;72(10):2457-67. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-2612.
A comprehensive survey of Ras mutations in cancer.
Prior IA, Lewis PD, Mattos C.
PMID: 22589270 PMCID: PMC3354961 DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-11-2612
Alapján sk.

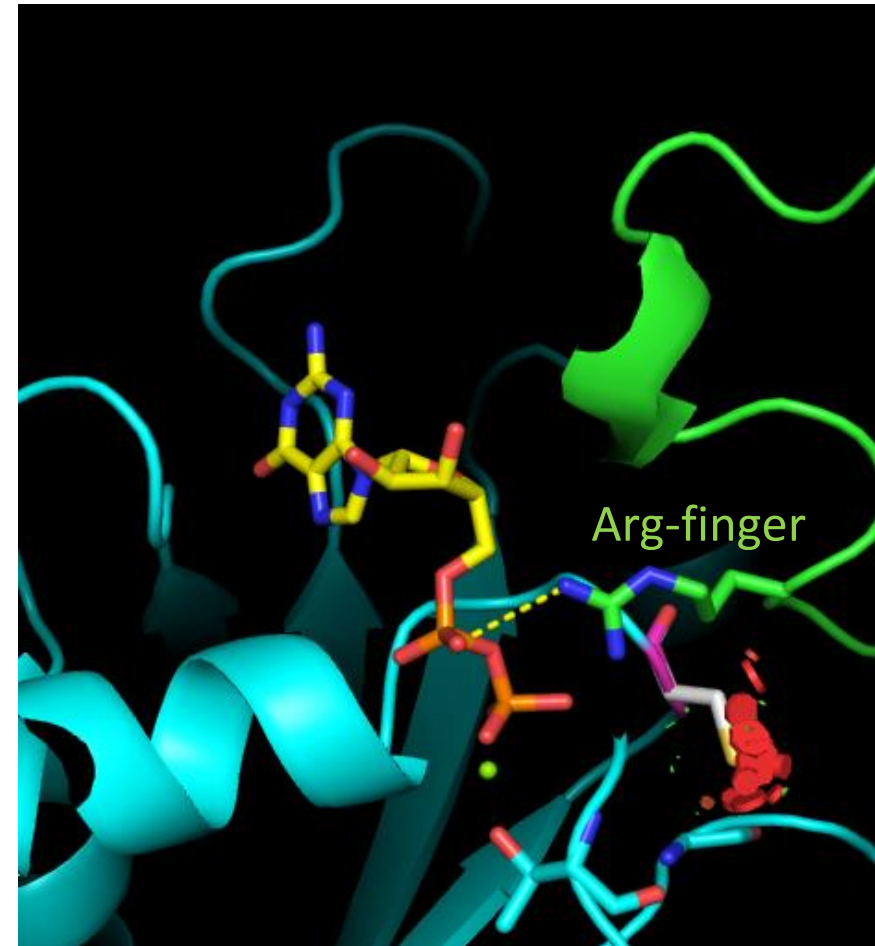
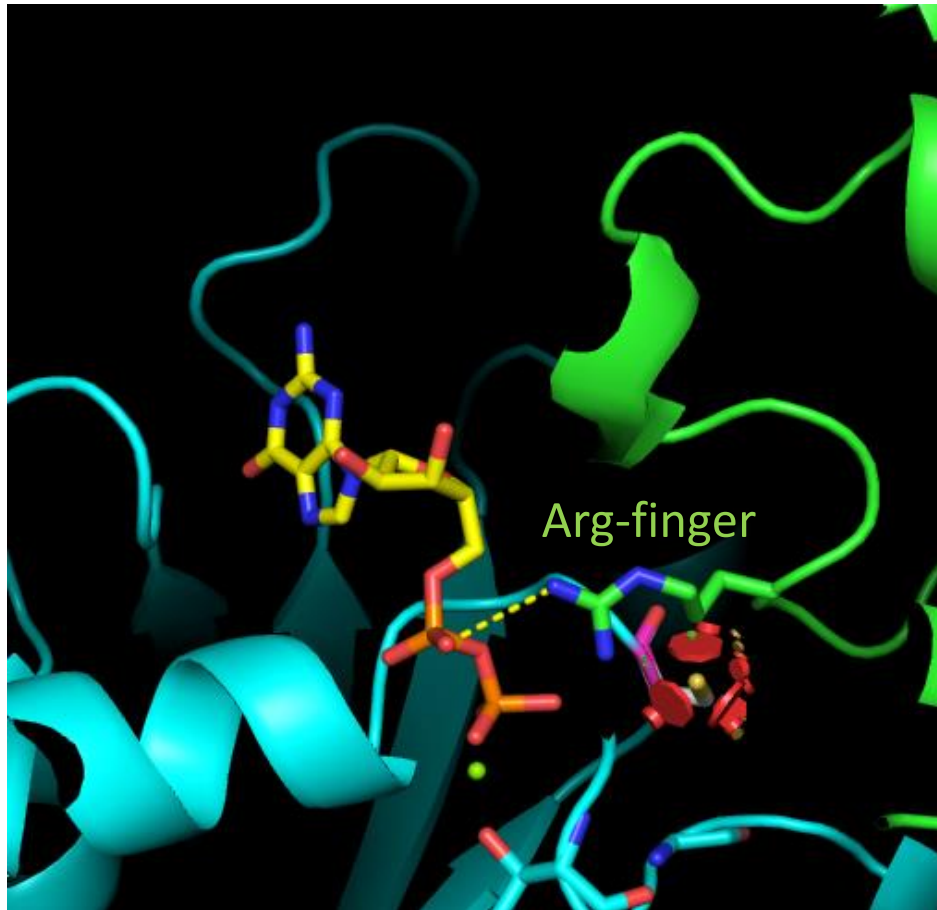


