

# Széles jelű NMR-spektroszkópia alkalmazása egyes rendezetlen fehérjék hidratációjának vizsgálatára

MTA doktori értekezés

***Dr. Bokor Mónika Zsuzsanna***



*HUN-REN Wigner Fizikai Kutatóközpont*

Budapest, 2025.

mbokor\_337\_25

## Tartalomjegyzék

|                                                                                 |     |
|---------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Jelölések, rövidítések és idegen kifejezések jegyzéke.....                      | 5   |
| Köszönetnyilvánítás.....                                                        | 7   |
| I. Bevezetés.....                                                               | 8   |
| II. Tudományos előzmények.....                                                  | 11  |
| A. Fehérjék – általános leírás, kémiai kötések és kölcsönhatások, típusok ..... | 12  |
| I. Vízszerkezet és -dinamika a fehérjék körül .....                             | 16  |
| II. Fehérje-fehérje kölcsönhatások .....                                        | 17  |
| III. A fehérjeoldatok általános tulajdonságai.....                              | 19  |
| IV. Rendezetlen fehérjék .....                                                  | 20  |
| B. Vizsgált fehérjék szerkezeti és biológiai háttere .....                      | 24  |
| I. $\alpha$ -szinukleinek.....                                                  | 24  |
| II. $\beta_4$ -timozin, stabilin-2 citoplazmadomén és komplexük .....           | 30  |
| C. Széles jelű $^1\text{H}$ NMR-mérés és értelmezése.....                       | 33  |
| III. Célkitűzések.....                                                          | 36  |
| IV. Anyagok és módszerek.....                                                   | 38  |
| A. Fehérjék előállítása .....                                                   | 39  |
| B. Széles jelű $^1\text{H}$ NMR mérések fagyott fehérjeoldatokon .....          | 41  |
| III. Mérési eredmények és értelmezésük .....                                    | 44  |
| A. A fagyott fehérjeoldatok általános tulajdonságai .....                       | 45  |
| I. Széles jelű NMR-spektroszkópia elve és részletei .....                       | 47  |
| II. $^1\text{H}$ NMR fid-jel és spektrum .....                                  | 50  |
| III. Olvadási diagram kiértékelésének elmélete .....                            | 51  |
| IV. Értelmezés részletei .....                                                  | 53  |
| B. Vad típusú és mutáns $\alpha$ -szinukleinek.....                             | 59  |
| I. $\alpha$ -szinuklein monomerek.....                                          | 61  |
| II. $\alpha$ -szinuklein oligomerek .....                                       | 70  |
| III. $\alpha$ -szinuklein amiloidok.....                                        | 72  |
| IV. Eltérő polimerizációfokból következő különbségek .....                      | 76  |
| V. Dinamikai paraméterek.....                                                   | 81  |
| C. $\beta_4$ -timozin, stabilin-2 citoplazmadomén és 1:1 komplexük .....        | 84  |
| IV. Összefoglalás, tézisek és tervek .....                                      | 99  |
| A. Összefoglalás.....                                                           | 100 |
| B. Tézisek .....                                                                | 104 |

## mbokor\_337\_25

|                                                 |     |
|-------------------------------------------------|-----|
| C. Eredmények hasznosításának lehetőségei.....  | 107 |
| D. További kutatási tervek.....                 | 108 |
| E. Értekezés alapjául szolgáló közlemények..... | 109 |
| V. Irodalomjegyzék .....                        | 111 |

## Jelölések, rövidítések és idegen kifejezések jegyzéke

*A30P* – alanin helyett prolin a 30. aminosavhelyen a fehérjében

*E46K* – glutaminsav helyett lizin a 46. aminosavhelyen a fehérjében

*A53T* – alanin helyett treonin az 53. aminosavhelyen a fehérjében

*apoptózis* – programozott sejthalál egy fajtája, normális fiziológiás válaszreakció specifikus „öngyilkos” szignálokra vagy a „túlélő” szignálok hiányára

*CD* – cirkuláris dikroizmus

*DSC* – differential scanning calorimetry: különbségi pásztázó kalorimetria

*ID* – intrinsically disordered: rendezetlen

*IDP* – intrinsically disordered protein: rendezetlen fehérje

*IDPR* – intrinsically disordered protein region: rendezetlen fehérjerégió

*in vivo* – élőben, az élő szervezetben

*in vitro* – kísérleti úton

*fagocitózis* – a folyamat során a sejt egy szilárd részecskét ( $\geq 0.5 \mu\text{m}$ ) bekebelez a környezetéből

*fehérjedomén* – fehérjék alapegysége, önállóan tud felgombolyodni, funkcionálni, fejlődni

*fuzziness* – fehérjekomplexben IDP-k szegmensei meg tudják őrizni rendezetlen állapotukat

*klaszter, klatrátrács* – vízmolekulák jégszerű kalitkaszerkezete hidrofób molekula körül

*koaleszkál* – aggregál, összeáll

*lipid* – többnyire glicerint és zsírsavat tartalmazó apoláris makromolekula

*meanderkonformáció* – kígyódísz (*ált.*); hurkokkal összekötött  $\beta$ -redők mintázata (*fehérje*)

*missense mutáció* – pontmutáció, mely megváltoztatja a fehérje szekvenciáját, és gyakran a szerkezetét és/vagy funkcióját

*molten globule* – kompakt, jelentős mennyiségű másodlagos, de nagymértékben rendezetlen harmadlagos szerkezetet mutató fehérje: olvadt gömböcske

*neurotranszmitter* – idegi ingerületátvivő anyag

## mbokor\_337\_25

*nukleotid* – nukleinsav polimerek (DNS, RNS) monomer egysége

*preszinaptikus kompartment* – az idegsejtek kapcsolódási pontja (szinapszis) előtti sejt

neurotranszmitterekkel telt szinaptikus hólyagocskákat tartalmazó kompartmentje

*proteom* – genom, sejt, szövet vagy élőlény által expresszál(ható)t fehérjék teljes halmaza

*random coil* – szabályos másodlagos szerkezetet és hidrogénkötés-mintázatot nem képző

fehérjerégiók: véletlenhurok

*szinaptikus vezikula* – idegvégződésben neurotranszmitterek tárolója: szinaptikus hólyagocska

*vad típusú fehérje* – a természetes populációban leggyakoribb (nem mutáns) szekvencia

## Köszönetnyilvánítás

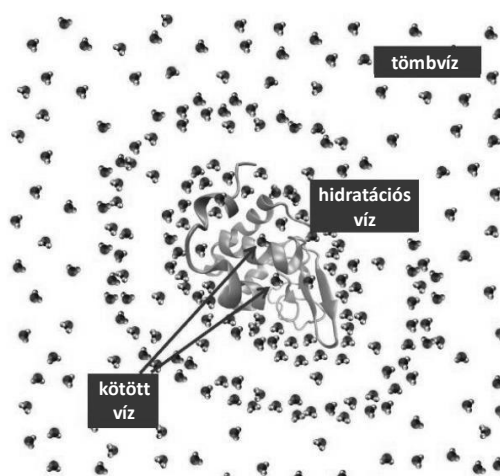
**Tompa Kálmánnak** mindazért, amit az NMR-ről tudok, az egész pályfutásomon átívelő támogatásáért, az építő, előremozdító kritikáiért. **Bánki Péternek** az NMR-méréseknél végzett technikai segítségéért. **Tompa Péternek** a kutatási témák meghatározásáért, a biokémiai vizsgálatok koordinálásáért, a közös munkáért, és a dolgozat értő kritikájáért. **Tantos Ágnesnek** a közös munkáért, a fehérjeminták elkészítésének, a biokémiai vizsgálatok elvégzésének vezényléséért, valamint az eredmények cikkekbe való átvitelének segítségével. **Kriza Györgynek** szakmai pártfogásáért, mindenkori önzetlen segítségéért, a dolgozat kritikai értékeléséért. **Kamarás Katalinnak** és **Péter Lászlónak** a dolgozat érdemi kritikájáért.

## **I. Bevezetés**

Az élő szervezetek számára létfontosságú molekulák a fehérjék, melyek kémiai szempontból makromolekuláris polipeptidek, az aminosavak egy vagy több hosszú láncát tartalmazzák, általában több mint 100 aminosavat kötve egymáshoz. A gerincesekben a legbőségebben előforduló szerves vegyületek, szöveteik száraz tömegének kb. az 50%-át teszik ki. Jóformán minden biológiai folyamat a fehérjék működésétől függ. Gyakorlatilag minden fehérjére igaz, hogy működése (Nyitrai & Pál 2013) során kötődik más molekulákhoz (ligandumokhoz). Kevés kivételtől eltekintve a működéshez az is szükséges, hogy a fehérje térszerkezete valamilyen mértékben megváltozzon.

A víz nélkülözhetetlen a fehérjék szerkezetéhez és működéséhez, és az IDP-k (intrinsically disordered proteins, rendezetlen fehérjék) esetében különösen igaz, hogy szerkezeti állapotuk a vízzel való kölcsönhatásban alakul ki, annak tükrében értelmezhető (Tompá P. 2010). Általánosságban a fehérjék körüli vizet három kategóriába lehet sorolni (1. ábra, Purkiss 2001). 1) Tömbvíz, mely szabadon mozog, az oldatban véletlenszerű mozgással segíti a fehérje diffúzióját más kölcsönható molekulákhoz képest – dinamikáját a fehérje nem befolyásolja. 2) Egyedileg kötött víz, mely hidrogén kötések hoz létre a fehérje belső üregekben a töltött vagy poláros fehérjeatomokkal (Roberts & Mancera 2008). 3) Hidratációs víz a fehérje felszínén, a fehérjével közvetlen kölcsönhatásokban (Nakasako 1999, Higo & Nakasako 2002). Egy vízmolekula mind az egyedileg kötött víz, mind a hidratációs víz tulajdonságaiban osztozhat, ha sokszoros kapcsolata van a fehérjével és hozzájárul a hidratációs víz hálózatához. Az egyedileg kötött víz is és a hidratációs víz is fehérjéhez kötött vízként szintén ismert és erős kölcsönhatásokat alkot a fehérjékkel.

**1. ábra.** A fehérjéket övező víz kategóriái: a) tömbvíz, b) hidratációs víz a fehérje felszínén több réteget képezve, c) a fehérjék belsejében lévő üregekben kötött víz (<http://people.du.ac.in/~pbiswas/research.html>).



A fehérjék a rájuk jellemző szerkezetet vizes közegben nyerik el és itt is működnek. A víz nélkülözhetetlen eleme a fehérjeszerkezetnek, -dinamikának és -működésnek, így a fehérjeszerkezet kialakulása és a funkció megértéséhez döntő fontosságú a fehérje vízzel való kölcsönhatásának részletes leírása. A hidratációs víz egy fő formája a fehérje által kötött víznek, mely hozzájárul a fehérjék sok tulajdonságához, mint például felgombolyodás, oldhatóság, gyógyszerdokkolás, és oligomerek képződése, amint (Raschke 2006)-ban áttekintette. A hidratációs víz közvetlen kölcsönhatásban van a fehérjefelszínnel, és a helyi fehérjeszerkezetre közvetlen hatást gyakorol (Chen et al. 2008).

A fehérje-víz rendszerek vizsgálatára unikális módszerként a széles jelű  $^1\text{H}$  NMR-spektroszkópia (nukleáris mágneses rezonancia) alkalmazható, melynek e célra való alkalmazását bevezettük és módszereit kidolgoztuk (Bokor et al. 2022, Bokor & Tantos 2021a,b, Bokor et al. 2020a,b, Taricska et al. 2019, Tompa K. et al. 2019, 2018, Tompa P. et al. 2016, Tantos et al. 2013, Házy et al. 2011). Megmutattuk, hogy a spektroszkópai jelek értékelésének eredményei termodinamikailag értelmezhetőek. Az értelmezés során vizes oldatokban meghatározásra kerül a fehérjemolekulához is kötött vízmolekulák mozgását gátló potenciálgátak energiaeioszlása. A módszer kifejlesztésével és alkalmazásával elsődleges célom a fehérjék vízzel érintkező felszínének a fehérje-víz kölcsönhatás szempontjából történő jellemzése.

## **II. Tudományos előzmények**

## A. Fehérjék – általános leírás, kémiai kötések és kölcsönhatások, típusok

(Watson et al. 2014)

A fehérjék aminosavak lineáris polimerjeként felépülő biomolekulák és makromolekulák. Az élőlényekben a funkciók hatalmas választékát végzik, mint például anyagcsere reakciók katalízise, DNS-replikáció, jelátviteli ingerekre adott válasz, sejtek és élőlények számára szerkezet biztosítása, és molekulák transzportja, szállítása. A fehérjék elsősorban az aminosavszekvenciájukban különböznek egymástól, melyet génjük nukleotid szekvenciája determinál, és ami általában a fehérje specifikus, az aktivitását meghatározó 3D szerkezetbe való felgombolyodását eredményezi.

