

Az onkogén KRas fehérjék kölcsönhatásainak vizsgálata

EMÖDI Nikolett^{a*}, Dr. NYÍRI Kinga^{a,b} és Dr. VÉRTESSY G. Beáta^{a,b}

^aBudapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem, Vegyészmérnöki és Biomérnöki Kar, Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudományi Tanszék, Műegyetem rkp. 3., 1111 Budapest, Magyarország

^bHUN-REN TTK, Molekuláris Élettudományi Intézet, Magyar tudósok körútja 2., 1117 Budapest, Magyarország

1. Bevezetés

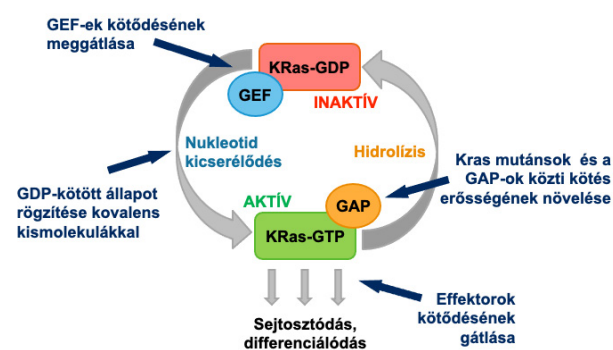
Az első humán onkogén Ras géneket, mint a *KRAS* (Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog) több, mint negyven éve fedezték fel a daganatokban.¹ Ezzel kezdetét vette egy napjainkban is töretlenül zajló kutatás, hiszen a *KRAS* mutációt hordozó daganatos megbetegedések kezelése még továbbra sem megoldott. A KRas fehérjét célzó rákterápiás módszerek fejlesztése nagy jelentőséggel bír, mivel a *KRAS* mutációja a rosszindulatú daganatos megbetegedések közel 14%-ának okozója, főként a hasnyálmirigyet, a vastagbelet és a tüdőt érinti. A KRas fehérje leggyakoribb mutációja (nagyjából a módosulások 78%-a) a 12. glicin cseréje, ezek közül is leggyakrabban ezen aminosav aszparaginsavra (KRas G12D) vagy ciszteinre (KRas G12C) való mutációja.²

A KRas fehérje a kis G-fehérjék családjának a tagja és központi szerepet tölt be a jelátviteli útvonalak szabályozásában, mint például a MAPK és PI3K szignálút, ezáltal hatással van a sejtbioológiai folyamatok döntő többségére, főként a sejtek proliferációs és túlélési folyamatainak irányítására.³ A KRas bináris kapcsolóként szabályoz, a GTP megkötésével a fehérje aktív állapotba kerül, ezáltal képes a jel továbbításra, majd guanozin-trifoszfát (GTPáz) aktivitása folytán a GTP-t GDP-vé hidrolizálja és így inaktívulódik.⁴

A kis GTPáz fehérjék intrinzik GTP hidrolízise azonban egy lassú folyamat, emellett disszociációs állandójuk alacsony, amely azt eredményezi, hogy a fehérjék majdnem mindig nukleotid-kötött állapotban vannak jelen a sejtben. A sejtben regulátorok (segédfehérjék) a Ras fehérjékhez kapcsolódva segítik a hidrolízist, illetve a nukleotid kicserélődést (1. Ábra). A GAP-ok, azaz GTPáz aktiváló fehérjék a KRas aktív centrumán belül a szubsztrát megfelelő koordinálásával a GTP hidrolízis sebességét öt nagyságrenddel képesek megnövelni. A GEF-ek (guanine exchange factor) segítik a GDP-GTP kicserélődést, azaz az aktív állapot elérését.^{4,5}

A KRas fehérje aktív centrumában történt mutáció (G12D és G12C) hatására azonban a GAP-ok nem tudják kifejteni reakciósebesség növelő hatásukat, ezáltal a fehérje GTP-kötött állapotban marad, amely kontrollálatlan sejtosztódáshoz, így daganatos megbetegedések kialakulásához vezet.^{5,6}

A mutáns KRas fehérjék általi hibás jelátvitel helyreállítására több megközelítést alkalmaznak (1. Ábra): a GEF-ek bekötődésének akadályozásával gátolható a GDP-GTP kicserélődés okozta aktiválás, kovalens kismolekulákkal a KRas GDP-kötött állapotban rögzíthető, az effektorok kötődésének gátlásával megszakítható a további jelátvitel és végül megoldást jelenthet, ha a GAP fehérjék mutáns KRas-hoz való kötődését erősítik, ami által a GAP-ok aktiváló hatása megfelelő módon érvényesülhet.^{6,7}



1. Ábra. A KRas fehérje mutációja okozta hibás jelátvitel helyreállításának megközelítései.

