

dc_1980_21^{dc1980_21}

Az NMR spektroszkópia sokszínűsége fehérjék és kismolekulák világában

Bodor Andrea

MTA doktori értekezés



ELTE
EÖTVÖS LORÁND
TUDOMÁNYEGYETEM

Eötvös Loránd Tudományegyetem

Kémiai Intézet

2022

dc_1980_21

Tartalomjegyzék

| | |
|--|----|
| Rövidítésjegyzék | V |
| 1. Bevezetés | 1 |
| 2. Szakirodalmi áttekintés | 3 |
| 2.1. Az NMR spektroszkópiai mérések kiválasztása | 3 |
| 2.2. Rendezetlen fehérjék/fehérje szakaszok és globuláris kölcsönható partnereik | 7 |
| 2.2.1. A p53TAD | 8 |
| 2.2.2. A Ca ²⁺ -kötő, homodimer S100A4 | 10 |
| 2.2.3. A nem-izom miozin NMIIA coiled-coil | 12 |
| 2.2.4. A homodimer dinein könnyű lánc és a miozin Va | 13 |
| 2.2.5. A TPPP25 | 15 |
| 2.2.6. A dUTPáz enzim és a PPI..... | 15 |
| 2.3. Membránmimetikumok és peptid-membrán kölcsönhatások..... | 16 |
| 2.4. Fenntartható fejlődés, NMR spektroszkópia a „zöld kémiában” és ipari eljárásokban..... | 20 |
| 3. Célkitűzések | 23 |
| 4. Kísérleti rész | 25 |
| 4.1. Fehérjék előállítása..... | 25 |
| 4.2. Membránmimetikumok és alkalmazott peptidek | 25 |
| 4.3. NMR minták, készülékek, mérések..... | 26 |
| 4.3.1. Globális paraméterek meghatározása | 27 |
| 4.3.2. Globuláris fehérjék jellemzése | 27 |
| 4.3.3. Rendezetlen fehérjék jellemzése..... | 32 |
| 4.3.4. Membránmimetikumok, peptid-bicella rendszerek jellemzése | 34 |
| 4.3.5. Nagynyomású és kis hőmérsékletű kísérletek | 34 |
| 5. Eredmények és értékelések | 35 |
| 5.1. Globális NMR paraméterek, empirikus <i>D-M</i> , <i>r_{H-N}</i> összefüggések..... | 35 |
| 5.2. Új, ¹ H ^α -detektált NMR pulzusszekvenciák rendezetlen fehérjék jellemzésére..... | 41 |
| 5.2.1. Prolin <i>cisz/transz</i> izomerek azonosítása | 47 |
| 5.2.2. Poszttranszlációs módosítások hatása a <i>cisz/transz</i> -prolin egyensúlyra | 51 |
| 5.2.3. A szomszédos aminosavak hatása a <i>cisz</i> -prolin tartalomra..... | 54 |
| 5.3. A rendezetlen fehérje/fehérje szakasz átfogó jellemzése, a kölcsönható partner viszonya: a rendezetlen-rendezett átalakulás | 57 |

| | |
|--|-----|
| 5.3.1. A p53TAD ¹⁻⁶⁰ : szerkezet, dinamika szabad és S100A4 kötött állapotban... 57 | 57 |
| 5.3.2. Az MPT coiled-coil szakasz és az MPT - S100A4 kölcsönhatás 63 | 63 |
| 5.3.3. A foszforiláció hatása az NMII coiled-coil szakaszokra 69 | 69 |
| 5.3.4. A miozin Va és a dinein könnyű lánc kölcsönhatása 72 | 72 |
| 5.3.5. A TPPP25 rendezetlen régiói és kölcsönhatásai 77 | 77 |
| 5.4. A dUTPáz hidrolízise, a Mg ²⁺ jelentősége 80 | 80 |
| 5.5. Membránmimetikum bicellák jellemzése..... 84 | 84 |
| 5.5.1. ¹³ C NMR relaxációs vizsgálatok 84 | 84 |
| 5.5.2. ³¹ P NMR relaxációs vizsgálatok..... 88 | 88 |
| 5.5.3. Méret és alak változás NMR-SAXS módszerek tükrében 91 | 91 |
| 5.6. „Zöld kémiai” és ipari folyamatok követése, jellemzése 97 | 97 |
| 5.6.1. A biomassa átalakítása..... 98 | 98 |
| 5.6.2. Reakciók ionos folyadékokban, a Ce(IV) oxidáció 99 | 99 |
| 5.6.3. Alkil-izocianát ciklooligomerizációjának mechanizmusa..... 101 | 101 |
| 6. Összefoglalás és kitekintés 104 | 104 |
| 7. Irodalomjegyzék..... 112 | 112 |
| 7.1. Az értekezés alapját képező közlemények 112 | 112 |
| 7.2. Kapcsolódó közlemények..... 113 | 113 |
| 7.3. Egyéb hivatkozások..... 115 | 115 |
| 8. Köszönetnyilvánítás 129 | 129 |

Rövidítésjegyzék

| | |
|---------|--|
| CAN | cérium-ammónium-nitrát |
| CD | Circular Dichroism; cirkuláris dikroizmus |
| BASEREX | BAnd-SElective REfocusing on the X-nuclei; sávselektív refókuszálás X-magon |
| BASHD | BAnd-Selective Homonuclear Decoupling; sávselektív homonukleáris lecsatolás |
| BIRD | Bilinear Rotation Decoupling; bilineáris forgatási lecsatolás |
| BEST | Band-selective Excitation Short Transient; sávselektív gerjesztő rövid tranziens |
| BIP | Broadband Inversion Pulse; szélessávú invertáló pulzus |
| BURBOP | Broadband Universal Rotations by Optimized Pulses; szélessávú univerzális rotációs optimált pulzusok |
| BURP | Band-selective, Uniform response, Pure-phase Pulse; sávselektív, egyenletes, tiszta fázisú pulzus |
| BSA | Bovine Serum Albumin; szarvasmarha szérum albumin |
| COSY | Correlation SpectroscopY; korrelációs spektroszkópia |
| CLEANEX | Clean Chemical Exchange; tiszta kémiai csere |
| CPMG | Carr-Purcell-Meiboom-Gill |
| DHPC | 1,2- dihexanoil- <i>sn</i> -glicero-3-foszfokolin |
| DLC | Dynein Light Chain; dinein könnyűlánc |
| DLS | Dynamic Light Scattering; dinamikus fényszórás |
| DMPC | 1,2- dimirisztoil- <i>sn</i> -glicero-3-foszfokolin |
| DMPG | 1,2- dimirisztoil- <i>sn</i> -glicero-3-foszfó-(1'-rac glicerol) |
| DOSY | Diffusion Ordered SpectroscopY, diffúziókontrollált spektroszkópia |
| DSS | 4,4-dimetil-4-szilapentán-1-szulfonsav |
| dUTP | dezoxi-uracil-trifoszfát |
| dUPNPP | α , β -imido-dezoxi-uracil-trifoszfát |
| dTTP | dezoxi-timin-trifoszfát |
| GVL | γ -valerolakton |
| GTP | guanin-trifoszfát |
| GDP | guanin-difoszfát |

dc_1980_21

| | |
|---------|---|
| GMP | guanin-monofoszfát |
| HOBS | HOmodecoupled Band-Selective; sávselektív homonukleáris lecsatolás |
| HMQC | Heteronuclear Multiple Quantum Correlation; heteronukleáris többkvantum korreláció |
| HSQC | Heteronuclear Single Quantum Correlation; heteronukleáris egykvantum korreláció |
| FID | Free Induction Decay; szabad lecsengési jel |
| Gdn | guanidínium |
| IDP/IDR | Intrinsically Disordered Proteins/Intrinsically Disordered Regions rendezetlen fehérje/fehérje szakasz |
| IPTG | izopropil- β -D-1-tiogalaktopiranozid |
| IR | InfraRed; infravörös |
| ITC | Isothermal Titration Calorimetry; izotermális titrálós kalorimetria |
| MS | Mass Spectrometry; tömegspektrometria |
| NMII | Non-muscle Miozin II; nem-izom miozin II |
| NMR | Nuclear Magnetic Resonance; mágneses magrezonancia |
| NOESY | Nuclear OvErhauser SpectroscopY; mag Overhauser hatás spektroszkópia |
| NUS | Non Uniform Sampling; nem lineáris mintavételezés |
| PGSE | Pulsed Gradient Spin Echo; térgradiens spin ekhó |
| PFG | Pulsed Field Gradient; térgradiens impulzus |
| PDB | Protein Data Bank; fehérje adatbázis |
| PPI | Protein-Protein Interaction; fehérje-fehérje kölcsönhatás |
| PSYCHE | Pure Shift Yielded by CHirp Excitation; Chirp impulzusok által létrehozott valódi/tiszta kémiai eltolódás |
| SASA | Solvent Accessible Surface Area; oldószernek kitett felszín területe |
| SAXS | Small Angle X-ray Scattering; kisszögű Röntgen szórás |
| SEC | Size Exclusion Chromatography; méretkizárásos kromatográfia |
| SHACA | Selective HA – CA correlation; szelektív HA-CA korreláció |
| SLS | Static Light Scattering; statikus fényszórás |
| TAD | TransActivation Domain; transzaktivációs domén |
| THF | tetrahidrofurán |
| TOCSY | Total Correlation SpectroscopY; totál korelációs spektroszkópia |

dc_1980_21

| | |
|----------|--|
| TPPP/p25 | Tubulin Polymerization Promoting Protein 25; tubulin polimerizációt segítő fehérje |
| SCS | Secondary Chemical Shift; másodlagos kémiai eltolódás |
| SOFAST | band-Selective Optimized-Flip-Angle Short Transient; sávselektív optimált billenés szögű rövid tranziens |
| STD | Saturation Transfer Difference; telítésátvitel különbség |

1. Bevezetés

A mágneses magrezonancia, vagy NMR (Nuclear Magnetic Resonance) spektroszkópia napjainkra számos tudományterületen elterjedt technikává nőtte ki magát. A kezdeti fizikai, szerves kémiai alkalmazásokon túl fontos eszköze lett szerkezeti biológiai, gyógyszeripari kutatásoknak, és egyaránt jelen van környezetkémiai, élelmiszeripari, minőség-ellenőrzési alkalmazásokban is. Minden területen a megfelelően megválasztott mérési módszer, annak beállítása, fejlesztése, és az eredmények szakszerű kiértékelése már önmagában is nagy feladatot jelent, ahol a legjobb válasz megtalálásához szükség van az NMR spektroszkópus szakértelemére.

A természettudományos kutatások fontos mérföldkövei közé tartozik a biológiai rendszerek működésének, a betegségek kialakulásának megértése; lehetséges gyógymódok keresése; hatóanyag molekulák tesztelése. A modern gyógyszerkutatás fő iránya a célzott terápia, melynek leggyakoribb gyógyszer-célpontjai a fehérjék. A klasszikus globuláris rendszerek mellett ma már a figyelem a másodlagos, harmadlagos szerkezettel nem bíró rendezetlen fehérjék (IDP – Intrinsically Disordered Protein) fele is irányul. Mindezen biomolekulák jellemzése *in vitro* körülmények mellett elengedhetetlen, és az NMR spektroszkópiának ezen a téren kiemelt szerep jut. A módszer lehetőségeit tekintve két módon is tud információt szolgáltatni: *globálisan* jellemzi a teljes molekulát – például a hidrodinamikai paramétereken keresztül, és *lokálisan* atomi szinten jellemzi az adott környezetet. Ez utóbbi jelenti a nagy előnyét, hiszen az oldatfázisú mérések nem csak szerkezeti szempontból, de dinamikailag, az oldatbeli mozgások elemzésével is képes a rendszer leírását szolgáltatni. Az így kapott információk közelebb visznek a fehérje működésének megértéséhez és kulcsfontosságú ismeretek a fehérje-kismolekula, fehérje-fehérje, illetve fehérje-membrán kölcsönhatások jellemzése szempontjából. A felsorolt jellemzők mindenkéhez sikerült saját eredményeink alapján általános érvényű megfogalmazásokat tenni, mérési technikákat fejleszteni, illetve konkrét betegségekben kiemelt szerepet játszó fehérjék jellemzését elvégezni.

Mindemellett napjaink égető kérdései közé tartozik a fosszilis üzemanyagok helyettesítése és a környezetszennyezés csökkentése is. Nagy erőfeszítéseket tesznek megoldások keresésére, melyek során az alapkutatásoknak is kitüntetett szerep jut. A komplex kérdéskörök megválaszolása ebben az esetben sem korlátozódik feltétlenül egy tudományág kutatási területére. A biomassza átalakításának lehetőségeit megfelelő modellvegyületek használatával, laboratóriumi körülmények között, NMR mérésekkel alátámasztott atomi szintű jellemzéssel lehet vizsgálni. A „zöldebb” oldószeres keresése és bevezetése esetén lényeges szempont, hogy a kémiai reakciók lejátszódása a szokásos oldószeresekben tanúsított viselkedéssel azonos legyen. A reakciók mechanizmusának leírásához ismerni kell a képződött intermediereket, a katalizátor szerepét, hiszen ezen tudás birtokában lehet hatékonyabbá alakítani a rendszereket. Ilyen típusú kérdésekben, amint azt kutatásainkban alá is támasztottuk, a nem szokványos NMR spektroszkópiai módszerek szintén kiemelt szerepet játszhatnak.

E dolgozat célja az NMR spektroszkópia szerteágazó, általánosságban és rendszer specifikusan alkalmazott kutatásainknak a bemutatása. Ennek tükrében az eredményeket az alábbi csoportosításban tárgyalom: (1) a globális paraméterek alkalmazhatósága; (2) új mérési megközelítések, pulzus szekvenciák bevezetése, elsősorban IDP rendszerek fiziológiás körülmények melletti jellemzésére; (3) adott fehérje viselkedésének megismerése, fehérje-fehérje, fehérje-peptid kölcsönhatások leírása mindkét partner szemszögéből, kinetikai vizsgálatok; (4) membránmimetikumok, peptid-bicella rendszerek jellemzése; (5) környezeti és ipari szempontból fontos kémiai reakciók vizsgálata.

A bemutatott eredmények alapjául az irodalomjegyzék elején felsorolt 18 publikáció szolgált, a kapcsolódó publikációk nagyrésze is a felsorolt csoportosítás valamelyikéhez szorosan fűződik. Minden közlemény egy csapatmunka eredménye, és az értekezésben a saját hozzájárulásom igyekszem ismertetni.

2. Szakirodalmi áttekintés

2.1. Az NMR spektroszkópiai mérések kiválasztása

A molekulák oldatfázisú, atomi szintű szerkezeti és dinamikai jellemzésére mára már az NMR spektroszkópiai módszerek bő tárháza áll rendelkezésre. A kutató a programkönyvtárakban szereplő többszáz pulzusszekvencia közül választhat, dönthet arról, hogy a kémiai/biokémiai rendszer megfejtésre váró kérdéseire válaszolva a molekula összetételében előforduló mely NMR aktív magokat vizsgálja, hány dimenziós mérés kiértékelésének eredménye hozza majd meg a kívánt eredményt, és milyen magot érdemes detektálnia, milyen beállítások mellett. A célhoz több út is vezethet, amiben a személyes tapasztalat, sőt, az ízlés is szerepet játszik.

Az elmúlt évtizedekben 16 NMR aktív mag mérésén keresztül számos kismolekula és fehérje NMR spektroszkópiai vizsgálatát végeztem el. A 2.1. táblázatban csak azon négy NMR aktív mag jellemzőit ismertetem, amelyekhez a jelen disszertációban foglalt kérdéskörök tanulmányozása során sor került.

2.1. táblázat. A leggyakrabban mért NMR aktív magok tulajdonságai

| NMR aktív mag | I | Természetes előfordulás (%) | Giromágneses együttható ($10^7 \text{ radT}^{-1}\text{s}^{-1}$) |
|-----------------|-----|-----------------------------|---|
| ^1H | 1/2 | 99,98 | 26,7519 |
| ^{13}C | 1/2 | 1,108 | 6,7283 |
| ^{15}N | 1/2 | 0,365 | -2,712 |
| ^{31}P | 1/2 | 100,00 | 10,841 |

Az 1D ^1H triviális mérés, minden rendszerről ez az első felvétel, ami készül. Míg kismolekuláknál már gazdagon szolgáltat információt, nagymolekuláknál egy kevésbé informatív kvalitatív képet kapunk. Amennyiben nem az atomi információ meghatározása a tét, akkor a kémiai rendszer egészét jellemző *globális* paraméter, a *D* translációs diffúziós együttható meghatározására szolgáltat lehetőséget. A megfelelő NMR mérés a gradiens spin echo (PGSE) alapkísérlet, amelynek továbbfejlesztett változatait széleskörűen alkalmazzák kis és nagymolekulák jellemzésére egyaránt. (Cohen 2005, Dixon 1999, Evans 2020, Johnson 1999) A mérés és a kiértékelés már 1965 óta ismert, adott rezonanciajel intenzitásának változását követjük leginkább a gradiens erősség függvényében. A kiértékelés kapcsán az irodalomban különböző megközelítéseket használnak. Egyik eljárás szerint a Stejskal Tanner összefüggés (Stejskal 1965) illesztése szolgáltatja *D* értékét (2.1. egyenlet):

$$I = I_0 \exp[-konst \cdot \gamma^2 \delta^2 g^2 D (\Delta - \delta/3)] \quad (2.1.)$$

ahol I , I_0 – a kiválasztott rezonanciajel/tartomány adott g gradiens erősségnél, illetve a választott legkisebb értéknél; δ – a gradiens impulzus hossza, Δ – a diffúziós idő; γ – a mért mag

giromágneses együtthatója és *konst* a mérőfejre meghatározott állandó. Ez a kiértékelés pontos eredményt szolgáltat, de akkor érdemes használni, ha egy, maximum két komponensű rendszert vizsgálunk, ez utóbbi esetben két *D* értékre történik az illesztés. Amennyiben több komponensű az oldat, úgy az inverz-Laplace transzformáción alapuló DOSY-kiértékeléshez kell folyamodni. Az eredmény egy két-dimenziós tábla, ami ránézésre egy NMR „kromatogram”, ugyanis a különböző méretű molekulák a rájuk jellemző diffúziós együttható értékének megfelelő frontvonalakat képeznek. A meghatározás hátránya, hogy adatfeldolgozás során adott esetben a hiba nagyobb, mint a Stejskal-Tanner módszernél. Érdemes megjegyezni, hogy erre a 2D ábrázolásra szokott a szakirodalom DOSY-ként hivatkozni, viszont ez nem egy más mérési módszer, hanem ugyanazon pulzusszekvenciát alkalmazó mérés egyik kiértékelési módja (Antalek 2002).

Az így meghatározott *D* translációs diffúziós együttható és az *M* molekulatömeg viszonyát a Stokes-Einstein (2.2.) egyenlet írja le:

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta r_H f} = \frac{k_B T}{6\pi\eta f} \left(\frac{4\pi\rho_{\text{eff}} N_A}{3} \right)^{1/3} M^{-1/3} \quad (2.2.)$$

ahol k_B – a Boltzmann állandó, T – hőmérséklet, η – a közeg viszkozitása, r_H – a látszólagos hidrodinamikai sugár, ρ_{eff} – a molekula effektív sűrűsége, N_A – az Avogadro szám, f – korrekciós faktorokat tömörítő paraméter.

A Stokes-Einstein egyenlet nagy népszerűségnek örvend, ám gyakran alkalmazzák olyan esetekben is, amikor a feltételek nem teljesülnek, így az irodalomban található értékeknél érdemes utánanézni, mennyire körültekintően történt a meghatározás. Ugyanis az összefüggést merev, gömbszerű részecske kontinuumban történő diffúziójára írták le, a kiértékelések során tehát a molekula alakját és a közeg kontinuum jellegét is meg kell vizsgálni. A gömbalak megközelítés fehérvék, membránmimetikumok vizsgálatánál nem mindig helytálló, ezekben az esetekben empirikus úton meghatározott, vagy különféle alakzatra kiszámolt f_{alak} korrekciókat lehet alkalmazni (Cantor 1980). Ugyanakkor azonos molekulatömegű fehérje eltérő hidrodinamikai paraméterekkel rendelkezik, attól függően, hogy meghatározott szerkezetű, félig letekeredett állapotban van, vagy rendezetlen. Az oldószer hatását magában foglaló korrekciót több közegben is vizsgálták, a Gierer-Wirtz egyenlet alapján az oldott molekula mérete és az oldószer mérete közötti eltéréstől származtatható egy f_S járulék (Evans 2018, Evans 2013). A felsorolt paraméterek pontos értékének ismerete szinte lehetetlen, ezért a figyelem inkább az empirikus egyenletek meghatározása fele irányult. Mondhatnánk, cseberből vederbe jutottunk, ugyanis a különböző technikák (SAXS, NMR, SEC, DLS) alapján, különböző körülmények között meghatározott *D* értékeket korreláltatták legtöbb esetben a látszólagos hidrodinamikai sugár r_H értékekkel, értelemszerűen minden korrekciót mellőzve (Marsh 2010, Uversky 2012, Wilkins 1999). A *D*-*M* empirikus egyenletek ritkábbak, és hiányosságuk, hogy vagy hasonló aminosavszekvenciájú rövid fehérjeszakaszokra határozták meg őket, vagy csak néhány globuláris rendszert elemeztek (Danielsson 2002, Groves 2004).

A leírtakból kitűnik, hogy a translációs diffúziós együtthatóra vonatkozó kérdéskör meghatározást, kiértékelést, de alkalmazást tekintve is kissé ingoványos talaj. Szisztematikus

vizsgálatokra van szükség ahhoz, hogy legalább egy bizonyos részterületen nagyobb biztonsággal lehessen eligazodni. Az NMR módszerekre alapozva ezen űr egy részének a pótlására vállalkoztam.

Az NMR spektroszkópia erőssége viszont a *lokális* paramétereiből, az atomi környezetekről kapott információ. A fehérjék alkotóelemei közül a ^1H , ^{13}C , ^{15}N atomokat szokás mérni, ezek közül legfontosabbak a peptidgerinc és az oldallánc α és β helyzetű ^1H , ^{13}C atomjai. Az NMR aktív ^{13}C , ^{15}N környezetek kis természetbeni előfordulása miatt a tipikusan μM - mM töménységben elérhető fehérjék jellemzése izotópjelölt formában történik.

A *globuláris*, szerkezettel bíró fehérjék atomi szintű tanulmányozására számos, mára már klasszikussá vált NMR spektroszkópiai megközelítés áll rendelkezésre (Batta 2018, Bertini 2012). Ezek főleg $^1\text{H}^{\text{N}}$ -detektáláson alapuló technikák, ahol a jelazonosítás alapja a 2D ^1H , ^{15}N korrelációs (intra-molekuláris $\text{H}_i\text{-N}_i$) mérés, amit széleskörben használnak kölcsönhatások, biológiai jelenségek követéséhez is. Ahhoz, hogy a mérési időt jelentősen csökkenteni tudjuk, és így akár gyorsan lejátszódó folyamatokat is követhessünk a szelektív és kis számú impulzust tartalmazó SOFAST-HMQC (Schanda 2005) és BEST-HSQC mérések a legkedveltebbek (Brutscher 2017). A jelazonosítás főleg időben bomlékony fehérje esetében célszerűbben oldható meg a BEST-típusú 3D (HNCA, HNCACB, HNCOC, stb.) mérések segítségével (Lescop 2007). A mérési idő a NUS nem-lineáris mintavételezés alkalmazásával tovább csökkenthető, azzal a kitételrel, hogy ebben az esetben a nyers adatok processzálása igényel több időt és tapasztalatot (Gołowicz 2020, Rao Kakita 2018). A nagyobb (4D, 5D, 6D, ...) dimenzionalitású mérések esetében viszont a NUS elengedhetetlen kellék. Egy jelasznációt eredményező impozáns - de kitanulását és rutinszerű sikeres alkalmazását tekintve szerintem időigényes - módszer az APSY-NMR megközelítés (Hiller 2005). Ez a rövid felsorolás is tükrözi, hogy rendelkezésre áll jónéhány lehetőség, ami a globuláris fehérjék jelazonosítását segíti.

A másodlagos, harmadlagos szerkezettel nem rendelkező ún. *rendezetlen* fehérjék és fehérje szakaszok esetében ezek a módszerek nem mindig vezetnek eredményre, főleg, ha fiziológias körülmények mellett szeretnénk dolgozni. Szobahőmérsékleten és fiziológias pH-n a gerinc -NH- protonok oldószert protonjaival történő cserefolyamata következtében a 2D ^1H , ^{15}N korrelációs mérésben a keresztcsúcsok gyakran detektálási határ alá szélesednek, így a jelazonosítás elvégzéséhez más megoldások után kell nézni. A metodikai fejlesztések egy elegáns csoportját a ^{13}C detektált mérések alkotják (Bermel 2012, Bermel 2008, Felli 2015, Felli 2021), melyeknek alapmérése a 2D CON (inter-molekuláris $\text{CO}_i\text{-N}^{\text{H}}_{i-1}$ korreláció). Annak ellenére, hogy nagyon jó a jeldiszperzió (a CO tartomány 10-15ppm széles) és az amidproton hiányában az $^1\text{H}^{\text{N}}$ - típusú mérésekben nem detektálható prolinok itt megjelennek; a mérések érzékenysége kicsi, főleg, ha nem dedikált, ^{13}C érzékenyített mérőfejekkel dolgozunk. Ilyen viszont világviszonylatban is csak 1-2 helyen áll rendelkezésre. Másik megoldást a szintén jó felbontású, de ugyancsak érzékenységi problémákkal terhelt ^{15}N detektált mérések jelentik (Chhabra 2018, Gal 2011, Gibbs 2018). Ha egy NMR mérés érzékenységét próbáljuk értelmezni, akkor az arányos a $\gamma_i\gamma_d^{3/2}$ szorzattal, ahol γ_i azon mag giromágneses együtthatója, amiről a mágnesezettséget indítjuk, γ_d pedig azé, amin a mágnesezettséget detektáljuk.

Feltételezve, hogy a mágnesezettség ^1H -ról indul, akkor egy ^1H detektált mérés érzékenysége ideális körülmények mellett $\sim 8\text{x}$ nagyobb, mint a ^{13}C -; és $\sim 31\text{x}$ nagyobb, mint a ^{15}N -detektált mérés érzékenysége. Ennek alapján nyugodtan kijelenthetjük, hogy érdemes ^1H detektált módszerekben gondolkodni, és ha a $^1\text{H}^{\text{N}}$ detektálás nem járható út, akkor az $^1\text{H}^{\text{a}}$ tartományban kéne próbálkozni. Ilyen típusú mérések ismertek, (Kanelis 2000, Mantylahti 2010, Mantylahti 2011, Wong 2020) de kevésbé elterjedtek. Ami a háttérbe szorítást eredményezte, az egyfelől a H^{a} eltolódásokhoz (3,9-4,8 ppm) közel eső nagy vízjel jelenléte - hacsak nem D_2O közegben dolgozunk -, illetve a nagy jelszélességek és a gyors relaxáció. Való igaz, hogy a nagyobb globuláris fehérjéknél kevesebb sikerrel lehet ezeket a méréseket futtatni, ám a mobilis, rendezetlen fehérjék kedvező relaxációs tulajdonságaik és keskeny jeleik miatt kivételt képezhetnek, főleg, ha sikerül az izotópjelölt molekulákban a kiterjedt homo- és heteronukleáris csatolásokat megszüntetni.

A spektrumok egyszerűsítése, a különféle lecsatolási technikák tökéletesítése régóta az NMR spektroszkópiai kutatások tárgyát képezi. Az adatgyűjtési (akvizíciós) idő alatti heteronukleáris lecsatolás nagyterű készülékeken a jól bevált kompozit impulzusok segítségével történik (Levitt 1983, Schilling 2014). A homonukleáris lecsatolás megvalósítása nagyobb körülményt igényel, amikor a szabad lecsengési jelet (FID) nem a megszokott folyamatos módon, hanem darabokban (chunks) detektáljuk. A rendelkezésre álló technikák két csoportra oszthatók: az interferogram típusú, illetve a valós idejű technikákra (Castañar 2015). A homonukleáris lecsatolás szekvenciája egy szelektív inverziós elemet tartalmaz, mely vagy szélessávú, vagy sávselektív lecsatolást eredményez. A Zangger-Stark (Zangger 1997) vagy a PSYCHE (Foroozandeh 2014) alapú szélessávú megközelítések lényeges érzékenység csökkenést eredményeznek, ezért alkalmazásuk kis koncentrációjú biológiai minták esetében nem célravezető. Az izotóp szelektivitást kihasználó szélessávú BIRD inverziós elem beépítése a természetes izotópeloszlású mintákban a kis mennyiségben jelen levő ^{13}C izotóp jelenléte miatt lesz kis érzékenységű; másfelől ez az eljárás ^{13}C izotópjelölt molekulákra nem működik (Aguilar 2011, Garbow 1982). A sávselektív lecsatoláson alapuló HOBS (Castañar 2013) és BASH (Ying 2014) technikák esetében nincs érzékenység csökkenés, sőt, bizonyos esetekben jel/zaj növekedés is tapasztalható. A biológiai $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ jelölt minták esetében arra fókuszáltam, milyen megoldást lehet találni ahhoz, hogy a spektrum egyszerűsítése megvalósuljon.

A sikeres kiértékelés érdekében a tapasztalat azt mutatja, hogy érdemes a különböző technikákat ötvözni, a „mit lehet mérni?”-t maga a fehérje rendszer is befolyásolja, és a globuláris fehérjékre kifejlesztett méréseket bizonyos kísérleti körülmények mellett IDPk esetében használjuk. Az általam alkalmazott mérés technikai megoldásokat a kísérleti részben kerülnek tárgyalásra.

Tovább elemezve a 2.1. táblázatot, kitűnik, hogy a ^{31}P atommag könnyen mérhető, és már az 1D spektrum is rövid idő alatt információt szolgáltat. Amíg a ^1H spektrumok mérése teljesen triviális, ^{31}P méréseket korlátozottabban alkalmaznak. Biológiai alkalmazásuk elsősorban az RNS kutatások fókuszát képezi (Fürtig 2003), viszont számos egyéb alkalmazása is lehetséges, amik kevésbé kerültek a köztudatba. Így például a membránmimetikum micellák

és bicellák tanulmányozásánál jól jellemezhető a foszfatidil-kolin fejcsoport foszfor környezetének a viselkedése (Glover 2001, Laguerre 2016, Triba 2005). A változó hosszúságú acillánc különböző kémiai eltolódású foszfor környezeteket eredményez, melyek jelzéssége, relaxációs tulajdonságai mind kiaknázhatók (Biverstahl 2009, Dudás 2020b). Továbbá a nukleozid foszfátok hidrolízise számos biológiai folyamatban (jelátvitel, DNS szintézis, anyagcsere) (Klähn 2006) játszik szerepet. Ezeket a reakciókat különféle rendszerek esetében behatóan tanulmányozták, mégis olyan lényeges kérdések, mint a reakció útvonal részletes atomi szintű jellemzése vagy mechanisztikus leírása sok enzimreakció esetében hiányos. A ^{31}P mérés segítségével már kis mennyiségben jelen levő nukleozid foszfát hidrolízise is egyszerűen monitorozható. A foszfátion koordinációs kémiai tulajdonságait tekintve a kation - tipikusan Mg^{2+} - koordinációjának köszönhetően a ^{31}P környezet és ennek kémiai eltolódásai jelentősen megváltoznak, így a fémion hatásának és szerepének vizsgálatára is lehetőség van. A kutatásaim során ezeket a koordinációs kémiában megszokott alkalmazásokat a dUTP Mason-Pfizer majom retrovírus (MPVM) dUTPáz jelenlétében történő hidrolízis feltérképezésére használtam, a teljes kép pedig több módszer: ^{31}P NMR, krisztallográfia, tömegspektrometria és molekulamodellés együtteséből alakult ki (Barabás 2013). Hasonló kérdéseket boncolgattam az agy-specifikus tubulin polimerizációt segítő TPPP/p25 fehérje kapcsán, olyan szempontból, hogy a GTP kötődés hatására bekövetkezik-e nukleotid hidrolízis (Zotter 2011a, Zotter 2011b). Az egyszerű, analitikus szemmel elvégzett foszformérés fontosságát a nyomnyi mennyiségben képződő pirofoszfát detektálására is felhasználtam (Képiró 2012). Nem utolsósorban, a kvantitatív analitikai meghatározás könnyű kivitelezhetőséget tükrözi az üdítőital foszfortartalmának meghatározását célzó, hallgatói gyakorlatra általam kifejlesztett mérés is.

2.2. Rendezetlen fehérjék/fehérje szakaszok és globuláris kölcsönható partnereik

A rendezetlen fehérjék és fehérje szakaszok (IDP/IDR) olyan biológiai rendszerek, melyek - a globuláris rendszerektől eltérően - nem rendelkeznek meghatározott másodlagos, harmadlagos szerkezettel, hanem szerkezeti sokaságok halmazaként írhatók le (Tompa 2002, Uversky 2002, Uversky 2020, Uversky 2012a, Uversky 2012b, Uversky 2000). A rendezetlenség az aminosav szekvenciában kódolt, a globuláris rendszerektől eltérően az IDPk összetételében gyakoriak a töltéssel rendelkező és hidrofil aminosavak, és hiányzanak, vagy alulreprezentáltak a szerkezeti mag kialakításáért felelős hidrofób aminosavak (Bodor 2021, Theillet 2013). Jellegzetességük, hogy sok „szerkezetörő” prolint tartalmaznak, és ebben az esetben a *cisz/transz* izomerekkel is számolni kell. A konformációs flexibilitásnak köszönhetően számos célponthoz tudnak kötődni. Sok esetben a kölcsönhatás következtében a „disorder-to-order”, azaz rendezetlen – rendezett átmenet valósul meg, azaz a rendezetlen szakaszban kötött állapotban stabil szerkezeti elemek alakulnak ki (Feng 2009, Lee 2010). Az elmúlt évtizedekben fény derült arra is, hogy a rendezetlen fehérjék számos biológiai folyamat kulcsszereplői. Meghatározó szerepet játszanak egyes neurodegeneratív betegségek kialakulásában, így az α -szinuklein a Parkinson kórral, a tau fehérje az Alzheimer kórral hozható kapcsolatba (Busche 2020, Iqbal 2010, Marsh 2006, Meade 2019). A p53

transzaktivációs doménjének kóros működése a sejtciklus és apoptózis szabályozásával daganatos betegségek (karcinómák, szarkómák) kialakulásához vezethet (Olivier 2003, Saha 2015). A *cisz/transz* prolin konformációs egyensúly kiemelt szerepére többször is rávilágítottak: az ATR fehérje Pro429 környezete szabályozó funkciót lát a DNS károsító folyamatokban (Hilton 2015, Makinwa 2020), a BMAL TAD fehérje Pro625 *cisz/transz* átalakulása pedig a cirkadián ritmus szabályozásában fontos (Gustafson 2017). Az adott prolin konformáció további jelentőséggel bír, amennyiben valamilyen poszttranszlációs – elsősorban foszforilációs – hely közvetlen szomszédságában található. A foszforiláció a Ser/Thr aminosavakat érinti, és a kialakult pSer/pThr oldallánca tartalmazza a foszfát csoportot, ami a kísérleti pH értéknek megfelelően protonált, ez semleges, fiziológiai körülmények között leginkább HPO_4^- . A prolin irányította foszforiláció elsősorban a cisztauzisban kiemelt, ahol a pSer/pThr-Pro prolin kötés a *cisz*-Pro izomer kialakulását vonja maga után (Nakamura 2012). Ugyanakkor általánosságban elmondható, hogy kiemelt fontossággal bír annak feltérképezése, hogy a foszforiláció során bekövetkező változások mennyire befolyásolják a fehérje működését, vagy a partnerekkel való kölcsönhatásokat.

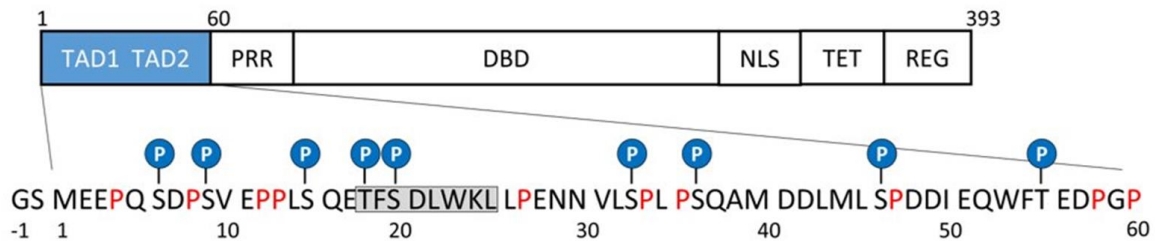
Mindezek fényében látható, hogy az IDPk szerkezeti hajlamainak, dinamikai viselkedésének, a kialakult izomerek oldatbeli eloszlásának ismerete, és a partnerekkel való kölcsönhatások leírása elengedhetetlen a biológiai funkcióban betöltött szerepük megértésében. Teszik/tesszük ezt olyan elgondolásból is, hogy fókuszba került a rendezetlen fehérjék potenciális gyógyszerhatóanyag célpontokként történő alkalmazása, az ún. „rendezetlenség alapú hatóanyag tervezés” (disorder based drug design) (Ambadipudi 2016, Neira 2017). Ezen mobilis rendszerek atomi szintű tanulmányozására a krisztallográfia és a krio-EM technika nem igazán alkalmasak, így az NMR spektroszkópiai módszerek tudnak a feltett kérdésekre válaszokat adni.

Az elmúlt évek során több rendezetlen és globuláris fehérje NMR spektroszkópiai vizsgálatával foglalkoztam. A behatóbban tanulmányozott rendezetlen fehérjék/fehérje szakaszok közé tartozik a p53TAD (60aa) (Bodor 2020, Dudás 2020a, Sebák 2022); a miozin IIa (45aa) (Pálfy 2016) a miozin Va (24aa) (Bodor 2014, Hódi 2006) a TPPP25 terminális szakaszai (Zotter 2011a, Zotter 2011b) MAPK, RSK lineáris motívumok (Alexa 2015, Gógl 2018); a DF31 (Szollosi 2008) és az α -szinukelin (Bodor 2020). Több esetben ezek a régiók globuláris fehérjékkel való kölcsönhatásának leírása is a kutatás fókuszát képviselte. A vizsgált partnerek közül kiemelkedik két homodimer: az S100A4 (Biri-Kovács 2017, Duelli 2014, Ecsédi 2018, Pálfy 2016) és a dinein könnyű lánc (DLC) (Bodor 2014, Hódi 2006). A következőkben csak az eredmények során leginkább érintett fehérjék biológiai jellemvonásait mutatom be.

2.2.1. A p53TAD

A „genom őrzőjének” is titulált humán, tumorszuppresszor p53 fehérje kulcsfontosságú szereplő a sejtciklus szabályozásban, az apoptózisban és a DNS javító mechanizmusokban (Bulavin 1999, Kruse 2009, Oda 2000). A 393 aminosav hosszú fehérje homotetramer

szerkezetű, ahol egy monomer felépítése: az N-terminális transzaktivációs domén (TAD), a prolin-gazdag régió (PRR), a DNS-kötő domén (DBD), a nukleáris lokalizációs szignál (NLS) szakasz, a tetramerizációs domén (TET) és a C-terminális szabályozó domén (REG) (lásd 2.1. ábra).



2.1. ábra: A p53 fehérje monomer lánca felépítése, kiemelve az 1-60 régió aminosavszekvenciáját. A foszforilációs helyek kékkel jelöltek, a prolinok pirosbetűsek. Az N terminális végen található -1,0 jelölésű aminosavak klónozási termékek.

Kutatásaim fókuszában a 60 aminosav hosszúságú N-terminális TAD domén áll, ami további két szakaszra osztható: a TAD1 (1-41) és a TAD2 (42-60) szubdoménekre (Raj 2017). A TAD funkciójának betöltésében fontos szerep jut a szerkezeti heterogenitásnak, így számos interakciós partnere van, melyek közül a legismertebbek a transzkripció adapter CBP és a p300 több doménje, a DNS-replikációt szabályozó humán replikációs A fehérje hRAPA70, a széleskörűen vizsgált MDM2 ubikvitin ligáz, az adenovírus E1B, és az S100 fehérjék (Fernandez-Fernandez 2005, Leiter 1996, Momand 1992, Scolnick 1997, Van Dieck 2009).

A TAD régió szerkezeti és dinamikai tulajdonságait NMR spektroszkópiái és fluoreszcens technikákkal is tanulmányozták, egybehangzó következtetésként megállapítva, hogy bár összességében rendezetlen, vannak naszcens helikális hajlamot mutató szakaszok (Lee 2000, Lum 2012). Elsősorban ezekre a régiókra jellemző, hogy a célfehérjével való kölcsönhatás következtében rendezetlen – rendezett átalakulást szenvednek és változó hosszúságú amfipatikus hélix szerkezetet vesznek fel. Kötött állapotban levő TAD szakaszok dinamikai viselkedésére kevés irodalmi adatot találunk, a CBP TAZ1- és TAD2-doménjével és a hRAP70-nel alkotott komplexek esetében végeztek ilyen vizsgálatokat (Krois 2016, Vise 2005). Ám kimutatható, hogy kötött állapotban is megmarad a TAD szakasz jelentős flexibilitása, így az ún. „bolyhos” (fuzzy) komplexek közé sorolhatjuk őket (Fuxreiter 2018, Miskei 2017, Tompa 2008). Kutatásaim során a metasztázisban szerepet játszó S100A4 fehérje és p53TAD¹⁻⁶⁰ kölcsönhatását vizsgáltam, mindkét partner szemszögéből szerkezeti és dinamikai szempontból is jellemezve a kialakult komplexet (Dudás 2020a).

A 2.1. ábrán is kiemeltem, hogy a p53TAD¹⁻⁶⁰ 10 prolin környezetet tartalmaz. Hiányos ismereteink vannak arról, vajon ezek a környezetek milyen izomer formát vesznek fel, esetleg detektálható-e *cisz/transz*-prolin egyensúly? A különféle izomerek különféle biológiai funkciót látnak el, így például a *cisz*-Pro27 jelenléte csökkenti a p53TAD - MDM2 komplex stabilitását (Zhan 2015), a *cisz*-Pro47 pedig a BAX fehérje aktiválásában játszik szerepet (Follis 2015). Annak eldöntésére, hogy melyik izomer keletkezik, általában prolin analógokat használnak, ami teljesen eltolja az egyensúlyt az egyik izomer irányába. A *cisz/transz* izomerizáció 10^{-3} - 10^{-2} s⁻¹ időskálájú folyamat, így az NMR spektrumban a prolinok és közvetlen környezetükben

levő szomszédai esetében minor jelek detektálhatók. A minorok azonosítása nem triviális, az X-Pro-Y, vagy X-Pro-Pro környezetek szekvenciális jelszignálása nem mindig egyértelmű, ahogy az sem, hogy milyen izomerhez tartoznak. Az izomerforma egyértelmű eldöntését a C β -C γ kémiai eltolódások különbsége szolgáltatja, ám ehhez megfelelő érzékenységgű, esetleg prolin-szelektív mérésekre van szükség. Munkámban ilyen kérdések megválaszolására is törekedtem, és a metodikai fejlesztést illetően a p53TAD esetén túlmenően tágabb értelemben is kerestem a megoldást.

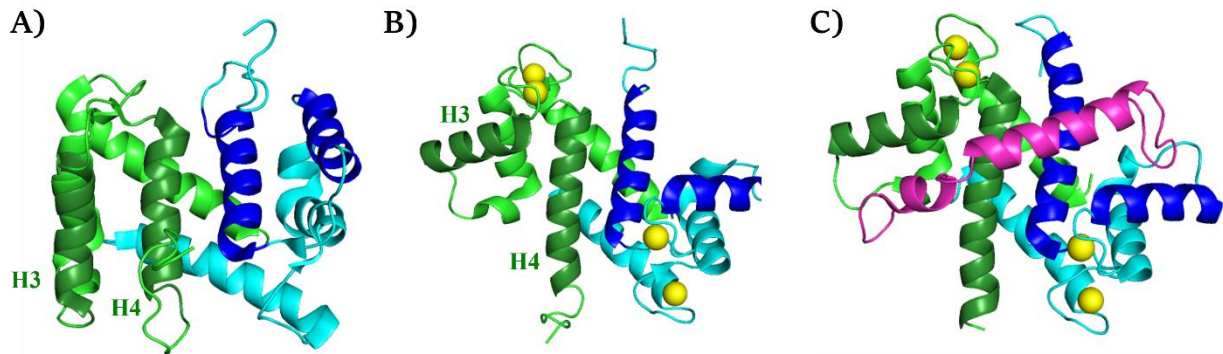
A p53 szabályozása leginkább a fehérjén bekövetkező poszttranszlációs módosításokon (PTM) keresztül történik. A TAD régióban a foszforiláció a fő szabályozó mechanizmus, itt hét Ser és két Thr foszforilációs környezet található. Enyhe DNS károsodás esetén a Ser15 és Ser20 foszforilálódik, és a p53 stabilizációját követve célgének transzkripcióját okozza. Míg a Ser15 és Ser20 foszforiláció kinetikája gyors, addig a sejtben az Ser46 foszforilációja órákkal a genotoxikus stressz után következik be (Oda 2000). Az Ser46 foszforilációját okozza a súlyos DNS károsodás, melynek következtében sejthalál stimuláló célgének kerülnek átírásra (BAX, p53AIP1, p53INP1, NOXA) (Liebl 2019). A foszforiláció hatásának tanulmányozásához a lehetséges kinázok közül a kutatásaim fókuszában a CK2 kazein kináz állt. Ismeretes, hogy a CK2 a p53 C-terminális szakaszán foszforilál, a TAD régióban történő hatásról csak nemrég számoltak be (Sun 2021). A predikció alapján a Thr55, Ser46, Ser6, Ser20 környezetek foszforilációja történik meg. Ennek a jelenségnek az ellenőrzése mellett olyan kérdéseket is körbejártam, vajon ezen környezetek közelében levő prolinok (elsősorban a Pro47) *cis/transz* egyensúlyát a foszforiláció befolyásolja-e és ez az NMR mérésekben hogyan detektálható?

2.2.2. A Ca²⁺-kötő, homodimer S100A4

Az S100 fehérjék kisméretű (~10-12 kDa tömegű), Ca²⁺-kötő, szimmetrikus homodimer szerkezetű családot alkotnak. Kizárólag gerincesekben fordulnak elő, fontos intra- és extracelluláris szerepük van többek között a sejtciklus és a sejtvezetési dinamikusan egyensúlyának szabályozásában, a Ca²⁺ homeosztázisban (Donato 2003). A család több tagjáról (S100A4, S100A6, S100A7, S100B) bizonyították, hogy különféle tumoros megbetegedésekben patológiásan jelentősek, nem meglepő tehát, ha potenciális terápiás célpontokká váltak (Bresnick 2015). A „kis színész, sok szerep” -ként számon tartott S100A4 (Boye 2010), tumoráttekttel, reumás artritisszel és egyes fibrotikus betegségekkel hozható kapcsolatba. Korreláció mutatható ki az S100A4 expressziós szintje és bizonyos tumoros sejtvonalak metasztázisra való hajlama között; klinikai kutatások szerint az S100A4 expressziója az agresszív tumor egyik jelentős markere; állatmodelleken pedig az S100A4 tumormetasztázis kialakulásában betöltött szerepére világítottak rá (Boye 2010, Huang 2012, Lukanidin 2012, Mishra 2012). A biológiai funkció megértéséhez, és bizonyos nem kívánt kölcsönhatások kiküszöböléséhez elengedhetetlenül szükségesek az atomi szintű jellemzések.

Kutatásunk a humán S100A4 fehérje kölcsönhatásainak megismerését célozta. A két, 101 aminosav hosszú monomerből felépülő fehérje szilárd és oldatfázisú szerkezete régóta ismert, jellemzése mind apo-, mind Ca²⁺-kötött formában megtörtént (Malashkevich 2008,

Pathuri 2008, Valley 2002). Szerkezete hasonló a család többi tagjának felépítéséhez: a monomer láncok mindegyike négy α -hélixből (H), három hurok (L) régióból, és egy mobilis C-terminális szakaszból áll. A kanonikus EF1-kéz motívum a H1-L1-H2 szakaszban található, a pszeudo-EF2- kéz motívum a H3-L3-H4 régióban helyezkedik el, a H2-H3 hélixet egy mobilis L2, „hinge”, azaz „csukló” hurok köti össze. A zártabb szerkezetű apo- forma monomerenként két Ca^{2+} iont tud koordinálni. A fémion kötődés nagy konformációs változással jár, melynek eredményeképpen a H3, H4 hélixek által övezett hidrofób felszíni mélyedés jelenik meg a fehérje felületén (2.2 ábra) (Dutta 2002, Malashkevich 2008).



2.2. ábra: A) Az apo-S100A4 (1M31.pdb) és B) a Ca^{2+} kötött S100A4 (2Q91.pdb) szerkezetei, jelölve a H3 és H4 hélixek, illetve C) az MPT-vel alkotott komplex szerkezete (3ZWH.pdb)

A kötőpartnerek ebben az árokban helyezkednek el és tipikusan α -helikális szerkezetet vesznek fel. Aminosav szekvenciájuk és biológiai funkciójuk tekintve a partnerek igen változatosak. Néhány kiemelt közülük az annexin A2 (Ecsédi 2017); a Tag7 és Hsp70 (Dukhanina 2009), a liprin β 1 (Kriajevska 2002) és az általam is vizsgált nemizom-miozin IIA (Kiss 2012, Kriajevska 1994, Ramagopal 2013), valamint a p53 transzkripció faktor (Grigorian 2001, Hiruta 2020, Orre 2013).

A kölcsönhatás és a Ca^{2+} ionok kötődése során bekövetkező szerkezeti és dinamikai változások követésének tisztázása világít rá a fehérje működésére, és az irodalomban „S100 dilemma” -ként emlegetett probléma feloldására. Ennek lényege, hogy szabad állapotban az S100 fehérjék kis Ca^{2+} kötő affinitással rendelkeznek (S100A4 esetében $K_d = 54 \mu\text{M}$ EF1 és $K_d = 3,3 \mu\text{M}$ EF2 esetén) (Ramagopal 2013), ugyanakkor más fémionok jelenléte is hatással van erre az egyensúlyra: a Zn^{2+} növeli, míg a K^+ csökkenti a Ca^{2+} affinitást. Ilyen feltételek mellett nem lehetséges a kellő telítődés ahhoz, hogy kapcsolóként tudjanak a Ca^{2+} szignalizációban működni, az viszont elképzelhető, hogy a citoplazmában nagyobb koncentrációban jelen legyenek anélkül, hogy a szabad Ca^{2+} ionokat teljes mértékben lekötnék (Fanò 1995). A partnerfehérjével történő kölcsönhatás viszont akár sokszorosára is növelheti Ca^{2+} affinitást, amint azt több (S100A1, S100B, S100A4) esetben is egyértelműen igazoltak (Malashkevich 2008, Markowitz 2005, Zimmer 2010). A nem-izom miozin IIA (NMIIA) és S100A4 közötti kirívóan erős kölcsönhatás ($K_d \leq 1 \text{ nM}$) a Ca^{2+} affinitás növekedését is maga után vonja, ami azt jelenti, hogy a két partner a μM nagyságrendű intracelluláris Ca^{2+} koncentráció mellett is képes kölcsönhatni (Badyal 2011, Elliott 2012). Az viszont továbbra is kérdéses maradt, vajon

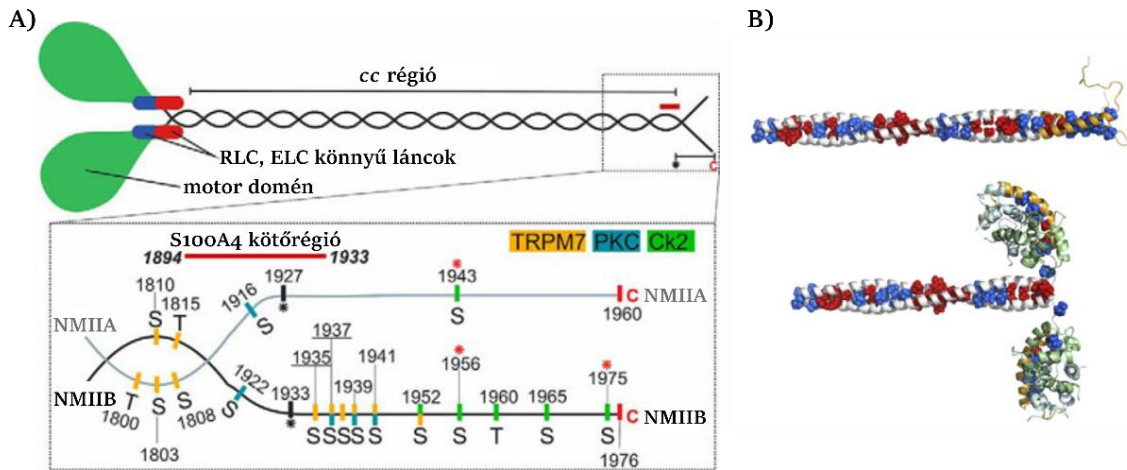
a Ca^{2+} affinitás növekedését szerkezeti vagy dinamikai tényezők okozzák. Ennek eldöntésére oldatfázisú NMR mérések eredményeim fényében lehet vállalkozni.

Az S100A4 fehérje és néhány kiválasztott partner kölcsönhatásának jellemzése több módszerrel történt/történik. Közös erőfeszítéseink arra irányulnak, hogy az atomi szintű leírást alapul véve az S100A4 működésének mechanizmusát feltárjuk, majd ezt követően irányított fehérje evolúcióval olyan fehérje-fehérje kölcsönhatást gátló (PPI) peptideket tervezhessünk, melyeknek akár terápiás felhasználása is lehet.

2.2.3. A nem-izom miozin NMIIA coiled-coil

Az *coiled-coil* (cc) szuperhélix két (vagy több) olyan α -hélix között alakul ki, amelyben az egymást követő heptádok első és negyedik aminosav oldallánca hidrofób természetű. A két láncot az így létrejövő hidrofób felszín varratszerűen tartja össze, amit az α -hélixek felszínén elhelyezkedő töltéssel rendelkező oldalláncok között létrejövő sóhidak tovább stabilizálnak (Lupas 2017). A DNS-kötő fehérjékben előforduló leucincipzár motívum a leginkább szabályos cc szekvencia, ez a szabályosság viszont a hosszú cc szekvenciákra (például a miozinokra) már kevésbé jellemző. Vizsgálataink a nem-izom miozin cc (NMII) jellemzésére irányultak. Három, 65-79%-ban szekvencia azonosságú: NMIIA, NMIIB, NMIIC izoformát különböztetünk meg, melyek a citoskeleton felépítésében minifilamentumokat képeznek. Mindhárom izoforma hasonló felépítésű (2.3A ábra): a motordomént tartalmazó fejrész két, 171-174kDa méretű nehézláncból áll, ezt követi két regulációs és két esszenciális könnyűlánc, majd a hosszú α -helikális cc régió, és a rövid, rendezetlen C-terminális szakasz. A cc szakasz végén található, és a filamentum képződésben kritikus szerepet betöltő ún. ACD (Assembly Competence Domain) régió, ami jellegzetes töltésmintázattal rendelkezik (Sellers 2000). Ezen aminosavak ionos kölcsönhatásai keresztül a filamentum összeállítását indítják el, és a folyamat kulcsfontosságú a sejtvezeték felépítésének és szétesésének szabályozásában (Vicente-Manzanares 2009). A filamentumok szétesése - ennek következtében a sejtvezeték fellazulása - a tumoros sejtek migrációját teszi lehetővé. Mindezek fényében a tumormetasztázis folyamatának kulcs lépése lehet a sejtek rögzítéséért felelős citoszolban található sejtvezeték fellazítása. A sejt a filamentumok összeállítását többféle módon szabályozza: (i) fehérje-fehérje kölcsönhatások létesítésével és (ii) a rendezetlen C-terminális, vagy ahhoz közeli szakaszokban történő foszforiláció útján. Az (i) esetben a partnerek közé sorolható az S100A4, vagy S100P, melyek kötődése megakadályozza az NMIIA filamentumképződését (2.3B ábra), de az NMIIB izoformára csak minimális a hatása. Mivel az NMIIC nem vesz részt a sejtvezetékben, így annak viselkedését nem igazán tanulmányozták. Ezzel szemben a (ii) esetben a foszforiláció az, ami az NMIIB filamentumok szétesését eredményezi (Murakami 2000) ami talán nem annyira meglepő, ha belegondolunk, hogy az NMIIA terminális végén csak 1 Ser foszforilációs hely található, az NMIIB terminális szakasz viszont bővelkedik Ser/Thr környezetekben, melyek foszforilációjában több kináz is közrejátszhat (2.3A ábra). Ennek ellenére az irodalomban a filamentumképzés szabályozási mechanizmusát, és a foszforilációt tekintve ellentmondásos adatok láttak napvilágot. A fentebb leírtak tükrében egyik elgondolás, hogy a filamentumképzés szabályozása az NMIIA esetében

a partnerfehérjék – elsősorban az S100A4 kötődésén keresztül, az NMIIB esetében pedig a C-terminális szakasz foszforilációján keresztül történik (Beach 2015, Murakami 2000). Egy másik elgondolás szerint az NMIIA Ser1943 környezetének foszforilációja jelentős konformációs változást eredményez, ami a megakadályozza az S100A4 kötődést, és ezáltal a filamentumképzést (Dulyaninova 2013).



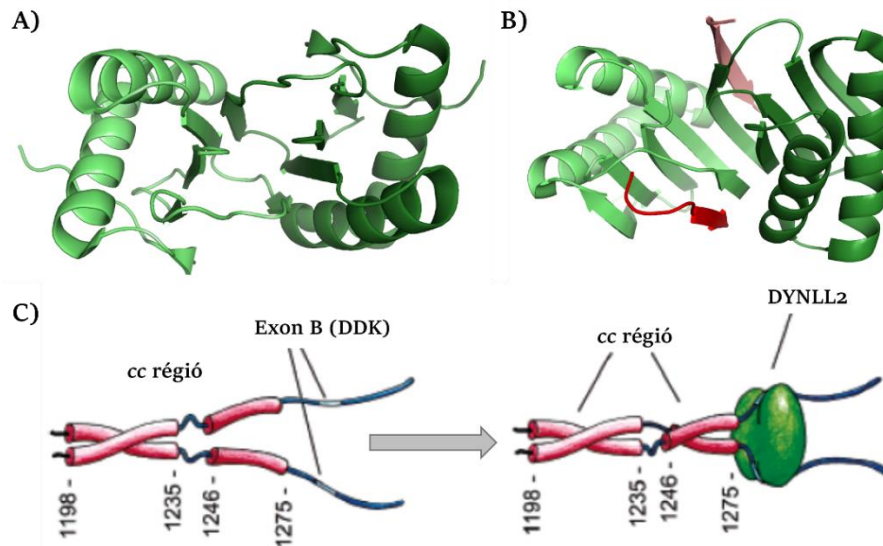
2.3. ábra: A) Az NMII sematikus felépítése (fent), kinagyítva a C-terminális régió NMIIA, illetve NMIIB izoformák esetében (lent). * jelöli a *cc* szakasz végét, és a rendezetlen szakasz kezdetét. Szinkódoltak a három kináz foszforilációs helyei, illetve az S100A4 kötőrégió (Ecsédi 2018 cikk alapján). B) Az NMII *cc* C-terminális szakaszának (fent) és az S100A4 fehérjével alkotott komplexének (lent) modellje. A *cc*-t felépítő heptádok *a* és *d* helyzeteiben levő, stabilitásért felelős aminosavak oldalláncjai gömbökkel vannak jelölve, késsel a nagy, hidrofób, stabilitást elősegítő; pirossal pedig a nem-optimalis, destabilizáló környezetek. Az S100A4 fehérjével kölcsönható régió narancssárga, az S100A4 alegységeit világoszöld és világoskék színek jelzik. A *cc* további részei szürkék. (Elliott 2012 cikk alapján)

A megállapítások kapcsán számos kérdés merülhet fel, úgy mint: mennyire befolyásolja az NMIIA, NMIIB farokrégiójának szerkezeti-dinamikai sajátosságait a foszforiláció? Illetve okozhat-e olyan nagymértékű konformációs változást a foszforiláció során beépülő negatív töltés? Ilyen és hasonló felvetések ellenőrzésére én az NMR spektroszkópia nyújtotta lehetőségeket aknáztam ki.

2.2.4. A homodimer dinein könnyű lánc és a miozin Va

Mindkét vizsgált fehérje a motorfehérjék családjához tartozik, azzal a különbséggel, hogy míg a dineinek a mikrotubulus mentén mozognak, addig a miozinok sínje az aktin filamentum. A 10 kDa méretű dinein könnyű lánc (LC8) jelenléte kulcsfontosságú az eukarióta sejtek működésében és több mint 100 kölcsönható partnerének köszönhetően csomóponti – „hub” – fehérjeként tartják számon. Szerepet játszik többek között az apoptózisban, a vírusfertőzések kialakulásában, a transzkripcióban, illetve a dinein és a miozin Va motorfehérje komplexek részeként az intracelluláris transzportfolyamatokban (Rapali 2011, Reardon 2020). Gerincesekben a nagyfokú szekvenciális azonosságot mutató DLC1 és DLC2 formák fordulnak elő, szerkezetük kristallográfiás és NMR spektroszkópiai úton szabad és partner peptidekkel kötött állapotban egyaránt ismert (Benison 2008, Day 2004, Fan 2001, Liang 1999). Fiziológias körülmények között homodimert alkotnak, melyet felületi kontaktusok, hidrofób

kölcsönhatások és hidrogén-hidak tartanak össze. A dimer magját két β -lemez alkotja, melyek öt-öt antiparallel szálból épülnek fel úgy, hogy négy szál az egyik, míg az ötödik a másik alegységéből származik. A β -lemezeket két-két α -hélix veszi körül. A β -redő széléin két mély, hidrofób kötőárok húzódik, ebben helyezkednek el a kötőpartnerek, melyek általában antiparallel β -redő szerkezetet vesznek fel, meghosszabbítva ezáltal a középső β -lemezt (2.4. ábra).



2.4. ábra: A) Az apo-DLC (1F3C.pdb) és B) ligandum (Bim) kötött – DYNLL2 tipikus szerkezete (1F95.pdb). C) A myoVa cc régió DLC kötő szakasza és a DLC2 fehérjével képezett komplexének modellje (Wagner 2006 cikk alapján)

A DLC kötőpartnerei rövid, lineáris peptid motívumok, melyek dimerizációs vagy cc régiók közelében található rendezetlen fehérje szakaszok részei és kötődés során a már említett rendezetlen – rendezett átalakulást mutatják (Fan 2001, Lightcap 2008, Lo 2001). Bár a kötőszekvenciák között kevés a hasonlóság, három tipikus motívumot különböztetünk meg, amelyekben a tetszőlegesen definiált 0 helyzetben egy konzervált glutamin található:

- K₃X₂T₁Q₀T₁X₂ (ez figyelhető meg a Bim, Bmf, Swallow, DIC partnereknél)
- K₃X₂T₁Q₀T₁X₂ (a nNOS partnernél)
- nem-kanonikus szekvenciák, mely egyik korábbi osztályba sem sorolhatóak (myoVa, Pak1)

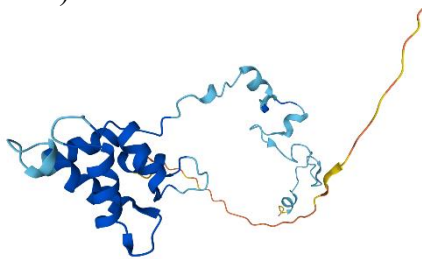
Kutatásainkban a kötőpartnerek közül mi a miozin-Va szakaszt vizsgáltuk több módszerrel. Ennek DYNLL2 kötésben részt vevő szakasza a 190 kDa méretű miozin-Va (myoVa) cc szerkezetű farokdoménjének mediális és disztális régiói között helyezkedik el. A nem-kanonikus, 15 aminosav hosszúságú kötőmotívum: IQPKDDKNT₋₁M₀T₁DST a 0 helyzetben nem glutamint, hanem metionint tartalmaz. Ahhoz, hogy az interakció létrejöjjön elengedhetetlen a kötőrégióon belül egy 3 aminosav hosszú B-exon (DDK) jelenléte is (Hódi 2006, Wagner 2006). Az NMR spektroszkópiai vizsgálatokkal annak az irodalmi feltételezésnek a körbejárására vállalkoztam, amely szerint a DLC-nek kargó-kötő szerepe van. Ez abból a hipotézisből ered, hogy egyaránt kötődik a dinein és a miozin Va motorfehérjékhez,

illetve olyan fehérjékhez, melyeket ez a két motor szállít. Így felmerülhet annak lehetősége, hogy a DLC egyik kötőárával a motorhoz, míg másikkal a szállított fehérjéhez kötődik.

2.2.5. A TPPP25

A konformációs betegségek (például a Parkinson kór) a központi idegrendszeri betegségek egy jelentős csoportját képviselik és kialakulásukban meghatározó szerepe van a rendezetlen fehérjéknek. Együtműködéseim során főként a magyar kutatók által azonosított agy-specifikus TPPP/p25 fehérje jellemzésébe kapcsolódtam be. A fehérje a Tubulin Polymerization Promoting Protein/p25 elnevezést a funkcióban betöltött szerepe és mérete alapján kapta (Hlavanda 2002, Takahashi 1993). Normál agyban a TPPP/p25 elsősorban az oligodendrocitákban fejeződik ki, és kölcsönható partnertől függően különböző funkciókat lát el fiziológias és patológias körülmények között, a fehérje génszintű változása nélkül. Fiziológias körülmények között a mikrotubuláris rendszer stabilitását és dinamikáját szabályozza, mikrotubulus kötegelő és tubulin acetilációt elősegítő aktivitása révén. Patológias körülmények között pedig az α -szinukleinnel kerül kölcsönhatásba. Ez az interakció aggregációt és további normálistól eltérő fehérje-fehérje kölcsönhatásokat idéz elő, amik a klinikai kórképre jellemző zárványtestek kialakulásához vezetnek. A TPPP/p25 és az alfa-szinuklein ko-lokalizációja és együttes feldúsulása humán agyban jellemző tünete a Parkinson-kórnak és más szinukleinopátiáknak.

Felépítését tekintve a 219 aminosav hosszú TPPP/p25 bővelkedik hidrofíl, töltéssel rendelkező aminosavakban: 23 Ala, 21 Gly, illetve 31 negatív (Asp, Glu) és 41 pozitív (Arg, Lys) töltésű környezete van. Az IUPRed2 jóslóprogram szerint az N-terminális ~ 1-60 szakaszban az aminosavakra kiszámolt érték $> 0,5$ ami arra utal, hogy ez a régió rendezetlen. A teljes fehérje szerkezetét kísérleti úton még nem határozták meg, viszont a ma már rendelkezésre álló AlphaFold szerint nagy bizonyossággal egy helikális maggal rendelkezik (2.5 ábra).



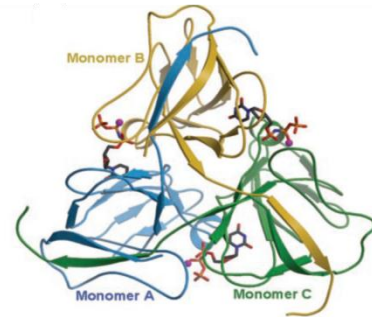
2.5. ábra: A TPPP/p25 AlphaFold által predikált szerkezte (AF-094811-F1). A jóslt szerkezeti elemnél megbízhatóbb, minél nagyobb az adott aminosavra kiadott pLDDT (per-residue confidence score) érték, ami 0-100 között változik. Kék: nagy megbízhatóság (>90); világoskék: megbízható: 70-90; sárga: kevésbé megbízható 50-70; narancssárga: kis megbízhatóság<50 (rendezetlen szakasz valószínűsíthető)

A TPPP/p25 atomi szintű jellemzése és partnereivel alkotott komplexeinek megismerése fontos feladat, hiszen ezek ismeretében lehetséges olyan gyógyszerjelölt molekulák kifejlesztése, melyek a kialakuló kölcsönhatásokat szelektíven befolyásolni tudják.

2.2.6. A dUTPáz enzim és a PPI

A dUTPázok (dezoxiuridin-trifoszfát nukleotido-hidroláz) egy eszenciális enzimcsalád tagjai, melyek mind a prokariótákban, mind az eukarióta szervezetekben előfordulnak (Vértessy 2009). Feladatuk meghiúsítani az uracil beépülését a DNS-be, így biztosítva annak egységét.