■ K-Ras4B ■ K-Ras4A

Izoformák előfordulási gyakorisága különböző tumorokban

- Proc Natl Acad Sci U S A. 2015 Jan 20;112(3):779-84. doi: 10.1073/pnas.1412811112. Epub 2015 Jan 5.
- K-Ras4A splice variant is widely expressed in cancer and uses a hybrid membrane-targeting motif.
- Tsai FD, Lopes MS, Zhou M, Court H, Ponce O, Fiordalisi JJ, Gierut JJ, Cox AD, Haigis KM, Philips MR.
- PMID: 25561545 PMCID: PMC4311840 DOI: 10.1073/pnas.1412811112

C12 mutáció RAS-GAP szerkezetre



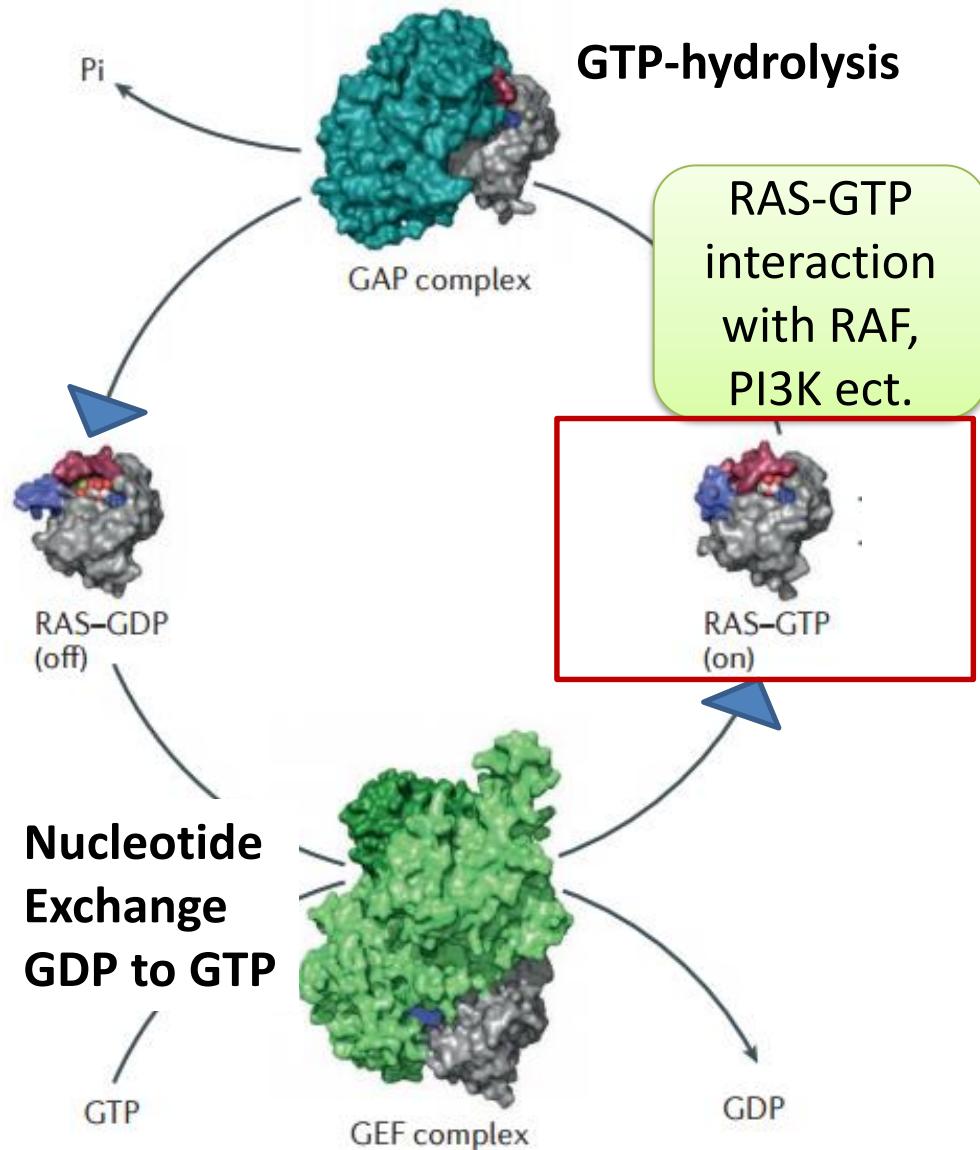
G12 pozíció a RAS fehérjében

Cisztein mutáns (mindkét konformer) –

piros korongok szterikus ütközés GAP-pal

Bármilyen, ami glicinnel nagyobb, ugyanezt fogja eredményezni

KRAS működése és a G12 mutáció hatása



A GTP foszfátot koordináló P-loopban lévő G12-es pozíciójának mutációja