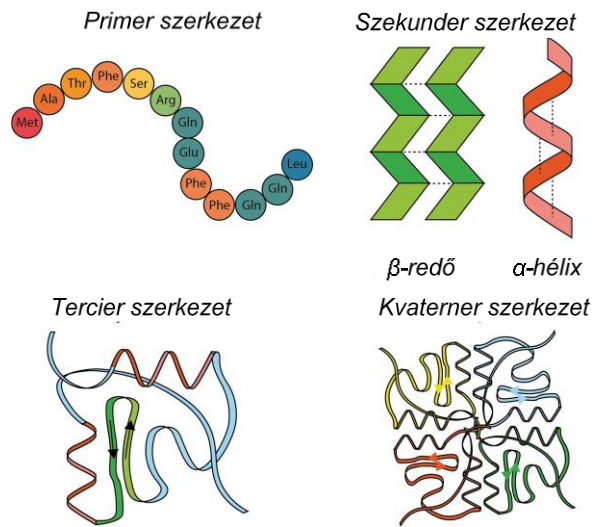
Az aminosavak alkotta lineáris láncot polipeptidnek nevezik. A fehérje legalább egy hosszú polipeptidet tartalmaz. A rövid, 20-30 aminosavnál kisebb, polipeptideket ritkán tartják fehérjének és rendszerint peptidnek nevezik. Az egyedi aminosavak peptidkötéssel vannak egymáshoz kötve. A fehérjében az aminosavsorrendet a génjének bázissorrendje - szekvenciája - határozza meg, a genetikai kódnak megfelelően. A genetikai kód általánosságban 20 standard aminosavat határoz meg; de egyes élőlényekben a genetikai kód szelenociszteint és – bizonyos archeákban – pirrolizint is tartalmazhat. Röviddel a szintézist követően vagy még aközben az aminosavak a fehérjében transzláció utáni módosítással gyakran kémiaiilag változnak (ezt poszt-transzlációs módosításnak nevezzük), melynek hatására módosulnak a fizikai és kémiai tulajdonságok, a felgombolyodás, a stabilitás, az aktivitás, és végül a fehérje funkciója is. A fehérjék működhetnek együtt is, hogy egy bizonyos funkciót betöltsenek, és gyakran összekapcsolódnak, hogy stabil fehérjekomplexekeket képezzenek (ld. II. Fehérje-fehérje kölcsönhatások, 17. oldal).

A fehérje térszerkezetének szintjeiben megkülönböztetünk elsődleges, másodlagos, harmadlagos és negyedleges szerkezetet (2. ábra) Az *elsődleges* vagy primer szerkezet a fehérje

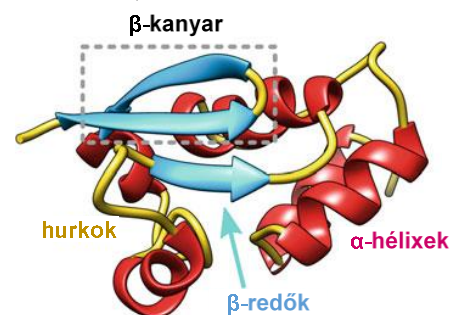
aminosav-szekvenciája, aminosav sorrendje. Az aminosavakból felépülő fehérjék a peptidkötés aszimmetrikus jellegének köszönhetően irányított polimerek. A fehérjelánc szintézisekor a legutoljára beépült aminosav karboxilcsoportjához kapcsolódik a következő aminosav aminocsoportja, és így tovább. A természetben több száz ilyen aminosav létezik, de az emberi szervezet mindössze 20-at hasznosít belő-

lük. Ezek közül kilenc fajtát – az úgynevezett esszenciális aminosavakat (fenilalanin, hisztidin, izoleucin, leucin, lizin, metionin, treonin, triptofán, valin) – az emberi szervezet nem, vagy csak elégtelen mennyiségben képes önmagától előállítani, ezért azokat élelmiszerek segítségével kell a szervezetbe juttatni. A **másodlagos** vagy szekunder szerkezeten a peptidgerinc hidrogénkötések által stabilizált lokális (legalább négy aminosavra kiterjedő) rendezettségét értjük. Ezt a szerkezeti szintet a peptidsíkok egymáshoz képest történő elfordulásával jellemezhetjük. A másodlagos szerkezeti elemek legfőbb csoportjai a jobb- vagy balmenetes hélixek, a redők, a hurok és a kanyarok (3. ábra). Az  $\alpha$ -hélix jobbkezes hurokkal vagy hélixszerkezettel jellemzett másodlagos szerkezeti motívum. A  $\beta$ -redő pedig egy, a polipeptidlánc szomszédos szálai közti hidrogénkötéssel stabilizált lineáris szakasszal írható le. A meanderrégió általában nem szabályos, kanyargós vonalat felvevő szegmensére utal egy fehérjének, mely gyakran  $\beta$ -redők hurokokkal oly módon összekötött mintázatát írja le,

2. ábra. Primer, szekunder, terciér, és kvaterner fehérjeszerkezet (Morris et al. 2022). A kvaterner szerkezetben mindegyik polipeptidlánc más-más színnel van jelölve.



3. ábra. Másodlagos szerkezetek:  $\alpha$ -hélixek (piros),  $\beta$ -redők (kék), hurokok (sárga), valamint két  $\beta$ -redőből és a köztük lévő hurokból álló  $\beta$ -kanyar – szupermásodlagos szerkezeti motívum (négyyszög) (Oldfield et al. 2019).



hogy az meandermintázatra emlékeztet. A meanderrégiók tipikusan  $\beta$ -redőkben figyelhetők meg, ahol is a szalagok szabályos, de komplikált mintázatban tekerednek hátra és előre, mégpedig gyakran antiparallel módon. A meanderrégiók hozzájárulnak a nagyrészt  $\beta$ -redőkből álló fehérjék általános stabilitásához és architektúrájához. Lehetővé teszik a  $\beta$ -redők szoros rendeződését, miközben az összekötő hurkokban megmarad a flexibilitás. A véletlenhurok a fehérje olyan szegmensére utal, melynek nincs szabályos másodlagos szerkezete, mint például  $\alpha$ -hélixek vagy  $\beta$ -redők. Ez a konformáció minden konzisztens mintázatot vagy stabil hidrogénkötést nélkülöz, nagy flexibilitás és véletlenszerűség jellemzi, vagyis a véletlenhurokban a polipeptidlánc nem vesz fel konzisztens alakot. Szabadon mozog helyett, ami rendezetlen vagy flexibilis szerkezethez vezet. Egy fehérje térszerkezetéből kiszámolható, hogy bizonyos aminosavak mennyire preferálják az egyes másodlagos szerkezeti elemeket. A meanderrégiók és a véletlenhurok a fehérjeszerkezetek sokoldalúságát tükrözik, kiemelve, hogy a fehérjék hogyan tudják ötvözni a szabályos, rendezett elemeket a flexibilis, rendezetlen szegmensekkel, hogy aztán a biológiai funkciók széles választékát hajtsák végre. A másodlagos szerkezet kísérletes meghatározására például a CD-spektroszkópia ad lehetőséget, amely a jobbra és balra cirkulárisan polarizált fény elnyelésének különbségéből képes szerkezeti információt kinyerni. A **harmadlagos** vagy terciér szerkezet egy polipeptidlánc teljes térbeli konformációja. Ezt a konformációt mindenekelőtt a hidrofób kölcsönhatások stabilizálják. Egy peptidlánc tartalmazhat egyetlen vagy többféle másodlagos szerkezeti elemet, melyek rendezetlen szakaszokkal váltakoznak, de ismertek olyan fehérjék is, melyekből teljesen hiányoznak a rendezett szerkezetek, ezeket natívan rendezetlen fehérjéknek nevezzük, azaz IDP-k. A folyamatot, mely során a fehérjemolekulák elnyerik a natív térszerkezetüket, vagyis amelyben betöltik biológiai funkciójukat, a fehérjék felgombolyodásának, foldingjának nevezzük. Bizonyos fehérjéket több peptidlánc alkot, melyeket alegységeknek nevezünk. Ez a **negyedleges** vagy kvaterner szerkezet. A peptidláncok lehetnek azonosak vagy eltérőek, számuk általában nem haladja meg a nyolcat.

A fehérjéket harmadlagos szerkezetük alapján többek között a következő fő típusokba lehet osztani. A **globuláris fehérjék** kompakt, és durván gömb alakkal jellemzettek. Tipikusan bonyolult háromdimenziós szerkezetekbe gombolyodnak fel úgy, hogy a hidrofób aminosavak a fehérje belsejében vannak eltemetve, a hidrofil aminosavak pedig a felszínen kitéttek. Változatos és specifikus funkciókat látnak el, gyakran enzimekként, transzporterekként, receptorokként, vagy jelmolekulákként szolgálnak. A **rendezetlen fehérjéknek** (IDP-knek) fiziológiás körülmények között nincs állandó háromdimenziós szerkezete. Ezek a fehérjék teljes hosszukban nagy flexibilitással rendelkeznek, ami lehetővé teszi a kötő partnereiknek vagy a környezeti körülményeknek megfelelő különböző konformációk felvételét. Lényeges szerepet játszanak különböző biológiai folyamatokban, köztük a jelátvitelben, transzkripcióban, és más fehérjék szabályozásában. Sokféle partnerrel kölcsönhatásban és a dinamikus sejti folyamatokat elősegítve gyakran molekuláris csomópontként működnek. A **komplex fehérjék** több alegységből vagy különböző szerkezeti tulajdonságú régiókból - doménekből - állnak. Gyakran bonyolult architektúrát mutatnak és kifinomult funkciókat végeznek el.

Az **amiloidok** olyan rendezett fehérjeaggregátumok, amelyeket a fehérjék in vivo vagy in vitro, sejten belül vagy sejten kívül kereszt- $\beta$  szerkezetet kialakítva hoznak létre. A fehérjék konformációja bennük a natív szerkezet helyett egy nyújtott, elágazásmentes szálakból álló, hidrogénhidakkal és hidrofób kölcsönhatásokkal stabilizált, nyújtott szerkezetet mutat. Amiloid szerűnek nevezzük a kereszt- $\beta$  másodlagosszerkezet-mintázat megjelenését (Eisenberg et al. 2006). Ismétlődő  $\beta$ -redő párok összességéből álló kereszt- $\beta$ -gerinc konformáció tartozik ehhez a mintázathoz (Sawaya et al. 2007, Nelson et al. 2005). Az amiloid szerkezet megjelenése csaknem minden neurodegeneratív betegség diagnosztikus velejárója (Chiti & Dobson 2017).

A molekulák közötti kölcsönhatások egyformán fontosak a kémiában, a fizikában és a molekuláris biológiában. Meghatározzák a biológiai vegyületek stabilitását. A biológiai működés szempontjából különlegesen fontos a fehérjefelszín első hidratációs héja (Rupley & Careri

1991), ugyanis a fehérje a biológiaiailag aktív egységet az első hidratációs rétegével együtt képezi (Shiro et al. 2015).



**4. ábra.** Ha egy szénhidrogén-molekulát víz veszik körül, a vízmolekulák klatrátrácsot alkotnak. E szerkezet eredményeképpen a víz entrópiája csökken, így a szénhidrogén vízben való diszpergálódása entrópiásan gátolt; a molekulák koaleszkálása viszont entrópia tekintetében kedvező (Atkins & de Paula 2006). A vízmolekulák klatrátrácsát a vonalak jelzik.

A fehérjék hidrogénkötések, nagy hatótávolságú Coulomb-erők és hidrofób erők hatására oldódnak fel. A hidrofób kölcsönhatást minőségileg a hidrofób részek aggregációját vagy klaszterezést okozóként értjük (Meyer et al. 2006). A fehérjék hidratációs vizének a mozgását befolyásoló potenciálgátokról kapunk információt NMR méréseink segítségével. A potenciálgátak a fehérje oldószernek hozzáférhető felszínének kémiai és topológiai tulajdonságai szerint változhatnak.

## I. Vízszerkezet és -dinamika a fehérjék körül

(Laage et al. 2017)

A fehérjék a tömbvízfázissal nem hatnak közvetlenül kölcsön; kölcsönhatásuk néhány szomszédos kötött vízmolekula-réteggel valósul meg (Tompá K. et al. 2012), ez a tény indokoltá teszi a kötött víz tulajdonságainak tanulmányozását. A hidratációs víz mozgása pikoszekundumos időskálán zajlik, míg az NMR időskálánk ennél egy nagyságrenddel lassúbb, így az NMR-ben a mozgási keskenyedés jelensége (50. oldal; Slichter 1990) jó mutató a mozgékony víz megkülönböztetésére. A fehérjék által a fehérjeoldat lefagyasztásakor a kötött vagy nem megfagyó vizet mozgékony hidratációs vízként említem a dolgozatban. A hidratációs vízre nem a fehérjemolekulák körüli merev vízhéjként kell tekinteni, hanem a vízmolekulák hullámozó felhőjeként, mely a fehérjefelszínnel többé vagy kevésbé erősen, vagy akár még taszító jelleggel is hat kölcsön.

A fehérje körüli első vízréteget definíció szerint azok a vízmolekulák képezik, melyek a fehérje atomjaival hidrogénkötésekkel és/vagy van der Waals kölcsönhatással közvetlen köl-

csönhatásban vannak (Durchschlag & Zipper 2001). Itt a vízmolekulák elrendeződését és helyi kölcsönhatásait a fehérjefelszín heterogén geometriai és kémiai jellege erősen befolyásolja. Ennek eredményeképpen a fehérjefelszínen a víz dinamikája nagyon változatos, heterogén energiaeloszlást mutat. A második rétegben a molekuláknak a fehérjével nincs közvetlen kölcsönhatása.

A hidratációs héj tömbvíz jellegű szerkezetet vesz fel a felületközi vízrétegtől (az oldott anyag/víz határfelület legfelső vízrétege) kezdve néhány rétegen belül, ez jellemzően öt rétegnél kevesebb (1. ábra, 9. oldal). A fehérjefelülettől 1 nm-es távolságig a hidratációs rétegnek a tömbvíztől eltérő dinamikája van és ebben az értelemben a hidratációs vizet kötött víznek is nevezik (Zhang et al. 2018). A fehérjéhez közeli vízmolekuláknak a tömbvízétől nagyon különböző kölcsönhatásai vannak (Raschke 2006). A poláros csoportok a fehérjefelszínen a vízzel hidrogénkötéseket képeznek. A töltött aminosavoldallancok (éppúgy, mint az amino- és a karboxilláncvég) a vízzel elektrosztatikus kölcsönhatásokat létesítenek. A felszínen lévő nem poláros atomok hidrofób kölcsönhatásokat hoznak létre. A hidrofób erők (4. ábra) minőségileg olyan kölcsönhatásokként foghatók fel, melyek a hidrofób feleket poláros oldószerben aggregációra vagy klaszteresedésre készítetik (Meyer et al. 2006).