Felépítésük különleges, a legtöbb esetben egy homotrimer alakul ki, melyben a trimert három intermolekuláris kölcsönható felszín tartja össze, ezek: a szomszédos alegységek közötti felszín, a szomszédos monomer fölé hajló C-terminális kar és az enzim központi csatornája (2.6. ábra). A három szimmetrikus katalitikus hely felépítésében mindhárom alegység részt vesz. Az enzim által katalizált folyamat a dUTP hidrolízise, melynek során dUMP és pirofoszfát (PP_i) képződik. A szerkezet - funkció kapcsolatban igen jelentős szerep jut a Mg²⁺ kofaktornak, melynek jelenlétében a hidrolízis hatékonyabb.



2.6. ábra: Az *E.coli* dUTPáz : α,β -imino-dUTP : Mg²⁺ komplex szerkezete (1RN8.pdb). Az enzim három monomerje színekkel, a dUPNPP pálcikamoddal, a Mg²⁺ ionok lila gömbökkel jelöltek.

A reakció funkcionális szempontból a timidilát bioszintézishez szükséges dUMP mennyiséget, és a sejten belüli alacsony dUTP/dTTP arányt biztosítja, megakadályozva az uracil DNS-be történő beépülését. dUTPáz hiányában az ún. timinmentes sejthalál következik be. Korábbi kutatásokban kimutatták, hogy vírussal fertőzött, illetve rákos sejtekben az enzim gátlása sejthalálhoz vezet. Ezen eredmények fényében joggal merül fel az a kérdés, hogy a dUTPáz új célpont lehet antivirális/antitumor hatású gyógyszerek tervezésében. A megfelelő gyógyszertervezésnek viszont az enzim katalitikus mechanizmusának az ismerete fontos feltétele. Oldatfázisú jellemzéshez az NMR spektroszkópia adott módszer, ám a 60kDa méretű enzim vizsgálata során csak a terminális, rendezetlen farokrégiók detektálhatók (Dubrovay 2004). Így szerkezetük is leginkább krisztallográfiás meghatározásokból adható meg (Barabás 2004).

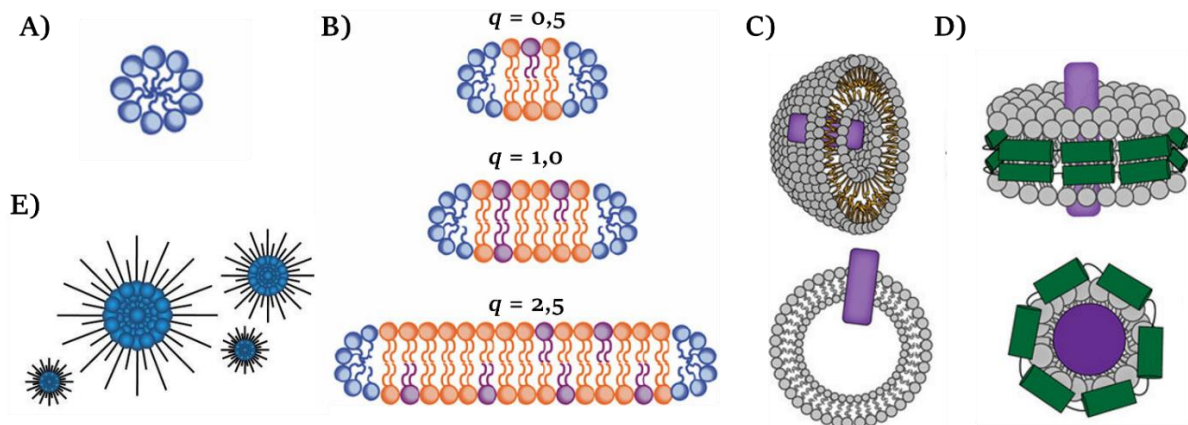
Tudvalevő, hogy a nukleozid foszfátok hidrolízise számos biológiai folyamatban (jelátvitel, DNS szintézis, anyagcsere) játszik szerepet. Annak ellenére, hogy ezt a reakciót különféle rendszerek esetében behatóan tanulmányozták, mégis olyan lényeges kérdések, mint a reakció útvonalának részletes atomi szintű jellemzése vagy mechanisztikus leírása sok esetben hiányos. A dUTPáz esetében a hidrolízis követése ³¹P NMR módszerekkel megvalósítható, és én ennek a folyamatnak a leírására vállalkoztam.

A ³¹P NMR mérések érzékenysége bizonyos, biológiai folyamatok kimenetelére hatással levő, nemkívánatos szennyezők egyértelmű kimutatására is alkalmas. A *Dictyostelium* Miozin II motor domén és az ATPáz ciklus kapcsolatát, és az aktin aktivációt feltérképező kutatásban nem vettem részt, de érdemesnek tartom megemlíteni azt az eredményt, amire valójában egy igen egyszerű kísérlettel sikerült rávilágítanom. Feladatom csupán arra korlátozódott, hogy megvizsgáljam, van-e a foszfát pufferben pirofoszfát szennyező, és ha igen, hogyan lehet mennyiségét csökkenteni, van-e ennek a biológiai kimenetelre valami hatása (Kintses 2007, Gyimesi 2007)?

2.3. Membránmimetikumok és peptid-membrán kölcsönhatások

A sejtmembrán egy komplex rendszer, így a membránban lejátszódó folyamatok tanulmányozása nagy kihívást jelent. Szerkezeti biológiai, gyógyszerfejlesztési szempontokból

a központi kérdés a membránfehérjék szerkezeti vizsgálata, hiszen a hatóanyag célpontok jórésze ezekre a rendszerekre irányul, (Hauser 2017, Odoemlam 2020, Overington 2006) gondoljunk csak a két kiemelt transzmembrán fehérjére: a számos hatóanyag célpont GPCR (G-fehérje kapcsolt receptor) és a manapság járványügyi szempontból elhíresült ACE2 fehérjékre (Hauser 2017, Medina-Enríquez 2020, Prabakaran 2004). A membránfehérjék ugyanakkor aktív szereplői a jelátviteli folyamatoknak, a sejtközi kommunikációnak, membrán transzportfolyamatoknak, a lipid és energia anyagcserének, mely folyamatokban aktív szerep jut az ion-csatornáknak (Capener 2002, Hilger 2021). Az ion-csatornák jellegzetessége, hogy membránmentes közegben általában instabilak, és nem, vagy csak részlegesen veszik fel natív térszerkezetüket. Ennek fényében a szerkezetmeghatározásuk – mivel a komplex összetételű sejtmembrán alkalmazása lehetetlen - főképpen modellmembránokban történik. A leggyakrabban használt mimetikumok a micellák, reverz micellák, bicellák, nanodiszkek, vezikulák, liposzómák, lipoprotein nanorészecskék (2.6 ábra) (Frauenfeld 2016, Kielec 2009, Majeed 2021, Sanders 1998, Warschawski 2011). A szerkezet meghatározó módszerek közül egyre nagyobb teret hódít a krio-EM technika, mellette továbbra is a krisztallográfiai és NMR spektroszkópiai módszerek használatosak. Az oldat- és szilárd-fázisú NMR módszerek hátránya a jelgazdag spektrumok nehézkes kezelése, kiértékelése és a rendszer méretéből adódó jelszélesedés, így egy micella közegben meghatározott szerkezet sem triviális (Fernández 2003, Liang 2016, Nielsen 2004, Tikhonova 2009, Unnerståle 2009).



2.6. ábra: Gyakorlatban alkalmazott membránmodellek: A) micella; B) változó összetételű bicella; C) liposzóma és D) nanodiszk oldal- illetve felülnézetből, lilával jelölve a fehérje fragmens/peptid; E) reverz micella (Chen 2015, Frick 2019, Duncke 2019 cikkek alapján)

Ugyanakkor a fehérje-membrán kölcsönhatások gyakran a membrán fizikai-kémiai paramétereinek (például folyékonyság, görbület) változásával járnak. Ebből következően számos kérdést vet fel a membránok viselkedésének megértése, és az NMR spektroszkópia ezen a területen tud hatékony válaszokat adni. A módszer adta lehetőségeket kihasználva kutatásaimban micella és bicella rendszerek biofizikai tulajdonságainak feltérképezésével és a fehérje fragmens/peptid membrán különböző részein való elhelyezkedésének meghatározásával foglalkoztam/foglalkozom. Az általam vizsgált mimetikumok kisméretűek, oldatbeli gyors bukdácsoló mozgásuknak köszönhetően izotróp közeget képeznek, melyben mind a fehérje, mind a lipid jelei jól jellemezhető NMR spektrumokat eredményeznek (Glover 2001, Liebau

2017, Vold 1997). A *micellák* a legegyszerűbben előállítható membránmimetikumok, detergens molekulákból épülnek fel, és általában szférikusak. Legismertebbek az SDS, DPC, és DHPC (dihexanoil-foszfadil-kolin) micellák. Hátrányuk, hogy nagy görbülettel rendelkeznek, ezáltal sejtmembrán alakjának modellezésére nem a legszerencsésebb választást jelentik. A korong alakú *bicellák* már jobb választásnak bizonyulnak, összetételükben a szegélyrészt képező vízdoldható, rövid szénláncú lipid és a kettősréteget alkotó vízdoldhatatlan, hosszú szénláncú lipid vesz részt (Sanders 1998). A bicella a q paraméterrel jellemezhető, ami a két lipid koncentrációjának aránya:

$$q = [\text{rövid szénláncú lipid}]/[\text{hosszú szénláncú lipid}] \quad (2.3.)$$

Oldatfázisú NMR vizsgálatokhoz a $q < 1$ bicellák alkalmasak, $q > 2$ arányoknál képződött korongszerű bicella rendszerek főleg szilárdfázisú NMR módszerek segítségével vizsgálhatók. Az eukarióta semleges töltésű sejtmembrán jó modellje a DHPC, és DMPC (dimirisztoil-foszfadil-kolin) összetételű – továbbiakban PC – bicella, aminek $q = 0,5$ értéknél a vastagsága megegyezik a sejtmembrán lipid kettősrétegének vastagságával. A negatív töltésű prokarióta membránok modellezésére a DMPC lipid tartalom egy részét DMPG (dimirisztoil-foszfadil-glicerol) molekulákra cserélik. Tipikusan 20% negatív töltésű rendszereket alkalmaznak, továbbiakban ezekre PC/PG bicellaként hivatkozom.

Az így előállított lipid kettősréteg egy dinamikus rendszer, melyben a lipid molekulák sokféle mozgást végeznek. A membránnal kölcsönható fehérje/peptid a lipid dinamikai viselkedésében is okoz változásokat. Az NMR spektroszkópiával tanulmányozható spin relaxáció a lipid molekulák mozgásának leírásával ezekre a tulajdonságokra tud rávilágítani. Én elsősorban a bicella oldaláról vizsgáltam és ^{13}C és ^{31}P NMR spektroszkópiai módszereket alkalmazva olyan kérdésekre kerestem a válaszokat, mint például hogyan változtatja meg a transzmembrán hélix jelenléte a lokális mozgásokat (Biverstáhl 2009), vagy lehetséges-e ^{31}P mérések útján a fehérje membránban való elhelyezkedését, topológiáját megadni (Bodor 2015). Másfelől a peptid-bicella kölcsönhatások tanulmányozásánál az interakció létrejöttére leginkább a rendszer méretváltozásából szoktak következtetni, valamilyen globális paraméter, leginkább a hidrodinamikai sugár értékéből. Ennek meghatározására több technika is alkalmazható, így NMR, SAXS/SANS, DLS, TEM, fluoreszcencia, vagy akár MD szimuláció (Luchette 2001, Morrison 2012, Mortensen 2018, Vestergaard 2015). Jómagam is korábbi vizsgálatok során DLS módszerrel meghatározott translációs diffúziós értékből származtattam a rendszer hidrodinamikai sugarát, ám nem gondolom, hogy minden esetben a Stokes-Einstein egyenletből számolt hidrodinamikai sugár értékek valóban reálisak, sőt, a különböző körülmények között mért értékek biztosan nem összevethetőek – ennek ellenére az ilyen összehasonlítás bevett gyakorlat az irodalomban. A bicella rendszereket illetően mai napig nem tisztázott a valós molekuláris összetétel, $q = 0,5$ arányú 50mM DMPC-100mM DHPC bicellák esetén az aggregációs számra megadott értékek tág határok között változnak: $N(\text{DMPC}) = 15-68$ és $N(\text{DHPC}) = 30-115$, ami nagyon más hidrodinamikai sugár értéket eredményez. Ezek után arra voltam kíváncsi, vajon egy szisztematikus, egymást kiegészítő NMR-SAXS módszereken

alapuló eljárás, ugyanazon mintán, ugyanolyan kísérleti körülmények között a bicella milyen méret és alak leírását képes adni? (Dudás 2020b)

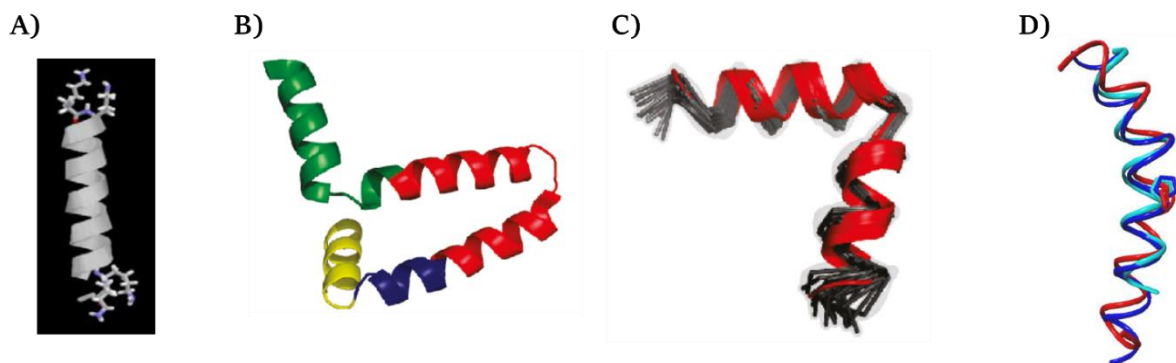
Az említett kérdéskörök megválaszolásához ismert topológiájú rendszereket használtam, melyek transzmembrán, vagy felületaktív elhelyezkedését a membránban/mimetikumban már leírták. Az alkalmazott peptidek: a mesterséges Kalp; a KvaP és HsapBK K⁺ csatornák transzmembrán régiói; a felületaktív dinorfin egy szakasza, és a melittin - ezek jellemzőit a 2.2 táblázatban gyűjtöttem össze.

A mesterségesen előállított GKK(LA)_xKKA általános szekvenciával leírható Kalp peptidek rövid hidrofil terminális szakaszok által közrefogott, változó hosszúságú ismétlődő Leu-Ala motívumokat tartalmaznak, melyek egy membrán hélixet képeznek. Ennek transzmembrán jellegét WALP mutáns segítségével számos módszerrel igazolták. Én a PC bicellákba jól illeszkedő Kalp21 és Kalp23 variánsokkal dolgoztam (De Planque 2003, Killian 2003).

2.2. táblázat: A tanulmányozott peptidek hosszai, az aminosav szekvenciák és nettó töltésük

| Név | aa | Aminosav szekvencia | Töltés |
|----------|----|---|--------|
| Kalp21 | 21 | GKKLA LALAL ALALA LALKK A | +4 |
| Kalp23 | 23 | GKKLA LALAL ALALA LALAL KKA | +4 |
| KvaP | 35 | PAGLL ALIEG HLAGL GLFRL VRLLR FLRIL LIISR | +5 |
| HsapBK | 28 | PVFVS VYLNK SWLGL RFLRA LRLIQ FSE | +4 |
| DynB | 13 | YGGFL RRDFK VVT | +2 |
| Melittin | 27 | GIGAV LKVLT TGLPP ALISW IKRKR QQ | +5 |
| Kalp21 | 21 | GKKLA LALAL ALALA LALKK A | +4 |
| Kalp23 | 23 | GKKLA LALAL ALALA LALAL KKA | +4 |

A 13 aminosav hosszú, arginin és lizin aminosavban gazdag dinorfin (dynB) a κ -opioid receptor endogén peptidje, mely a membrán felületével kerül interakcióba. A kölcsönhatás nem okoz szerkezeti változást, kötött állapotban is megmarad a rendezetlen peptid viselkedés (Lind 2006, Marinova 2005).

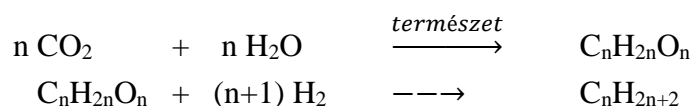


2.7. ábra: A tanulmányozott peptidek szerkezetei: A) a mesterséges Kalp; B) a KvaP S3-S4 szakasza (1ORQ.odb); C) a HsapBK S3B-S4 régiójának DPC micellában meghatározott szerkezete; D) három irodalomban található melittin szerkezetének összehasonlítása (Killian 2003, Unnerstale 2009 és Ramirez 2018 cikkek alapján)

Az *Apis mellifera* méhből származó, hemolitikus aktivitással rendelkező 27 aminosav hosszú melittin peptid számos membrán kölcsönhatás tanulmány tárgyát képezte (Dempsey 1990, Hong 2019, Ramirez 2019, Steiner 1981). A hélix-kanyar-hélix szerkezet és a hosszabb hélix tengelye a membrán felületével párhuzamosan helyezkedik el, ezáltal felületaktív modellként alkalmazható. Membrántörő, hemolitikus aktivitása kísérleti körülményeink és az alkalmazott koncentráció arányok mellett nem tapasztalható, a bicella szerkezetében hetek múlva sem okoz változást, az NMR spektrumok változatlanok maradnak.

2.4. Fenntartható fejlődés, NMR spektroszkópia a „zöld kémiában” és ipari eljárásokban

A fenntartható fejlődés alapkérdései közé tartozik, hogy a társadalom növekvő energiaigényét milyen forrásokból sikerül biztosítani. A fosszilis energiahordozó (kőolaj, földgáz) készletek végesek, ezért a figyelem jövedelme új, alternatív nyersanyag- és energiaforrások felderítésére irányult. Egy ilyen megújuló energiaforrásnak a *biomassza* bizonyul, ami elsősorban szén, hidrogén és oxigén alapú, és amiből a természet évi kb. 170 billió tonnát termel, főleg fotoszintézis útján (Corma 2007, Van Der Waal 2016). Az említett mennyiség 75%-át szénhidrogének alkotják, ezek hexózok (leginkább glükóz) és pentózok (leginkább xilóz) – összességében a leggazdagabb megújuló energiaforrást jelenthetik. A bevezetett "biofinomító" koncepció alternatívát jelent szén-alapú építőelemek: *platform molekulák* előállítására, amelyek átvehetik a jelenleg fosszilis eredetű alapanyagok vegyiparban betöltött szerepét (Kamm 2008). A „megújuló” olaj előállítása az alábbi általános reakciók szerint történhet:



A biomassza különféle oxigéntartalmú vegyületekké és szénhidrogénekké történő átalakítása fermentáció, vagy kémiai transzformáció útján valósítható meg. Abból kiindulva, hogy a biomassza egy igen komplex rendszer, a kémiai átalakítás nem triviális feladat. Kutatásaim során egy ilyen típusú munkába kapcsolódtam be, és vizsgálatainkban annak próbáltunk utánajárni, hogy egyaránt alkalmazva homogén és heterogén katalitikus rendszereket, megvalósítható-e a szacharóz lépcsőzetes átalakítása olyan termékekké, mint a kiemelt fontosságú levulinsav, a γ -valerolakton (GVL), illetve végtermékként alkán elegyek. A levulinsav, vagy 4-oxopentánsav két funkcionális csoportjának (keto- és karboxil csoport) köszönhetően az energia előállítás mellett fontos alternatívát jelent több vegyipari intermediér szintézisére. Mint megújuló forrásból származó oxigéntartalmú építőelem a top 10 legvonzóbb platform molekula között tartják számon (Upare 2013). A GVL (5-metil-4,5-dihidrofuran-2(3H)-on) a természetben különböző gyümölcsfélékben, pl. narancsban, fordul elő, felhasználják élelmiszeripari adalékként, és az illatszeriparban is. Stabil molekula, tág hőmérséklet tartományban biztonságosan, nagy mennyiségben tárolható és szállítható. További kedvező fizikai és kémiai tulajdonságainak köszönhetően felkerült a biomassza alapú platform molekulák listájára és biztonságos alternatív energiaforrásként tekintenek rá (Ding 2014,

Horváth 2008, Osakada 1982). A molekulában található aszimmetria-centrumnak köszönhetően enantiomertiszta formában alkalmas lehet királis, adott esetben fontos biológiai aktivitással rendelkező vegyületek előállítására. A levulinsav egy másik, kiemelt átalakítása a 2-metil tetrahidrofurán, melyet „zöld” oldószerként történő alkalmazása a kedvezőtlenebb tetrahidrofurán felváltására szolgál.

Ahhoz, hogy a felsorolt termékek előállíthatóvá váljanak, kontrollált módon, megfelelő katalizátorok alkalmazásával kell a szacharóz átalakítását megvalósítani. A többlépéses folyamatban az NMR spektroszkópia a reakcióelegyek jellemzése során aknázható ki, azt is szem előtt tartva, hogy az adott vegyület összegképletén, és az intramolekuláris arányok megadásán túlmenően a szerkezeti képlet is meghatározható. Nagy előnye a vizsgálatoknak, hogy nagynyomású mérések is kivitelezhetőek, így a hidrogénezési folyamat akár *in situ* is követhető, a keletkező specieszek pedig detektálhatók.

A biomassza átalakítása csak egy módja a „zöld kémiai” megoldások keresésének. Nagy erőfeszítések történnek kisebb környezeti szennyezést okozó „zöld kémiai” reakcióutak megtalálására, így a szerves oldószerek helyettesítésére keresnek alternatívákat. Az elmúlt évtizedekben e tekintetben az ionos folyadékok felé fordult a figyelem. Ezek az ionpár felépítésű folyadékok különböző mértékben képesek vagy nem elegyedni szerves oldószerekkel, ami lehetőséget biztosít két- vagy akár többfázisú reakciók megvalósítására. Polaritásuk a homogén reakciókban leginkább alkalmazott alkohol oldószerekéhez hasonló; egyaránt jól oldják a szervetlen és szerves vegyületeket, és a fémkatalizátorokat; termikus stabilitásuk lehetővé teszi tág hőmérséklettartományban történő alkalmazásukat (Lei 2017, Singh 2020, Vekariya 2017). Nem párolognak, nem éghetőek és nem jelentenek egészségre különös veszélyt, így biztonságtechnikai szempontból is vonzóak. Ennyi pozitív tulajdonság birtokában felmerül a kérdés, vajon a reakciók lejátszódása hasonló, mint a jól bevált szerves oldószerekben történő megfelelőik. Ahhoz, hogy ezt eldönthessük modellreakciók ionos közegben történő vizsgálatát kell elvégezni. Jómagam az imidazolium alapú ionos folyadékok alkalmazási lehetőségeit vizsgáltam cérium mediált oxidációs folyamatokban, a reakcióutakra és a képződött vegyületek azonosítására NMR spektroszkópiai módszerek segítségével igyekeztem rávilágítani. A stabil, nagy oxidációs potenciál értékkel (1,61 V) rendelkező Ce(IV) ammónium nitrát sóját (CAN) széleskörűen alkalmazzák szerves kémiai oxido-redox folyamatokban, ahol egy-elektron transzfer során a szintén stabil Ce(III) képződik (Sridharan 2010). Különböző módszerekkel történő vizsgálatainkban Ce(IV) sók ionos folyadékokkal történő elegyedését tanulmányoztuk és a benzilalkohol benzaldehiddé történő oxidációjának ilyen közegben történő lejátszódására voltunk kíváncsiak. Az NMR spektroszkópiai mérések során az oxidálódó környezet szelektív ^{13}C -jelölésével (Ph- ^{13}C H $_2$ OH) elérhető, hogy ne csak a termékekről, hanem az esetlegesen detektálható kis koncentrációban jelen levő intermedierekről is képet lehessen alkotni.

Kutatásaim során volt szerencsém olyan ipari, poliuretán gyártáshoz kapcsolódó témákon is dolgozni, amik jól bevált folyamatok reakcióútjának felderítésére összpontosultak. A mindennapi életünkben elterjedt poliuretán műanyagok alkotóelemei az aromás és alifás

izocianátok (Kapp 2014). Bevonatként leginkább alifás poliizocianátokat alkalmaznak, melyek előállítása hexametilén-diizocianátból (HDI) történik, ezek közül is a HDI oligomerek a preferáltak (Bohnet 2002). Ezek előállítása a monomer izocianátok ciklooligomerizációjával történik katalitikus úton, tri-n-butilfoszfin jelenlétében. Annak ellenére, hogy a foszfinokat évtizedek óta alkalmazzák a folyamatban, mechanisztikus vizsgálat kivitelezése nem állt rendelkezésre. Kutatásaim arra irányultak, hogy ^{13}C izotópjelölt monomerekből kiindulva, kis hőmérsékletű NMR mérésekkel próbáltam a lehetséges intermediereket megtalálni, így a reakciómechanizmust felvázolni.

Összegzésként elmondható, hogy a fentebb ismertetett nagyon szerteágazó, sokszálú tudományterületek mindenikében felmerülnek olyan témakörök, melyekben az NMR spektroszkópia által nyújtott oldatfázisú atomi vizsgálatok nélkülözhetetlenek és a megoldásokat keresve az NMR módszerek széles tárházát alkalmazni lehet.

3. Célkitűzések

Kutatásaim során – elsősorban NMR spektroszkópusként - több célt tartottam szem előtt. Egyfelől törekedtem arra, hogy általánosan is alkalmazható módszereket dolgozzak ki, másfelől próbálkoztam azzal, hogy egy adott területen jól bevált, rutinszerű méréseket hogyan lehetne más területen meghonosítani. Amennyiben adott biológiai rendszer megismerése a cél, hogyan lehet egy minél teljesebb jellemzést megadni, esetleg milyen új mérési módszereket érdemes használni, vagy kifejleszteni. Az NMR spektroszkópia nyújtotta egyedi lehetőségeket kihasználva olyan megoldásokat kerestem, amelyek viszonylag rövid mérési idő alatt biológiai rendszerekről információt szolgáltatnak, másfelől új mérési módszerek bevezetésével igyekeztem bővíteni a fehérjék viselkedésének megismerését. Amennyiben adott kérdések megválaszolására egy technika nyújtotta lehetőségek nem elegendőek és társ-módszereket kell alkalmazni, külön figyelmet fordítottam arra, hogy adott technikák milyen módon ötvözhetőek optimálisan. Ezeket szem előtt tartva az alábbi célokat fogalmaztam meg:

1) Az NMR spektroszkópia *globális* paramétereinek alkalmazhatóságát tekintve célul tűztem ki, hogy szisztematikusan elvégzett transzlációs diffúziós mérésekkel; megfelelően megválasztott, jól jellemzett globuláris és rendezetlen fehérjéket felhasználva empirikus *D-M* esetleg r_H-N összefüggéseket határozzak meg. Olyan kérdésekre kerestem válaszokat, hogy vajon ilyen mérésekkel megkülönböztethetővé válnak-e a globuláris és rendezetlen fehérjék? A tipikus biomolekulás körülmények mellett alkalmazható-e a Stokes- Einstein egyenlet? Milyen alkalmazásai lehetnek ezen összefüggéseknek?

2) A rendezetlen fehérjék atomi szintű jellemzése elsősorban fiziológiai körülmények mellett releváns. Ilyen vizsgálatoknál a jól bevált $^1H^N$ - detektálás mellett egyéb módszerek szükségesek. Elgondolásom szerint egy megoldást a $^1H^\alpha$ - detektált módszerek jelentenének, és első lépésben célul tűztem ki egy szelektív, mindkét dimenzióban a lehetséges maximális lecsatolást biztosító 2D korrelációs mérés megtervezését. Egy általánosságban bevezetendő új pulzus-szekvencia akkor lehet sikeres, ha a biológiai minta készítésekor nem kell a mintát D_2O -ban oldani, tehát a szekvenciának megfelelő vízelnyomást kell biztosítani, így az 5-10% D_2O tartalmú minták vizsgálatát lehetővé teszi.

3) A konformációs heterogenitáshoz nagymértékben hozzájáruló prolin *cisz-transz* izomerek kimutatása a rendezetlen fehérjék viselkedésének megismerésének újabb lehetőségét rejti. Az akár kis mennyiségben jelenlevő izomerek egyértelmű azonosítására prolin szelektív pulzusszekvenciák tervezését tűztem célul, és modellrendszerként a p53TAD¹⁻⁶⁰ régióját választottam. Arról is meg szerettem volna győződni, hogy a $^1H^\alpha$ - detektált módszerek segítségével a kialakuló *cisz-transz* prolin egyensúlyt vajon egy prolin közelében történő poszttranszlációs folyamat megzavarja-e és ezt sikerül-e kimutatni?

4) A *cisz-transz* prolin egyensúly kialakulásánál változó mennyiségben jelenlevő *cisz* izomer kialakulásának okait szerettem volna megvizsgálni. Az okok közül először is azt akartam körbejárni, vajon a prolin szomszédságában levő aminosavak természete hogyan befolyásolja a *cisz* izomer jelenlétét?

5) A funkcionális megismerés végett egy másik célom a rendezetlen a p53TAD¹⁻⁶⁰ régiójának szerkezeti hajlamainak és dinamikai viselkedésének megismerése volt, szabad, illetve S100A4 fehérjéhez kötött állapotban. Hogy lehet a kialakult komplexet jellemezni?

6) A metasztázis marker Ca²⁺-kötő homodimer S100A4 fehérje egy másik partnere a miozin IIA fragmens. Ezen kölcsönhatás leírását tűztem ki célul, mindkét kötőpartner oldaláról vizsgálódva, olyan kérdésekre is választ keresve, hogyan és hol történik a rendezetlen-rendezett átalakulás? A szerkezeti és dinamikai információk fényében a Ca²⁺- affinitás változásáról lehet-e következtetéseket levonni? A miozin coiled-coilok esetében milyen jelentősége van a foszforilációnak, illetve az S100A4 kölcsönhatás felelős-e a filamentumok széteséséért?

7) A homodimer fehérjék témakörben olyan célokat is megfogalmaztam, vajon a dinein könnyű lánc (DLC) rendelkezik-e „kargó/kötő” tulajdonságokkal? A miozin Va szakasszal történő kölcsönhatása során lehet-e olyan körülményeket teremteni, hogy a két ekvivalens kötőzsebet különböző partner foglalja el, ez által lehetővé téve az ún. „kargókötő” szállítást? Detektálható-e a miozinVa esetében rendezetlen-rendezett átmenet, illetve vannak-e másodlagos kötőhelyek?

8) A tubulin polimerizáció promoter (TPPP25) fehérje irodalomban kevésbé ismert szerkezeti jellemzését tűztem ki célul, továbbá a fehérje funkcióinak feltérképezéséhez a GTPáz aktivitás, illetve a Zn²⁺ kötődés lehetőségeire szerettem volna rávilágítani.

9) NMR spektroszkópusként foglalkoztatott az a kérdés, vajon egyszerű ³¹P NMR mérések segíthetnek-e a biológiai rendszerek viselkedésének leírásában? Egy jó példának mutatkozott a korábbi TPPP25 GTPáz aktivitás vizsgálata mellett a dUTPáz mechanizmusának feltérképezése Mg²⁺ fémion jelenlétében és hiányában. Ugyanakkor felmerült a kérdés, vajon kis mennyiségben jelen levő szennyező kimutatása, átalakítása, hogyan befolyásolja egy biológiai kölcsönhatás menetét?

10) Érdeklődve tanulmányozom a bicella membránmimetikumok és peptidok kölcsönhatását. Ebben a témakörben olyan kérdések megválaszolására vállalkoztam, mint: feszültségfüggő ioncsatorna szakaszok konkrét esetében a ¹³C relaxációs mérések mit árulnak el a kettős rétegben való elhelyezkedésről? Milyen módszerrel dönthető el egyszerűen, hogy a peptid felületaktív, vagy transzmembrán elhelyezkedésű? Mit mondanak a ³¹P NMR relaxációs vizsgálatok? Transzlációs diffúziós ¹H NMR mérések és SAXS szórásgörbék alapján történő vizsgálatok tudnak-e erre érdemben válaszolni?

11) Izgalmas dolog az egyszerű, klasszikus NMR mérésekből lényeges következtetésekre jutni nem-szokványos körülmények mellett. „Zöldebb” szerves kémiai folyamatok vizsgálatában szerettem volna ezekre rávilágítani, így célul tűztem ki, vajon alkalmazható-e sikerrel a nagynyomású NMR technika biomassza átalakulás monitorizálására? A modellreakciók milyen módon játszódnak le ionos folyadékokban? Kis hőmérsékletű mérésekkel hogyan lehet feltérképezni a reakció intermediereket, és megadható-e egy reakciómechanizmus?

4. Kísérleti rész

4.1. Fehérjék előállítása

In vitro vizsgálatainkhoz a fehérjék/fehérje szakaszok előállítása génexpressziós technikával történt. Az eredményekben tárgyalt rendszerek esetében az expressziós munkában nem vettem részt, az a szakmai együttműködő partnerek feladata volt. Viszont posztdoktori tanulmányaim során lehetőségem nyílt a lundi egyetem elsajátítani ezt a technikát, ahol a K⁺ csatorna evező régiójának expresszióját próbáltam megoldani, és az itt bemutatott fehérjék előállítása is hasonlóképpen történt. Minden esetben T7 promóterrel rendelkező *Escherichia coli* baktériumtörzseket használtunk. A megfelelően megtervezett, fehérjét kódoló DNS szekvenciát endonukleázok és T4 DNS-ligáz segítségével kis méretű cirkuláris DNS-ekbe - úgynevezett plazmid vektorokba - építettük be. Ezt követte a transzformálás, az előállított konstrukciók sejtekbe történő bejuttatása, majd ezek növesztése Luria-Bertani (LB) táplevesben. Az expresszió indukálása IPTG hozzáadásával történt. Amennyiben izotópjelölt fehérje előállítása volt a cél, úgy a felnövesztett sejtek minimál tápoldatba kerültek, ahol a nitrogén- illetve szénforrást ¹⁵NH₄Cl, illetve ¹³C-glükóz biztosították. Ezután következett a sejtek feltárása, ami fagyasztás és ultrahangos szonikálás segítségével történt, majd a célfehérje tisztítása. Az általunk vizsgált fehérjék esetében egy expresszió során az előállított mennyiség 1-10 mg körüli volt, ami 1-3 NMR mintára elegendő. A kutatások során minden esetben ennél több mintára volt szükség, és fontos megjegyezni, hogy a különböző expressziók eredményeképpen született szabad fehérjék spektrumai tökéletesen reprodukálhatóak voltak.

4.2. Membránmimetikumok és alkalmazott peptidek

A DHPC, DMPC, DMPG lipideket > 99%-os tisztaságú por formában az Avanti Polar Lipids (Alabaster, Al, USA) cégtől rendeltük, és további tisztítás nélkül használtam őket. A bicella oldat készítése többféleképpen is történhet, de kísérleti úton meggyőződtem, hogy az általam vizsgált rendszerek esetében minden módszerrel ugyanazok az eredmények születtek. A vízben jól oldódó DHPC-ből 1M törzsoldatot készítettem. Egy centrifuga csőbe pontos tömegben kimért DMPC (illetve a DMPG/DMPC 20/80 arányban) desztillált vízzel szuszpenziót képez, amihez folyamatos vortexelés, rázatás mellett a kívánt mennyiségű DHPC oldatot adagoltam. Az izotróp oldatfázis eléréséhez az így készült törzsoldatot rövid ideig 50°C hőmérsékleten tartottam, majd jeges vízzel hűtöttem, és ezt a folyamatot többször megismételtem. A végső térfogatra állított törzsoldat tipikus összetétele 100mM DMPC, 200mM DHPC, 50mM foszfátpuffer (pH = 7,4) volt és szobahőmérsékleten legalább 12 órán át állni hagytam. Ezt követően készültek az NMR minták, és ezt a törzsoldatot használtam peptid-bicella oldatok előállításához. A minták reprodukálhatósága személytől és kutatási helyszíntől függetlenül kiváló, ezt ¹H és ³¹P NMR mérésekkel ellenőriztem.

Ezen kutatáshoz használt peptideket a PolyPeptide Group cégtől (Strasbourg, Franciaország) rendeltük, és minden további tisztítás nélkül használtam őket. Az 1-3mM

koncentrációnak megfelelő tömegű peptidet a szükséges térfogatú bicella törzsoldatban oldottam, és folyamatos vortexelés mellett, színtelen, átlátszó, izotróp oldatot kaptam.

4.3. NMR minták, készülékek, mérések

Általánosságban elmondható, hogy a fehérjék tanulmányozásánál jelazonosítás céljából $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -jelölt, a kötődés- és dinamikai vizsgálatokhoz pedig ^{15}N -jelölt mintákat használtam. Amennyiben a hidrodinamikai paraméterek meghatározása volt a cél, természetes izotópeloszlású fehérjékkel/peptidekkel dolgoztam. A fehérjéket az említett expressziós módszerekkel, és a vizsgált peptideket szilárdfázisú peptid szintézissel állították elő az együttműködő partnerek.

A vizsgált NMR minta tipikusan 0,5-1,0mM fehérjét tartalmazott, de több esetben az 50-300 μM tartományban is dolgoztam, 5-10% D_2O tartalom mellett. 5mm normál vagy Shigemii csöveket használtam, ahol az oldat térfogata 500, illetve 280 μl volt.

A kívánt hőmérséklet beállításához a mérőfejek előzetes hőmérséklet kalibrációját végeztem el, ami a standard metanolos oldat felhasználásával történt. A translációs diffúziós mérések kiértékeléséhez szükséges, mérőfejre jellemző korrekciós konstans értékét a 25°C-on mért HDO translációs diffúziós együtthatója ismeretében határoztam meg. Ehhez az 1% H_2O , 0,1% CH_3OH és 0,1mg GdCl_3 tartalmú standard D_2O mintát használtam.

A megbízható, reprodukálható jelazonosításhoz a kémiai eltolódás referálása ^1H esetében a DSS jelére történt (0,000 ppm), ^{13}C , illetve ^{15}N magokra a IUPAC giromágneses együtthatók arányán alapuló módszerét alkalmaztam.

A dolgozatomban bemutatott NMR mérések nagyrésze az ELTE Kémia Intézetében a 700MHz-es Bruker Avance III készüléken történt, 5 mm, z-gradienssel ellátott, szobahőmérsékletű $^1\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ TCI, valamint N_2 -hűtésű Prodigy $^1\text{H}\&^{19}\text{F}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ TCI mérőfejeket használtam. További méréseket végeztem a Kémiai Intézet 500MHz és a 250MHz Bruker Avance spektrométerein, és az optimális mérés érdekében 5mm BBI, BBO, QNP, illetve 10mm BBO mérőfejeket egyaránt használtam. A Stockholmi Egyetemen 5mm BBO mérőfejjel ellátott Bruker Avance 400MHz, és 500MHz készülékeken dolgoztam, néhány mérés a Debreceni Egyetem 5mm BBI mérőfejjel ellátott 500MHz-es spektrométerén készült. Kutatási együttműködés kapcsán a karlsruhei KIT egyetemen 600MHz, 5 mm $^1\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ TCI kriomérőfejjel ellátott berendezést használtam. A BioNMR keretprogramban lehetőségem nyílt a firenzei CERM központban található 700MHz és 900MHz, kriogén hűtésű TCO mérőfejjel felszerelt készülékek használatára. Az EastNMR keretében az oxfordi házi építésű 950MHz berendezésen mértem. Egy belga – magyar együttműködés keretében a leuveni 300MHz-es készüléket használtam. A több készüléken való munka, a több felhasználói stílus megismerése számos tapasztalattal gazdagított, és gyakorlatban is kitűnt, hogy megfelelő kalibrálást követően a készülékek „átjárhatósága” nagyon jó.

A továbbiakban az NMR spektroszkópiai módszerek tárházából csak azokat a technikákat ismertetem, melyeket a kísérleteink során alkalmaztunk, illetve amelyek felsorolása az adott témát érintően elengedhetetlenül szükséges. Jobb áttekintés érdekében külön tárgyalom

a rendezetlen és globuláris fehérjék jellemzésére tipikusan használt megközelítéseket. Ugyancsak külön választom az ún. *globális* paraméterek meghatározását, melyek a rendszert, mint egészet jellemzik, és a *lokális* paraméterek meghatározását, ami az adott környezet kémiai eltolódásainak megadását és a jelazonosítást jelenti.

4.3.1. Globális paraméterek meghatározása

A molekulák méretének és alakjának egyik jellemző paramétere a D translációs diffúziós együttható. A D értékének meghatározásához a kismolekulákénál rövidebb T_2 relaxációs idővel rendelkező makromolekulák esetében a stimulált ekho és longitudinális maradék örvényáram lecsengéses pulzusszekvenciákat, illetve amennyiben szükséges volt, oldószer elnyomást is használtam. A *led* és *stebpgps* szekvenciákkal is futtatott kísérletek azonos eredményre vezettek, általánosságban én a *stebpgps* szekvenciát alkalmaztam, és minden mérésnél optimaltam a defázisoló/refókuszáló gradiens pulzus hosszát (δ) és a diffúziós időt (Δ). A pszeudo 2D módban végzett mérések során a gradiens pulzus erősségét (g) lineárisan változtattam, jellemzően 16-32 pontban, a maximális gradiens erősség 5-95%-nak tartományában. A mérések alatt a hőmérséklet ingadozás 0,1K alatt maradt, és a termikus egyensúly beállításához 20-30 percig vártam a mérés indításával. A tipikusan állandó 500 μ l mintatérfogóban, vizes oldatokban a D érték változatlan marad a N_2 áram 200-800 l/h tartományban történő változtatásával, és modell vegyületek esetében számszerűen megegyezik az irodalmi adatokkal, így jó közelítéssel feltételezhető, hogy a konvekció hatása elhanyagolhatónak tekinthető. Vizsgálataim során főleg monodiszperz, egy komponensű mintákkal dolgoztam, és a kiértékelést úgy végeztem, hogy az alifás tartomány metil-, illetve metilén- régiójában (0-3ppm) 2-3 tartományban meghatároztam az I integrált intenzitás értékét, majd az $I=f(g)$ lecsengést illesztettem a Stejskal-Tanner 2.1. összefüggésre. A méréseket tipikusan 2-3-szor ismételtam, így a kiválasztott integrálási régiókat figyelembe véve a kiszámolt diffúziós együttható minimum 6 érték átlaga volt.

4.3.2. Globuláris fehérjék jellemzése

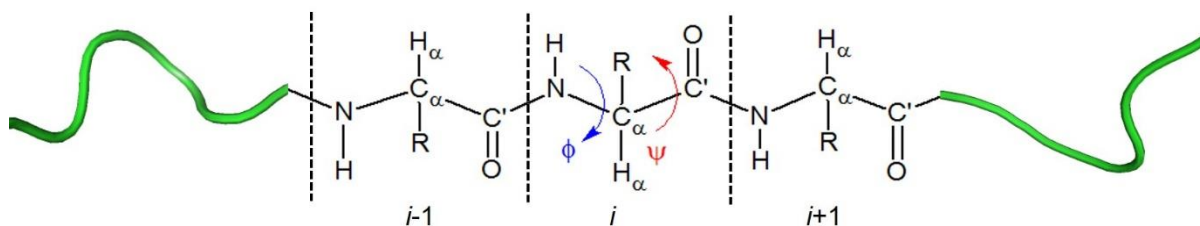
Jelaszignáció. A dolgozatban előforduló fehérjék jelazonosításához tipikusan $^{13}C/^{15}N$ jelölt mintákat használtam. Az izotópjelölés lehetővé teszi a H, N, C környezetek kémiai eltolódásainak meghatározását. Ennek előfeltétele minden esetben a primer aminosav szekvencia ismerete, a kiértékelések során a szekvenciális aszignációt kell megoldani. A feladat legegyszerűbben 3D mérések kiértékelésével végezhető el. Ahhoz, hogy a mérési időket csökkentsem, a BEST-típusú méréseket választottam, ezeket rutinszerűen használjuk bármely fehérje esetében (Sattler 1999). A BEST (Brutscher 2009) technika előnye, hogy egy szelektív pulzussal csupán a $^1H^N$ régiót gerjesztjük, és a gyors relaxáció miatt a várakozási idő (d1) jelentősen csökkenthető.

Az egyértelmű jelazonosítás komplementer mérések futtatásával oldható meg, és az alábbi korrelációk határozhatók meg (4.3.1. ábra):

- 3D HNC0 és 3D HN(CA)CO: $H^N(i) - C'(i-1)$

- 3D HNCA és 3D HN(CO)CA: $H^N(i) - C\alpha(i-1)$ és i ; illetve $H^N(i) - C\alpha(i-1)$.
- 3D HNCACB és 3D HN(CO)CACB: $H^N(i) - C\alpha(i-1)$ és i , $C\beta(i-1)$ és i ; illetve $H^N(i) - C\alpha(i-1)$ és $C\beta(i-1)$. A $C\alpha$ és $C\beta$ jelei ellentétes fázisúak, ezáltal is megkönnyítve az azonosítást.
- 3D (H)CCCONH: $H^N(i) - (i-1)$ C környezetek. A mérés előnye, hogy a H^N protonnal nem rendelkező prolin aminosavak szén-láncai is jellemezhetőek, viszont a szekvenciális konnektivitásban szakadás jelenik meg az $X(i-1)$ -Pro(i) régióban. A mérés hátránya a kis érzékenység.

A 2D alap spektrum ezekben az esetekben egy $^1H, ^{15}N$ -korreláció, jellemzően a SOFAST – HMQC, de a BEST-HSQC és a FHSQC változatokat is használtam.



4.3.1. ábra: A fehérje/peptidgerinc vázának sematikus bemutatása megfelelő jelölésekkel, az R oldallánc az esetleges további hosszabb-rövidebb β, γ, δ környezeteket is magában foglalja; a Φ és Ψ a megfelelő diéderes szöveget jelöli. Az NMR mérések során az $(i-1) - i$; $(i-1) - (i+1)$ konnektivitásokat kell megtalálni, és a különféle környezetek kémiai eltolódásai értékeit meghatározni.

Megjegyzendő, hogy amennyiben lehetséges, mindenképpen érdemes a kettős izotópjelölést alkalmazni rövidebb (50 aminosav hossz körüli) fehérjék esetében is, mert a kiértékelés egyértelműbb, az információ mennyisége és megbízhatósága pedig megkérdőjelezhetetlen.

Gyakran előfordul az átlapoló jelek, és/vagy a repetitív aminosav motívumok jelenléte miatt, hogy a jelazonosítás bizonytalan. A tisztázásához számos egyéb technika áll rendelkezésre. Például a 4D, 5D, stb. korrelációk nagy előnye, hogy az $(i-1) - (i+1)$ aminosavak összekötését teszik lehetővé/erősítik meg. Ezeket a méréseket nem-lineáris mintavételezéssel (NUS) végezzük, és a processzálas adott esetben nagy(obb) tárkapacitást igényel. Segédprogramok alkalmazását követően 2D síkok kinyerése és kiértékelése történik, illetve – elsősorban globuláris fehérjéknél fordulhat elő – hogy a gyors relaxáció következtében egyes szakaszok jelei nem detektálhatóak. Egy másik multidimenzionális technika, ami jó eredményre vezet, az APSY megközelítés. A mérés során csúcslistákat kapunk, ezek feldolgozására segédprogramokra van szükség.

Az általam végzett mérések és a processzálas a TopSpin mérőprogrammal történt, a kiértékeléshez pedig a Sparky (Goddard 2000), CARA (Keller 2004) szoftvereket használtam.

Szerkezeti információk. A dolgozatban tárgyalt biológiai rendszerek vizsgálata során csak ritkán merült fel szerkezet meghatározásának, vagy szerkezeti információ kinyerésének szükségessége, ezért ilyen típusú méréseket korlátozottan alkalmaztam. A $^1H-^1H$ atommagok $<6\text{Å}$ közelségére utaló távolsági NOE információkat a klasszikus X-editált (^{13}C , vagy ^{15}N) 3D TOCSY-HSQC és 3D NOESY-HSQC mérések kiértékeléséből határoztam meg.

A peptidgerinc $H^\alpha-H^N$ atomjai közötti 3-kötéses ${}^3J_{HH}$ csatolási állandó a Φ diéderes szög nagyságának függvénye, ezáltal térszerkezeti információt hordoz. A 3D HNHA mérés (Vuister 1993, Vuister 1994) során a térfogatintegrál alapján határozható meg ${}^3J_{HH}$ értéke, ugyanis a diagonális és keresztcsúcsok intenzitásának aránya a $H^N \rightarrow H^\alpha$ mágneszettség transzfer mágneszettségi idejével ($2t$) arányos:

$$\frac{I_{\text{keresztcsúcs}}}{I_{\text{diagonális csúcs}}} = -\tan^2(2t \cdot {}^3J_{HH}) \quad (4.3.1.)$$

Az 4.3.1. egyenletből számolt ${}^3J_{HH}$ értéke random-coil, α -hélix, vagy β -redő másodlagos szerkezeti elemekről tanúskodik. Egy következő lépésben pedig a Karplus összefüggés alapján a peptidgerinc Φ diéderes szögének nagysága is származtatható. Az csatolási állandó értékek meghatározása ebben az esetben a CCPNMR (Vranken 2005) szoftver segítségével történt.

Dinamikai információk. A fehérjedinamika a különféle időskálákon történő mozgások feltérképezését jelenti, én az alábbiakban ezek közül csak az eredményekhez felhasznált módszereket ismertetem (Morin 2011, Palmer 2014).

(i) Leginkább elterjedt a peptidgerinc **ps-ns** időskálán történő mozgásainak a leírása. A módszer a különböző frekvenciákon fluktuáló terek erősségét leíró spektrális sűrűségfüggvény $J(\omega)$ és a kísérletileg meghatározható relaxációs paraméterek közötti kapcsolat leírását veszi alapul. Izotópjelölt fehérjét használva a T_1 és T_2 magspin relaxációs idők és az $X-{}^1H$ ($X = {}^{13}C$, vagy ${}^{15}N$) stacionárius heteronukleáris NOE (hetNOE) értékek szolgáltatják a kísérleti adatokat.

A fehérjelánc dinamikájának leírásához elsősorban a ${}^{15}N$ mag jellemzését használjuk. A ${}^{15}N$ T_1 mérés telítés felépülést alkalmazó, HSQC alapú pseudo-3D pulzus szekvenciával történik. A mérés során 10-12 pontban változtattam a várakozási időt, tipikusan a 0,005 – 2,8 s tartományban, és a reprodukálhatóság érdekében egy vagy két pont felvételét megismételtem. A ${}^{15}N$ T_2 mérés a CPMG szekvencián alapul és a detektálás szintén HSQC alapú pseudo-3D. A tipikusan 10 mérési pont a 0,017-0,5 s tartományt fedi le. A kiértékelés során minden aminosav NH környezetére meghatározott térfogatintegrálok várakozási idő függvényében történő exponenciális lecsengésének illesztéséből kaptam meg az időállandó értékét. A ${}^1H-{}^{15}N$ hetNOE adatok a HSQC adott aminosav környezetére számolt 1H telítéses és telítés hiányában felvett spektrumból származó térfogatintegrálok aránya. Ezekben az esetekben 7-8 s várakozási időt alkalmaztam. Az adott aminosavra jellemző relaxációs paraméterek kiszámítása Sparky, vagy Dynamic Center programokkal történt. A fehérjék gerincdinamikai jellemzését egy B_0 térerőn (16,4T) végeztem.

A relaxációs adatokat ezt követően lehet értékelni. Az $X-{}^1H$ kötésvektor viselkedésének leírása a Lipari-Szabó modell-mentes formalizmuson alapszik (Halle 1981, Lipari 1982a, Lipari 1982b) A modell-mentes kifejezés arra utal, hogy nem alkalmazunk semmilyen feltételezést a kötésvektor mozgására vonatkozóan, így a módszer bármely korrelációs időfüggvényre alkalmazható. Általánosságban a $C(t)$ korrelációs időfüggvény felbontható egy globális (overall) és egy lokális (local) összetevőre:

$$C(t) = C_{\text{overall}}(t) \cdot C_{\text{local}}(t), \text{ ahol} \quad (4.3.2.)$$

$$C_{overall}(t) = 1/5 e^{-1/\tau_{overall}} \text{ és } C_{local}(t) = S^2 + (1 - S^2)e^{-1/\tau_{local}} \quad (4.3.3., 4.3.4.)$$

ahol $\tau_{overall}$ a globális, τ_{local} pedig az effektív belső rotációs korrelációs idő, S az ún. rendparaméter, S^2 az X-¹H kötésvektor térbeli mozgáskorlátozottságának mértéke, ami 0-1 között változik. $S^2 = 0$ azt jelenti, hogy a kötés korlátlanul mozoghat, míg $S^2 = 1$ esetben egy merev szegmensről beszélünk. A korrelációs időfüggvény Fourier transzformációja eredményezi a spektrális sűrűségfüggvényt, aminek alakulása izotróp rotációs diffúzió esetében:

$$J(\omega) = \frac{2}{5} \left[S^2 \frac{\tau_{overall}}{1 + \omega^2 \tau_{overall}^2} + (1 - S^2) \frac{\tau}{(1 + \omega^2 \tau^2)} \right] \quad (4.3.5.)$$

ahol $\tau^{-1} = \tau_{overall}^{-1} + \tau_{local}^{-1}$.

A relaxációs mérések értékeléséhez a spektrális sűrűség függvények és a meghatározott relaxációs adatok közötti összefüggéseket használjuk fel. A relaxációs mechanizmusokból adódó járulékok a zérus frekvencián $J(0)$, az egy-kvantum $J(\omega_H)$, $J(\omega_X)$ és a zérus ill. két-kvantum $J(\omega_H - \omega_X)$, $J(\omega_H + \omega_X)$ frekvenciákon való értékektől függenek, melyek alakulása:

$$R_1^{DD} = \frac{d^2}{4n} [(J(\omega_H - \omega_X) + 3J(\omega_X) + 6J(\omega_H + \omega_X))] \quad (4.3.6.)$$

$$R_1^{CSA} = c^2 J(\omega_X) \quad (4.3.7.)$$

$$R_2^{DD} = \frac{d^2}{8n} [4J(0) + (J(\omega_H - \omega_X) + 3J(\omega_X) + 6J(\omega_H) + 6J(\omega_H + \omega_X))] \quad (4.3.8.)$$

$$R_2^{CSA} = \frac{c^2}{6} [4J(0) + 3J(\omega_X)] \quad (4.3.9.)$$

$$NOE = 1 + \frac{d^2 \gamma_H}{4R_1 \gamma_X} [6J(\omega_H + \omega_X) - J(\omega_H - \omega_X)] \quad (4.3.10.)$$

ahol $d = \frac{\mu_0 \hbar \gamma_X \gamma_H}{8\pi^2} \cdot \frac{1}{r_{XH}^3}$; $r_{NH} = 1,02 \text{ \AA}$; $r_{CH} = 1,08 \text{ \AA}$; $c = \frac{\omega_X \Delta\sigma}{\sqrt{3}}$; $\Delta\sigma_N = -160 \text{ ppm}$; n - a kötésben részt vevő ¹H száma (amid NH esetében $n=1$).

A 1/2-es spinű magokra jó megközelítéssel feltételezhetjük, hogy a két meghatározó relaxációs mechanizmus a dipól-dipól kölcsönhatás és a kémiai eltolódás anizotrópia; így a mért R_1 és R_2 „auto-relaxációs” sebességek (a T_1 és T_2 relaxációs idők reciprokai) és a stacionárius X-¹H} heteronukleáris NOE az alábbiak szerint írhatók fel:

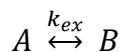
$$R_1 = R_1^{DD} + R_1^{CSA} \text{ és } R_2 = R_2^{DD} + R_2^{CSA} + R_{ex} \quad (4.3.11., 4.3.12.)$$

$$NOE_{X-H} = \frac{I_X}{I_{X0}} \quad (4.3.13.)$$

ahol R_{ex} a kémiai csere okozta jelszélesítő hatás, I_X az ¹H telítés során kapott, I_{X0} pedig a besugárzás mentes intenzitást jelöli.

Ezen összefüggések felhasználásával a FAST-Modelfree program segítségével végeztem a kiértékeléseket (Palmer 1991).

(ii) A lassabb, μs - ms időskálájú folyamatok közé tartoznak például a konformációs egyensúlyok, vagy a kis mennyiségben jelen levő, minor partnerekkel történő cserefolyamatok. Gyakorlatban a kölcsönhatás, letekeredés, konformációváltozás kéthelyű cserét feltételez:



ahol k_{ex} sebességi állandó, az A és B állapot adott környezetei között mért kémiai eltolódás: $\Delta\omega$. Amennyiben $\Delta\omega > k_{ex}$ ($10 >$) lassú cseréről beszélünk, ekkor A és B külön jeleket adnak a spektrumban; ha $k_{ex} > \Delta\omega$ (>10) gyors csere állapotról beszélünk és egy populáció súlyozott jelet észlelünk; $k_{ex}/\Delta\omega \sim 1$ esetben pedig közepes cseresebesség tartományban vagyunk, melyet jelszélesedés növekedés tükröz. A mérések során a k_{ex} paramétert, vagy a minor forma ω értékeit határozzuk meg. Kísérletileg ez az ún. *relaxációs diszperziós* módszerek segítségével történik, ami a gyorsabb időskálájú ($<100 \mu\text{s}$) esetben $R_{1\rho}$, a lassabb időskálán pedig CPMG típusú mérések kivitelezését jelenti. Mindkét esetben a látszólagos R_2 értékeit határozzuk meg (esetünkben ^{15}N -re) úgy, hogy a spin-lock mező erősségét ($R_{1\rho}$), vagy 180° -s pulzusok ismétlődését (CPMG) változtatjuk (Palmer 2014). A CPMG kísérlet során az effektív R_2 változását a ν_{CP} CPMG tér függvényében követjük, ahol ν_{CP} (Hz) a 180 pulzus párok ismétlésének frekvenciáját (ez ^{15}N -re max 1000Hz -ig változatható) τ_{CP} pedig a közöttük levő várakozási időt jelöli:

$$\nu_{CP} = \frac{1}{2\tau_{CP}} \quad (4.3.14.)$$

A görbe lecsengésének komplex alakja van, melyet a k_{ex} sebességi állandó, a p_A, p_B populációk értéke és a $\Delta\omega$ kémiai eltolódás különbsége is befolyásol. A mért effektív R_2 értéke:

$$R_{2,CP}^{obs} = R_2^0 + R_{ex,CP} \quad (4.3.15.)$$

ahol R_2^0 a saját transzverz relaxációs sebesség cserefolyamat hiányában, az $R_{exp,CP}$ pedig a kémiai csere járulék. Általánosságban két helycserét feltételezünk, és adott körülmények mellett egyszerűsítéssel is élhetünk. Például $p_A \gg p_B$ esetben az összefüggés (Ishima 1999):

$$R_{2,CP}^{obs} = R_2^0 + \frac{p_A p_B \Delta\omega^2 k_{ex}}{k_{ex}^2 + [p_A^2 \Delta\omega^4 + 48(2\nu_{CP})^4]^{1/2}} \quad (4.3.16.)$$

ahol lassú cserekor $R_2^0 = R_{2,A}$, gyors cserénél pedig $R_2^0 = p_A R_{2,A} + p_B R_{2,B}$

Én a CPMG típusú mérések kiértékelését a Dynamic Center programmal végeztem.

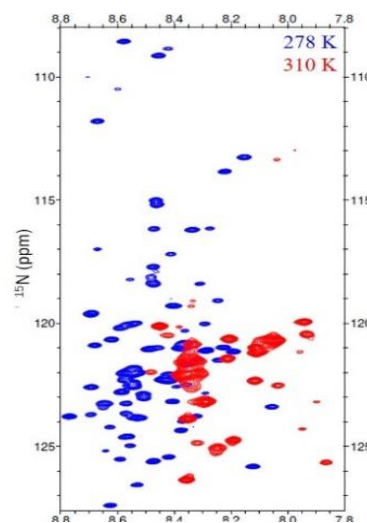
(iii) A **0,1-10 s** tartományba eső cserefolyamatok közé sorolhatóak a konformációs egyensúlyok. Detektálásuk az ún. *ZZ* méréssel lehetséges, de csak abban az esetben alkalmazható, ha a két A, B cserepartner jelei egymástól elkülönülnek és mindkettő detektálható, a populáció $> 10\%$ (Farrow 1995, Palmer 2019). Amint az elnevezés is utal rá a kísérlet során a longitudinális mágnesszettség változását követjük a major és minor jelek között. A z-tengely mentén kialakuló nem-egyensúlyi mágnesszettségben a megadott t keverési idő alatt az A és B állapotok között mágnesszettség átvitel játszódik le. A csere következtében a az $(\omega_{N,A}, \omega_{H,B})$ és $(\omega_{N,B}, \omega_{H,A})$ keresztcsúcsokat is detektáljuk, ahol a keresztcsúcs intenzitása a kisebb populációjú állapot intenzitásánál kisebb. A mérés kvalitatív és kvantitatív célokra is

használható, hiszen egyfelől rávilágít az összetartozó jelekre, másfelől legalább két keverési idő mellett felvett spektrum kiértékeléséből meghatározható k_{ex} nagysága.

(iv) A gyors **ms** tartományba esnek a víz – makromolekula NH egyensúlyok. A cserefolyamat jellemzésére a CLEANEX-PM megközelítés alkalmazható (Hwang 1998). Amennyiben az R_2 nem befolyásol, úgy a HSQC detektálási spektrumban a keverési idő változtatásával az integrált intenzitások értékét követjük. Az eltemetett, vagy kevésbé cserélődő régióknál az effektus sokkal kisebb lesz.

4.3.3. Rendezetlen fehérjék jellemzése

Jelasznáció. A globuláris fehérjéknél ismertetett módszerek kiválóan alkalmasak az IDPk tanulmányozására, ez mindaddig igaz, amíg létezik detektálható HN proton. Másfelől, az IDPk esetében a konformációs sokaságok, a szerkezeti hajlamok nagymértékben változnak a kísérleti körülményekkel, igazán releváns információ fiziológiai körülmények mellett nyerhető. Ilyen feltételeknél számos IDP esetében az amid és víz protonjainak cseresebessége következtében a jelek kiszélesednek, és nem detektálhatóak. Ezt jól tükrözi a 4.4.1. ábrán bemutatott 105 aminosav hosszúságú rendezetlen fehérje (EZH2) viselkedése, aminek 278K-en felvett $^1\text{H}, ^{15}\text{N}$ -SOFAS-HMQC spektrumán a prolinokat leszámítva az összes amid környezet jele detektálható (kék), ám 310K-en ennek csak egy töredéke jelenik meg (piros).



4.3.2. ábra: Egy 105 aminosav hosszú IDP $^1\text{H}, ^{15}\text{N}$ - SOFAST HMQC spektrumai 278 (kék) és 310K hőmérsékleteken.

A megoldást más detektálási módok, így például a ^{13}C detektált mérések jelenthetik. A nem ^{13}C érzékenyített mérőfej

hiánya - ami a világon alig pár helyen elérhető – a megfelelő 3D korrelációs mérések kivitelezéséhez hosszú mérési időket (napokat) igényel. Ezen technikák közül viszont igen hasznosnak bizonyult a jó jeldiszperziójú 2D CON – $\text{N}(i)$ - $\text{C}'(i-1)$ korreláció – mérés, melyben kiválóan elkülönülnek a prolinokhoz tartozó jelek, illetve a 2D CACO – $\text{C}\alpha(i)$ - $\text{C}'(i)$ korreláció.

A jelasznáció az $^1\text{H}^\alpha$ detektált módszerek alkalmazásával is megvalósítható. Ezen mérések előnye, hogy a kiértékelés során az X-Pro-Y és X-Pro-Pro szakaszok is összeköthetőek. A mérések hátránya, hogy a tipikusan 7-10% D_2O tartalmú minták vizsgálatánál a vízjel elnyomása kihívásokat jelent. Három mérést alkalmaztam sikerrel, melyek segítségével az alábbi korrelációk határozhatók meg (4.3.1. ábra):

- 3D HCAN és 3D HCA(CO)N: $\text{H}^\alpha(i) - \text{N}(i)$ és $(i+1)$, illetve $\text{H}^\alpha(i) - \text{N}(i+1)$
- 3D HCA(N)CO: $\text{H}^\alpha(i) - \text{C}'(i)$ és $(i-1)$.

Szerkezeti információk. A rendezetlen fehérje nem rendelkezik meghatározott másodlagos, harmadlagos szerkezettel, ennek ellenére szerkezeti hajlamok, úgynevezett preformált motívumok jelen lehetnek, és legtöbbször ezek a régiók a későbbi kölcsönhatások következtében másodlagos szerkezetet mutatnak. A rendezetlenség az aminosav szekvencia

ismeretében számos web-alapú jóslóprogram segítségével predikálható, viszont igazán az atomi szintű információ az, ami ezeket a szerkezeti hajlammal bíró szakaszokra rá tud mutatni. Ez úgy kapható meg, hogy az ún. másodlagos kémiai eltolódás (*SCS*) értékeket az aminosav szekvencia mentén ábrázoljuk, és amennyiben néhány egymást követő aminosavra egyértelmű tendenciát mutat valamely irányban, úgy az α -helikális, vagy β -redő hajlamhoz köthető. Adott *SCS* kiszámítása a jelazonosítást követően adott *i* környezet (leginkább a $H\alpha$, $C\alpha$, $C\beta$, C') *CS* kémiai eltolódásainak és az adott környezetre jellemző *RCCS* ún. random-coil kémiai eltolódásnak a különbsége:

$$SCS_i = CS_i^{mért} - RCCS_i \quad (4.3.17.)$$

Az *SCS* értékét nagymértékben befolyásolja, hogy milyen *RCCS* értéket használunk, hiszen ez az előjelre és annak alakulására is hatással van. Az irodalomban évtizedek óta újabb és újabb *RCCS* meghatározó algoritmusok látnak napvilágot, melyek között van aminosav szekvencia korrigált (Wishart 1995), de létezik hőmérséklet és pH-korrektúra (Kjaergaard 2011, Kjaergaard 2011, Nielsen 2018) is. Egy másik közkezeleten alkalmazott másodlagos szerkezeti elemek jelenlétére utaló megközelítés az ún. *SSP* pontozófüggvény, aminek értéke -1 (tisztá β -redő) és 1 (tisztá α -hélix) között váltakozik, az értéke pedig adott aminosavra meghatározott kémiai eltolódásokból számolható (Marsh 2006). Én mindkét közelítést alkalmaztam, nem csupán IDPk, de globuláris fehérjék esetében is a korábban irodalomban meghatározott szerkezeti elemek ellenőrzésére.

Dinamikai információk. A rendezetlen fehérjékre mért relaxációs paraméterek Lipari-Szabó analízisen alapuló értékelése szerkezet hiányában nem megoldható. Ennek ellenére a kiszámolt spektrális sűrűségek a fehérje gerincdinamika félkvantitatív kiértékelését teszik lehetővé – globuláris és rendezetlen fehérjék esetében egyaránt. Kihhasználva azt a tényt, hogy a $^1H:^{15}N$ giromágneses együttthatók aránya $\sim 10:1$ (lásd 2.1. táblázat) az alábbi egyszerűsítésekkel élhetünk: $J(\omega_H - \omega_N) \approx J(\omega_H) \approx J(\omega_H + \omega_N) \approx J(\omega_h)$. A *redukált spektrális sűrűség analízis* a 4.3.6., 4.3.8 és 4.3.10. egyenletek alapján a három kísérletileg meghatározott paraméter: az R_1 , R_2 , *hetNOE* és a $J(0)$, $J(\omega_N)$, $J(\omega_h)$ viszonyát elemzi (Kadeřávek 2014, Křížová 2004), ahol $J(0)$ a lassú, $J(\omega_N)$ a közepes és $J(\omega_h)$ a gyorsmozgások arányát mutatja. Az elemzés során leginkább a $J(0) - J(\omega_N)$ függvény ábrázolása (ún. Lefèvre-ábrázolás) használatos, és az fehérjét felépítő aminosavak NH környezeteire kapott értékeket „egymozgás” görbéhez viszonyított helyzetük alapján tárgyaljuk. Az „egymozgás” görbe egy teljesen merev, egységes mozgással rendelkező, belső mozgások nélküli elméleti esetből kiszámítható:

$$J(\omega) = \frac{J(0)}{1+6,25(\omega \cdot J(0))^2} \quad (4.3.18.)$$

A felsorolt mérések és kiértékelések a rendezetlen fehérjék dinamikai viselkedésére mutatnak rá, melynek következtében a merevebb szakaszok jelenlétéről/jellegéről átfogó képet kapunk.

4.3.4. Membránmimetikumok, peptid-bicella rendszerek jellemzése

A bicella/micella rendszerek jelazonosítása klasszikus homo- és heteronukleáris 2D méréseken alapult (^1H , ^1H -COSY, NOESY; ^1H - ^{13}C HSQC, HMBC), míg méretmeghatározáshoz a korábban ismertetett diffúziós méréseket alkalmaztam.