KRas-GAP kölcsönhatás sztérikus gátlás következtében nem tud létre jönni

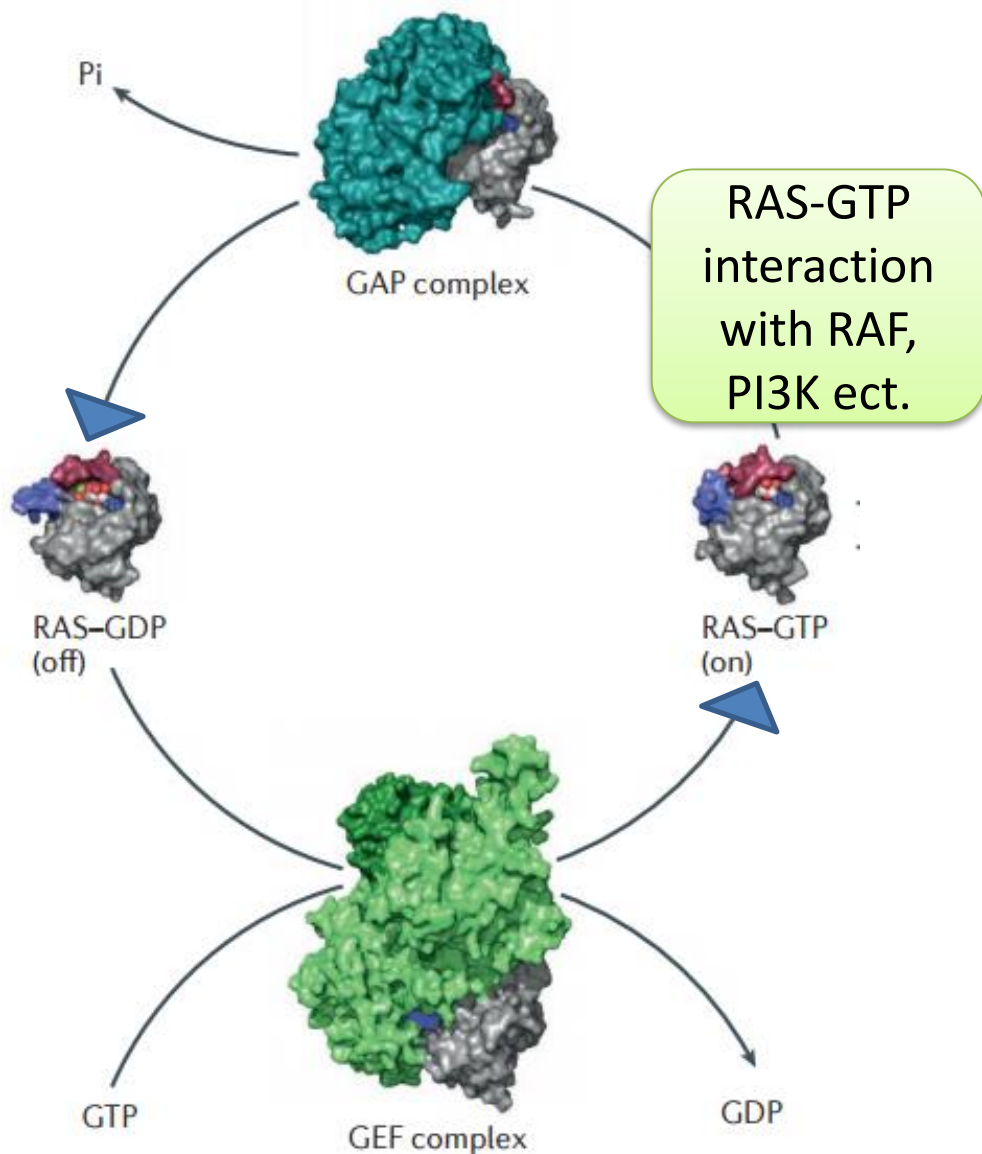


jelentősen csökken a GTP hidrolízis sebessége, mivel nincs ott a GAP reakciót elősegítő Arg-fingere.



A kapcsoló bekapcsolt állapotban marad onkogén transzformáció

KRAS-inhibitor tervezési stratégiák



1) Az allosztérikus inhibitorok, melyek gátolják az effektor kötődést a rendszer sajátosságai miatt nem kecsegtet sikerrel.

(flexibilis kötőhely, és a nagy felületen bekötődő fehérje partnerrel nehezen konkurrál egy kis molekula, ráadásul mivel allosztérikus nehezen lehet mutáns-specifikus)

2) a GTP-t nem lehet kiszorítani mert nagyon kicsi a K_d -ja,

A GDP kötött Ras lesz tehát a target, ezért olyan mutánst kell vizsgálni aminek van GTPáz aktivitása (G12C közel wt aktivitás, G12D csökkent aktivitás, G12V praktikusán inaktív?)