Az *in silico* modellezések, mint például a QM/MM (quantum mechanics/molecular mechanics) módszerrel együttműködő partnerünk a GAP fehérje 190 különböző, pontmutánsát vizsgálta, hogy azok képesek-e a G12D és G12C mutáns KRas fehérjét hatékonyan aktiválni. A QM/MM modellezés révén a GAP-katalizálta hidrolízisre egy új mechanizmust javasoltak és azonosították a csökkent enzimaktivitást helyreállítani képes legígéretesebb GAP mutánsokat is (R903 és L902 mutánsok).⁸

Az RGS (regulator of G protein signaling protein) fehérjék szerepe a kis GTPáz-ok által szabályozott jelátvitel gyors leállításában van. Az RGS3 fehérjéről egy KRas G12C inhibitorokat vizsgáló tanulmány során derült ki, hogy mutáns KRas-okat is képes aktiválni. A Ras-GAP-okkal ellentétben nem rendelkezik a katalitikus arginin-ujjal, hanem feltehetőleg egy aszparagin segíti a hidrolízis aktivációját. A fehérje két RGS-GAP domént tartalmazó izoformáját vizsgálták, egy nagyobb, 75 kDa nagyságú és egy kisebb, 25 kDa nagyságú variánst. Azt találták, hogy ezek a legy-

* Főszerező: Email: nikolettemodi@edu.bme.hu

gyakrabban előforduló G12 mutáns KRas fehérjék esetében (G12D és G12C) jelentős aktivációra képesek a Ras-GAP-okhoz képest. Azonban hatékonyságuk vad típusú KRas esetében néhány nagyságrenddel elmarad a Ras-GAP-okétól.⁹ Az RGS3 fehérje ezen tulajdonsága kihasználható lehet Ras mutánsokat célzó terápiában.

Kutatásunk céljából tűztük ki, hogy a gyakorlatban is próbára tegyük a kollaboráció keretein belül *in silico* QM/MM modellezéssel tervezett GAP variánsokat és az RGS3 fehérjét. Ezek az ismeretek inspirálhatják új gyógyszerek kifejlesztését, innovatív megközelítések születését, ezzel egy alternatív módszert biztosítva az onkogén KRas mutációk kezelésére.

2. Eredmények

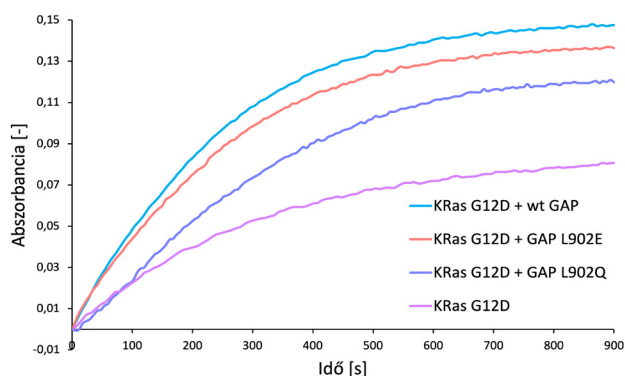
A KRas és GAP fehérjék kölcsönhatásának vizsgálatához a vad típusú fehérjéket, illetve azok mutánsait bakteriális expresszióval állítottuk elő és affinitás kromatográfiás módszerrel tiszta formában izoláltuk.