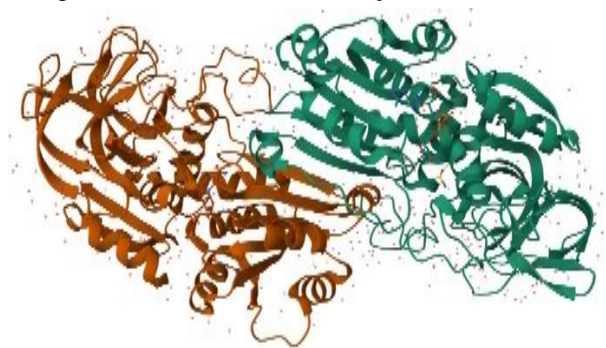
## II. Fehérje-fehérje kölcsönhatások

A fehérjék funkciójukat gyakran más fehérjékkel kölcsönhatásban látják el, vagyis szinte minden fehérje fizikai kapcsolatot alakít ki más fehérjékkel. A fehérjekomplexek fajtái a következők.

### Obligát vs. nem-obligát komplexek.

Ha *in vivo* a fehérje stabil, jól felgombolyodott szerkezetet tud alkotni önmagában (bármely más társult fehérje nélkül), akkor az ilyen

5. ábra. Az alkohol dehidrogenáz obligát, szimmetrikus homo-oligomer komplexe (PDB ID: 2OHX). A két fehérjelánc piros, illetve zöld színnel van jelölve.



fehérjék által képzett komplexet általában nem-obligát fehérjekomplexnek nevezik. Némely fehérje önmagában nem tud stabil, jól felgombolyodott szerkezetet kialakítani, de előfordul olyan fehérjekomplex részeként, mely az alkotó fehérjéket stabilizálja. Ezek az obligát fehérjekomplexek.

Tranziens vs. permanens komplexek. A tranziens fehérjekomplexek *in vivo* átmenetileg képződnek és bomlanak le, míg a permanens fehérjekomplexeknek viszonylag hosszú felezési idejük van. Tipikusan az obligát kölcsönhatások (fehérje-fehérje kölcsönhatások obligát komplexben) permanensek, míg a nem-obligát kölcsönhatások vagy permanensek, vagy tranziensek bizonyulnak (Amoutzias & Van der Peer 2010). Az obligát és a nem-obligát, illetve tranziens és permanens kölcsönhatások között nincs világos különbségtétel, inkább folytonosság áll fenn, mely ráadásul a környezeti körülményektől, például pH, fehérjekoncentráció, effektor molekulák, poszttranszlációs módosulások, stb... is függ (Nooren & Thornton 2003).

Fuzzy komplexek. A fuzzy (bolyhos) fehérjekomplexeknek több szerkezeti alakjuk, vagy kötött állapotban dinamikus szerkezeti rendezetlenségük van (Tompá P. & Fuxreiter 2008). A kölcsönhatás során a fehérjék nem gombolyadhatnak fel teljesen, hanem részben vagy egészben megőrzik szerkezeti rendezetlenségüket. Gyakran fordulnak elő a természetben fuzzy komplexek, melyeknél bizonyos mértékű flexibilitás kötés után is megfigyelhető (Fuxreiter 2020). Legtöbbször, ha egy IDP globuláris fehérjével létesít kapcsolatot, a fuzzy tulajdonság bizonyos mértékig korlátozott lesz, viszont két IDP egymáshoz kötődése különösen fuzzy komplex képződéséhez vezethet – ekkor a partnerek többnyire rendezetlenek maradnak (Wang & Wang 2019, Borgia et al. 2018). Az ilyen típusú kölcsönhatások szerkezeti jellemzése nehézséget jelent, mert sok módszer képtelen az ily módon való kötődés során fellépő finom változások érzékelésére.

Az 1:1 komplexek életidejük szerint lehetnek tranziens (átmeneti) komplexek. Ide tartoznak a gyenge tranziens komplexek, ezek állandóan felszakadó és újraformálódó kapcsolatot

létesítenek. Még a külső jel hatására bekövetkező felszakadás vagy újraformálódás is erős tranziens komplexeket hoz létre. A permanens (állandó) komplexeket viszont állandó, stabil, erős kapcsolatok jellemzik, ekkor az 1:1 komplex sohasem bomlik fel.

### III. A fehérjeoldatok általános tulajdonságai

A vízmolekulák nagyon szoros kölcsönhatásban vannak a fehérjékkel, és tulajdonságaik a hidratációs héjban a tömbvízétől jelentősen különböznek. A víz a feloldott fehérjékre az első-sorban lokális típusú, gyenge hidrogénkötéseken, a hosszútávú Coulomb-erőkön, és a nem túl erős hidrofób erőkön keresztül is erős befolyást tud gyakorolni (Laage et al. 2017, Kuntz & Kauzmann 1974). A vízmolekulák mozgására nézve a leggyengébb fehérje–víz kölcsönhatás eredményezi a legalacsonyabb potenciálgátat. Kémiaiilag ezek a vízmolekulák hidratálják a legkevésbé a hidrofíli fehérjerészeket, vagyis az oldószernek kitett legkevésbé hidrofíli fehérjefelszín hat a leggyengébben kölcsön a vízzel.

A biokémiában különleges jelentőségű a fehérjével kölcsönható mozgékony vízmolekulák alkotta hidratációs héj vagy réteg. A fehérjefelszínnek erre a környező vízzel való kölcsönhatására gyakran fehérjehidratációként utalnak, és a fehérjék működésével kapcsolatban alapvető fontosságúnak tekintik (Mondal et al. 2017). A hidratáció során a hidratálódó fehérje köré vízmolekulákból álló burok épül. Az oldott anyag és az oldószer között létrejövő másodrendű kémiai kötések (dipólus-dipólus, ion-dipólus, esetleg hidrogénkötés) energiát szabadítanak fel. A hidratáció mindig exoterm folyamat. A hidratációt a fehérje kölcsönhatási helyeire jellemző hidrofilitás mértéke határozza meg (hidrofíli tulajdonság intenzitása; hidrofíli: a felület visszahúzó nedvesítési érintkezési szöge  $< 90^\circ$  (Law 2014)).

A fehérjék (első) hidratációs héja oldatfázisban a külső fehérjefelszínnel kapcsolatban lévő vízmolekulákból áll (Persson et al. 2018). Ezek azok a vízmolekulák, melyek nincsenek teljesen körülvéve más vízmolekulákkal, és ezért tulajdonságaik a tömbvízétől a legnagyobb mértékben térnek el.

A fehérje–víz érintkezés számos vonatkozását vizsgálták globuláris fehérjék híg, vizes oldataiban molekuladinamikai szimulációkkal (Persson et al. 2018). A szakirodalomban gyakran idézett, hogy az első hidráthéjban a hidratáció  $h = 0,3\text{--}0,4$  g víz/g fehérje (Durchschlag & Zipper 2001, Gregory 1995, Rupley & Careri 1991, Kuntz & Kauzmann 1974, Cooke & Kuntz 1974). Eredményeik szerint egy közepes méretű fehérjénél ilyen alacsony  $h$ -érték körülbelül a fehérje oldószernek kitett felületének felének hidratációs vízzel való beborításához szükséges mennyiségnek felel meg. Az ebben a dolgozatban szereplő fehérjék méretüket tekintve igen kicsinek tekinthetők, ezért esetükben a  $h = 0,3\text{--}0,4$  mennyiségű hidratáció elég lehet az első hidratációs héjhoz.

### IV. Rendezetlen fehérjék

(Uversky 2019, 2015, Lieutaud et al. 2016, van der Lee et al. 2014)

A múlt század második felében általános volt az a meggyőződés, hogy a fehérjék részletes háromdimenziós szerkezetébe eredendően kódolva van a biológiai funkciójuk, azaz a szerkezeti biológia központi dogmája, miszerint felgombolyodott fehérje szükséges a biológiai funkcióhoz. Jóllehet a szerkezet és a funkció szorosan összekapcsolódik, de nem minden biológiailag funkcionális fehérje kódolt arra, hogy spontán állandó globuláris szerkezetet vegyen fel. A globuláris fehérjék szerkezete ugyan leírható összes atomjuk koordinátaival, de ez az információ sokszor túl összetett ahhoz, hogy a funkció vonatkozásában értelmezhető legyen. Az aminosav-szekvencia nemcsak a natív funkcionális állapotot, hanem az ehhez az állapothoz vezető utat is kódolja; így egyértelműen meghatározza a natív háromdimenziós szerkezetet. Ez a natív állapot általában megfelel a konformációs tér globális minimumának.

Az ezredfordulóból származó felfedezés (Tomba P 2002), hogy a klasszikus szerkezet-funkció paradigma meghaladtá vált az olyan fehérjékre és fehérjedoménokra, melyek natív és funkcionális állapota szerkezetileg rendezetlen. A rendezetlen állapot minden élő szervezetre általános, nélkülözhetetlen az alap sejti funkciókhoz; tehát a fehérjék birodalmában külön funk-

cionális és szerkezeti kategóriát képvisel. Mivel a szerkezeti biológia gyökerei a globuláris (rendezett) fehérjék tanulmányozásába nyúlnak vissza, ezért a fehérjeszerkezet klasszikus fogalmai inkább alkalmasak a rendezett, mint a rendezetlen fehérjék leírására. Miután a rendezetlen állapot (Tomba P. 2002) a definíció szerint minden egyes fehérjére különböző szerkezetek együttese, ezért az IDP-k szerkezetileg egy szerkezeti sokasággal írhatók le.

Az IDP-k, IDR-ek annak ellenére, hogy biológiailag aktívak, nem képeznek egyedi háromdimenziós szerkezetet, hanem nagyon dinamikus szerkezeti sokaságokként léteznek úgy a másodlagos, mint a harmadlagos szinten (Uversky 2013, Tomba P. 2002). A rendezetlenség az itt használt értelemben a fehérje gerincére vonatkozik, nem pedig az aminosavak oldalcsoportjaira. Egy fehérje különböző régióinak rendezetlensége eltérő lehet, sok fehérje rendezett és rendezetlen részekből áll. A IDP-k és a hibrid fehérjék (vegyesen rendezett és rendezetlen részek) a természetben nagyon bőségesen előfordulnak, minden eddigi leírt proteomban nagy számban megtalálhatók (Peng et al. 2015). A rendezetlen fehérjék képesek véletlenhurok konformációra (random coil), vagy olvadt gömböcske (molten globule) állapot felvételére.

A fehérjék rendezettsége vagy rendezetlensége a mi megközelítésünkben lazábban az olvadási diagramjuk (mozgékony víztartalom vs. hőmérséklet) energiaviszonyai, szigorúbban pedig a mozgékony hidratációs vizük mennyiségei alapján határozható meg. Míg egy évtizede az IDP-cikkek legtöbbje a rendezetlenséget bináris állapotként jellemezte, addig napjainkban már a széleskörű elemzéseket tartalmazó munkák az uralkodóak, melyek számos kiegészítő kísérleti módszert használva több feltételes állapotot írnak le. Az ajánlott kísérleti módszereket MIADE (Minimum Information About Disorder Experiments) megközelítéssel érdemes megválasztani (Mészáros et al. 2023). A kísérleti módszerek közé tartozik *a*) az NMR spektroszkópia, mely hatékony módszer a fehérjedinamika és -flexibilitás tanulmányozására (HQSC, relaxációs, valamint széles jelű mérések; *b*) a CD-spektroszkópia, mely segítségével meghatározható a fehérjék másodlagos szerkezet-tartalma az  $\alpha$ -hélixek, a  $\beta$ -redők, és a másodlagos szerkezet

nélküli részek jellegzetes mintázatai alapján; c) a FRET (saját-fluoreszcencia és Föster-féle rezonáns energiaátadás), mely saját-fluoreszcenciát mutató (például triptofánt tartalmazó) vagy külső fluoreszcens molekulával jelölt fehérjék szerkezeti dinamikájáról és konformációs változásairól ad információt és hasznos a fehérjék felgombolyodásának és dinamikájának vizsgálatában, kimutatva a rendezetlen régiók jelenlétét; d) SAXS (kisszögű röntgenszórás), mely az oldatban lévő fehérjék általános alakjáról és teljes méretéről nyújt információt, segítve a fehérjék globális konformációjának a felderítését és ezáltal a rendezetlenség és a flexibilitás területeinek azonosítását; e) HDX- (hidrogén-deutérium kicserélődés) és tömegspektroszkópia, melyek közül a HDX a fehérje flexibilitásába és dinamikájába ad betekintést, valamint a HDX-szel kombinált tömegspektroszkópia a rendezetlen – oldószernek kitett, exponált – területeket jelzi a konkrét fehérjerégiók kicserélődési sebességének pontos mérése által; f) bioinformatika és számítási megközelítések, melyek a kísérleti módszerek mellett az aminosavszekvencia alapján előre tudják jelezni a fehérje rendezetlenségét (például IUPred (Dosztányi et al. 2005) és DISOPRED (Ward et al. 2004)) és potenciálisan rendezetlen régiókra összpontosíthatják a további kutatásokat. Egy váratlan, jelentős fejlemény a területen, hogy a fehérjeszerkezetek jóslásában rendkívül sikeres új algoritmus, az AlphaFold (Jumper et al. 2021), nagyon pontosan tudja jóslani a szerkezettel nem rendelkező – rendezetlen – részeket is. Összességében kijelenthetjük, hogy mindegyik módszernek vannak erősségei és korlátai, valamint gyakran a technikák kombinációja használatos, hogy a fehérjékben vagy a speciális fehérjerégiókban a rendezetlenség arányát széleskörűen megértsük.

Mint említettük, a fehérjék aminosavsorrendje a biológiai funkcióhoz elengedhetetlen térszerkezetet nem határozza meg egyértelműen. Belső dinamikájukat illetően arra is fény derült, hogy az IDP-k mozgékonyaságuk miatt nem jellemezhetők egyetlen időátlagolt térszerkezettel (Tompá P. 2002). Az ilyen fehérjék és fehérjerégiók dinamikus sokaságként léteznek, fehér-

jefelhőkre hasonlítanak. Működőképesek (biológiai aktivitással rendelkeznek), és alapvető biológiai szerepet töltenek be (Dunker et al. 2013), emellett többféle partnerrel való kölcsönhatásra nyújtanak különleges lehetőségeket (Tompá P. et al. 2005).