A peptidok hatását a lipidek dinamikájára kétféle megközelítéssel vizsgáltam:

- ^{13}C - ^1H kötésvektor viselkedésének leírásához a nagy koncentrációban jelen levő lipideknek köszönhetően a klasszikus ^{13}C -detektálású pszeudo-2D inverzió átvitelen alapuló T_1 mérést végeztem 0,01-10s várakozási idővel, tipikusan 10 pontban, a tranzienések száma pedig 400-512 volt. A ^1H - ^{13}C stacionárius heteronukleáris NOE értékeket adott rezonanciajel besugárzás mentes és az adatgyűjtést megelőző, hosszú, 27s ideig tartó ^1H besugárzást követően kapott intenzitásai arányából nyertem. A tranziensek száma ezen méréseknél 800-1024 volt. A relaxációs méréseket két (9,39T és 14,09T) térerőn végeztem, és mivel bicellákra a Lipari-Szabó megközelítés nem bizonyult helyénvalónak, így az analízis módosított változatát alkalmaztam (ezt az „Eredmények és értékelések” fejezetben tárgyalom), az értékeléshez házilag írt Matlab programokat használtam.

- a foszfolipidek ^{31}P környezetének dinamikai vizsgálatához 9,4 T és 11,7 T térerőkön relaxációs méréseket végeztem. A pszeudo-2D inverzió átvitelen alapuló T_1 mérések 14 pontban készültek, 1ms-6s várakozási idő tartományban. A pszeudo-2D CPMG szekvencián alapuló T_2 méréseket 12 pontban végeztem, a 0,03-0,58 s várakozási idő tartományban. Minden esetben a méréseket háromszor ismételttem. Az illesztés a TopSpin programban történt és az időállandókat az exponenciális lecsengésből kaptam.

4.3.5. Nagynyomású és kis hőmérsékletű kísérletek

Ezekhez az egzotikusabb kísérletekhez minden esetben a 250MHz-es készüléket használtam. A kiértékeléshez szükséges információkat a klasszikus 1D ^1H , ^{13}C mérések szolgáltatják, kvantitatív $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ mérésekhez a fordított kapuzású (inverse gated) pulzus szekvenciát alkalmaztam. A nyomás alatt történő felvételekhez 10mm BBO mérőfejet és 10mm átmérőjű zafír csöveket használtam. A zafír cső megfelelő nyomás alá lett helyezve, majd a kísérlet befejeztével újabb nyomásméréssel állapítottam meg, hogy minden esetben a mérés során a rendszerben a kívánt értéken állandó maradt.

Kis hőmérséklet eléréséhez, a 0°C – -40°C tartományban, a mérőfejet közvetlenül csatlakoztattam a cseppfolyós N_2 -t tartalmazó Dewar edényhez és a kívánt hőmérséklet eléréséhez megfelelő sebességgel biztosítottam a N_2 melegítést/párolgást. A rendszer hőmérsékletének ingadozása a kísérletek alatt $0,1^\circ\text{C}$ volt.

5. Eredmények és értékelések

5.1. Globális NMR paraméterek, empirikus $D - M$, $r_H - N$ összefüggések

A jól meghatározott szerkezettel bíró globuláris fehérjék és a konformációs sokaságokkal jellemezhető, dinamikus, rendezetlen (IDP) fehérjék hidrodinamikai paraméterei - elvárható módon - különböznek. Már az egyszerű 1D ^1H spektrumok érzékeltetik (5.1A. ábra), hogy az adott biomolekula globuláris, vagy rendezetlen. A másodlagos, harmadlagos szerkezettel bíró fehérjék nagyfokú árnyékoltságot mutató metil csoportokkal rendelkeznek, melyeknek jelei -1,00 – -2,00 ppm kémiai eltolódás értékeknél detektálhatók. Az IDP-k esetében ilyen jelenség nem tapasztalható, és a teljes spektrumban, bármely ^1H környezetre jellemző tartományban a jeldiszperzió sokkal kisebb.

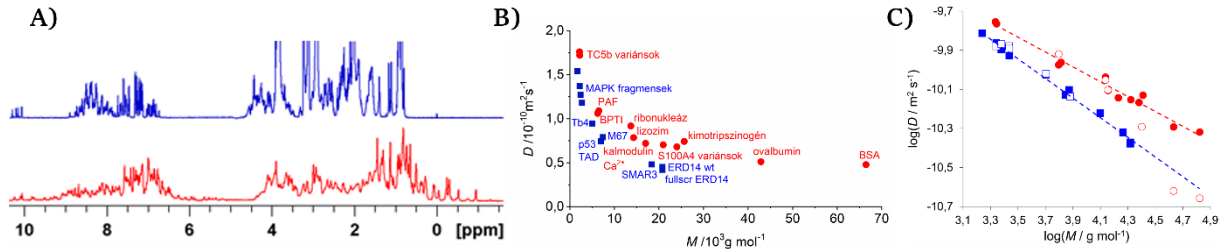
A globuláris és IDP biomolekulák megkülönböztetését a hidrodinamikai paraméterek változását leíró empirikus összefüggések segít(het)ik. Célom az volt, hogy megbízható, bioanalitikai célokra is használható empirikus egyenleteket állítsak fel. Ehhez már jellemzett, ismert fehérjéket használtam, és azonos kísérleti körülmények biztosításával határoztam meg a D translációs diffúziós együtthatókat. A molekulaméret (M) változása D függvényében a bevezetőben már ismertetett 2.2. Stokes-Einstein összefüggés alapján így alakul:

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta f} \left(\frac{4\pi\rho_{\text{eff}}N_A}{3} \right)^{1/3} M^{-1/3} \quad (5.1.)$$

Elsőként ennek az összefüggésnek az alkalmazhatóságáról kell meggyőződni, hiszen az eredeti egyenlet egy gömb alakú részecske kontinuumban történő diffúziójára vonatkozik. Ezen feltételtől eltérő korrekciókat az 5.1. egyenletben szereplő f faktor tartalmazza. Az oldószer és oldott anyag méretének viszonyából származó korrekció a Gierer-Wirtz összefüggés alapján számolható (Evans 2018, Evans 2013, Gierer 1953). Biomolekulák vizes közegben történő vizsgálatánál ez a hozzájárulás elhanyagolható, mivel az oldószer víz molekula sokkal kisebb, mint az oldott anyag molekulatömege. A közeg szerepét és befolyását úgy ellenőriztem, hogy meghatároztam az oldatban levő víz D értékét fehérje jelenlétében és hiányában. A jellemzően $\sim 1\text{mM}$ fehérje koncentrációknál ezek az értékek azonosak, tehát a közeg nem befolyásol. Továbbá elvégeztem a vízre meghatározott D együttható hőmérséklet függését és a linearizált Arrhenius egyenlet meredekségéből kiszámoltam a vízmolekulák diffúziós aktiválási energiáját. Az így kapott érték 20,6 kJ/mol, ami kiváló egyezést mutat az irodalmi 20kJ/mol értékkel (Roos 2016). Ezen kísérleti bizonyítékok tükrében jó eséllyel feltételezhető, hogy a jellegzetes biomolekulás mérési körülmények között a molekuláris zsúfoltság nem befolyásol, és a kontinuum modell érvényesnek tekinthető. Természetesen felmerülhet még az aggregáció lehetősége, ennek ellenőrzésére adott koncentráció tartományban mért D értékek változásából lehet következtetni. Néhány kiválasztott fehérje esetében a μM - mM tartományban elvégzett mérések translációs diffúziós értékei állandóak voltak, aggregációra utaló jelenséget nem észleltem.

Ilyen tapasztalok birtokában határoztam meg a kiválasztott - korábban általunk, vagy irodalomban már jellemzett - 12 globuláris és 10 IDP fehérje D együtthatóját 287K

hőmérsékleten. Minden esetben a *stegbpb9* pulzus szekvenciát használtam, minden mérés esetében optimalám a paramétereket, és megfelelő S/N arány mellett dolgoztam. A fehérjék megnevezése és az értékek alakulása az 5.1B. ábrán látható. A bemutatott *D-M* változából kitűnik, hogy mind a globuláris, mind a rendezetlen fehérjék esetében a *D* érték kb 20000g/mol értékig csökkenő tendenciát mutat, ezt követően szignifikáns változás nem történik. A jelenség a gyenge kooperatív molekuláris kölcsönhatások meglétével magyarázható, ugyanakkor ez a tapasztalás összecseng korábbi megfigyelésekkel, melyek szerint egy fehérje domén maximálisan ~200 aminosavat foglal magába (Eilers 2000, Makhatadze 1995).



5.1. ábra. A) Egy tipikus globuláris (piros) és egy rendezetlen (kék) fehérje 1D ^1H spektruma; B) Kísérletileg meghatározott *D* transzlációs diffúziós együtthatók változása *M* molekulaméret függvényében globuláris (piros körök) és rendezetlen (kék négyzetek) fehérjékre. C) a B) pontban látható lecsengésekre illesztett görbék linearizált log-log ábrázolása. 8M karbamid közegben az üres körök globuláris fehérjékre, az üres négyzetek pedig IDP fehérjére mért értékeket jelölik.

A *D-M* változások egyértelműen mutatják, hogy az IDP és globuláris fehérjék viselkedése jól elkülönül. A kísérletileg meghatározott pontokra illeszthető összefüggések alakja:

$$D(\text{globuláris}) = 3,16 \cdot 10^{-9} M^{-0,381} \quad (5.2.)$$

$$D(\text{IDP}) = 6,78 \cdot 10^{-9} M^{-0,507} \quad (5.3.)$$

Bioanalitikai célokra a linearizált egyenletek használata kedveltebb, ennek fényében az összefüggések alakulása:

$$\log D(\text{globuláris}) = -0,381 \cdot \log M - 8,499 \quad (5.4.)$$

$$\log D(\text{IDP}) = -0,507 \cdot \log M - 8,169 \quad (5.5.)$$

Érdeemes elemezni az egyenletekben szereplő *M* kitevő értékeit, ugyanis ezek a számok általános alak információt is hordoznak. A globuláris fehérjékre kapott 0,381 érték gömbszimmetriához közeli állapotra, torzult szférikus alakra utal (hiszen az ideális gömb alak esetében ez a szám 0,333), IDP-k esetében a 0,507 érték pedig a szintetikus polimerekre meghatározott 0,52-0,55 paraméterekhez közelít (poli(etilén oxid)-ra - PEO - vizes közegben meghatározott érték) (Guo 2017), ez által is hangsúlyozva a fehérjelánc és a polimerláncok viselkedése közötti hasonlóságot.

Az így meghatározott *D* érték kiindulópontja további paraméterek kiszámolásának. Meglátásom szerint az irodalomban előszeretettel származtatott r_H értékek jó részénél nem vesznek figyelembe korrekciókat, egyes esetekben pedig a Stokes-Einstein egyenlet adott körülmények melletti alkalmazhatósága is kétséges. Ahhoz, hogy saját adataimra történő $r_H - N$ összefüggéseket levezessek, két módon ellenőriztem az effektív hidrodinamikai sugár

kiszámítását. Az *abszolút módszer* szerint az érték a 2.2. Stokes-Einstein egyenletből számolható ($f=1$ mellett) és adott hőmérsékleten a közeg viszkozitását is ismerni kell – ezt mi megtettük és az általam vizsgált közegekre viszkoziméteres eljárással meghatároztuk ezeket az értékeket. A *relatív módszer* esetében egy referencia molekulát használunk, mely kis mennyiségben van jelen a vizsgált oldatban. Hagyományosan ez a vegyület a dioxán, ami 3,544 ppm kémiai eltolódásnál egy szingulett jelet ad. A mérés során meghatározott D értékek arányából a közeg hatása kiesik, és a fehérjére vonatkozó r_H kiszámolható. Az első bizonytalanság ebben az esetben a dioxánra irodalomban elérhető effektív hidrodinamikai sugár: egyaránt találkozunk 1,7Å (Jones 1997) és 2,12Å (Wilkins 1999) adatokkal, és mindkét értéket használják – ami igencsak eltérő eredményre vezet. Saját méréseim alapján 287K-en $2,16 \pm 0,01\text{Å}$ értéket határoztam meg. A módszerekből adódó másik bizonytalanság a 3,0 - 4,0 ppm tartományban jelenlévő jelátfedés. Ebben a régióban a fehérje alifás protonjai adnak jeleket, és a kiértékelés során elkerülhetetlenül kell ezekkel számolni. Szerencsés, ha egy kismolekulára és egy fehérjére is optimált diffúziós mérést futtatunk, és ezek kiértékeléséből kapott D értékekkel számolunk. Végül az a kérdés is felmerül, hogy a kis tömegű dioxán esetében az f értékét meg kéne adni, hiszen dioxánra nézve az oldószer víz molekula mérete nem elhanyagolható. Ovalbumin és lizozim esetében mindkét módszert teszteltem és arra a következtetésre jutottam, hogy az abszolút módszer esetében a hiba kisebb ($\pm 0,4$ illetve $0,5\text{Å}$), mint a relatív módszernél ($\pm 2,0$ illetve $1,4\text{Å}$), ezért ennek alkalmazását javaslom.

A fentebb bemutatott módon származtatott r_H adatok változását a polimerkémiából eredő, és fehérje jellemzéseknél máig használt aminosav tagszám függvényében írjuk fel, abból kiindulva, hogy a polipeptid – a szintetikus polimerekhez hasonlóan – egy N statisztikai szegmensből összekapcsolt lánc (Flory 1969). Ennek figyelembevételével az eredő empirikus egyenletek:

$$r_H(\text{globuláris}) = 3,405 \cdot N^{0,382} \quad (5.6.)$$

$$r_H(\text{IDP}) = 3,128 \cdot N^{0,492} \quad (5.7.)$$

Az empirikus egyenletek tágabb értelmezése. Megvizsgáltam az általam meghatározott és a többi irodalomban elérhető empirikus egyenlet viszonyát, illetve azt is, hogy ezen egyenletek felhasználásával milyen további összefüggések megállapítása lehetséges.

(i) Az irodalomban fellelhető $D(M)$ összefüggések ritkák (5.1. táblázat) – pedig ezeket személy szerint megbízhatóbbnak tartom. Korábban rövid, AB kis peptidekre történt vizsgálat (Danielsson 2002), melyeknél nagymértékben átfednek az aminosav szekvenciák; illetve néhány szerkezettel bíró fehérjére van adat, amikor is D_2O közegben történt jellemzés (Groves 2004). Mindkét esetben a meghatározás diffúziós NMR méréseken alapult. Ezt a kört én mind molekulaméret tartományban, mind aminosav szekvencia változatosságban ugyanakkor mind globuláris, mind rendezetlen fehérjékre vonatkozó összefüggésekkel bővítettem, így az egyenletek általánosabb alakot öltenek, amit az M hatványkitevő értékei is tükröznek.

5.1. táblázat. A szakirodalomban előforduló empirikus összefüggések, és felállításukhoz alkalmazott meghatározási módszerek.

| <i>Empirikus egyenlet</i> | <i>Meghatározási módszer</i> | <i>Referencia</i> |
|---|------------------------------|-------------------|
| <i>D(M) összefüggések</i> | | |
| $D = (6,06 \pm 0,01) \cdot 10^{-9} \cdot M^{(-0,44 \pm 0,02)}$ | PFG-NMR | Danielsson 2002 |
| $\log D^G = -0,366 \cdot \log EMW^a - 8,484$ | PFG-NMR | Groves 2004 |
| $\log D^G = -0,381 \cdot \log M - 8,499$ | PFG-NMR | Dudás 2019 |
| $\log D^{IDP} = -0,507 \cdot \log M - 8,169$ | | |
| <i>r_H(N) összefüggések</i> | | |
| $r_H^{IDP} = (3,53 \pm 0,01) \cdot N^{0,449 \pm 0,01}$ | Szimuláció, adatbázis, SAXS | Bernado 2009 |
| $r_H^G = (4,75 \pm 1,11) N^{0,29 \pm 0,02}$ | PFG-NMR | Wilkins 1999 |
| $r_H^D = (2,21 \pm 1,07) N^{0,57 \pm 0,02}$ | | |
| $r_H^G = 4,92 N^{0,285}$ | PFG-NMR, SEC | Marsh 2010 |
| $r_H^D = 2,33 N^{0,549}$ | | |
| $r_H^{IDP} = 2,49 N^{0,509}$ | | |
| $r_H^G = 3,405 N^{0,382}$ | PFG-NMR | Dudás 2019 |
| $r_H^{IDP} = 3,128 N^{0,492}$ | | |
| $\log r_H^{IDP} = (0,454 \pm 0,017) + (0,493 \pm 0,008) \log N$ | Viszkozimetria, SEC, DLS | Uversky 2012 |
| $\log r_H^{PMG} = (0,587 \pm 0,029) + (0,402 \pm 0,012) \log N$ | | |
| $\log r_H^{MG} = (0,629 \pm 0,051) + (0,334 \pm 0,021) \log N$ | | |
| $\log r_H^G = (0,525 \pm 0,012) + (0,358 \pm 0,005) \log N$ | | |
| $\log r_H^D = (0,385 \pm 0,017) + (0,543 \pm 0,007) \log N$ | | |

^a EMW-effektív molekula tömeg, G-globuláris, D-denaturált, PMG-premolten globula, MG-molten globula.

Másfelől sokkal több $r_H(N)$ összefüggést találunk az irodalomban. Amennyiben a rendelkezésre álló egyenleteket megpróbáljuk egymással összehasonlítani, akkor azt váránk, hogy azonos N értékre a kompaktabb globuláris fehérje kisebb r_H értéket fog eredményezni, mint az IDP. Az általam felállított összefüggések esetében ez a feltétel teljesül: az $N=50-200$ tartományban az IDP-k mérete nagyobb, az eltérés a globuláristól 4-6Å. Globuláris rendszerekre megvizsgált r_H adatok kis N tartományban az irodalmi képletekből számolt értékek közé esnek, ám $N > 100$ esetben a saját egyenletek szisztematikusan nagyobb értékeket szolgáltatnak (7-8Å). A bizonytalanságot az irodalomból származó egyenletek esetében az okozza/okozhatja, hogy a különféle fehérjéket különféle körülmények mellett tanulmányoztak, egyes esetekben különféle módszerekkel is, és ezeket együtt kezelve írtak fel egy empirikus összefüggést.

(ii) Egyértelmű, hogy a molekula alakja befolyásolja a hidrodinamikai paraméterek nagyságát, ezért ilyen információk kinyerése nagyon népszerű. Elterjedten használják az alakfaktort, amit a girációs és hidrodinamikai sugarak hányadosaként fejeznek ki. Gömb alakra az érték 0,77; egy nyújtott alak 1,00 körüli értéket eredményez. A girációs sugár kísérleti úton a SAXS szórási görbe Guinier tartományának illesztéséből, vagy SLS mérésekből számolható; de ismert szerkezetre az érték származtatható is. Ez utóbbi megközelítést alkalmaztam, és néhány globuláris fehérje esetén a PDB adatbázisból elérhető szerkezet alapján a HYDROPRO (Ortega 2011) program segítségével számoltam D^{calc} és r_G értékeket (5.2. táblázat). Ezt követően az alakfaktort mind a számolt (calc) mind a kísérletileg meghatározott (exp) hidrodinamikai sugár adatokkal meghatároztam.

5.2. táblázat. Néhány kiválasztott globuláris fehérje szerkezete alapján származtatott translációs diffúziós együttható, hidrodinamikai és girációs sugarak (calc), illetve a kísérletileg meghatározott értékek (exp). Az utolsó három oszlopban az alakfaktor számítása a különféle megközelítések alapján.

| Fehérje /PDB kód | D^{calc} (m^2s^{-1}) | D^{exp} (m^2s^{-1}) | r_H^{calc} (m) | r_H^{exp} (m) | r_G^{calc} (m) | $r_G^{\text{calc}}/r_H^{\text{calc}}$ | $r_G^{\text{calc}}/r_H^{\text{exp}}$ | r_G/r_H számolt |
|--------------------------------|--|---|----------------------------|---------------------------|----------------------------|---------------------------------------|--------------------------------------|----------------------|
| TC5b /1l2y | 1,41E-10 | 1,76E-10 | 1,27E-9 | 1,02E-10 | 9,65E-10 | 0,76 | 0,95 | 0,12 |
| PAF /2mhv | 1,21E-11 | 1,06E-11 | 1,48E-9 | 1,02E-10 | 1,34E-9 | 0,90 | 0,79 | 0,37 |
| ribonukleáz /2e3w | 8,08E-11 | 9,17E-11 | 2,22E-9 | 1,96E-10 | 1,63E-9 | 0,73 | 0,83 | 0,49 |
| lizozim /1lys | 9,00E-11 | 7,84E-11 | 2,00E-9 | 2,29E-10 | 1,49E-9 | 0,75 | 0,65 | 0,50 |
| S100A4 /1m31 | 6,54E-11 | 6,80E-11 | 2,75E-9 | 2,64E-10 | 2,03E-9 | 0,74 | 0,77 | 0,55 |
| kimotripszi- nogén /1ex3 | 7,61E-11 | 7,41E-11 | 2,36E-9 | 2,42E-10 | 1,71E-9 | 0,72 | 0,71 | 0,56 |
| ovalbumin /1ova | 3,84E-11 | 5,10E-11 | 4,68E-9 | 3,52E-10 | 3,51E-9 | 0,75 | 1,00 | 0,60 |
| BSA /3v03 | 3,74E-11 | 4,80E-11 | 4,80E-9 | 3,74E-10 | 3,87E-9 | 0,81 | 1,03 | 0,63 |

Illetve harmadik lehetőségként az irodalomban megadott szimulációkon, SAXS adatokon és FM (Flexible Meccano) sokaság számolásokon alapuló empirikus képlet (Nygaard 2017) alapján is kiszámoltam az arányt (számolt):

$$\frac{r_G}{r_H} = \frac{0,216 \cdot (r_G - 4,06 \cdot N^{0,33})}{(N^{0,60} - N^{0,33})} + 0,821 \quad (5.8.)$$

Az eredmények az 5.2. táblázat utolsó három oszlopában láthatók. A szerkezeti koordinátákból kapott faktorok (calc) gömbszimmetrikus közeli alakra utalnak, talán a BSA és PAF azok, amik torzultabbak. A vegyes (calc/exp) megoldás, azaz számolt r_G és kísérletileg meghatározott r_H

több esetben is nyújtott formát valószínűsít. Szembetűnő, hogy az 5.8. empirikus képlet nagyon torz arányokat eredményez, a méretfüggés (N) nagy hangsúlyt kap az egyenletben. Annak ellenére, hogy számos kéziratban hasonló elgondolásokból vonnak le – akár messzemenő – következtetéseket, ez a számolás is azt sugallja, ez inkább játék a számokkal, és valós következtetéshez ugyanolyan körülmények között meghatározott kísérleti adatokat kell/célszerű összevetni - ilyen azonban ritkán áll rendelkezésre. Mi megpróbáltuk az NMR és SAXS méréseket összehangolni. Egyértelműen kimutatható, hogy a közeg hatással van a mért értékekre. Egy 0,4mM töménységű lizozim oldatot véve alapul 298K hőmérsékleten a translációs diffúziós mérésekből számolt hidrodinamikai sugár értéke só hiányában $21,9 \pm 0,1 \text{ \AA}$, míg 150mM NaCl jelenlétében $18,9 \pm 0,1 \text{ \AA}$. Ugyanezen oldatok, ugyanezen körülmények mellett felvett SAXS szórásgörbéi azt mutatják, hogy a girációs sugár a Guinier tartományban megbízhatóan, és legkisebb hibával a nagyobb, így a 150mM ionerősség mellett számolható, a kapott érték $14,2 \pm 0,4 \text{ \AA}$. A kísérleti adatokból számolt alakfaktor 0,75 és ez a szám a szerkezeti modellből származtatott értékkel cseng össze. A kapott elsődleges kísérleti adatok is szemléltetik, hogy mennyire oda kell figyelni ilyen értékek származtatásánál.

(iii) Továbbgondolva az empirikus összefüggéseket arra is választ kerestem, vajon lehetséges-e egy effektív fehérje sűrűséget becsülni? Kismolekulákra jó közelítéssel 620 kg/m^3 az érték (Evans 2013), de biomolekulák esetében a sűrűség nem független a fehérjelánc hosszától, alakjától, solvatációjától (hidratációjától) és mozgékonyaságától. Az 5.1. egyenlet alapján az effektív sűrűségeket próbáltam értelmezni. A Voronoi féle módszer (Voronoi 1908) 1470 kg/m^3 átlagértéket becsül eltemetett és oldószer által nem hozzáférhető atomokra. Amennyiben az atomok oldószernek kitettek, és változó számú vízmolekulával kell számolni, különféle sűrűség értékek születnek. Nekem nem sikerült a globuláris fehérjékre számolt effektív sűrűség értékek és a molekulatömeg között összefüggést megállapítani. Próbálkoztam még SASA értékekkel való összevetéssel is, de ezek sem vezettek eredményre. Annyi megállapítható, hogy a globuláris rendszerek esetében a sűrűség többé kevésbé független a fehérjelánc hosszától. IDP rendszereknél más a helyzet. Az elvárásnak megfelelően a számolt értékek kisebbek, és ebben az esetben egy $\rho = 569 \cdot M^{-0,52}$ képlettel leírható lecsengés is illeszthető az adatokra. Ismét polimerkémiából tudjuk, hogy makromolekulák sűrűségének változása „ideális” oldószerben a molekulaméret $-0,50$ hatványával írható le, és úgy tűnik az IDPk ezt a megfigyelést alátámasztják. Továbbá kimutatták, hogy erőteljesen denaturáló közegekben (6M GdnHCl) a látszólagos sűrűség M -től való függése leírásánál M hatványkitevője $-0,64$ - $-0,66$. Mindezek tükrében levonható az a következtetés, hogy az IDPk és a szintetikus polimerek viselkedése hasonló. Továbbá a denaturált fehérjék és IDPk tulajdonságai között sincs nagy különbség.

(iv) Ez utóbbi állítás valódiságát azért ellenőrizni kell. A letekeredett állapotok denaturált közegbeli viselkedésének vizsgálatára óriási erőfeszítéseket tettek, és továbbra is nyitott kérdés, hogy mikor érhető el a denaturáció végpontja, ez pedig milyen kaotróp közegben történik meg? Válaszokat keresve én a biokémiában és NMR spektroszkópiában leginkább használatos 8M karbamid (urea) közeget választottam, és ebben a közegben határozottam meg

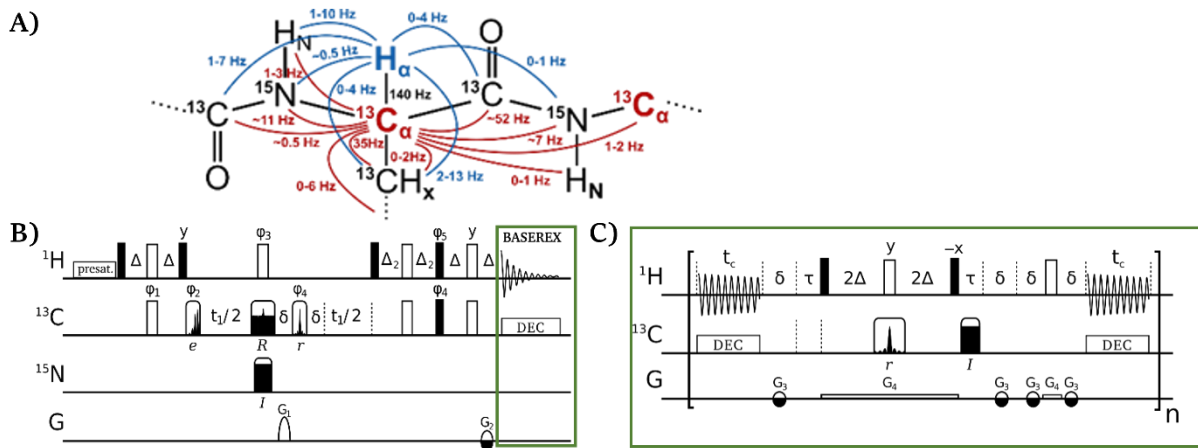
néhány fehérje translációs diffúziós együtthatóját. Azt várnánk, attól függetlenül mi az eredeti kiindulási állapot (globuláris, vagy rendezetlen), hogy a végeredmény egy letekeredett „random coil” lesz. Ám ahhoz, hogy ellenőrizni tudjam, vajon a mért pontok hogyan helyezkednek el a linearizált empirikus egyeneseken először egy viszkozitás korrekciót kell alkalmazni (8M karbamid és vizes közeg viszkozitása eltér). Az eredmény az 5.1C ábra nem kitöltött négyzetei és körei. A globuláris fehérjékre elég szerteágazó eredmények születtek, hiszen vannak olyan esetek, amikor a globuláris egyenesre esnek a pontok – azaz nincs letekeredés. A magyarázatot erre a viselkedésre a fehérje szerkezetében kerestem, és nem meglepő módon arra az ismert következtetésre jutottam, hogy pH=7,0 környékén a diszulfid híddal is rendelkező fehérjék (lizozim, PAF) nem tekerednek le, tehát jogos az eredmény. Más fehérjék csak részlegesen tekerednek le, így a mért érték a két egyenes között található, de van arra is példa, hogy a rendezetlen egyenesre kerül az érték ami egy letekeredett állapotnak felel meg. A denaturált IDP-kre vonatkozó eredmények a linearizált egyenesre vagy annak közelébe esnek, megerősítve azt a tényt, hogy a 8M karbamid denaturáció és a vizes közegben mutatott viselkedés hasonló. Ebből a tényből kiindulva, az irodalomban denaturált közegekre felállított összefüggésekből kiszámoltam az r_H értékeket, és valóban azok az általam meghatározott IDP-kre érvényes egyenletekből számolt adatokkal jó egyezést mutatnak. Ez azt is jelenti, hogy mind az IDP-k, mind a denaturált fehérjék maradék szerkezeti hajlamai – 8M karbamid közegben – nem fogják befolyásolni a globális hidrodinamikai jellemzőket.

A szisztematikus vizsgálat eredményeképpen sikerült tehát empirikus összefüggéseket felírni globuláris és IDP fehérjékre, melyeknek szerteágazó bioanalitikai alkalmazása lehet, többek között lehetővé teszik a denaturáció, az aggregáció követését, vagy a denaturáció teljességének megállapítását. Kísérleti igazolást nyert az a tény is, hogy a szintetikus polimerek és IDPk hasonló viselkedést mutatnak.

5.2. Új, $^1H^\alpha$ -detektált NMR pulzusszekvenciák rendezetlen fehérjék jellemzésére

Az IDPk konformációs heterogenitását a kísérleti körülmények nagymértékben befolyásolják, így a másodlagos szerkezeti hajlamokat mutató szakaszok hossza és helyzete függ a hőmérséklettől, az oldat pH értékétől, az ionerősségtől. Könnyen belátható, hogy a releváns biológiai funkcióban betöltött szerepüket tekintve ezen rendszerek jellemzését fiziológiás körülmények mellett célszerű végezni. Ilyen feltételek mellett a $^1H^N$ detektált HSQC mérések alkalmazása hátrányos lehet, mivel az oldószer víz és az amidprotonok közötti csere következtében több -NH- környezet kiszélesedett jele a detektálási szint alá kerül (4.3.2. ábra). Ennek kiküszöbölésére a megoldásokat az $^1H^\alpha$ -detektálás jelenthetné, hiszen a H^α protonok nem diszociálisanak. Ami korábban ezen módszer háttérbe szorítását eredményezte, az egyfelől a C^α környezet jelszélessége, gyors relaxációja, a vízjel közelsége (~4,7 ppm körül, a H eltolódások pedig 3,9 - 4,8 ppm tartományba esnek). Az IDP-k esetében viszont a $^1H^\alpha$ rezonanciajelek szélesedése elsősorban az izotópjelölésből fakadó nagyszámú csatolás következménye, amint azt az 5.2.1A ábrán is szemléltetem, és a relaxációs idők is hosszabbak, mint a globuláris fehérjék esetében. Másfelől az $^1H^N$ amid és $^1H^\alpha$ tartományok szélessége

nagyon hasonló, 1ppm körüli. Mindezek figyelembevételével a cél egy ún. „pure-shift” – valódi eltolódás - ^1H , ^{13}C szelektív korrelációs mérés megtervezése volt, melynek során mind hetero-, mind homo-nukleáris lecsatolást alkalmazunk, és ami kellően érzékeny ahhoz, hogy kis populációjú állapotok detektálása is lehetővé váljon. A megalkotott SHACA-HSQC és a BASEREX adatgyűjtés pulzus szekvenciái az 5.2.1B és C ábrákon láthatók.

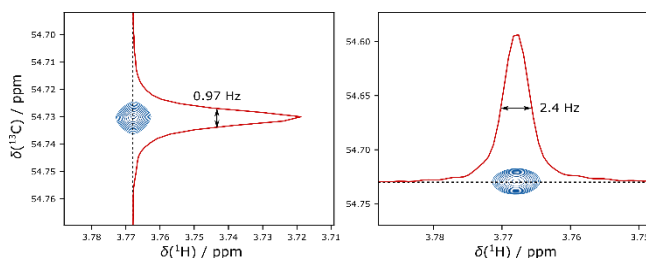


5.2.1. ábra: a) A ^{13}C , ^{15}N izotópjelölt fehérjékben előforduló csatolások: pirossal a $^{13}\text{C}_\alpha$ környezet és kékkel a $^1\text{H}_\alpha$ környezet csatolási partnerei és az állandók értékei. B) A SHACA-HSQC pulzusszekvencia, zöld téglalap jelöli az adatgyűjtési szakaszt. C) A BASEREX adatgyűjtés pulzusszekvenciája. Fekete téglalapok jelölik a kemény 90 fokos pulzusokat, üres téglalapok pedig a kemény 180 fokos pulzusokat. A megfelelő szelektív formázott pulzusok dőlt betűvel szerepelnek: *e*: EBURP (1,5ms) – C_α szelektív; *R*: BURBOP (2ms) szélessávú invertáló pulzus; *r*: REBURP (1,5ms) – C_α szelektív, *I*: BIP szélessávú invertáló pulzus ami B) esetében 1,6ms és a ^{15}N amidtartományt, C) esetében 160 μs és a C_α tartományt fedi le. $\Delta = \frac{1}{4} J_{\text{CH}}$, $\Delta_2 = \frac{1}{4} J_{\text{CH}}$, $\delta = 300\mu\text{s}$, $\tau = 160\mu\text{s}$. A megválasztott adatgyűjtési időtől függően $t_c = 9$ -13,5 ms, $n=8$ -20 értékek között mozog. A gradiens pulzusok maximális (53,4 G/cm) gradiens erősséghez viszonyított aránya: $G_1=80\%$, $G_2=20,1\%$, G_3 értéke 7-9% és minden csonkolt periódus alatt az előjele változik, $G_4=0,1\%$. Az indirekt dimenzió echo/antiecho detektálású.

A SHACA-HSQC pulzus szekvenciáját elemezve az INEPT szelektivitása a C_α régióra szelektíven kiadott gerjesztési *e* (EBURP) pulzus révén érhető el. Ezt követően a t_1 evolúciós idő során ^1H , ^{13}C és ^{15}N csatolási evolúciók refokuszálása történik meg. A ^1H lecsatolást a szokásos 180° -os pulzus biztosítja, a ^{15}N esetében ez egy szelektív *I* (BIP) refokuszáló pulzussal oldható meg, ami a peptidgerinc NH tartományát (90-150ppm) fedi le. A ^{13}C lecsatoláshoz egy BURBOP 180° -os pulzust követően egy 180° fokos C_α Reburp szelektív pulzust használtam. Ennek az eredménye, hogy a $^{13}\text{C}_\alpha$ spinek 360° fokos forgatásnak vannak kitéve, így folyamatos a kémiai eltolódás evolúció. Minden más ^{13}C spin 180° -os pulzust érzékel és invertálódik, a következmény a ^{13}C - $^{13}\text{C}_\alpha$ spinek csatolási evolúciójának refokuszálása. Kivételt képez ez alól a három-kötéses C_α - C_α csatolás, $^3J_{\text{C}_\alpha\text{C}_\alpha}$, illetve a szerin aminosav kétkötéses C_α - C_β csatolása, $^2J_{\text{C}_\alpha\text{C}_\beta}$ - mivel a C_β kémiai eltolódás a szelektíven gerjesztett tartományba esik. A mágnesezettség ^1H -ra való visszavitelét követően az adatgyűjtés alatt ^1H - ^1H homonukleáris lecsatolás is megvalósul. Ez azt jelenti, hogy az adatgyűjtés nem folyamatos, adott t_c időközönként (lásd 5.2.1C. ábra) egy szelektív invertáló elem kerül beépítésre, melynek eredményeképpen a kémiai eltolódás evolúció megmarad, és a csatolási ^1H - ^1H evolúció refokuszálódik. ^{13}C izotópjelölt molekulákról lévén szó, az általunk korábban kifejlesztett BASEREX (Band Selective Refocusing on X) módszer alkalmazása válik be

(Haller 2019). Ennek alapja egy szelektív BIRD^d (Bilinear Rotation Decoupling) típusú bilineáris forgatási lecsatolás, melynek során a ¹³C csatornán nem a BIRD szekvenciában szokásosan használt keménypulzusokat, hanem a ¹³Ca tartományt lefedő szelektív (REBURP) pulzust és a ¹³C-¹³Ca lecsatoláshoz pedig egy *I* (BIP) invertáló pulzust használunk. A t_c idő alatt jó közelítéssel feltételezhető, hogy minimális a homonukleáris csatolási evolúció. Az ideális t_c szelet hossza 9-13,5 ms, és ez időtartam alatt a ¹³C csatornán történő heteronukleáris lecsatolást a *garp* szekvencia biztosítja. A BASEREX lehetőséget teremt a heteronukleáris lecsatolási teljesítmény jelentős csökkentésére, aminek köszönhetően hosszú adatgyűjtési idő (akár 0,5s) is biztosítható. A SHACA-HSQC mérés során mindkét dimenzióban elérhető nagy felbontás, ami elsősorban a rendezetlen fehérjék jelátfedésének kiküszöbölését jelenti. A direkt dimenzióban a H α protonok szingulett jeleket eredményeznek, kivételt képez a glicin, ahol a homonukleáris csatolás nem működik és a geminális csatolás dubletteket eredményez. A vízjel minimális, erről a BASEREX időtartama alatti gyenge gradiensek, a szekvencia előtt alkalmazott elötétítés is gondoskodik.

A pulzusszekvencia teljesítőképességét több rendszeren is kipróbáltam. Kismolekulás mintaként a kereskedelmi forgalomban is kapható 20 esszenciális, ¹³C,¹⁵N izotóp jelölt aminosav változó arányú keverékét használtam, ami elsősorban a pulzusszekvencia paramétereinek beállítására szolgált.



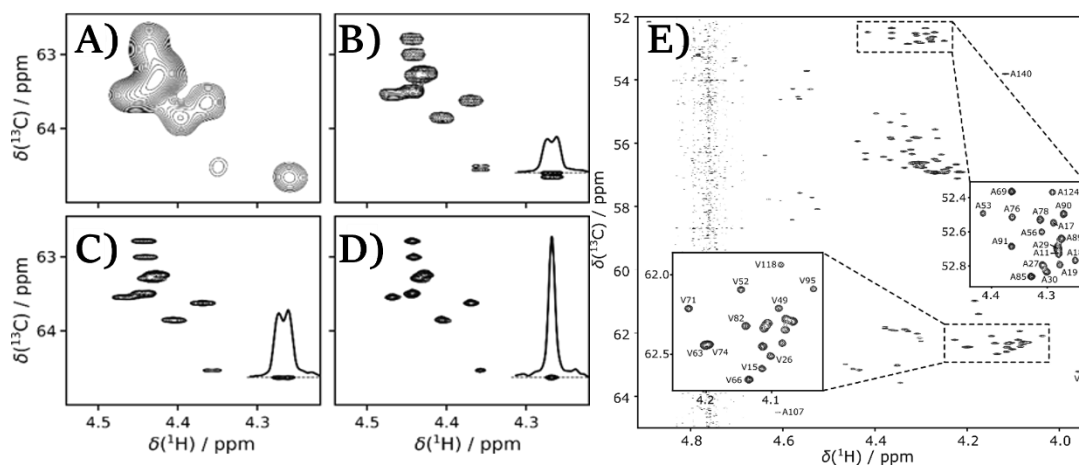
5.2.2. ábra. ¹³C,¹⁵N-jelölt aszparaginsav SHACA-HSQC keresztcsúcsa és a hozzá tartozó indirekt/direkt dimenziókban az oszlop/sor vonalszélesség értéke.

Minden aminosav esetében a teljes lecsatolás következtében keskeny jelek detektálhatók, az 5.2.2. ábrán ezt az aszparaginsav példáján mutatom be. A 2D spektrum megfelelő sorának/oszlopának dekonvolúciója ¹H dimenzióban ~2,5Hz, ¹³C dimenzióban ~1,0Hz vonalszélességet mutat – ami kiváló eredmény.

A 62 aminosav hosszú p53TAD¹⁻⁶⁰ rendezetlen fehérje SHACA-HSQC spektrumának teszteléséhez összehasonlítási alapként a gyakorlatban leginkább használt konstans idejű HSQC (CT-HSQC) (Vuister 1992) spektrumot használtam. Az 5.2.3A ábrán a CT-HSQC prolin régióra nagyított részlete látható, ebben a tartományban 9 jel található, ám ezek nehezen megkülönböztethetők. A szelektív, csak ¹H és ¹³C lecsatolást tartalmazó HSQC mérés során már jelentős javulás tapasztalható (5.2.3B ábra). Itt az indirekt dimenzióban jól megfigyelhetők az ¹J_{CN} és ²J_{CN} okozta felhasadások, ezeken javít a ¹⁵N lecsatolás alkalmazása (5.2.3C ábra). Végül a BASEREX hozzáadása az adatgyűjtési szakaszban jól elkülönülő, keskeny jelek detektálásához vezet (5.2.3D ábra).

Következő példának a szintén rendezetlen, 168 aminosav hosszú, α -szinukleint (AS) választottam. Ez a fehérje hét KTKE(Q)GV szakasszal, és nagyon kis jeldiszperzióval rendelkezik. Az 5.2.3E ábrán bemutatott SHACA-HSQC felvételen a legtöbb aminosav jele

feloldható, még a kritikusnak tartott valin és alanin régiókban is, a nagyításon látszik, hogy az adott tartományba eső 17 alanin; illetve 18 valin jel azonosítható.



5.2.3. ábra. A)-D): ^1H - ^{13}C korrelációk: 1mM p53TAD¹⁻⁶⁰, 10% D₂O, pH=6,2 mintán 303K hőmérsékleten, nagyítás a prolin régióra: a) CT-HSQC; b) SHACA-HSQC: 2k x 1k komplex pont, ^{15}N lecsatolás nélkül, c) ^{15}N lecsatolás beiktatásával és d) az adatgyűjtés ideje alatt BASEREX alkalmazásával. E) 200 μM α -szinuklein 5% D₂O, pH=7,02 mintán 303K hőmérsékleten, SHACA-HSQC: 2kx512 komplex pont. Mindkét felvétel 700MHz-en készült, NS=4, d1=0,7s, aq=243ms, t_c=10,1ms, n=12 paraméterek mellett.

Ezt követően érdemes megítélni azt, hogy a SHACA-HSQC teljesítménye hogyan viszonyul a $^1\text{H}^{\text{N}}$, illetve a ^{13}C detektált 2D mérések paramétereire. Az 5.2.1 táblázatba kigyűjtött értékek mutatják, hogy az IDP rendszerek jeldiszperziója $^1\text{H}^{\alpha}$ tartományban ~ 1 ppm, ami SD 700 Hz-nek felel meg, $^{13}\text{C}^{\alpha}$ tartományban pedig a glicineket nem számítva ~ 16 ppm, ami SD 2800 Hz. Ennek fényében a SHACA-HSQC felbontása a ^{13}C -detektált CON felbontásához hasonló, és nagyobb mint ami a $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC méréssel elérhető. A felsorolt példák azt is szemléltetik, hogy mindkét rendezetlen fehérje – melyek aminosav szekvenciája és hossza is nagyon eltérő – jelei hasonló jelszélességeket mutatnak. Ezek az értékek ^1H dimenzióban: 7-9 Hz, ^{13}C dimenzióban: 6-8 Hz, ami direkt dimenzióban a másik két mérés értékeivel összhangban van, az indirekt dimenziót illetően kissé jobb jelszélességet mutat. Végül a mérés érzékenységét tekintve, egy 700 MHz-es Prodigy N₂ hűtéssel ellátott mérőfej alkalmazása során a releváns $S/(N\sqrt{t})$ arány a SHACA-HSQC-ben 7-szer nagyobb, mint a CON esetében. Ez azt jelenti, hogy ugyanazon jel/zaj viszony eléréséhez a CON mérést $\sim 7^2$, azaz ~ 50 -szer hosszabb ideig kell futtatni, ami jelentős idő megtakarítást jelent a $^1\text{H}^{\alpha}$ detektálás alkalmazásakor.

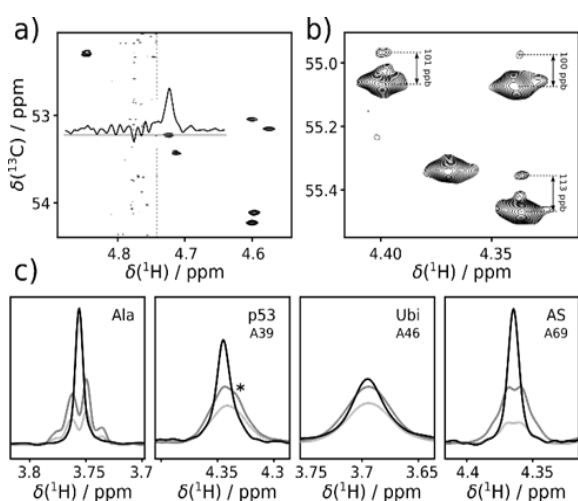
5.2.1. táblázat. Gyakorlatban használt 2D mérések és a SHACA-HSQC felbontás értékei: SD: jeldiszperzió, és SW mért jelszélesség tartományok 700MHz-en.

| Mérés típus | Direkt dimenzió | | Indirekt dimenzió | |
|----------------------------------|-----------------|--------|-------------------|--------|
| | SD(Hz) | SW(Hz) | SD(Hz) | SW(Hz) |
| $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC | 700 | 4,5-13 | 1680 | 7-15 |
| CON | 1050 | 7-10 | 2450 | 4,5-13 |
| SHACA-HSQC | 700 | 7-9 | 2800 | 6-8 |

Ugyanakkor a $^1\text{H}^\alpha$ -detektált mérések ellen gyakran felhozott érv, hogy a víz jelenléte zavar és a fehérjét D_2O -ban kell oldani. Méréseim során a maximális D_2O tartalom 10% volt, és a jól beállított paraméterek mellett a maradék vízjel minimális (5.2.3e ábra), sőt a vízhez nagyon közeli jelek is detektálhatók (lásd 5.2.4a ábra).

Amennyiben arra próbálunk rávilágítani, milyen koncentrációkat tudunk ezen mérési időtartamok alatt detektálni, akkor érdemes megfigyelni a nagy intenzitású jel mellett 100 ppb felterű eltolódásnál sok esetben megjelenő kis keresztcsúcsot, ami a deuterált amid ^{13}C környezetéhez rendelhető (5.2.4b ábra). A keresztcsúcs változó intenzitása a különböző mértékű $-\text{NH}/\text{D}$ cserére utal. A bemutatott spektrum egy $50\mu\text{M}$ töménységű, 5 % D_2O tartalmú, $\text{pH} = 7.03$ értékű és 303K hőmérsékletű α -szinuklein mintán 42 perc alatt készült és a kis jelekre vonatkoztatott koncentráció $\leq 2,5\mu\text{M}$.

Az elérhető érzékenység növekedés számszerű becsléséhez összehasonlítottam egy



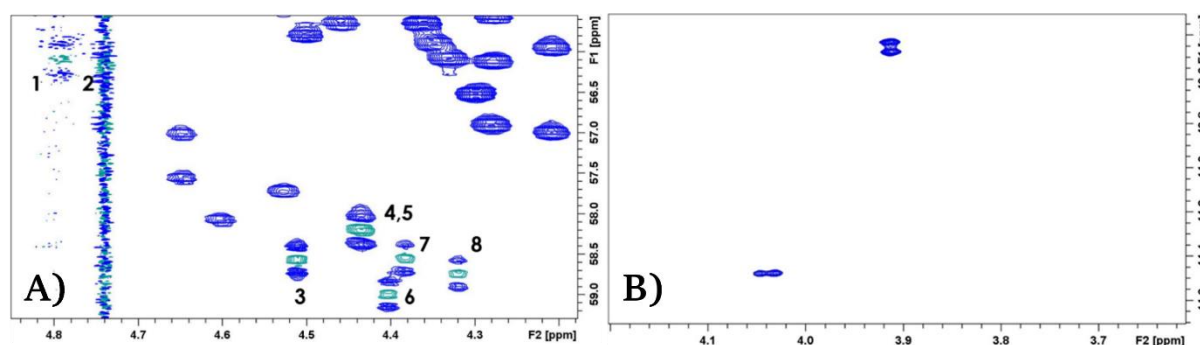
5.2.4. ábra. SHACA-HSQC részletek: a) a vízhez közeli jel detektálása, és intenzitásának szemléltetése. A függőleges szaggatott vonal jelöli az O1 frekvenciát. b) az $^1\text{H}/^2\text{H}$ izotóp eltolódás detektálása c) érzékenység növekedés az alanin esetében a 2D spektrum megfelelő sorainak elemzésével: világosszürke: csak $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ lecsatolás, sötétszürke: ezen felül ^{15}N lecsatolás, fekete: teljes, és BASEREX lecsatolást is tartalmazó mérés. Az Ala környezet viselkedése a szabad aminosavban, illetve különböző méretű IDP, és globuláris fehérjékben.

adott környezetre – jelen esetben az alanin H_α jelére – vonatkoztatva a jelintenzitásokat amennyiben (i) csak $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ lecsatolást; (ii) $^1\text{H}, ^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}$ lecsatolást; végül (iii) ezek mellett a BASEREX lecsatolást is alkalmaztam. Az 5.2.4c ábra mutatja be ennek a növekedésnek az alakulását a molekulamérettel és a fehérje szerkezetével összefüggésben. A különböző hosszúságú rendezetlen és globuláris fehérjék adott alanin környezetében látható, hogy a t_1 evolúciós idő alatti lecsatolás minden esetben jel/zaj viszony növekedéshez vezet. Az indirekt dimenzióban alkalmazott ^{15}N lecsatolás kétszeres intenzitás növekedést jelent. A direkt dimenzióban a szomszédos $-\text{CH}_3$ csoport jelenléte 1:3:3:1 intenzitású multiplettet

eredményez, ami a homonukleáris lecsatolás következtében szinguletté esik össze, és az eredő elméleti növekmény $8/3 = 2,6$. A teljes elméleti növekmény tehát $2 \cdot 2,6 = 5,3$. Ezt az értéket a szabad aminosav és az AS spektrumai esetén elérjük. A szerkezettel bíró His-Ubi-nál a növekedés csak 2,1, míg a dinamikus p53 esetében ez az érték 2,8. Arra a következtetésre jutottam, hogy az elméleti értéket akkor lehet megközelíteni, ha a nem-lecsatolt spektrumokban a multiplettek azonosíthatóak (szabad aminosav, AS). Amennyiben ez a multiplett szerkezet nem azonosítható, a homonukleáris lecsatolás okozta növekmény kisebb, vagy akár elhanyagolhatóvá is válik. Másfelől, a 8-20 tipikusan 9ms hosszúságú elemet tartalmazó BASEREX szekvencia ideje alatt a relaxációval is számolni kell. Ez nagyobb méretű globuláris

fehérjéknél, melyek rövid T_2 relaxációs idővel rendelkeznek, jelentős intenzitás veszteséggel jár, így a szerkezettel bíró fehérjék vizsgálatánál kb 100 aminosav az a hosszúság ahol még növekmény detektálható. Ez a szabály a mobilis rendezetlen fehérjékre nem vonatkozik, hiszen igazolható, hogy például az AS jobb eredményeket hoz, mint a jóval rövidebb p53TAD¹⁻⁶⁰.

Az előnyös tulajdonságok mellett érdemes a mérés hátrányait is megismerni. Tekintettel arra, hogy a szerin aminosav C^α és C^β kémiai eltolódásai $\sim 58,7$ illetve $\sim 63,7$ ppm értékeknél találhatóak a $C\alpha$ szelektív impulzus mindkettőt érinti és így a szerinek torzult keresztcsúcsot mutatnak. Ennek ellenére, amint azt az 5.2.5A ábra is szemlélteti, a p53TAD¹⁻⁶⁰ mind a nyolc szerin környezete detektálható. A másik kényelmetlenség, hogy a SHACA-HSQC spektrumban a glicin aminosav nem detektálható. Egy külön kísérletben, ahol a $\Delta 2$ várakozási időt $1/(8J_{CH})$ értékre módosítjuk, a glicin környezetek jelei fognak megjelenni, de geminális 1H - 1H környezetekről lévén szó a homonukleáris lecsatolás itt nem hoz eredményt. Az 5.2.5B ábra mutatja a p53TAD¹⁻⁶⁰ esetében a detektált két glicin környezetet. A láncvégi glicin $-NH_2$ csoportjának kémiai eltolódása nem esik a BIP pulzus által lefedett amidtartományba, és az indirekt dimenzióban a 43,4 ppm-nél megjelenő dublett a $^1J_{CN}=8,4Hz$ miatti csatolásnak köszönhető.

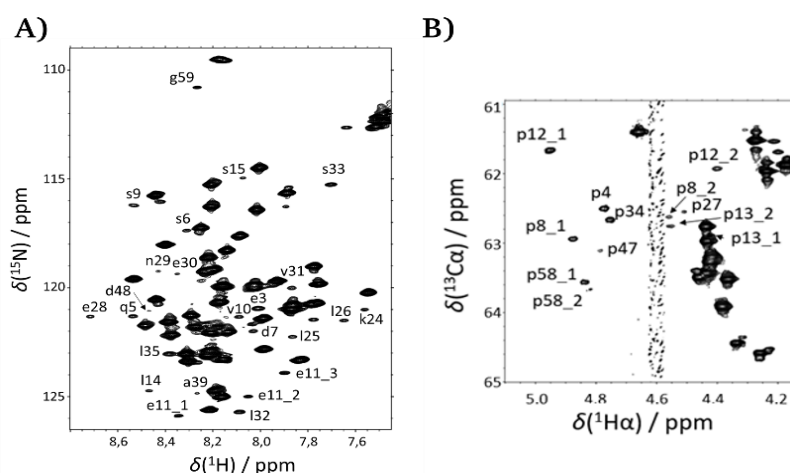


5.2.5. ábra. A) 1mM p53TAD¹⁻⁶⁰ spektrumrészlete: az indirekt dimenzióban csak 1H , ^{13}C lecsatolást tartalmazó SHACA-HSQC, megjelölve a nyolc torzult szerin jele; B) ugyanezen mintán a glicin régióra optimált SHACA-HSQC.

Végezetül elmondható, hogy az újonnan bevezett impulzus szekvencia *felbontás, érzékenység és víznyomás* tekintetében nagyon jó eredményeket mutat. Előnye, hogy fiziológiás körülmények mellett szolgáltat információt a fehérjéről, mivel a pH és a hőmérséklet kevésbé zavaró tényezők. Az elsősorban rendezetlen fehérjékben szép számmal előforduló prolinok is detektálhatók, és az érzékenységnek köszönhetően a minor formákat is ésszerű mérési időben ki lehet mutatni. Amennyiben szükséges, a mérés időtartama nem-lineáris mintavételezéssel (NUS) csökkenthető. Már 5% D_2O tartalom mellett is jó minőségű spektrumot kapunk, a maradék vízjel hatása kisebb térfogatban (például 3mm-es NMR cső alkalmazásával) még kevésbé lehet zavaró. Mindezen tulajdonságok alapján a SHACA-HSQC lehet az $^1H^\alpha$ -detektált mérések referencia spektruma, és beépíthető a 3D-típusú mérésekbe, ezáltal megkönnyítve és újabb kapaszkodót jelentve a rendezetlen fehérjék tanulmányozásában. A 2D mérés többértően alkalmazható, kémiai, biológiai farmakológiai célokra, izotóp jelölt molekulák monitorozására, poszt-transzlációs módosulatok okozta változások feltérképezésére, metabolikus útvonalak meghatározására (Nath 2016, Saborano 2019, Schätzlein 2018).

5.2.1. A prolin *cisz/transz* izomerek azonosítása

A 60 aminosav hosszú p53TAD¹⁻⁶⁰ régió 10 prolint tartalmaz, melyek több izomer formában lehetnek jelen. Fontos annak ismerete, hogy mely prolin környezetben milyen szerkezeti formák vannak jelen, és ezek egyértelműen milyen izomerhez tartoznak. A szerkezeti sokaság pontosabb leírásán túl ilyen információk biológiailag is relevánsak, hiszen több prolin is foszforilációs hely közelében található, ami a fehérje működési mechanizmusának feltárásában segíthet. Erre irányuló NMR spektroszkópai vizsgálatokban arra utaló jel, hogy a prolin környezetében valami észlelhető, már a ¹H, ¹⁵N korrelált spektrumon is látható, ugyanis a fő jeleken kívül számos kis intenzitású jelet is detektálni lehet (5.2.6A ábra). A jelazonosítás



5.2.6. ábra. A) A p53TAD¹⁻⁶⁰ ¹H, ¹⁵N-fHSQC spektruma, az azonosított minor jelek; B) SHACA-HSQC részlet: az azonosított minor prolin környezetek.

megjelenik, ezek fő jelekhez viszonyított aránya 3-13% között változik, és jó egyezést mutat az ¹H^N-detektált mérésből származó kiértékeléssel. A minorok mennyisége az 5.2.1. összefüggés alapján határozható meg:

$$m\% = \frac{[m]}{[m]+[M]} \cdot 100 \quad (5.2.1.)$$

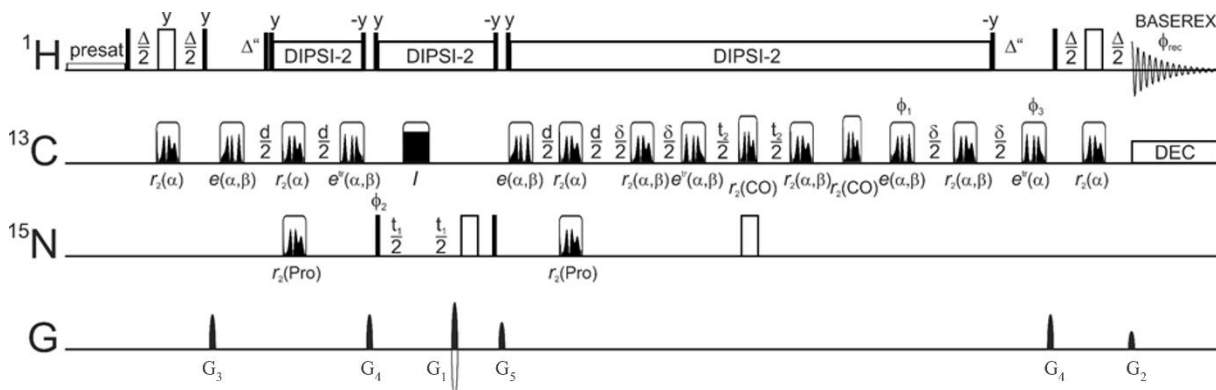
ahol *m* a minor formát, *M* pedig a fő, major formát jelöli.

Következő lépés a prolin jelek izomerizációs állapotának egyértelmű meghatározása, ami a C β és C γ kémiai eltolódások ismeretében lehetséges. Amennyiben a C β -C γ = $\Delta\beta\gamma$ különbség ~5ppm akkor *transz*-, ha ~10ppm akkor *cisz*-prolin izomerről van szó. Ezen értékek meghatározásához megfelelő mérések futtatása szükséges, ám ezek a szakirodalomban elég hiányosak, a ¹H α -detektált technikák között nem szerepelnek prolin szelektív mérések. A kérdés megoldásához új mérési megközelítéseket kell tervezni, és több lehetőség áll rendelkezésre:

a) A 3D HACAN mérést alapul véve és szem előtt tartva, hogy a prolin szelektivitás leginkább a ¹⁵N dimenzióban valósítható meg a 3D Pro-(HCA)NCACBHA pulzusszekvencia tervezhető. A prolin szelektivitást azt biztosítja, hogy a ¹⁵N tartományban a prolin kémiai eltolódásai (130-145 ppm) jól elkülönülnek a többi aminosavra vonatkozó értékektől (100-115 ppm). A megalkotott pulzusszekvencia a 5.2.7. ábrán látható, a koherencia útvonal pedig:

elvégzését követően kiderül, hogy ezek a kis jelek mind prolin közeli aminosavakhoz tartoznak, továbbá az adott minor Pro-X szakaszok össze is köthetőek. A minor prolin jelek detektálására a SHACA-HSQC mérés korábban tárgyalt érzékenysége nyújt lehetőséget. Az 5.2.6B ábrából kitűnik, hogy a prolin régióban több kis jel is

$^1\text{H}^\alpha/{}^1\text{H}^\delta \xrightarrow{J_{\text{HC}}} {}^{13}\text{C}^\alpha/{}^{13}\text{C}^\delta \xrightarrow{J_{\text{CN}}} {}^{15}\text{N}_{\text{Pro}}$; $t_1 \xrightarrow{J_{\text{CC}}, J_{\text{CN}}} {}^{13}\text{C}^\alpha/{}^{13}\text{C}^\delta, {}^{13}\text{C}^\beta/{}^{13}\text{C}^\gamma$; $t_2 \xrightarrow{J_{\text{CC}}} {}^{13}\text{C}^\alpha/{}^{13}\text{C}^\delta \xrightarrow{J_{\text{H}\alpha\text{C}\alpha}} {}^1\text{H}^\alpha/{}^1\text{H}^\delta$; t_3
 ahol feltüntettem a lépések során aktív csatolásokat, t_i ($i=1-3$) az akvizíciós periódusokat jelöli.

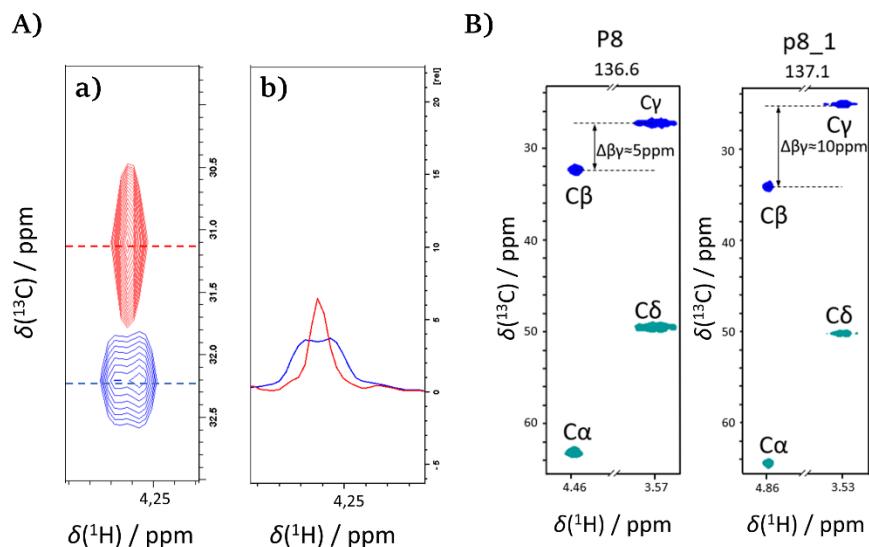


5.2.7. ábra. A 3D Pro-(HCA)NCACBHA pulzusszekvencia. A kemény 90° -os pulzusok fekete kitöltésűek, a 180° -os pulzusokat üres téglalapok, a szelektív pulzusokat az amplitúdó mintázatuk jelölik. Nagybetűvel jelölve a szélessávú pulzusok: I – adiabatikus Crp60(80). Kisbetűsek az adott sávzélességet lefedő pulzusok, zárójelben a kiválasztott környezet: e – Q5 típusú SEBOP gerjesztő, vagy 90° -os univerzális forgató pulzus; r – REBURP refókuszáló pulzus; r_2 : Q3 típusú SURBOP (4ms) refókuszáló pulzus. Minden pulzus x irányú, eltérő esetben a rajzon jelölve. Az időtartamok: $\Delta=1/(2 \ ^1J_{\text{CH}})$, $\Delta''=1/(3 \ ^1J_{\text{CH}})$, $d=1/(2 \ ^1J_{\text{CN}})$, $\delta=1/(2 \ ^1J_{\text{CC}})$. A gradiens pulzusok maximális gradiens erősséghez viszonyított aránya: $G1=80\%$, $G2=8,1\%$, $G3=50\%$, $G4=-30\%$, $G5=-20\%$. Az első dimenzió echo/antiecho detektálású, és a $G1$ gradiens előjele váltakozik, a második dimenzió States-TPPI detektálás, és ϕ_1, ϕ_3 váltakoznak.

Sáv szelektív pulzusok alkalmazásával a H^α mágneszettséget a C^α , majd ezt követően kizárólag csak a N_{Pro} környezetekre visszük át INEPT szekvenciák segítségével, és t_1 idő alatt megtörténik a ${}^{15}\text{N}$ kémiai eltolódás evolúció. Ezután reverz INEPT segítségével a mágneszettség a $\text{C}\alpha$ és $\text{C}\beta$ környezetekre tevődik át, ezek kémiai eltolódás evolúciója a t_2 idő alatt zajlik. Továbbiakban a mágneszettség átvitel a $\text{C}\alpha$ környezetre, innen pedig a $\text{H}\alpha$ -ra valósul meg. A detektálás során ez alkalommal is a valós idejű homo- és heteronukleáris lecsatoláson alapuló BASEREX szekvenciát alkalmaztam. A kísérlet során ${}^{15}\text{N}$ lecsatolás nem-szelektív π impulzussal oldható meg, sáv szelektív r_2 ${}^{13}\text{C}$ pulzusok segítik a C-C lecsatolásokat ($\text{C}^\alpha\text{-C}'$, $\text{C}^\alpha\text{-C}^\beta$), míg az ${}^1\text{H}$ lecsatolásra a DIPSI szolgál. A nagy vízjel kiküszöbölését segíti a Kay-féle $\pi/2\text{-}\pi/2$ motívum, illetve a relaxációs idő alatt a vízjel telítése. A BASEREX lecsatoláshoz a korábban már ismertetett értékeket alkalmaztam, és az ily módon megvalósított adatgyűjtés javít a felbontáson, illetve $\sim 2x$ intenzitás növekedés detektálható, amint az az 5.2.8A ábrán is látható. A pulzusszekvencia előnyei közé tartozik az egyértelmű prolin-szelektivitás, melynek köszönhetően más aminosavaktól származó jelek nem jelennek meg. Mivel a sáv szelektív pulzusok egyaránt érintik az α és δ környezeteket, a mérés során két korreláció is detektálható: a $\text{H}\alpha - (\text{C}\alpha, \text{C}\beta)$ mellett a $\text{H}\delta - (\text{C}\delta, \text{C}\gamma)$ is, így a teljes prolin szénváz kémiai eltolódásai meghatározhatók és a bennünket érdeklő $\Delta\beta\gamma$ különbség kiszámolható. A vízjel közelsége továbbra sem zavar, a spektrum minőségét, a kapott stripeket egy kiválasztott fő és egy minor prolin környezetre az 5.2.8B ábrán szemléltetem.

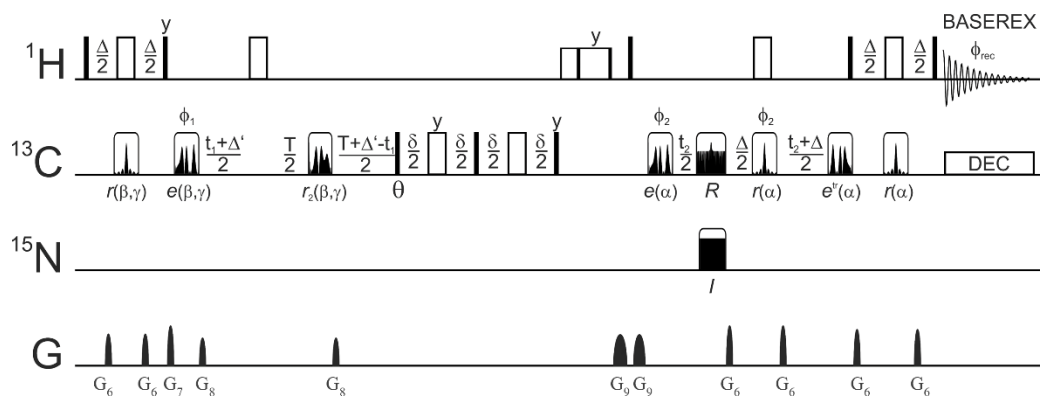
A mérés hátránya lehet a kísérleti idő hossza, ami tipikus paraméterek mellett a kis intenzitású jelek azonosítása érdekében $\sim 30\text{h}$ (lásd 5.2.2 táblázat). Tény és való ez a szám

relatív, mivel egy ^{13}C detektált 3D mérés, vagy egy $^1\text{H}^{\text{N}}$ detektált CCONH mérés hossza is hasonló tartományba esik. Viszont a hosszú koherencia útvonal nem az érzékenység malmára hajtja a vizet. Továbbá az is felróható, hogy a számunkra érdekes kémiai eltoldások ($\text{C}\beta$, $\text{C}\gamma$) nem direkt korreláltak.