1. Táblázat. Az előállított fehérjék összegzése.

KRas fehérjék	GAP fehérjék	RGS3 fehérjék
wt KRas, KRas G12D, KRas G12C, wt KRas-AviTag, KRas G12D-AviTag, KRas G12C-AviTag	wt GAP, GAP mutánsok: R903A, R903D, R903E, R903Q, L902D, L902E, L902Q,	RGS3 RGS3-AviTag

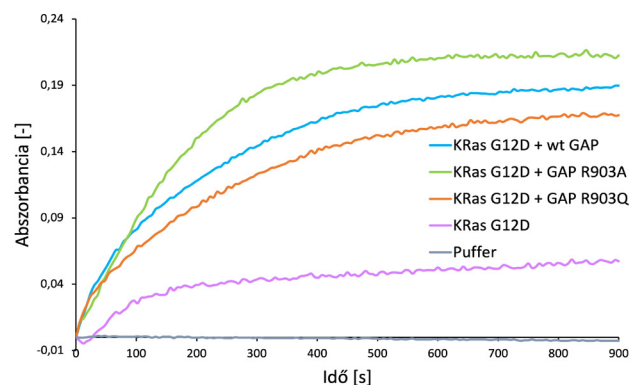
2.1. A GAP variánsok KRas aktiválása gyakorolt hatásának vizsgálata MESG-PNP foszfát esszével

MESG-PNP foszfát esszé segítségével enzimaktivitás vizsgálatokat végeztünk. Először azt elemeztük, hogy a különböző KRas mutációk miként hatnak a vad típusú GAP katalizálta GTP hidrolízisre. Vad típusú fehérjék esetén a reakció gyorsan lezajlott, azonban az aktív centrumban mutálódott KRas fehérjék esetén a hidrolízis sebessége jelentősen csökkent.



2. Ábra. A KRas G12D fehérje és a GAP L902E és L902Q variánsok kölcsönhatásának hidrolízisre gyakorolt hatása MESG-PNP foszfát esszével mérve.

Ezt követően megvizsgáltuk, hogy a GAP-ok 902. lizin aminosavat érintő mutációja (L902E és L902Q) miként hat a KRas G12D GTPáz aktivitására. Az eredményeket összevetettük a vad típusú GAP (wt GAP) katalizálta reakcióval. Az elvárásokkal szemben a GAP variánsok nem tudtak gyorsabb hidrolízist eredményezni, mint a wt GAP, azonban az L902E mutáns aktiváló képessége megközelítette a vad típusét (2. Ábra).

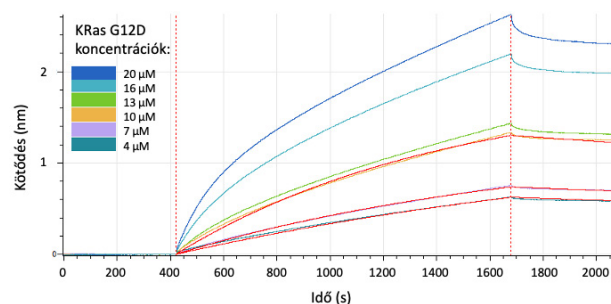


3. Ábra. A KRas G12D fehérje és a GAP R903A és R903Q variánsok kölcsönhatásának hidrolízisre gyakorolt hatása MESG-PNP foszfát esszével mérve.

A 903. arginin aminosav megváltoztatásának (R903A és R903Q) hatását is megvizsgáltuk. Ebben az esetben úgy tűnt, hogy az R903A mutáns kis mértékben javítani tudta az aktivitást (3. Ábra). Ezek az eredmények azt sugallják, hogy a QM/MM modellel alkotott GAP variánsok alkalmasak lehetnek a KRas mutánsok hidrolízisének helyreállítására.

2.2. Az RGS3 és a KRas fehérjék kölcsönhatásának vizsgálata bioréteg interferometriás módszerrel

Bioréteg interferometriás (BLI) módszerrel a KRas mutánsok és az RGS3 fehérje közti kölcsönhatást vizsgáltuk. Az RGS3-AviTag fehérjekonstruktot sikeresen biotináltuk, ami azt jelentette, hogy a fehérje alkalmas ligand lehet a bioréteg interferometriás mérésekben. Ebben az elrendezésben az RGS3-AviTag fehérje kötődött a szenzorhoz és az analit oldata különböző koncentrációkban a vad típusú vagy mutáns KRas volt, nem hidrolizálható GTP-analóggal feltöltve (4. Ábra).



4. Ábra. A KRas G12D és az RGS3-AviTag kölcsönhatásának BLI vizsgálata. Különböző KRas G12D koncentrációk esetében. A mérési pontokra illesztett görbék pirossal jelöltek.