Az IDP-k, a rendezett fehérjék és fehérjedomének aminosavsorrendje és aminosav-összetétele nagyon különbözik egymástól (Vymětal et al. 2019). Ha egy fehérje aminosav-összetétele ismert, előrejelzés tehető a kötött víz mennyiségére (Derbyshire 1982, Kuntz 1971). Korábbi tanulmányok (Tompá P. 2002, Uversky 2002, Dunker & Obradovic 2001) alapján elmondható, hogy a globuláris fehérjékhez képest az IDP-kben a triptofán, cisztein, fenilalanin, izoleucin, tirozin, valin, leucin és aszparagin aminosav jelentősen kisebb mennyiségben van jelen, azonban ezek a fehérjék gazdagabbak alanin, arginin, glicin, glutamin, szerin, prolin, glutaminsav, és lizin aminosavban. Az előbbieket ezért rendezettséget, az utóbbiakat pedig rendezetlenséget elősegítő aminosavnak nevezik. A hisztidin, metionin, treonin, és aszparaginsav gyakorisága nem mutat jelentős különbséget a két fehérjecsoport között.

Az IDP-k szerkezetileg nagyon heterogének és többé-kevésbé kompakta is lehetnek. Kisebb-nagyobb mennyiségű hajlékony másodlagos szerkezetük lehet, és tranziens harmadlagos szerkezeti kapcsolatokkal is bírhatnak (Uversky & Dunker 2010). Bár nagyon dinamikus sokaságként léteznek, a szerkezetük meglehetősen jól leírható egészen korlátos számú és alacsony energiájú konformációval (Huang & Stultz 2008, Choy & Forman-Kay 2001). Néhány rendezetlen fehérje, fehérjerészlet másik fehérjével való kötött állapotában nem gombolyodik fel (részben, vagy teljesen), hanem a másik fehérjével kölcsönhatásban is rendezetlen marad, fuzzy komplexet képez. Fontos szabályozó és jelátviteli funkcióik miatt sok IDP a különböző emberi betegségek – rék, neurodegeneráció, metabolikus betegségek, – kórfejlődésével is kapcsolatba hozzák (Uversky et al. 2008).

## B. Vizsgált fehérjék szerkezeti és biológiai háttere

A fehérjék tekintetében a globuláris és rendezett jelzőket azonos jelentésűként használom, bár a globuláris jelző szűkebb értelmű. A rendezetlen fehérje hasonló jelentéssel bír, mint az oldószernek nagyban kitett felülettel rendelkező fehérje. A következőkben a dolgozatban vizsgált, betegségekben fontos szerepet játszó IDP-ket ismertetem.

### I. $\alpha$ -szinukleinek

(Parihar et al. 2019)

#### 1. Szerep a Parkinson-kórban

A Parkinson-kór neurodegeneratív rendellenesség. Olyan tünetek alapján diagnosztizálják, mint remegés nyugvó helyzetben, izommerevség, akaratlagos mozgások végzésének akadályozottsága. Velejárója a mozgási nehézség, zavarok az emésztésben, keringésben és alvásban (Tanaka et al. 2004). A Parkinson-kór előfordulásának gyakorisága az életkor előrehaladásával növekszik, és 65 év felett a népesség körülbelül 2-3%-át érinti. A Parkinson-kór gyakran jár együtt rendezett idegi amiloid aggregátumok, Lewy testek megjelenésével, amelyek elsődleges összetevője az  $\alpha$ -szinuklein. Szinte minden Parkinson-kóros megbetegedés genetikailag ismeretlen eredetű, a dominánsan kromoszóma eredetű Parkinson-kór ritka formái az A53T (Sachsenhauser et al. 2020), A30P (Ramis et al. 2019), és az E46K (Bokor et al. 2022) pontmutációkhoz kapcsolódnak, vagyis szekvenciájukban egy aminosav más, mint a vad típusú, azaz változatlan, eredeti szekvenciájú fehérjében.

A családban öröklődő Parkinson-kór számos esete az  $\alpha$ -szinuklein missense mutációjával van összefüggésben. A missense mutáció egyetlen nukleotid változását eredményezi a gén kódoló régiójában, és ezzel egy aminosavnak egy másikkal való helyettesítéséhez vezet a létrejövő fehérjében. Az aminosavszekvenciában történő változás hatások sorát fejtheti ki a fehérje

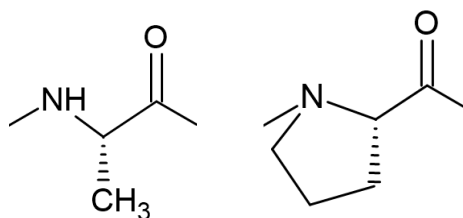
szerkezetére és funkciójára. Olasz és görög családokban a Parkinson-kór korai kezdetével azonosított első genetikai missense mutáció az A53T volt.

Az  $\alpha$ -szinuklein oligomerek a  $\beta$ -polimerek (amiloidok) előzményei, és a közvetlen idegi összeköttetést romboló hatást okozhatnak (Choi et al. 2013). Az  $\alpha$ -szinuklein oligomerizációjának, illetve polimerizációjának megállítása ezért a Parkinson-kór kezelésének kézenfekvő terápiás megközelítése (Jasutkar et al. 2022).

### A30P mutáns $\alpha$ -szinuklein

Az A30P mutáció (Krüger et al. 1998) az aminosav oldalláncok régiójában fordul elő, N-terminális irányban a meanderrégiótól, ezzel a toxicitásra alternatív mechanizmust vetve fel (Bisi et al. 2021). Például a természetes felgombolyodásnál ez a változás az optimális működésben gátolt szerepet eredményezhet, esetleg a kölcsönhatást a foszfolipid membránokkal közvetlenül befolyásolva. Az A30P mutánsnak a vad típusnál kevésbé kompakt és kevésbé állandó szerkezetei vannak, és a mutációnak a fehérje szerkezeti tulajdonságaira lokális és hosszútávú hatásai is vannak (Wise-Scira et al. 2013a). A vad típushoz képest a mutáns fehérje oligomerizációjának a sebessége és aggregációra való hajlama is lényegesen megnövekedett.

**6. ábra.** Az A30P mutációban érintett aminosav oldalláncok  
alanin (A)                      prolin (P)  
oldallánc



E46K mutáns  $\alpha$ -szinuklein

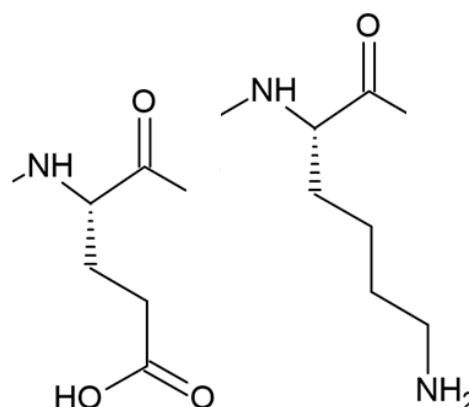
A szerkezetek többségében az E46 és a K80 oldalláncok szoros közelsége stabilizáló sóhíd kialakulását veti fel (Li et al. 2018). Az elektrosztatikus tasztítás miatt az E46K  $\alpha$ -szinukleinmutánsban (Zarranz et al. 2004) ez a sóhíd nem jön létre, ami a fehérje működését gátolja. Ezáltal a meanderkonformációt destabilizálja és valószínűleg inkább a kisebb oligomerek, mint a kifejlett fibrillumok kialakulásához, meg-növekedett koncentrációjához vezet (Bisi et al. 2021).

A mutáció következtében a fehérje hélixtartalma vizes oldatban jelentősen lecsökken, ugyanakkor  $\beta$ -szerkezetének a mennyisége nagyon megnő. A vad típusúnál kompaktabb, viszont kevésbé stabil szerkezettel rendelkezik. Ez a mutáció nagy befolyással van az  $\alpha$ -szinuklein monomer vizes oldatbeli szerkezeti és termodinamikai tulajdonságaira (Wise-Scira et al. 2013b).

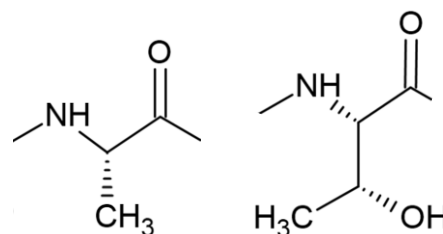
A53T mutáns  $\alpha$ -szinuklein

Ez a mutáció megváltoztatja a vad típusú  $\alpha$ -szinuklein idegsejtmérgező hatását és polimerizációját (Bisi et al. 2021). Az  $\alpha$ -szinuklein monomerek konformációs sokaságát nyitottabb állapotba tolja (Bertoncini et al. 2005b) és azokat a molekulán belüli kölcsönhatásokat destabilizálja (Bertoncini et al. 2005a), melyek a vad típusú szerkezetben a rostszál-, vagyis az amiloidképződést megátolják. A vad típusú  $\alpha$ -szinuklein hélixtartalmát nemigen befolyásolja az A53T mutáció, kivéve néhány aminosav-oldalláncot az amino- és a karboxilláncvégi régióban (Coskuner & Wise-Scira 2013a).

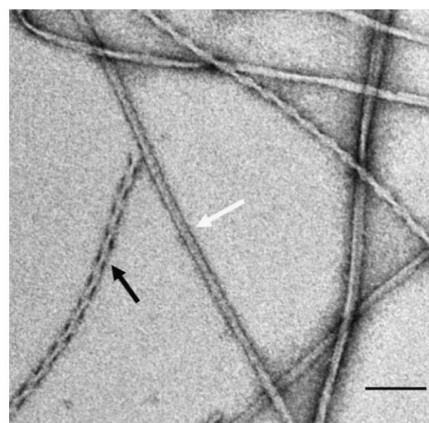
7. **ábra.** Az E46K mutációban érintett aminosav oldalláncok  
glutaminsav (E)                      lizin (K)  
oldallánc



8. **ábra.** Az A53T mutációban érintett aminosav oldalláncok  
alanin (A)                      treonin (T)  
oldallánc



Annak ellenére, hogy az említett egyetlen aminosavban történő változások a Parkinson-kór korai megjelenéshez vezetnek, mindegyik nagyon eltérő hatást fejt ki az  $\alpha$ -szinuklein aggregációjának sebességére és oligomerizációs hajlamára (Meade et al. 2019). Például, az E46K (Geenbaum et al. 2005, Zarranz et al. 2004, Choi et al. 2004), és az A53T (Serpell et al. 2000, Polymeropoulos et al. 1997) mutáció a fibrillumok képződésének megnövekedett sebességéhez vezet, míg az A30P (Krüger et al. 1998) mutáció lassítja a rostszálak képződési sebességét. Mi-



**10. ábra.** Két különböző polimorfot mutató negative-stain elektronmikroszkópfelvétel teljes hosszúságú  $\alpha$ -szinuklein amiloidszálakról – rúd (nem csavart elemi szál, fehér nyíl), twister (csavart elemi szálak, fekete nyíl) – és egy kb. 10 nm vastagságú szál.

vel a polimerizációs mechanizmus és sebesség, valamint a monomer fehérjeszerkezet között közvetlen kapcsolat van (Coskuner & Wise-Scira 2013), alapvető fontosságú lenne ismerni a monomer vad típusú, illetve az A30P, E46K, A53T mutáns  $\alpha$ -szinuklein szerkezetét. A különböző

**9. ábra.**  $\alpha$ -szinuklein, micellához kötött szerkezet



oligomer típusok közös tulajdonságai közé tartozik a  $\beta$ -redős szerkezet, a nagy mennyiségű oldószernek kitett hidrofób tartomány és a globulá-

ris vagy csöves morfológia (Chen et al. 2015, Cremades et al. 2017).

## 2. Szerkezeti tulajdonságok

Az emberi  $\alpha$ -szinuklein 140 aminosavegységből áll, molekulatömege 14442 mol/g, egy aminosavra átlagosan 103,2 g tömeg esik, elsőrendű szerkezete/szekvenciája a következő.

*Vad típusú  $\alpha$ -szinuklein szekvenciája, a vizsgált mutációs helyek vastagon jelölve.*

MDVFMKGLSKAKEGVVAAAEKTKQGVAEAAAGKTKEG-  
 VLYVGSKTKEGVVHGVATVAEKTKEQVTNVGGAV-  
 VTGVTAVAQKTVEGAGSIAAATGFVKKDQLGKNEEGAPQEGI-

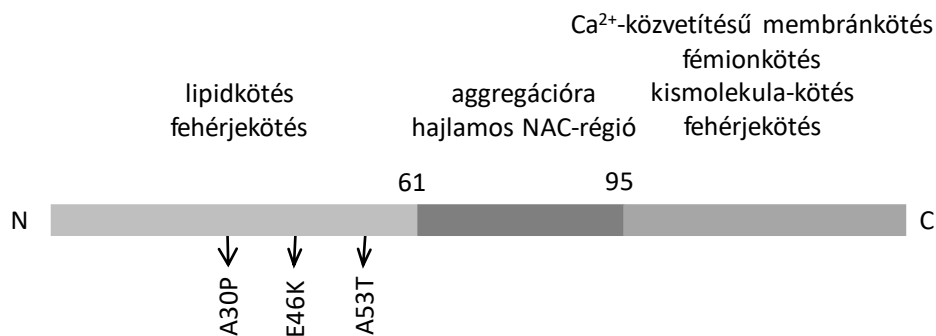
Az  $\alpha$ -szinuklein amiloidszál-képző fehérje, pontos természetes szerkezetét nem sikerült meghatározni (Bisi et al. 2021, Meade et al. 2019). Úgy is le lett leírva, mint rendezetlen (Semenyuk 2022,

Breydo et al. 2012, Theillet et al. 2016), vagy mint helikális (Bartels et al. 2011, Wang et al. 2011) szerkezetű fehérje, vagy mint a kettő kombinációja (Burre et al. 2013). A jelenlegi konszenzus szerint az  $\alpha$ -szinuklein elsődlegesen az idegsejtek preszinaptikus kompartmentjeiben elhelyezkedő szinaptikus vezikulák kialakulásában és a bennük található neurotranszmitterek kiürülésében játszik szerepet. Ezt az teszi lehetővé, hogy membránkötő képességgel bír, és a membrángörbület szabályozásában játszik szerepet (Varkey et al. 2010, Chandra et al. 2003). Az  $\alpha$ -szinuklein *in vivo* valószínűleg szerkezet nélküli monomer, részben helikális membrán-kötött forma, statisztikailag kedvezőtlen helikális oligomer(ek) egyensúlyi keverékeként létezik. Az általános konszenzus szerint az  $\alpha$ -szinuklein monomer oldatban majdnem teljesen strukturálatlan (9. ábra, Chen et al. 2021, Fauvet et al. 2012).