3) G12C-re kovalens inhibitor ARS853
GDP kötött Ras-t stabilizálja

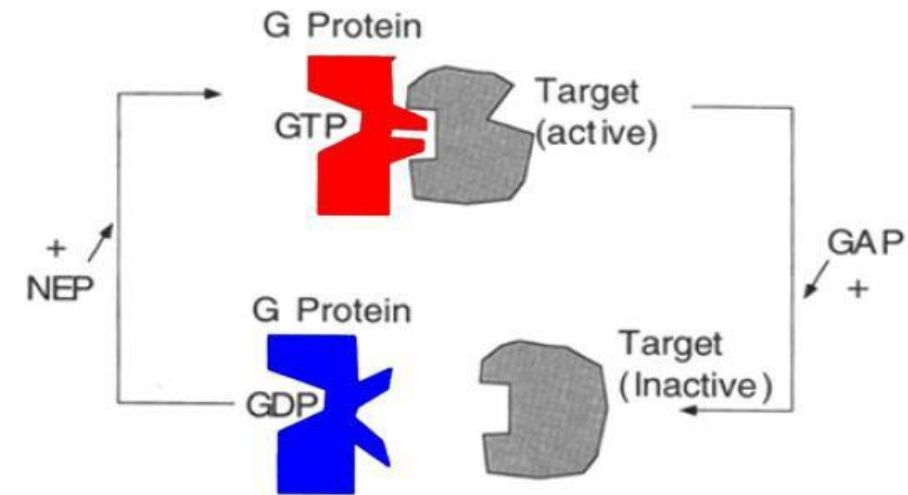
IC_{50} ARS853 kb $1 \mu M$

Lenne itt még mit javítani!

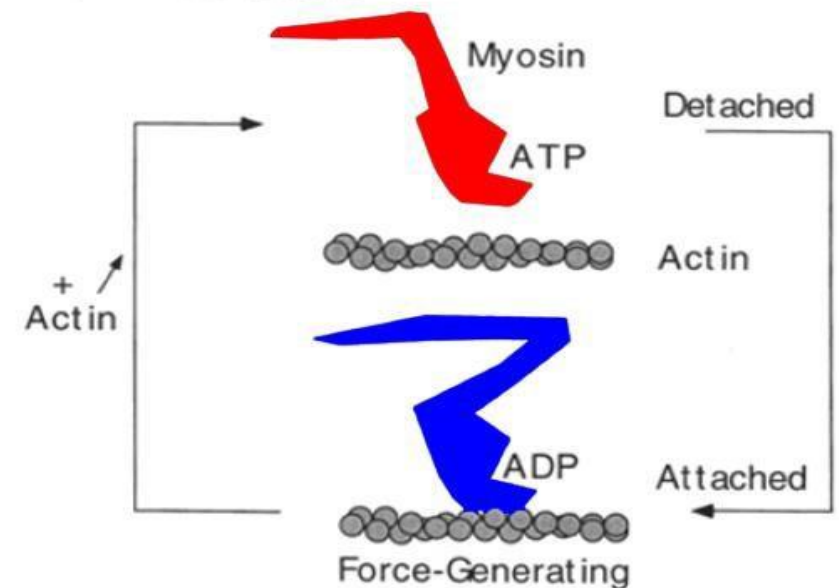
Motor és G-fehérje aktivátorok

Transition	1	2	3
Protein-NTP	→	Protein-NDP-Pi	→ Protein + NDP
		Rate (sec ⁻¹)	
Transition	Ras	Myosin	Kinesin
1. Bond cleavage			
- GAP/Polymer	0.0003	50-100	9
+ GAP/Polymer	15	30	100
2. Phosphate release			
- GAP/Polymer	-	0.1	>9
+ GAP/Polymer	<100	20-80	13
3. NDP release			
- NEP/Polymer	0.0004	1	0.01
+ NEP/Polymer	0.8	300-500	40

G Proteins



Motor Proteins



GAP és NEP (aka GEF, GNRP) hatása:
NAGYSÁGRENDEK!

$$\frac{[GTPáz.GTP]}{[GTPáz.GDP]} = k_{diss-GDP} / k_{cat-GTP}$$

G-fehérje ciklus szabályozása

- Bazális (*intrinsic*, „aktiválatlan”) sebességi állandók (GTP-hidrolízis, GDP-felszabadulás) nagyon alacsonyak ($< 0.001/s$)
- GTP ill GDP-affinitás ($10^7 - 10^{11} /M$) sokkal magasabb, mint a sejtbeli nukleotid koncentráció ($> 10^{-4} M$)
 - A rendszer a nukleotid-koncentráció változására nem érzékeny
 - A működés központi eleme a szabályozott (időzített) nukleotid-kicserélődés
- A ciklus „egyenirányításának (GDP-GTP kicserélődés) mechanizmusai GTP-
 - felesleg
 - Nagyobb affinitás GTP-hez, mint GDP-hez
 - További kötőpartnerek kapcsolódása

A GNRP hármass (terner) komplexben fejt ki hatását

Általános NTPáz (X)