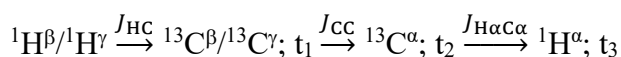
5.2.8. ábra. A) A 3D Pro-(H)CA NACBHA mérés jellemzői: a) az első 2D síkrészlet BASEREX lecsatolás beépítésével (piros) és hiányában (kék). Az egymáshoz képest elcsúsztatott spektrumok szemléletesebbek b) A két kiválasztott csúcshoz tartozó 1D spektrumszelet. B) A P8 fő és p8 minor környezetekre kapott eredmények.

b) Mindezeket kiküszöböli a 3D Pro-(H)CBCGCAHA pulzus szekvencia (5.2.9 ábra), amit minimális transzfer lépés beépítésével a 3D HCCH-TOCSY mérés alapján készítettünk.



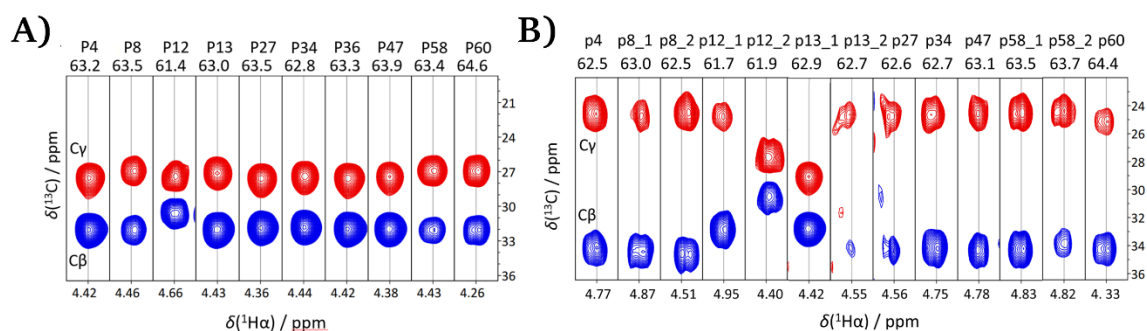
5.2.9. ábra: A 3D Pro-(H)CBCGCAHA pulzus szekvencia. A kemény 90° -os pulzusok fekete kitöltésűek, a 180° -os pulzusokat üres téglalapok, a szelektív pulzusokat az amplitúdó mintázatuk jelölik. Szélessávú pulzusok: I – BIP, R - refókuszáló BURBOP. Adott sávszélességet lefedő pulzusok, zárójelben a kiválasztott környezet: e - 90° -os univerzális forgató pulzus; r - REBURP refókuszáló pulzus; r_2 – Q3 típusú SURBOP refókuszáló pulzus. Minden pulzus x irányú, eltérő esetben a rajzon jelölve. Az időtartamok: $\Delta=1/(2 \ ^1J_{\text{CH}})$, $\Delta'=1/(4 \ ^1J_{\text{CH}})$, $\delta=1/(2 \ ^1J_{\text{CC}})$. Amennyiben r REBURP pulzust alkalmazunk, a pulzus hosszának 0,94-szerese az adott delay idő részét képezi (ref). A gradiens pulzusok maximális gradiens erősséghez viszonyított aránya: $G_6=16\%$, $G_7=30\%$, $G_8=16\%$, and $G_9=60\%$. Mindkét indirekt dimenzió fázis érzékeny States-TPPI inkrementálás.

A koherencia útvonal:



Ebben az esetben az oldallánc protonok mágnesezettségét visszük át a szomszédos szénatomokra, és a konstans idejű t_1 evolúciós idő alatt a $C\beta$, $C\gamma$ kémiai eltolódásai fejlődnek ki, durva felbontás alkalmazásával. A továbbiakban a Θ pulzus hosszával „hangolható” a kísérlet kimenetele. Amennyiben $\Theta = 0^\circ$, csak $C\beta$; $\Theta = 90^\circ$ esetén csak $C\gamma$ korreláció valósítható meg, viszont $\Theta = 45^\circ$ alkalmazásával egyenlő intenzitással és ellentétes előjellel mindkét környezet detektálható. A következő refókuszáló INEPT transzfer lépés kizárólagosan a $C\alpha$ -ra viszi át a polarizációt. A SHACA-HSQC típusú megoldás következménye, hogy t_2 evolúciós idő alatt nagy felbontással dolgozhatunk. Végezetül az adatgyűjtés ebben az esetben is a BASEREX valós idejű lecsatolással történik.

A mérés a kis számú, maximálisan optimált transzfer lépésnek köszönhetően nagy érzékenységű, 3D méréstől szokatlan módon nagy felbontású, és a $C\beta$, $C\gamma$ környezetek direkt korrelációját valósítja meg. Ugyan nem prolin szelektív, de kimutatható, hogy az esetleges áttörések nem befolyásolják a jelazonosítást, ugyanis más aminosavak jelei torzultak, nagyon kis intenzitásúak, és nem két jelet eredményeznek, tehát a prolinok egyértelműen azonosíthatóak (5.2.10. ábra).



5.2.10. ábra. A 3D Pro-(H)CBCGCAHA mérés eredménye: A) fő és B) minor jelek azonosítása a p53TAD¹⁻⁶⁰ esetében.

A t_2 dimenzióban a szokatlanul nagy felbontás (512 komplex pont) választása a mérés időtartamát megnöveli (5.2.2. táblázat), ám amennyiben ez a felbontás szükségtelen a mérési idő lényegesen rövidíthető, további időnyereség pedig a nem-lineáris mintavételezéssel is elérhető. Továbbá figyelemreméltó a Pro-(HCA)NCACBHA, illetve a $^1H^N$ -detektált (H)CCCONH mérésekhez képest a mérési idő csökkenése.

5.2.2. táblázat. Prolin környezetek meghatározását célzó 3D mérések tipikus paraméterei: a három dimenzióban alkalmazott komplex pontok, a tranziensek száma, a várakozási idő és a mérési időtartam.

| Mérés típusa | t_1 | t_2 | t_3 | NS | d1 | Mérési idő |
|------------------|-------|-------|-------|----|------|------------|
| Pro-(HCA)NCACBHA | 4k | 128 | 64 | 8 | 0,7s | ~ 30h |
| Pro-(H)CBCGCAHA | 4k | 512 | 16 | 4 | 0,7s | ~ 13h |
| (H)CCCONH | 1k | 64 | 72 | 16 | 1,0s | ~ 25h |

A kiértékelést követően a kémiai eltolódás adatokból egyértelműen számolható a $\Delta\beta\gamma$ különbség, ezek értékeit az 5.2.3. táblázatban foglaltam össze. Amint az elvárható, a fő jelek esetében a prolin mindig *transz* izomer formában van jelen. A detektált 13 minor komponens

esetében túlnyomórészt a *cisz* izomer detektálható, de két esetben a *transz* izomer is megjelenik, ez a Pro12-Pro13 motívumot érinti. Érdekes módon, a prolin gazdag környezetek esetében egy prolinhoz több minor forma is detektálható.

5.2.3. táblázat: A 3D Pro-(H)CBCGCAHA mérés alapján detektált fő/major és minor prolin jelek, a kiszámított $\Delta\beta\gamma$ különbségek értékei, az ennek alapján megállapítható izomer, és a minor forma %-os előfordulási aránya.

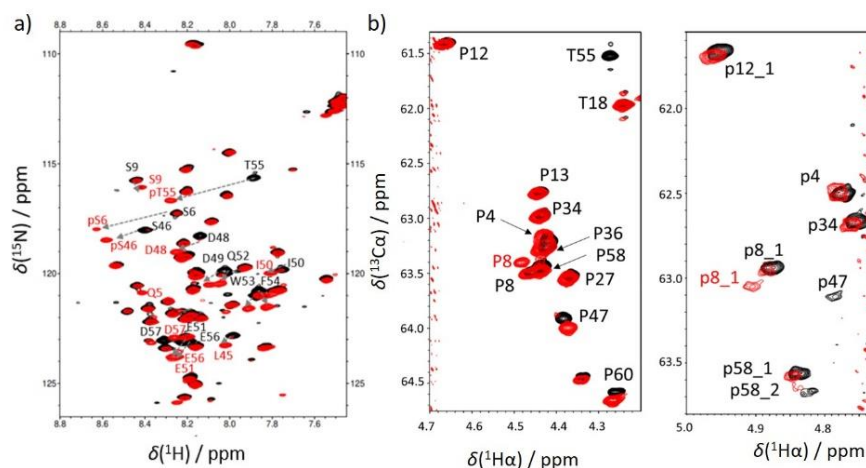
| Prolin | Fő/Major jel | | Minor jel | | |
|--------|---------------------------|---------------|---------------------------|---------------|--------|
| | $\Delta\beta\gamma$ / ppm | Pro-izomer | $\Delta\beta\gamma$ / ppm | Pro-izomer | Minor% |
| P4 | 4,7 | <i>transz</i> | 9,6 | <i>cisz</i> | 11,5 |
| P8 | 5,0 | <i>transz</i> | 9,4 | <i>cisz</i> | 9,0 |
| | | | 9,7 | <i>cisz</i> | 10,0 |
| P12 | 3,1 | <i>transz</i> | 8,2 | <i>cisz</i> | 13,0 |
| | | | 2,9 | <i>transz</i> | 8,0 |
| P13 | 4,7 | <i>transz</i> | 4,6 | <i>transz</i> | [a] |
| | | | 9,7 | <i>cisz</i> | [a] |
| P27 | 4,6 | <i>transz</i> | 10 | <i>cisz</i> | 5,5 |
| P34 | 5,0 | <i>transz</i> | 9,5 | <i>cisz</i> | 12,5 |
| P36 | 4,7 | <i>transz</i> | nem detektálható | | |
| P47 | 4,7 | <i>transz</i> | 9,6 | <i>cisz</i> | 4,5 |
| P58 | 5,3 | <i>transz</i> | 9,6 | <i>cisz</i> | 7,0 |
| | | | 9,5 | <i>cisz</i> | 6,0 |
| P60 | 5,1 | <i>transz</i> | 9,1 | <i>cisz</i> | 34,5 |

Az eredmények azt mutatják, hogy az új, érzékeny $^1\text{H}^\alpha$ -detektált megoldást tartalmazó pulzusszekvenciák lehetőséget nyújtanak fiziológias körülmények mellett, rövid idő alatt, akár 10-20 μM mennyiségben is minor prolin jelek kimutatására és egyértelmű azonosítására. Ugyanekkora jel/zaj viszony eléréséhez ez ^{13}C -detektált mérés ~64x hosszabb ideig tartana, ami nagy előrelépést jelent, arról nem is beszélve, hogy a technika széleskörűen, bármely bioNMR laboratóriumban alkalmazható. A pulzusszekvenciánk sikerességét a konkrét példa esetre vonatkoztatva elmondható, hogy először sikerült a p53TAD¹⁻⁶⁰ régióban prolin minorok detektálását és jellemzését megadni. Az eredmények további kérdéseket vetnek fel: (i) amennyiben *in vitro* körülmények között meghatározható az adott prolin környezet *cisz-transz* egyensúlyi eloszlása, vajon a poszttranszlációs módosítások mennyire vannak erre befolyással?; (ii) mi az oka annak, hogy a minor prolin környezetek előfordulási %-os mennyisége ennyire változó?

5.2.2. Poszttranszlációs módosítások hatása a *cisz/transz*-prolin egyensúlyra

A poszttranszlációs módosítások közül a foszforiláció jelenségét aknáztam ki. A foszforiláció enzimek útján valósul meg, és a szerin, vagy treonin aminosavakat érinti. A különböző enzimek különböző felismerési motívumokkal rendelkeznek, így a foszforiláció

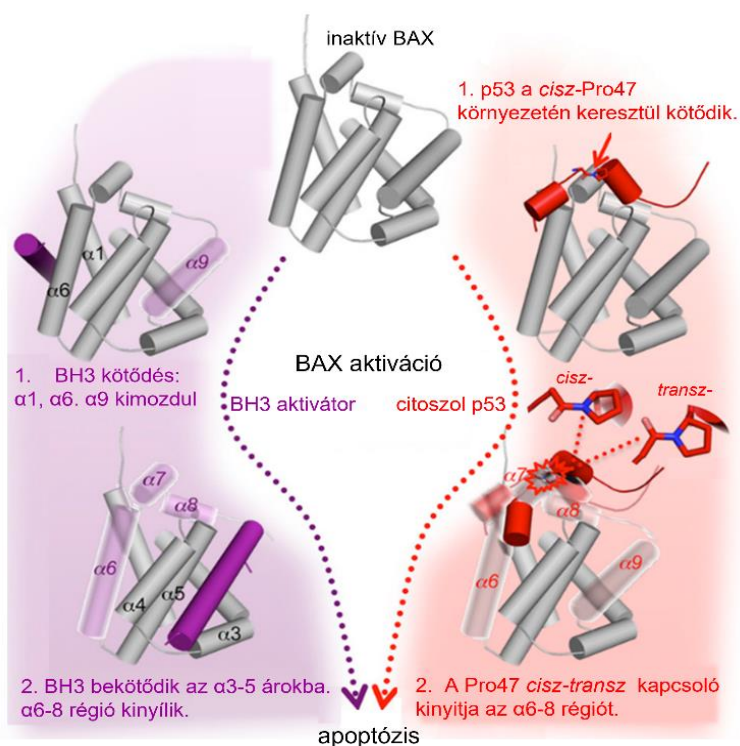
szelektíven megy végbe és az aminosav szekvencia fogja eldönteni, hogy melyik környezet foszforilálódik. A p53TAD¹⁻⁶⁰ 7 Ser és 2 Thr környezetet tartalmaz, melyek között két Ser-Pro motívum található. Én az apoptózisban jelentős szerepet játszó Ser46 környezetének viselkedésére igyekeztem rávilágítani, ennek érdekében kazein kináz 2 (CK2) enzimet választottam, melynek konszenzus szekvenciája: Ser/Thr-X-X-Asp/Glu. Előnyös, ha ebben több a negatív töltésű oldallánccal rendelkező aminosav, illetve ha a Ser/Thr+3 helyzetben Asp helyett Glu található. A nagy térkitöltésű, hidrofób oldallánccal rendelkező aminosavak és a prolin gátolják a foszforilációt. A web-alapú NetPhos 3.1 server (Blom 2004) segítségével futtatott predikció szerint a CK2 enzim a p53TAD¹⁻⁶⁰ régióban elsősorban három környezetet foszforilál, ezek a foszforiláció valószínűségének csökkenő sorrendjében: Thr55>Ser46>Ser6>Ser20. Irodalmi előzmények (Sun 2021) szerint a foszforiláció lassan megy végbe. Ennek értelmében a folyamatot ¹H,¹⁵N-sfHMQC és SHACA-HSQC mérésekkel 12 és 36 órás inkubációt követően monitorizáltam, és a lassan bekövetkező foszforilációt igazoltam. 12 óra elteltével a Thr55 foszforilációs szintje 100%, 36 óra elteltével a Ser46 környezet 86%-os, és a Ser6 környezet pedig 45%-os foszforilációs szintet mutatott, a Ser20 környezet <10%-ban foszforilálódott – jó egyezésben a predikcióval. A foszforiláció ténye a ¹H,¹⁵N-sfHMQC spektrumban követhető leginkább, hiszen a foszforilált Ser/Thr jele látványosan eltolódik (lásd 5.2.11A ábra). A kémiai eltolódás feltérképezés alapján számolt $\Delta\delta$ értékek arról tanúskodnak, hogy a foszforiláció csupán a közvetlen környezetben levő aminosavak (± 3) eltolódásaira van hatással. A SHACA-HSQC alapján látható, hogy a H α és C α környezetek csak kismértékben tolódnak el, a számított másodlagos kémiai eltolódások azt mutatják, hogy semmilyen szerkezeti változás nem történik (amint ezt már korábbi, rendezetlen szakaszokban történő foszforiláció során is megállapítottuk (Gógl 2018)).



5.2.11. ábra: A) A p53TAD¹⁻⁶⁰ foszforilációja CK2 jelenlétében. A folyamat követése ¹H,¹⁵N- sfHMQC illetve B) SHACA-HSQC mérésekkel. Fekete a nem-foszforilált, piros a foszforilált fehérjéről felvett spektrum. a prolin régióra fókuszálva, balra a fő, jobbra a minor jelek változása figyelhető meg.

A foszforiláció igazolását követően azt vizsgáltam meg, van-e ennek bármilyen hatása a prolin *cisz-transz* egyensúlyokra? A fő (*transz*) prolin jelek változását illetően a SHACA-HSQC spektrumon megfigyelhető (5.2.11B ábra), hogy P47 és P8 esetében két-két jel detektálható, egyik a foszforilálatlan Ser, másik a foszforilált Ser melletti prolin jeléhez

tartozik, és a térfogatintegrálok aránya a foszforilációs szintet tükrözi (85% P47, illetve 45% a P8 esetben). A 100%-ban foszforilált T55-höz legközelebbi prolin a +3 pozícióban található (P58), itt már kémiai eltolódásban nem detektálható változás. A P4, P8 és P58 prolinok a foszforilált környezettől 2, illetve 3 aminosavnyi távolságra találhatók. Ezen prolinok minor (*cisz*) jeleinek vizsgálata azt mutatja, hogy a foszfátcsoport beépítése nem befolyásolta a *cisz-transz* izomerek arányát. Nem ezt tapasztaljuk viszont a P47 esetén. A S46 foszforilációját követően a minor p47 (*cisz*) jele nem detektálható a SHACA-HSQC spektrumban, sőt a rákövetkező d48 jele is eltűnik a $^1\text{H}, ^{15}\text{N}$ korrelációs spektrumokon. Ez arra utal, hogy a foszforiláció hatására a *cisz-transz* egyensúly eltolódott a *transz* izomer irányába. Magyarázata az lehet, hogy a megnövekedett számú negatív töltés energetikailag és sztérikusan kedvezőtlen a *cisz*-prolin izomer kialakulásához.



5.2.13. ábra. A BAX fehérje lehetséges aktivációs útvonalai (Follis 2015 alapján)

Korábbi kutatások szerint (Follis 2015), az apoptózis során a BAX fehérje aktiválásához vezető egyik lehetséges útvonal a citoszolban található p53 fehérje közreműködésével történik (5.2.13. ábra). Első lépésben a p53 a TAD régióban található P47 *cisz*-térállású formájában kötődik az inaktív BAX fehérjéhez, majd a PIN *cisz/transz* polimeráz fehérje hatására megtörténik a *transz* P47 állapotba történő átkapcsolás. Ez a változás a BAX fehérje átrendeződését, nevezetesen a $\alpha 6-9$ hélixek felnyílását – és a BAX aktiválását vonja maga után. Az eredményeink szerint az egyensúlyi *in vitro cisz*-P47 koncentrációt egy foszforilációs esemény megszünteti (vagy még kisebb szintre szorítja vissza), így eltűnik az a téralkat, ami az inaktív BAX-hoz kötődhet, és az aktiváció ezen útvonala járhatatlanná válik. Hogy ez valóban így történik, és mi ennek a következménye az további – elsősorban részletes biológiai kutatások jövőbeli tárgyát képezi.

Ez több szempontból is egy igen jelentős megállapítás:

i) metodikai vonatkozásban elmondható, hogy a SHACA-HSQC a prolin szelektív 3D, $^1\text{H}^\alpha$ detektált mérésekkel együtt átfogó és egyértelmű jellemzését adja a *cisz-transz* prolin egyensúlyoknak, és bármilyen poszttranszlációs módosítás hatása jól monitorozható.

ii) biológiai relevanciáját tekintve, fiziológiai körülmények mellett, atomi szinten aránylag egyszerűen kimutatható, hogy a foszforiláció befolyással van a *cisz-transz* prolin egyensúlyra. A p53TAD¹⁻⁶⁰ viselkedését illetően az eredmény igen jelentős.

5.2.3. A szomszédos aminosavak hatása a *cisz*-prolin tartalomra

Az 5.2.3. táblázat utolsó oszlopának tanulmányozása során kiderül, hogy a minor prolin környezetek változó, 3-15% arányban fordulnak elő, és ez a jelenség megfigyelhető volt az általam vizsgált más rendezetlen fehérje szakaszok prolin aminosavai esetében is, (Gógl 2018, Pálffy 2016, Szabó 2022) illetve irodalmi adatokat is találni ennek alátámasztására (Ahuja 2016, Aitio 2012, Alderson 2018, Chaves-Arquero 2018, Dujardin 2019, Ludzia 2020, Mateos 2020, Urbanek 2020). Ez felkeltette az érdeklődésem, és ennek okaira próbáltunk rávilágítani. Egy kézenfekvő magyarázat a prolin melletti aminosavak típusában keresendő. Ennek érdekében összegyűjtöttük az irodalomban megtalálható azon rendezetlen fehérjéket, ahol kísérletileg meghatározták a minor prolin izomerek arányát. Érthető okoból nem sok ilyenre van példa, és csupán a közelmúlt irodalma szolgáltat ilyen információt. A rendelkezésre álló 11 rendezetlen, 40-220 aminosav hosszú fehérjét lehet értékelni. Megjegyzendő, hogy a rövid, prolin tartalmú peptidek nem kerültek számításba, ugyanis azokban az esetekben sokkal nagyobb arányban képződik a *cisz*-Pro. Ezt mi is bizonyítottuk egy 13 aminosav hosszú peptid szakaszon, ahol a Pro6 környezetre számolt a *cisz-transz*-Pro arány: 25%-75% (Sebák 2021). Az így létrehozott adatbázis elemzése a prolin közvetlen környezetében ($i \pm 3$, ahol i a prolin helyzetét jelöli) levő aminosavakra korlátozódott. Ennek oka, hogy a *cisz*-Pro izomer okozta szerkezeti változások (kis minor jelek az NMR spektrumban) ennél nagyobb távolságban már nem detektálhatóak. A 11 rendezetlen fehérjéből álló adatbázis $N^{\text{tot}}=101$ db prolin környezetet tartalmaz, aminek környezetében $n^{\text{tot}}=595$ db aminosav található. Az eredetileg elvárt szám $101 \cdot 2 \cdot 3=606$ volna, viszont a terminális végeken elhelyezkedő prolinok esetében nem mindig teljesül a ± 3 feltétel. Az aminosavak elemzéséhez a klasszikus, oldalláncok típusa szerint történő 7 csoportba való sorolást választottam, ezek (a későbbiekben használt szinkóddal ellátva):

1. glicin, Gly
2. alifás oldallánc (alanin, izoleucin, leucin, metionin, valin)
3. poláris oldallánc (szerin, treonin, cisztein, aszparagin, glutamin)
4. pozitív töltésű oldallánc (arginin, lizin, hisztidin)
5. negatív töltésű oldallánc (aszparaginsav, glutaminsav)
6. aromás (fenilalanin, tirozin, triptofán)
7. prolin, Pro

A hét típus %-os eloszlása a rendezetlen fehérjéket tartalmazó DisProt adatbázis alapján könnyen megadható (lásd 5.2.14A ábra bal oszlop). Első lépésként a saját adatkészletben található $\text{Pro} \pm 3$ környezetében elhelyezkedő aminosavak %-os előfordulását elemezzük (5.2.14A ábra jobb oszlop), és azt, hogy ez az eloszlás mennyiben különbözik a DisProt adatbázisban tapasztalttól. Az elemzés statisztikai analízissel történt, binomiális eloszlás vizsgálattal, a p bekövetkezési valószínűség az adott aminosavcsoport DisProt adatbázisban való előfordulása volt 0,1 szignifikanciaszint mellett. A kapott eredmények az 5.2.4. táblázatban láthatóak, ahol a várható értéktartomány a DisProt előfordulás alapján számolt érték (db), és ezt hasonlítom a saját adatbázisban található adott típusú aminosav számával (db). Megállapítható, hogy a saját adatbázisban szignifikánsan kevesebb Gly, negatív, illetve aromás

oldalláncú aminosav található, ellenben szignifikánsan több a Pro. Ezen eredmény elgondolkodtató, hiszen egyfelől érthető, hogy elsősorban a prolinban gazdagabb fehérjék esetén került elő a *cisz*-Pro kérdéskör, viszont a szignifikánsan kevesebb aminosav típus esetén egyértelmű magyarázat nem igazán adható. Már ebben a szakaszban levonható a következtetés, hogy érdemes volna mennél nagyobb halmazból meríteni, és figyelni, hogy a saját előfordulás értékek ezekre az aminosav típusokra vajon növekedni kezdenek-e?

5.2.4. táblázat. A DisProt és saját adatbázis eloszlásainak összevetése.

| Aminosav típus | DisProt előfordulás (%) | Összes aminosav ($n^{\text{tot}}=595$), saját adatkészlet | | |
|------------------------|-------------------------|---|-------------------------|--|
| | | Várható értéktartomány (db) | Előfordulás, saját (db) | DisProt adatbázissal történő összehasonlítás |
| Gly | 7,7 | 38-54 | 22 | szignifikánsan <i>kevesebb</i> |
| Alifás | 24,8 | 134-161 | 144 | <i>nincs</i> szignifikáns eltérés |
| Poláris | 24,1 | 130-157 | 157 | <i>nincs</i> szignifikáns eltérés |
| Pozitív töltésű | 14,6 | 76-98 | 98 | <i>nincs</i> szignifikáns eltérés |
| Negatív töltésű | 15,7 | 82-105 | 64 | szignifikánsan <i>kevesebb</i> |
| Aromás | 5,2 | 24-38 | 20 | szignifikánsan <i>kevesebb</i> |
| Pro | 8,1 | 40-57 | 90 | szignifikánsan <i>több</i> |

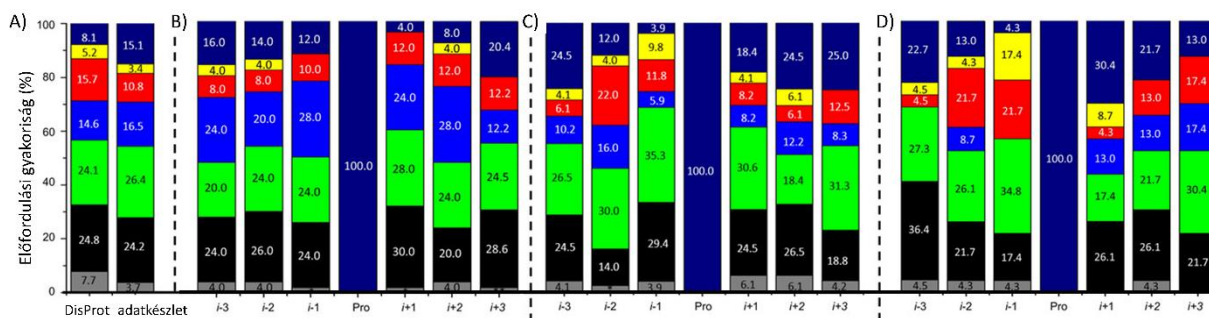
Így következő lépésben a saját adathalmaz N=101 szakaszát a *cisz*-Pro előfordulása szerint taglaltam, önkényesen 3 csoportot különböztetve meg: a) <5% (N=50, n=299 aminosav), b) >5% (N=51, n=296 aminosav), c) >10% (N=23, n=137 aminosav). A fentebb ismertetett statisztikai elemzés és a DisProt referenciával történő összevetést követően az eredmény:

5.2.5. táblázat. A DisProt és saját adatbázis eloszlásainak összevetése, a teljes saját adatkészletre és a *cisz*-Pro mennyisége alapján csoportosított halmazokra. Amennyiben nincs szignifikáns eltérés, azt üres cellák jelzik, a *kevesebb* és *több* a szignifikáns változásra vonatkozik.

| Aminosav típus | Mind, n=595 | <5% <i>cisz</i> -Pro, n=299 | >5% <i>cisz</i> -Pro, n=296 | >10% <i>cisz</i> -Pro, n=137 |
|------------------------|-----------------|-----------------------------|-----------------------------|------------------------------|
| Gly | <i>kevesebb</i> | <i>kevesebb</i> | <i>kevesebb</i> | <i>kevesebb</i> |
| Alifás | | | | |
| Poláris | | | <i>több</i> | |
| Pozitív töltésű | | <i>több</i> | <i>kevesebb</i> | <i>kevesebb</i> |
| Negatív töltésű | <i>kevesebb</i> | <i>kevesebb</i> | <i>kevesebb</i> | |
| Aromás | <i>kevesebb</i> | <i>kevesebb</i> | | |
| Pro | <i>több</i> | <i>több</i> | <i>több</i> | <i>több</i> |

Így már látható, hogy a Gly minden esetben szignifikánsabban kevesebb, a Pro pedig több. A nagy *cisz*-Pro tartalom esetén szignifikánsan kevesebb a pozitív töltéssel rendelkező aminosav, míg kis *cisz*-Pro tartalom esetén ez szignifikánsan több. Ha arra gondolunk, hogy az aromás π -prolin CH₂ kölcsönhatás kedvez a *cisz*-Pro kialakulásának (Mateos 2020), akkor kis mennyiségű *cisz*-Pro esetében nem meglepő, hogy a pozitív töltéssel rendelkező aminosav előfordulása szignifikánsan több és az aromás oldalláncú aminosav pedig kevesebb.

Következő lépésben azt vizsgáltam, hogy a *cisz*-Pro tartalom szerinti osztályozás három csoportjában miként alakul adott pozícióban ($i\pm 3$) az aminosav típusok előfordulása. Itt is a statisztikai vizsgálat során az adatok binomiális eloszlást követtek, a kísérletek száma az egyes pozíciókban lévő aminosavak száma volt, a bekövetkezés valószínűsége a teljes adatkészletben található előfordulási arány volt 0,1 szignifikanciaszint mellett. Referenciaként a saját adatkészletben lévő összes szekvenciából származó százalékos előfordulást, és nem a DisProt előfordulást használtam (5.2.14. ábra).



5.2.14. ábra. A) A különböző aminosavtípusok előfordulása a DisProt adatbázisban és a saját adatkészletben, illetve a prolin ± 3 környezetében levő pozíciókban: B) $<5\%$ *cisz*-prolin, C) $>5\%$ *cisz*-prolin, illetve D) $>10\%$ *cisz*-prolin tartalmú szekvenciák esetén.

Az 5.2.14. ábra alapján néhány szabályszerűség azért körvonalazódik:

a) a kis, $<5\%$, *cisz*-Pro tartalom esetében az Arg és Lys aminosavak szignifikánsan többször fordulnak elő, elsősorban az $i-3$, $i-1$, $i+1$ és $i+2$ pozíciókban. Ezen oldalláncok prolin karbonil csoportjával történő kölcsönhatása inkább a *transz*-Pro izomer kialakulásának kedvez.

b) a $>5\%$, *cisz*-prolint tartalmazó szekvenciákban a Pro aminosav szignifikánsan gyakrabban fordul elő, elsősorban az $i-3$, $i+2$ és $i+3$ pozíciókban. Ez a poliprolin II szerkezeti elemekben megtalálható Pro-X-X-Pro és Pro-X-Pro motívumok (± 3 pozíciókban lévő prolinok stabilizálják a PPII struktúrákat) jelenlétével magyarázható. Az $i+1$ pozícióban található Pro szintén kedvező, ez azt is jelenti, hogy a *cisz*-Pro-*transz*-Pro motívumok a *transz*-Pro-*cisz*-Pro elrendeződésnél gyakoribbak. Szintén szignifikánsan nagyobb az elektronban gazdag oldalláncok gyakorisága. Így az $i-2$ pozícióban a negatív, $i-1$ -ben a poláris és az aromás, $i+2$ -ben szintén az aromás oldalláncok a kedvezményezettek. Szignifikánsan kevesebb található viszont a pozitív töltésű aminosavakból, elsősorban az $i-1$, $i+1$ és $i+3$ pozíciókban.

c) Ha szűkítjük a kört, és azt elemezzük, hogy mi történik a $>10\%$ *cisz*-Pro tartalmú szekvenciákban, akkor az elektronban gazdag oldalláncok jelentősége hangsúlyos, a negatív töltésű Asp és Glu aminosavak szignifikánsabban többször fordulnak elő az $i-2$, $i-1$ és $i+3$ pozíciókban, az aromások az $i-1$ és $i+1$ pozíciókban szignifikánsan gyakoribbak. Irodalmi adatok rámutatnak, hogy a prolin közvetlen környezetében levő aromás aminosavak az π -prolin CH_2 kölcsönhatás következtében kedveznek a *cisz*-Pro kialakulásnak (Gustafson 2017, Mateos 2020). Továbbá az $i-3$ és $i-1$ pozíciókban a pozitív töltésű aminosavak előfordulása szignifikánsan kisebb.

Mindezek figyelembevételével érdemes megvizsgálni a p53TAD¹⁻⁶⁰ régió sajátosságait, ahol a prolin környezetében aromás oldalláncú aminosav nem található, mégis a Pro4, Pro8,

Pro12, Pro34, Pro58 környezetek >10% *cisz*-Pro minor formát tartalmaznak. Ezen szakaszokban az *i*-2 és *i*-1 pozíciókban elsősorban negítv töltésű aminosavak helyezkednek el, összhangban a fentebb megállapított következtetésekkel. Másfelől a Pro27, Pro47 kis mennyiségű minor formát tartalmaz, a Pro36 esetében pedig nem is detektálunk minor formát. Ez arra is utal, hogy nem csupán az aminosav típusa, de a másodlagos szerkezeti hajlam is befolyásolhatja az adott izomer forma létrejöttét, ugyanis, mint a következőkben kiderül, a Pro27 és Pro47 is egy α -helikális hajlamú szakasz lezáró eleme.

Végezetül, a minor adathalmaz folyamatos bővüléséhez az ismertett mérési módszerek is hozzájárulnak, és remélhetőleg ez a növekedő adatbázis eljut majd oda, hogy adott rendezetlen fehérje *cisz/transz*-Pro eloszlását megjósolja, esetleg adott izomer tartalommal rendelkező aminosav szekvencia is modellezhető/gyártható.

5.3. A rendezetlen fehérje/fehérje szakasz átfogó jellemzése, a kölcsönható partner viszonya: a rendezetlen-rendezett átalakulás

A flexibilis fehérjék és fehérje komplexek jellemzése a szerkezeti biológia kihívásai közé tartozik. Ebben a témakörben kutatásaim során több rendszer részletes elemzésével foglalkoztam, ezek közé tartozik a p53TAD régiója (62aa) (Dudás 2020); a miozin IIa (45aa) (Ecsédi 2018, Pálffy 2016); a miozin Va (24aa) (Bodor 2014, Hódi 2006); a TPPP25 terminális szakaszai (Zotter 2011a, Zotter 2011b); MAPK, RSK lineáris motívumok (Alexa 2015, Gógl 2016) és a DF31 (Szöllősi 2008). A következőkben ezen eredmények közül ismeretetek néhányat, mindenik esetben kicsit más aspektusokra fókuszálva.

5.3.1. A p53TAD¹⁻⁶⁰: szerkezet, dinamika szabad és S100A4 kötött állapotban

A korábban már ismertett p53TAD¹⁻⁶⁰ fehérje szakasz S100A4 fehérjével való kölcsönhatásának megismerése biológiailag is releváns kérdés. A két partner közül a Ca²⁺-kötő S100A4 fehérje globuláris, homodimer szerkezetű, míg a p53TAD¹⁻⁶⁰ szakasz rendezetlennek minősített. Maga a tény, hogy egy adott aminosav szekvencia mennyire hajlamos a feltekeredésre és egy rendezett másodlagos, harmadlagos szerkezet kialakítására, az már a primer aminosav sorrendjében kódolt. A rendezetlen fehérjékben a hidrofób, aromás oldallánccal rendelkező aminosavak hiánya, a sok hidrofíl aminosav és a prolinok jelenléte nem kedvez egy globuláris elrendeződés kialakításának, csupán adott szegmensek szerkezeti hajlamai nyilvánulnak meg. Ezt volna célszerű a konkrét p53TAD¹⁻⁶⁰ esetében is megvizsgálni, elsősorban predikációs programok segítségével. Az elmúlt évtizedekben több mint 50 rendezetlenséget/szerkezeti hajlam hiányát jósló web-alapú programot fejlesztettek, (Bodor 2021, Dosztányi és Tompa 2008, Erdős 2021, Meszaros 2018) melyek többféleképpen csoportosíthatók. Vannak olyanok, melyek az aminosavak biofizikai tulajdonságaira (pld. IUPRed2A, GlobPlot, FoldIndex, FoldUnfold), mások gépi tanulási módszerekre (neurális hálók, mély-tanulás alapú PONDR[®], DisEMBL, Disopred, Espritz, SPOT-Disorder) építenek, míg egy harmadik csoport konszenzus alapú (MFDp, GeneSilicoMetadisorder, PredictProtein).

Első lépésként mindenképpen érdemes ezek közül néhányat kipróbálni, hogy egy adott fehérje szegmensre mit becsülnek. Az 5.3.1. táblázatban a p53TAD¹⁻⁶⁰ esetében több prediktor eredményét hasonlítom össze.

5.3.1. táblázat. A p53TAD¹⁻⁶⁰ fehérje szakaszra futtatott jósló programok eredménye. Az aminosav szekvencia: MEEPQSDPSVEPPLSQETFSDLWKLLPENNVLSPPLSQAMDDLMLSPDDIEQWFTEDPGP

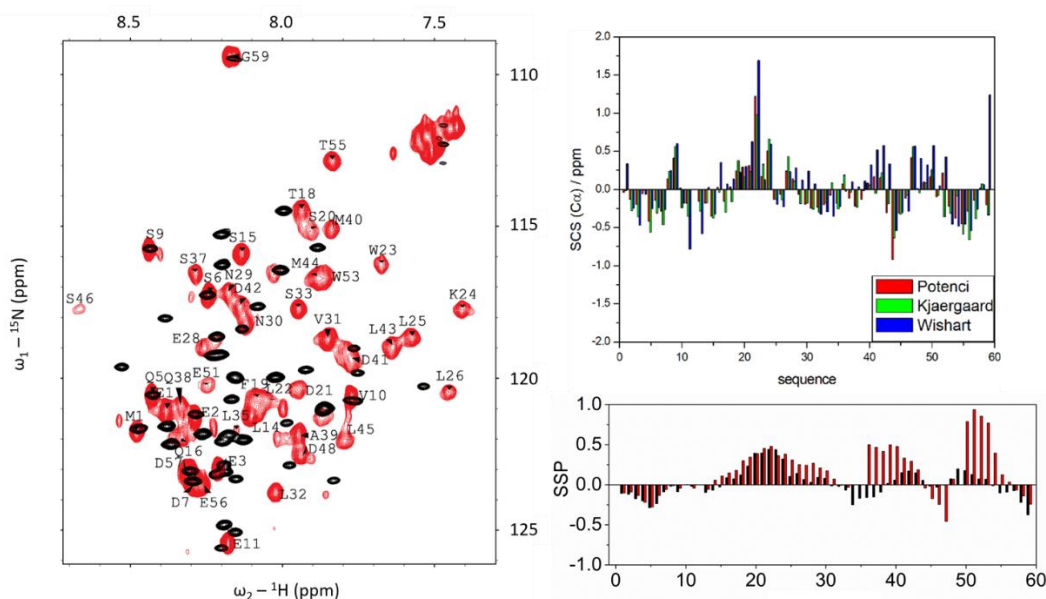
| Jósló program | Rendezetlen régió |
|-------------------------------|---|
| IUPRed2A-long | 1-22; 26; 30-60 |
| IUPRed2A-short | 1-15; 17-18; 37-39; 42-43; 46-60 |
| GlobPlot 2^a | 3-15; 32-42; 54-60 |
| FoldIndex^b | 1-21; 37-60 |
| FoldUnfold | 1-17 |
| PONDR[®] VLXT | 1-18; 34-60 |
| PONDR[®] VSL2 | 1-60 |
| PONDR[®] VL3 | 5-60 |
| DisEMBL^c | 1-16 |
| DISOPRED | 1-19 |
| ESpritz-Xray | 1-27; 45-60 |
| ESpritz-NMR | 1-60 |
| ESpritz-Disprot | 1-60 |
| MFDp | 1-60 |
| SPOT-disorder | 1-11; 58-60 |
| ProtPredict(PROFbval) | 1-9; 11-15; 17; 24-31; 33-40; 43-49; 51-52; 54-60 |
| ProtPredict(Ucon) | 1-16; 31-32; 36-37; 42-43; 45; 46-50; 60 |
| ProtPredict(NORSnet) | 1-24; 26-45; 48-54; 60 |
| ProtPredict(MD) | 1-60 |

^a Russell-Linding propenzitás; ^b window-31; ^cRemark-465;

Általánosságban elmondható, hogy majdnem minden megközelítés rendezetlennek minősíti az N-terminális 17-20-ig terjedő régiót és hosszabb-rövidebb szakaszokat 45-60 a C-terminális végről. Ezek után mindenképpen érdemes utánajárni annak, hogy a kísérleti eredmények mennyire vannak ezzel a predikcióval összhangban.

Tudjuk, hogy elsősorban IDPk esetében a pH, hőmérséklet, ionerősség nagymértékben befolyásolja a szerkezeti hajlammal rendelkező szakasz hosszát. Az NMR spektroszkópiai jelazonosítás során meghatározott kémiai eltolódás értékek a szerkezeti hajlam kialakulásáról tanúskodnak. A ¹⁵N/¹³C izotópjelölt p53TAD¹⁻⁶⁰ fehérjén futtatott ¹H^N detektált BEST alapú 3D mérésekből a teljes jelaszignáció megoldható. Már az alap 2D ¹H,¹⁵N-HSQC korreláció kis jeldiszperziója (5.3.1A ábra, fekete spektrum) is rendezetlenségről árulkodik és itt jegyzendő meg, hogy ebben a szerencsés esetben még 313K-en is jól elemezhető a spektrum. A peptidgerinc atomjainak és az oldallánc ¹³C környezeteinek kémiai eltolódás értékei közül a C β adatok felhasználásával a másodlagos szerkezeti hajlamok becsülhetőek, úgy, hogy a mért kémiai eltolódásokat egy referencia (random-coil) értékhez viszonyítjuk és az aminosav szekvencia függvényében értelmezzük a tendenciákat. Ez a megoldás a H α , C α , C α -C β kémiai

eltolódások esetén a leginkább informatív, de a palack nyaka a referencia érték (RCCSR - Random Coil Chemical Shift Reference) jósága. Az irodalomban erre több megközelítés létezik, egy pontosabb kép eléréséhez figyelembe kell venni a pH, hőmérséklet hatását is, ennek ellenére a naszcens szerkezeti hajlamok hossza így is eltérő lehet. Az 5.3.1B ábrán a $C\alpha$ eltolódásokra három RCCSR megközelítéssel számolt SCS értékek eltérőek, minden esetre az egyértelmű, hogy az F19-K24 szakasz tranziens helikális jelleggel bír, kisebb mértékű helicitás hajlam lehet a M40-44 és S46-W53 tartományokban; míg a terminális végen és a TAD1-TAD2 között egy kanyarra való utalás látható, viszont az értékek nagyon kicsik és messzemenő következtetést nem érdemes levonni. Az irodalomban egy másik, gyakran használt megközelítés a Marsh és munkatársai által bevezetett SSP (Secondary Structural Propensity) értéken alapul (Marsh 2006). Ezt a megközelítést mutatja az 5.3.1C ábra, ahol a szabad p53TAD¹⁻⁶⁰ viselkedését a fekete oszlopok jelzik. A T18-E28 szakasz pozitív tendenciát mutat, ami helikális hajlamra utal, míg a többi rész rendezetlen, a turn hajlamra való utalás megszűnik. Mindezeket összevetve látszik, hogy vannak eltérések a módszerek között, ezért érdemes több RCCSR megközelítést kipróbálni, hiszen a szerkezeti hajlamokkal rendelkező szakaszok esetében a különböző módszerek azonos eredményre kell vezessenek. A jelen esetben 313K-en és pH=6 értéken meghatározott kísérleti adat több predikció eredményével is összhangban van.



5.3.1. ábra. A) ^1H , ^{15}N -sfHMQC spektrumok p53TAD¹⁻⁶⁰ szabad (fekete) és S100A4-kötött állapotban (piros) - erre az esetre vonatkozik a feltüntetett jelazonosítás; B) SCS $C\alpha$ értékek változása az aminosav szekvencia függvényében különböző RCCSR megközelítések (Kjaergaard 2011, Kjaergaard és Poulsen 2011, Nielsen és Mulder 2018, Wishart 1995, Wishart és Sykes 1994) alkalmazásával; C) az SSP módszer a szabad (fekete) és S100A4-kötött (piros) p53TAD¹⁻⁶⁰ esetében.

Továbbiakban felmerül a kérdés, vajon a szerkezeti hajlam mennyire tükröződik a dinamikai viselkedésben? A meghatározott relaxációs paraméterek: T_1 , T_2 , és hetnoe értelmezéséhez a kísérleti módszerek fejezetben ismertetett redukált spektrális sűrűség analízist végeztem el. A származtatott spektrális sűrűség értékek közül a $J(\omega_N) - J(0)$ ábrázolásmód (5.3.2B ábra) kiválóan mutatja, hogy minden aminosav kis $J(0)$ értékkel rendelkezik, és

figyelembe véve az egy korrelált mozgással leírt görbét, ezek a fekete folytonos vonallal ábrázolt görbe kezdeti szakaszán csoportosulnak.

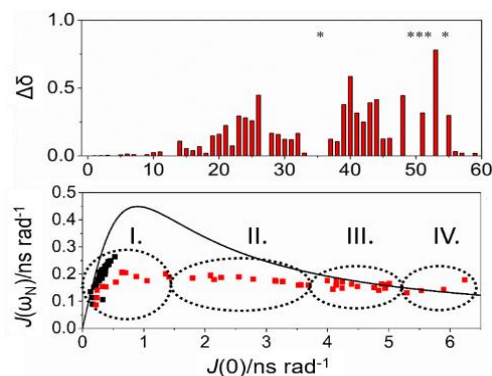
Levonható tehát a következtetés, hogy mind a kémiai eltolódás értékekből származtatott szerkezeti információk, mind a dinamikai mérések eredményei egy nagyon mobilis, rendezetlen fehérjére jellemző viselkedésre utalnak.

Ezt követően az S100A4 fehérjével történő kölcsönhatást elemeztem. Első lépésében ^{15}N -jelölt p53TAD $^{1-60}$ és jelöletlen Ca^{2+} -kötött S100A4 1:1 arányú komplexét vizsgáltam. A komplexképződést ^1H , ^{15}N -sfHMQC mérésekkel követve megfigyelhető, hogy a szabad p53TAD $^{1-60}$ -hoz képest a jeldiszperzió jelentősen megnő és a legtöbb jel eltolódik (5.3.1A ábra, piros keresztcsúcsok). Ezzel

egyidejűleg jelszélesedés tapasztalható, mely egyes esetekben olyan mértékű, hogy az adott aminosav jele detektálási határ alá kerül. Nem is meglepő, hiszen a kölcsönhatás következtében a molekulaméret jelentősen megnő és 7kDa helyett 31kDa lesz, így a rotációs korrelációs idő is megváltozik. A kialakult komplex esetében újra jelazonosítást kell elvégezni, ezt ismét a 3D BEST típusú mérések alapján sikerült megadni. Most már egyértelműen számolható a szabad p53TAD $^{1-60}$ és az 1:1 komplex 2D ^1H , ^{15}N -sfHMQC spektrumaiból a kumulált $\Delta\delta$ kémiai eltolódás (5.3.2A ábra), ami a kötőhelyek azonosítását teszi lehetővé. Egy önkényesen megállapított 0,15 értéknél nagyobb eltolódást tükröznek a S20-N29, A39-M44 és D48-T55 régiók, ezek elsődlegesen érintettek a komplex kialakulásában, míg a D48-T55 régióban több jel olyan mértékű kiszélesedést szenved, hogy a detektálási határ alá kerül. Az L26, M40 és W53 környezetekre számolható a legnagyobb érték, ami azt mutatja, hogy ezek az aminosavak szenvedik el a legnagyobb kémiai környezet változást.

A szerkezeti változás tekintetében az SSP értékek (5.3.1C ábra, piros oszlopok) is nagymértékű változást mutatnak. A szabad p53TAD $^{1-60}$ tranziens hélix szakasza meghosszabbodik, és új helikális szakaszok detektálhatók a P36-D42, I50-F54 régiókban. A hélix kialakulását támasztják alá a meghatározott hőmérsékleti koeficiensok is, melyek a K24-L26, S20-D21, A39-L45 szakaszokban és a T55 környezetben hidrogén hidak kialakulására utalnak.

A dinamikai paramétereket illetően az elsődlegesen meghatározott T_1 , T_2 és hetnoe értékek is változást mutatnak. Az R_2 ($1/T_1$) a szabad fehérjében egyenletesen változik 2 s^{-1} körül, a komplexben viszont az $1,4\text{--}25\text{ s}^{-1}$ intervallumban változó értékeket kapunk, melyek jelentős növekedést mutatnak az E17-S33, S37-T55 szakaszokban, legnagyobb értékeket pedig a W23-L25, D42-L45, E51 környezetek mutatják. A heteronukleáris NOE adatok a W23-L26, D41-S46, E51 és T55 aminosavakra a legnagyobbak, érzékeltetve, hogy ezekben a régiókban a szerkezeti hajlamok erősödtek. Az aminosavakra kapott redukált spektrális sűrűség analízis (5.3.2B ábra, piros négyzetek) már nem kis $J(0)$ érték tartományára mutat, hanem a viselkedés

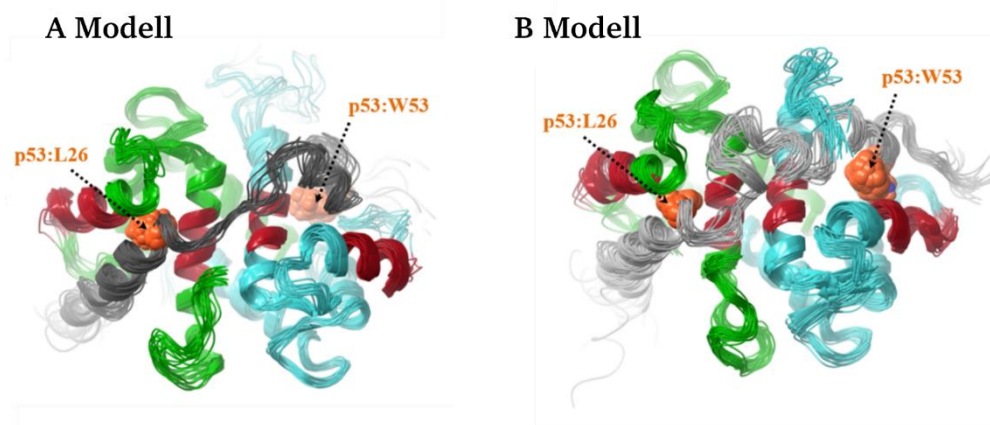


5.3.2. ábra. A) p53TAD $^{1-60}$ jeleinek kémiai eltolódás változása S100A4 kölcsönhatás következtében; B) a redukált spektrális sűrűség analízis szabad (fekete) és kötött (piros) p53TAD $^{1-60}$ esetében.

alapján több csoportra is megkülönböztethető: a mobilis terminális végek (I), a helikális régiókat összekötő loop régiók (II) a helikális szakaszok (III) és (IV) a leginkább merev környezetek, melyek konformációs egyensúlyokban is részt vehetnek: W23, K24, L32, E51.

Mindezek tükrében az NMR paraméterek széleskörű kiértékelése egybehangzóan mutatja, hogy az S100A4 fehérjével alkotott komplexében a p53TAD¹⁻⁶⁰ egy hosszú, mobilis N-terminális (M1-Q16) és egy rövid, mobilis C-terminális (E56-P60) szakasszal rendelkezik, melyek a kölcsönhatásban nem vesznek részt. Három helikális szakasz alakul ki: a TAD1-ben a T18-N29, a TAD1-TAD2 összekötésében a P36-P47 és a TAD2-ben található I50-T55, melyeket dinamikus régiók kötnek össze.

Továbbiakban a kötött p53TAD¹⁻⁶⁰ szerkezetét szerettem volna megadni. Az NMR spektroszkópiai meghatározáson alapuló szerkezetszámoláshoz kényszerfeltételek megadása szükséges. Komoly erőfeszítéseket tettem, több próbálkozás, kísérleti körülmény, hőmérséklet változtatásával, hogy elsősorban távolsági ¹H-¹H NOE adatokat tudjak meghatározni. Ám csupán kis számú, helikális elrendezésre utaló (*i, i+2*) és (*i, i+3*) NOE keresztesúcsot sikerült a 3D ¹H, ¹⁵N HSQC-NOESY spektrumokból kigyűjteni a korábban is említett jelszélesedés miatt, ami értelemszerűen a kötődésben leginkább érintett régiókban a leghangsúlyosabb. A szerkezetszámolás tehát nem járható út, viszont a detektált ¹H-¹H térbeli közelségek -melyek leginkább a második helikális szakaszt érintik – elégségesnek bizonyulnak ahhoz, hogy MD szimulációk kezdeti feltételként beépíthetőek legyenek, majd ezután a szerkezeti számolások kényszerfeltételek nélkül futtathatóak. Az eredmény két különböző elrendezés: A Modell és B Modell (5.3.3. ábra), mindkettő teljesíti a kísérletileg is meghatározott NOE kényszerfeltételeket és összhangban van az NMR spektroszkópiai kiértékelésekkel: az L14-L26 és I55-T55 régiókban stabil hélix kialakulása tapasztalható. Egyes szerkezetekben D7-P13 szakasznak is van helikális jellege, de nagyfokú mobilitás jellemzi, amit a B-faktorok nagy értékei jól tükröznek; és ez az NMR dinamikai eredményekkel is teljes összhangot mutat.



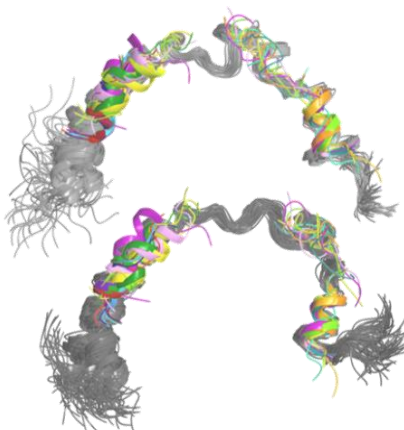
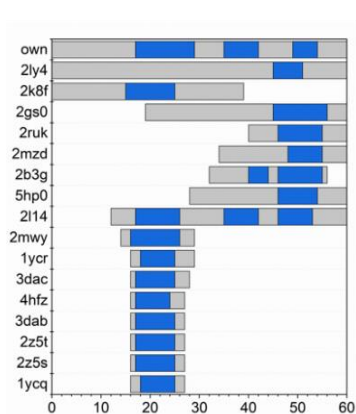
5.3.3. ábra. A p53TAD¹⁻⁶⁰ – S100A4 komplex NMR távolsági kényszerfeltételek alapján számolt MD szimulációs szerkezeti modellei. A p53TAD¹⁻⁶⁰ szürke különböző árnyalataival van ábrázolva, narancssárgával kiemelve a fő horgonypontok.

A B Modellben a p53TAD¹⁻⁶⁰ C-terminális szakasza oldószernek kitett és a középső M40-M44 szakasz is helikális, amit az S100A4 II láncának C-terminálisán bekövetkező konformációs változása idéz elő. Mindkét modell esetében a fő horgonypontok és a legkisebb

B-faktorral is rendelkező aminosavak az L26, M40 és W53, melyekre az NMR mérések a kölcsönhatás során bekövetkező legnagyobb kémiai eltolódásváltozást mutatták. Az L26 és W53 az S100 monomerek által alkotott hidrofób zsebben helyezkednek el (amit az S100: L42, F45, L58, L62, V77, F78, C81 és I82 környezetei alkotnak), míg az M40 a két monomérláncot összekötő „gerincen” található.

A két módszer alapján elért eredmények azt tükrözik, hogy a szabad állapotban rendezetlen p53TAD¹⁻⁶⁰ kötődés hatására részlegesen rendeződik, elsősorban a TAD1 és TAD2 régióban képez hélixet, viszont túlnyomórészt így is rendezetlen, mobilis marad, úgynevezett „bolyhos” (fuzzy) komplexet képez. Az NMR-MD módszerek ötvözete sikeres megoldásnak bizonyul ezen nehezen tanulmányozható rendszerek szerkezeti modelljének és viselkedésének leírására. Olyan esetekben tanácsos ehhez a hibrid megoldáshoz nyúlni, amikor a kristályosítás nem járható út, illetve az NMR paraméterek is elég szerények egy érdemleges szerkezetszámolás elvégzéséhez. A nehézségek ellenére a bemutatott módszer alkalmazható számos más bolyhos komplex jellemzésére, funkcionális működésük feltérképezésére.

Az általunk tanulmányozott szakasz az irodalomban eddig leírt leghosszabb p53TAD régió, amit kötődésvizsgálatokban alkalmaztak. Kíváncsiak voltunk, hogy a változó hosszúságú



és vagy TAD1, vagy TAD2 régiókat tartalmazó szakaszok különféle partnerekkel történő kölcsönhatás során milyen másodlagos szerkezeti elemeket mutatnak. Az irodalomban 16 ilyen komplex található és az ezekben meghatározott p53TAD szerkezeteket egymásra helyezve az 5.3.4. ábrán látható eredményeket kapjuk. Az A) ábrán szürkével jelölve

5.3.4. ábra. A) p53TAD szakaszok különféle partnerekkel alkotott komplexei. Szürkével jelölve a p53 szakasz, kékkel pedig a kialakult hélix hossza. B) p53TAD¹⁻⁶⁰ szerkezeti modelljei az S100A4 fehérjével képzett komplexben (szürke); összehasonlítva az A) ábrán felsorolt komplexekben található szerkezetekkel (szinkódolva).

a rendezetlen és kékkel a helikális szakaszok, a B) ábrán pedig a megfelelő szerkezeti modellek láthatóak. Legtöbb esetben a TAD1 viselkedését vizsgálták, és ez minden leírt komplex esetében hélix szerkezetű a T18-L25 szakaszon. Ez a régió az Mdm2 és Mdm4 fehérjék elsődleges kötőhelye, de a p300 és a CBP fehérjék is hasonló szerkezetváltozást indukálnak. Ami a TAD2 szakaszt illeti, az a P47-T55 régióban lesz helikális, TFIIH és CBP kötődés hatására. A hRPA70 két rövid hélix kialakulásának kedvez az D40-M44, P47-T55 szakaszokon. Kevés példát látunk a teljes TAD1-TAD2 lánc együttes tanulmányozására. A CBP kötődés három helikális szegmens kialakulását okozza a T18-L26, P36-D42, P47-W53 részeken. A teljes 91 aminosav hosszú TAD a HMGB1 (High Mobility Group B1) fehérjével való kölcsönhatása során az F19-L26 és az S46-E51 szakaszokban lesz helikális. Az általunk tanulmányozott 1-60 szakaszban pedig 3 hélix is detektálható, a két szélső hélix a partner

fehérje két különböző részéhez kötődik. A komplexet egy hidrofób kölcsönhatás stabilizálja, amit a \emptyset -X-X- \emptyset - \emptyset szegmens biztosít, ahol \emptyset a hidrofób aminosavat jelöli. Esetünkben ezt a szerepet az F¹⁹SDLW²³ és I⁵⁰EQWF⁵⁴ hélixek töltik be. Az W53 és F54 aromás oldallánccal rendelkező aminosavak a kötődés szempontjából igen fontosak, továbbá az L26 és M40 környezetek is kulcsfontosságú horgonypontok. A TAD1 és TAD2-ben kialakult hélixeket egy flexibilis linker köti össze, és egy csipesz „clamp” típusú komplex jön létre. A rendezetlen fehérjék esetében nem ismeretlenek ilyen típusú bolyhos komplexek, melyek a molekuláris kölcsönhatások flexibilitását és alkalmazkodóképességét tükrözik. Ugyanakkor a példáinkon keresztül is bemutatott konzervált lokális szerkezetek a p53 felismerés egy jellemvonását igazolják.

A p53TAD-S100A4 komplex atomi szintű jellemzése lehetővé teszi a fehérje-fehérje kölcsönhatás inhibitor molekulák tervezését, és S100A4 kötődés alapú bioszenzorok fejlesztését.

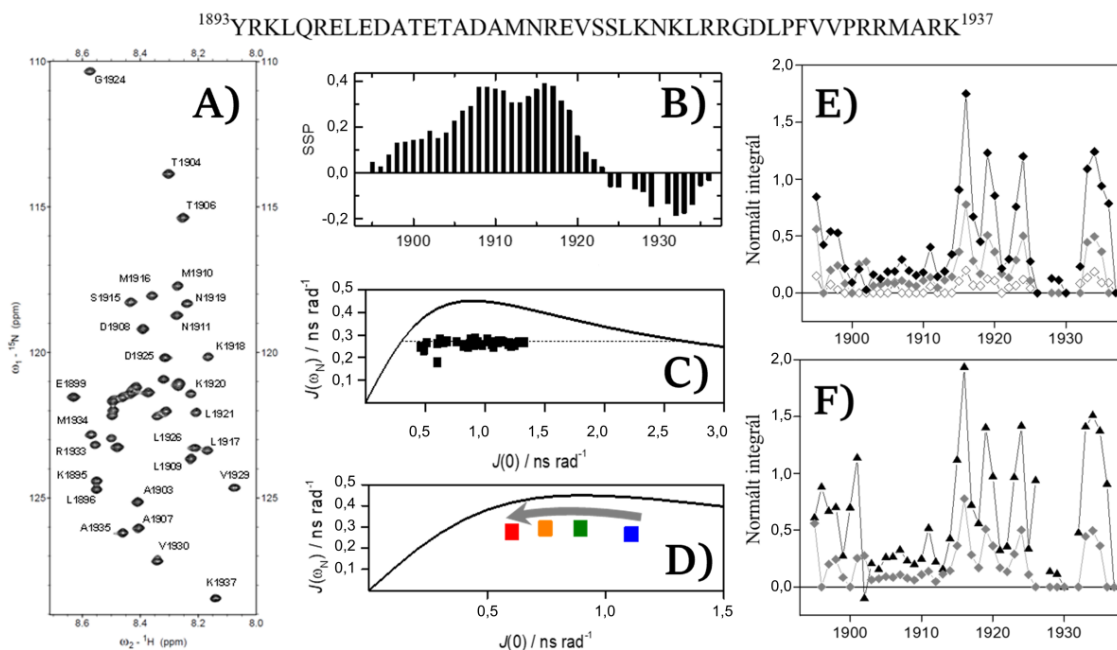
5.3.2. Az MPT coiled-coil szakasz és az MPT - S100A4 kölcsönhatás

A nem-izom miozin IIA (NMIIA) nehézlánccának szokatlanul hosszú, 45 aminosavból álló, 1893-1937 régiója (MPT) nagy affinitással (<10nM) kötődik az S100A4 homodimerhez. Egy NMIIA lánc egy S100A4 dimerrel hat kölcsön, az eredmény pedig a kristályszerkezet alapján egy „átkaroló” aszimmetrikus komplex. Irodalmi utalások szerint ennek a kölcsönhatásnak egyik következménye a coiled-coil stabilitásának csökkenése. Az irodalomban leírtak tükrében a rendszer vizsgálata során több tisztázatlan kérdésre is válaszokat kerestem. Egyfelől jellemezni kell a kölcsönhatásban résztvevő partnereket: a 45 aminosav hosszú MPT fragmens kapcsán a rendezetlenség jellegét kell körbejárni, és azt, hogy ilyen hosszúságú szakasznál kialakul-e a coiled-coil szerkezet? Továbbá az a kérdés is felmerül, hogy a kialakult komplex esetében oldatfázisban tetten érhető-e az aszimmetria, és milyen dinamikai sajátságokkal rendelkezik a rendszer. Illetve a vizsgálatok eredményei alapján vajon közelebb kerülünk a Ca²⁺ affinitás növekedésének megértéséhez?

Az MPT fragmens jellemzése. A szabad állapotú fragmens NMR spektroszkópiai jellemzése az 5.3.1. fejezetben ismertetett p53TAD¹⁻⁶⁰ fehérjéhez hasonlóan történt, az eredményeket pedig az 5.3.5. ábrán foglaltam össze. A ¹H,¹⁵N-HSQC kis jeldiszperziója és az elvégzett jelasznigáció (BMRBID: 25992) alapján számolt SSP értékek (5.3.5A és B ábra) rendezetlen szakaszcsoportra tanúskodnak, ahol a középső D1908-K1918 szakasz enyhe helikális hajlamot mutat (SSP 0,3-0,4 között). A T₁, T₂ és hetNOE relaxációs paraméterek redukált spektrális sűrűség analízise szerint a legkisebb J(0) értékkel a mobilis C- és N-terminális szakaszok környezetei rendelkeznek. Az A1903-G1924 régió, ami az SSP alapján kimutatott naszcens helikális jelleggel rendelkezik, a kisebb mobilitást mutató viselkedéssel összhangban van (5.3.5C ábra). A dinamikai elemzés hőmérsékletfüggése rámutat arra, hogy amíg 283K-en jól elkülönül a szerkezeti hajlammal bíró régió, addig 298K-en a teljes MPT fragmens nagy mobilitással rendelkezik, és egyértelműen kijelenthető, hogy teljesen rendezetlen. Ezt jól illusztrálja a kiválasztott A1903 környezet J(0) értékeinek csökkenő tendenciája a 283 K- 298

K tartományban (5.3.5D ábra). Az oldószerrel történő protoncsere hatékonyság vizsgálatához CLEANEX méréseket végeztem. 283K-en a különböző keverési idő mellett felvett spektrumok normált integrál értékei azt mutatják, hogy a két terminális vég közül elsősorban a C-terminálison, illetve az R1912-D1925 tartományban hatékony a protoncsere. Vannak viszont „néma régiók” L1900-A1909, illetve P1927-P1931 körül melyek egy kiválasztott keverési idő mellett a hőmérséklet függvényében sem mutatnak jelentős változást. A jelenség magyarázatára az Eisenberg féle hidrofobicitás mutat rá, ugyanis a P1927-P1931 szakasz egy kis hidrofób magot képez, a másik legkevésbé hidrophil környezet pedig az L1900-A1909 szakasz.

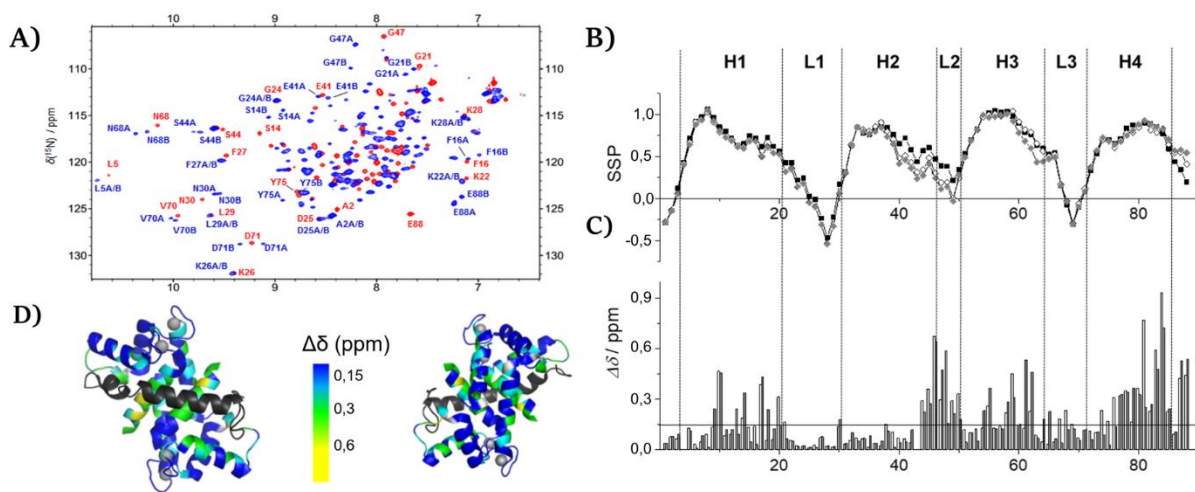
Az eredmények kiválóan tükrözik az MPT szakasz rendezetlen jellegét, és azt a tényt, hogy a külső paraméterek változtatásával hogyan alakul a másodlagos szerkezeti hajlamok hossza. A 288K-en mért translációs diffúziós együttható egy rendezetlen, monomer formára utal, alátámasztva, hogy a kísérleti körülményeink mellett nem alakul ki *cc* szerkezet.