Az  $\alpha$ -szinuklein teljes szekvenciája három különböző tartományra osztható (11. ábra, 29. oldal, Bisi et al. 2021, Parihar et al. 2019). *a)* Pozitívan töltött lipidkötő rész, az 1-60. aminosavra kiterjedő amino-terminális láncvég, mely számos amfipatikus, váltakozó hidrofóbicitású 11 aminosavnyi ismétlődést mutat, és a KTKEGV konszenzus szekvenciát tartalmazza. Ebben az  $\alpha$ -szinuklein régióban helyezkedik el a legtöbb családban öröklődő mutáció, így az A30P, az E46K, és az A53T is. Az aminoláncvég-régió rendezetlen természete miatt vizes oldatban különböző átmeneti másodlagos szerkezeti jellemzőket vehet fel. Számos tanulmányban azt a tendenciát figyelték meg (Kim et al. 2020, Meade et al. 2019, Brodie et al. 2019, Bhattacharya et al. 2019, Zhang et al. 2018, Coskuner & Wise-Scira 2013, Jónsson et al. 2012, Allison et al. 2009, Vilar et al. 2008), hogy az aminoláncvég helikális másodlagos szerkezetre tesz szert. *b)* A központi hidrofób szakasz (61-

95. aminosav) a nem-amiloid- $\beta$ -komponens centrális régió (NAC), mely nagyon erősen amiloidképző hatású, és a fehérjét  $\beta$ -redők létrehozására teszi képessé. c) A 96-140. aminosav negatívan töltött karboxiláncvég-szakasz, amely elektrosztatikus taszítás révén megelőzi az aggregációt.

Vizes oldatban az  $\alpha$ -szinuklein monomer az agyban lerakódó amiloidszálakhoz hasonló rostokat alkot, és a polimerizáció folyamata a szálképződést megelőzően átmeneti fajták, köztük oldható oligomerek létrejöttén keresztül halad előre. Az  $\alpha$ -szinuklein legerősebben idegméregként ható formái az érett amiloidszálakhoz képest inkább ezek az oligomerfajták. Az  $\alpha$ -szinuklein monomer és -oligomer fehérje szerkezete határozza meg a polimerizáció mechanizmusát.



**11. ábra.** A három  $\alpha$ -szinukleinrégió különböző színekkel van jelölve (a) 1-60. aminosav: világosszürke, b) 61-95. aminosav: sötétszürke, c) 96-140. aminosav: szürke). A fő Parkinson-kóros mutációkkal és a kölcsönható helyekkel együtt jelölve vannak a tulajdonságaik.

sát.

Megfigyelések szerint sok polipeptid esetén, főleg a  $\sim 150$  aminosavnál kisebb monomereknél, az aggregációhoz szükséges koncentráció felett a natív (természetes) állapot termodinamikailag nem stabil, és a fehérje elvben amiloid képződéssel a teljes szabadenergiáját csökkentheti (Baldwin et al. 2011). Esetünkben mindegyik vizsgált  $\alpha$ -szinukleinváltozatra érvényes ez a feltétel. Eredményeink arra utalnak, hogy a két más polimerizációs fokú változathoz, az oligomerhez, illetve az amiloidhoz képest az  $\alpha$ -szinuklein monomereknek vannak a legnagyobb arányban oldószernek kitett hidrofíli csoportjai.

## II. $\beta_4$ -timozin, stabilin-2 citoplazmadomén és komplexük

### 1. $\beta_4$ -timozin

A timozinokat eredetileg a csecsemőmirigyből különítették el, így nevüket a csecsemőmirigy latin elnevezése után kapták. Kisméretű, majdnem minden emlős szövetben jelen lévő fehérjék és sokféle biológiai aktivitásuk van. A betegségekkel kapcsolatban a timozinokat a biológiai választ módosító fehérjékként sorolták be (Low & Goldstein 1984).

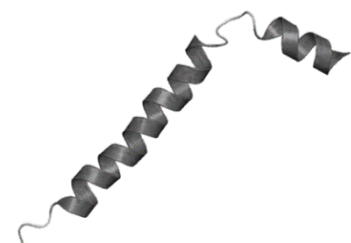
A  $\beta_4$ -timozin evolúciósan nagymértékben megőrzött (konzervált), természetesen előforduló, vízben oldódó regeneratív peptid, mely minden eukarióta szövetben és sejttípusban (kivéve vörösvérsejtek) megtalálható (Goldstein & Kleinman 2015, Goldstein et al. 2012). A vérben és más testnedvekben is előfordul, ideértve a könnyet, nyálat, agygerincvelői folyadékot, és a sebnedveket (Badamchian et al. 2007, Huang et al. 2006, Mohring et al. 2005). Bár nem túl sok aminosavból áll, széles körű regenerációs aktivitása van és különböző funkcióit a molekulán specifikus szakaszok közvetítik (Sosne et al. 2010, Low & Goldstein 1984). A  $\beta_4$ -timozin sok klinikai vizsgálat alanya (Goldstein & Kleinman 2015), például második fázisú klinikai vizsgálatok során gyorsította a sebgyógyulást olyan betegeknél, akiknek esetenként felfekvése, lábszárfekélye, vagy hólyagos felhámbetegsége volt.

A humán  $\beta_4$ -timozin 43 aminosavból áll, a molekulatömege 4921 g/mol, egy aminosavra

*$\beta_4$ -timozin szekvenciája.* SDKPDMAEIEKFDKSKLKKTTETQKEKNPLPSKETIEQEKQAGES

átlagosan 114,5 g tömeg esik és alábbi a szekvenciája. Rendezetlen moonlighting fehérje. A moonlighting fehérjék olyan fehérjék, melyekben egy polipeptidlánc egynél több fiziológiailag lényeges biokémiai vagy biofizikai funkciót lát el (Jeffery 2018, 2003, 1999). A fehérje rendezetlenségét és szerkezeti dinamikáját heteronukleáris NMR-mérésekkel,  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  NOE-val (nukleáris Overhauser-effektussal) jellemezték (Sung & Eliezer 2018). Vizes

12. ábra.  $\beta_4$ -timozin



oldatban nincs stabil felgombolyodott szerkezete (12. ábra), nagyon kevés és tranziens másodlagos szerkezetet találtak benne ebben az állapotában. Sok funkciója valószínűleg ehhez a sajátosságához kapcsolható. Fiziológus partnereihez gyakran gyengén, heterogén szerkezetű komplexeket alkotva kötődik (Sluchanko & Bustos 2019), de kötődéskor fel is gombolyodhat, például G-aktinnal képzett komplexében.

### *$\beta_4$ -timozin biológiai aktivitása*

A  $\beta_4$ -timozin például stabilin-2 közvetítésével szerepet játszik az elhalt sejtek eltávolításában (apoptózis, Böhm & Schild 2003). Különböző partnerekhez kötődve sokféle fuzzy kölcsönhatásban vesz részt (18. o), azaz képes a különböző, mégis specifikus kölcsönhatásokat összekötő kapocsként szolgálni anélkül, hogy a különböző komplexekben határozott felgombolyodott szerkezetet venne fel (Tantos et al. 2013).

A moonlighting fehérjék többfunkciós működést mutatnak, illetve sokféle partnerük van (Jeffery 1999). Sok ilyen fehérje vagy teljesen IDP, vagy hosszú ilyen régiói vannak (Tomba P. et al. 2005). Fő, aktint stabilizáló és aktin polimerizációt szabályozó molekuláris szerepén kívül a  $\beta_4$ -timozin még figyelemre méltóan sokféle funkcióval bír az állati szöveti sejteket övező folyadékban (<https://www.uniprot.org/uniprotkb/P62328/entry>), például általános szerepet játszik a szöveti regenerációban. A szövetgyógyuláshoz kapcsolódó sokféle aktivitás olyan receptorokkal történő kölcsönhatásoktól függhet, melyek az aktintól különböznek és sejten kívüli ligandumköti doménnel rendelkeznek.

### **2. Stabilin-2 citoplazmadomén**

A teljes stabilin-2 (névváltozatok: stabilin-2, FEX-2, FEEL-2, HARE), nagyméretű, 2551 aminosavból álló fehérje. Transzmembrán receptorfehérje, mely az érzékelés folyamán, nyiroksejt-irányításban, sejttapadásnál, vagy receptor eltakarításában működhet, valamint hialuronsav-receptor szerepe is van (<https://www.uniprot.org/uniprot/Q8WWQ8>). Úgy Gram-pozitív,

mint Gram-negatív baktériumokhoz is kötődik és szerepe lehet a bakteriális fertőzések elleni védekezésben (<https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q8WWQ8/entry>; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/55576>).

A  $\beta_4$ -timozinnak a stabilin-2-vel alkotott komplexe a programozott sejthalál sejtfalásában érintett, a  $\beta_4$ -timozin szerepet játszik ebben. A folyamat pontos mechanizmusa azonban még nem ismert (Lee et al. 2008).

A citoplazmadomén a stabilin-2 fehérjének a karboxilláncvégen a 2484-2551 aminosav alkotta része. Ennek a 2501-2551 aminosav által képzett részét vizsgáltuk, tömege 5631 g/mo-

*Stabilin-2 fehérje 2501-2551. aminosavszekvenciája.*

INVAALGKQQPENISNPLYESTTSAPPEPSYDPFTDSEERQLEGNDPLRTL

lekula, egy aminosavra átlagosan 110,4 g tömeg esik. A stabilin-2 citoplazmadomén a hialuronsav sejten belüli receptora és a  $\beta_4$ -timozint kötő régiója (Bokor et al. 2020a, Tantos et al. 2013, Ho et al. 2008). A  $\beta_4$ -timozin a stabilin-2 citoplazmadomén 2504-2514. aminosav-oldalláncával lép kölcsönhatásba, és a sejtmembrán betüremkedésében együtt lokalizálódnak (Lee et al. 2008).

### 3. $\beta_4$ -timozin–stabilin-2 citoplazmadomén komplex

A  $\beta_4$ -timozin és a stabilin-2 citoplazmadomén jelentősége, hogy fuzzy komplexet (18. oldal) képeznek, vagyis gyenge, tranziens, és szerkezetileg nem egyértelmű fehérje-fehérje kölcsönhatást alakít ki (Tantos et al. 2013).

A fehérjekomplex társult polipeptidláncok csoportja, kvaterner szerkezeti forma, mely-

*$\beta_4$ -timozin–stabilin-2 citoplazmadomén komplex aminosavsorrendje:* SDKPDMAEIEKFDK-SKLKKTETQEKNPLPSKETIEQEKQAGESINVAALGKQQPENISNPLYESTTSAPPEPSY-DPFTDSEERQLEGND

ben a fehérjéket nem-kovalens fehérje-fehérje kölcsönhatások kapcsolják össze. A  $\beta_4$ -timozin és a stabilin-2 citoplazmadomén által képzett 1:1 komplexet létrehozó kölcsönhatásnak szerepe van a stabilin-2 közvetítette programozott sejthalálban. A kölcsönhatást eddig csak sejtes rendszerekben jellemezték, a komplexről, annak kialakulásáról semmilyen szerkezeti vagy kinetikus adat nem érhető el. Képződésének *in vitro* termodinamikai, kinetikai és szerkezeti viszonyait sem tanulmányozták korábban.

## C. Széles jelű $^1\text{H}$ NMR-mérés és értelmezése

(Eads 1995)

Az NMR spektroszkópia az IDP-k tanulmányozásának meghatározó eszköze, mivel flexibilis és dinamikus oldatbeli szerkezetükbe nagyfelbontású betekintést nyújt. Ellentétben a strukturált fehérjékkel, az IDP-k nem vesznek fel rögzített konformációt, és az NMR-nek az a képessége, hogy dinamikus együtteseiket és tranziens kölcsönhatásaikat megragadja, ideálissá teszi ezen egyedülállóan flexibilis fehérjék funkcionális mechanizmusainak jellemzésére (Murali et al. 2020).

Ha NMR-ről van szó, szokásosan azt feltételezik, hogy kémiai analitikai módszerről, vagy mágneses rezonancia képalkotásról (magnetic resonance imaging, MRI) van szó. A időtartományú NMR és MRI módszer jó a folyékony és a szilárd halmazállapotú anyagok fizikai tulajdonságainak mérésére. Az anyag tulajdonságai viszont sokkal egyszerűbben kinyerhetők az időtartománybeli adatokból, mint a nagy mágneses térrel mért, nagy felbontású spektrális adatokból. Ráadásul az alacsony mágneses térrel mérő, időtartományú NMR készülékek tipikusan 10-100-szor olcsóbbak, mint a nagy mágneses terű, nagy felbontású szilárd NMR-rendszerek (Webber 2021). Az NMR-spektroszkópia a kémiai analízis nélkülözhetetlen módszere, de a nagy mágneses tér, a beszerzés és fenntartás magas költségei, és az összetett üzemelés általános felhasználását korlátozzák. A kismolekula elemzésre alkalmas kémiai, asztali kompakt NMR-spektrométerek állandó mágneseket tartalmaznak, melyek 40-80 MHz-es proton frekvenciákat eredményeznek (Blümich & Singh 2018). A gyakorlatban a kis mágneses terű, azaz széles jelű NMR-spektroszkópia a kémiai és biokémiai analízis fontos módszere (Grootveld et al. 2019).