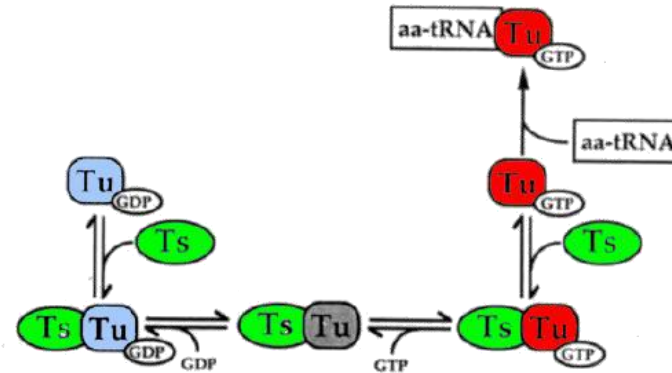
- inaktív (GDP-kötött) forma
- aktív (GTP-kötött) forma
- GNRP



Általános séma

EF-Tu translációs elongációs faktor

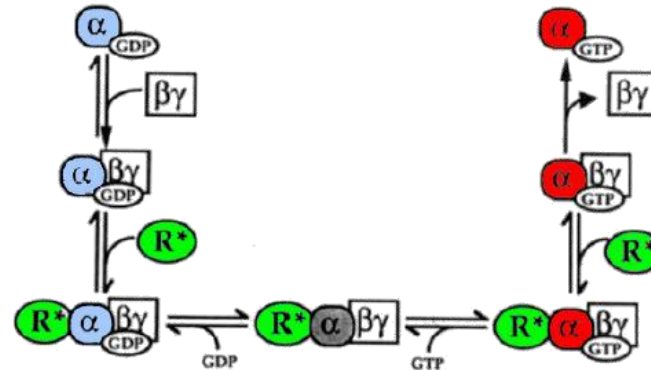
- **EF-Ts**: konstitutív (nem-regulált) **GNRP**
 - GDP-GTP kicserélődést felgyorsítja → hatékony fehérjeszintézis
- *Aminoacil-tRNS*: a GDP-GTP kicserélődés hatékonyságát növeli
 - Erősen köt EF-Tu.GTP-hez (EF-Tu.GDP-hez nem)
 - A reakciót a GDP-GTP kicserélődés felé hajtja, annak ellenére, hogy az EF-Tu GDP-affinitása nagyobb, mint GTP-affinitása
- Nem minden EF igényel GNRP-t (pl. EF-G: peptidil-tRNS A-P transzlokációja) → komplex szabályozás



Fehérjeszintézis

Heterotrimer jelátvivő fehérje α-alegysége

- **R***: **hormonreceptor (GNRP)**
- βγ alegységek: a GDP-GTP kicserélődés hatékonyságát növelik
 - Receptor kötődéshez előzőleg kötniük kell a βγ alegységeknek az α.GDP-hez
 - α.GTP-ről a βγ alegységek gyorsan disszociálnak

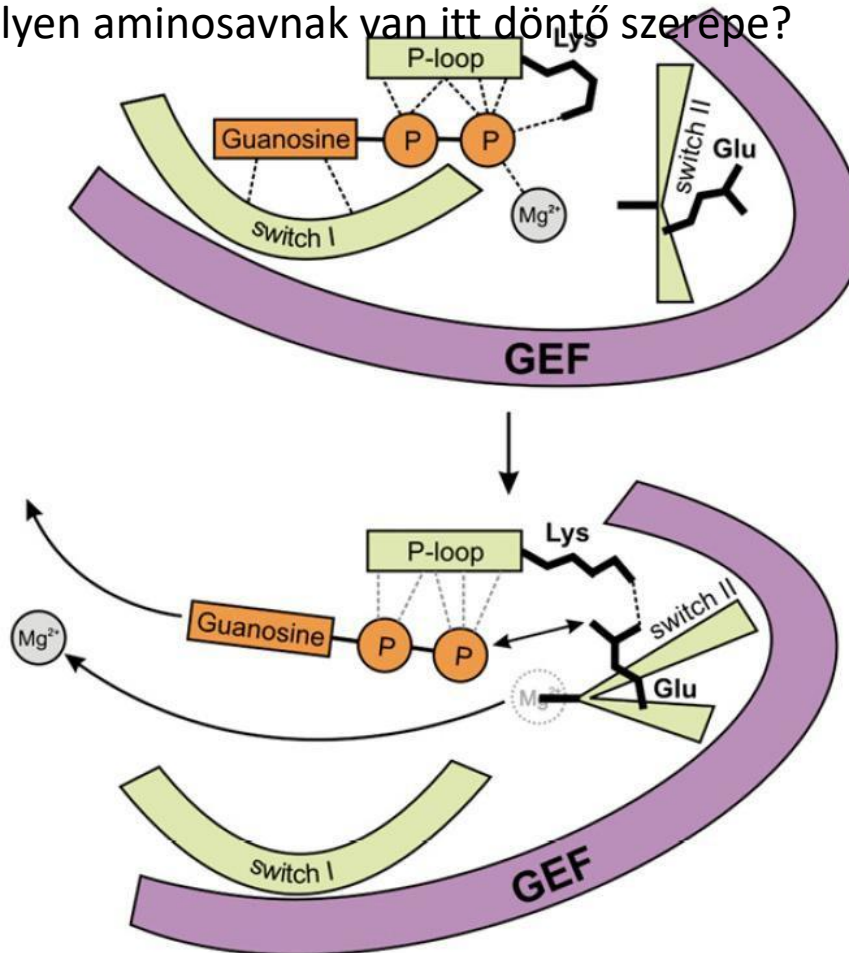


Jelátvitel heterotrimer

A GEF-aktivált nukleotid-kicserélődés általános mechanizmusa

A GEF a switch-1 és switch-2 átrendeződését indukálja → Mg-disszociáció → nukleotid-kicserélődés

Milyen aminosavnak van itt döntő szerepe?