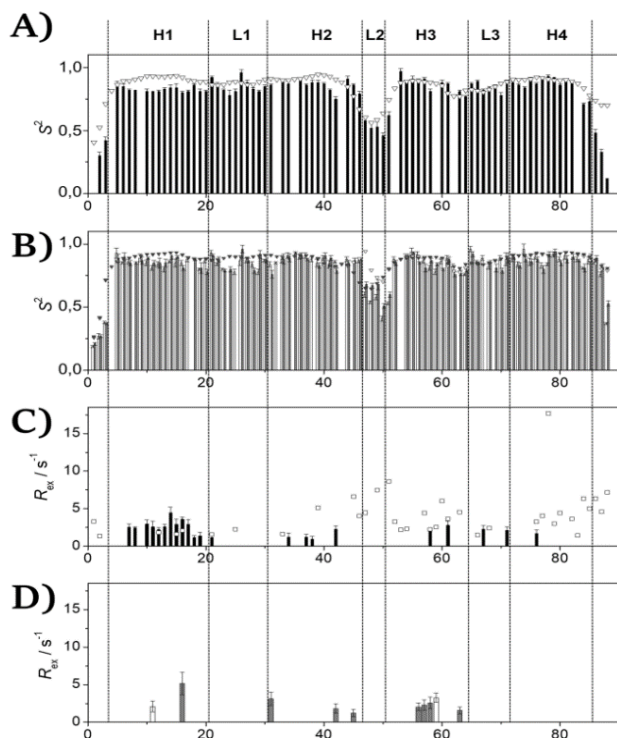
5.3.5. ábra. Az MPT aminosav szekvenciája. A) Az aszignált $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC spektrum 700MHz-en és 283K hőmérsékleten. B) A jelazonosítás alapján számolt SSP értékek változása az aminosavszekvencia mentén. C) A 283K-en mért relaxációs paraméterekből számolt redukált spektrális sűrűség analízis eredménye. D) Az A1907 aminosav hőmérsékletfüggő viselkedése a redukált spektrális sűrűség analízis tükrében: 283K (kék), 288K (zöld), 293K (narancssárga), 298K (piros). E) A CLEANEX mérésekből számolt normált integrál arányok alakulása az aminosav szekvencia mentén különböző keverési idő értékeknél: 5ms (üres), 10ms (szürke), 70ms (fekete). F) Kiválasztott 10 ms keverési idő mellett felvett CLEANEX mérések eredménye 288 K (szürke) és 298 K (fekete) hőmérsékleteken.

Az MPT-S100A4 kölcsönhatás. A kölcsönhatás MPT oldaláról való vizsgálata a p53TAD¹⁻⁶⁰ - S100A4 rendszertől eltérően 298K-en nem kivitelezhető, mivel a kialakuló komplex esetében a $^1\text{H},^{15}\text{N}$ - HSQC spektrumban a jelek a detektálási határ alá szélesedtek. Így a jellemzést csak a partner oldaláról lehetséges elvégezni. Irodalmi előzmények alapján tudjuk, hogy a kölcsönhatásban az S100A4 fehérje mobilis C-terminális vége nem vesz részt (Badyal 2011, Ramagopal 2013), így a korábbi munkánkban kimutatott aggregáció jelenségének elkerülése végett (Duelli 2014) a C-terminálison 13 aminosavval rövidített S100A4dC fehérjét

használtam a kölcsönhatás vizsgálatára. Az S100A4dC $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC spektruma szabad állapotban a globuláris fehérjére jellemző nagy jeldiszperziót mutatja, ahol a dimer két lánc ekvivalens, mivel adott aminosav kémiai eltolódás értéke mindkét láncban ugyanaz. Az MPT kötődése ezt a helyzetet megváltoztatja, legtöbb esetben adott aminosav rezonanciajele kettőzödik, ami arra utal, hogy a komplexben az A és B monomer láncok már nem ekvivalensek (5.3.6A ábra). A jelazonosításokat mindkét esetben a szokásos 3D mérések kiértékelése szolgáltatja, a kapott eredmények a BMRB adatbázisban találhatóak: 25136 (S100A4dC) és 25208 (S100A4dC MPT komplex). A szerkezeti elemek igazolásához az SSP értékeket használtam (5.3.6B ábra), és ezek alakulása teljes összhangban van a korábban megállapított szerkezeti elemek jelenlétével (2.2 ábra). A komplexre számolt SSP adatok is nagyon hasonlóak, ami arra enged következtetni, hogy az MPT kötődése nem okoz nagy szerkezeti változásokat. Így például a H2 hélix esetében az értékek kisebbek – ami gyengébb helikális jellegre utal –, míg a H4 terminális végén nagyobb értékek detektálhatóak – itt erősödik a helikális jelleg. Az aminosavak kémiai eltolódásainak változása alapján számolt $\Delta\delta$ kumulatív kémiai eltolódás a kötésben résztvevő régiók felderítését segíti (5.3.6C és D ábra). Amint az elvárható, a $> 0,35$ ppm érték mind A, mind B lánc esetében az L2, H3, H4 alkotta kanonikus kötőrégiót jelöli meg. Érdekesség, hogy a dimer összetartásáért felelős H1 hélix egyes aminosavai esetében is jelentős változásokat látni, holott ez a szakasz az interakciós felszíntől távol található. A magyarázat az lehet, hogy itt a kötődés indukálta konformációs változások tükröződését látjuk.



5.3.6. ábra. A) A szabad (piros) és MPT-kötött (kék) S100A4dC $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC spektruma 700MHz-en és 300K-en. Jobb átláthatóság kedvéért csak néhány környezet aszignációját tüntettem fel. B) A jelazonosítás alapján számolt SSP alakulása a fehérjelánc mentén: szabad (fekete) és MPT kötött S100A4dC két monomerlánc (üres és szürke) esetében. Függőleges egyenesekkel jelöltem a kialakult szerkezeti elemeket. C) A kumulatív $\Delta\delta$ kémiai eltolódás változás az aminosav szekvencia mentén és D) ennek színkódolt változása kivetítve a komplex 3ZWH.pdb szerkezeti modelljére (feketével jelölve az MPT).



5.3.7.ábra. Gerincdinamika Lipari-Szabó analízisének eredményei: A)-B) az S^2 rendparaméter illetve C)-D) az R_{ex} értékek aminosavszevencia mentén történő változása, a szabad S100A4 (A), C)), és a komplexben levő S100A4 (B), D)) esetében.

mozgásokat jellemző S^2 rendparaméterek az N-, C-terminális végeken és az L2 hurok esetében nagyobb mozgékonytságot mutatnak, a molekula többi része nagyrészt merev (0,9 körüli értékek). Ezt követően utánajártam annak is, hogy a relaxációs kísérleti adatokból származtatott rendparaméterek hogyan viszonyulnak a kémiai eltolódásokból számolt RCI (random coil index) alapján predikált értékekkel (Berjanskii 2005). Amint az 5.3.7A, B ábrákból is kitűnik a két megközelítés során kapott adatok jó összhangban vannak, eltérések elsősorban a szabad fehérje H1 hélixben figyelhetők meg. Szembetűnő, hogy a komplexképződés nem okoz különösebb változást a rendparaméterekben. A figyelemreméltó változás a lassabb, μs – ms időskálájú konformációs mozgásokat leíró R_{ex} paraméterekben történik. Szabad állapotban a H1 hélixben lassú időskálájú mozgások detektálhatók (5.3.7D ábra), ami azért meglepő, mivel ez a régió a dimer összetartásáért felelős X-típusú négyláncú H1-H4-H'-H4' hélixköteg vázát képezi. Kötött állapotban ezek a mozgások megszűnnek (5.3.7E ábra), R_{ex} érték nem határozható meg. Ennek a megfigyelésnek kísérleti úton történő alátámasztásával is megpróbálkoztam. A CPMG mérések kiértékelése során a H1 hélixen kívül a H2, L2, H3, H4 szakaszokra is kimutatható R_{ex} járulék. A magyarázat a származtatott és a mért adatok eltérése között az is lehet, hogy az időskála kicsit különbözik. Viszont kötött állapotban már jó az egyezés, ugyanis a CPMG kísérletek sem tudnak lassú mozgásokat kimutatni.

A rendelkezésre álló szerkezeti és dinamikai NMR adatok további következtetések levonását is lehetővé teszik:

Következő lépésben a komplexképződés gerincdinamikára gyakorolt hatását vizsgáltam. Globuláris fehérjéről lévén szó a szabad és MPT kötött S100A4dC fehérjére relaxációs paramétereiből kiindulva elvégeztem a kiterjesztett Lipari-Szabó modellfüggetlen analízist. A rendszer alakjának megadásához a rotációs diffúziós tenzor közelítő értékét a HYDROPRO (Ortega 2011) program segítségével határoztam meg. A szabad fehérjére felhasznált 2Q91.pdb (Malashkevich 2008) és a kötött fehérjére meghatározott 3ZWH.pdb (Kiss 2012) szerkezetek az axiálisan anizotróp megközelítés használatát indokolják, és ezen feltételek mellett elvégzett Lipari-Szabó analízis eredményeit az 5.3.7 ábra tükrözi. A ps-ns időskálájú

(i) Rávilágíthatunk bizonyos termodinamikai aspektusokra, így például az entrópiaváltozás kapcsán meg lehet határozni a fehérjegerinc entropikus hozzájárulását. Egy komplexképződés során a teljes ΔS entrópiaváltozás:

$$\Delta S = \Delta S_{\text{konf}} + \Delta S_{\text{hidr}} + \Delta S_{\text{rot-trans}} \quad (5.3.1.)$$

ahol ΔS_{hidr} a hidratációs, míg $\Delta S_{\text{rot-trans}}$ a rotációs translációs entrópiaváltozást takarja. Az NMR mérésekből a ΔS_{konf} konformációs entrópiaváltozásról lehet következtetéseket levonni, ez a fehérjegerincben (bb) és az oldalláncokban (sc) detektálható változásokra vonatkozik:

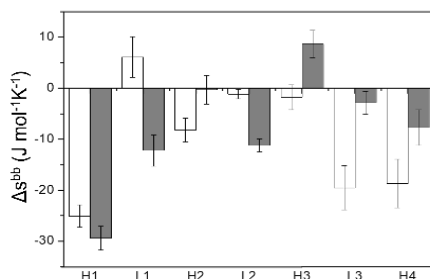
$$\Delta S_{\text{konf}} = \sum \Delta S_i^{\text{bb}} + \sum \Delta S_i^{\text{sc}} \quad (5.3.2.)$$

ahol i adott aminosavra vonatkozik. A fehérjegerincre érvényes ΔS_i^{bb} értéke a rendparaméterekből számolható (Yang 1996):

$$\Delta S_i^{\text{bb}} = R \ln \left[\frac{3 - (1 + 8S_{i, \text{komplex}})^{1/2}}{3 - (1 + 8S_{i, \text{szabad}})^{1/2}} \right] \quad (5.3.3.)$$

ahol R az egyetemes gázállandó, S az adott i N-H kötésvektorra jellemző rendparaméter négyzetgyöke. Esetünkben $\Delta S_i^{\text{bb}} = -168,3 \text{ Jmol}^{-1}\text{K}^{-1}$, és a negatív előjel arra utal, hogy

komplekképződés hatására a fehérjegerinc rendezettebbé válik. Az adott szerkezeti elemekre külön – külön is meghatározott változások (lásd 5.3.8. ábra), azt mutatják, hogy a legnagyobb konformációs entrópiacsökkenés a H1 hélixekben történik, ezen szakaszok mozgásaiban érezhető leginkább az MPT kötődés hatása.



5.3.8. ábra. A gerinckonformációs entrópiaváltozások a különböző szerkezeti elemekre az A- (üres) és B-lánc (szürke) esetében.

A komplexképződés szabadentalpia változásához való hozzájárulás is megadható, ennek értéke 300K-en: $-T \Delta S_i^{\text{bb}} = +50,49 \text{ Jmol}^{-1}\text{K}^{-1}$. Az ITC mérésekből meghatározott $+17,2 \text{ Jmol}^{-1}\text{K}^{-1}$ összérték ismeretében a különbséget egyéb járulékok eredményezik, mint például az oldalláncok konformációs entrópiaváltozása, valamint a hidratáció és a rotációs-transzlációs mozgások entrópiaváltozása (Grünberg 2006).

(ii) Az S100 fehérjecsaldban irodalomban meghatározott gerinckinamikai viselkedések összehasonlító elemzését lehet elvégezni. Ennek eldöntésére összevettem a rendelkezésre álló Lipari-Szabó analízisből származó rendparamétereket. Érdekes módon, ilyen vizsgálatok saját rendszereinken kívül csak néhány esetben történtek, így a szarvasmarha apo- és β -merkaptotanol-S100A1; humán apo-, Ca^{2+} -, illetve Ca^{2+} , homocisztein-S100A1 (Nowakowski 2011, Nowakowski 2013, Zhukov 2008); apo-S100A4 (Dutta 2008); apo-, Ca^{2+} -kötött, és Ca^{2+} , TRTL-S100B (Inman 2001) esetében. Nem meglepő módon az EF1- és EF2-kezeket tartalmazó L1, illetve L3 hurokrégiók mozgékonyasága Ca^{2+} kötődés hatására lecsökken (S^2 0.2-0.3 értékkel nő, komplexben 0.9 körüli értéket mutatva). Ennek oka, hogy a fémion koordinációja merevítő hatással van a szerkezetre. Az apo-S100B fehérje kivételt képez, itt a hurok régiók már fémion hiányában is nagy S^2 értéket mutatnak. A jelenség azzal magyarázható, hogy az S100A1 és S100A4 fehérjéktől eltérően az S100B-ben antiparallel elrendeződésű rövid redők is találhatóak az L1, L3 hurokrégiókban, ezek jelenléte a

mozgékonyt korlátozza (Liriano 2012). Az L2 hurokrégió minden esetben nagyon mozgékony, kimagasló mobilitást az apo-S100A4 esetében mutat ($S^2 = 0,57$). A hélixek tekintetében S100A1 szerkezete a legmerevebb, S100B pedig legkevésbé merev.

A lassú időskálájú mozgásokat elemezve, CPMG mérésekből kiszámolt R_{ex} hozzájárulás az apo- és Ca kötött S100B esetében is detektálható a H1 hélixben, és ez a mozgás már egy kis, 12 aminosavból álló TRTK peptid kötődésének hatására is megszűnik (Inman 2001, Liriano 2012).

Ez arra enged következtetni, hogy kötőpartner hiányában a molekula egy „lélegző” mozgást végez, amit a kölcsönhatás elfojt, a szerkezet stabilabbá válik. Ez a tulajdonság az S100 család több tagjánál is megtalálható.

(iii) Az S100A4-MPT komplex kialakulása során az MPT szakasz rendezetlen - rendezett átalakuláson megy keresztül. A rendezetlen szakasz feltekeredése kétféleképpen történhet: a konformációs szelekciós, illetve az indukált feltekeredés modell szerint (Boehr 2009, Csermely 2010, Marsh 2010). Az NMR vizsgálatok kimutatták, hogy a szabad MPT rendelkezik egy naszcens helikális szakasszal. Ez azt jelenti, hogy ugyan az MPT konformációs sokasága átlagban egy rendezetlen, szerkezet-nélküli molekula, de bizonyos részarányában folytonosan le- és feltekeredő hélixek is jelen vannak. Az S100A4-gyel történő kölcsönhatás a hélixek populáció arányát növeli. Ez arra utal, hogy MPT esetében a feltekeredés a konformációs szelekció modell szerint történik.

A preformált hélix jelenléte a miozin fragmensben arra is enged következtetni, hogy a teljes hosszúságú NMIIA esetében kötődés során a coiled-coil szerkezet nem tekeredik le teljes mértékben. A folyamat szabadentalpia változásában az entrópiaváltozásból származó tag lecsökken, ami hozzájárulhat a szokatlanul erős 0,1nM affinitású komplex képződéséhez.

Az A1907 aminosav (melynek korábban hőmérsékletfüggő dinamikáját tárgyaltam), a naszcens helikális szakaszban helyezkedik el és biológiailag releváns környezet, szerepet játszik a nemizom miozinok izoforma – specifikus kötődésében. Az NMIIA és NMIIC izoformák kötődnek az S100A4 fehérjéhez, az NMIIB esetében a kölcsönhatás nem jön létre, ugyanis ebben az esetben alanin helyett aszparagin aminosav található az 1907-es pozícióban.

(iv) Végezetül arra is próbáltam rávilágítani, mi okozza a megnövekedett Ca^{2+} affinitást. Ismert, hogy a biológiai kölcsönható partner hiányában sok EF-kézzel rendelkező fehérje kötő affinitása kicsi. Az S100 családban a μM -os nagyságrendű affinitás az interakciós partner jelenlétében akár 300-szorosára is megnövekedhet, lásd RyR és S100A1, vagy TRTK-12 és S100B kölcsönhatások (Liriano 2012, Wright 2008). Ezek közül is kiemelkedő az S100A4 viselkedése, hiszen az MPT kötődés négy nagyságrendű növekedést okoz a Ca^{2+} affinitásban (Elliott 2012). A magyarázat szerkezeti és/vagy dinamikai változásokban keresendő, és több lehetséges modellel kell számolni:

- a legkézenfekvőbb magyarázat az volna, hogy az EF-kezekben a partner hiányában a Ca^{2+} koordináció gyengébb, és a kötődés során kisléptékű szerkezeti változások következnek be. Ennek ellentmond az a tény, hogy az EF-kezek aminosav környezetei semmilyen kémiai eltolódás változást nem mutatnak MPT kötődés során. Ezt megerősítendő megvizsgáltam a

partner jelenlétében és hiányában meghatározott kristályszerkezeteket is, és ott sem tapasztaltam a Ca^{2+} koordinációs szférájában változást. Tehát nincs szerkezeti oka az affinitás növekedésnek.

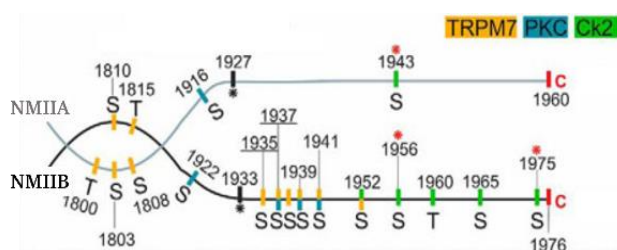
- a második modell egy elő-egyensúly meglétét feltételezi zárt és nyitott S100A4 formák között, ami a Ca^{2+} kötődés előtti és utáni állapotokat jelenti (lásd 2.2 ábra). Amennyiben ez valóban fennáll, úgy az EF-kezek Ca^{2+} kötő aminosavai esetében dinamikai változásokat, R_{ex} járulékot kéne detektálni. Mivel ez sem történik meg, az elő-egyensúlyi modellt sem lehet alátámasztani.

- a harmadik lehetőség a target kötő és funkcionális feltekeredés modell (target binding and functional folding). Ebben az esetben a partner hiányában egy konformációs kiátlagolódást eredményező elő-egyensúlyt feltételezünk a különböző affinitású Ca^{2+} -kötő állapotok között. Ez egy konformációs szelekció típusú mechanizmus a zárt (apo-) és nyílt (Ca^{2+} kötött) állapotok között, ahol a kötőpartner az egyensúlyt nagymértékben a nyílt forma fele tolja el, dinamikai változásokat eredményezve. Ugyan a kutatás célját az EF-kezek körültekintő dinamikai folyamatainak elemzése nem képezte, de a gerincdinamikai eredmények: az MPT kötődés hatására történő fehérjegerinc merevedése, amire a csökkent konformációs entrópia is utal, illetve a H1 hélix lassú mozgásának kölcsönhatás következtében történő megszűnése is arra engednek következtetni, hogy ez a modell az, ami leginkább közelít a valósághoz.

A bemutatott eredményekből levonható az a figyelemreméltó következtetés is, hogy az oldatfázisú NMR vizsgálatok mennyire fontosak a kölcsönhatás vizsgálatokban. Más módszerrel a dinamikai folyamatok atomi szintű elemzése nem lehetséges, és az információ különösen értékes, hiszen ilyen ismeretek birtokában lehet olyan inhibitorokat tervezni, fejleszteni, melyek a fehérje – partner kölcsönhatás dinamikájának a változását is utánozni képesek, és nem csupán a szerkezeti aspektusokra figyelnek.

5.3.3. A foszforiláció hatása az NMII coiled-coil szakaszokra

A kutatások ezen szakaszában az NMIIA és NMIIIB filamentumok szétesésének az S100 fehérjék, illetve a foszforiláció által történő szabályozását vizsgáltam, és a már említett ellentmondásos irodalmi állításoknak jártam utána. Az NMR spektroszkópián kívül a rendszer vizsgálatát ECD, MS mérésekkel egészítettük ki. Az NMIIA kölcsönhatását az S100A4 fehérjével a rövid MPT: NMIIA¹⁸⁹³⁻¹⁹³⁷ fragmenszen keresztül az előző fejezetben ismertettem. A jelen vizsgálatokhoz kiválasztott miozin fragmenseket vázlatosan az 5.3.9. ábrán



5.3.9. ábra. Az NMIIA és NMIIIB coiled-coil régiók C-terminális szakaszai, és lehetséges foszforilációs helyek.

szemléltetem:

M67: NMIIA¹⁸⁹⁴⁻¹⁹⁶⁰, az MPT rendezetlen C-terminális irányban hosszabbított szakasza;

M111A: NMIIA¹⁸⁵⁰⁻¹⁹⁶⁰ egy cc régiót és a rendezetlen C-terminálist tartalmazó szakasz;

M121B: NMIIB¹⁸⁵⁶⁻¹⁹⁷⁶ egy *cc* régiót és a rendezetlen C-terminálist tartalmazó szakasz, ami rossz vízoldhatóságú, NMR spektroszkópiai módszerekkel nehezen tanulmányozható;

M121AB: NMIIA¹⁸⁵⁰⁻¹⁹²³_NMIIB¹⁹³¹⁻¹⁹⁶⁰ kiméra vízoldható szakasz, ami lehetővé teszi az NMIIB farokrégiójának jellemzését. A *cc* szakasz az NMIIA, a rendezetlen szakasz pedig az NMIIB része.

A vizsgált szakaszok foszforilált változatainak NMR spektroszkópiai jellemzése a szabályozás és biológiai funkció betöltése kapcsán több kérdésre is választ adhat. Esetemben a már tárgyalt CK2 enzimmel történt a foszforiláció és MS mérésekkel igazoltuk, hogy az NMIIA esetében a foszforiláció az 5.3.9 ábrán is jelölt Ser1943 helyet érinti. Az NMIIB esetében több lehetséges Ser/Thr foszforilációs környezet is létezik, de a mérések nem adtak egyértelmű választ a kérdésre, így atomi szinten kell ennek eldöntésére is próbálkozni.

Az első felmerülő kérdés, vajon a kiválasztott fragmensek esetében kialakul-e a coiled-coil szerkezet? A választ erre a korábban felállított empirikus *D-M* összefüggésekből (5.3. egyenlet), és hőmérsékletfüggő translációs diffúziós mérésekből próbáltam megadni. Az eredményeket az 5.3.2. táblázatban foglaltam össze, ahol a diffúziós együtthatóból számolt látszólagos hidrodinamikai sugár értékek a gömbszimmetrikus alakra vonatkoznak (ez nagy valószínűséggel nem helytálló, de csak tájékoztató jellegű értékre vagyunk kíváncsiak, nem abszolút méretmeghatározás a cél). Az empirikus egyenletből származik az $M_{szám}$ értéke, melynek az elméletileg várt molekulatömeghez viszonyított aránya mutatja meg, milyen aggregátum képződött.

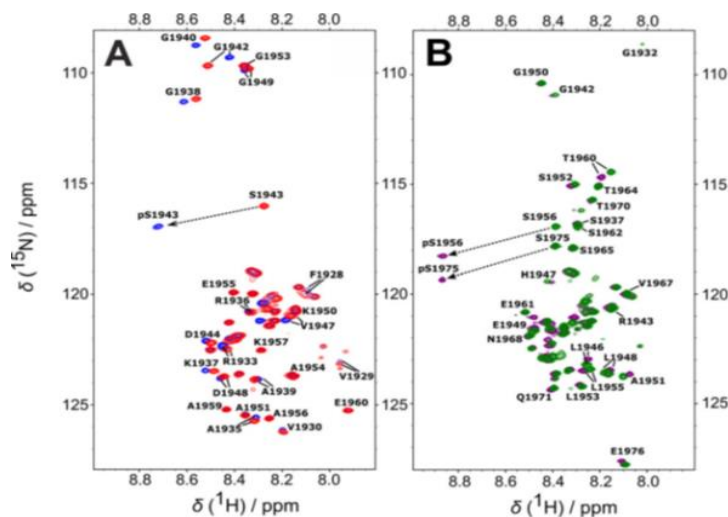
5.3.2. táblázat. A miozinfrafragmensek 288K hőmérsékleten meghatározott hidrodinamikai paraméterei: a mért translációs diffúziós együttható, a számolt látszólagos hidrodinamikai sugár, a származtatott és az elméleti molekulatömeg, és ezek aránya.

| Fragmens | $10^{-11} D / \text{m}^2\text{s}^{-1}$ | $r_H^{\text{app}} / \text{Å}$ | $M_{szám} / \text{Da}$ | M_{elm} / Da | $M_{szám} / M_{elm}$ |
|----------|--|-------------------------------|------------------------|-----------------------|----------------------|
| M67A | $7,89 \pm 0,04$ | 22,1 | 6784 | 7503 | 0,90 |
| M67A-P | $7,48 \pm 0,11$ | 23,4 | 7602 | 7583 | 1,00 |
| M111A | $4,26 \pm 0,03$ | 41,0 | 25121 | 12938 | 1,94 |
| M111A-P | $4,18 \pm 0,05$ | 41,8 | 26087 | 13018 | 2,00 |
| M121AB | $3,47 \pm 0,03$ | 50,3 | 38756 | 14072 | 2,75 |
| M121AB-P | $4,76 \pm 0,12$ | 36,7 | 19774 | 14232 | 1,39 |

A kapott értékek szerint az M67A monomer, az M111A esetében az aggregáció mértéke 2,00, így ő egy dimer, és ez a megállapítás a *cc* szerkezet kialakulását támasztja alá. Irodalmi adatok az NMIIB kapcsán tetramerekről és dimer asszociátumokról írnak. A kiméra M121AB aggregációja is egy asszociátum létrejöttére utal. Az 5.3.2. táblázat adataiból levonható másik következtetés, hogy a foszforilált fragmensek hidrodinamikai paraméterei M67A és M111A esetében megegyeznek a natív szekvenciákra mért értékekkel, ezzel is jelezve már globális szinten, hogy a foszforiláció nem okoz detektálható szerkezeti változásokat. Az M121AB tekintetében a foszforiláció az asszociátumok szétesésére utal.

Az M111A esetében a *cc* szerkezet kialakulását CD mérésekkel is igazoltuk. 278 K-en jellegzetes helikális, míg 348 K-en rendezetlen fehérjére jellemző a spektrum. A 222nm-en mért értékek hőmérsékletfüggése szigmoid görbét eredményez, ami jellegzetesen kétállapotú rendszerre jellemző, a meghatározott olvadási hőmérséklet 300 K. Mivel oldatban egyszálú hélix nem létezik, ez egy *cc* szerkezettel van összhangban. A foszforilált fragmensek spektrumai nem különböznek a natív szakaszok spektrumaitól, ezzel a módszerrel is igazolva, hogy a másodlagos szerkezeti elemekben nem történik változás.

A globális paraméterek leírását követően érdemes azt is megvizsgálni, mi történik atomi szinten. Első lépés a ^{15}N jelölt fehérjéken a jelazonosítása volt, amit a TOCSY-HSQC és NOESY-HSQC mérések kiértékelése szolgáltatott. Az M67A spektrumában minden jel azonosítható. Nem ez a helyzet az M111A és az M121AB esetekben, ahol csak a terminális szakaszokon található jelek azonosítása lehetséges, a középső K1862-R1923 régió jelei nem is detektálhatóak (5.3.10. ábra). Ennek oka, hogy ebben a szakaszban *cc* szerkezet alakul ki, és amint arra az irodalomban is rámutattak, ezek a régiók kiszélesedett, nem detektálható jeleket eredményeznek (Badyal 2011).



5.3.10. ábra. $^1\text{H}, ^{15}\text{N}$ -HSQC spektrumok alakulása 298K-en: A) M111A (piros) és M111A-P (kék); illetve B) M121AB (zöld) és M121AB-P (lila) fragmensek esetében

Az azonosítható jelekre számolt SCS $\text{H}\alpha$ értékek az aszignált részek rendezetlen jellegére utalnak. A CK2 jelenlétében lejátszódó foszforilációt tekintve az NMR spektrumokból több információ is kinyerhető:

(a) M111A esetében a foszforiláció az egyetlen lehetséges Ser1943 helyen következik be, amit a keresztcsúcs egyértelmű jeletolódása is igazol (5.3.10A ábra). Az M121AB esetében az *in-situ* 16 órán NMR csőben

monitorziált foszforiláció két környezet: a Ser1956 és a Ser1975 változását mutatja. Az időfüggő spektrumok kiértékelése rámutat arra, hogy amíg a Ser1956 környezet foszforilációja azonnal megtörténik, addig a Ser1975 teljes foszforilációja 5 óra alatt megy végbe. Mivel kísérleti *in vitro* körülményeink mellett egy már 3%-ban jelen levő komponens gond nélkül detektálható, az NMR mérések egyértelműsítik a kérdéses foszforilációs helyeket: az M111A esetben egy pozíciót, az M121AB fragmensnél a több lehetséges hely közül (5.3.9. ábra) csak két környezetet érint, és egyik esetében ez időfüggő folyamat.

(b) A foszforilált fragmensek jelazonosítása azt mutatja, hogy ebben az esetben is csak a közvetlen környezet jelei tolódnak el, és még lokálisan sem tapasztalható szignifikáns szerkezeti változás.

Az NMR kísérletekből származó megállapítások egyértelműsítik, hogy *in vitro* körülmények mellett melyek a foszforilációs helyek; ugyanakkor megkérdőjelezzik azt az irodalmi állítást, amely szerint a C-terminális szakasz egyetlen helyén bekövetkező foszforiláció jelentős szerkezeti változást okozna. Állítólag ez a rendezetlen szakasz ACD doménre való visszahajlását idézné elő, így akadályozva meg a filamentumok összeállását (Dulyaninova 2013, Dulyaninova 2005). Hogy a foszforiláció milyen hatással van a filamentumok összeállására és szétesésére az már NMR spektroszkópiával nem vizsgálható, hosszabb szakaszokon lehet csak igazolni. Biológiai együttműködő partnereink ennek utána is jártak és elektronmikroszkópos módszerek segítségével azt találták, hogy a hosszú NMIIA esetében a foszforiláció nem okoz változást, viszont az NMIIB esetében a foszforiláció valóban elősegíti a filamentum szétesést. Emlékeztetőül az általam vizsgált rövid szakaszokon a translációs diffúziós mérések ugyanezt sugallták.

Összefoglalásként megállapíthatom, hogy az NMII filamentumok szétesésének és összeállásának szabályozása NMIIA esetében az S100 fehérjékkel – ezek közül is elsősorban az S100A4-el – történő kölcsönhatás, míg NMIIB izoformánál a foszforiláció következtében történik meg. Így egyfelől alátámasztottuk azt a feltételezést, hogy a filamentum szétesés izoforma specifikus reguláció szerint történik (Murakami 2000), másfelől megcáfoltuk a nagy szerkezeti változást javasoló elméleteket (Dulyaninova 2013).

5.3.4. A miozin Va és a dinein könnyű lánc kölcsönhatása

A miozin Va coiled-coil szerkezeti jellemvonásait és működését befolyásolja a dinein könnyű láncal történő kölcsönhatása. Ezt a jelenséget jártuk alaposan körbe számos, egymást kiegészítő biofizikai módszer segítségével. Irodalomból ismert, hogy a dinein kötőhely a miozin lánc *cc* szakaszai között, a rendezetlen Pro1235-Arg1320 szakaszban található. Változó hosszúságú régiókon végzett szisztematikus kötődésvizsgálatok eredményeképp Nyitray László csoportja kimutatta, hogy egy 15 aminosav hosszúságú szegmensre lehet szűkíteni a minimális kötőmotívumot, ami az Ile1280 – Ile1294 régiót foglalja magába:

IQPKDDKNTM⁰TDSTI

Egy másik fontos következtetés pedig, hogy a kötődés csak a B exon - a szekvenciában aláhúzott DDK környezet - jelenlétében történik meg.

Az első NMR spektroszkópiai kérdés, vajon ez a miozin szakasz más kötőpartnerekhez hasonlóan kötődik-e a DLC2-höz? A kérdés megválaszolásához kémiai eltolódás feltérképezést alkalmaztam, viszont ehhez a DLC2 jelazonosítására szükség van. Mivel ezek az adatok korábbi irodalmi vizsgálatokból részben elérhetőek voltak (Day 2004), a klasszikus 3D mérések kiértékelése főleg ellenőrzésképpen történt, a saját mérési körülményeim között is érvényesítve az azonosítást. A nem izotóp-jelölt M7 miozin fragmens ¹⁵N-DLC2-hez történő fokozatos hozzáadása (peptiddel történő „titrálás”) a jelek kétszerezőségét vonta maga után. Ez azt jelenti, hogy lassú csere tartományban vagyunk, külön jeleket ad a szabad és a kötött fehérje is, a peptid koncentráció növelésével pedig adott aminosav szabad állapotban levő jelintenzitása csökken,

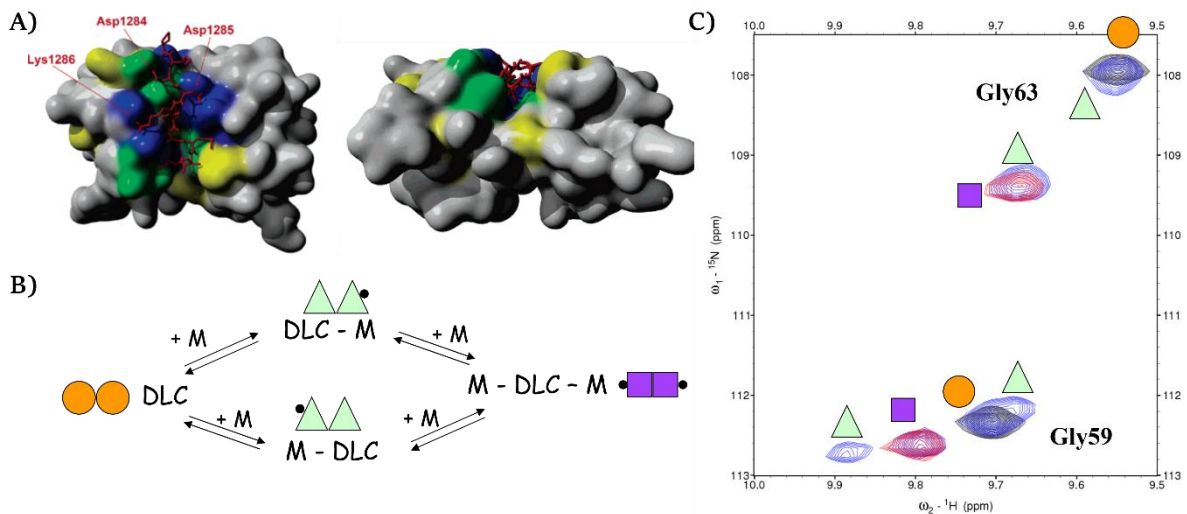
míg a kötött állapotban való jelintenzitás növekszik. Néhány jól elkülönülő környezet (Asp37, Gly59, Gly63, Gly79) esetében az integrált intenzitásokból disszociációs állandó számolható, melynek értéke $K_d \sim 30 \mu\text{M}$. A telítéskor a DLC2 : miozin 1:1 arányt állapítottam meg, a két monomer lánc pedig mindvégig ekvivalens maradt – erre abból lehet következtetni, hogy adott aminosav jele mindkét monomerben ugyanannál a kémiai eltolódásnál volt detektálható, tehát egy szimmetrikus komplex jött létre. A legnagyobb kémiai eltolódást elszenvedő környezetek: Lys36, Asp37, Gly59, Asn61, Phe62, Gly63, Ser64, Lys71, Gly79; ezek mind a kötőárok mentén helyezkednek el. A kölcsönhatás jellemzésére dokkolásos módszerrel is próbálkoztunk. Ehhez a DLC1-Bim komplex szerkezetét használtuk fel (1F95.pdf), és a miozin peptid Ac-PPKDKNTMTD-NMe szakaszának dokkolása történt. Az energia minimalizáció eredménye az 5.3.10A. ábrán látható modell, ami a ^1H , ^{15}N -HSQC mérésekből meghatározott eltolódási adatokkal összhangban van. Levonható tehát az a következtetés, hogy a miozin peptid más partnerekhez hasonlóan szintén a kötőárokban foglal helyet, és a két árokba két peptid kötődik be.

A partnerkötődés kapcsán miozin esetében gyakran felmerül az a kérdés, vajon rendelkezik-e „kargó/kötő” funkcióval? Ez az jelenti, hogy a két kötőárkot más-más partner foglalja el, ezáltal a két árok ekvivalenciája megszűnik. Ennek úgy próbáltam a végére járni, hogy a peptiddel történő titrálásos kísérlet 50% körüli telítésénél a kölcsönhatásban részt vevő környezetek viselkedését vizsgáltam. Valóban - amint a 5.3.10B ábrából is kiténik – ilyen körülmények mellett egy aminosav esetében több jel is detektálható, a peptid tartalom növekedésével a jelenség megszűnik, a spektrum ismét egyszerűsödik. Legvalószínűbb magyarázatnak az tűnik, hogy a szimmetrikus szabad és a már kialakult 1:1 komplex egy-egy jele mellett a részlegesen telített dinein átmenetileg aszimmetrikus. Így a két kötőhely nem ekvivalens, azaz újabb két jelet detektálok. A jelenséget két különböző hosszúságú miozin peptiddel is megvizsgáltam, és azt állapítottam meg, hogy az aszimmetria a hosszabb szakasz esetében több aminosavra is kiterjed – jobban átfogja, így jobban is befolyásolja a kötőárkot. Ugyanakkor a jelenség csak félig telített állapotban detektálható, a végső komplexben minden szimmetrikus. A jobban kötődő nNos peptiddel végzett leszorításos kísérlet során sem tapasztalható aszimmetria. Az irodalomban másoknak sem sikerült a két különböző kötőpartnert kimutatni, így máig is csak feltételezés maradt a kargó-kötő funkció.

Amennyiben a rendezetlen dinein kötő régiót körülvevő cc láncok tulajdonságait vizsgáljuk, ezek fiziológiás hőmérsékleten közepes stabilitást mutatnak – az őket felépítő heptádok aminosav természetéből adódóan. DLC2 kötődés hatására viszont a helikális tartalom megnő (CD spektroszkópiai eredmények ezt alátámasztják) és a K_d pedig egy nagyságrendet növekszik.

A kötődésvizsgálatok eredményei alapján elképzelhető, hogy a DLC2 dimer két dinein kötő régiót keresztez, és a kölcsönhatás következtében a két coiled-coil nehéz láncot stabilizálja és egymáshoz is közelebb kerülnek. Hasonló stabilizáló jelenséget írtak le a DLC1 és swallow peptid kölcsönhatása során (Wang 2004). Eredményeink azt az irodalmi feltételezést támasztják

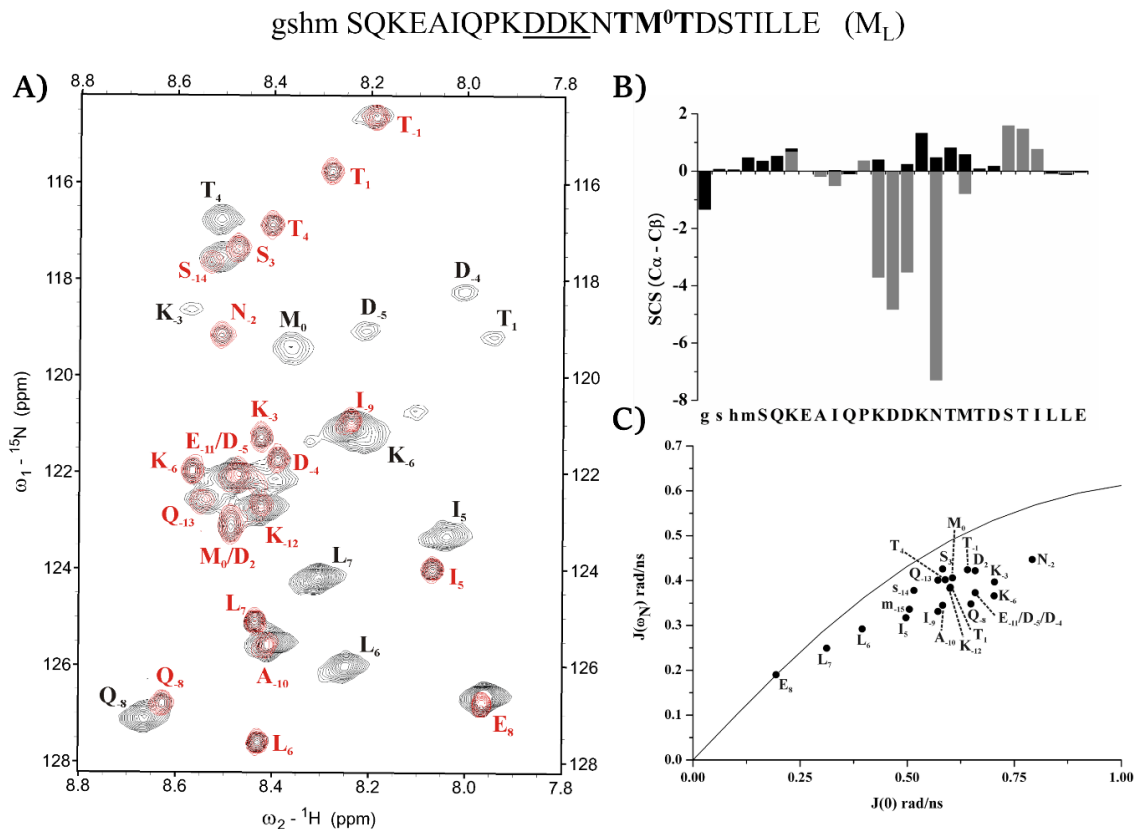
alá, mely szerint a DLC molekuláris „ragasztó” -ként működik, és fehérje komplexek rendeződését idézi elő.



5.3.10 ábra. A) miozin Ac-PKKDKNTMTD-NMe peptid (a B exon környezeti pirossal kiemelve) és DLC2 kötődése – dokkolásos modellen bemutatva felül- és oldal- nézetből. A peptid dokkolása csak egyik kötőárokba történt. Zölddel jelölve mind az NMR kémiai eltolódások, mind a dokkolás eredményeképpen kapott környezetek, kékkel a csak dokkolás, sárgával pedig a csak NMR vizsgálatokból meghatározott aminosavak. B) A peptid jelenlétében a ^1H , ^{15}N HSQC glicin régiója, ahol a két kötőhely ekvivalenciája kezdeti és végállapotban, míg 50%-os telítettségnél több jelet eredményez.

Ezen megállapítások tükrében újabb kérdések merülnek fel: milyen szerkezeti változásokat szenved a miozin kötőpeptid? A kötőmotívumban a nem-kanonikus Met jelenléte okoz-e valamilyen szerkezeti változást a többi Gln tartalmú kötőpartnerhez képest; illetve, hogy néz ki a miozin-DLC szerkezete? NMR spektroszkópiai, krisztallográfiai és molekula dinamikai szimulációk együttesével tudtunk ezekre a felvetésekre válaszolni.

Az előeredmények birtokában a dinein kötő régió egy hosszabb szakaszával végeztem a vizsgálatokat. A 23 aminosav hosszú Ser1275-Glu1297 szakaszt (továbbiakban M_L) használtam, azért, hogy feltehetően a kötőárkon kívüli viselkedésről is legyen információ. Az aminosav szekvencia az 5.3.11. ábrán látható, ahol jelölésben a Met aminosav – a kanonikus kötőmotívumra történő utalás alapján – 0 helyzetű. Első lépésben ^{13}C , ^{15}N - M_L mintán, klasszikus 3D mérések kiértékelésével elvégeztem a teljes jelazonosítást. A ^{15}N -jelölt fragmens szabad állapotban, elvárható módon, rendezetlen (5.3.11A ábra, fekete spektrum). A másodlagos kémiai eltolódás értékek ezt alátámasztják, esetleg a D₄ – T₄ szakasz nagyon enyhe helikális hajlamot mutat (5.3.11B fekete oszlopok). A gerincdinamika már ismertetett redukált spektrális sűrűség analízise (5.3.11C ábra) ezzel szintén összhangban van (5.3.11D ábra). A DLC2 kötődése jelzéledést von maga után, a jelek nagymértékben eltolódnak (5.3.11A piros spektrum). Itt is egy lassú csere figyelhető meg, hiszen a kötött és szabad állapot külön jeleket ad. A képződött 2:2 M_L :DLC2 arányú szimmetrikus komplex disszociációs állandója $K_d \sim 9\mu\text{M}$ (Radnai 2010). A spektrum alapján számolt legnagyobb kumulatív kémiai eltolódás a K₆ – K₃, és az M₀T₁ szakaszokon detektálható, azaz ők az elsődleges kötőhelyek. A komplexre elvégzett jelazonosításból számolt másodlagos kémiai eltolódás a K₆-M₀ szakaszban egyértelmű β -redő kialakulását mutatja (5.3.11B sötét oszlopok).

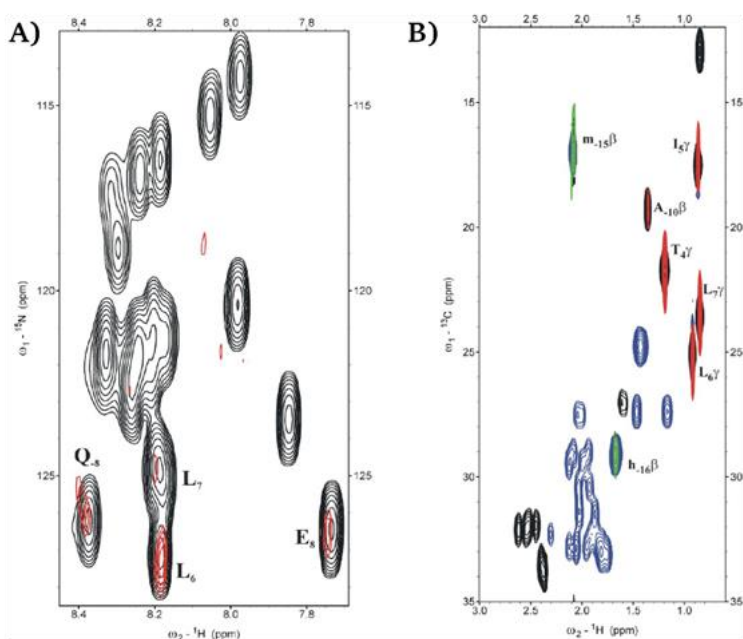


5.3.11. ábra. Az M_L aminosav szekvencia, számozással, kisbetűs a klónozási műtermék; a kanonikus aminosav 0 helyzetű. A) Szabad (fekete) és DLC2 kötött M_L (piros) ¹H,¹⁵N-HSQC spektruma, 700MHz-en, 288K-en, jelazonosítással. B) A C α másodlagos kémiai eltolódás alakulása az aminosav szekvencia mentén szabad (fekete) és DLC2 kötött (szürke) M_L esetében. C) Szabad M_L gerincdinamikai paramétereinek redukált spektrális sűrűség analízis szerinti kiértékelése.

Sikerült tehát oldatfázisban kimutatnom a komplexképződés hatására bekövetkező rendezetlen – rendezett átalakulást, azaz a miozin peptid naszcens helikális hajlamú szakasza kötődéskor β -redő szerkezetet vesz fel.

Továbbiakban arra voltam kíváncsi, vajon ezt a szerkezeti változást kísérik-e egyéb kölcsönhatások? Ezt telítésátviteli kísérletek (STD – saturation transfer difference) futtatásával próbáltam kimutatni. A kísérlet lényege, hogy egyik partner (tipikusan a kis mennyiségben jelen levő nagy DLC2 fehérje) egyértelműen különálló jeleit szelektíven besugározzuk. A szelektív jelölés szétterjed, és a kémiai csere során a partnerre (peptid) is áttevődik, melynek a kötődésben részt vevő jelein intenzitáscsökkenés tapasztalható. Egyértelműbb eldönteni, melyek ezek a környezetek, amennyiben a besugárzott és a besugárzás mentes spektrumok különbségét elemezzük, hiszen ebben csak a kölcsönhatásban részt vevő környezetek jelei detektálhatóak. Fehérje – fehérje (peptid) kölcsönhatások tanulmányozásánál ez a módszer nehézkes, hiszen a két partner jelei nagymértékben átfednek. Jómagam próbálkoztam a szerkezettel bíró DLC2 fehérje -2 ppm környékén, illetve a triptofán indol környezet 10ppm környékén történő jeleinek szelektív besugárzásával, de a 23 aminosav hosszú M_L nagymértékben átlapoló jeleinek azonosítása mind az ¹H 1D mérésben, mind pedig ¹H,¹H-TOCSY detektált mérésben sikertelennek bizonyult, és a csoport-szelektív mérések sem

vezettek jobb eredményre (Kövér 2010). A megoldást ^{13}C , ^{15}N izotópjelölt M_L kis mennyiségű jelületlen DLC2 rendszeren futtatott klasszikus ^1H STD kísérlet adja, amit a jelazonosítás szempontjából egyértelmű ^1H , ^{15}N -HSQC és ^1H , ^{13}C -CT-HSQC mérésekkel detektálunk.



5.3.12. ábra. A telítésátvitel (STD) mérések eredményei, ^{13}C , ^{15}N jelölt M_L jelein monitorizálva. A) ^1H , ^{15}N -HSQC (fekete referencia, piros besugárzás utáni spektrum), illetve B) ^1H , ^{13}C -HSQC mérésekkel.

ezen az úton az E_{-11} - L_9 és T_4 - E_8 szakaszok hidrofób kontaktusai detektálhatók.

Az eredmények tárgyalása a sikeresen megoldott kristályszerkezet tükrében válik teljessé (ugyan a kristályosítás a rövidebb miozin szakasszal történt). A DLC2-vel történő közvetlen kapcsolatot a B exon és az N_{-2} , T_{-1} , M_0 , T_1 , D_2 környezetei létesítik, jó egyezésben az oldatfázisú NMR mérések eredményeivel. A nem-kanonikus Met_0 a más szerkezetekben Gln_0 által elfoglalt konformációt veszi fel. Nem meglepő módon, hiszen ebben a részben a DLC2 Lys_{36} , Glu_{35} és Ile_{34} aminosavainak fő- és oldallánca által közrevert zsebbe a Gln aminosavon kívül a valamivel kisebb méretű Met is befér, más aminosavak, akár méretüknél, akár kedvezőtlen töltésüknél fogva nem fognak idekötődni. Oldalláncok tekintetében sem tapasztalható lényeges különbség; az 5.3.12B ábrán látható, hogy az oldalláncok is a Gln_0 elrendeződésének megfelelően helyezkednek el. A metionin esetében gyengébb a kötődés, ezt a mért K_D értékek tükrözik: a TQT motívumra $1\ \mu\text{M}$, a TMT-re pedig $9\ \mu\text{M}$ affinitás jellemző. A kristályszerkezetben a peptidgerinc β -redő szerkezetet vesz fel, az N-terminális $\text{Q}_{-8}\text{P}_{-7}\text{K}_{-6}$ szakasza a kötőmotívum irányába történő visszahajlást mutat, B exonnal kedvező kölcsönhatások kialakítása során – amire a STD eredmények is rámutatnak. A C-terminális D_2 - E_8 rész pedig a dinein kötőárkával való interakción túlmenően enyhén dimerizál, ebben a folyamatban az $\text{I}_5\text{L}_6\text{L}_7$ szakasz játszik szerepet. Az STD-vel is észlelhető jelenséget molekula dinamikai szimulációk is kimutatják.

Következésképpen sikerült igazolni, hogy a metionin jelenléte nem befolyásolja a kötődést, a többi partnerhez hasonlóan ugyanazt a dinein kötőárkot foglalja el a miozin, és a

Az 5.3.12A ábrán látható, hogy a gerinc NH környezetek közül a Q_8 , L_6 , E_8 környezetek, illetve gyengébben az L_7 ad jelet. A ^1H , ^{13}C -CT-HSQC típusú detektálás bővebb információtartalmú, hiszen itt több oldallánc is „megszóal”, így a I_9 , I_5 , L_6 , L_7 , T_{-1} , T_1 , T_4 γ és/vagy δ környezetei, vagy pedig a terminális szakaszok jelei, melyeknek a kölcsönhatás kialakításában fontos szerep jut. Az STD kísérletek jelentősége, hogy amíg a kémiai eltolódás feltérképezés az elsődleges kötőhelyekre világított rá, addig

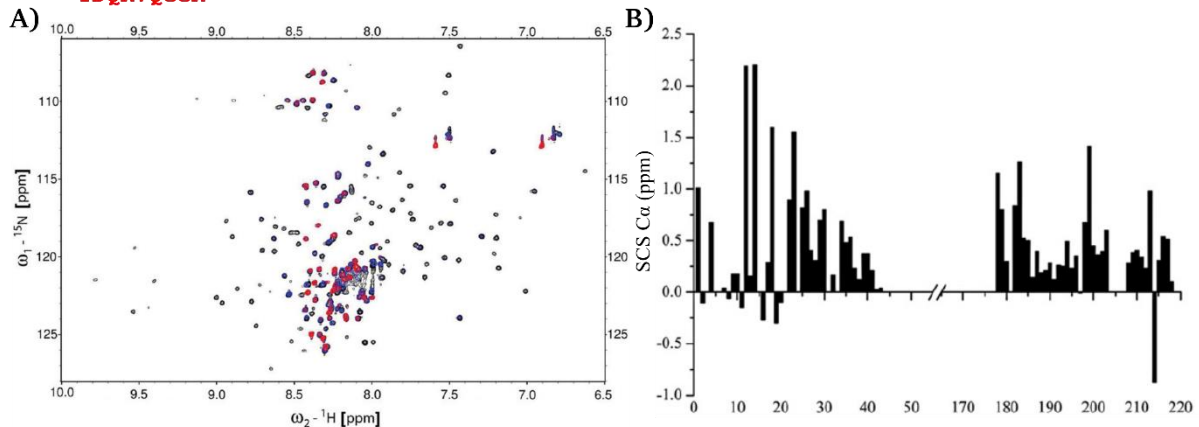
rendezetlen dinein kötő domén β -redő szerkezetű lesz a komplexben. A kötőárkon túlnyúló szakaszok viselkedése a molekuláris „ragasztó” elméletet támasztják alá és a *cc* szakaszok dimerizációjának stabilizálására mutatnak rá. Ugyanakkor a DLC2 kötődése a B exon tartalmú miozin Va izoformák stabilizálásában játszik szerepet. Az eredmények tükrében feltételezésekbe is bocsátkozhatunk a miozinVa motorfehérje szerkezeti működését illetően. A miozin Va kargó kötő képessége proteolízis, foszforiláció, illetve Ca^{2+} kötődés által szabályozott. Kargó hiányában, kis Ca^{2+} koncentrációnál a motor inaktív konformációban van, ekkor a fejrész hátrahajlik és a globuláris fark régióval (GTD) kerül kölcsönhatásba (Sellers 2008). Viszont, ha a *cc* domének és az inter-coiled-coil szakasz nyújtott állapotban vannak, ez a visszahajlás már nem lesz lehetséges. Ekkor a kölcsönhatás létrejöttéhez a GTD doménnek fordított irányba kell néznie, ez a feltétel pedig a DLC2-vel történő komplexképződés során teljesül. Azonban, hogy ez mennyire helytálló következtetés, azt további – a teljes rendszeren végzett - komplex biológiai kísérletek tudnák alátámasztani.

5.3.5. A TPPP25 rendezetlen régiói és kölcsönhatásai

Az agy-specifikus tubulin polimerizációt segítő TPPP/P25 fehérje elsődleges szerepe a mikrotubulusok dinamikájának ellenőrzése, szerkezete azonban ismeretlen. Munkám céljai között szerepelt, hogy multinukleáris, multidimenzionális NMR módszerekkel az oldatfázisú szerkezetet meghatározzam, tanulmányozzam továbbá a fehérje nukleotid kötő tulajdonságait, esetleges enzimátikus funkcióját, és a funkcionálisan fontos fémionok hatását. A fehérje jellemzéséhez a teljes képet az NMR módszerek mellett az együttműködő partnerek Ovádi Judit csoportjában CD és fluoreszcencia spektroszkópia, ITC és malachitzöld foszfát teszt vizsgálatokkal egészítették ki/támasztották alá.

A 219 aminosavból álló TPPP/p25 fehérje csupán néhány napig marad stabil, időben aggregálódik, ezért az NMR méréseket optimálni kell. A több mintán készült kísérletek sikeresnek bizonyultak és a minták jól reprodukálhatóak voltak. Már a ^1H , ^{15}N -HSQC spektrum (5.3.13A ábra) mutatja, hogy számos keskeny és kis jeldiszperziót mutató keresztcsúcs mellett jól elkülönülő széles és nagy jeldiszperzióval jellemezhető jelek detektálhatók. Ez arra enged következtetni, hogy a fehérje részben rendezetlen és rendelkezik egy jól meghatározott globuláris régióval is. Az aszignáció során a széles jelek azonosítása többszöri nekifutásra is sikertelen maradt, az N- és C-terminálisok 45, illetve 44 aminosav hosszúságú szakaszait tudtam jellemezni. A $\text{C}\alpha$ környezetre számolt másodlagos kémiai eltolódás értékek (5.3.13B ábra), néhány nem tendenciózus kiugrástól eltekintve mindvégig az önkényesen megválasztott 0,5 érték alatt maradnak, tehát mindkét terminális végen hosszú rendezetlen régiók találhatóak. Így első alkalommal sikerült igazolnom az eddigi irodalmi sejtéseket, hogy a TPPP/p25 egy részben rendezetlen fehérje. A középső 130 aminosavból álló szakasz alig, vagy nagyon kis intenzitással jelenik meg a ^1H , ^{15}N -HSQC spektrumban, ez lehet egy ún. molten globula állapot, vagy több konformációs állapot közötti cserefolyamat következménye.

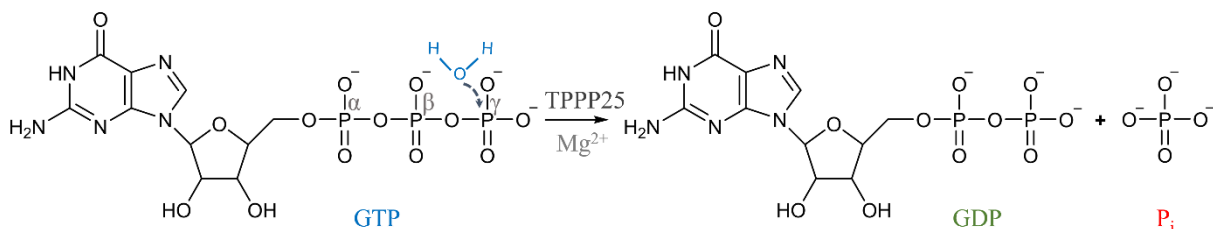
MADKAKPAKA ANRTPPKSPG DPSKDRAAKR LSLESEGAGE GAAASPELSA LEEAFRRFAV HGDARATGRE
 MHGKNWSKLC KDCQVIDGRN VTVTVDVIVF SKIKGKSCRT ITFEQFQEAL EELAKKRFKD KSSEEAVREV
 HRLIEGKAPI ISGVTKAISS PTVSRLTDTT KFTGSHKERF DPSGKGGKA GRVDLVDESG YVSGYKHAGT
 YDQKVQGGK

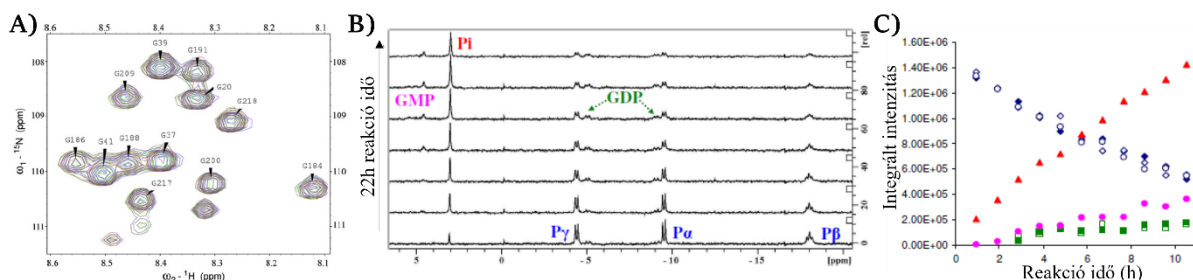


5.3.13. ábra. A TPPP/p25 aminosav szekvenciája, pirossal jelölve az azonosított szakaszok, aláhúzva a GTP kötő motívumok, és kézzel jelölve a Zn^{2+} kötő motívumok. A) $440\mu M$ ^{15}N -jelölt TPPP/p25 1H , ^{15}N -HSQC spektruma 750 MHz-en, $300K$ -en (fekete), illetve a spektrum alakulása 1:1 (kék) és 2:1 (piros) Zn^{2+} : TPPP/p25 arányánál. B) Az azonosított Ca környezetekre számolt SCS Ca értékek változása az aminosav szekvencia mentén.

Ezt követően a TPPP/p25 nukleotid kötő hajlamainak jártam utána. Tettem ezt abból a megfontolásból, hogy a TPPP/p25 fehérjében több GTP kötő motívum is található, ami megegyezik irodalmi GTP kötő konszenzus szekvenciákkal (Bourne 1991). Ilyen például a G^{68} -(X) $_4$ -GK vagy D^{82} -(X) $_{10}$ -T szakasz, melyek a nem azonosított régióban helyezkednek el, a C-terminális végen pedig a $D^{181}XXG/D^{197}XXG$ motívumokat lehet felfedezni. A GTP kötődésének tényét együttműködő partnereink több módszerrel: affinitás kromatográfiai, triptofán fluoreszcencia és CD spektroszkópiai vizsgálatokkal egyértelműen igazolták, meghatározták a GTP kötődésre jellemző $IC_{50} \sim 500\mu M$ értéket, és arra a következtetésre jutottak, hogy az affinitás Mg^{2+} jelenlétében fokozódik. Az NMR spektroszkópia hivatott annak eldöntésére, hogy ez a kötődés a fehérje mely szakaszait érinti, és ezt GTP koncentrációfüggő 1H , ^{15}N -HSQC mérések monitorizálásával tettem meg. Mivel a spektrumokban a rendezetlen szakaszok jeleinek kémiai eltolódás értékei nem változnak (lásd 5.3.14A ábra a spektrum glicin régiójára nagyítva), arra következtethetünk, hogy amennyiben megtörténik a GTP kötődés az nem a C-terminális rendezetlen szakaszra eső lehetséges $D^{181}XXG$, $D^{197}XXG$ régiókhoz, hanem az NMR spektroszkópiailag nem detektálható motívumok egyikéhez kötődhet.

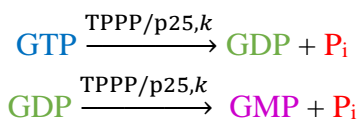
Továbbiakban azt vizsgáltam, hogy Mg^{2+} jelenlétében, a TPPP/p25-GTP kötődés hatására történik-e nukleotid hidrolízis. Ez a GTP leginkább reaktív γ -foszfát környezetét érinti:





5.3.14. ábra. A) ^1H , ^{15}N -HSQC (750 MHz, 300K) spektrumok glicin régiója $400\ \mu\text{M}$ ^{15}N TPPP/p25 (piros) szabad fehérje, illetve egyre növekvő GTP mennyiség jelenlétében, ahol a végső GTP koncentráció $1500\ \mu\text{M}$ (fekete). A nem azonosított kisebb intenzitású, széles jelek a fehérje középső szakaszához tartoznak. B) GTP hidrolízis követése *in situ* $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ NMR (101,25 MHz) spektrumokkal egy $200\ \mu\text{M}$ TPPP/p25, $1360\ \mu\text{M}$ GTP, $4\ \mu\text{M}$ Mg^{2+} , $\text{pH}=7,0$ összetételű mintán 300K-en. C) A spektrumok integrált intenzitásainak alakulása a reakcióidő függvényében: GTP 3 környezete (kék), GDP 2 környezete (zöld), GMP 1 jele (lila), szabad P_i (piros) 1 jele esetében.

$^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ NMR mérések azt mutatják, hogy fehérje hiányában a kísérleti körülmények mellett a GTP hidrolízise napokig nem detektálható, a három környezet: α (duplett), β (triplett), γ (duplett) integrált intenzitása változatlan marad. A TPPP/p25 katalizátorként viselkedik és hozzáadása beindítja a hidrolízis reakciót. A reaktív γ foszfor környezeten előidézett változás:



Az elvárásoknak megfelelően a megjelenő P_i szabad foszfát szingulett jelét, illetve a GDP-re jellemző két dublett jelet detektáljuk (5.3.14B ábra). *In situ* $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ NMR spektrumokkal 22 órán át követtem a hidrolízis alakulását, a kiértékeléshez az első 12 óra spektrumait használtam fel (5.3.14C ábra). A lecsengés tükrében a legegyszerűbb katalitikus modell írható fel, ami a GTP bomlására az alábbi összefüggést jelenti:

$$\frac{d[\text{GTP}]}{dt} = k [\text{GTP}][\text{TPPP/p25}] \quad (5.3.x)$$

Mivel a fehérje koncentrációja állandónak tekinthető, az egyenlet alakulása:

$$\frac{d[\text{GTP}]}{dt} = k_{cat} [\text{GTP}] \quad (5.3.x)$$

melynek integrálása után:

$$[\text{GTP}] = [\text{GTP}]_0 \exp(-k_{cat} t) \quad (5.3.x)$$

Az 5.3.14C ábrán a GTP jelének időbeli csökkenésére történő exponenciális görbe illesztése $k_{cat} = 0,0016\ \text{min}^{-1}$ értéket eredményez, ami jó egyezésben van a malachit zöld teszt során, P_i felszabadulás kiértékeléséből kapott $k_{cat} = 0,018\ \text{min}^{-1}$ eredménnyel. Megjegyzendő, hogy az NMR spektrumok kiértékelése a k_{cat} kiszámításának többféle képződő szabad P_i mennyiségéből is kiszámolható. Sikerült tehát igazolni, hogy a TPPP/p25 nem csupán GTP-kötő tulajdonságokkal rendelkezik, de a kis G fehérjékéhez (Rac1, H-Ras, Rap1A, Ran) hasonló – inherens - GTPáz aktivitást is mutat (Fiegen 2004, Hart 1990, Schweins 1997).

A TPPP/p25 az NMR spektroszkópiailag nem jellemezhető szakaszán belül tartalmaz egy jellegzetes Zn^{2+} kötő motívumot: $\text{His}^{61}(\text{Xaa})_{10}\text{His}^{72}(\text{Xaa})_7\text{Cys}^{80}(\text{Xaa})_2\text{Cys}^{83}$. ITC mérések kimutatták az 1:1 arányú Zn^{2+} – fehérje komplex képződését, az exoterm folyamat asszociációs állandója $K_a = 3,29 \cdot 10^4\ \text{M}^{-1}$ és a kapott termodinamikai paraméterek: $\Delta H = -9.42 \pm 3.06\ \text{kcal}$

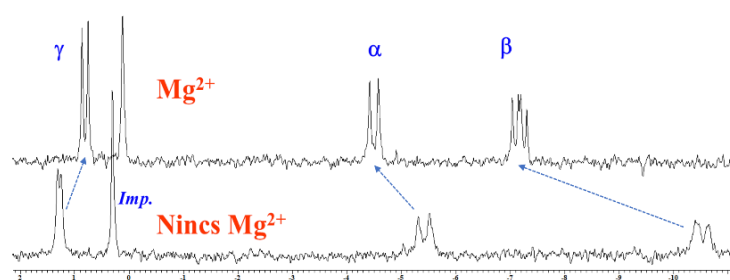
mol^{-1} , $T\Delta S = -3.25 \text{ kcal mol}^{-1}$, $\Delta G = -6.17 \text{ kcal mol}^{-1}$. A CD spektrumok elemzése arra utal, hogy Zn^{2+} kötődés hatására szerkezeti változás történik, a rendezetlen szakaszok mennyisége csökken; míg az ANS fluoreszcencia vizsgálatok arra utalnak, hogy a Zn^{2+} egy molten globula állapotot stabilizál. A Zn^{2+} hatására történő atomi szintű változásokat ^1H , ^{15}N -HSQC mérésekkel követtem. Már 1:1 Zn^{2+} :TPPP/p25 aránynál a széles, nem azonosítható szakasz jelei eltűnnek – detektálási határ alá szélesednek - ami kötődés okozta konformációs változásokra utal, és a molten globula állapot kialakulását is alátámaszthatja. A Zn^{2+} :TPPP/p25 arány további növelése nem okozott újabb változásokat a spektrumban.