Azt találtuk, hogy az RGS3 a KRas vad típusához, illetve G12C és G12D mutánsaihoz közelítőleg hasonló affinitással kötődik. Ez alapján megállapítható, hogy nem kizárólag a KRas-RGS3 közti kölcsönhatás erősségében rejlő különbségek okozzák, hogy az RGS3 a mutáns KRas fehérjék aktivitását nagyobb mértékben növeli, mint a vad típusét. Az RGS3 aktiváló mechanizmusának feltárása választ adhat ezen különbségekre, azonban ehhez megbízható szerkezeti modellekre van szükség.

3. Kísérleti rész

A vizsgálni kívánt fehérjét kódoló DNS szekvenciát mutagenézis PCR segítségével állítottuk elő. A létrejött expressziós vektort kémiaiilag kompetenssé tett *Escherichia coli* XL1Blue sejtekbe transzformáltuk. A felszaporított DNS-t izolálás után fehérjeexpresszióra alkalmas *E. coli* BL21 kompetens sejtekbe transzformáltuk. A sejtek rekombináns fehérje termelését izopropil- β -D-tiogalaktozid (IPTG) hozzáadásával indukáltuk. A sejteltérést szonikálással végeztük, így az intracellulárisan termeltetett fehérjét izolálni tudtuk a baktériumsejtekből. A rekombináns fehérjék mind rendelkeztek hisztidin-taggal, amely lehetővé tette az affinitás kromatográfiás elválasztásukat nikkel-nitrilotriecetsav (Ni-NTA) oszlopon. A tisztítás során kapott frakciók fehérjetartalmát nátrium-dodecil-szulfát gélelektroforézissel (SDS-PAGE) ellenőriztük. A célfehérjét tartalmazó oldatot ezt követően dializáltuk, hogy a fehérje mellől a kismolekulás szennyeződések eltávolítsuk. Szükség esetén a fehérjeoldatot méretkizárásos kromatográfiával tovább tisztítottuk, vagy töményítő oszlopon koncentráltuk. A fehérjék megfelelő feltekeredését az enzimkinetikai vizsgálatok megkezdése előtt termofluorimetriás méréssel ellenőriztük.

A GTP enzimkatalizált hidrolízisének követésére az EnzCheck™ Phosphate Assay módszert alkalmaztuk. Ennek segítségével nemcsak a KRas fehérje intrinzik hidrolízise vizsgálható, hanem a vele kölcsönható fehérjék enzimaktivitásra gyakorolt hatása is. A valós időben nyomon követhető spektrofotometriás eljárás további előnye, hogy a kapott aktivitási görbére függvény illeszthető, így a kinetikai állandók is kiszámíthatók, valamint összemérhetők egymással. A módszer alapja, hogy a KRas enzimreakciója során egy inorganikus foszfát (Pi) hidrolizál a GTP molekuláról, ezt a purin-nukleozid-foszforiláz (PNP) 2-amino-6-merkaptó-7-metil-purin-ribozid (MESG) szubsztrát jelenlétében 2-amino-6-merkaptó-7-metil-purin terméké és ribóz-1-foszfáttá alakítja. A keletkezett terméknek 360 nm-en abszorpciós maximuma van, ezáltal ennek mennyisége spektrofotometriásan időben követhető, ami pedig egy közvetett összefüggést biztosít a felszabaduló inorganikus foszfát mennyiségével.

Az RGS3 fehérje és a vad típusú, valamint mutáns KRas-ok közti kölcsönhatást bioréteg interferometriával vizsgáltuk. A Sartorius Octet® K2 BLI rendszerben található

optikai bioszenzor (Octet® SAX (Sartorius)) egy sztreptavidinnel bevont, biokompatibilis réteggel van ellátva, amelyhez a biotinált fehérjék specifikusan tudnak kötődni magas affinitásuk miatt. Ezekhez a fehérjékhez aztán specifikusan újabb fehérjék kapcsolódhatnak. A szenzoron ekkor megváltozik a réteg vastagsága és ezáltal a bevilágított fénysugarak interferencia mintázata is, amelyet valós időben detektálni lehet. Így a fehérjék kölcsönhatásait jellemző kötődési állandók (K_D) is meghatározhatók. Az elvégzett mérések során biotinált AviTag-es RGS3 fehérjét rögzítettük a szenzorhoz. Ez merült a nem-hidrolizálható GTP analóggal (guanozin-5'-[β,γ -imido]trifoszfát (GppNHP)) feltöltött KRas fehérjék oldatába.