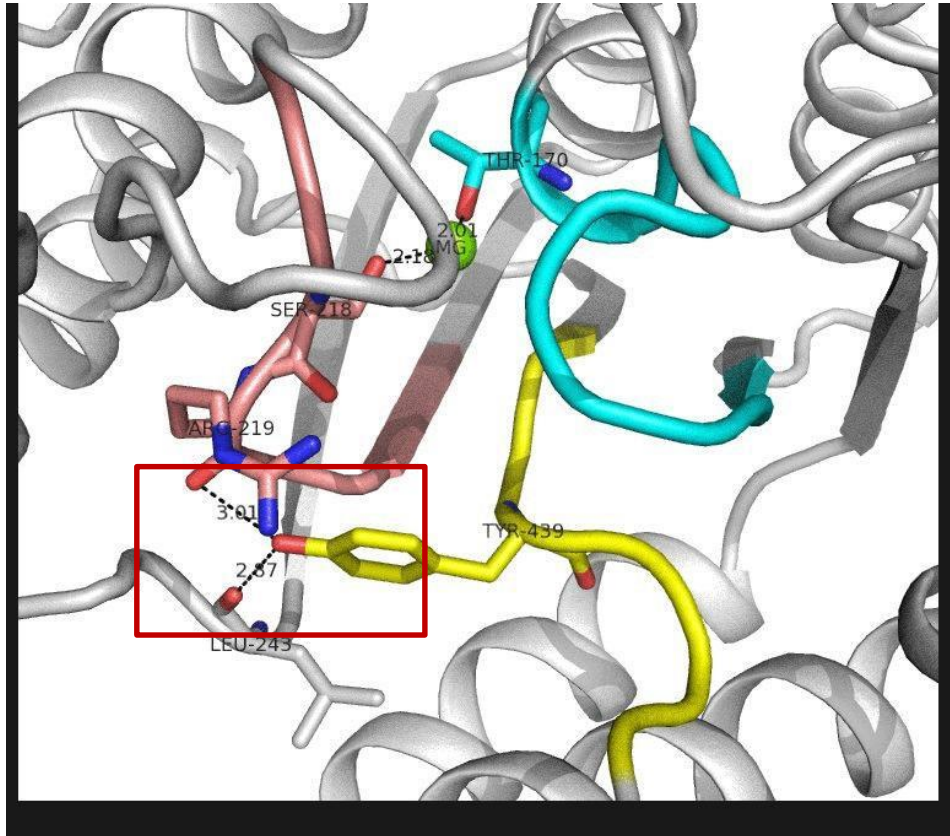


P-loop és switch 2 NEM kapcsolódik

P-loop és switch 2 kapcsolódik, így a P-loop már nem köti erősen a GDP-t

Thomas 2007

Aktin-indukált Mg-nukleotid-kicserélődés miozinban



Kék: P-hurok
Rózsaszín: switch-1
Sárga: switch-2

Switch 1 és
switch 2
kapcsolódik, így a
P-loop már nem köti
erősen a GDP-t

Kovács 2010

Termodinamikai kapcsoltság

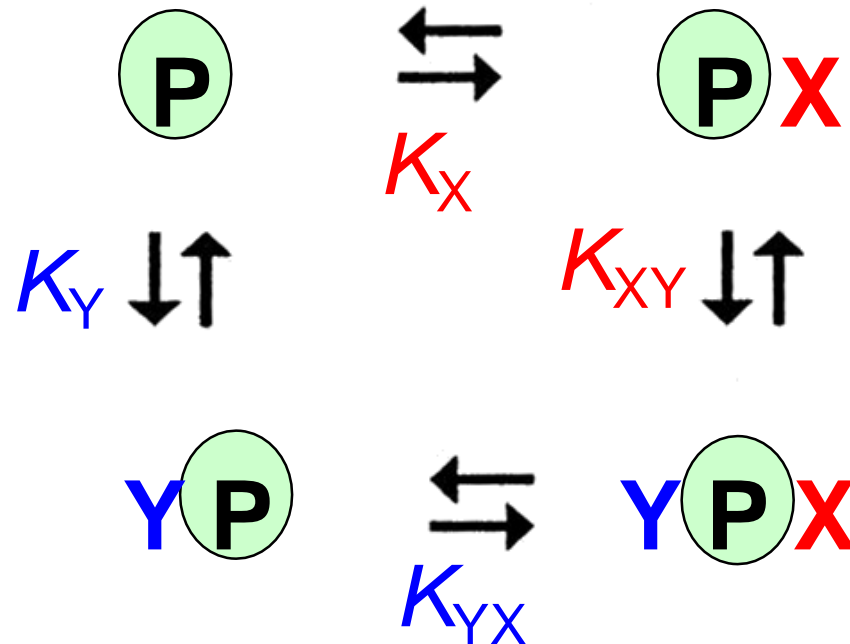
Két ligandum (X, Y) allosztérikus kötődése ugyanazon célfehérjéhez (P)

Energiaváltozás útvonal-függetlensége miatt:

$$K_X * K_{XY} = K_Y * K_{YX}$$

azaz

$$K_X / K_{YX} = K_Y / K_{XY}$$



Mindegy, melyik úton megyünk, ugyanoda jutunk,
így a ciklus teljes deltaG-je ugyanaz lesz

Termodinamikai kapcsoltság

Nincs kapcsoltság:

$$K_X / K_{YX} = K_Y / K_{XY} = 1$$

A két ligandum nem befolyásolja egymás kötődését

Pozitív kapcsoltság:

$$K_X / K_{YX} = K_Y / K_{XY} < 1$$

(asszociációs állandók!)