A folyadékszerű állapotban lévő molekulák rendszerint molekulaszervezet-függő frekvenciával vagy kémiai eltolódással jellemzett keskeny NMR rezonanciákat hoznak létre (néhány – több tíz Hz). Ezen jelek analízise megkönnyíti például folyadékok egyes összetevőinek azonosítását. A szilárd állapotban lévő molekulák sokkal szélesebb, inhomogén rezonanciákat

hoznak létre (1000 – 100.000 Hz). Azaz, miután az atommag és a környezete közötti mágneses kölcsönhatások irányfüggőek, a mintában lévő molekulák változatos orientációja sok, kissé különböző frekvenciájú rezonanciát állít elő. Egy széles rezonancia ezért a lokális szerkezetről és mozgásról hordoz információt. A szerves anyagokban található protonokra ható domináns jel-szélesedési kölcsönhatás a homonukleáris mágneses dipólus kölcsönhatás.

A fehérjéről alkotott tudományos világkép az ezredforduló környékén alapvetően megváltozott (Tomba P 2010, 2003, 2002, Dunker et al. 2001, Wright & Dyson 1999), amikor többen is javasolták, hogy a fehérjék rendezetlen állapota általánosan elterjedt minden élő szervezetben, és elengedhetetlen az alapvető sejtműködéshez; ilyenformán megérdemli, hogy a fehérjék világában külön működési és szerkezeti kategóriaként vegyük figyelembe. Ezek a rendezetlennek nevezett fehérjék.

A széles jelű NMR-spektroszkópia használata kiterjeszthető a fehérjékre, amint azt korábban már megmutattuk, például (Bokor et al. 2005). Mint élő anyag, madarak (csirke és pulyka) szemlencséin végeztünk szélesjelű  $^1\text{H}$  NMR jelintenzitás, spin-rács és spin-spin relaxációs ráta, valamint DSC méréseket (Tomba K. et al. 2010). A szemlencse elsősorban vízből és fehérjerostokból áll, tehát közelítőleg tömény fehérjeoldatnak tekinthető. Méréseinkkel a fehérje-víz határfelületi régióra jellemző fehérjehidrataációról kaptunk kvantitatív információkat. Ezek nagy fontossággal bírnak mind a szemlencse fiziológiájának, mind az opak fehérje aggregátumok képződésével a kóros hályogos állapotba való átmeneteinek a megértésében. Azt találtuk, hogy termodinamikai értelemben a szemlencse és annak hidrátrétege egyetlen, magas szinten összekapcsolódott fázisként viselkedik. A relaxációs ráták elemzése kimutatta, hogy mind a longitudinális, mind a leghalványabb transzverzális relaxációs komponens ugyanazt az aktivációs energiát adja. Ez a  $0^\circ\text{C}$  felett létező transzlációs diffúzió következménye, ugyanis a transzlációs diffúzió összekeveri a felületközi és a tömbfázisbeli vízmolekulákat.

A fehérjeoldatoknál az oldószer minősége meghatározó a fehérjék hidratációjának tulajdonságai szempontjából (Kamasa et al. 2007). A kezdetekben méréseinket 150 mM  $\approx$  0,9 tömeg%, azaz fiziológias mennyiségű NaCl-ot tartalmazó, trisz(hidroximetil)-aminometánnal (triszel) pufferezt, semleges kémhatású oldatokban vizsgáltuk (Balázs et al. 2009, Tompa K. et al. 2009, Kamasa et al. 2007, Tompa P et al. 2006, Bokor et al. 2005, Csizmók et al. 2005). A fehérje mellett más oldott anyagok is hatnak azonban a mérési paraméterekre, ezért akkor lehet egyértelműen csakis az oldott fehérjék hidratációjához kapcsolható paraméterváltozásokról beszélni, ha oldószerként más oldott anyagoktól mentes vizet használunk (minden 2010 után készült munkánk, Házay et al. 2011, Szöllősi et al 2008, Kamasa et al. 2007).

### **III. Célkitűzések**

Munkám során két nagy célom volt: egyrészt ki akartam terjeszteni a széles-jelű NMR formalizmust a fehérjék hidratációs viszonyainak a vizsgálatára, másrészt ennek alkalmazása rendezett és rendezetlen fehérjék vizsgálatára. Ezen célok fő részletei:

- a fehérjék rendezettségi-rendezetlenségi állapotának a fehérjéhez és a szomszédos vízmolekulákhoz egyaránt kötődő vízmolekulák mozgékonyasága alapján történő definiálása és kísérleti meghatározása
- jól definiált rendparaméterek segítségével a rendezett fehérjéknek és az IDP-knek a hidratvíz molekuláris mozgékonyasága szerinti osztályozása
- a rendezett és rendezetlen részek arányainak, és bennük a fehérje-víz potenciálgátak energiaeoszlásának közvetlen mérési eredmények alapján történő meghatározása
- betegségekben szerepet játszó fehérjékhez ( $\alpha$ -szinuklein,  $\beta_4$ -timozin és stabilin2 citoplazmadomén) kapcsolódó mozgékony hidratációs víz termodinamikai jellegzetességeinek vizsgálata (energetikai szempontok)
- az egyes fehérjék olvadási diagramjának elemzése, hidratációs tulajdonságaik betegségben játszott szerepük szerinti értelmezése

## **IV. Anyagok és módszerek**

## A. Fehérjék előállítása

A fehérjekutatások a HUN-REN Wigner Fizikai Kutatóközpont Szilárdtest-fizikai és Optikai Intézete (Wigner FK SZFI) és a HUN-REN Molekuláris Élettudományi Intézete<sup>1</sup> közti együttműködésben zajlottak. A széles jelű NMR kísérletek a Wigner FK SZFI-ben zajlottak a fagyott fehérjeoldatokon, míg a vizsgált fehérjéket a Molekuláris Élettudományi Intézetben készítették a következőképpen.

### *$\alpha$ -szinuklein*

(Bokor et al. 2022, Bokor et al. 2020b, Házy et al. 2011)

A rekombináns humán A30P, E46K, A53T mutáns, és a vad típusú  $\alpha$ -szinuklein variánsok expressziója és tisztítása pRK-172 alapú expresszálo rendszerben történt (van Raaij et al. 2006) szerint. A fehérjék expressziójára pT7-7-alapú expresszálo rendszerben, IPTG indukciót követően, *Escherichia coli* BI21(DE3) sejtekben került sor. Centrifugálással baktérium-sejtpelletek kerültek begyűjtésre és 10 mM Tris-HCl, pH 8,0, 1 mM EDTA, és 1 mM cOmplete proteáz inhibitor koktélnálban reszuszpedálásra. A sejtroncsolás után a streptomycin szulfát-csapadék DNS-t centrifugálással eltávolították és ammóniumszulfátos csapadékképzési lépés történt, hogy szelektíven az  $\alpha$ -szinuklein fehérje csapódjon ki. 4 °C-on, 13.500 g-n történő, 30 perces centrifugálás után a pelletet feloldották 10 mM Tris-HCl, pH 7,4, 1 mM cOmplete-ban és 0,2  $\mu$ m-en átszűrték. A kapott oldatot Resource Q anion kicserélő oszlopra töltötték Äkta Explorer kromatográfiás rendszeren (GE Healthcare). A tisztított fehérjék tisztaságát és integritását SDS-PAGE-el igazolták (elektroforézis módszer, a fehérjéket tömegük szerint választja el poliakrilamid alapú porózus gél közegben, 13. ábra). A csúcsfrakciók kerültek begyűjtésre és kétszer desztillált víz ellenében dializálták liofilizálás előtt.

Mérési minta készítésekor a liofilizált fehérje tömegét lett megmérve (minden további

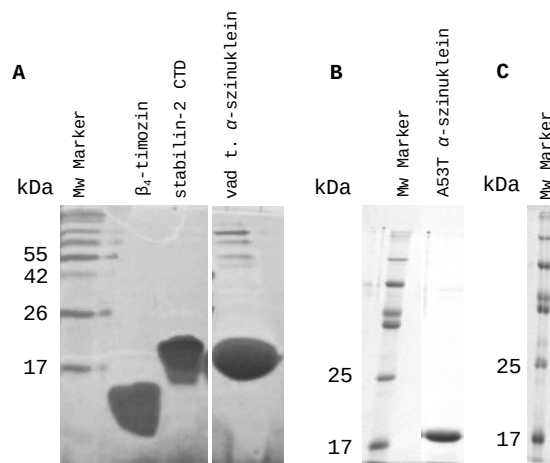
---

<sup>1</sup> 2023. 11. 28.-ig Enzimológiai Intézet

tisztítás nélkül), a megfelelő mennyiségű, monomerek esetén ultratiszta, kétszer desztillált vizet adtak hozzá, hogy 50 mg/ml legyen a névleges koncentráció. A folyamat során képződött oligomerek eltávolították az oldat 100 kDa-os membránon való átszűrésével.

Az amiloid képződés 50 mg/ml fehérjének a következő pufferben történő feloldásával lett megindítva: 10 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 0,02% NaN<sub>3</sub>, 100 mM CuCl<sub>2</sub>. A mintákat 37 °C-on, 800 rpm rázással inkubálták. és az amiloidszál növekedése tioflavin T (ThT) fluoreszcenciával lett követve, 5 µM ThT-vel (végső koncentráció). Az amiloidnövekedés lag fázisában, a kezdőpont után 24 órával lettek az oligomerminták kivéve. A képződött amiloidok a növekedést követően 60 órával lettek elválasztva. Azonos körülmények között, de ThT nélkül inkubált mintákon a szálak jelenléte elektronmikroszkóppal (Jeol JEM1011) lett igazolva. Mérés előtt az oligomer és az ami-

**13. ábra.** Reprezentatív SDS-PAGE gélképek a felhasznált fehérjékről. A.  $\beta_4$ -timozin, stabilin-2 CTD és vad típusú  $\alpha$ -szinuklein. B.  $\alpha$ -szinuklein A53T variáns. C.  $\alpha$ -szinuklein E46K variáns



loid minták ultratiszta kétszer desztillált vízbe lettek dializálva. Az NMR-mérés időpontjában a végső koncentrációk a következők voltak: monomerek és amiloidok: 25 mg/ml, oligomerek: 50 mg/ml. A mérések három azonos, egymástól függetlenül készített mintán lettek elvégezve. Minden eredmény, ahol a víz mozgékony frakciója,  $n(T_{fn})$  érintett, 50 mg/ml fehérjekoncentrációra lett számítva.

### ***$\beta_4$ -timozin, stabilin-2 citoplazmadomén és 1:1 komplexük***

(Bokor et al. 2020a, Tantos et al. 2013)

A humán  $\beta_4$ -timozin (UniProt: P62328) DNS-t tartalmazó pET22b expressziós plazmidot az MWG Biotech AG-től vásároltuk. A kódoló régióhoz stop kodon lett hozzáadva, hogy a fehérje biztosan His-jelölés nélkül fejeződjön ki. Egy éjszakai indukciót (28 °C; 1 mM IPTG

[Apollo, BIMB1008]) követően a sejtekből pelletet csináltak és roncsoló pufferben (10 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  [Sigma, S50876], 150 mM NaCl Sigma, 59888], pH = 7,0) SIGMAFAST Inhibitor Cocktail-lal (Sigma, S58820), szonikálással roncsolták. A sejttermelék centrifugálással ( $24.000\times g$ , 20 perc, 4 °C) került eltávolításra, 5 percig vízfürdőben lett forralva a felülúszó, és aztán centrifugálva lett ( $24.000\times g$ , 20 perc, 4 °C). 3% perklórsavat (Sigma, 77230) adtak a felülúszóhoz és a kicsapódott fehérje centrifugálással ( $24.000\times g$ , 20 perc, 4 °C) el lett távolítva. A felülúszó pH-ja 7,0-ra lett beállítva 5 M KOH (Sigma, P1767) adagolásával. A végső fehérjeoldat 0,2  $\mu\text{m}$ -es nitrocellulóz szűrőn lett átszűrve és Akta Explorer rendszeren (GE Healthcare), fordított fázisú (RPC) oszlopon (GE Healthcare, 17-1182-01) lett tisztítva. Az eluált  $\beta_4$ -timozin desztillált víz ellen dializálva és aztán liofilizálva lett. A humán stabilin-2 (Uniprot: Q8WWQ8) levágott sejten belüli régiója (2501-2551. aminosav) DNS-t az MWG Biotech AG cég szintetizálta és inszertálta pETARA vektorba, ami a célfehérjét GST-fúziós konstrukció formában fejezi ki. Szonikálás után  $24.000\times g$ -n 50 percet, 4 °C-on lett centrifugálva. A fehérjekifejezés 28 °C-on, 0,5 mM IPTG-vel egy éjszakán át lett indukálva. A felülúszó 0,2  $\mu\text{m}$ -es nitrocellulóz szűrőn lett átszűrve és GSTrap FF oszlopokra lett töltve. Az elúciót éjszakai TEV proteáz kezelés követte, hogy GST-jelölés el legyen távolítva. A keverék vízfürdőn 5 percet forralva lett tisztított fehérjét 20 mM ammónium acetát (Sigma, A7330) ellenében (pH = 6,8) dializálva és aztán liofilizálva lett (13. ábra). A komplexképződés a két fehérje ekvimoláris mennyiségének desztillált vízben történő összekeverésével és a keverék liofilizálásával lett elérve.