Továbbá figyelembe véve, hogy a Zn^{2+} és GTP kötő motívumok átfednek (5.3.13 ábra szekvencia), érdemes azt is megvizsgálni, vajon a fémion kötődés befolyásolja-e a GTPáz aktivitást? A már ismertetett *in-situ* $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ NMR spektrumok monitorizálásával követtem a folyamatot, ami az 5.3.B ábrához nagyon hasonló képet mutatott. A $k_{cat} = 0,012 \text{ min}^{-1}$ értéke a Zn^{2+} hiányában mért értéknél valamivel kisebb, ami arra utal, hogy a Zn^{2+} gátolja a hidrolízist.

Összefoglalásként a TPPP/p25 fehérje NMR spektroszkópiai jellemzése elsőként igazolta a rendezetlen szakaszok jelenlétét. Eredményem alátámasztja azt az irodalmi magyarázatot, hogy más, jól ismert rendezetlen fehérjékhez hasonlóan (α -szinuklein, tau) a TPPP/p25 részlegesen rendezetlen állapotban található az agyi szövetekben, ahol akumulálódik és plakkokat képez. A TPPP/P25 ugyanakkor nukleotid kötő tulajdonsággal rendelkezik, Mg^{2+} jelenlétében inherens GTPáz aktivitást mutat, amit a Zn^{2+} kationok enyhén gátolnak.

5.4. A dUTPáz hidrolízise, a Mg^{2+} jelentősége

Jelen projektben a dUTP Mason-Pfizer majom retrovírus (MPMV) dUTPáz jelenlétében történő hidrolízis mechanizmusát és a Mg^{2+} kofaktor jelentőségét vizsgáltam. A reakció jelentősége, hogy funkcionális szempontból a timidilát bioszintézishez szükséges dUMP mennyiséget, és ezáltal a sejten belüli dUTP/dTTP arányt biztosítja. Az átfogó jellemzéshez ^{31}P NMR, tömegspektrometria, krisztallográfia és molekulamodellizálás módszerek ötvözetét használtuk. Ismeretes, hogy a nukleozidok γ -foszfát csoportja igen reaktív, ezzel szemben az α - helyzetű foszfát és a foszfodiészter kötések sokkal inertebbek. Ahhoz, hogy ezen inert környezetek reakcióképesekké váljanak, igen erőteljes katalizátorokra (nukleázok, Nudix hidrolázok, dUTPázok) van szükség. Jelen esetben a dUTPáz hatására egy – az enzim aktív centrumában található - vízmolekula nukleofil támadását követően a dUTP elbomlik dUMP és

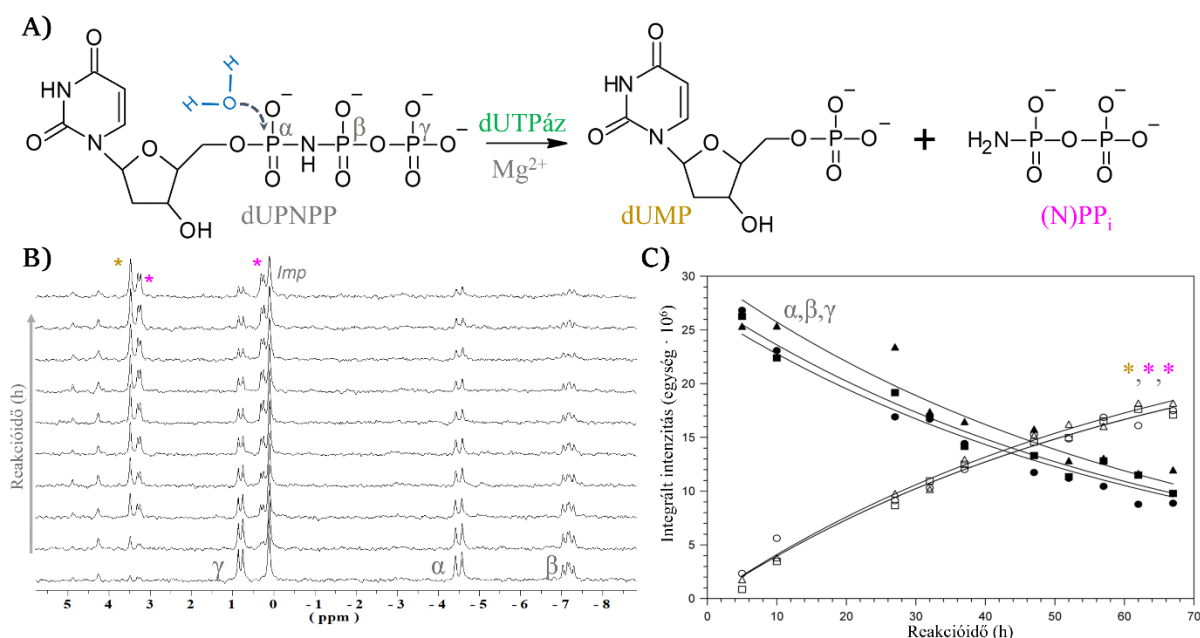


5.3.15. ábra. A dUPNPP foszfor környezeteinek változása Mg^{2+} hatására, a megfelelő $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ (101,25 MHz, 298K) spektrumok alakulása, ahol a szingulett *Imp* jel egy szennyező.

pirofoszfát képződése mellett. A reakció gyors, ezért lefutásának vizsgálatához szubsztrátként az α , β -imido-dUTP (dUPNPP) analógot használtam, melynek kötési geometriája, illetve funkciójában ellátott szerepe a dUTP-vel megegyezik (Barabás

2004). Amellett, hogy a hidrolízis dUPNPP jelenlétében lelassul, és ezáltal kényelmesebben követhetővé válik. A korábban ismertetett *in-situ* $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ mérésekkel a 3 foszfor környezet viselkedése egyértelműen követhető. Arra is válasz adható, vajon van-e szerepe a Mg^{2+} kofaktornak? A fémion koordinációja a foszfát oxigén atomjaihoz hatással van a foszfor környezetek kémiai eltolódásaira, amint ezt az 5.3.15. ábrán is szemléltettem. A dUPNPP foszfor környezetek multiplicitása hasonló a GTP jeleinek felhasadásához: α -P dublett, β -P dublett dublettje, γ -P dublett. A Mg^{2+} koordinációja leginkább a β és α foszforjelek kémiai eltolódásaira van hatással. Ez a jelentős különbség már önmagában elég ahhoz, hogy megállapíthassuk, van-e fémion a rendszerben.

a) A hidrolízis követése Mg^{2+} jelenlétében. 2mM dUPNPP és 1mM dUTPáz reakciója során az első 6 órában változás nem detektálható, ezt követően indul be a hidrolízis (5.3.16B ábra). Az α, β, γ környezetek jeleinek csökkenése, illetve 3 új jelcsalád megjelenése észlelhető, ez utóbbiak intenzitás aránya 1:1:1. A 3,5 ppm eltolódásnál megjelenő szingulett a dUMP, míg a 3,3 és 0,3 ppm értékeknél detektált dublettek ($^2J_{\text{PP}} = 6,5\text{Hz}$) az (N)PPi aminopirofoszfáthoz rendelhetők. A reakció végén ismert dUMP tartalmú oldat adagolása a szingulett jelnek az intenzitásnövekedését vonta maga után, így egyértelműsítve az azonosítást. A képződő termékek arra utalnak, hogy a reakció során a nukleofil támadás az α foszforatomon történt az 5.3.16A ábrán bemutatott reakció szerint. A spektrumok további értelmezése az előző fejezetben tárgyaltak szerint történt. A jelek időbeli intenzitás változásának követése (5.3.16C ábra) egy pszeudo elsőrendű kinetikát feltételezve $k_{\text{cat}} = 1,9 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ állandó kiszámolását teszi lehetővé, ami jó egyezésben van az *E.coli* dUTPáz dUPNPP hidrolízise során mért k_{cat} értékkel (Barabás 2004).

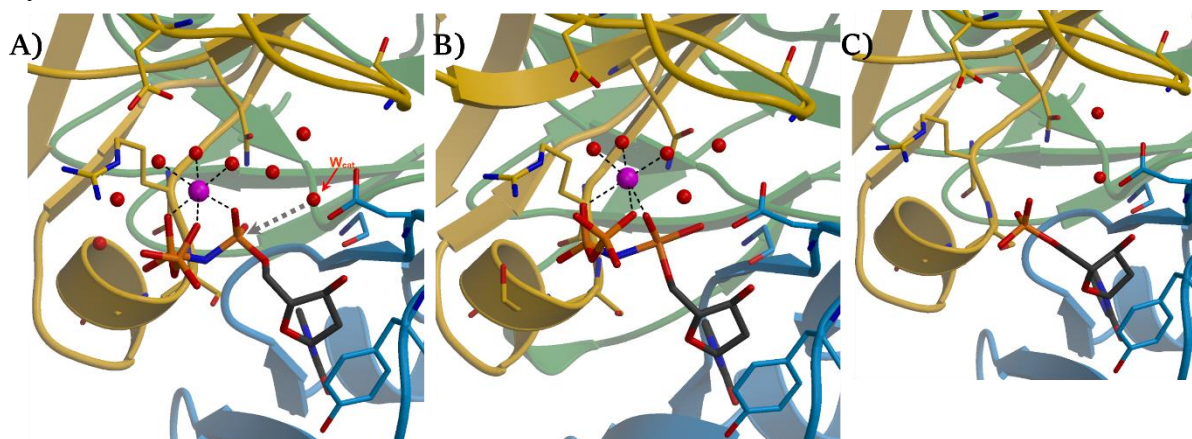


5.3.16. ábra. A) A dUTPáz katalizált dUPNPP hidrolízise Mg^{2+} jelenlétében. B) A 2mM dUPNPP, mM Mg^{2+} hidrolízise 1mM dUTPáz mellett, pH =8, 298K körülmények között. A reakció monitorizálása $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ NMR mérésekkel történt 101,25 MHz-en, 5-67 h időtartamban és C) a megfelelő szinkódolt foszfor környezetek integrált intenzitásainak időfüggése, a pszeudo – elsőrendű kinetika feltételezésével történő illesztéssel (folytonos vonal).

Az NMR mérések eredménye összecseng a kapott MS adatokkal, így minden információ arra utal, hogy a nukleofil támadás az α -P atomon történik, az 5.3.16A ábrán bemutatott reakció a valójában is lejátszódó folyamat.

Kinetikus kristallográfiai mérések alátámasztják ezeket az állításokat, sőt, a reakció mechanizmus útjára is rávilágítanak. dUTPáz és dUPNPP kokrisztallizációja során nyert különböző „életkorú” kristályokról; illetve áztatásos kísérletek során - amikor a kristályos apo-enzim kerül a dUPNPP oldatba az adatgyűjtés pedig változó inkubációs idő után történt – készültek a felvételek. A kezdeti apo-enzim állapotban egyértelműen látszik a koordinált Mg^{2+} ion mellett egy kedvező lineáris elhelyezkedésben levő w_{cat} vízmolekula jelenléte (5.3.17A ábra), aminek nukleofil támadása az α foszforon történik. Ennek következtében egy nagy energiájú asszociatív intermedier képződik (5.3.17B), majd a katalitikus centrumban már csak a dUMP található (5.3.17C).

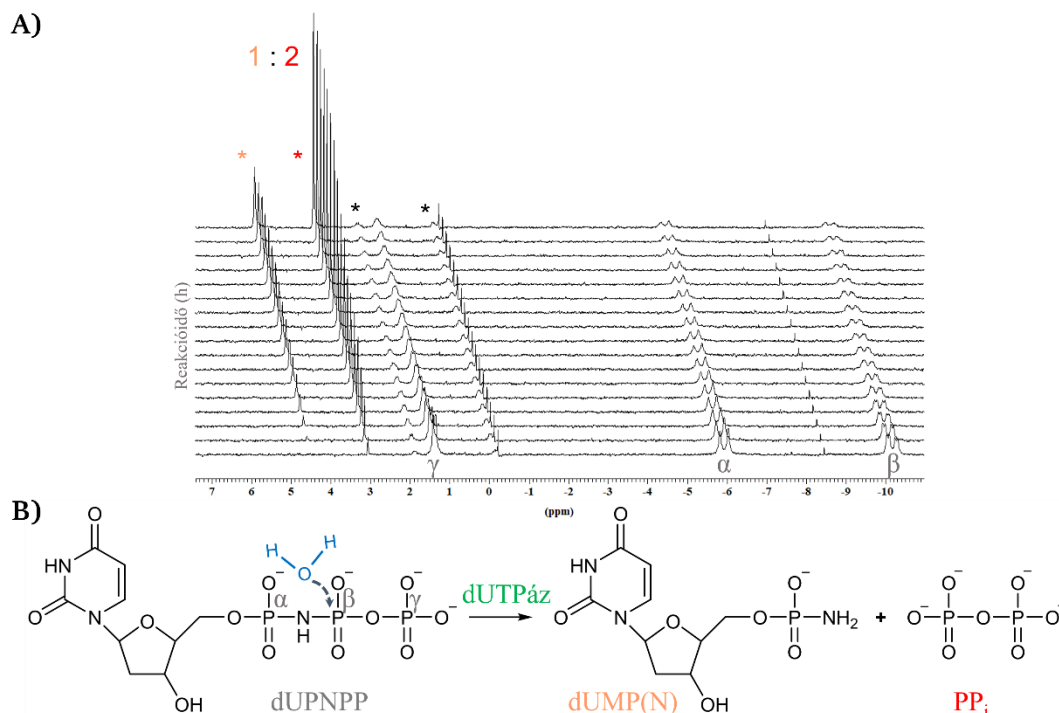
Összességében sikerült kimutatni, hogy a Mg^{2+} jelenlétében történő hidrolízis egy asszociatív mechanizmus szerint megy végbe. A nukleofil támadás az α foszfor atomon történik, és a folyamatra jellemző k_{cat} pseudo-elsőrendű állandó más dUTPáz által katalizált folyamatokhoz hasonló értéket ad.



5.3.17. ábra. Kinetikus kristallográfiai felvételek: A) a katalitikus centrum: az apo-enzim szerkezete, a pálcikamoddell jelölt dUPNPP, a koordinált Mg^{2+} (lila gömb), illetve a katalitikus vízmolekula w_{cat} (piros gömb). B) a nagy energiájú, asszociatív intermedier szerkezete, C) a reakciótermék dUMP a katalitikus centrumban.

b) A hidrolízis követése Mg^{2+} hiányában. Irodalmi megfigyelések arra utalnak, hogy fémion kofaktor nélkül is lejátszódik a folyamat, csak lassabban. Arra voltam kíváncsi, vajon a reakció lefutása hasonlóképpen történik csak más időskálán, vagy más úton megy végbe? A 2,6mM dUPNPP 1,3 mM dUTPáz katalizált hidrolízisét 1 napig követtem $^{31}P\{^1H\}$ mérésekkel. A dUPNPP jeleinek kémiai eltolódása igazolja, hogy nincs a rendszerben koordinálódó fémion. Az időbeli változás viszont nem a várt képet mutatta, ugyanis a dUPNPP bomlásával egyidejűleg két szingulett jel jelent meg, 1:2 integrál arányokkal. Kis koncentrációban előbb növekvő, majd állandó értéket mutató két szingulett jelet is lehet detektálni. Ez csupán akkor lehetséges, ha aminocsoport végű dUMP képződik, amit az is bizonyít, hogy a kémiai eltolódás nem egyezik meg a dUMP kémiai eltolódásával. Az 1:2 arány és a szingulett pedig arra utal, hogy a másik termék a pirofoszfát. Ahhoz, hogy ez a folyamat lejátszódjon, a nukleofil támadásnak a dUPNPP β foszfor atomján kell megtörténnie. Ugyan sem részletes kinetikai

elemzés, sem alátámasztó krisztallográfiai felvételek nem készültek, a hidrolízis reprodukálhatóan így játszódik le.



5.3.18. ábra. A) 2,6 mM dUPNPP hidrolízise 1,3 mM dUTPáz mellett, 298K-en. A reakció monitorizálása $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ NMR mérésekkel történt 101,25 MHz-en, 5-70 h időtartamban; B) A dUTPáz katalizált dUPNPP hidrolízise Mg^{2+} hiányában. A megfelelő foszfor környezetek szinkódokkal jelöltek.

Az eredmények a fémion kofaktor enzimatikus foszfát észter hidrolízisben betöltött nagyon szokatlan szerepére világítanak rá, amivel ezek szerint érdemes számolni.

Az említett példákból több lényeges következtetés is levonható:

i) a pH, a közeg, a fémion - koordináció nagymértékben befolyásolja egy foszfor környezet kémiai eltolódását. Jelazonosításkor a bizonytalankodás esetén nem megvetendő olyan egyszerű trükkök alkalmazása, hogy kérdéses jel esetén – amennyiben rendelkezésre áll – az adott vegyületet adagoljuk az oldathoz.

ii) a ^{31}P érzékenysége megengedi a nagy jelek mellett jelen levő szennyezők kimutatását, azonosítását.

Ezek a megállapítások néha nagy jelentőségűek lehetnek, amint az egy biológiai vizsgálat során ki is derült (Gyimesi 2008). A foszfát pufferek kis $\sim 0,01\%$ mennyiségben tartalmaznak pirofoszfátot, amivel általában nem foglalkozunk. Viszont, ha biológiai kísérletekről van szó, ott általában kis koncentrációkat használunk és ekkor már könnyen előfordulhat, hogy a szennyező – jelen esetben pirofoszfát - már nem elhanyagolható. Ismeretes, hogy a pirofoszfát nagy affinitással hat kölcsön a miozinnal, és ez a folyamat képes egy kisebb affinitású szubsztrát kötődését meggátolni. Az 1D ^{31}P NMR spektrumban kimutatható a PP_i szingulett jelenléte, amit ismert pirofoszfát oldat adagolása következtében megnövekedett jelintenzitás is alátámasztott. Az amúgy kis mennyiség lúgos körülmények közötti melegítéssel nagymértékben még tovább csökkenthető, és ez a spektrumban is tetten

érhető. Biológiai oldalról nézve, a kisebb koncentrációban jelen levő pirofoszfát már nem akadályozza a szubsztrát kötődését, így a tanulmányozni kívánt kölcsönhatás létrejön.

5.5. Membránmimetikum bicellák jellemzése

5.5.1. ^{13}C NMR relaxációs vizsgálatok

A fehérje-membrán kölcsönhatás lipid dinamikára gyakorolt hatását leginkább egy igazoltan transzmembrán fehérje szakaszon érdemes tanulmányozni. Erre a célra ideális választásnak bizonyul a feszültség-függő K^+ csatorna S3b-S4 hélix-kanyar-hélix „evező” régiója, ami a kettős rétegben helyezkedik el. Ahhoz, hogy azt is el lehessen dönteni, vajon a különböző szakaszok mennyire befolyásolnak, érdemes hasonló szerkezetet mutató, de különböző hosszúságú és típusú aminosavszekvenciákat vizsgálni. Így a 35 aminosav hosszúságú KvaP és a rövidebb, 28 aminosav hosszú HsapBK szakaszainak PC bicellára gyakorolt hatását tanulmányoztuk NMR, CD és fluoreszcens módszerekkel. Jómagam a PC bicella ^{13}C lokális környezeteinek dinamikáját térképeztem fel. Ehhez $q=0,5$ és 200mM DHPC, 100mM DMPC bicella és 3mM peptidet tartalmazó összetételt választottam, amikoris túlnyomórészt a vizsgálat tárgyát képező peptid tartalmú bicellákkal van dolgunk, éppenséggel peptid fölösleggel számolhatunk. Azért ilyen bizonytalan a megfogalmazás, mert a peptid : bicella koncentráció arány pontos értékének meghatározása kérdéses. A bicella koncentrációjának kiszámításához szükség van a bicellát képező DMPC molekulák aggregációs számára, ezt illetően pedig az irodalomban igen széles skálán található értékeket ($N=22-68$) (Mortensen 2018, Situ 2014, Triba 2005, Vold 1997), így az arány 0,7-2 közé esik.

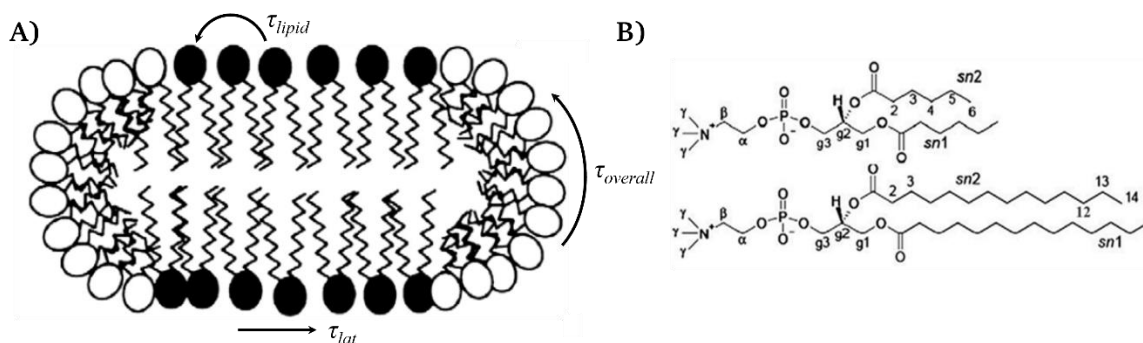
A nagy mennyiségben jelen levő lipidek lehetővé teszik természetes izotóposzlás mellett a relaxációs paraméterek meghatározását. Az adatok értékelésénél gondot okoz, hogy a PC bicellák $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ spektrumában számos DHPC és DMPC jel átfed, különálló jelek csak a DMPC 2, 3, 12 és 13 környezetei (5.5.1. ábra) esetében detektálhatók. Megbízható következtetések levonása érdekében az értékeléshez az acil lánc ezen környezeteit használtam. Egy másik probléma, hogy a relaxációs paraméterek kísérleti részben ismertett Lipari-Szabó modell-mentes formalizmus szerinti értékelése lipidek esetében a megadott formában nem alkalmazható. A lipidek ugyanis számos átlapoló időskálán történő mozgással jellemezhetők, melyek a kvantitatív kiértékelést nehezítik (néhány példa az 5.5.1A ábrán látható). Ahhoz, hogy egy peptid hatását a lipid környezet dinamikájára megállapíthassam, az irodalomban korábban leírt bicellákra alkalmazható megközelítést alkalmaztam (Andersson 2005, Ellena 1993). Ebben az esetben számolni kell a bicella teljes reorientációjával, a bicellán belüli lipid reorientációjával és az adott lokális ^1H - ^{13}C vektorok mozgásával. Egy további egyszerűsítéssel élve, a lipid molekulára jellemző S^2_{lipid} rendparaméter és a τ_{lipid} korrelációs idő paraméter vezethető be, ami a lipid molekula bicellán belüli reorientációs mozgását jellemzi. Adott lipid molekula végezhet a fő tengelye körül forgó mozgást, de a két másik tengely mentén történő forgása gátolt. Ugyanez az elgondolás a lokális mozgásokra is igaz, tehát minden mért környezetet egy S^2_{local} és τ_{local} paraméterrel is jellemeznünk kell. Ami a teljes bicellát illeti, a

30-200ns nagyságrendű $\tau_{overall}$ korrelációs idő túl nagy ahhoz, hogy a spektrális sűrűséget befolyásolja, ezért biztonsággal elhanyagolható. Mindezeket figyelembe véve a spektrális sűrűség függvény alakulása:

$$J(\omega) = \frac{2}{5} \left[\frac{(S_{local}^2 - S_{local}^2 S_{lipid}^2) \tau_{lipid}}{1 + \omega^2 \tau_{lipid}^2} + \frac{(1 - S_{local}^2) \tau'}{1 + \omega^2 \tau'^2} \right] \quad (5.5.1.)$$

ahol $1/\tau' = 1/\tau_{lipid} + 1/\tau_{local}$ és $\tau_{lipid} \gg \tau_{local}$.

Így most már megtörténhet a relaxációs paraméterek illesztése, de ez sem a megszokott utat követi. Mivel a lassú, globális (overall) mozgás az R_2 relaxációs sebességet nagymértékben befolyásolja, a kiértékeléshez csupán két külön térerőn (9.39T és 14.09T) meghatározott R_1 és stacionárius hetNOE értékeket használtam. Figyelembe véve, hogy egy izolált ^1H - ^{13}C spin-pár esetében a dipól-dipól kölcsönhatás a fő T_1 relaxációs mechanizmus, a CSA hozzájárulás elhanyagolható. A kiértékeléshez bizonyos paraméterek az irodalomból (^{13}C - és ^2H -NMR relaxációs, vagy EPR mérésekből) rendelkezésre állnak, így a $\tau_{lipid} = 1,9$ ns és $S_{lipid}^2 = 0,36$ értékek állandónak tekinthetők, ugyanakkor tanulmányozható ezen értékek változtatásának hatása az S_{local}^2 és τ_{local} paraméterekre.



5.5.1. ábra: A) A $q=0,5$ bicella vázlatos felépítése, a különféle mozgások által jellemzett korrelációs idők. B) a DHPG és DMPC molekulák szerkezeti képletei.

A kísérleti adatok ez úton történő kiértékelése az 5.5.1 táblázatban összefoglalt eredményekhez vezet. Az adatok arra utalnak, hogy mind a szabad bicella, mind a fehérje-bicella rendszerekben az acil lánc mentén a terminális vég fele haladva nő a mozgékonyság (csökkenő rendparaméterek), gyorsul a lokális mozgás (csökkenő τ_{local} értékek). Annak ellenére, hogy minimálisak az eltérések, de mindkét fehérje jelenléte hatással van a DMPC lipid dinamikájára. A lipid fejcsoporthoz legközelebb álló 2, de leginkább 3 környezetek nagyobb rendparaméterekkel, és szignifikánsan nagyobb korrelációs időkkel rendelkeznek, ami arra utal, hogy a peptid jelenléte csökkenti a lánc mobilitását. A terminális végen található 12 és 13 környezetekre ugyanez jellemző. A HsapBK esetében nagyobb hatás érzékelhető. Az eredmény azt mutatja, hogy mindkét peptid nagy valószínűséggel a kettős rétegbe épült be, és az acil lánc fejcsoporthoz legközelebbi részeinek mobilitását csökkenti. Hasznos volna tudni, hogy reagál erre a jelenlétre a glicerol csoport, illetve a fejcsoport. Ennek eldöntése bicella esetében az átlapoló jelek miatt nem megoldható.

5.5.1. Táblázat: Az S^2_{local} és τ_{local} paraméterek változása a vizsgált DMPC lipid ^{13}C környezeteire. 200mM DMPC tartalmú q=0,5 PC üres, illetve 3mM peptidet tartalmazó bicellákban, 37°C hőmérsékleten. Az $sn1$ és $sn2$ szénláncok adott környezeteinek kémiai eltolódásaira átlagértékeket használtam.

| ^{13}C | DMPC/DHPC | | DMPC/DHPC + KvaP | | DMPC/DHPC + HsapBK | |
|-----------------|---------------|---------------------|------------------|---------------------|--------------------|---------------------|
| | S^2_{local} | τ_{local} (ps) | S^2_{local} | τ_{local} (ps) | S^2_{local} | τ_{local} (ps) |
| 2 | 0,22 ± 0,01 | 33 ± 3 | 0,23 ± 0,01 | 35 ± 5 | 0,24 ± 0,01 | 31 ± 3 |
| 3 | 0,12 ± 0,01 | 19 ± 3 | 0,16 ± 0,01 | 28 ± 3 | 0,14 ± 0,01 | 30 ± 3 |
| 12 | 0,04 ± 0,01 | 10 ± 2 | 0,03 ± 0,01 | 12 ± 2 | 0,02 ± 0,01 | 14 ± 5 |
| 13 | 0,02 ± 0,01 | 8 ± 2 | 0,02 ± 0,01 | 9 ± 2 | 0,01 ± 0,01 | 10 ± 2 |

Egy megoldás kínálkozik, hiszen a DHPC *micellák* jelenlétében ez a hatás követhető, ugyanakkor a DHPC viselkedése is megismerhető. Ebben az esetben 3mM peptid hatását követtem 200mM DHPC micella oldatra, ami egy peptid : micella ~ 3 : 12,5 = 0,24 arányt jelent, azaz a micella van jelentős feleslegben. A micella kisebb méretéből adódóan itt a globális rotációs korrelációs idő ($\tau_{overall}$) már nem hanyagolható el a dinamikai analízisben. Valóban, a DLS mérésekből származtatott hidrodinamikai sugár értékéből (2,2nM, 37°C) számolt $\tau_{overall} = 5\text{ns}$, így a micella reorientációját is figyelembe véve az 5.5.1 összefüggés alakulása:

$$J(\omega) = \frac{2}{5} \left[\frac{(S^2_{lipid} \tau_{overall})}{1 + \omega^2 \tau_{overall}^2} + \frac{(S^2_{local} - S^2_{local} S^2_{lipid}) \tau_{lipid}}{1 + \omega^2 \tau_{lipid}^2} + \frac{(1 - S^2_{local}) \tau'}{1 + \omega^2 \tau'^2} \right] \quad (5.5.2.)$$

Azt mindenképpen érdemes megvizsgálni, vajon a globális mozgás milyen hatással van a spektrális sűrűség függvényre, ez által a relaxációs paraméterekre. Ennek eldöntésére, feltételezve, hogy $\tau_{lipid} = 1,9$ ns és $S^2_{lipid} = 0,36$ ugyanakkora, mint a DMPC bicellák esetében, és $S^2_{local} = 0,16$ meghatároztam különböző globális korrelációs időkre a $J(\omega)$ spektrális sűrűség függvény értékét $\omega = 2\pi \cdot 125 \cdot 10^6$ rad s⁻¹ ^{13}C Larmor frekvenciánál (11,8T térerőn). A bicellákra $\tau_{overall} = 100$ ns mellett $J(\omega) = 0,83 \cdot 10^{-10}$ s rad⁻¹, micellák esetében $\tau_{overall} = 5\text{ns}$ és $J(\omega) = 0,93 \cdot 10^{-10}$ s rad⁻¹. Ugyanakkor a relaxációs sebesség alakulását leíró egyenletben a legnagyobb frekvencia $\omega_C + \omega_H = 2\pi \cdot (125 + 500) \cdot 10^6$ rad s⁻¹ és a spektrális sűrűség függvény értéke $\tau_{overall}$ nagyságától függetlenül mindig $0,46 \cdot 10^{-10}$ s rad⁻¹. Az elmondottakból következik, hogy a micella globális mozgása a spektrális sűrűség függvény kis frekvencia tartományában bír csak jelentőséggel.

Az előbbi feltételezés értelmében DHPC és DMPC molekulák forgására jellemző τ_{lipid} érték ugyanakkora bicellák és micellák esetében is, ami valószínűleg nem helytálló. A DHPC micellákra ez az érték kisebb: 1,0 illetve 1,5 ns korrelációs időket választva, arra a következtetésre jutottam, hogy nincsenek hatással a globális mozgásra. Hasonló az eredmény, ha S^2_{lipid} értékét változtatom 0,25 - 0,5 tartományban: ez a S^2_{local} adatokban maximum 0,05 eltérést okoz. Következtetésként elmondható, hogy a lipid molekulában bekövetkező kis változások nincsenek jelentős hatással a relaxációs sebességek értelmezésére.

Végezetül micellák esetében nem elhanyagolható a DHPC molekulák oldalirányú diffúziója. Mivel az oktanoát és DHPC micellák mérete hasonló, az irodalomban előbbire

meghatározott $\tau_{lat} = 1,5$ ns adat használata jó megközelítésnek bizonyul. DLS mérések alapján $\tau_{rot} = 5$ ns, a DMPC mozgások alapján becsült $\tau_{lipid} = 1-2$ ns, azaz minden rotációs korrelációs idő ugyanazon nagyságrenden belül található. A teljes effektív korrelációs idő: $1/\tau_{overall} = 1/\tau_{rot} + 1/\tau_{lipid} + 1/\tau_{lat}$.

Ezek tükrében elemeztem, hogy a két peptid milyen hatással van a micella S^2_{local} paramétereire. Különböző τ_{lat} (1; 5; 10 ns) és τ_{lipid} (1,0; 1,5; 1,9 ns) értéknél kiszámolt rendparaméterek azt mutatták, hogy egyetlen környezet esetében sincs érdemi változás a lokális dinamikában, tehát a végső kiértékelésnél bizalommal támaszkodhatunk a bicellákra megadott DMPC kiértékelés menetére. Az elmondottak alapján számolt eredmények az 5.5.2 táblázatban láthatók. Ha a DHPC molekula környezetét három csoportra osztjuk: a fej- (γ, β, α), a glicerol- (g1, g2, g3) és a szénlánc csoportokra, akkor szembetűnő, hogy a glicerol régióban található környezetek mozgása gátolt leginkább. A fejcsoport környezetei mobilisabbak, de még inkább dinamikus a szénlánc terminális vége, és meglepő módon a 3-as környezet. A szénláncra vonatkozó rendparaméterek sokkal kisebbek, mint a bicellák DMPC komponensénél számolt megfelelő értékek, ez a mobilitás növekedés a rövidebb acil-lánc jelenlétével magyarázható. Peptidek hatására a rendparaméterek növekednek, itt is kiemelten a glicerol régióban. A peptid : DHPC arány ismeretében a rendparaméter 0,50-ról 0,58-ra (KvAP), illetve 0,59-re (HsapBK) történő változása igen szignifikáns. Akárcsak a bicelláknál, a micella esetében is a HsapBK peptidre vonatkozó adatok arra utalnak, hogy ez a fragmentum valamivel nagyobb változást okoz, de nagy különbség a két peptid dinamikára gyakorolt hatása között nem tapasztalható.

5.5.2. táblázat. Az S^2_{local} paraméter változása a DHPC micella ^{13}C környezetei esetében: 200mM DHPC és 3mM peptid koncentrációknál, 37°C hőmérsékleten. Az illesztés során $\tau_{lipid} = 1,9$ ns és $S^2_{lipid} = 0,36$ értékeit állandónak tartottam. Az *sn1* és *sn2* szénláncok adott környezeteinek kémiai eltolódásaira átlagértékeket használtam.

| ^{13}C | DHPC S^2_{local} | DHPC + KvAP S^2_{local} | DHPC + HsapBK S^2_{local} |
|-----------------|-----------------------|------------------------------|--------------------------------|
| γ | 0,03 \pm 0,01 | 0,03 \pm 0,01 | 0,03 \pm 0,01 |
| β | 0,07 \pm 0,01 | 0,06 \pm 0,01 | 0,08 \pm 0,01 |
| α | 0,08 \pm 0,01 | 0,08 \pm 0,01 | 0,10 \pm 0,01 |
| g3 | 0,37 \pm 0,02 | 0,43 \pm 0,03 | 0,43 \pm 0,03 |
| g2 | 0,49 \pm 0,03 | 0,56 \pm 0,02 | 0,56 \pm 0,02 |
| g1 | 0,50 \pm 0,03 | 0,58 \pm 0,04 | 0,59 \pm 0,04 |
| 2 | 0,13 \pm 0,01 | 0,13 \pm 0,01 | 0,16 \pm 0,01 |
| 3 | 0,04 \pm 0,01 | 0,04 \pm 0,01 | 0,06 \pm 0,01 |
| 4 | 0,06 \pm 0,01 | 0,07 \pm 0,01 | 0,09 \pm 0,01 |
| 5 | 0,03 \pm 0,01 | 0,03 \pm 0,01 | 0,03 \pm 0,01 |
| 6 | 0,01 \pm 0,01 | 0,01 \pm 0,01 | 0,01 \pm 0,01 |

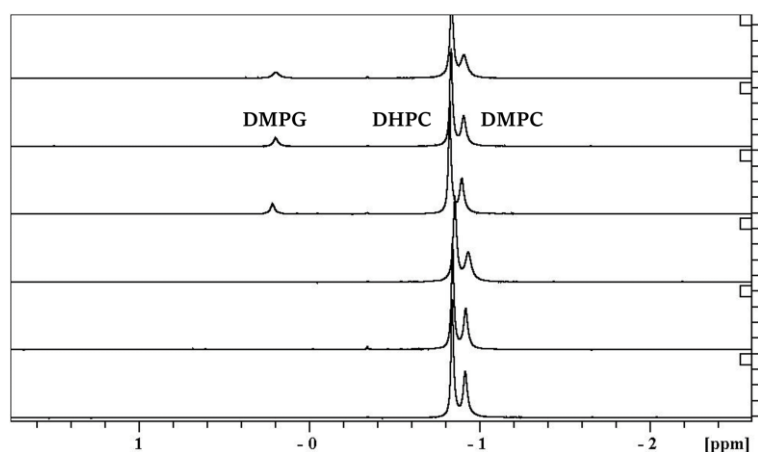
Összegzésként megállapítható, hogy az adatok a peptidek kettős rétegen belüli elhelyezkedésére utalnak, és a kölcsönhatás következtében legnagyobb mobilitási változást

szenvető környezetekre könnyen fény derül. Ugyanakkor a relaxációs mérések eredményei fluoreszcencia vizsgálatok kimenetelével összhangban vannak. Következtetések más irodalmi utalásokkal is egybecsengenek, melyek szerint a dinamikai változások leginkább a glicerol régióban érzékenyek a bicella rendszerben bekövetkező változásokra (Yamamoto 2009). Az mindenképpen előny, hogy transzmembrán peptidok esetében atomi szinten, egyszerűen kivitelezhető relaxációs paraméterekből az adott környezetek dinamikája feltérképezhető, de mint látható, több, jól alátámasztott egyszerűsítéssel kell élni – még kevés komponensű membránmimetikum esetében is. Bonyolultabb rendszerek esetében ez a megközelítés már nem biztos, hogy helytálló.

5.5.2. ^{31}P NMR relaxációs vizsgálatok

Azt már tapasztaltuk, milyen módon befolyásolja a peptidok membrán mimetikumokkal való kölcsönhatása a lipidek dinamikáját, de olyan célzott kísérletek az irodalomban nem történtek, vajon lehetséges-e – legalábbis közelítő – választ adni arra a kérdésre, hogy a fehérje fragmentum transzmembrán, vagy pedig a membrán felületén helyezkedik-e el. Munkám során egy ^{31}P NMR spektroszkópiai méréseken alapuló egyszerű és rutinszerűen alkalmazható eljárást próbáltam kidolgozni ennek eldöntésére. Két ismert topológiájú rendszert választottam: a 13 aminosavból álló, felületaktív dinorfin B (DynB) és a 21 aminosav hosszú mesterséges transzmembrán KALP21 peptideket. Mimetikumként $q=0,5$ PC, illetve 20% negatív töltéssel rendelkező PC/PG bicellákat használtam. Üres és peptid-bicella rendszerekben térerő- (9,4 és 11,7 T) és hőmérséklet-függő (25–45°C tartományban) $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ T_1 és T_2 relaxációs idő értékek szolgáltatták a kiértékelések alapját, a molekulaméret ellenőrzése pedig dinamikus fényszórás vizsgálatokból történt.

Az oldatfázisú PC bicellák egy-dimenziós $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ spektruma igen informatív, ugyanis hiába ugyanaz a kolin fejrész a DHPC és a DMPC molekulákban, a két különböző hosszúságú szénláncnak és a bicella felépítésében betöltött helyzetének köszönhetően a két foszfor

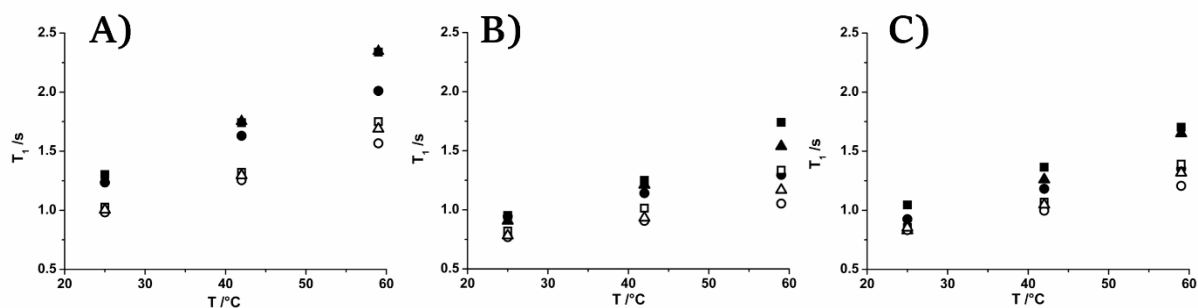


5.5.2. ábra. $q=0,5$ bicella rendszerek $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ spektrumai, lentről felfele haladva: üres PC bicella, 2mM DynB és PC bicella, 2mM KALP21 és PC bicella, üres 20% negatív töltésű PC/PG bicella, 2mM DynB és PC/PG bicella, 1mM Kalp és PC/PG bicella.

környezet különbözik (5.5.2 ábra). Ennek következményeként két jelet detektálunk, melyek egymástól 0,06 ppm távolságra helyezkednek el és integrál arányaikból a DHPC/DMPC összetétel is ellenőrizhető. Negatív töltésű PC/PG bicelláknál a DMPG foszfor környezete nagyobb kémiai eltolódásnál detektálható. A peptid jelenléte a foszfor jelek

kiszélesedését okozza, ez a szélesedés elsősorban a transzmembrán KALP21 fragmentum esetében jelentős.

A T_1 longitudinális relaxációs idő változása a várakozásnak megfelelő eredményt mutat: kisebb térerőn nagyobb értékeket mérünk, és leghosszabb relaxációs idővel a DHPC foszfor környezete rendelkezik (25°C hőmérsékleten és 9,4T térerőn 1,3s), míg a DMPG és DMPC foszfor magokra vonatkozó adatok igen hasonlóak: 1,0, illetve 0,94 s, lásd 5.5.3 ábra. Ebből arra következtethetünk, hogy a longitudinális relaxációs időt befolyásoló paraméterek függetlenek attól, hogy semleges vagy töltéssel rendelkező bicella rendszert vizsgálunk. Mindkét peptid jelenléte csak kismértékű csökkenést (kb 0,1s nagyságú) idéz elő a PC bicellák T_1 értékeiben, és ez is csak magas, 59 °C hőmérsékleten érzékelhető. Anionos PC/PG bicelláknál az effektus valamivel nagyobb már 25°C hőmérsékleten is (kb 0,2s nagyságú a csökkenés), ez elsősorban a DynB jelenlétében detektálható. A rövidebb T_1 a foszfát csoport korlátozottabb mozgásával van összhangban, ami azzal magyarázható, hogy mindkét peptid pozitív töltésekkel rendelkezik, és a kölcsönhatás - főleg az anionos bicellákkal - igen kedvező. A felületaktív DynB tehát nagyobb hatással van a lipid dinamikájára, mint a transzmembrán KALP21.



5.5.3. ábra. 150mM $q=0,5$ PC/PG, 20% negatív töltésű bicellák ^{31}P környezetének hőmérsékletfüggő T_1 értékei 9,4T (telt szimbólumok) és 11,7T (üres szimbólumok) térerőkön: üres bicella (négyzet), 2mM DynB és bicella (kör), 1mM KALP21 (háromszög) rendszereken. A) a DHPC; B) a DMPC és C) a DMPG fejcsoportra jellemző relaxációs idők.

A dinamika alaposabb értelmezése és termodinamikai paraméterek meghatározása céljából a T_1 adatok mélyebb elemzésnek is alávetethetők. Kísérleti körülményeink között a ^{31}P magra jellemző lehetséges relaxációs mechanizmusok közül kettőt érdemes figyelembe venni: a dipól-dipól kölcsönhatást (DD) és a kémiai eltolódás anizotrópiáját (CSA). Milburn és munkatársai kimutatták, hogy 124,7 MHz feletti frekvenciákon a ^{31}P mag relaxációját a CSA mechanizmus dominálja (Milburn 1987). Mivel a méréseket 162 és 202 MHz frekvenciákon végeztem, így a mért relaxációs időre érvényes összefüggés:

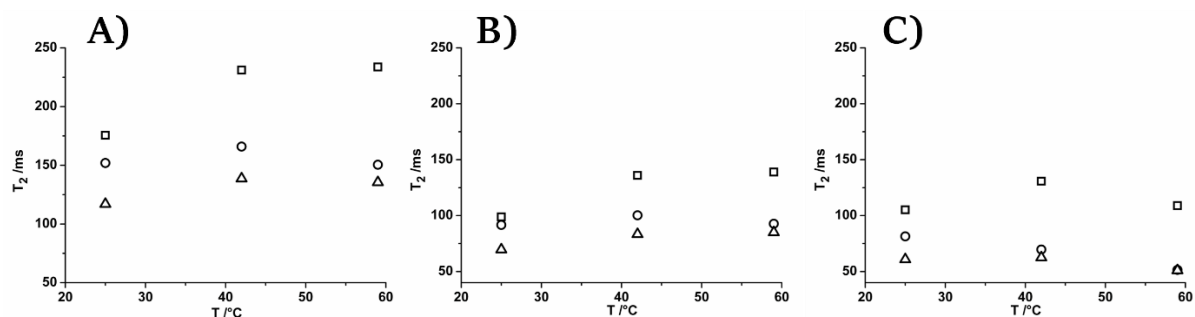
$$\frac{1}{T_1^{\text{mért}}} = \frac{1}{T_1^{\text{CSA}}} = \frac{2}{15} \gamma^2 (\Delta\sigma)^2 B_0^2 \tau_c \quad (5.5.3.)$$

ahol γ a ^{31}P mag giromágneses együtthatója, $\Delta\sigma$ a kémiai eltolódás anizotrópiája, B_0 a mágneses mező erőssége, τ_c pedig a foszfát csoport reorientációjára jellemző effektív rotációs korrelációs idő. Az irodalmi $\Delta\sigma = 50\text{ppm}$ adat ismeretében az 5.5.3. egyenlet alapján a τ_c értéke kiszámolható. Feltételezve, hogy a közeg izotróp és a mozgás egyetlen τ_c korrelációs idővel

írható le, ennek Arrhenius típusú hőmérsékletfüggéséből megbecsülhető a foszfát csoportnak a glicerol gerincéhez képest történő reorientációs aktiválási energiája. PC bicellákra azt találtam, hogy a hőmérséklet emelkedésével τ_c értéke csökken, ahogy az el is várható. 25°C hőmérsékleten mind a bicella, mind a peptid-bicella esetében 1,0ns körüli érték számolható, megerősítve azt az állítást, hogy a bicella fejrész viselkedése minden rendszerben hasonló. A reorientációs aktiválási energia értékek a DHPC molekulára nagyobbak, mint a DMPC-re, ami a bicella felépítésében betöltött különböző szerepüknek lehet köszönhető. KALP21 hozzáadásával az aktiválási energia keveset változik és csökken (9,2-ről 8,7 kJ/mol értékre DHPC; és 6,4-ről 5,7 kJ/mol értékre DMPC esetében) DynB peptidre ez a változás jelentősebb és növekszik (DHPC molekulára 11,8; DMPC esetében 9,4 kJ/mol). Korábbi vizsgálatok más, hosszabb szénlánccal rendelkező bicellákra a reorientációs energia 16 kJ/mol értékét közlik, ami a jelen megközelítéssel jó egyezésben van. Másfelől az 1,0 ns effektív rotációs korrelációs idő szintén összhangban van az általam korábban vizsgált ^{13}C környezetek dinamikájánál alapul vett $\tau_{lipid} = 1,9$ ns értékkel.

A levonható következtetés az, hogy a felületaktív peptidek sokkal inkább hatással vannak a ^{31}P relaxációs idő értékekre, mint a transzmembrán fragmentumok.

A T_2 longitudinális relaxációs idő nem csak a lipid rendszerek mozgásaira, hanem a bicella rendszerek méretére is érzékeny. A bicellákra és peptid-bicella rendszerekre mért T_2 értékek a longitudinális relaxációs idő értékeknél körülbelül tízszer kisebbek (5.5.4. ábra). Mindkét peptid, de főleg a KALP21 jelentős jelszélesedést okoz a semleges PC bicellák foszfor jelein, ami T_2 csökkenésre utal és anionos PC/PG bicellák esetén ez a hatás igen szignifikáns. Az NMR spektroszkópiai mérések összhangban vannak a DLS eredményekkel, melyek megnövekedett bicella méretet mutatnak, elsősorban a KALP21 jelenlétében. A DLS mérésekből származtatott hidrodinamikai sugárból rotációs korrelációs idő a 35-182ns tartományba esik. A legkisebb az érték a csak bicellát tartalmazó rendszerre, legnagyobb pedig a KALP21 jelenlétében. Következésképpen egy transzmembrán fehérje sokkal nagyobb hatással van a T_2 dinamikára, mint a T_1 dinamikára. Kvantitatív következtetést nem vonhatunk le a méret növekedéssel kapcsolatban, de az együttes NMR - DLS eredmények egyértelműen arra mutatnak, hogy a membrán morfológiája változik transzmembrán fehérje hatására.



5.5.4. ábra. 150mM $q=0,5$ PC/PG, 20% negatív töltésű bicellák ^{31}P környezetének hőmérsékletfüggő T_2 értékei 11,7T térerőn: üres bicella (négyzet), 2mM DynB és bicella (kör), 1mM KALP21 (háromszög) rendszereken. A) a DHPC; B) a DMPC és C) a DMPG fejsoporra jellemző relaxációs idők.

Mindezekből kitűnik, hogy a ^{31}P relaxációs értékek meghatározása lehet egy módszer a fehérje-membrán kölcsönhatás topologikus vizsgálatára. Egyértelműen megállapítható a felületaktív peptid lipid dinamikára gyakorolt hatása, ugyanakkor a transzmembrán peptid ezt a mozgást nem befolyásolja, ezzel szemben méretnövekedést és morfológiai változásokat okoz. Szükség van azonban újabb és újabb rendszerekre, hogy a modellpeptidekre megfogalmazott állításokat igazolni lehessen.

5.5.3. Méret és alak változás NMR - SAXS módszerek tükrében

A bicella-peptid kölcsönhatás következménye a bicella méret- és/vagy alakváltozása. Az irodalomban elterjedt, hogy a mért translációs diffúzió együtthatóból számolt látszólagos hidratációs sugarat használják összehasonlításra. Amennyiben ez az üres bicellára mért értéknél nagyobb, a jelenséget a bicella méretnövekedésével magyarázzák, ugyanakkor a bicella alakjának megváltozása is okozhatja ezt a jelenséget. Hogy melyik állítás igaz, annak eldöntésére - jelenleg is folyamatban levő kutatásaimban – a diffúziós NMR vizsgálatokat ötvöztem kisszögű röntgenszórás (SAXS) mérésekkel. A hibrid megközelítés előnye, hogy míg az NMR mérésből egy látszólagos hidrodinamikai sugár (r_H), addig a SAXS szórásgörbe kezdeti Guinier tartományából girációs sugár (r_G) számolható. A két érték akkor értékelhető együtt, ha mindkettőt ugyanolyan körülmények között határoztuk meg. Ezért méréseink ugyanazon mintán, ugyanazon hőmérsékleten történtek. Az eredeti elképzelés szerint az r_G/r_H arány a rendszer alakjára enged következtetni, és már a kapott tendencia is informatív lehet, hiszen az alakfaktorban detektált változás a bicella és bicella-peptid rendszer alakváltozását tükrözi. A vizsgálatok első eredményei igen biztatóak voltak, hiszen a DHPC micellákra meghatározott 1 körüli alakfaktor a DHPC micella nyújtott alakjára utal és ez a megállapítás irodalmi előzményekkel teljes összhangban van (Lin 1986).

A céloom tehát az volt, hogy bicella és bicella - modellpeptid rendszerekre szisztematikusan, azonos körülmények mellett meghatározott r_H és r_G értékek alapján ezen alakfaktorok alakulását megvizsgáljam, és eldöntsem vajon az ilyen típusú vizsgálatok mennyire járulnak hozzá a membrán mimetikumok viselkedésének és fehérjék/peptidek hatására történő változásainak mélyebb megértéséhez és pontosabb leírásához. A feladat elvégzéséhez ismételtelen $q=0,5$ összetételű PC és 20% negatív töltésű PC/PG bicellákat, illetve modellpeptidként a transzmembrán KALP23 és a túlnyomórészt felületaktív melittint használtam.

NMR spektroszkópiai információ: oldatösszetétel, aggregációs számok, méret. Mindenekelőtt azt kell tisztázni, hogy pontosan mi is a bicella oldat összetétele. Ugyanis adott kísérleti körülmények mellett az oldat tartalmazhat PC bicellát, DHPC micellát és szabad DHPC molekulákat. Annak eldöntésére, hogy ezek milyen arányban fordulnak elő, tudni kell a DHPC kritikus micella képződési koncentrációját (cmc) is, ami hőmérséklet és ionerősségfüggő paraméter. Így az első lépést a micella pontos megismerése jelenti.

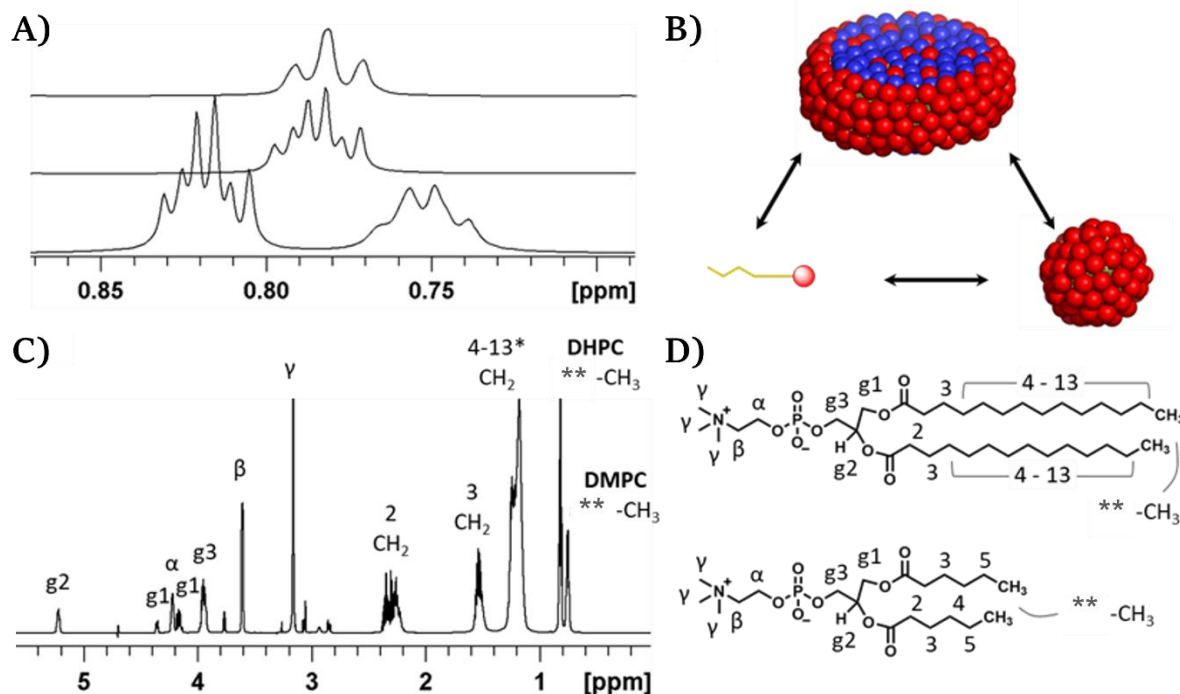
A különböző ionerősségű oldatok, különböző hőmérsékleten érvényes cmc értékeit DHPC koncentráció-függő translációs diffúziós mérésekből határoztam meg (5.5.3. táblázat).

Az adatokból kiderül, hogy míg 298K-en az ionerősség befolyása kisebb, addig 310K-en ez sokkal hangsúlyosabb. Továbbá a micella a 283-313 K tartományban történő viselkedését illetően arra ez eredményre jutottam, hogy a hidrodinamikai sugár értékek csupán 1 Å változást mutatnak, azaz ilyen körülmények között a micella szerkezete állandónak tekinthető.

5.5.3. táblázat. Kísérletileg meghatározott *cmc* értékek

| <i>c</i> NaCl (mM) | <i>cmc</i> (mM) | |
|--------------------|-----------------|-------|
| | 298 K | 310 K |
| 0 | 15,9 | 12,9 |
| 50 | 15,0 | 11,6 |
| 150 | 14,9 | 9,1 |

Az is vitatott kérdés, hogy mennyi a micellát felépítő DHPC molekulák aggregációs száma (N_{agg}). A korábban felállított *D* - *M* empirikus egyenleteim alapján erre én is megpróbáltam egy értéket becsülni. A DHPC micellára a 298 K-en meghatározott $D = (1,37 \pm 0,01) \cdot 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ maximálisan egy $M = 7,3 \text{ kDa}$ méretű rendszerre utal, és ebben az esetben $N_{agg} = 16$. Ez az érték jó összhangban van a SANS mérések eredményével ($N_{agg} = 19$) (Lin 1986), illetve a SAXS szórásgörbékre 310K-en illetett héjmodellből kapott értékkel ($N_{agg} = 16$) (Mortensen 2018); ugyanakkor a többi $N_{agg} = 25$, illetve 35 és 40 értékektől jócskán eltér (Lipfert 2007, Tausk 1974). Azért nem gondolom, hogy ezek a nagyobb aggregációs számok volnának a reálisak, mert akkor az ezekből visszszámolt molekulatömeg alapján egy nagyon más translációs diffúziós együtthatót mérnénk.



5.5.5. ábra. A) A láncvégi -CH₃ metil régió 1D ¹H spektruma fentről lefele haladva: DHPC monomer (9mM), DHPC micella (27 mM) és PC bicella (DHPC 100mM) esetében. B) a bicella oldat lehetséges összetétele; C) A q=0,5 PC bicella oldat 1D ¹H spektrumának jelazonosítása és D) a szerkezeti képlet a megfelelő jelölésekkel.

Ilyen előzetes információk birtokában most már meghatározható egy bicella oldat összetétele, amihez elegendő az 1D ^1H spektrumok kiértékelése és a translációs diffúziós együtthatók meghatározása. D kiszámításához a láncvégi $-\text{CH}_3$ metilcsoport tripllett jeleit használtam (5.5.5A ábra). DHPC molekula esetében a jelek szélesek, aminek oka a szerkezetben két nem igazán ekvivalens oldallánc közeli kémiai eltolódás értékeiből adódik. Micella esetében a két láncvégi metilcsoport jele elválik, de a csatolási állandó értéke változatlan marad: $^3J_{\text{HH}} = 7,2$ Hz. A bicellában külön detektálható a bicella kötött és a szabad DHPC metil jele, így az ezekből meghatározott D értékekből az oldatösszetételre (5.5.5B ábra) következtethetünk:

$$D_{\text{DHPC}} = x_{\text{szabad}} (D_{\text{szabad}}^0 - D_{\text{bicella}}) + D_{\text{bicella}} \text{ és } x_{\text{szabad}} = c_{\text{szabad}}^{\text{DHPC}} / c_{\text{DHPC}} \quad (5.5.3. \text{ és } 5.5.4)$$

ahol a szabad megnevezés a nem-bicella kötött DHPC mennyiségét jelenti, a D_{szabad}^0 pedig a monomer DHPC molekulára utal - ezt az értéket külön mérésből kell meghatározni. Mivel jó közelítéssel az amúgy vízoldhatatlan DMPC teljes mértékben bicella formában van jelen, így $D_{\text{bicella}} = D_{\text{DMPC}}$ és x_{szabad} mennyisége meghatározható. A teljes DHPC koncentráció a bemért értékből származik, így az 5.5.4. egyenletből kiszámolható a szabad DHPC koncentráció. Ezt az információt többféleképpen is felhasználhatjuk: (i) a cmc ismeretében megállapítható van-e micella is az oldatban, illetve annak mennyisége mekkora - itt a koncentráció az N_{agg} ismeretében számolható; (ii) meghatározható a pontos q értéke, amit általában irodalomban csak a bemért, elméletileg elvárt lipidkoncentrációk arányából számolnak, ám ami félrevezető lehet, és elsősorban a SAXS szórásgörbék értékelésénél van fontos szerepe.

5.5.4. táblázat. PC és PC/PG bicellák jellemzése peptidek jelenlétében. A különböző hőmérsékleteken, szabad DHPC koncentrációból kiszámított pontos q_{eff} arány, a mért translációs diffúziós együttható és gömbszimmetrikus feltételezéssel számolt hidrodinamikai sugár értékei. * jelöli az eseteket, ahol $c^{\text{DHPC}} > cmc$.

| Bicella | Peptid | T (K) | c^{DHPC} (mM) | q_{eff} | D ($10^{-11}\text{m}^2 \text{s}^{-1}$) | r_H (Å) |
|---------|-----------------|------------|---------------------------|------------------|---|----------------|
| - | | | 11,1 | 0,562 | $5,46 \pm 0,02$ | $42,2 \pm 0,2$ |
| | KALP23 (1 mM) | | 11,3 | 0,564 | $5,03 \pm 0,03$ | $45,9 \pm 0,2$ |
| | KALP23 (2 mM) | 298 | 14,8 | 0,587 | $4,44 \pm 0,03$ | $51,9 \pm 0,2$ |
| | melittin (1 mM) | | 11,8 | 0,567 | $5,52 \pm 0,01$ | $41,8 \pm 0,1$ |
| | melittin (2 mM) | | 14,3 | 0,583 | $5,61 \pm 0,02$ | $41,1 \pm 0,2$ |
| PC | - | | 11,3* | 0,564 | $7,26 \pm 0,02$ | $46,1 \pm 0,1$ |
| | KALP23 (1 mM) | | 11,8* | 0,567 | $6,08 \pm 0,07$ | $55,1 \pm 0,6$ |
| | KALP23 (2 mM) | 310 | 14,6* | 0,585 | $5,26 \pm 0,02$ | $63,7 \pm 0,3$ |
| | melittin (1 mM) | | 12,0* | 0,568 | $6,88 \pm 0,01$ | $48,7 \pm 0,1$ |
| | melittin (2 mM) | | 14,3* | 0,583 | $6,74 \pm 0,01$ | $49,7 \pm 0,1$ |

| | | | | | |
|-----------------|-----|-------|-------|-------------|------------|
| - | | 10,0 | 0,556 | 5,35 ± 0,03 | 43,1 ± 0,3 |
| KALP23 (1 mM) | 298 | 10,7 | 0,560 | 4,74 ± 0,02 | 48,6 ± 0,1 |
| melittin (1 mM) | | 11,1 | 0,562 | 4,95 ± 0,01 | 46,6 ± 0,1 |
| PC/PG | | | | | |
| - | | 8,9 | 0,549 | 8,16 ± 0,40 | 41,1 ± 2,7 |
| KALP23 (1 mM) | 310 | 10,9* | 0,561 | 6,13 ± 0,08 | 54,6 ± 0,1 |
| melittin (1 mM) | | 11,4* | 0,564 | 5,91 ± 0,05 | 56,7 ± 0,2 |

Az vizsgált bicella és peptid-bicella oldatokra kapott értékek az 5.5.4. táblázatban találhatóak. Az adatokból kitűnik, hogy 298 K hőmérsékleten minden esetben a szabad DHPC koncentráció a *cmc* érték alatt van, tehát az oldatban nincs micella. 310 K-en viszont minden esetben nagyobb értéket kapunk, amiből a visszszámolt micella koncentráció < 0,2 mM. A peptidok jelenléte – topológiától és hőmérséklettől függetlenül – a szabad DHPC mennyiségének növekedését vonja maga után, ami azt jelenti, hogy a kölcsönhatás következtében valamennyi DHPC felszabadul a bicellából.

Hasonlóképpen a micellánál tárgyalt esetben, a meghatározott translációs diffúziós együtthatók felhasználásával (5.5.4. táblázat) a bicellára is megpróbálkoztam aggregációs számokat becsülni a korábbi *D* – *M* empirikus összefüggések alapján. Az általam kiszámolt minimum értékek: $N_{\text{agg}}^{\text{DHPC}} = 30$, $N_{\text{agg}}^{\text{DMPC}} = 15$, ami a SAXS módszerből származtatott adatokkal van jó egyezésben (Mortensen 2018), és az is teljesen egyértelmű, hogy az irodalmi 300, illetve 164 nagyságrendű értékek irreálisak (Lee 2008).

Ami a peptidok hatását illeti, a származtatott hidrodinamikai sugár értékek arra utalnak, hogy a transzmembrán KALP23 fokozatos hozzáadása a PC és a PC/PG bicella méretnövekedésével jár együtt. Így 2mM peptid PC bicellával való kölcsönhatása esetén 298K-en 6 Å-el, 310K-en pedig 9 Å-el nagyobb az üres bicellához képest mért hidrodinamikai sugár. Ezzel szemben a melittin esetében szignifikáns növekedés nem tapasztalható. Viszont az NMR adatokból arra nem lehet következtetni, hogy ez a növekedés a rendszer alakjával milyen összefüggésben van, így más módszerekhez kell folyamodni.

SAXS szórásgöréből származtatott alak információ. A peptid bicella alakjára gyakorolt hatása első elgondolás szerint az alakfaktor meghatározása alapján lehetséges. Ehhez megbízható girációs sugár értékre van szükség, amit az NMR mérésekhez használt minta ugyanazon körülmények között felvett SAXS szórásgörbéjének az elemzéséből próbáltunk meghatározni. Az 5.5.6A ábrán láthatók bicellára felvett jellegzetes szórásgörbék, ahol *q* a távolság reciproka és nem összetévesztendő a bicellára jellemző *q* lipid aránnyal. A széles körben használt r_G meghatározás a szórásgörbe kezdeti szakaszának, az ún. Guinier régiónak az illesztésén alapul:

$$I(q \approx 0) \approx I_0 \exp\left(-\frac{q^2 r_G^2}{3}\right) \quad (5.5.5.)$$

ahol I_0 a zérus szögnek megfelelő intenzitás. Az r_G meghatározásának a hibája nagymértékben függ a görbe ezen szakaszának alakjától, amit számos tényező befolyásol, többek között a részecskék közötti kölcsönhatások, és az elektronsűrűségek. Bicellák esetében a szóró részecske elektronsűrűsége változik, és az is előfordulhat, hogy r_G imaginárius szám lesz, ami értelmezhetetlen. Mindenezen tényezők elemzéséből kiviláglik, hogy bicellák esetében nincs értelme az ily módon történő girációs sugár meghatározásnak (ennek ellenére ezt az irodalomban gyakran megteszik).

A bicella szórásgörbéjének egy másik jellemzője a q 1-2 nm⁻¹ tartományban található maximum (q_{\max} , lásd 5.5.6A ábra). Ez az érték a lipid fejcsoportok közötti L távolsággal korreláltható, ami az $L = 2\pi / q_{\max}$ összefüggés alapján számolható. DMPC bicella esetében az elméleti távolság: 2x(DMPC alkil láncok hossza) + 1xfejcsoport hossza, ami 2x17,9 + 9 = 44,8 Å (Caldwell 2018). Méréseink során az üres bicellára kapott érték 43,5Å, ez jó egyezésben van az elvárt adattal. A peptid – elsősorban a transzmembrán KALP23 - jelenlétében a q_{\max} nő, azaz L csökken, ami a bicella morfológiai változásaira enged következtetni. Ennek ellenére ez a megközelítés sem teljesen problémamentes a szórásgörbe bizonytalanságai és a különféle bicellák összevethetősége miatt.