X kötődése erősíti Y kötődését
(és fordítva!)

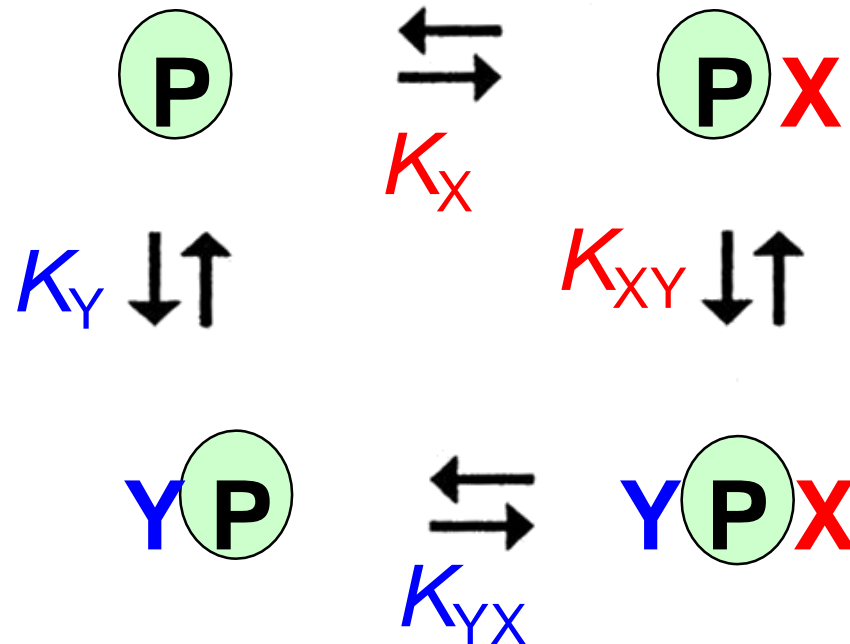
Negatív kapcsoltság:

$$K_X / K_{YX} = K_Y / K_{XY} > 1$$

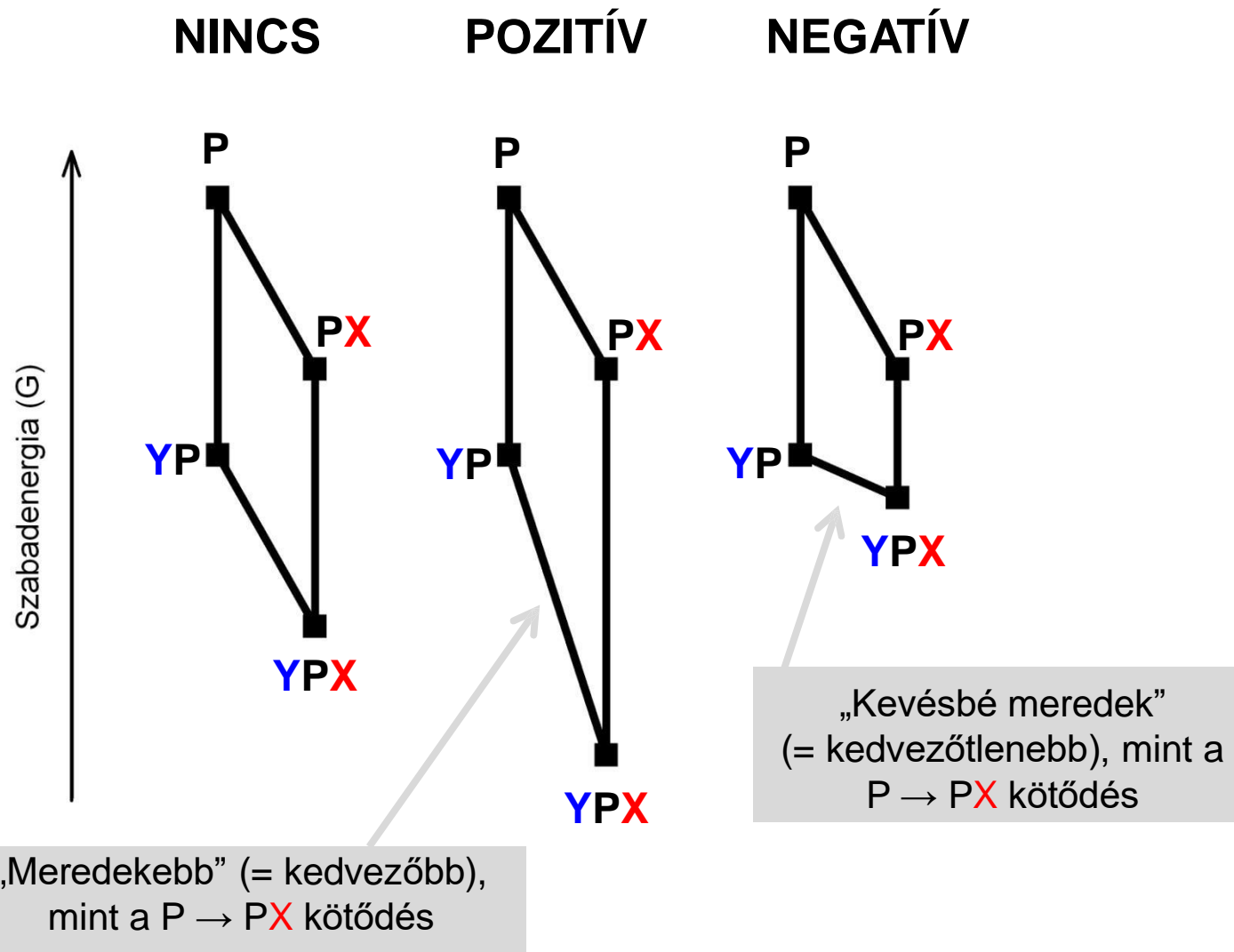
(asszociációs állandók!)