## B. Széles jelű $^1\text{H}$ NMR mérések fagyott fehérjeoldatokon

Bruker AVANCE III NMR-pulzus spektrométeren, 82,4 MHz frekvencián készültek az  $^1\text{H}$  NMR-mérések és az adatgyűjtés (Tompá P. et al. 2006, Csizsók et al. 2005). A mérések stabilitása jobb volt, mint  $\pm 10^{-6}$ -od rész. A mágneses tér inhomogenitása 2 ppm volt. Az adatpontokhoz az NMR-jelek 50-es jel/zaj arány eléréséig voltak átlagolva. A széles jelű NMR-spektroszkópia

elve és részletei az következő fejezetben találhatóak. A mért szabad precessziós jelek (free induction decay, fid) amplitúdóját a 90°-os pulzus hosszára és a nukleáris szuszceptibilitás hőmérsékletfüggésére normalizáltuk. A mérés időskálájára jellemző értékek a következők: 2  $\mu$ s-os pulzushossz, 10  $\mu$ s-os spektrométer-holtidő, és néhány 100-1000  $\mu$ s a mozgékony hidratációs víznek megfelelő fid hossza, illetve ez mintegy 20 ms a tömbvíz esetén. A mozgékony protonhányadot (vízhányaddal arányos) közvetlenül mértük a fid-jel amplitúdóján keresztül. A fid-jel nulla időre való extrapolációja Gauss-függvények összegének illesztésével történt. A fehérjéket 25 mg/ml, illetve 50 mg/ml koncentrációban, ultratiszta desztillált vízben oldottuk fel. A fehérje–víz határfelületre koncentráció kísérlet fagyasztással–olvasztással, vagyis lehűtéssel és lépésenkénti újra felmelegítéssel járó technológiából áll. A fid-jeleket minden egyes hőmérsékleten a hőmérsékleti egyensúly elérését követően vettük fel -70 °C és +25 °C között. A mérések melegítés közben történtek, hogy a túlűtés problémáját elkerüljük. A fehérjék minden esetben, szobahőmérsékletre történő újramelegítés után a hűtés előttivel egyező fid-jelet adtak, tehát nem történt változás a szerkezetükben, nem fordult elő hideg denaturáció. Egy mérési pont felvétele jellemzően 10 percet vett igénybe. Folyékony nitrogén felhasználásával, nyílt körű Janis-kriosztáttal szabályoztuk a hőmérsékletet, melynek pontossága és állandósága jobb volt, mint  $\pm 1$  °C.

Általánosságban, a számértékek utolsó számjegyének hibája zárójelben van megadva. A víz mozgékony hányadát használó minden eredményt 50 mg/ml fehérjekoncentrációra vonatkoztattunk, így az értékek közvetlenül összehasonlíthatók.

A kitűzött célok elérésének érdekében széles jelű  $^1\text{H}$  NMR-spektroszkópiával olvadási diagramokat rögzítettünk. Az olvadási diagramok fagyott fehérjékben (elenyésző víztartalom) vagy fagyott fehérjeoldatokban (számottevő víztartalom) a mozgékony vízmolekulák mennyiségét adják meg a hőmérséklet vagy energia függvényében. Az olvadási diagram megadja, hogy adott hőmérsékleten, illetve potenciálját értéknél mennyi nem fagyott állapotú víz van a fehérje

## mbokor\_337\_25

körül. A fehérjefelszín és a hidratációs víz közötti szoros kapcsolat elemzését az oldat állapotú fehérjerendszerekben mért kísérleti víztulajdonságok segítségével lehet megtenni (Martini et al. 2013).

### **III. Mérési eredmények és értelmezésük**

A széles jelű  $^1\text{H}$  NMR-spektroszkópiával vizsgált fehérjék előállítás és biokémiai jellemzése a HUN-REN Enzimológiai Intézetben történt, míg a HUN-REN Wigner FK SZFI-ben végeztük az NMR-méréseket. Ennek során új módon, a fehérjéhez és a szomszédos vízmolekulákhoz egyaránt kötött vízmolekulák mozgékonyasága és annak hőmérsékletfüggése alapján definiáltuk a rendállapotot (ennek elvi kidolgozása Tompa Kálmánnak köszönhető) és széles jelű  $^1\text{H}$  NMR-rel kísérletileg meghatároztuk. Az így meghatározott rendezettség, illetve rendezetlenség fizikai-kémiai állapotjelző, és nem írható le pontszerű objektumok közötti potenciállal. A fehérjéhez is kötött vízmolekulák (rotációs) mozgásának megindulásához szükséges termikus gerjesztési energia a mért mennyiség, mely különbözik a fehérje-víz kötési energiától.

A vízmolekulák mozgását akadályozó potenciálgátak széles energiaszórása tapasztalható, így ezek segítségével nem csak egyetlen átlagértéket kapunk, hanem ennél jóval részletesebb információ nyerhető ki, például az eloszlás minőségét, az általa átfogott energiatartományt stb. illetően. A fehérje vizes közeggel közvetlenül érintkező hidrofób része, ill. ennek aránya a teljes víznek kitett felülethez képest, határozza meg a kötés erősségét a fehérje hidratációs héjában kötött vízre (Brotzakis et al. 2016). A lokális hidrofobicitás mértéke fordítottan arányos a lokális kötéserősséggel. A fehérje rendezetlenségét a víz (oldószer) fehérjefelülethez való hozzáférése mértékének leírásával lehet mennyiségileg meghatározni. Az oldószernek hozzáférhető felszín területe jelentősen nagyobb az IDP-k esetén, mint a globuláris fehérjéknél (Tompa K. et al. 2012, 2010b). A vízmolekulák mozgékonyaságát meghatározó potenciális energia nagyság szerinti eloszlása és ennek heterogenitása a fehérjék rendezetlen vagy rendezett általános természetére vet fényt (például Taricska et al. 2019). A széles jelű  $^1\text{H}$  NMR-spektroszkópiai eredmények megmutatják, hogy a kérdéses fehérje IDP-nek sorolható-e be.

## A. A fagyott fehérjeoldatok általános tulajdonságai

(Tompa K. et al. 2015, 2012, 2010b, Bokor et al. 2005)

A fehérjeoldatok fő komponensként fehérjemolekulákból, hidratációs héjből, és nem-

kötött vízből állnak. Hogy a mintákban jelen lévő különböző vízfázisokat elkülönítsük egymástól, a fehérjeoldatokat lefagyasztjuk: a jégfázisban lévő hidrogénatomok keskeny időskálájú  $^1\text{H}$ -jele (fidje) a spektrométer holtidejébe esik (az eljárás ötlete Tompa Kálmánnak köszönhető). A jégprotonok, fehérjeprotonok, és a (nem-fagyott) vízprotonok világosan elválaszthatóak a fid-jelben, mert a különböző fid-komponensek lecsengésének sebessége markánsan különbözik. Ez lehetővé teszi a fehérjék hidrátrétegéhez tartozó fidek konkrét rögzítését (14. ábra, 50. oldal). A vízmolekulák viselkedése felől nézve négy különböző hőmérséklet-tartományt (*a–d*) azonosíthatunk, melyeken belül jellegzetes különbségeket mutat a vízfázisoknak az NMR-jelhez való hozzájárulása.

*a) tartomány* A fagyponthoz felett a fehérjeoldat teljes víztartalma folyadék állapotban van és hozzájárul az NMR-jelhez. *b) tartomány* A fagyás folyamata kezdetben csak a hidratációs héjon kívüli tömbvízre hat. Így a fagyponthoz körül a fehérjeoldat kétfázisú spinrendszerként kezelhető (hidratációs héj és szabad víz), a két fázis közötti molekulacserével. A hidratációs héj kifejezés alatt a fehérje–víz határfelületen lévő vízmolekulák értendők, míg az olvadás a reorientációjuk megindulását jelenti. *c) tartomány* Hidrátrétegbeli gyorsan változó nem-fagyott vízmennyiségekkel jellemzett ez a fagyponthoz  $\sim(-23\text{ }^\circ\text{C})$ -ig terjedő hőmérséklet-régió. *d) tartomány* A nem-fagyott vízfrakció azonos  $^1\text{H}$  magok rendszerként kezelhető  $-23\text{ }^\circ\text{C}$  alatt. A nem-fagyott víz mennyisége csak kicsit változik ebben a hőmérsékleti régióban. *b–d) tartomány* A fagyott víz (jég) frakció merev spinrendszerként viselkedik. Ha a mintát fagyáspont alá hűtjük, akkor növekvő mennyiségben van jelen és NMR-jele a spektrométer holtidejében elvesző gyors lecsengéssel jellemzett (Barnal & Lowe 1967). A jég hozzájárulását ezért nem lehet közvetlenül észlelni, csak a hiányát tapasztaltam.

A rendezett fehérjék széles  $0\text{ }^\circ\text{C}$  alatti potenciálgát-tartományban konstans mozgékony –mennyiségértéket mutatnak, míg a rendezetlen fehérjék az esetleges, de mindenképpen rövid konstans szakasz után a potenciálgát függvényében emelkedő trenddel rendelkeznek. Vagyis

azt tapasztaltam, hogy a rendezett fehérjék szinte az egész 0 °C alatti tartományban állandó mozgékony hidrátvízmennyiség értéket mutatnak, míg a rendezetlen fehérjék mozgékony hidrátvízmennyisége széles tartományban folytonosan növekszik a tömbvíz olvadáspontjáig.

## **I. Széles jelű NMR-spektroszkópia elve és részletei**

(Tompá K. et al. 2013, 2012, 2010b)

Az időfüggő mágneses térben lévő elektromos hullámnak a magmágneses momentumok által való rezonáns abszorpciója az NMR. Bár a fehérjekutatásban széleskörűen és sikeresen alkalmaznak nagy felbontású NMR-technikákat (például homo- és heteronukleáris Overhauser-módszerek), azonban a hagyományosabb széles jelű NMR-spektrummérések nagyon hasznosnak bizonyulnak a globuláris és az IDP-k kutatásának alapkérdéseit illetően.

Modellmentes eljárást alkalmazva (ötletét és kidolgozását Tompa Kálmánnak köszönve), közvetlen módon jellemezzük a fehérjéket. Az egyes mozgékony vízfrakciók megkülönböztetése vagy osztályozása a vízmolekulák, pontosabban a bennük foglalt hidrogén atommagok, mozgékonyságának különbözőségén alapul. A mozgás itt transzlációs diffúziót vagy rotációt jelent. Az anyagminta energiaeloszlás szerinti heterogenitásának, vagy az NMR-válasz ebből következő összetettségének csökkentését a hőmérséklet változtatásával oldottam meg. A gyorsan -70 °C-ig lehűtött, és aztán egyensúlyi állapotokon keresztül történő felmelegítés során mért NMR spektrumjellemzők a vizsgált minta molekuláinak mozdulatlan, illetve részben vagy teljes mértékben mozgékony állapotáról nyújtanak közvetlen információt (Slichter 1990). Az alacsony hőmérsékletű (0 °C alatti) mozgékony vízfrakció határfelületi vízként azonosítottam, vagyis az anyagok hidratációjaként, és mennyiségét, dinamikáját, létrejöttének ütemét a hőmérséklet függvényében tudtam vizsgálni.

Az NMR relaxációs folyamatait, a rádiófrekvenciás tér által indukált magspinpolarizáció bomlását alapvetően két folyamat határozza meg (lehűtött fehérjeoldatok: Tompa K. et al. 2010,

2012). Egyrészt a rezonancia intenzitásának elvesztését okozza az impulzus gerjesztését követően a spin-rács vagy longitudinális relaxáció, melyből lényeges információt kapunk a vizsgált rendszer inter- és intramolekuláris dinamikája tekintetében. A longitudinális relaxáció a rács többi szabadsági fokával történő energiacserét jelent. Lehűtött fehérjeoldatokon végzett korábbi longitudinális relaxációs idő méréseinkből kiviláglott (Tompá K. et al. 2010, Bokor et al. 2005), hogy az IDP-k esetén a legerősebben kötött részének, a hidratációs víznek, a dinamikára kapott aktiválási energiája 50%-kal nagyobb, mint a globulárisaknál. A két fehérjetípus között az ehhez a mozgásokhoz tartozó korrelációs idők is jelentősen, nagyságrendekkel eltértek. Másrészt a spin-spin vagy transzverzális relaxáció mérhető, mely fáziskoherenciavesztést jelent, a fid lecsengését okozza, és a vonalak szélességéért felelős (Slichter 1990), valamint a kölcsönható magspinek közötti energiaátadással jár. Ez a dolgozat nem tartalmaz relaxációs idő méréseket.

Az alacsony hőmérsékletű ( $< 0\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) jelintenzitást lehet mérni a fid-jel vagy a CPMG echósorozat  $t = 0$ -ra extrapolált amplitúdójával (Tompá K. et al. 2012), ebből pedig a mozgékony hidratációs víznek az összes vízhez vett arányát lehet kiszámítani. A CPMG echósorozat (Hahn 1950, Carr & Purcell 1954, Meiboom & Gill 1958) a transzverzális relaxációs idő és az NMR-jelamplitúdó mérésére használható (Tompá K. 2010b). Ekkor csak azok a protonok járulnak a kapott jelhez, melyekre az átlagos dipoláris tér zérus a mozgási keskenyedés (50. oldal) miatt, azaz csak a mozgékony protonokat detektáljuk.

Jelen dolgozatban csak a fid-jelek amplitúdóméréséből határoztam meg a mozgékony vízhányadokat. A  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$  feletti hőmérsékleten mért,  $t = 0$ -ra (gerjesztő pulzus vége) extrapolált fid-jelintenzitás szolgál 100%-os referenciapontként a  $< 0\text{ }^{\circ}\text{C}$ -os mozgékony vízhányad megállapításához. Fontos felvenni  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$  felett néhány fid-jelet az anyagminta lehűtése előtt és akkor is, miután újra visszamelegítettük azt szobahőmérsékletre. Ezen fid-jelek amplitúdójának, alakjának összehasonlításával ellenőrizhető, hogy a fagyasztási eljárás után az anyagminta visszatér-

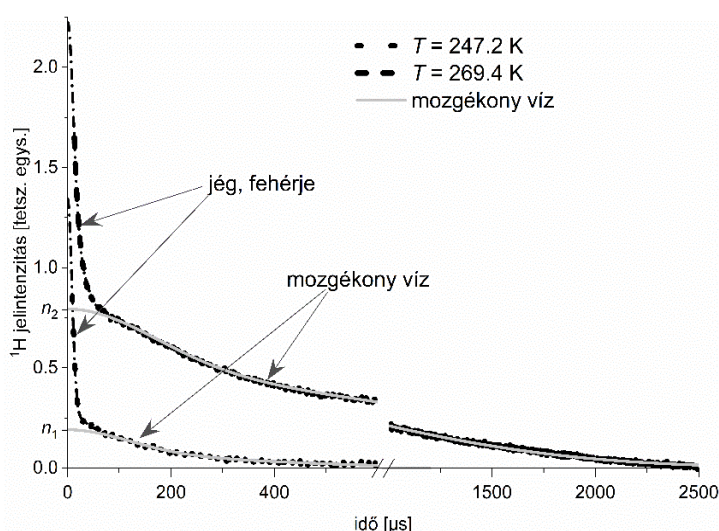
e eredeti állapotába, nem történt-e hűtési denaturáció. Az NMR-kísérleteket az adott fehérjeoldat jellegzetességei által megkívánt hőmérsékletközönként végeztem, ami legtöbbször néhány °C. Általánosságban a fid-jelek alacsony, tehát 0 °C alatti hőmérsékleten háromkomponensűek (ld. következő fejezet).