Köszönetnyilvánítás

Köszönetünket fejezzük ki kollaborátorainknak, Dr. Berta Dénesnek és Dr. Rosta Edinának.

Hivatkozások

1. Tsuchida, N.; Murugan, A. K.; Grieco, M. *Oncotarget* **2016**, 7, 46717-46733.
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.8773>
2. Yang, H.; Zhou, X.; Fu, D.; Le, C.; Wang, J.; Zhou, Q.; Liu, X.; Yuan, Y.; Ding, K.; Xiao, Q. *Cancer Commun (Lond)* **2023**, 43, 42-74.
<https://doi.org/10.1002/cac2.12377>
3. Zenonos, K. *World J Gastrointest Oncol* **2013**, 5, 97-101.
<https://doi.org/10.4251/wjgo.v5.i5.97>
4. Mishra, A. K.; Lambricht, D. G. *Biopolymers* **2016**, 105, 431-448.
<https://doi.org/10.1002/bip.22833>
5. Ahmadian, M. R.; Stege, P.; Scheffzek, K.; Wittinghofer, A. *Nat Struct Biol.* **1997**, 4, 686-689.
<https://doi.org/10.1038/nsb0997-686>
6. Nyíri K, Koppány G, Vértessy B. G. *Cancer Metastasis Rev.* **2020**, 39, 1091-1105.
<https://doi.org/10.1007/s10555-020-09914-6>
7. Randelović I, Nyíri K, Koppány G, Baranyi M, Tóvári J, Kigyós A, Tímár J, Vértessy BG, Grolmusz V. *Int J Mol Sci.* **2024**, 25, 2572-2591.
<https://doi.org/10.3390/ijms25052572>
8. Berta, D.; Gehrke, S.; Nyíri, K.; Vértessy, B. G.; Rosta, E. **2023**, *J Am Chem Soc.* 145, 20302-20310.
<https://doi.org/10.1021/jacs.3c04330>
9. Li, C.; Vides, A.; Kim, D.; Xue, J.Y.; Zhao, Y.; Lito, P. *Science.* **2021**, 374, 197-201.
<https://doi.org/10.1126/science.abf1730>

Investigating the activity and interactions of oncogenic KRas proteins

Mutations in the Ras protein family are responsible for one of the highest prevalence in cancer. Most commonly affecting the pancreas, colon and lung, these lesions remain challenging for medical science today. The KRas protein, encoded by the Ras gene, plays a central role in regulating signaling pathways. This enzyme can control signaling as a binary switch through its GTPase activity, thereby affecting cell proliferation and division. The function of the KRas protein is facilitated by GAP (GTPase activating protein) proteins, which can increase the rate of GTP hydrolysis by several magnitudes. However, this finely tuned system can easily be disrupted by mutations in the active site of the KRas protein. A single point mutation reduces the ability of GAP to activate KRas proteins, therefore the rate of hydrolysis is significantly reduced, resulting that the protein being unable to fulfil its role in the signaling network. This leads to improper functioning of cellular processes and as a consequence uncontrolled cell division and tumor development.

Several approaches have been developed to restore the signaling, the most common one is drug treatment with inhibitor molecules. However, the restoration of the activation of mutant KRas proteins by GAP proteins holds promise too. Despite being an important target, the mechanism of GAP-catalysed hydrolysis has not been precisely defined yet. To understand this, our collaborators have set up a QM/MM model to systematically design GAP mutants that can activate the KRas G12D mutant, which is the most abundant KRas mutant in the human cancers. In addition, researchers have recently discovered a GAP-like protein, RGS3, which can also cause a catalytic effect on mutant KRas proteins. Our aim is to test these alternative GAP proteins in practice. For this, we investigated the interaction between the mutant KRas and RGS3 by biolayer interferometry and measured the ability of GAP variants to activate KRas mutants by using MESG-PNP enzyme activity assay. These studies may help to understand the interaction of these proteins and thus improve the development of tumor therapeutics.