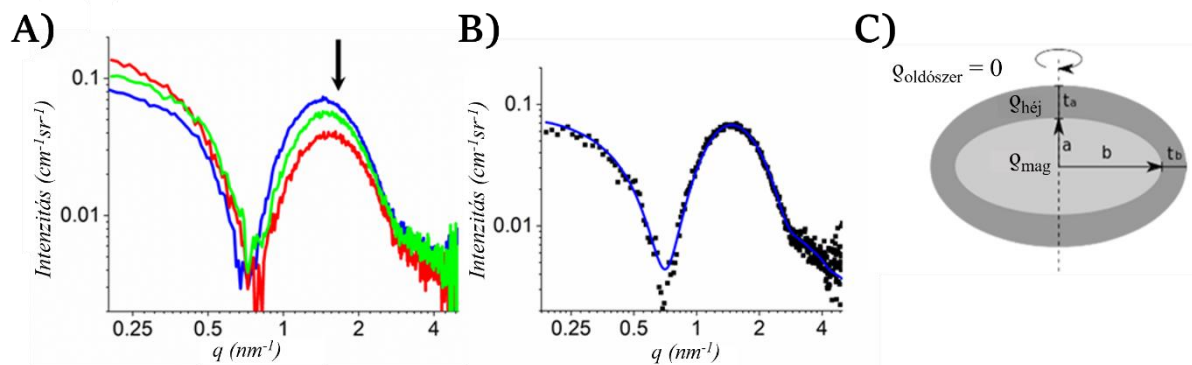
A megoldást az jelenti, hogy meghatározott elektron eloszlással rendelkező, matematikailag leírható alakmodellt illesztünk a szórásgörbére. Mivel jó megközelítéssel feltételezhető, hogy a bicellák elipszoid alakúak és a külső részen elhelyezkedő fejcsoportok, illetve a belső részt alkotó alkil láncok két különböző elektronsűrűséggel jellemezhetők ($\rho_{\text{héj}}$, ρ_{mag}) így a legegyszerűbb leírásnak az elipszoid mag-héj modell ígérkezik (5.5.6C ábra). Mivel *a priori* nem ismerjük a peptidok pontos elhelyezkedését, ezek szórásával nem számolunk. Ez az egyszerű modell, melyet Lipfert és munkatársai vezettek be (Lipfert 2007) egy effektív méret és alakjellemezésre ad lehetőséget, ami a peptid hatásának leírásához jelenlegi esetben kielégítő eredményre vezet. Az illesztés során az 5.5.6C ábrán látható a , t_a , b , t_b értékek is meghatározhatók, amik a megfelelő fél-tengelyek hosszát adják meg, és amelyek segítségével a Stokes-Einstein összefüggésben szereplő F korrekciós faktorok közül az f -el jelölt bicellák alakját leíró ún. Perrin faktor is kiszámolható:

$$f = \frac{\sqrt{x^2-1}}{\sqrt[3]{x^2 + \tan^{-1}\sqrt{x^2-1}}} \quad (5.5.6.)$$

ahol x a hosszú, illetve rövid tengelyek arányát jelöli. $q < 1$ lipid aránnyal jellemzett bicellák esetében az $f=1$ megközelítést alkalmazzák, viszont eddig ennek kísérleti bizonyítéka nincsen.

A választott modell alapján számolt szórásgörbe jó egyezést mutat a kísérletileg meghatározott szórásgörbével, amit az 5.5.6B ábra is szemléltet. Sikeresen meghatározhatók a tengelyek értékei, és ezekből az f Perrin faktorokat is ki lehet számítani, az eredményeket az 5.5.5. táblázatban foglaltam össze. Minden esetben az $(a+t_a) < (b+t_b)$ feltétel teljesül, tehát mind az üres, mind a vizsgált peptid-bicella rendszerek oblat alakúak. A kettős réteg vastagságát a $2(a+t_a)$ érték adja meg, ami 50-52 Å tartományba esik, igen jó egyezésben a DMPC kettős réteg vastagságára megadott 53,8 Å értékkel (Van Dam 2004).

Mindezek alapján arra következtethetünk, hogy a mag-héj modell alkalmazható a vizsgált bicella rendszereinkre.



5.5.6. ábra. A) Jellemző SAXS szórásgörbe alakulása üres $q=0,5$ PC bicella (kék), 2mM KALP23 és PC bicella (piros), 2mM melittin és PC bicella (zöld) oldatok esetében. B) $q=0,5$ PC bicella 310K-en mérés során kapott SAXS szórásgörbe (fekete pontok) és a mag-héj modell alapján illesztett szórásgörbe (kék folytonos vonal). C) Az elipszoid mag-héj modell: ha $a < b$ oblát, $a > b$ esetben pedig prolát elipszoidról beszélünk.

5.5.5. táblázat. A SAXS szórásgörbe illesztése az eliptikus mag-héj modell alapján $q=0,5$ PC és PC/PG bicellákra. A különböző peptidok és a hőmérséklet hatása a tengelyek hosszára, és a számolt f Perrin faktorok értékei.

| Bicella | Peptid | T (K) | a (Å) | b (Å) | ta (Å) | tb (Å) | f |
|---------|-----------------|-------|----------------|----------------|----------------|---------------|------|
| | - | | $12,0 \pm 0,1$ | $36,7 \pm 0,3$ | $14,3 \pm 0,2$ | $3,0 \pm 0,1$ | 1,01 |
| | KALP23 (1 mM) | | $11,9 \pm 0,1$ | $43,7 \pm 0,7$ | $13,4 \pm 0,2$ | $1,6 \pm 0,2$ | 1,03 |
| | KALP23 (2 mM) | 298 | $11,9 \pm 0,2$ | $48,4 \pm 2,0$ | $12,5 \pm 0,4$ | $1,0 \pm 0,5$ | 1,04 |
| | Melittin (1 mM) | | $11,9 \pm 0,1$ | $38,4 \pm 0,4$ | $14,4 \pm 0,2$ | $2,2 \pm 0,1$ | 1,02 |
| | Melittin (2 mM) | | $11,6 \pm 0,2$ | $39,2 \pm 0,7$ | $14,7 \pm 0,4$ | $1,7 \pm 0,2$ | 1,02 |
| PC | - | | $12,3 \pm 0,2$ | $35,6 \pm 0,6$ | $13,1 \pm 0,3$ | $2,8 \pm 0,2$ | 1,02 |
| | KALP23 (1 mM) | | | | - | | |
| | KALP23 (2 mM) | 310 | $11,9 \pm 0,2$ | $43,4 \pm 1,5$ | $11,5 \pm 0,4$ | $2,1 \pm 0,4$ | 1,04 |
| | Melittin (1 mM) | | $12,3 \pm 0,2$ | $37,7 \pm 0,8$ | $12,8 \pm 0,4$ | $2,1 \pm 0,3$ | 1,02 |
| | Melittin (2 mM) | | $12,4 \pm 0,2$ | $39,9 \pm 0,8$ | $12,3 \pm 0,3$ | $1,3 \pm 0,2$ | 1,02 |
| | - | | $11,9 \pm 0,1$ | $36,1 \pm 0,4$ | $14,6 \pm 0,3$ | $2,9 \pm 0,2$ | 1,01 |
| | KALP23 (1 mM) | 298 | $12,2 \pm 0,2$ | $45,7 \pm 1,0$ | $12,5 \pm 0,3$ | $1,0 \pm 0,2$ | 1,04 |
| | Melittin (1 mM) | | $12,5 \pm 0,1$ | $39,0 \pm 0,6$ | $12,8 \pm 0,3$ | $1,8 \pm 0,2$ | 1,02 |
| PC/PG | - | | $12,5 \pm 0,1$ | $35,9 \pm 0,5$ | $12,7 \pm 0,3$ | $2,2 \pm 0,2$ | 1,02 |
| | KALP23 (1 mM) | 310 | $12,5 \pm 0,2$ | $44,1 \pm 1,3$ | $11,4 \pm 0,3$ | $1,3 \pm 0,3$ | 1,04 |
| | Melittin (1 mM) | | $12,8 \pm 0,1$ | $36,2 \pm 0,3$ | $11,5 \pm 0,1$ | $1,6 \pm 0,1$ | 1,02 |

Az 5.5.5. táblázatban a kiszámolt f Perrin faktorok értékei az 1,01-1,04 tartományba esnek. Chou és munkatársai $q=0,5$ bicellák esetére 1,00 körüli adatot adnak meg, Liebau és

munkatársai 1,04-1,22 értékeket használnak (Chou 2004, Liebau 2017). Adataink teljes összhangban vannak ezekkel az irodalmi következtetésekkel, ezen felül mi ezeket kísérleti úton határoztuk meg.

A KALP23 peptid jelenléte a (b+t_b) tengely hosszabbodásával jár PC és PC/PG bicellák esetében egyaránt: 2mM KALP23 298K-en a PC bicella (b+t_b) tengelyének ~10Å hosszú növekedését, míg 310K-en ~10Å-el nagyobb növekedését vonja maga után. A melittinre ilyen jellegzetes növekedés nem tapasztalható. Az eredmények összhangban vannak az NMR mérésekből levont következtetésekkel, megállapítható tehát, hogy PC bicellák esetében a transzmembrán peptidek az oblat alakú rendszer hosszabb tengelyének növekedését okozzák, ami a peptid bicellába való beékelődésére utal. A felületaktív peptidek esetében ez a hatás nem detektálható, vagy nagyon kicsi. Negatív töltésű PC/PG bicellák esetében különös figyelmet kell fordítani a töltések nagyságára, és a peptidlánc mentén történő eloszlására is, hiszen ez nagyban befolyásolja az eredményeket.

Végezetül elmondható, hogy a két technika (NMR és SAXS) ötvözése valóban alkalmas bicella rendszerek méret- és alak-meghatározásának leírására, ugyan nem az alakfaktoron keresztül, ahogy azt eredetileg elképzeltem. Megmutattam, hogy egyszerű translációs diffúziós NMR mérések nagymértékben járulnak hozzá az oldat összetevőinek kvalitatív és kvantitatív leírásához, a SAXS görbe leírására adott mag-héj modell alkalmazhatóságát bizonyítottuk és bicellák esetében kísérletileg is meghatároztuk a Perrin faktorokat,

Az elért biztató eredmények valós rendszereken való tesztelését követően a membránmimetikum- fehérje kölcsönhatások biofizikai leírása pontosabban történhet, ugyanakkor jobb modellrendszerek tervezhetők a funkcionális vizsgálatokhoz.

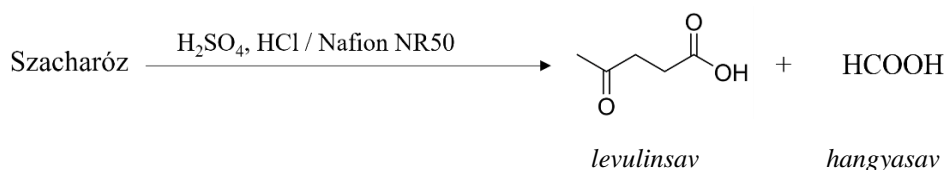
5.6. „Zöld kémiai” és ipari folyamatok követése, jellemzése

Kismolekulák NMR spektroszkópiai vizsgálata rutinszerűen történik. A következőkben ezen a területen végzett néhány, a mindennapi gyakorlatban nem használt, nagynyomású, illetve alacsony hőmérsékleten végzett kísérlet alkalmazását mutatom be. A 10mm átmérőjű zafír NMR csövek használata teszi lehetővé a nagynyomású mérések kivitelezését, vizsgálataimban a hidrogénezési, karbonilezési folyamatok követésére használtam ezt a megoldást. Kontrollált körülmények között N₂ hűtéssel biztosított 240-260 K hőmérsékleteken szerves reakciók intermedierei, katalizátor komplexek detektálhatóak, és az azonosítást követően mechanizmus útvonalakra lehet javaslatot tenni. A vizsgálatok zöld kémiai kutatások és ipari alkalmazások területéről valók és az említett megközelítéseket sikerrel alkalmaztam többek között biomassza átalakítását célzó kutatásokban (Mehdi 2008), az 1,3-butadién kobalt-katalizált hidrometoxikarbonilezésénél (Tuba 2003), izocianátok foszfin-katalizált ciklo oligomerizációjában (Pusztai 2005), aldehidek arany katalizátorok jelenlétében történő hidroszililezésénél (Lantos 2007). Klasszikus NMR vizsgálatokat végeztem ionos folyadékokban történő reakciók (Fábos 2008, Mehdi 2007), fluoros vegyületek (Bálint 2005, Csapó 2012, Nemes 2010, Szabó 2006), polimerek (Kali 2007, Kali 2013, Kasza 2018) és szerves szintézisek (Csihony 2002, Kiss K 2012) átfogó jellemzésére.

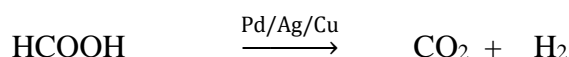
5.6.1. A biomassa átalakítása

A 10 évvel korábban végzett kutatás akkor is aktualitásnak örvendett, viszont napjaink váratlanul alakuló gazdasági/politikai helyzete a fosszilis üzemanyagokhoz való hozzáférés korlátozását és ezek egyre emelkedő árát eredményezi, így más ígéretes lehetőségek után kell nézni. Egy ilyen megoldás lehet a biomassa többlépcsős átalakítása. Alap kutatásainkban a szacharóz homogén és heterogén katalitikus folyamatok során történő átalakításának lehetőségeit vizsgáltuk, én ezen folyamatokban keletkező termékek NMR spektroszkópiai jellemzését végeztem, légköri, illetve nagynyomású mérésekkel.

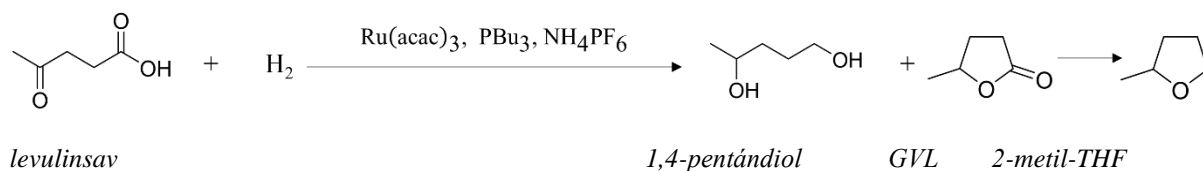
A szacharóz dehidratációja savak (H_2SO_4 , HCl) vagy NafionR50 katalizátorok jelenlétében, nagynyomású N_2 atmoszférában, 8-40h alatt 140°C -on, 35-50%-os konverzióval megy végbe:



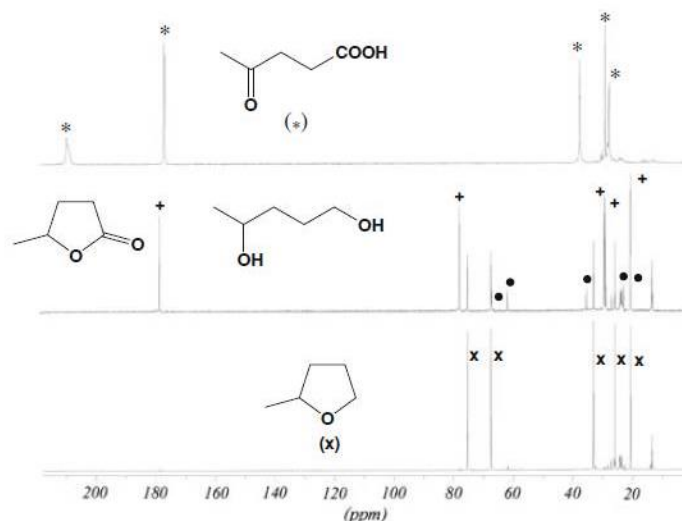
Mindkét termék vonzó tulajdonságokkal rendelkezik, a hangyasav katalitikus bomlása széndioxidot és hidrogént eredményez, és az így előállított hidrogén felhasználható lehet a levulinsav γ -valerolaktonná (GVL) történő átalakításában:



A levulinsav tovább alakítható újabb molekulákká. Katalitikus hidrogénezése 1200 psi nyomáson és 200°C -on előbb GVL és 1,4-pentándiol elegyét, a reakció végén pedig kvantitatívan 2-metil-THF-et eredményez. A reakciót nagynyomású NMR mérésekkel követtem, a $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ spektrumokból a termékek egyértelműen azonosíthatók:

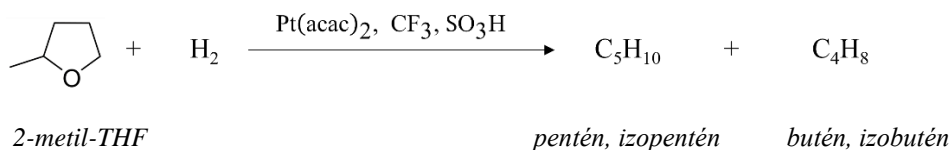


Sikerült tehát igazolni, hogy a levulinsav 100%-os konverziójával az ígéretes zöld üzemanyagnak számító GVL képződik. A GVL kedvező fizikai és kémiai tulajdonságai lehetővé teszik, hogy fenntartható folyadékként tárolják, szállítsák és energia és/vagy szénalapú termékek termelésére használják.



5.6.1. ábra: A levulinsav hidrogénezésének $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ spektrumokkal történő monitorizálása 60,5 MHz-en, nagynyomású NMR cső használatával. Levulinsav (*) 1,200 psi H_2 jelenlétében szobahőmérsékleten; a reakcióelegy 22 órán át 200°C-on történő melegítését követően GVL (+) és 1,4-pentándiol (●) képződik; 46h után 2-metil-THF(x) a végtermék.

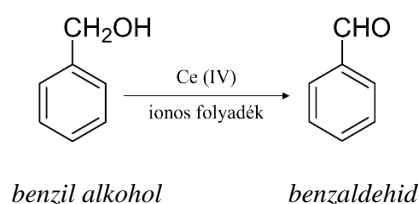
Végül annak jártam utána, vajon a 2-metil-THF tovább alakítható-e? Molekuláris hidrogénnel, 150°C-on és 1200 psi nyomáson történő hidrogénezés alkének keverékét (pentén, izopentén, butén, izobutén) eredményezte:



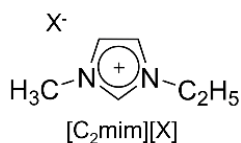
A bemutatott kísérletsor igazolja, hogy szacharóz modellrendszert alkalmazva homogén és heterogén katalitikus reakciók megfelelő kombinációjával sikerült egyre kevesebb oxigént tartalmazó C_5 -oxigenátokat (levulinsav, GVL, 1,4-butándiol, 2-metil-THF) és végül alkének keverékét előállítani, NMR és IR mérésekkel igazolni a termékeket. Így bizonyítható, hogy a biomassza átalakítása lehetséges, gazdasági szempontból pedig elsősorban a GVL biomasszából történő előállítása jelenthet mérföldkövet.

5.6.2. Reakciók ionos folyadékokban, a Ce(IV) oxidáció

Az ionos folyadékok jó választásnak bizonyulhatnak „zöldebb” oldószerekként való alkalmazásban, ám arról mindenképp meg kell győződni, vajon az adott szerves kémiai átalakulás hasonlóképpen játszódik-e le ilyen körülmények mellett is? A benzil alkohol Ce (IV) mediált benzaldehiddé történő homogén közegben végbemenő oxidációját vizsgáltuk és imidazólium ionos folyadékokat teszteltünk:



Első lépésként cérium (IV) sók ionos közegben való oldhatóságának kellett utánajárni. Azt találtuk, hogy a triflát aniont tartalmazó ionos folyadékok, azok közül is az 1-etil-3-metilimidazólium-trifluorometánszulfonát [C₂mim][TfO] a legjobb választás:



A reakciót (NH₄)₂(Ce(NO₃)₆) ammónium hexanitráto cerát (IV) (CAN) só alkalmazása mellett GC és NMR mérésekkel követtük. A folyamat során adott körülmények között egy barna gáz képződött, ez a NO₂ kialakulásának köszönhető. Ugyan ezt

irodalomban korábban még nem jelezték, de a jelenség nem meglepő, ha belegondolunk a lejátszódó redox folyamatra, melynek eredményeképpen salétromsav képződik:

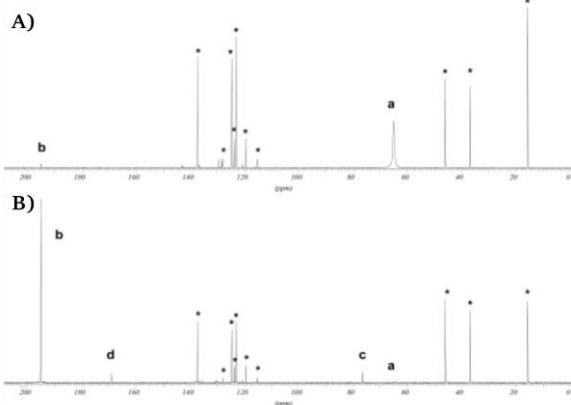


Amennyiben a reakció vizes közegben megy végbe ez a közeg savasságának a növelésével jár. Ha száraz ionos folyadék a közeg, akkor a vízmentes salétromsav magas hőmérsékleten (esetemben 100°C-on) elbomlik és barna NO₂ gázt eredményez:



A NO₂ képződése nagymértékben függ az alkalmazott CAN mennyiségétől. Így 1mmol CAN és 2mmol ionos folyadék 150°C-on, N₂ atmoszférában történő elegyítésénél detektálható, ám 0,25mmol CAN és 2,5 mmol ionos folyadék alkalmazása esetében 6 órán át 150°C-on, N₂ atmoszférában történő melegítése során a barna gáz képződése nem tapasztalható.

Ezen fontos megállapítást követően a reakciót 100°C-on, N₂ atmoszférában történő végbemenetelét szobahőmérsékletű NMR felvételekkel követtem. A képződő termékek

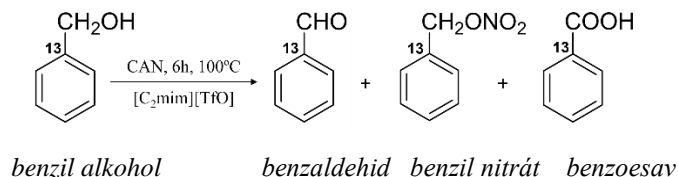


5.6.2. ábra: Ph¹³CH₂OH oxidációja CAN jelenlétében. A 75,47 MHz-en készült ¹³C{¹H} spektrumok A) 5 perc, illetve B) 6 h reakcióidőt követően. Az elegy összetételének azonosítása: a) benzil alkohol, b) benzaldehid, c) benzil nitrát, d) benzoesav. A [C₂mim][TfO] ionos folyadék jeleit *-al jelöltem.

azonosítására szelektíven izotóp jelölt Ph¹³CH₂OH benzil alkoholt használtam. Ennek két oka is volt: egyfelől nem zavarnak az ionos folyadék oldószer jelei, másfelől ezen környezet jelölésén keresztül a reakció útvonala is monitorizálható (Csihony 2002). Megjegyezném, hogy a 75,47 MHz-en (300 MHz-es készülék) futtatott mérésekhez az NMR minták nem tartalmaztak semmilyen deuterált oldószert, még belső standardként sem, a felvételek lock nélküli üzemmódban készültek. A benzil alkohol hozzáadását követően 5 perccel készült felvételen a benzaldehid 195ppm-nél található jele már

detektálható (5.6.2A ábra), egyéb intermedier nem jelenik meg a spektrumban. A benzil alkohol széles rezonanciajelének magyarázata a szabad és CAN-koordinált állapotok közötti csere folyamat létrejötte lehet. 6h elteltével a benzil alkohol már csak nyomokban van jelen, a

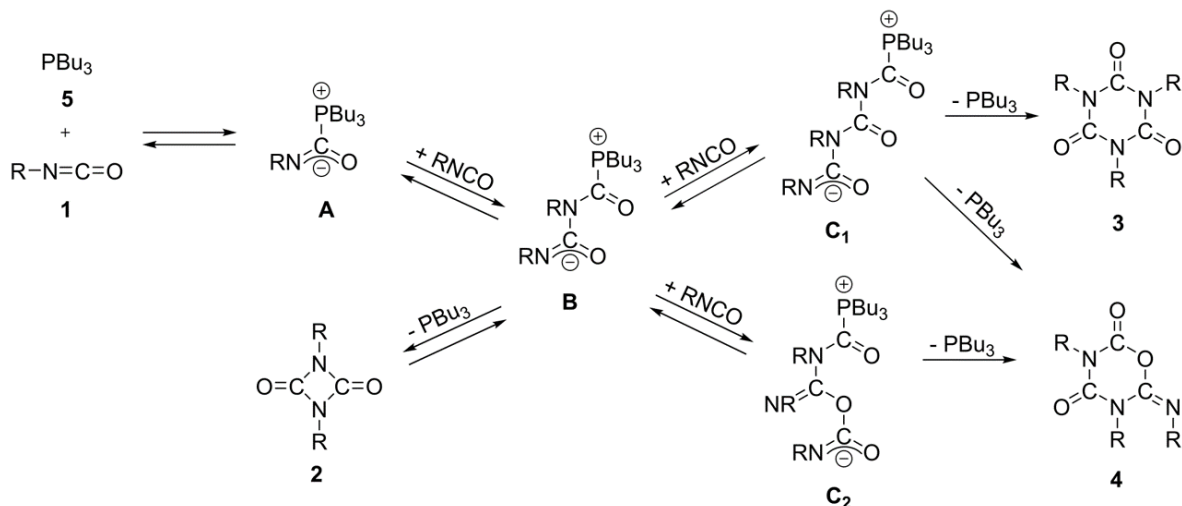
fő termék a benzaldehid, de kis mennyiségben (5.6.2B ábra) benzil nitrát és benzoesav is képződik:



Az NMR méréseim eredményeit a párhuzamos FTIR mérések eredményei is alátámasztották, így a modellreakció vizsgálata több kérdésre is választ adott: (i) sikerült igazolni, hogy a benzil alkohol CAN-mediált oxidációja száraz $[\text{C}_2\text{mim}][\text{TfO}]$ ionos folyadékban lejátszódik, (ii) magas hőmérsékleten előnyös a reakció futtatása, hiszen a melléktermékek kialakulása elhanyagolható és (iii) a reakció során képződő NO_2 gáz mennyisége nagymértékben befolyásolható a CAN/ionos folyadék arány beállításával.

5.6.3. Alkil-izocianát ciklooligomerizációjának mechanizmusa

A poliuretánok széles körben alkalmazott műanyagok és felépítésükben aromás, vagy alifás izocianátok vesznek részt. Az alifás oligomer építőelemek a megfelelő monomer katalitikus ciklooligomerizációjával állíthatók elő. A legfontosabb képviselők ezek közül az uretdionok (2), izocianurátok (3) és iminooxidiazindionok (4). Kutatásaink arra irányultak, hogy a tri-n-butilfoszfin (5) katalizátor jelenlétében lejátszódó reakciók útvonalára rávilágítsunk.

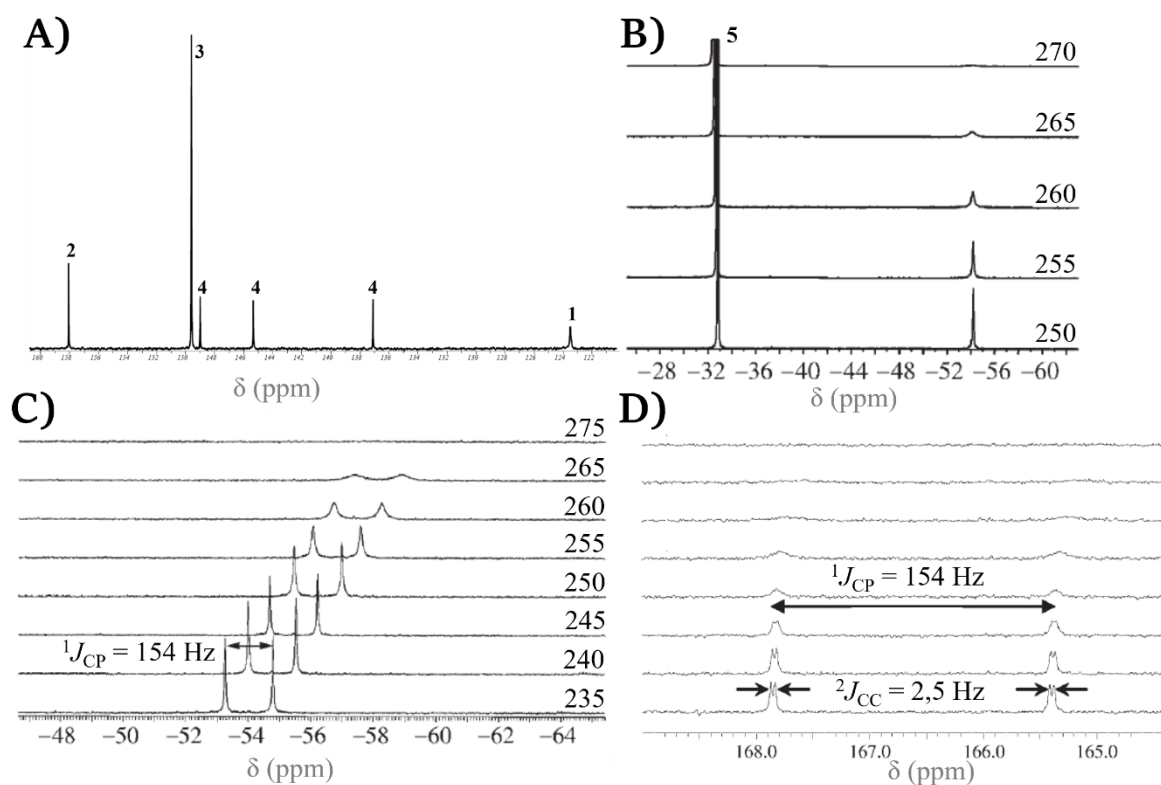


5.6.3. ábra. A foszfin katalizált izocianát reakció lehetséges mechanizmusa. Számok jelölik a kiindulási vegyületeket, és a termékeket, betűk jelölik a lehetséges intermediereket.

A javasolt mechanizmus az 5.6.3 ábrán látható: a reakció a foszfinnak az izocianát (1) karbonil csoportjára történő nukleofil támadásával indul, melynek eredménye egy zwitterionos **A** intermedier. Következő lépésben **A** egy újabb izocianáttal való reakció során a hosszabb láncú zwitterionos **B** intermediert eredményezi. A **B** intermedier kétféleképpen viselkedhet. Az $\text{O}(\text{RN})^-$ ion intramolekuláris nukleofil támadása ciklizációt és a **2** uretdion képződését eredményezi, a katalizátor pedig felszabadul. A másik út, hogy egy további izocianáttal reagál,

és a most már három monomerből álló zwitterionos intermedier két módon jöhet létre: **C**₁ és/vagy **C**₂ képződhet. Végül az ⁻O(RN) ion intramolekuláris nukleofil támadása a ciklikus **3** és **4** vegyületeket eredményezni. A javasolt útvonalak megállapítására *in situ* NMR méréseket végeztem, az eredményeket és következtetéseket pedig *in situ* IR vizsgálatok egészítették ki/támasztották alá.

Munkám során két R-N=C=O **1** alkil-izocianát viselkedését tanulmányoztam, R: n-butil illetve n-hexil láncok esetét. A kapott eredményekben nem volt eltérés, ami arra utal, hogy a lánchossz nem befolyásolja a reakció alakulását. Szobahőmérsékleten **1** és **5** reakciójának időbeli monitorizálása azt mutatja, hogy előbb a **2** vegyület képződik, majd a **3** és **4** vegyületekre jellemző jelek is megjelennek. A **2** uretdion koncentrációjának időbeli változása egy maximumot mutat. A végső egyensúlyi összetétel a **2:3:4** = 0,2:2:1 aránynál áll be, azaz leginkább az izocianurát képződése favorizált (5.6.4A ábra).



5.6.4. ábra. A) 3,43 mmol n-HexNCO (**1**) 0,18 mmol PBU₃ jelenlétében történő ciklooligomerizációjának eredménye a ¹³C{¹H} spektrum -N=C=O tartományának tükrében 298 K-en, 1 hét elteltével, 250 MHz készüléken. B) Ugyanezen összetételű friss minta hőmérsékletfüggő ³¹P{¹H} spektrumai, a K-ben megadott hőmérséklet a spektrumok jobb oldalán van feltüntetve. C) A B) mérés ismétlése a karbonilon történő szelektív izotópjelölésű [¹³C] n-hexil izocianát használatával és D) hőmérsékletfüggő ¹³C{¹H} spektrumokkal is monitorizálva.

Ezt követően azt vizsgáltam, vajon **2** és **5** között lejátszódik-e reakció, és azt tapasztaltam, hogy **1**, **3** és **4** képződik, azaz a ciklodimer képződése reverzibilis folyamat. Másfelől sem **3**, sem **4** nem reagál a katalizátorral, a felvett spektrumok időben állandóak, ami azt jelenti, hogy ezen gyűrűk felnyílása nem történik meg, mint ahogy az egymásba való átalakulás sem.

Következő lépésben a lehetséges **A**, **B**, **C** intermedierek jelenlétére próbáltam rávilágítani. Szerkezetüket tekintve ennek legjobb módja a reakció ^{31}P mérésekkel történő vizsgálata. A szobahőmérsékletű spektrum csak a katalizátor jelét mutatja, ezért alacsonyabb hőmérsékleteken próbálkoztam a spektrum elemzésével. Amint azt az 5.6.4B ábra is mutatja, 270 K-en is csak a szabad foszfin keskeny szingulett jele detektálható -32,9 ppm eltolódásnál. A reakcióelegy további lehűtése 265 K-en már -54,0 ppm értéknél egy új, széles, kis intenzitású jel detektálását eredményezi. Fokozatos hűtés során az új jel keskenyedik, 250 K-ig követtem ennek alakulását. Sikerült tehát egy feltehetően intermedier vegyület jelét megtalálni, viszont ezen adatok birtokában nem eldönthető, hogy ez **A**, **B**, vagy **C**₁/**C**₂ szerkezetekhez rendelhető. A megoldást az izocianát -N=C=O csoport szelektív ^{13}C izotópjelölt alkalmazása nyújtja. Ilyen körülmények mellett 265 K-en a $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ spektrumban a várt -54,0 ppm középeltolódással egy széles dublett jelenik meg, ami további 235 K-re történő hűtés során a jelek keskenyedését vonja maga után (5.6.4C ábra). A dublett az egy-kötéses P-C csatolás eredménye, ahol a csatolási állandó értéke $^1J_{\text{PC}} = 154$ Hz, azaz a kis jel valóban intermedier. A pontos szerkezetet a $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ spektrumban látható csatolási séma fogja megadni (5.6.4D ábra). A $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ spektrumok hőmérsékletfüggése 260 K-en szintén kis intenzitású, $^1J_{\text{PC}} = 154$ Hz csatolási állandóval jellemezhető dublett megjelenését mutatja. A további hűtés hatására a dublett jelek további felhasadást mutatnak, ami két-kötéses C-C csatolás meglétére utal, az érték pedig $^2J_{\text{CC}} = 2,5$ Hz. A spektrumok finomszerkezete tehát a **B** intermedier jelenlétét igazolja.

Sikerült tehát az izocianátok foszfin katalizált ciklooligomerizációjának molekuláris szintű jellemzését megadni. Általánosságban elmondható, hogy a hőmérsékletfüggő NMR mérések és a szelektív izotópjelölés együttes alkalmazása az a módszer, ami egy organokatalitikus ipari folyamat reakciómechanizmusának igazolását és a kialakult intermedier azonosítását eredményezi. Tágabb értelemben ilyen információk birtokában lehet új katalizátorok tervezésébe fogni, ami a reakció finomhangolását és egy adott termék irányába történő eltolást eredményezheti.

6. Összefoglalás és kitekintés

A külön-külön megfogalmazott célok elérése sikeresnek bizonyult. Az eredmények között egyaránt szerepelnek általános érvényű következtetések és rendszer specifikus információk is. Átfogó értékelésüket a bevezető részben megadott csoportosítás szerint taglalom.

1. Globális paraméterek alkalmazhatósága

1.1. Szisztematikusan elvégzett translációs diffúziós mérésekkel, megfelelően megválasztott, jól jellemzett globuláris és rendezetlen fehérjéket felhasználva empirikus D - M és r_H - N összefüggéseket állítottam fel (Dudás 2019). Megállapítottam, hogy a globuláris fehérjék viselkedése a gömbszimmetrikus alakú molekulák viselkedéséhez közeli, a rendezetlen fehérjék pedig a szintetikus polimerekhez hasonlóan viselkednek. A linearizált $\lg D - \lg M$ összefüggések bioanalitikai célokra, feltekeredés és aggregáció vizsgálatokban használhatóak. Igazoltam továbbá, hogy tipikus biomolekulás körülmények mellett a Stokes-Einstein egyenlet alkalmazható. A publikációra érkezett hivatkozásokból kitűnik, hogy az összefüggéseket széles körben használták fel: polimerek, kismolekulák, élelmiszerek, aggregáció és qNMR vizsgálatokban. Az elvégzett munka hagyott nyitott kérdéseket, melyekre azóta is folyó kutatásokban válaszokat kerestünk/keresünk. A közölt empirikus összefüggéseket 288 K-en állítottam fel, és felmerül a kérdés, vajon más hőmérsékleten ezek mennyire érvényesek? Kimutattuk, hogy megfelelő korrekciókkal (hőmérséklet, viszkozitás) az összefüggések 298 K-en is érvényesek, de a más körülményekre való átvitelnek a lehetőségét is taglaltuk. Utánajártunk, hogy az egyenletek letekeredés tanulmányokban alkalmazhatóak-e. 8M karbamid és DMSO kaotróp közegekben különféle modell fehérjék esetében mutattuk ki az alkalmazhatóságot. Gyógyszeripari felhasználások tekintetében a hatóanyag – fehérje kölcsönhatások DMSO/víz elegyekben történő tanulmányozására a globális és lokális paraméterek változását elemeztük. Az elért eredményeket jelen dolgozat benyújtásakor fogadták el (Szabó 2022).

1.2. A translációs diffúziós együtthatóból levonható következtetések több biológiai rendszer esetében is értékes információt szolgáltatottak. Sikeresen alkalmaztam az S100A4 homodimer fehérje Ca^{2+} ion hatására történő alakváltozásának és rendezetlen farokrégiójának a fehérje kompaktságára való hatásának vizsgálatában (Duelli 2014). Továbbá a miozin coiled-coil letekeredésében, a filamentumok foszforiláció okozta szétesésében; micellák kritikus micella képződési koncentrációjának meghatározásában; bicella rendszerek oldatbeli összetételének jellemzésére és aggregációs számok megadásában (Dudás 2020b).

2. Új pulzus szekvenciák bevezetése

2.1 Elsősorban az IDP/IDR rendszerek atomi szintű vizsgálatára kidolgoztam és bevezettem a szelektív $\text{H}\alpha$ - $\text{C}\alpha$ korrelációs SHACA – HSQC mérést. Az új $^1\text{H}^\alpha$ - detektált pulzus szekvencia mindkét dimenzióban a lehetséges maximális lecsatolást biztosítja, adatgyűjtés alatt az általunk korábban bevezetett BASEREX homo- és heteronukleáris lecsatolást tartalmazza (Haller

2019). A SHACA – HSQC teljesítőképességét a sok prolin aminosavat tartalmazó p53TAD¹⁻⁶⁰ és a több ismétlődő motívummal rendelkező AS rendezetlen fehérjéken, valamint a globuláris ubikvitinen teszteltem. Igazoltam, hogy kiváló felbontás és érzékenység érhető el, és más, IDP rendszerek és prolin kimutatására használatos ¹³C'- detektált CON méréshez képest a mérési idő lényegesen rövidebb. További nagy előny, hogy fiziológiás körülmények mellett 5-10% D₂O tartalmú mintákkal lehet dolgozni. A mérés globuláris fehérjék esetében 100 aminosav méretű rendszerekig alkalmazható sikerrel, ennél nagyobb molekuláknál a homonukleáris lecsatolás már nem jár intenzitás növekedéssel. Ilyen kitétel a rendezetlen fehérjékre nem vonatkozik (Bodor 2020).

A felsorolt tulajdonságok alapján a SHACA-HSQC a ¹H^α- detektált mérések referencia spektrumává válhat, beépíthető a 3D típusú mérésekbe, így az IDP rendszerek tanulmányozásában újabb fogódzót jelenthet. Saját kutatásainkban a mérést több fehérjén is sikerrel teszteltem, például a 104 aminosav hosszúságú EZH2 (Szabó 2022b) rendezetlen fehérjén, illetve szerencsésen beépíthető volt egy prolin szelektív 3D pulzus szekvenciába (Sebák 2022). A 2D mérés számos további alkalmazása lehetséges: biokémiai, farmakológiai célokra, poszttranszlációs módosulatok változásának követésére, metabolikus útvonalak követésére. Mi jó eredményekkel használtuk a foszforiláció okozta változások monitorizálására (Sebák 2022).

2.2. A rendezetlen fehérjékben a prolin aminosav egyaránt előfordulhat *cisz*- és *transz*- izomer formájában. Jellegzetesen - de nem kizárólagosan - a spektrumban detektálható minor forma *cisz* állapotú. A két izomer biológiai funkcióban betöltött szerepe különböző lehet, ezért még hangsúlyosabban tevődik fel a kérdés, hogy a megjelenő forma melyik izomerhez tartozik. Az NMR mérés egyértelmű választ tud adni, amennyiben sikerül a prolin oldalláncának C β és C γ kémiai eltolódásait meghatározni, ugyanis ezek különbsége árulkodik az izomer típusáról. E célból két prolin szelektív, ¹H^α-detektált, 3D-mérést vezettem be. A 3D Pro-(HCA)NCACBHA során detektált korrelációkból: H α – (C α , C β) és H δ – (C δ , C γ), a teljes prolin szénváz meghatározható. Hátránya, hogy a koherencia útvonal hosszú, ami érzékenység csökkenést jelent és a számunkra érdekes kémiai eltolódások nem direkt korreláltak. Ezen kedvezőtlen tulajdonságokat küszöböli ki a 3D-Pro(H)CBCGCAHA pulzus szekvencia, ami kis számú, a maximálisan optimált transzfer lépéseknek köszönhetően nagy érzékenységű, és a SHACA-HSQC megoldás kapcsán 3D méréstől szokatlan módon, igény szerint, elfogadható mérési idő alatt nagy felbontással is futtatható. A méréseket sikerrel teszteltem a p53TAD¹⁻⁶⁰ esetében, megállapítva, hogy a 10 fő, major prolin jel *transz* állapotú, illetve először sikerült 13 minor prolin jelet is jellemezni, melyek nagyrésze *cisz* izomer. Utánajártam, hogy a CK2 enzim hatására a Ser46 foszforilációja a Pro47 *cisz-transz* egyensúly eltolódását vonja maga után, a minor *cisz* prolin jele detektálási határ alá csökken. Ez a megállapítás a p53TAD¹⁻⁶⁰ partnereivel való kölcsönhatás leírásában igen fontos lehet.

A bevezetett mérések általánosan, bármely prolin környezet meghatározására alkalmazhatók, a kidolgozott módszer pedig a releváns prolin *cisz-transz* egyensúlyok vizsgálatát teszi lehetővé, ami más módszerekkel sokkal idő- és pénzigényesebb. Jelenleg is folyó kutatásainkban az

EZH2 és a p53TAD¹⁻¹⁰⁰ prolin gazdag szakasszal hosszabbított rendezetlen fehérjék jellemzésében használjuk sikerrel izomerek meghatározására.

2.3. A prolin *cisz* izomer változó, 3-15% arányban jelenik meg, ennek egyik oka a szomszédságában jelen levő aminosavak természete. Ebből a feltevésből kiindulva összegyűjtöttem az irodalomban megtalálható azon IDPKet, ahol a *cisz* izomerek kísérletileg meghatározott mennyiségét megadták. A rendelkezésre álló 11 rendezetlen fehérje 101 prolin $i\pm 3$ környezetében található 595 aminosav statisztikus elemzését végeztem el, úgy, hogy az aminosavakat az oldalláncok típusa szerint 7 csoportba soroltam. Az elemzés során több szabályszerűség is megfogalmazható, így: (i) kis, <5%, *cisz*-Pro tartalom esetében az Arg és Lys aminosavak szignifikánsan többször fordulnak elő, elsősorban az $i-3$, $i-1$, $i+1$ és $i+2$ pozíciókban. Nem meglepő, hiszen ezen oldalláncoknak a prolin karbonil csoportjával történő kölcsönhatása inkább a *transz*-Pro izomer kialakulásának kedvez. (ii) >5% *cisz*-prolint tartalmazó szekvenciákban a Pro aminosav szignifikánsan gyakrabban fordul elő, elsősorban az $i-3$, $i+2$ és $i+3$ pozíciókban. Ez a poliprolin II szerkezeti elemekben megtalálható Pro-X-X-Pro és Pro-X-Pro motívumok jelenlétével magyarázható, mivel a ± 3 pozíciókban lévő prolinok stabilizálják a PPII struktúrákat. Az $i+1$ pozícióban található Pro szintén kedvező, ez azt is jelenti, hogy a *cisz*-Pro-*transz*-Pro motívumok a *transz*-Pro-*cisz*-Pro elrendeződésnél gyakoribbak. Továbbá szignifikánsan nagyobb az elektronban gazdag oldalláncok gyakorisága. Így az $i-2$ pozícióban a negatív, $i-1$ -ben a poláris és az aromás, $i+2$ -ben szintén az aromás oldalláncok a kedvezményezettek. Szignifikánsan kevesebb található viszont a pozitív töltésű aminosavakból, elsősorban az $i-1$, $i+1$ és $i+3$ pozíciókban. A szabályszerűségek jórésze a p53TAD¹⁻⁶⁰ esetében érvényes, továbbá jelenleg is folyó kutatásokban pontmutációk bevezetésével ezek helytállóságát a gyakorlatban is ellenőrizzük. Kis peptidek esetében a megfigyelések érvényesnek bizonyultak (Sebák 2021).

A felállított adathalmaz folyamatos bővüléséhez az ismertett mérési módszerek is hozzájárulnak, és remélhetőleg ez a növekedő adatbázis eljut majd oda, hogy adott rendezetlen fehérje *cisz/transz*-Pro eloszlását megjósolja.

3. Adott fehérje jellemzése, kölcsönhatások, kinetikai vizsgálatok

3.1. Elvégeztem a p53TAD¹⁻⁶⁰ doménjének szerkezeti és dinamikai vizsgálatát, megállapítottam, hogy a TAD1 régióban található F19-K24 szakasz tranziens helikális jellegű, a TAD2 szakasz M40-44 és S46-W53 részein lehet nagyon enyhe helicitást észlelni. A relaxációs adatok redukált spektrális sűrűség analízis szerinti elemzése összhangban van ezekkel a megállapításokkal, és igazolja a transzaktivációs domén rendezetlen jellegét. S100A4 fehérjével 1:1 arányú, stabil komplex képződik. A kémiai eltolódás vizsgálatokat itt is alátámasztják a dinamikai eredmények, mind azt mutatják, hogy a hosszú, mobilis N-terminális (M1-Q16) és a rövid, mobilis C-terminális (E56-P60) szakaszok a kölcsönhatásban nem vesznek részt. Három helikális szakasz alakul ki: a TAD1-ben a T18-N29, a TAD1-TAD2 összekötésében a P36-P47 és a TAD2-ben található I50-T55, ezeket dinamikus régiók kötik össze. A komplexben a p53TAD¹⁻⁶⁰ szerkezete hibrid NMR-MD módszerekkel adható meg, a

TAD1 és TAD2 régiókban hélixek alakulnak ki; a fehérje többi része túlnyomórészt rendezetlen, mobilis marad, azaz úgynevezett „bolyhos” (fuzzy) komplexet képez. Az NMR-MD módszerek ötvözte sikeres megoldásnak bizonyul nehezen tanulmányozható, elsősorban rendezetlen fehérje komplexek szerkezeti modelljének és viselkedésének leírására. Olyan esetekben tanácsos ehhez a hibrid megoldáshoz nyúlni, amikor a kristályosítás nem járható út, illetve az NMR paraméterek is elég szerények egy érdemleges szerkezetszámolás elvégzéséhez (Dudás 2020a).

További kitekintésként elmondható, hogy az atomi szintű jellemzés és a most már elérhető szerkezeti modell lehetővé teszi a fehérje-fehérje kölcsönhatás (PPI) inhibitor molekulák tervezését, és S100A4 kötődés alapú bioszenzorok fejlesztését.

3.2. Tanulmányoztam a metasztázis marker Ca^{2+} -kötő homodimer S100A4 fehérje és az MPT miozin IIA fragmens kölcsönhatását mindkét kötőpartner oldaláról. Igazoltam, hogy a 45 aminosav hosszú MPT szakasz szobahőmérsékleten rendezetlen, nem alakul ki a coiled-coil szerkezet. Továbbá, a kisebb hőmérsékleten detektálható preformált hélix jelenléte azt is jelenti, hogy az eredeti hosszúságú NMIIA kötődése során a coiled-coil szerkezet nem tekeredik le teljes mértékben. Az S100A4 oldaláról végzett vizsgálatok azt mutatják, hogy a fehérje homodimer jellege a kölcsönhatás során megszűnik, az A és B monomer láncok már nem ekvivalensek. Kémiai eltolódás és dinamikai vizsgálatok alapján a kötőrégió kivül a dimer összetartozásáért felelős H1 hélix is változást mutat. Ennek magyarázata, hogy kötőpartner hiányában a molekula egy „lélegző” mozgást végez, amit a kölcsönhatás elfojt, a szerkezet stabilabbá válik. Ez a tulajdonság az S100 család több tagjánál is kimutatható. Az eredmények tükrében megkíséreltem a megnövekedett Ca^{2+} affinitást is megmagyarázni. A komplex legnagyobb valószínűséggel a target kötő és funkcionális feltekeredés modell szerint alakul ki. Ez egy konformációs szelekció típusú mechanizmus a zárt (apo-) és nyílt (Ca^{2+} kötött) állapotok között, ahol a kötőpartner az egyensúlyt nagymértékben a nyílt forma fele tolja el, dinamikai változásokat eredményezve. Ezt támasztja alá az MPT kötődés hatására történő fehérjegerinc merevedése, amire a csökkent konformációs entrópia is utal, illetve a H1 hélix lassú mozgásának kölcsönhatás következtében történő megszűnése.

Az eredmények az oldatfázisú NMR vizsgálatok fontosságára is rávilágítanak. Más módszerrel a dinamikai folyamatok atomi szintű elemzése nem lehetséges, és az információ különösen értékes, hiszen ilyen ismeretek birtokában lehet olyan inhibitorokat tervezni, fejleszteni, melyek a fehérje – partner kölcsönhatás dinamikájának a változását is utánozni képesek, és nem csupán a szerkezeti aspektusokra figyelnek (Pálfy 2016).

3.3. Különböző hosszúságú NMIIA és NMIIIB izoforma szakaszok szerkezeti és foszforiláció okozta változásait tanulmányoztam. Megállapítottam, hogy az NMII filamentumok szétesésének és összeállásának szabályozása az NMIIA esetében az S100 fehérjékkel – ezek közül is elsősorban az S100A4-gyel – történő kölcsönhatás, míg az NMIIIB izoformánál a foszforiláció következtében történik meg. Így egyfelől sikerült kísérleti bizonyítékokkal

alátámasztani azt a feltételezést, hogy a filamentum szétesés izoforma specifikus reguláció szerint történik; illetve megcáfoltuk a nagy szerkezeti változást javasoló elméleteket.

3.4. A homodimer dinein könnyű lánc (DLC) és miozin Va szakasz kölcsönhatásának vizsgálata során kimutattam, hogy a szabad állapotban rendezetlen miozin peptid kötődéskor β -redő szerkezetet vesz fel, ebben az esetben is alátámasztva a rendezetlen – rendezett átalakulást. A kanonikus pozícióban Gln helyett Met aminosavat tartalmazó miozin más kötőpartnerekhez hasonlóan kötődik a DLC-hez. Speciális $^1\text{H}, ^{15}\text{N}$ -HSQC és $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -CT-HSQC detektált STD mérésekkel kimutattam, hogy a kötőárkon túlnyúló szakaszok hidrofób kölcsönhatásokban vesznek részt. Ez a viselkedés a molekuláris „ragasztó” elméletet támasztja alá és a *cc* szakaszok dimerizációjának stabilizálására mutat rá. A DLC két kötőárkának „kargó/kötő” funkciója nem igazolható ebben az esetben sem, viszont azt sikerült kimutatnom, hogy 50%-os telítettségénél a két kötőárok aszimmetrikussá válik, ám a második peptid bekötődése a szimmetriát helyreállítja (Bodor 2016, Hódi 2004).

3.5. Elsőként sikerült igazolnom, hogy az agy-specifikus tubulin polimerizációt segítő TPPP/p25 fehérje hosszú rendezetlen terminális szakaszokkal rendelkezik, a szerkezettel bíró régió az NMR spektrumban molten globulaként jelenik meg, ezen aminosavak jelazonosítása nem lehetséges. A fehérje AlphaFold által megadott szerkezeténél az általam leírt rendezetlenségi információkra támaszkodtak. A fehérje funkcióinak feltérképezéséhez vizsgáltam GTP kötő funkcióját, és lehetséges GTPáz aktivitását. Mg^{2+} jelenlétében a GTP hidrolízis ^{31}P spektrumokkal való követése a k_{cat} érték kiszámítását eredményezte. Megállapítható, hogy a TPPP/p25 a kis G fehérjékéhez (Rac1, H-Ras, Rap1A, Ran) hasonló GTPáz aktivitást mutat. Továbbá igazoltam, hogy ezt az aktivitást a Zn^{2+} kationok enyhén gátolják (Zotter 2011a, Zotter 2011b).

3.6. A dUTP Mason-Pfizer majom retrovírus (MPMV) dUTPáz jelenlétében történő hidrolízis mechanizmusát és a Mg^{2+} kofaktor jelentőségét vizsgáltam. ^{31}P NMR mérések kiértékelésével igazoltam, hogy a Mg^{2+} jelenlétében történő hidrolízis során a nukleofil támadás az α foszfor atomon történik, és a folyamatra jellemző k_{cat} pszeudo-elsőrendű állandó más dUTPáz által katalizált folyamatokhoz hasonló értéket ad. Az asszociatív mechanizmust kinetikus krisztallográfiai felvételek igazolták. A fémion hiányában a hidrolízis lassabban megy végbe és az elemzés azt mutatja, hogy ebben az esetben a nukleofil támadás a β foszfor atomon történik. Az eredmények a fémion kofaktor enzimatis foszfát észter hidrolízisben betöltött szokatlan szerepére világítanak rá, amivel ezek szerint érdemes számolni.

Az említett hidrolízis vizsgálatok egyértelműen tükrözik a pH, a közeg, és a fémion - koordináció szerepét. Ezekre egyszerű ^{31}P mérésekkel lehet rámutatni, a mérések érzékenysége a kinetikai folyamatok leírásán túlmenően megengedi a nagy jelek mellett jelen levő szennyezők kimutatását, azonosítását (Barabás 2013, Gyimesi 2008).

4. Membránmimetikumok jellemzése, peptid-bicella rendszerek

4.1. PC bicella, illetve DHPC micella és két feszültség függő K^+ csatorna transzmembrán régiójának kölcsönhatását vizsgáltam ^{13}C relaxációs mérésekkel, több térerőn. A bicella esetében a relaxációs paraméterek értékelése a szabad bicella, és a peptid-bicella rendszerekben egyaránt azt mutatja, hogy az acil lánc mentén a terminális vég fele haladva nő a mozgékonyság (csökkenő rendparaméterek), és gyorsul a lokális mozgás (csökkenő τ_{local} értékek). Annak ellenére, hogy minimálisak az eltérések, mindkét fehérje jelenléte hatással van a DMPC lipid dinamikájára. A lipid fejcsoporthoz legközelebb álló 2, de leginkább 3 környezetek nagyobb rendparaméterekkel, és szignifikánsan nagyobb korrelációs időkkel rendelkeznek, ami arra utal, hogy a peptid jelenléte csökkenti a lánc mobilitását. A terminális végen található 12 és 13 környezetekre ugyanez jellemző. Mindkét peptid nagy valószínűséggel a kettős rétegbe épült be, és az acil lánc fejcsoporthoz legközelebbi részeinek mobilitását csökkenti. A mérések egyszerűek, a kiértékeléseknél ugyan több megközelítéssel kell élni, de az eljárást bármely membrán mimetikum rendszer vizsgálatára lehet használni (Biverstahl, 2009).

4.2. ^{31}P NMR spektroszkópiai méréseken alapuló egyszerű és rutinszerűen alkalmazható eljárást próbáltam kidolgozni annak eldöntésére, hogy a peptid felületaktív, vagy transzmembrán-e? Két ismert topológiájú rendszer hőmérséklet- és térerő függő relaxációs méréseit végeztem el. A T_1 mérések alapján megállapítottam, hogy a felületaktív peptid nagyobb hatással van a lipid dinamikájára, mint a transzmembrán peptid. Feltételezve, hogy a közeg izotróp és a mozgás egyetlen τ_c korrelációs idővel írható le, az Arrhenius típusú hőmérsékletfüggéséből a foszfát csoportnak a glicerol gerincéhez képest történő reorientációs aktiválási energiáját határoztam meg. A reorientációs aktiválási energia értékek a DHPC molekulára nagyobbak, mint a DMPC-re, ami a bicella felépítésében betöltött különböző szerepüknek lehet köszönhető. A transzmembrán peptid hatására aktiválási energia keveset változik és csökkenő tendenciát mutat, a felületaktív peptid hatására a változás jelentősebb és növekszik. Korábbi vizsgálatok más, hosszabb szénlánccal rendelkező bicellákra hasonló reorientációs energia értéket közölnek. Ami a T_2 relaxációs időre gyakorolt hatást illeti, azt mutattam ki, hogy a transzmembrán peptid esetén sokkal nagyobb az effektus. Ugyan kvantitatív következtetés nem vonható le, de az NMR és DLS eredmények is egyértelműen méretnövekedést, esetleges morfológiai változásokat mutatnak a transzmembrán peptid beépülésének hatására. A ^{31}P relaxációs értékek meghatározása lehet tehát egy módszer a fehérje-membrán kölcsönhatás topologikus vizsgálatára. Ugyanakkor szükség van újabb és újabb rendszerekre, hogy a modellpeptidekre megfogalmazott állításokat igazolni lehessen (Bodor 2015).

4.3. Utánajártam korábbi saját és irodalmi megállapításoknak, mely szerint bicella-peptid kölcsönhatás következménye a bicella méret- és/vagy alakváltozása. Ismételten modell peptideket használva, ugyanazon mintán, azonos kísérleti körülmények között felvett NMR spektrumok és SAXS szórásgörbék értékelését végeztük el. Megállapítottam, hogy a translációs diffúziós 1H NMR mérések kiválóan jelentenek a bicella oldatok pontos

összetételéről, sőt, a lehetséges aggregációs számokról. A transzmembrán peptid hozzáadása a PC és a PC/PG bicella méretnövekedésével jár együtt, ezzel szemben a felületaktív molekula jelenléte nem okoz szignifikáns növekedést. A SAXS szórásgörbe illesztésére a mag – héj modell sikerességét igazoltuk. A modell illesztése során a bicella alakjára tudunk következtetni, és a tengelyek értékéből kísérleti úton meghatározott Perrin faktorokat tudunk meghatározni. A transzmembrán peptid jelenléte az oblát alakú PC bicellák hosszabb tengelyének növekedését okozzák, ami összhangban van a peptid kettősrétegbe történő beékelődésével. Felületaktív peptideknél – elvárható módon – ez a hatás nem detektálható. A két technika (NMR és SAXS) ötvözése valóban alkalmas bicella rendszerek méret- és alak-meghatározásának leírására, és az elért biztató eredmények valós rendszereken való tesztelését követően a membránmimetikum-fehérje kölcsönhatások biofizikai leírása pontosabban történhet, és a funkcionális vizsgálatokhoz jobb modellrendszerek tervezhetők (Dudás 2020b).

5. Környezeti és ipari szempontból fontos kémiai reakciók vizsgálata

5.1. A fosszilis üzemanyagokhoz való hozzáférés korlátozása, ezek egyre emelkedő ára azt eredményezi, hogy más, ígéretes lehetőségek után kell nézni. Kutatásainkban a biomassza átalakításának lehetőségét vizsgáltuk. Szacharóz modellrendszert alkalmazva homogén és heterogén katalitikus reakciók megfelelő kombinációjával sikerült egyre kevesebb oxigént tartalmazó C₅-oxigenátokat (levulinsav, GVL, 1,4-butándiol, 2-metil-THF) és alkének keverékét előállítani. A komponenseket egyszerű, klasszikus NMR technikákkal, de nem-szokványos körülmények mellett, nagynyomású mérésekkel mutattam ki. A kísérletek igazolták, hogy a biomassza átalakítása lehetséges, gazdasági szempontból pedig elsősorban a GVL biomasszából történő előállítása jelenthet mérföldkövet (Mehdi 2008).

5.2. A szerves oldószerek lecserélésének lehetőségét jelenthetik a barátságosabb, „zöldebb” oldószerek, és az ionos folyadékok jó jelölteknek számítanak. Kutatásaim során 1-etil-3-metilimidazólium-trifluorometánszulfonát [C₂mim][TfO] közegben vizsgáltam a benzil alkohol cérium (IV) só által mediált oxidációjának lejátszódását. Ebben az esetben is rutin NMR mérésekkel, viszont szelektíven jelölt benzil alkohol használatával igazoltam, hogy az átalakulás a száraz ionos folyadékban kvantitatívan lejátszódik, és sikerült azt is igazolni, hogy a reakció során képződő NO₂ gáz mennyisége nagymértékben befolyásolható a CAN/ionos folyadék arány beállításával (Mehdi 2007).

5.3. Sikeresen megadtam az izocianátok foszfin katalizált ciklooligomerizációjának molekuláris szintű jellemzését, -70°C-on történő mérésekkel igazoltam a képződő intermedierek szerkezetét. Az általam bemutatott hőmérsékletfüggő NMR mérések és a szelektív izotópjelölés együttes alkalmazása az a módszer, ami egy organokatalitikus ipari folyamat reakciómechanizmusának leírását és a kialakult intermedier azonosítását eredményezi. Tágabb értelemben ilyen információk birtokában lehet új katalizátorok tervezésébe fogni, ami a reakció finomhangolását és egy adott termék irányába történő eltolást eredményezheti (Pusztai 2005).

A felsorolt területeken végzett kutatások kétségkívül erőfeszítést igényelnek, hiszen több szempontból is igazolni kell azt, hogy például egy ionos folyadék megfelelő közeg-e adott reakció futtatásánál. Arra azonban nincs rálátásom, hogy egy iparilag jól bevált, nagy profitot termelő folyamat esetében az oldószercseré a gyakorlatban valóban meg is történik-e, és ha igen, hogyan. Másfelől, a szerves kémiai folyamat tökéletesítése érdekében az alkalmazott katalizátorok cseréje vagy egy adott típus továbbiakban történő alkalmazása – főleg a reakciómechanizmus tudatában – hamarabb megvalósulhat.

Összefoglalásként elmondható, hogy az itt felsorolt módszerek, kiértékelések és megközelítések nagyszerűen tükrözik azt, hogy az NMR spektroszkópia milyen szerteágazóan tud biomolekulák és kismolekulák vizsgálata során a legkülönbözőbb felvetésekre is választ adni. Ez a kutatómunka sokszínű, számos kihívás elé állított és állít, miközben lehetőséget nyílt több tudományterülettel is megismerkedni. Ez a sokféleség segített abban, hogy ne csak a konkrét rendszerekre koncentráljak, hanem próbáljak meg általános érvényű megfogalmazásokat is tenni, és az alkalmazások körét tágítsam. A feltett kérdésekre adott válaszok közelebb visznek a rendszerek, mint egész működésének és viselkedésének megértéséhez. A több területen elért eredmények összegzése válhat hasznosítható tudássá, legyen szó akár gyógyszertervezésről, akár a környezeti szennyezés csökkentéséről.

8. Irodalomjegyzék

8.1. Az értekezés alapját képező közlemények

1. Barabás O, Németh V, **Bodor A**, Perczel A, Rosta E, Kele Z, Zagyva I, Szabadka Z, Grolmusz VI, Wilmanns M, Vértessy BG. (2013) Catalytic mechanism of α -phosphate attack in dUTPase is revealed by X-ray crystallographic snapshots of distinct intermediates, ^{31}P -NMR spectroscopy and reaction path modelling. *Nucleic Acids Res*, 41: 10542-10555.
2. **Bodor A**, Haller JD, Bouguechtouli C, Theillet FX, Nyitray L, Luy B. (2020) Power of Pure Shift $\text{H}\alpha\text{C}\alpha$ Correlations: A Way to Characterize Biomolecules under Physiological Conditions. *Anal Chem*, 92: 12423-12428.
3. **Bodor A**, Radnai L, Hetényi C, Rapali P, Láng A, Kövér KE, Perczel A, Wahlgren WY, Katona G, Nyitray L. (2014) DYNLL2 dynein light chain binds to an extended linear motif of myosin 5a tail that has structural plasticity. *Biochemistry*, 53: 7107-7122.
4. **Bodor A**, Kövér KE, Mäler L. (2015) Membrane interactions in small fast-tumbling bicelles as studied by ^{31}P NMR. *Biochim Biophys Acta*, 1848: 760-766.
5. Biverstahl H, Lind J, **Bodor A**, Mäler L. (2009) Biophysical studies of the membrane location of the voltage-gated sensors in the HsapBK and KvAP K(+) channels. *Biochim Biophys Acta*, 1788: 1976-1986.
6. Dudás EF, Pálffy G, Menyhárd DK, Sebák F, Ecsédi P, Nyitray L, **Bodor A**. (2020a) Tumor-Suppressor p53TAD(1-60) Forms a Fuzzy Complex with Metastasis-Associated S100A4: Structural Insights and Dynamics by an NMR/MD Approach. *ChemBioChem*, 21: 3087-3095.
7. Dudás EF, Wacha A, Bóta A, **Bodor A**. (2020b) Peptide-bicelle interaction: Following variations in size and morphology by a combined NMR-SAXS approach. *Biochim Biophys Acta*, 1862.
8. Dudás EF, **Bodor A**. (2019) Quantitative, Diffusion NMR Based Analytical Tool To Distinguish Folded, Disordered, and Denatured Biomolecules. *Anal Chem*, 91: 4929–4933.
9. Ecsédi P, Billington N, Pálffy G, Gógl G, Kiss B, Bulyáki É, **Bodor A**, Sellers JR, Nyitray L. (2018) Multiple S100 protein isoforms and C-terminal phosphorylation contribute to the paralog-selective regulation of nonmuscle myosin 2 filaments. *J Biol Chem*, 293: 14850-14867.
10. Gyimesi M, Kintses B, **Bodor A**, Perczel A, Fischer S, Bagshaw CR, Málnási-Csizmadia A. (2008) The mechanism of the reverse recovery step, phosphate release, and actin activation of Dictyostelium myosin II. *J Biol Chem*, 283: 8153-8163.
11. Hódi Z, Németh AL, Radnai L, Hetényi C, Schlett K, **Bodor A**, Perczel A, Nyitray L. (2006) Alternatively spliced exon B of myosin Va is essential for binding the tail-associated light chain shared by dynein. *Biochemistry*, 45: 12582-12595.
12. Mehdi H, **Bodor A**, Lantos D, Horváth IT, De Vos DE, Binnemans K. (2007) Imidazolium ionic liquids as solvents for cerium(IV)-mediated oxidation reactions. *J Org Chem*, 72: 517-524.
13. Mehdi H, Fábos V, Tuba R, **Bodor A**, Mika LT, Horváth IT. (2008) Integration of Homogeneous and Heterogeneous Catalytic Processes for a Multi-step Conversion of Biomass: From Sucrose to Levulinic Acid, γ -Valerolactone, 1,4-Pentanediol, 2-Methyl-tetrahydrofuran, and Alkanes. *Top Catal*, 48: 49-54.

14. Pálffy G, Kiss B, Nyitray L, **Bodor A.** (2016) Multilevel Changes in Protein Dynamics upon Complex Formation of the Calcium-Loaded S100A4 with a Nonmuscle Myosin IIA Tail Fragment. *ChemBioChem*, 17: 1829-1838.
15. Pusztai Z, Vlád G, **Bodor A**, Horváth IT, Laas HJ, Halpaap R, Richter FU. (2005) In situ NMR spectroscopic observation of a catalytic intermediate in phosphine-catalyzed cyclo-oligomerization of isocyanates. *Angew Chem Int Ed Engl*, 45: 107-110.
16. Sebák F, Ecsédi P, Bermel W, Luy B, Nyitray L, **Bodor A.** (2022) Selective (1) H(α) NMR Methods Reveal Functionally Relevant Proline cis/trans Isomers in Intrinsically Disordered Proteins: Characterization of Minor Forms, Effects of Phosphorylation, and Occurrence in Proteome. *Angew Chem Int Ed Engl*, 61: e202108361.
17. Zotter Á*, **Bodor A***, Oláh J, Hlavanda E, Orosz F, Perczel A, Ovádi J. (2011a) Disordered TPPP/p25 binds GTP and displays Mg²⁺-dependent GTPase activity. *FEBS Lett*, 585: 803-808.
18. Zotter Á, Oláh J, Hlavanda E, **Bodor A**, Perczel A, Szigeti K, Fidy J, Ovádi J. (2011b) Zn²⁺-induced rearrangement of the disordered TPPP/p25 affects its microtubule assembly and GTPase activity. *Biochemistry*, 50: 9568-9578.