X kötődése gyengíti Y kötődését
(és fordítva!)

Két ligandum (X, Y) allosztérikus kötődése ugyanazon célfehérjéhez (P)



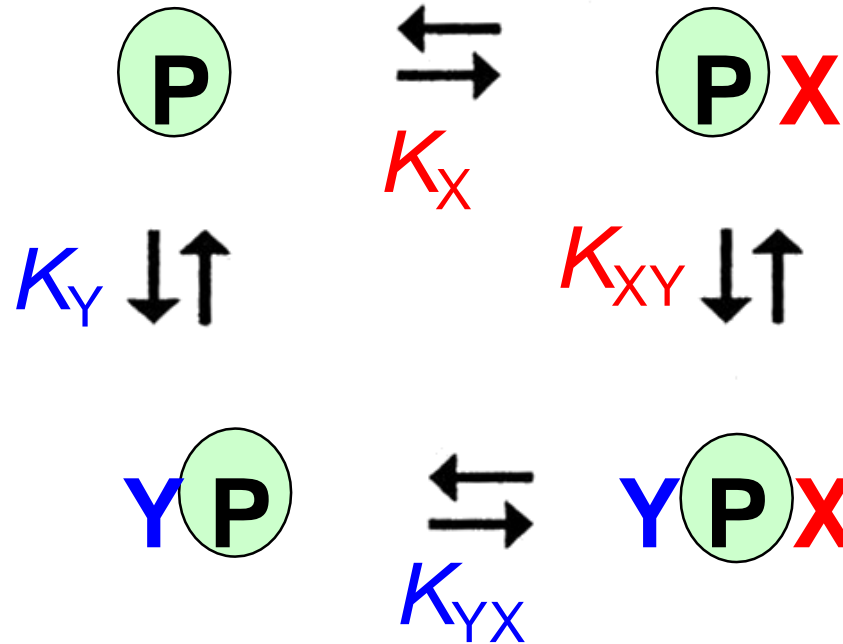
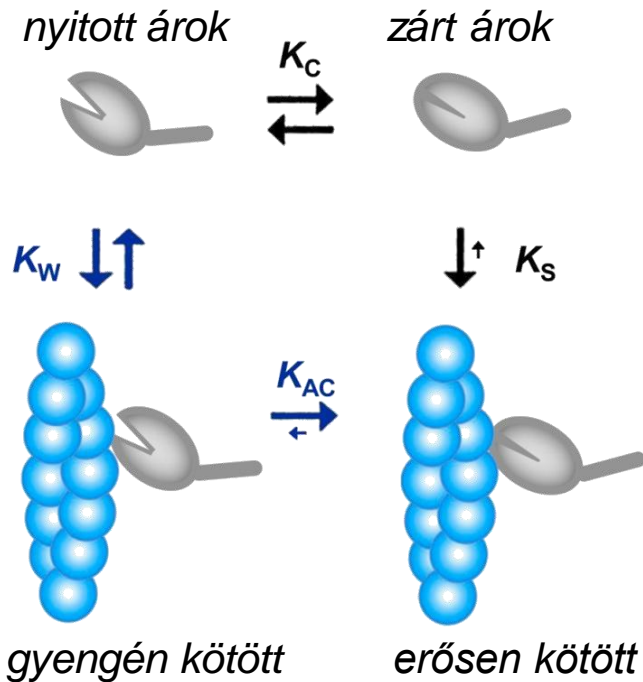
Termodinamikai kapcsoltság



Termodinamikai kapcsoltság

MEGJEGYZÉSEK

- Ha X és Y azonos: kapcsoltság = kooperativitás (nincs, negatív, pozitív)
- K_X -nek és K_Y -nak nem kell feltétlenül kötődéssel járnia (elsőrendű szerkezetváltozás is lehet, pl. miozin aktinkötése esetén, ld lent)



Házi feladatban
Ras-sal kell
majd foglalkozni