8.2. Kapcsolódó közlemények

Az értekezéshez közvetlenül nem tartozó, de a vizsgálat tárgyát és/vagy módszereit tekintve kapcsolódó publikációk listája:

- Alexa A, Gógl G, Glatz G, Garai Á, Zeke A, Varga J, Dudás E, Jeszenői N, **Bodor A**, Hetényi C, Reményi A. (2015) Structural assembly of the signaling competent ERK2-RSK1 heterodimeric protein kinase complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112: 2711-2716.
- Batta G, **Bodor A**, Kövér K, Martinek T, Perczel A, Tőke O. NMR- és ESR-spektroszkópia. In: Buday L, Nyitray L, Perczel A (szerk.), *Ezerarcú fehérjék*. Semmelweis Kiadó és Multimédia Stúdió, Budapest, 2018: 203-256.
- Bálint A-M, **Bodor A**, Gömörý Á, Vékey K, Szabó D, Rábai J. (2005) Mitsunobu synthesis of symmetrical alkyl and polyfluoroalkyl secondary amines. *J Fluor Chem*, 126: 1524-1530.
- Biri-Kovács B, Kiss B, Vadászi H, Gógl G, Pálffy G, Török G, Homolya L, **Bodor A**, Nyitray L. (2017) Ezrin interacts with S100A4 via both its N- and C-terminal domains. *PLoS One*, 12: e0177489.
- Bodor A.** (2021) Intrinsic structural disorder of proteins: From prediction to experimental identification. In: *Amino Acids, Peptides and Proteins* (Ryadnov MG, Hudecz F szerk.) Vol. 43 pp. 64-114, Royal Society of Chemistry
- Csapó Á, **Bodor A**, Rábai J. (2012) Hiyama coupling reaction of fluorosilyl-alkenyl-fluorosilanes: Scope and mechanistic considerations. *J Fluor Chem*, 137: 85-92.
- Csihony S, **Bodor A**, Rohonczy J, Horváth IT. (2002) In situ IR and NMR spectroscopic investigation of the formation and structure of protonated diacetylketene tetrachloroaluminate. *J Chem Soc Perkin Trans. 1*, 24: 2861-2865
- Duelli A, Kiss B, Lundholm I, **Bodor A**, Petoukhov MV, Svergun DI, Nyitray L, Katona G. (2014) The C-terminal random coil region tunes the Ca²⁺-binding affinity of S100A4 through conformational activation. *PLoS One*, 9: e97654.
- Fábos V, Lantos D, **Bodor A**, Bálint AM, Mika LT, Sielcken OE, Cuiper A, Horváth IT. (2008) Epsilon-caprolactamium hydrogen sulfate: an ionic liquid used for decades in the large-scale production of epsilon-caprolactam. *ChemSusChem*, 1: 189-192.

- Gógl G, Biri-Kovacs B, Poti AL, Vadaszi H, Szeder B, **Bodor A**, Schlosser G, Acs A, Turiak L, Buday L, Alexa A, Nyitray L, Remenyi A. (2018) Dynamic control of RSK complexes by phosphoswitch-based regulation. *FEBS J*, 285: 46-71.
- Gógl G, Alexa A, Kiss B, Katona G, Kovács M, **Bodor A**, Reményi A, Nyitray L. (2016) Structural Basis of Ribosomal S6 Kinase 1 (RSK1) Inhibition by S100B Protein: Modulation Of The Extracellular Signal-Regulated Kinase (Erk) Signaling Cascade In A Calcium-Dependent Way. *J Biol Chem*, 291: 11-27.
- Haller JD, **Bodor A**, Luy B. (2019) Real-time pure shift measurements for uniformly isotope-labeled molecules using X-selective BIRD homonuclear decoupling. *J Magn Reson*, 302: 64-71.
- Kali G, Szesztay M, **Bodor A**, Iván B. (2007) A New Synthetic Method for the Preparation of Star-Shaped Polyisobutylene with Hyperbranched Polystyrene Core. *Macromol Chem Phys*, 208: 1388-1393.
- Kali G, Szesztay M, **Bodor A**, Iván B. (2013) Star and Hyperbranched Polyisobutylenes via Terminally Reactive Polyisobutylene-Polystyrene Block Copolymers. *Macromol Symp*, 323: 37-41.
- Kasza G, Szarka G, **Bodor A**, Kali G, Iván B. In Situ Terminal Functionalization of Polystyrene Obtained by Quasiliving ATRP and Subsequent Derivatizations. In: *Reversible Deactivation Radical Polymerization: Materials and Applications*. American Chemical Society, 2018: 281-295.
- Képiró M, Várkuti BH, **Bodor A**, Hegyi G, Drahos L, Kovács M, Málnási-Csizmadia A. (2012) Azidoblebbistatin, a photoreactive myosin inhibitor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109: 9402-9407.
- Kiss K, Holczbauer T, Czugler M, Sohár P, **Bodor A**, Csámpai A. (2012) Synthesis, IR-, NMR-, DFT- and X-ray analysis of novel C2-chiral diferrocenyl–salen complexes. *J Organomet Chem*, 706-707: 46-51.
- Lantos D, Contel Ma, Sanz S, **Bodor A**, Horváth IT. (2007) Homogeneous gold-catalyzed hydrosilylation of aldehydes. *J Organomet Chem*, 692: 1799-1805.
- Nemes A, Tölgyesi L, **Bodor A**, Rábai J, Szabó D. (2010) Greener fluoros chemistry: Convenient preparation of new types of 'CF₃-rich' secondary alkyl mesylates and their use for the synthesis of azides, amines, imidazoles and imidazolium salts. *J Fluor Chem*, 131: 1368-1376.
- Sebák F, Horváth LB, Kovács D, Szolomájer J, Tóth GK, Babiczky Á, Bösze S, **Bodor A**. (2021) Novel Lysine-Rich Delivery Peptides of Plant Origin ERD and Human S100: The Effect of Carboxyfluorescein Conjugation, Influence of Aromatic and Proline Residues, Cellular Internalization, and Penetration Ability. *ACS Omega*, 6: 34470-34484.
- Szabó CL, Szabó B, Sebák F, Bermel W, Tantos A, **Bodor A**. (2022) The Disordered EZH2 Loop: Atomic Level Characterization by ¹HN- and ¹H α -Detected NMR Approaches, Interaction with the Long Noncoding HOTAIR RNA. *Int J Mol Sci*, 23: 6150.
- Szabó CL, Sebák F, **Bodor A**. (2022) Monitoring Protein Global and Local Parameters in Unfolding and Binding Studies: The Extended Applicability of the Diffusion Coefficient–Molecular Size Empirical Relations. *Anal Chem* 94: 7885–7891
- Szabó D, Mohl J, Bálint A-M, **Bodor A**, Rábai J. (2006) Novel generation ponytails in fluoros chemistry: Syntheses of primary, secondary, and tertiary (nonafluoro-tert-butylloxy)ethyl amines. *J Fluor Chem*, 127: 1496-1504.
- Szollosi E, Bokor M, **Bodor A**, Perczel A, Klement E, Medzihradsky KF, Tompa K, Tompa P. (2008) Intrinsic structural disorder of DF31, a Drosophila protein of chromatin decondensation and remodeling activities. *J Proteome Res*, 7: 2291-2299.

Tuba R, Mika LT, **Bodor A**, Pusztai Z, Tóth I, Horváth IT. (2003) Mechanism of the Pyridine-Modified Cobalt-Catalyzed Hydromethoxycarbonylation of 1,3-Butadiene. *Organometallics*, 22: 1582-1584.

8.3. Egyéb közlemények

- Aguilar JA, Nilsson M, Morris GA. (2011) Simple proton spectra from complex spin systems: pure shift NMR spectroscopy using BIRD. *Angew Chem Int Ed Engl*, 50: 9716-9717.
- Ahuja P, Cantrelle FX, Huvent I, Hanouille X, Lopez J, Smet C, Wieruszeski JM, Landrieu I, Lippens G. (2016) Proline Conformation in a Functional Tau Fragment. *J Mol Biol*, 428: 79-91.
- Aitio O, Hellman M, Skehan B, Kesti T, Leong JM, Saksela K, Permi P. (2012) Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* exploits a tryptophan switch to hijack host f-actin assembly. *Structure*, 20: 1692-1703.
- Alderson TR, Lee JH, Charlier C, Ying JF, Bax A. (2018) Propensity for cis-Proline Formation in Unfolded Proteins. *ChemBioChem*, 19: 37-42.
- Ambadipudi S, Zweckstetter M. (2016) Targeting intrinsically disordered proteins in rational drug discovery. *Expert Opin Drug Dis*, 11: 65-77.
- Andersson A, Måler L. (2005) Magnetic resonance investigations of lipid motion in isotropic bicelles. *Langmuir*, 21: 7702-7709.
- Badyal SK, Basran J, Bhanji N, Kim JH, Chavda AP, Jung HS, Craig R, Elliott PR, Irvine AF, Barsukov IL, Kriajevska M, Bagshaw CR. (2011) Mechanism of the Ca²⁺-dependent interaction between S100A4 and tail fragments of nonmuscle myosin heavy chain IIA. *J Mol Biol*, 405: 1004-1026.
- Barabás O, Pongrácz V, Kovári J, Wilmanns M, Vértessy BG. (2004) Structural insights into the catalytic mechanism of phosphate ester hydrolysis by dUTPase. *J Biol Chem*, 279: 42907-42915.
- Beach JR, Hammer JA, 3rd. (2015) Myosin II isoform co-assembly and differential regulation in mammalian systems. *Exp Cell Res*, 334: 2-9.
- Benison G, Karplus PA, Barbar E. (2008) The interplay of ligand binding and quaternary structure in the diverse interactions of dynein light chain LC8. *J Mol Biol*, 384: 954-966.
- Berjanskii MV, Wishart DS. (2005) A simple method to predict protein flexibility using secondary chemical shifts. *J Am Chem Soc*, 127: 14970-14971.
- Bermel W, Bertini I, Chill J, Felli IC, Haba N, Kumar MVV, Pierattelli R. (2012) Exclusively Heteronuclear C-13-Detected Amino-Acid-Selective NMR Experiments for the Study of Intrinsically Disordered Proteins (IDPs). *ChemBiochem*, 13: 2425-2432.
- Bermel W, Felli IC, Kummerle R, Pierattelli R. (2008) C-13 Direct-Detection Biomolecular NMR. *Concepts Magn Resonance Part A*, 32A: 183-200.
- Bernado P, Blackledge M. (2009) A Self-Consistent Description of the Conformational Behavior of Chemically Denatured Proteins from NMR and Small Angle Scattering. *Biophys J*, 97: 2839-2845.
- Bertini I, McGreevy KS, Parigi G. *NMR of Biomolecules*. Wiley VCH2012
- Blom N, Sicheritz-Ponten T, Gupta R, Gammeltoft S, Brunak S. (2004) Prediction of post-translational glycosylation and phosphorylation of proteins from the amino acid sequence. *Proteomics*, 4: 1633-1649.
- Boehr DD, Nussinov R, Wright PE. (2009) The role of dynamic conformational ensembles in biomolecular recognition. *Nat Chem Biol*, 5: 789-796.
- Bohnet M. (2002) *Ullmann's encyclopedia of industrial chemistry*, 6th ed. Wiley, Weinheim, Németország

- Bourne HR, Sanders DA, McCormick F. (1991) The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature*, 349: 117-127.
- Boye K, Maelandsmo GM. (2010) S100A4 and metastasis: a small actor playing many roles. *Am J Pathol*, 176: 528-535.
- Bresnick AR, Weber DJ, Zimmer DB. (2015) S100 proteins in cancer. *Nat Rev Cancer*, 15: 96-109.
- Brutscher B, Schanda P. Rapid Multidimensional NMR: Fast-Pulsing Techniques and their Applications to Proteins. In: *eMagRes*. 2009.
- Brutscher B, Solyom Z. Chapter 1 Polarization-enhanced Fast-pulsing Techniques. In: *Fast NMR Data Acquisition: Beyond the Fourier Transform*. The Royal Society of Chemistry, 2017: 1-32.
- Bulavin DV, Saito S, Hollander MC, Sakaguchi K, Anderson CW, Appella E, Fornace AJ. (1999) Phosphorylation of human p53 by p38 kinase coordinates N-terminal phosphorylation and apoptosis in response to UV radiation. *EMBO J*, 18: 6845-6854.
- Busche MA, Hyman BT. (2020) Synergy between amyloid- β and tau in Alzheimer's disease. *Nat Neurosci*, 23: 1183-1193.
- Caldwell TA, Baoukina S, Brock AT, Oliver RC, Root KT, Krueger JK, Glover KJ, Tieleman DP, Columbus L. (2018) Low-q Bicelles Are Mixed Micelles. *J Phys Chem Lett*, 9: 4469-4473.
- Cantor CR, Schimmel PR. *Biophysical Chemistry: Part II: Techniques for the Study of Biological Structure and Function*. W. H. Freeman 1980
- Capener CE, Kim HJ, Arinaminpathy Y, Sansom MS. (2002) Ion channels: structural bioinformatics and modelling. *Hum Mol Genet*, 11: 2425-2433.
- Castañar L, Nolis P, Virgili A, Parella T. (2013) Full sensitivity and enhanced resolution in homodecoupled band-selective NMR experiments. *Chemistry*, 19: 17283-17286.
- Castañar L, Parella T. (2015) Broadband ^1H homodecoupled NMR experiments: recent developments, methods and applications. *Magn Reson Chem*, 53: 399-426.
- Chaves-Arquero B, Pantoja-Uceda D, Roque A, Ponte I, Suau P, Jiménez MA. (2018) A CON-based NMR assignment strategy for pro-rich intrinsically disordered proteins with low signal dispersion: the C-terminal domain of histone H1.0 as a case study. *J Biomol NMR*, 72: 139-148.
- Chhabra S, Fischer P, Takeuchi K, Dubey A, Ziarek JJ, Boeszoermyeni A, Mathieu D, Bermel W, Davey NE, Wagner G, Arthanari H. (2018) N-15 detection harnesses the slow relaxation property of nitrogen: Delivering enhanced resolution for intrinsically disordered proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*, 115: E1710-E1719.
- Chou JJ, Baber JL, Bax A. (2004) Characterization of phospholipid mixed micelles by translational diffusion. *J Biomol NMR*, 29: 299-308.
- Cohen Y, Avram L, Frish L. (2005) Diffusion NMR Spectroscopy in Supramolecular and Combinatorial Chemistry: An Old Parameter—New Insights. *Angew Chem Int Ed*, 44: 520-554.
- Corma A, Iborra S, Vely A. (2007) Chemical routes for the transformation of biomass into chemicals. *Chem Rev*, 107: 2411-2502.
- Csermely P, Palotai R, Nussinov R. (2010) Induced fit, conformational selection and independent dynamic segments: an extended view of binding events. *Trends Biochem Sci*, 35: 539-546.
- Danielsson J, Jarvet J, Damberg P, Graslund A. (2002) Translational diffusion measured by PFG-NMR on full length and fragments of the Alzheimer A beta(1-40) peptide. Determination of hydrodynamic radii of random coil peptides of varying length. *Magn Res Chem*, 40: S89-S97.

- Day CL, Puthalakath H, Skea G, Strasser A, Barsukov I, Lian LY, Huang DC, Hinds MG. (2004) Localization of dynein light chains 1 and 2 and their pro-apoptotic ligands. *Biochem J*, 377: 597-605.
- de Planque MR, Killian JA. (2003) Protein-lipid interactions studied with designed transmembrane peptides: role of hydrophobic matching and interfacial anchoring. *Mol Membr Biol*, 20: 271-284.
- Dempsey CE. (1990) The actions of melittin on membranes. *Biochim Biophys Acta*, 1031: 143-161.
- Ding D, Wang J, Xi J, Liu X, Lu G, Wang Y. (2014) High-yield production of levulinic acid from cellulose and its upgrading to γ -valerolactone. *Green Chemistry*, 16: 3846-3853.
- Dixon AM, Larive CK. (1999) NMR spectroscopy with spectral editing for the analysis of complex mixtures. *Appl Spectrosc*, 53: 426A-440A.
- Donato R. (2003) Intracellular and extracellular roles of S100 proteins. *Microsc Res Tech*, 60: 540-551.
- Dosztányi Z, Tompa P. Prediction of Protein Disorder. In: Kobe B, Guss M, Huber T (szerk.), *Structural Proteomics: High-Throughput Methods*. Humana Press, Totowa, NJ, 2008: 103-115.
- Dujardin M, Madan V, Gandhi NS, Cantrelle FX, Launay H, Huvent I, Bartenschlager R, Lippens G, Hanoulle X. (2019) Cyclophilin A allows the allosteric regulation of a structural motif in the disordered domain 2 of NS5A and thereby fine-tunes HCV RNA replication. *J Biol Chem*, 294: 13171-13185.
- Dukhanina EA, Kabanova OD, Lukyanova TI, Shatalov YV, Yashin DV, Romanova EA, Gnuchev NV, Galkin AV, Georgiev GP, Sashchenko LP. (2009) Opposite roles of metastasin (S100A4) in two potentially tumoricidal mechanisms involving human lymphocyte protein Tag7 and Hsp70. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106: 13963-13967.
- Dulyaninova NG, Bresnick AR. (2013) The heavy chain has its day: regulation of myosin-II assembly. *Bioarchitecture*, 3: 77-85.
- Dulyaninova NG, Malashkevich VN, Almo SC, Bresnick AR. (2005) Regulation of myosin-IIA assembly and Mts1 binding by heavy chain phosphorylation. *Biochemistry*, 44: 6867-6876.
- Dutta K, Cox CJ, Basavappa R, Pascal SM. (2008) ^{15}N relaxation studies of Apo-Mts1: a dynamic S100 protein. *Biochemistry*, 47: 7637-7647.
- Dutta K, Cox CJ, Huang H, Basavappa R, Pascal SM. (2002) Calcium coordination studies of the metastatic Mts1 protein. *Biochemistry*, 41: 4239-4245.
- Ecsédi P, Kiss B, Gógl G, Radnai L, Buday L, Koprivanacz K, Liliom K, Leveles I, Vértessy B, Jeszenői N, Hetényi C, Schlosser G, Katona G, Nyitray L. (2017) Regulation of the Equilibrium between Closed and Open Conformations of Annexin A2 by N-Terminal Phosphorylation and S100A4-Binding. *Structure*, 25: 1195-1207.e1195.
- Eilers M, Shekar SC, Shieh T, Smith SO, Fleming PJ. (2000) Internal packing of helical membrane proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97: 5796-5801.
- Ellena JF, Lepore LS, Cafiso DS. (1993) Estimating lipid lateral diffusion in phospholipid vesicles from carbon-13 spin-spin relaxation. *J Phys Chem*, 97: 2952-2957.
- Elliott PR, Irvine AF, Jung HS, Tozawa K, Pastok MW, Picone R, Badyal SK, Basran J, Rudland PS, Barraclough R, Lian LY, Bagshaw CR, Kriajevska M, Barsukov IL. (2012) Asymmetric mode of Ca^{2+} -S100A4 interaction with nonmuscle myosin IIA generates nanomolar affinity required for filament remodeling. *Structure*, 20: 654-666.
- Erdős G, Pajkos M, Dosztányi Z. (2021) IUPred3: prediction of protein disorder enhanced with unambiguous experimental annotation and visualization of evolutionary conservation. *Nucleic Acids Res*, 49: W297-w303.

- Evans R, Dal Poggetto G, Nilsson M, Morris GA. (2018) Improving the Interpretation of Small Molecule Diffusion Coefficients. *Anal Chem*, 90: 3987-3994.
- Evans R, Deng ZX, Rogerson AK, McLachlan AS, Richards JJ, Nilsson M, Morris GA. (2013) Quantitative Interpretation of Diffusion-Ordered NMR Spectra: Can We Rationalize Small Molecule Diffusion Coefficients? *Angew Chem Int Ed*, 52: 3199-3202.
- Evans R. (2020) The interpretation of small molecule diffusion coefficients: Quantitative use of diffusion-ordered NMR spectroscopy. *Prog Nucl Magn Reson Spectrosc*, 117: 33-69.
- Fan J, Zhang Q, Tochio H, Li M, Zhang M. (2001) Structural basis of diverse sequence-dependent target recognition by the 8 kDa dynein light chain. *J Mol Biol*, 306: 97-108.
- Fanò G, Biocca S, Fulle S, Mariggiò MA, Belia S, Calissano P. (1995) The S-100: a protein family in search of a function. *Prog Neurobiol*, 46: 71-82.
- Farrow NA, Zhang OW, Szabo A, Torchia DA, Kay LE. (1995) Spectral density-function mapping using N-15 relaxation data exclusively. *J Biomol NMR*, 6: 153-162.
- Felli I, Pierattelli R. (2015) *Intrinsically Disordered Proteins Studied by NMR Spectroscopy*. Springer
- Felli IC, Bermel W, Pierattelli R. (2021) Exclusively heteronuclear NMR experiments for the investigation of intrinsically disordered proteins: focusing on proline residues. *Magn Reson Discuss*, 2021: 1-20.
- Feng H, Jenkins LMM, Durell SR, Hayashi R, Mazur SJ, Cherry S, Tropea JE, Miller M, Wlodawer A, Appella E, Bai Y. (2009) Structural Basis for p300 Taz2-p53 TAD1 Binding and Modulation by Phosphorylation. *Structure*, 17: 202-210.
- Fernández C, Wüthrich K. (2003) NMR solution structure determination of membrane proteins reconstituted in detergent micelles. *FEBS Letters*, 555: 144-150.
- Fernandez-Fernandez MR, Veprintsev DB, Fersht AR. (2005) Proteins of the S100 family regulate the oligomerization of p53 tumor suppressor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102: 4735-4740.
- Fiegen D, Haeusler LC, Blumenstein L, Herbrand U, Dvorsky R, Vetter IR, Ahmadian MR. (2004) Alternative splicing of Rac1 generates Rac1b, a self-activating GTPase. *J Biol Chem*, 279: 4743-4749.
- Flory PJ. *Statistical mechanics of chain molecules*. Interscience Publishers, New York, 1969
- Follis AV, Llambi F, Merritt P, Chipuk JE, Green DR, Kriwacki RW. (2015) Pin1-Induced Proline Isomerization in Cytosolic p53 Mediates BAX Activation and Apoptosis. *Mol Cell*, 59: 677-684.
- Foroozandeh M, Adams RW, Meharry NJ, Jeannerat D, Nilsson M, Morris GA. (2014) Ultrahigh-resolution NMR spectroscopy. *Angew Chem Int Ed Engl*, 53: 6990-6992.
- Frauenfeld J, Löving R, Armache JP, Sonnen AF, Guettou F, Moberg P, Zhu L, Jegerschöld C, Flayhan A, Briggs JA, Garoff H, Löw C, Cheng Y, Nordlund P. (2016) A saposin-lipoprotein nanoparticle system for membrane proteins. *Nat Methods*, 13: 345-351.
- Fuxreiter M. (2018) Fuzziness in Protein Interactions-A Historical Perspective. *J Mol Biol*, 430: 2278-2287.
- Fürtig B, Richter C, Wöhnert J, Schwalbe H. (2003) NMR spectroscopy of RNA. *ChemBioChem*, 4: 936-962.
- Gal M, Edmonds KA, Milbradt AG, Takeuchi K, Wagner G. (2011) Speeding up direct 15N detection: HCaN 2D NMR experiment. *J Biomol NMR*, 51: 497-504.
- Garbow JR, Weitekamp DP, Pines A. (1982) Bilinear rotation decoupling of homonuclear scalar interactions. *Chemical Physics Letters*, 93: 504-509.
- Gibbs EB, Kriwacki RW. (2018) Direct detection of carbon and nitrogen nuclei for high-resolution analysis of intrinsically disordered proteins using NMR spectroscopy. *Methods*, 138: 39-46.

- Gierer A, Wirtz K. (1953) Molekulare Theorie der Mikroreibung - Molecular theory of microfriction. *Zeitschrift Für Naturforschung Section A*, 8: 532-538.
- Glover KJ, Whiles JA, Wu G, Yu N, Deems R, Struppe JO, Stark RE, Komives EA, Vold RR. (2001) Structural evaluation of phospholipid bicelles for solution-state studies of membrane-associated biomolecules. *Biophys J*, 81: 2163-2171.
- Goddard TD, Kneller DG. (2000) SPARKY 3. University of California, San Francisco
- Gołowicz D, Kasprzak P, Orekhov V, Kazimierczuk K. (2020) Fast time-resolved NMR with non-uniform sampling. *Prog Nucl Magn Reson Spectrosc*, 116: 40-55.
- Grigorian M, Andresen S, Tulchinsky E, Kriajevska M, Carlberg C, Kruse C, Cohn M, Ambartsumian N, Christensen A, Selivanova G, Lukanidin E. (2001) Tumor suppressor p53 protein is a new target for the metastasis-associated Mts1/S100A4 protein - Functional consequences of their interaction. *J Biol Chem*, 276: 22699-22708.
- Groves P, Palczewska M, Molero MD, Batta G, Canada FJ, Jimenez-Barbero J. (2004) Protein molecular weight standards can compensate systematic errors in diffusion-ordered spectroscopy. *Anal Biochem*, 331: 395-397.
- Grünberg R, Nilges M, Leckner J. (2006) Flexibility and conformational entropy in protein-protein binding. *Structure*, 14: 683-693.
- Guo X, Laryea E, Wilhelm M, Luy B, Nirschl H, Guthausen G. (2017) Diffusion in Polymer Solutions: Molecular Weight Distribution by PFG-NMR and Relation to SEC. *Macromol Chem Phys*, 218: 1600440.
- Gustafson CL, Parsley NC, Asimgil H, Lee HW, Ahlbach C, Michael AK, Xu H, Williams OL, Davis TL, Liu AC, Partch CL. (2017) A Slow Conformational Switch in the BMAL1 Transactivation Domain Modulates Circadian Rhythms. *Mol Cell*, 66: 447-457.e447.
- Halle B, Wennerstrom H. (1981) Interpretation of Magnetic-Resonance Data from Water Nuclei in Heterogeneous Systems. *J Chem Phys*, 75: 1928-1943.
- Hart PA, Marshall CJ. (1990) Amino acid 61 is a determinant of sensitivity of ras proteins to the ras GTPase activating protein. *Oncogene*, 5: 1099-1101.
- Hauser AS, Attwood MM, Rask-Andersen M, Schiöth HB, Gloriam DE. (2017) Trends in GPCR drug discovery: new agents, targets and indications. *Nat Rev Drug Discov*, 16: 829-842.
- Hilger D. (2021) The role of structural dynamics in GPCR-mediated signaling. *FEBS J*, 288: 2461-2489.
- Hiller S, Fiorito F, Wüthrich K, Wider G. (2005) Automated projection spectroscopy (APSY). *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102: 10876-10881.
- Hilton BA, Li Z, Musich PR, Wang H, Cartwright BM, Serrano M, Zhou XZ, Lu KP, Zou Y. (2015) ATR Plays a Direct Antiapoptotic Role at Mitochondria, which Is Regulated by Prolyl Isomerase Pin1. *Mol Cell*, 60: 35-46.
- Hiruta A, Oguri Y, Yokoi A, Matsumoto T, Oda Y, Tomohiro M, Hashimura M, Jiang Z, Tochimoto M, Nakagawa M, Saegusa M. (2020) S100A4/Nonmuscle Myosin IIA/p53 Axis Contributes to Aggressive Features in Ovarian High-Grade Serous Carcinoma. *Am J Pathol*, 190: 2304-2316.
- Hlavanda E, Kovács J, Oláh J, Orosz F, Medzihradszky KF, Ovádi J. (2002) Brain-specific p25 protein binds to tubulin and microtubules and induces aberrant microtubule assemblies at substoichiometric concentrations. *Biochemistry*, 41: 8657-8664.
- Hong J, Lu X, Deng Z, Xiao S, Yuan B, Yang K. (2019) How Melittin Inserts into Cell Membrane: Conformational Changes, Inter-Peptide Cooperation, and Disturbance on the Membrane. *Molecules*, 24.
- Horváth IT, Mehdi H, Fábos V, Boda L, Mika LT. (2008) γ -Valerolactone—a sustainable liquid for energy and carbon-based chemicals. *Green Chemistry*, 10: 238-242.

- Huang L, Xu Y, Cai G, Guan Z, Cai S. (2012) Downregulation of S100A4 expression by RNA interference suppresses cell growth and invasion in human colorectal cancer cells. *Oncol Rep*, 27: 917-922.
- Hwang TL, van Zijl PC, Mori S. (1998) Accurate quantitation of water-amide proton exchange rates using the phase-modulated CLEAN chemical EXchange (CLEANEX-PM) approach with a Fast-HSQC (FHSQC) detection scheme. *J Biomol NMR*, 11: 221-226.
- Inman KG, Baldisseri DM, Miller KE, Weber DJ. (2001) Backbone dynamics of the calcium-signaling protein apo-S100B as determined by ¹⁵N NMR relaxation. *Biochemistry*, 40: 3439-3448.
- Iqbal K, Liu F, Gong CX, Grundke-Iqbal I. (2010) Tau in Alzheimer disease and related tauopathies. *Curr Alzheimer Res*, 7: 656-664.
- Ishima R, Torchia DA. (1999) Estimating the time scale of chemical exchange of proteins from measurements of transverse relaxation rates in solution. *J Biomol NMR*, 14: 369-372.
- Jiang Y, Lee A, Chen J, Ruta V, Cadene M, Chait BT, MacKinnon R. (2003) X-ray structure of a voltage-dependent K⁺ channel. *Nature*, 423: 33-41.
- Johnson CS. (1999) Diffusion ordered nuclear magnetic resonance spectroscopy: principles and applications. *Progr Nucl Magn Reson Spectrosc*, 34: 203-256.
- Jones JA, Wilkins DK, Smith LJ, Dobson CM. (1997) Characterisation of protein unfolding by NMR diffusion measurements. *J Biomol NMR*, 10: 199-203.
- Kadeřávek P, Zapletal V, Rabatinová A, Krásný L, Sklenář V, Židek L. (2014) Spectral density mapping protocols for analysis of molecular motions in disordered proteins. *J Biomol NMR*, 58: 193-207.
- Kamm BaKMaSMaHTaSM. Biorefineries-Industrial Processes and Products: Status Quo and Future Directions Vol. 22008
- Kanelis V, Donaldson L, Muhandiram DR, Rotin D, Forman-Kay JD, Kay LE. (2000) Sequential assignment of proline-rich regions in proteins: Application to modular binding domain complexes. *J Biomol NMR*, 16: 253-259.
- Kapp RW. Isocyanates. In: Wexler P (szerk.), *Encyclopedia of Toxicology (Third Edition)*. Academic Press, Oxford, 2014: 1112-1131.
- Keller R. (2004) *The Computer Aided Resonance Assignment Tutorial*. Cantina, Goldau
- Kielec JM, Valentine KG, Babu CR, Wand AJ. (2009) Reverse micelles in integral membrane protein structural biology by solution NMR spectroscopy. *Structure*, 17: 345-351.
- Killian JA. (2003) Synthetic peptides as models for intrinsic membrane proteins. *FEBS Lett*, 555: 134-138.
- Kiss B, Duelli A, Radnai L, Kékesi KA, Katona G, Nyitray L. (2012) Crystal structure of the S100A4-nonmuscle myosin IIA tail fragment complex reveals an asymmetric target binding mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109: 6048-6053.
- Kjaergaard M, Brander S, Poulsen FM. (2011) Random coil chemical shift for intrinsically disordered proteins: effects of temperature and pH. *J Biomol NMR*, 49: 139-149.
- Kjaergaard M, Poulsen FM. (2011) Sequence correction of random coil chemical shifts: correlation between neighbor correction factors and changes in the Ramachandran distribution. *J Biomol NMR*, 50: 157-165.
- Klähn M, Rosta E, Warshel A. (2006) On the mechanism of hydrolysis of phosphate monoesters dianions in solutions and proteins. *J Am Chem Soc*, 128: 15310-15323.
- Kövér KE, Wéber E, Martinek TA, Monostori E, Batta G. (2010) (¹⁵N and (¹³C group-selective techniques extend the scope of STD NMR detection of weak host-guest interactions and ligand screening. *ChemBioChem*, 11: 2182-2187.
- Kriajevska M, Fischer-Larsen M, Moertz E, Vorm O, Tulchinsky E, Grigorian M, Ambartsumian N, Lukanidin E. (2002) Liprin beta 1, a member of the family of LAR transmembrane

- tyrosine phosphatase-interacting proteins, is a new target for the metastasis-associated protein S100A4 (Mts1). *J Biol Chem*, 277: 5229-5235.
- Kriajevska MV, Cardenas MN, Grigorian MS, Ambartsumian NS, Georgiev GP, Lukanidin EM. (1994) Non-muscle myosin heavy chain as a possible target for protein encoded by metastasis-related mts-1 gene. *J Biol Chem*, 269: 19679-19682.
- Křížová H, Židek L, Stone MJ, Novotny MV, Sklenář V. (2004) Temperature-dependent spectral density analysis applied to monitoring backbone dynamics of major urinary protein-I complexed with the pheromone 2-sec-butyl-4,5-dihydrothiazole. *J Biomol NMR*, 28: 369-384.
- Krois AS, Ferreon JC, Martinez-Yamout MA, Dyson HJ, Wright PE. (2016) Recognition of the disordered p53 transactivation domain by the transcriptional adapter zinc finger domains of CREB-binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 113: E1853-E1862.
- Kruse JP, Gu W. (2009) Modes of p53 regulation. *Cell*, 137: 609-622.
- Laguerre A, Löhr F, Henrich E, Hoffmann B, Abdul-Manan N, Connolly PJ, Perozo E, Moore JM, Bernhard F, Dötsch V. (2016) From Nanodiscs to Isotropic Bicelles: A Procedure for Solution Nuclear Magnetic Resonance Studies of Detergent-Sensitive Integral Membrane Proteins. *Structure*, 24: 1830-1841.
- Lee CW, Martinez-Yamout MA, Dyson HJ, Wright PE. (2010) Structure of the p53 Transactivation Domain in Complex with the Nuclear Receptor Coactivator Binding Domain of CREB Binding Protein. *Biochemistry*, 49: 9964-9971.
- Lee D, Walter KFA, Brückner A-K, Hilty C, Becker S, Griesinger C. (2008) Bilayer in Small Bicelles Revealed by Lipid-Protein Interactions Using NMR Spectroscopy. *J Am Chem Soc*, 130: 13822-13823.
- Lee H, Mok KH, Muhandiram R, Park KH, Suk JE, Kim DH, Chang J, Sung YC, Choi KY, Han KH. (2000) Local structural elements in the mostly unstructured transcriptional activation domain of human p53. *J Biol Chem*, 275: 29426-29432.
- Lee SY, Lee A, Chen J, MacKinnon R. (2005) Structure of the KvAP voltage-dependent K⁺ channel and its dependence on the lipid membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102: 15441-15446.
- Lei Z, Chen B, Koo YM, MacFarlane DR. (2017) Introduction: Ionic Liquids. *Chem Rev*, 117: 6633-6635.
- Leiter LM, Chen J, Marathe T, Tanaka M, Dutta A. (1996) Loss of transactivation and transrepression function, and not RPA binding, alters growth suppression by p53. *Oncogene*, 12: 2661-2668.
- Lescop E, Schanda P, Brutscher B. (2007) A set of BEST triple-resonance experiments for time-optimized protein resonance assignment. *J Magn Reson*, 187: 163-169.
- Levitt MH, Freeman RAY, Frenkiel T. Broadband Decoupling in High-Resolution Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. In: Waugh JS (szerk.), *Advances in Magnetic and Optical Resonance*. Academic Press, 1983: 47-110.
- Liang B, Tamm LK. (2016) NMR as a tool to investigate the structure, dynamics and function of membrane proteins. *Nat Struct Mol Biol*, 23: 468-474.
- Liang J, Jaffrey SR, Guo W, Snyder SH, Clardy J. (1999) Structure of the PIN/LC8 dimer with a bound peptide. *Nat Struct Biol*, 6: 735-740.
- Liebau J, Ye W, Mäler L. (2017) Characterization of fast-tumbling isotropic bicelles by PFG diffusion NMR. *Magn Reson Chem*, 55: 395-404.
- Liebl MC, Hofmann TG. (2019) Cell Fate Regulation upon DNA Damage: p53 Serine 46 Kinases Pave the Cell Death Road. *Bioessays*, 41: e1900127.
- Lightcap CM, Sun S, Lear JD, Rodeck U, Polenova T, Williams JC. (2008) Biochemical and structural characterization of the Pak1-LC8 interaction. *J Biol Chem*, 283: 27314-27324.

- Lin TL, Chen SH, Gabriel NE, Roberts MF. (1986) The use of small-angle neutron scattering to determine the structure and interaction of dihexanoylphosphatidylcholine micelles. *J Am Chem Soc*, 108: 3499-3507.
- Lind J, Gräslund A, Mäler L. (2006) Membrane interactions of dynorphins. *Biochemistry*, 45: 15931-15940.
- Lipari G, Szabo A. (1982a) Model-Free Approach to the Interpretation of Nuclear Magnetic-Resonance Relaxation in Macromolecules 1. Theory and Range of Validity. *J Am Chem Soc*, 104: 4546-4559.
- Lipari G, Szabo A. (1982b) Model-Free Approach to the Interpretation of Nuclear Magnetic-Resonance Relaxation in Macromolecules 2. Analysis of Experimental Results. *J Am Chem Soc*, 104: 4559-4570.
- Lipfert J, Columbus L, Chu VB, Lesley SA, Doniach S. (2007) Size and Shape of Detergent Micelles Determined by Small-Angle X-ray Scattering. *J Phys Chem B*, 111: 12427-12438.
- Liriano MA, Varney KM, Wright NT, Hoffman CL, Toth EA, Ishima R, Weber DJ. (2012) Target binding to S100B reduces dynamic properties and increases Ca(2+)-binding affinity for wild type and EF-hand mutant proteins. *J Mol Biol*, 423: 365-385.
- Lo KW, Naisbitt S, Fan JS, Sheng M, Zhang M. (2001) The 8-kDa dynein light chain binds to its targets via a conserved (K/R)XTQT motif. *J Biol Chem*, 276: 14059-14066.
- Luchette PA, Vetman TN, Prosser RS, Hancock RE, Nieh MP, Glinka CJ, Krueger S, Katsaras J. (2001) Morphology of fast-tumbling bicelles: a small angle neutron scattering and NMR study. *Biochim Biophys Acta*, 1513: 83-94.
- Ludzia P, Akiyoshi B, Redfield C. (2020) (1)H, (13)C and (15)N resonance assignments for the microtubule-binding domain of the kinetoplastid kinetochore protein KKT4 from *Trypanosoma brucei*. *Biomol NMR Assign*, 14: 309-315.
- Lukanidin E, Sleeman JP. (2012) Building the niche: the role of the S100 proteins in metastatic growth. *Semin Cancer Biol*, 22: 216-225.
- Lum JK, Neuweiler H, Fersht AR. (2012) Long-range modulation of chain motions within the intrinsically disordered transactivation domain of tumor suppressor p53. *J Am Chem Soc*, 134: 1617-1622.
- Lupas AN, Bassler J, Dunin-Horkawicz S. The Structure and Topology of α -Helical Coiled Coils. In: Parry DAD, Squire JM (szerk.), *Fibrous Proteins: Structures and Mechanisms*. Springer International Publishing, Cham, 2017: 95-129.
- Majeed S, Ahmad AB, Sehar U, Georgieva ER. (2021) Lipid Membrane Mimetics in Functional and Structural Studies of Integral Membrane Proteins. *Membranes (Basel)*, 11.
- Makhatadze GI, Privalov PL. (1995) Energetics of protein structure. *Adv Protein Chem*, 47: 307-425.
- Makinwa Y, Musich PR, Zou Y. (2020) Phosphorylation-Dependent Pin1 Isomerization of ATR: Its Role in Regulating ATR's Anti-apoptotic Function at Mitochondria, and the Implications in Cancer. *Front Cell Dev Biol*, 8.
- Malashkevich VN, Varney KM, Garrett SC, Wilder PT, Knight D, Charpentier TH, Ramagopal UA, Almo SC, Weber DJ, Bresnick AR. (2008) Structure of Ca²⁺-bound S100A4 and its interaction with peptides derived from nonmuscle myosin-IIA. *Biochemistry*, 47: 5111-5126.
- Mantylahti S, Aitio O, Hellman M, Permi P. (2010) HA-detected experiments for the backbone assignment of intrinsically disordered proteins. *J Biomol NMR*, 47: 171-181.
- Mantylahti S, Hellman M, Permi P. (2011) Extension of the HA-detection based approach: (HCA)CON(CA)H and (HCA)NCO(CA)H experiments for the main-chain assignment of intrinsically disordered proteins. *J Biomol NMR*, 49: 99-109.

- Marinova Z, Vukojevic V, Surcheva S, Yakovleva T, Cebers G, Pasikova N, Usynin I, Hugonin L, Fang W, Hallberg M, Hirschberg D, Bergman T, Langel U, Hauser KF, Pramanik A, Aldrich JV, Gräslund A, Terenius L, Bakalkin G. (2005) Translocation of dynorphin neuropeptides across the plasma membrane. A putative mechanism of signal transmission. *J Biol Chem*, 280: 26360-26370.
- Markowitz J, Mackerell AD, Jr., Carrier F, Charpentier TH, Weber DJ. (2005) Design of Inhibitors for S100B. *Curr Top Med Chem*, 5: 1093-1108.
- Marsh JA, Forman-Kay JD. (2010) Sequence Determinants of Compaction in Intrinsically Disordered Proteins. *Biophys J*, 98: 2383-2390.
- Marsh JA, Singh VK, Jia ZC, Forman-Kay JD. (2006) Sensitivity of secondary structure propensities to sequence differences between alpha- and gamma-synuclein: Implications for fibrillation. *Prot Sci*, 15: 2795-2804.
- Mateos B, Conrad-Billroth C, Schiavina M, Beier A, Kontaxis G, Konrat R, Felli IC, Pierattelli R. (2020) The Ambivalent Role of Proline Residues in an Intrinsically Disordered Protein: From Disorder Promoters to Compaction Facilitators. *J Mol Biol*, 432: 3093-3111.
- Meade RM, Fairlie DP, Mason JM. (2019) Alpha-synuclein structure and Parkinson's disease – lessons and emerging principles. *Molecular Neurodegeneration*, 14: 29.
- Medina-Enríquez MM, Lopez-León S, Carlos-Escalante JA, Aponte-Torres Z, Cuapio A, Wegman-Ostrosky T. (2020) ACE2: the molecular doorway to SARS-CoV-2. *Cell Biosci*, 10: 148.
- Meszáros B, Erdos G, Dosztanyi Z. (2018) IUPred2A: context-dependent prediction of protein disorder as a function of redox state and protein binding. *Nucl Acids Res*, 46: W329-W337.
- Milburn MP, Jeffrey KR. (1987) Dynamics of the phosphate group in phospholipid bilayers. A ³¹P nuclear relaxation time study. *Biophys J*, 52: 791-799.
- Mishra SK, Siddique HR, Saleem M. (2012) S100A4 calcium-binding protein is key player in tumor progression and metastasis: preclinical and clinical evidence. *Cancer Metastasis Rev*, 31: 163-172.
- Miskei M, Antal C, Fuxreiter M. (2017) FuzDB: database of fuzzy complexes, a tool to develop stochastic structure-function relationships for protein complexes and higher-order assemblies. *Nucl Acids Res*, 45: D228-D235.
- Momand J, Zambetti GP, Olson DC, George D, Levine AJ. (1992) The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. *Cell*, 69: 1237-1245.
- Morin S. (2011) A practical guide to protein dynamics from N-15 spin relaxation in solution. *Progr Nucl Magn Reson Spectrosc*, 59: 245-262.
- Morrison EA, Henzler-Wildman KA. (2012) Reconstitution of integral membrane proteins into isotropic bicelles with improved sample stability and expanded lipid composition profile. *Biochim Biophys Acta*, 1818: 814-820.
- Mortensen HG, Jensen GV, Hansen SK, Vosegaard T, Pedersen JS. (2018) Structure of Phospholipid Mixed Micelles (Bicelles) Studied by Small-Angle X-ray Scattering. *Langmuir*, 34: 14597-14607.
- Murakami N, Kotula L, Hwang YW. (2000) Two distinct mechanisms for regulation of nonmuscle myosin assembly via the heavy chain: phosphorylation for MIIB and mts 1 binding for MIIA. *Biochemistry*, 39: 11441-11451.
- Nakamura K, Greenwood A, Binder L, Bigio EH, Denial S, Nicholson L, Zhou XZ, Lu KP. (2012) Proline Isomer-Specific Antibodies Reveal the Early Pathogenic Tau Conformation in Alzheimer's Disease. *Cell*, 149: 232-244.
- Nath J, Smith T, Hollis A, Ebbs S, Canbilen SW, Tennant DA, Ready AR, Ludwig C. (2016) (¹³C) glucose labelling studies using 2D NMR are a useful tool for determining ex vivo

- whole organ metabolism during hypothermic machine perfusion of kidneys. *Transplant Res*, 5: 7.
- Neira JL, Bintz J, Arruebo M, Rizzuti B, Bonacci T, Vega S, Lanas A, Velázquez-Campoy A, Iovanna JL, Abián O. (2017) Identification of a Drug Targeting an Intrinsically Disordered Protein Involved in Pancreatic Adenocarcinoma. *Sci Rep*, 7: 39732.
- Nielsen JT, Mulder FAA. (2018) POTENCI: prediction of temperature, neighbor and pH-corrected chemical shifts for intrinsically disordered proteins. *J Biomol NMR*, 70: 141-165.
- Nielsen N, Malmendal A, Vosegaard T. (2004) Techniques and applications of NMR to membrane proteins. *Mol Membr Biol*, 21: 129-141.
- Nowakowski M, Jaremko Ł, Jaremko M, Zhukov I, Belczyk A, Bierzyński A, Ejchart A. (2011) Solution NMR structure and dynamics of human apo-S100A1 protein. *J Struct Biol*, 174: 391-399.
- Nowakowski M, Ruszczyńska-Bartnik K, Budzińska M, Jaremko L, Jaremko M, Zdanowski K, Bierzyński A, Ejchart A. (2013) Impact of calcium binding and thionylation of S100A1 protein on its nuclear magnetic resonance-derived structure and backbone dynamics. *Biochemistry*, 52: 1149-1159.
- Nygaard M, Kragelund BB, Papaleo E, Lindorff-Larsen K. (2017) An Efficient Method for Estimating the Hydrodynamic Radius of Disordered Protein Conformations. *Biophys J*, 113: 550-557.
- Oda K, Arakawa H, Tanaka T, Matsuda K, Tanikawa C, Mori T, Nishimori H, Tamai K, Tokino T, Nakamura Y, Taya Y. (2000) p53AIP1, a potential mediator of p53-dependent apoptosis, and its regulation by Ser-46-phosphorylated p53. *Cell*, 102: 849-862.
- Odoemelam CS, Percival B, Wallis H, Chang MW, Ahmad Z, Scholey D, Burton E, Williams IH, Kamerlin CL, Wilson PB. (2020) G-Protein coupled receptors: structure and function in drug discovery. *RSC Adv*, 10: 36337-36348.
- Olivier M, Goldgar DE, Sodha N, Ohgaki H, Kleihues P, Hainaut P, Eeles RA. (2003) Li-Fraumeni and related syndromes: correlation between tumor type, family structure, and TP53 genotype. *Cancer Res*, 63: 6643-6650.
- Orre LM, Panizza E, Kaminsky VO, Vernet E, Gräslund T, Zhivotovsky B, Lehtiö J. (2013) S100A4 interacts with p53 in the nucleus and promotes p53 degradation. *Oncogene*, 32: 5531-5540.
- Ortega A, Amorós D, García de la Torre J. (2011) Prediction of hydrodynamic and other solution properties of rigid proteins from atomic- and residue-level models. *Biophys J*, 101: 892-898.
- Osakada K, Yoshikawa S, Ikariya T. (1982) Preparation And Properties Of Hydride Triphenylphosphine Ruthenium Complexes With 3-Formyl (Or Acyl) Propionate [RuH(OCOCHRCHRCOR')(PPH3)3] (R=H, CH3, C2H5 - R'=H, CH3, C6H5) AND With 2-Formyl (Or Acyl) Benzoate [RuH(O-OCOC6H4COR')(PPH3)3] (R'=H, CH3). *J Organomet Chem*, 231: 79-90.
- Overington JP, Al-Lazikani B, Hopkins AL. (2006) How many drug targets are there? *Nat Rev Drug Discov*, 5: 993-996.
- Palmer AG, 3rd, Koss H. (2019) Chemical Exchange. *Methods Enzymol*, 615: 177-236.
- Palmer AG, Rance M, Wright PE. (1991) Intramolecular motions of a zinc finger DNA-binding domain from Xfin characterized by proton-detected natural abundance carbon-13 heteronuclear NMR spectroscopy. *J Am Chem Soc*, 113: 4371-4380.
- Palmer AG. (2014) Chemical exchange in biomacromolecules: Past, present, and future. *J Magn Reson*, 241: 3-17.
- Pathuri P, Vogeley L, Luecke H. (2008) Crystal structure of metastasis-associated protein S100A4 in the active calcium-bound form. *J Mol Biol*, 383: 62-77.

- Prabakaran P, Xiao X, Dimitrov DS. (2004) A model of the ACE2 structure and function as a SARS-CoV receptor. *Biochem Biophys Res Commun*, 314: 235-241.
- Radnai L, Rapali P, Hódi Z, Süveges D, Molnár T, Kiss B, Bécsi B, Erdödi F, Buday L, Kardos J, Kovács M, Nyitray L. (2010) Affinity, avidity, and kinetics of target sequence binding to LC8 dynein light chain isoforms. *J Biol Chem*, 285: 38649-38657.
- Raj N, Attardi LD. (2017) The Transactivation Domains of the p53 Protein. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 7.
- Ramagopal UA, Dulyaninova NG, Varney KM, Wilder PT, Nallamsetty S, Brenowitz M, Weber DJ, Almo SC, Bresnick AR. (2013) Structure of the S100A4/myosin-IIA complex. *BMC Structural Biology*, 13: 31.
- Ramirez LS, Pande J, Shekhtman A. (2019) Helical Structure of Recombinant Melittin. *J Phys Chem B*, 123: 356-368.
- Rao Kakita VM, Bopardikar M, Kumar Shukla V, Rachineni K, Ranjan P, Singh JS, Hosur Ramakrishna V. (2018) An efficient combination of BEST and NUS methods in multidimensional NMR spectroscopy for high throughput analysis of proteins. *RSC Advances*, 8: 17616-17621.
- Rapali P, Szenes Á, Radnai L, Bakos A, Pál G, Nyitray L. (2011) DYNLL/LC8: a light chain subunit of the dynein motor complex and beyond. *FEBS J*, 278: 2980-2996.
- Reardon PN, Jara KA, Rolland AD, Smith DA, Hoang HTM, Prell JS, Barbar EJ. (2020) The dynein light chain 8 (LC8) binds predominantly "in-register" to a multivalent intrinsically disordered partner. *J Biol Chem*, 295: 4912-4922.
- Roos M, Ott M, Hofmann M, Link S, Rössler E, Balbach J, Krushelnitsky A, Saalwächter K. (2016) Coupling and Decoupling of Rotational and Translational Diffusion of Proteins under Crowding Conditions. *J Am Chem Soc*, 138: 10365-10372.
- Saborano R, Eraslan Z, Roberts J, Khanim FL, Lalor PF, Reed MAC, Günther UL. (2019) A framework for tracer-based metabolism in mammalian cells by NMR. *Sci Rep*, 9: 2520.
- Saha T, Kar RK, Sa G. (2015) Structural and sequential context of p53: A review of experimental and theoretical evidence. *Prog Biophys Mol Biol*, 117: 250-263.
- Sanders CR, Prosser RS. (1998) Bicelles: a model membrane system for all seasons? *Structure*, 6: 1227-1234.
- Sattler M, Schleucher J, Griesinger C. (1999) Heteronuclear multidimensional NMR experiments for the structure determination of proteins in solution employing pulsed field gradients. *Progr Nucl Magn Reson Spectrosc*, 34: 93-158.
- Schanda P, Brutscher B. (2005) Very fast two-dimensional NMR spectroscopy for real-time investigation of dynamic events in proteins on the time scale of seconds. *J Am Chem Soc*, 127: 8014-8015.
- Schätzlein MP, Becker J, Schulze-Sünninghausen D, Pineda-Lucena A, Herance JR, Luy B. (2018) Rapid two-dimensional ALSOFASST-HSQC experiment for metabolomics and fluxomics studies: application to a (^{13}C) -enriched cancer cell model treated with gold nanoparticles. *Anal Bioanal Chem*, 410: 2793-2804.
- Schilling F, Warner LR, Gershenson NI, Skinner TE, Sattler M, Glaser SJ. (2014) Next-generation heteronuclear decoupling for high-field biomolecular NMR spectroscopy. *Angew Chem Int Ed Engl*, 53: 4475-4479.
- Schweins T, Scheffzek K, Assheuer R, Wittinghofer A. (1997) The role of the metal ion in the p21ras catalysed GTP-hydrolysis: Mn^{2+} versus Mg^{2+} . *J Mol Biol*, 266: 847-856.
- Scolnick DM, Chehab NH, Stavridi ES, Lien MC, Caruso L, Moran E, Berger SL, Halazonetis TD. (1997) CREB-binding protein and p300/CBP-associated factor are transcriptional coactivators of the p53 tumor suppressor protein. *Cancer Res*, 57: 3693-3696.

- Sellers JR, Thirumurugan K, Sakamoto T, Hammer JA, 3rd, Knight PJ. (2008) Calcium and cargoes as regulators of myosin 5a activity. *Biochem Biophys Res Commun*, 369: 176-181.
- Sellers JR. (2000) Myosins: a diverse superfamily. *Biochim Biophys Acta*, 1496: 3-22.
- Singh SK, Savoy AW. (2020) Ionic liquids synthesis and applications: An overview. *J Mol Liq*, 297: 112038.
- Situ AJ, Schmidt T, Mazumder P, Ulmer TS. (2014) Characterization of membrane protein interactions by isothermal titration calorimetry. *J Mol Biol*, 426: 3670-3680.
- Sridharan V, Menéndez JC. (2010) Cerium(IV) ammonium nitrate as a catalyst in organic synthesis. *Chem Rev*, 110: 3805-3849.
- Steiner H, Hultmark D, Engström A, Bennich H, Boman HG. (1981) Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity. *Nature*, 292: 246-248.
- Stejskal E, Tanner J. (1965) Spin Diffusion Measurements: Spin Echoes in the Presence of a Time-Dependent Field Gradient. *J Chem Phys*, 42: 288-292.
- Sun X, Dyson HJ, Wright PE. (2021) A phosphorylation-dependent switch in the disordered p53 transactivation domain regulates DNA binding. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 118.
- Takahashi M, Tomizawa K, Fujita SC, Sato K, Uchida T, Imahori K. (1993) A brain-specific protein p25 is localized and associated with oligodendrocytes, neuropil, and fiber-like structures of the CA3 hippocampal region in the rat brain. *J Neurochem*, 60: 228-235.
- Tausk RJM, Van Esch J, Karmiggelt J, Voordouw G, Overbeek JTG. (1974) Physical chemical studies of short-chain lecithin homologues. II: Micellar weights of dihexanoyl- and diheptanoyllecithin. *Biophys Chem*, 1: 184-203.
- Theillet FX, Kalmar L, Tompa P, Han KH, Selenko P, Dunker AK, Daughdrill GW, Uversky VN. (2013) The alphabet of intrinsic disorder: I. Act like a Pro: On the abundance and roles of proline residues in intrinsically disordered proteins. *Intrinsically Disord Proteins*, 1: e24360.
- Tikhonova IG, Costanzi S. (2009) Unraveling the structure and function of G protein-coupled receptors through NMR spectroscopy. *Curr Pharm Des*, 15: 4003-4016.
- Tompa P, Fuxreiter M. (2008) Fuzzy complexes: polymorphism and structural disorder in protein-protein interactions. *Trends Biochem Sci*, 33: 2-8.
- Tompa P. (2002) Intrinsically unstructured proteins. *Trends Biochem Sci*, 27: 527-533.
- Triba MN, Warschawski DE, Devaux PF. (2005) Reinvestigation by phosphorus NMR of lipid distribution in bicelles. *Biophys J*, 88: 1887-1901.
- Unnerståle S, Lind J, Papadopoulos E, Måler L. (2009) Solution structure of the HsapBK K⁺ channel voltage-sensor paddle sequence. *Biochemistry*, 48: 5813-5821.
- Upare PP, Yoon J-W, Kim MY, Kang H-Y, Hwang DW, Hwang YK, Kung HH, Chang J-S. (2013) Chemical conversion of biomass-derived hexose sugars to levulinic acid over sulfonic acid-functionalized graphene oxide catalysts. *Green Chemistry*, 15: 2935-2943.
- Urbanek A, Popovic M, Elena-Real CA, Morato A, Estana A, Fournet A, Allemand F, Gil AM, Cativiela C, Cortes J, Jimenez AI, Sibille N, Bernado P. (2020) Evidence of the Reduced Abundance of Proline cis Conformation in Protein Poly Proline Tracts. *J Am Chem Soc*, 142: 7976-7986.
- Uversky VN, Dunker AK. (2012a) *Intrinsically Disordered Protein Analysis Volume 1, Methods and Experimental Tools*. Humana Press
- Uversky VN, Dunker AK. (2012b) *Intrinsically Disordered Protein Analysis: Volume 2, Methods and Experimental Tools*. Springer-Verlag New York
- Uversky VN, Gillespie JR, Fink AL. (2000) Why are "natively unfolded" proteins unstructured under physiologic conditions? *Proteins*, 41: 415-427.
- Uversky VN, Santambrogio C, Brocca S, Grandori R. (2012) Length-dependent compaction of intrinsically disordered proteins. *FEBS Lett*, 586: 70-73.

- Uversky VN. (2002) Natively unfolded proteins: A point where biology waits for physics. *Prot Sci*, 11: 739-756.
- Uversky VN. Intrinsically Disordered Proteins. In: Renaud JP (szerk.), *Structural Biology in Drug Discovery*. John Wiley & Sons, 2020: 587-612.
- Vallely KM, Rustandi RR, Ellis KC, Varlamova O, Bresnick AR, Weber DJ. (2002) Solution structure of human Mts1 (S100A4) as determined by NMR spectroscopy. *Biochemistry*, 41: 12670-12680.
- van Dam L, Karlsson G, Edwards K. (2004) Direct observation and characterization of DMPC/DHPC aggregates under conditions relevant for biological solution NMR. *Biochim Biophys Acta- Biomembranes*, 1664: 241-256.
- van der Waal, J.C. and de Jong, E. (2016). Avantium Chemicals: The High Potential for the Levulinic Product Tree. In *Industrial Biorenewables*, P. Domínguez de María (Ed.).
- van Dieck J, Teufel DP, Jaulent AM, Fernandez-Fernandez MR, Rutherford TJ, Wyslouch-Cieszynska A, Fersht AR. (2009) Posttranslational Modifications Affect the Interaction of S100 Proteins with Tumor Suppressor p53. *J Mol Biol*, 394: 922-930.
- Vekariya RL. (2017) A review of ionic liquids: Applications towards catalytic organic transformations. *J Mol Liq*, 227: 44-60.
- Vestergaard M, Kraft JF, Vosegaard T, Thøgersen L, Schiøtt B. (2015) Bicelles and Other Membrane Mimics: Comparison of Structure, Properties, and Dynamics from MD Simulations. *J Phys Chem B*, 119: 15831-15843.
- Vicente-Manzanares M, Ma X, Adelstein RS, Horwitz AR. (2009) Non-muscle myosin II takes centre stage in cell adhesion and migration. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 10: 778-790.
- Vise PD, Baral B, Latos AJ, Daughdrill GW. (2005) NMR chemical shift and relaxation measurements provide evidence for the coupled folding and binding of the p53 transactivation domain. *Nucl Acids Res*, 33: 2061-2077.
- Vold RR, Prosser RS, Deese AJ. (1997) Isotropic solutions of phospholipid bicelles: a new membrane mimetic for high-resolution NMR studies of polypeptides. *J Biomol NMR*, 9: 329-335.
- Voronoi G. (1908) Nouvelles applications des paramètres continus à la théorie des formes quadratiques. Deuxième mémoire. Recherches sur les paralléloèdres primitifs. *Journal für die reine und angewandte Mathematik (Crelles Journal)*, 1908: 198-287.
- Vranken WF, Boucher W, Stevens TJ, Fogh RH, Pajon A, Llinas P, Ulrich EL, Markley JL, Ionides J, Laue ED. (2005) The CCPN data model for NMR spectroscopy: Development of a software pipeline. *Proteins*, 59: 687-696.
- Vuister GW, Bax A. (1992) Resolution enhancement and spectral editing of uniformly ^{13}C -enriched proteins by homonuclear broadband ^{13}C decoupling. *J Magn Reson*, 98: 428-435.
- Vuister GW, Bax A. (1993) Quantitative J correlation: a new approach for measuring homonuclear three-bond J(HN α) coupling constants in ^{15}N -enriched proteins. *J Am Chem Soc*, 115: 7772-7777.
- Vuister GW, Bax A. (1994) Measurement of four-bond HN-H α J-couplings in staphylococcal nuclease. *J Biomol NMR*, 4: 193-200.
- Wagner W, Fodor E, Ginsburg A, Hammer JA, 3rd. (2006) The binding of DYNLL2 to myosin Va requires alternatively spliced exon B and stabilizes a portion of the myosin's coiled-coil domain. *Biochemistry*, 45: 11564-11577.
- Wang L, Hare M, Hays TS, Barbar E. (2004) Dynein light chain LC8 promotes assembly of the coiled-coil domain of swallow protein. *Biochemistry*, 43: 4611-4620.
- Warschawski DE, Arnold AA, Beaugrand M, Gravel A, Chartrand É, Marcotte I. (2011) Choosing membrane mimetics for NMR structural studies of transmembrane proteins. *Biochim Biophys Acta*, 1808: 1957-1974.

- Wilkins DK, Grimshaw SB, Receveur V, Dobson CM, Jones JA, Smith LJ. (1999) Hydrodynamic radii of native and denatured proteins measured by pulse field gradient NMR techniques. *Biochemistry*, 38: 16424-16431.
- Wishart DS, Bigam CG, Holm A, Hodges RS, Sykes BD. (1995) H-1, C-13 and N-15 Random Coil NMR Chemical-Shifts of the Common Amino-Acids 1. Investigations of Nearest-Neighbor Effects. *J Biomol NMR*, 5: 67-81.
- Wishart DS, Sykes BD. (1994) The C-13 Chemical-Shift Index - A Simple Method For The Identification Of Protein Secondary Structure Using C-13 Chemical-Shift Data. *J Biomol NMR*, 4: 171-180.
- Wong LE, Kim TH, Muhandiram DR, Forman-Kay JD, Kay LE. (2020) NMR Experiments for Studies of Dilute and Condensed Protein Phases: Application to the Phase-Separating Protein CAPRIN1. *J Am Chem Soc*, 142: 2471-2489.
- Wright NT, Inman KG, Levine JA, Cannon BR, Varney KM, Weber DJ. (2008) Refinement of the solution structure and dynamic properties of Ca(2+)-bound rat S100B. *J Biomol NMR*, 42(4):279-86
- Yamamoto K, Soong R, Ramamoorthy A. (2009) Comprehensive analysis of lipid dynamics variation with lipid composition and hydration of bicelles using nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy. *Langmuir*, 25: 7010-7018.
- Yang D, Kay LE. (1996) Contributions to conformational entropy arising from bond vector fluctuations measured from NMR-derived order parameters: application to protein folding. *J Mol Biol*, 263: 369-382.
- Ying J, Roche J, Bax A. (2014) Homonuclear decoupling for enhancing resolution and sensitivity in NOE and RDC measurements of peptides and proteins. *J Magn Reson*, 241: 97-102.
- Zangger K, Sterk H. (1997) Homonuclear Broadband-Decoupled NMR Spectra. *J Magn Reson*, 124: 486-489.
- Zhan YA, Ytreberg FM. (2015) The cis conformation of proline leads to weaker binding of a p53 peptide to MDM2 compared to trans. *Arch Biochem Biophys.*, 575: 22-29.
- Zhukov I, Ejchart A, Bierzyński A. (2008) Structural and motional changes induced in apo-S100A1 protein by the disulfide formation between its Cys 85 residue and beta-mercaptoethanol. *Biochemistry*, 47: 640-650.
- Zimmer DB, Weber DJ. (2010) The Calcium-Dependent Interaction of S100B with Its Protein Targets. *Cardiovasc Psychiatry Neurol*, 2010.

8. Köszönetnyilvánítás

Hosszú út vezetett a bemutatott eredmények eléréséhez, amit értelemszerűen egyedül nem lehet megtenni. Fontos egy ilyen kalandban a tapasztaltabb vezetők jelenléte, mert ők azok, akik a kémiai/biológiai rendszerekre való általánosabb rálátást, a szakma csínyját-bínját tudják átadni. Szerencsés voltam ilyen tekintetben, hiszen Horváth István Tamás, rövid ideig Náray-Szabó Gábor, majd Perczel András kutatócsoportjaiban dolgozhattam. Istvánnak köszönhetően kerültem az ELTE Kémia Intézetébe, ő volt az, aki mindig kreatív gondolkodásra serkentett, a „think out of the box” gyakorlására. A biológiai kérdések fele való fordulás a Gábor csoportjában kezdődött el. Az infrastrukturális háttér ilyen kutatási területeken kiemelten fontos, és András érdeme, hogy a 700 MHz-es készülék sikeresen landolt az ELTE-n. A bemutatott eredmények nagyrésze is ezen a készüléken született. Az András által vezetett kutatócsoportban hosszú időt töltöttem el, és lehetőségem volt az NMR spektroszkópiai kutatások sokféle arcát elsajátítani. Köszönettel tartozom Andrásnak, hogy hagyta ezt az utat járnom.

A biológiai rendszerek vizsgálatánál elengedhetetlenek a jó együttműködések. Nyitrai László csoportjával régóta dolgozunk együtt, neki köszönhetem azt a látásmódot, amivel az ilyen tanulmányokat figyelemmel kell kísérni. Hálás köszönetem Radnai László, Kiss Bence, Ecsédi Péter kollégáknak a jó minőségű izotóp jelölt mintákért. További sikeres együttműködésünk volt Vértessy Beáta, Ovádi Judit, Reményi Attila, Málnási-Csizmadia András csoportjaival.

A módszertani megközelítések nemzetközi együttműködésben születtek. Sokat köszönhetek a karlsruhei KIT egyetemről Burkhard Luynak és csoportjának, elsősorban Jens Hallernek, hogy a pulzus szekvencia fejlesztés rejtelseibe (és buktatóiba) bevezettek. Hálás vagyok a Bruker cégtől Wolfgang Bermelnek, nem csupán a módszerfejlesztésben, de a mindennapi mérésekben adott tanácsaiért és segítségéért.

A membránmimetikumokkal posztdoktori tanulmányaim során kerültem kapcsolatba, köszönet a lehetőségért stockholmi egyetem biofizika tanszékén Astrid Gräslundnak és Lena Mälernek, akikkel a kutatásokat tudományos együttműködések keretében is folytattuk. Az ott eltöltött idő szakmailag, és emberileg is kellemes volt.

Sokat tanultam más módszerekről. Ebben nagy szerepe volt Bóta Attila és Wacha András kollegáknak, jólesően gondolok vissza (a még mindig nem lezárt) SAXS és bicellák kérdéskörben folytatott mélyreható tudományos fejtegetéseinkre. Karancsiné Menyhárd Dórának köszönöm az MD szimulációk kapcsán nyújtott segítségét. Hasan Mehdi a szerves kémiai szintézisek, katalizátorok és ionos folyadékok világában való eligazodásom istápolta.

Külön köszönettel tartozom Kövér Katalinnak, Batta Gyulának és Bányai Istvánnak a mindig önzetlen segítségért, tanácsokért.

A dolgozatban elért eredmények jórésze nem született volna meg elkötelezett és lelkes doktoranduszok nélkül, a velük együtt végzett munkát kifejezetten értékesnek tartom. Dudás Erika, Pálffy Gyula és Sebák Fanni eredményei vannak a dolgozatban, a jelenleg folyó kutatások már a kitekintés és a továbbgondolás részét képezik, ami Szabó Csenge Lilla és Kovács Dániel

nevéhez fűződik elsősorban. Jó volt és jó veletek együtt dolgozni, és gondolkozni! Fanninak külön köszönöm a segédkezést az irodalomjegyzék egységesítésében.

Természetesen a készülék rendeltetésszerű működése sem elhanyagolható tényező, nagy köszönettel tartozom Molnár Károlynak, aki minden alkalommal azonnali segítséget nyújtott, és akitől nagyon sokat tanultam.

Az egyetemi munka mellett kell lennie egy másik világnak, ami a kikapcsolódást és a háttérrel biztosítja. Nagyon hálás vagyok családomnak, szüleimnek, hogy ez mindig ott volt, és van, és hogy erre a támogatásra mindig számíthatok! Köszönöm barátaimnak a biztatást, a kirándulásokat és szénhidrátbombákat, amik a holtpontokon átlendítettek és a dolgozat elkészítését katalizálták.

Végezetül azt is el kell mondanom, hogy ugyan erőfeszítés és néha soha véget nem érő érzés volt eme értekezés elkészítése, de ez az áttekintés hasznosnak bizonyult. Azon felül, hogy több tématerületen egy rendrakást is eredményezett, az a jó érzés fogalmazódott meg bennem, hogy megérte! Köszönetem tehát mindenkinek, aki ehhez hozzájárult!