A széles jelű  $^1\text{H}$  NMR-kísérletek eredményeként megkaptam az adott hőmérsékleten a mozgékony hidratációs víz mennyiségének arányát az oldat teljes vízmennyiségéhez képest, valamint a hidratációs víz mozgását meghatározó potenciálgátak eloszlását. A mozgó vízmennyiségeket és a potenciálgáteloszlásokat olvadási diagramok formájában, illetve ezek deriváltjaként ábrázoltam. Az olvadási diagram értelmezésével a fehérjék oldószernek hozzáférhető felszínének termodinamikai természetéről kaptam információt. A potenciálgátak eloszlásán keresztül felderíthettem, milyen erősek a fehérje–víz kötések. Megállapítottam azoknak a mozgékony vízhányadoknak a mennyiségét, melyek a fehérjének a hidratációs víz mozgását meghatározó különböző potenciálgátakkal jellemzett, oldószernek hozzáférhető felszínrészeihez kötődnek. Információt kaptam a fehérjék azon tulajdonságairól, melyek a mozgékony hidratációs víz megkötéséhez fűződnek.

## II. $^1\text{H}$ NMR fid-jel és spektrum

Többkomponensű rendszerben a fid-et külön frakciókra lehet bontani (14. ábra), melyekben a rezonáns atommagok mozgékonyasága eltérő lesz. A jég-, fehérje-, és a mozgékony vízprotonok fid-jelkomponense jól elkülönül a spin-spin relaxációs idejük nagy különbségei miatt (Csizmók et al. 2005). A fid lassan lecsengő komponensét (14. ábra, világosszürke vonal) a mozgékony  $^1\text{H}$  magok hozzák létre. Ezek a protonok esetünkben leginkább a hidratációs vízben találhatók.

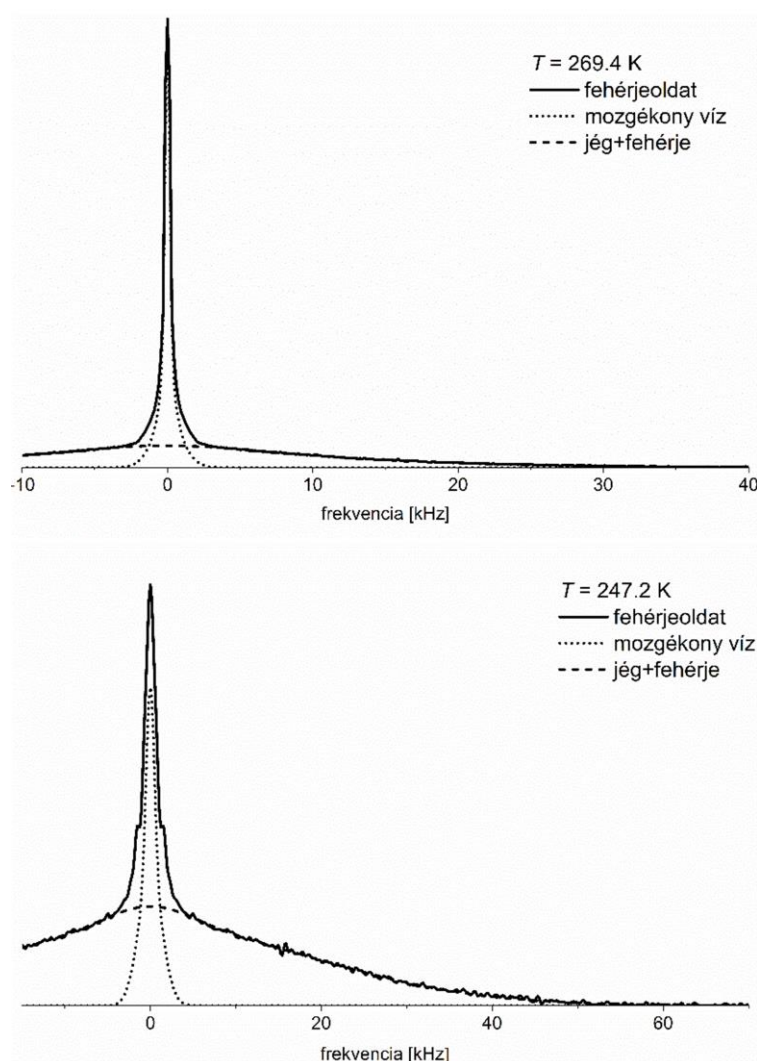
Egy fid-komponens amplitúdóját  $t = 0$ -ra (Gauss-függvények összegével) extrapolál-tam, mely megfelel az érintett magok által keltett  $M_{i0} \propto n_i \cdot B_0/T$  mágneszettségnek. ( $M_{i0}$ : mag-



**14. ábra.** Széles jelű NMR-spektroszkópiával, fehérjeoldatokon,  $T = 247,2\text{ K}$ -en (pontosított vonal) és  $T = 269,4\text{ K}$ -en (szaggatott vonal) felvett  $^1\text{H}$  szabad precessziós jele. A  $t < 100\text{ µs}$ -nál meredeken csökkenően lefutó komponensek jégben és fehérjében lévő  $^1\text{H}$ -magoktól származnak. A lassan lecsengő komponens (világosszürke vonal) a mozgékony vízmolekulákban lévő  $^1\text{H}$ -magoktól ered. Ez utóbbi  $t = 0$ -ra extrapolált amplitúdója ( $n_1$  és  $n_2$ ) arányos a mozgékony víz mennyiségével (Bokor et al. 2020a, Supporting information).

mágneszettség,  $n_{ii}$ : az adott jelkomponenst generáló atommagok száma,  $B_0$ : az állandó mágneses tér indukciójának nagysága,  $T$ : abszolút hőmérséklet). Ez a kifejezés közvetlenül adja meg minden egyes,  $n_i$  számú magból álló  $^1\text{H}$ -hányad nagyságát. A fehérjeoldatok olvadása az  $^1\text{H}$  NMR-spektrumban mozgási keskenyedett komponens megjelenésével jár (mozgási keskenyedés: az atomok mozgásának hatására a spektrum szélességét okozó dipólus-dipólus kölcsönhatások kiátlagolódnak, a spektrum szélessége lecsökken; 15. ábra). A keskeny vonal az alacsonyabb hőmérsékleten merev, ezen a magasabb hőmérsékleten már mozgékony vízmolekuláknak tulajdonítható (Tompá K. et al. 2013, 2012, 2010b), melyek a fehérje–oldószer határfelületen,

azaz a fehérjemolekulák felszínén találhatók (nincsenek a fehérjemolekula oldószernek nem hozzáférhető helyein elrejtve).



**15. ábra.** Eltérő hőmérsékleteken mért szabad precessziós jelek  $^1\text{H}$  NMR-spektruma. A fehérjeoldat spektruma (folytonos vonal) széles (szaggatott vonal) és keskeny (pontozott vonal) komponens összegéből áll. A széles vonal forrásai a jégben és a fehérjében lévő  $^1\text{H}$ -magok, míg a keskeny (mozgási keskenyedett, 50. oldal) vonal a mozgékony vízmolekulákban lévő  $^1\text{H}$ -magoktól ered (Bokor et al. 2020a, Supporting information).

### III. Olvadási diagram kiértékelésének elmélete

Az aktuális molekuláris mozgás kezdő hőmérsékletét a hőmérsékleti gerjesztési energiával összekapcsoló formalizmust (Waugh & Fedin 1962) Tompa Kálmán (HUN-REN Wigner FK SZFI) korrigálta és új tulajdonságokkal felruházva vezette be (Tompá K. et al. 2017, 2015). a) Mértékegységek tekintetében helyessé tette; valamint bevezette b) a vizes oldatokra való alkalmazását és a fundamentális hőmérsékleti skála használatát, illetve a c) vízmolekulák reorientációjának a fehérje oldószernek kitett felületén való megindulásának detektálását széles jelű  $^1\text{H}$  NMR-módszerrel.

Ezen eredeti megközelítés abból indul ki, hogy az adott molekuláris mozgás, mely  $T$  hőmérsékleten kezdődik és  $V_0$  hőmérsékleti gerjesztési energia tartozik hozzá, a  $V_0 = \text{konsztans} \times T$  összefüggéssel írható le. A hőmérséklet megadására az energiaegységekben mérő fundamentális hőmérséklet fogalmát használjuk. Az olvadási diagram (42. oldal) megadja a megolvadt mozgékony víz NMR-rel mért  $n_i$  mennyiségét (mennyiségének arányát az oldat teljes vízmennyiségéhez viszonyítva) a fundamentális hőmérséklet függvényében, mely definíció szerint  $T_f = R \cdot T = k_B \cdot T \cdot N_A$ , tehát lényegében energia<sup>2</sup>, vagyis energia dimenziójú (McGee 1988, Kittel & Kroemer 1980). A fundamentális hőmérsékletet a jég olvadáspontjára normalizáljuk, az így kapott normalizált fundamentális hőmérséklet tehát  $T_{fn} = T / 273,15 \text{ K}$ . A továbbiakban a normalizált fundamentális hőmérsékletet (Tompá K. et al. 2015) használjuk dimenziómentes egységként. A fehérjével kölcsönhatásban lévő mozgékony vízmolekulák mozgására ható potenciálgátakat a víz moláris olvadási hőjével súlyozott hőmérsékleti energiával azonosítottuk, vagyis a potenciálgát-érték,  $E_a = T_{fn} \cdot \Delta_m H$  egyenlő a normalizált fundamentális hőmérséklet szorozva a víz moláris olvadáshőjével ( $\Delta_m H = 6,01 \text{ kJ mol}^{-1}$ ; CRC Handbook 2020). Így már lehetséges a molekuláris mozgások kezdetét energiaskálán jellemezni.

Egy adott hőmérsékleten tipikusan azon vízmolekulák válnak mozgékonyá, melyek kötési energiája nem nagyobb a hőmérsékleti energiánál ( $k_B T$ ). Ezek a vízmolekulák nem az összesféle aminosavhoz kötöttek, kötődhetnek egy- vagy többféle aminosavhoz is.

A mozgékony vízmolekuláknak a teljes víztartalom mennyiségéhez viszonyított arányára, valamint a normalizált fundamentális hőmérsékletre kizárólag fizikai dimenziótól mentes mennyiségeket használtam. Ezt a vízmennyiséget aztán egyrészt mikroszkopikus, másrészt pedig makroszkopikus mértékként használtam. A mikroszkopikus  $n$  mértéket (mozgékony hidratációs vízmennyiség aránya) továbbalakítottam a vízmolekulák aminosavankénti

---

<sup>2</sup>  $R = 8,314 \cdot 10^{-23} \text{ J (mol K)}^{-1}$  a moláris gázállandó,  $T$  az abszolút hőmérséklet,  $k_B = 1,381 \cdot 10^{-23} \text{ J K}^{-1}$  a Boltzmann-állandó,  $N_A = 6,02 \cdot 10^{23}$  pedig az Avogadro-állandó.

$naa$  számává, makroszkopikus mérőegységnek pedig  $h$  hidratációvá váltottam át. A vízmolekulák aminosavankénti számát meghatároztam:  $naa = n \cdot (m_{\text{víz}} \cdot M_{\text{r}}^{\text{fehérje}}) / (m_{\text{fehérje}} \cdot M_{\text{r}}^{\text{víz}})$  [ $M_{\text{r}}^i$ :  $i$  anyag relatív moláris tömege]. A hidratációt az NMR-rel mért mozgékony vízhányadot szorozva a víz, mint oldószer tömegével és osztva az oldott fehérje tömegével,  $h = n \cdot m_{\text{víz}} / m_{\text{fehérje}}$ , számítottam ki, azaz a vizes fehérjeoldat koncentrációjának a mértékeként. Az  $naa$  vs.  $E_a$  adatok a spektroszkópián túlmenően mennyiségi elemzést biztosítanak.

#### IV. Értelmezés részletei

A különböző fid-komponensek megkülönböztetéséhez jó szolgálatot tesz a félértékszélesség. A mozgékony víz generálta fid-komponens félértékszélessége legalább 100  $\mu\text{s}$ . Ezt az értéket pontosabban meghatározza a jéghez, a fehérjéhez és a mozgékony vízhez tartozó fid-komponensek jó elkülönülése. A mozgékony vízfrakciótól eredő fid-komponens rendelkezik a legnagyobb lecsengési időállandóval, vagyis a legnagyobb félértékszélességgel. A mérések során keresett eredmény a mozgékony vízfrakciót leíró fid-komponens intenzitása, másként amplitúdója, amiket a dolgozatban egymás szinonimájaként fogok használni.

Az alábbi (1) egyenlet írja le az adott hőmérsékleten (molekuláris mozgás megindulásához szükséges termikus gerjesztési energián) mozgékony vízmolekulák számát. Az olvadási görbét (42. oldal), tehát a mozgékony víz  $n$  arányát a  $T_{\text{fn}}$  hőmérséklet függvényében, formálisan sorfejtésként írjuk le (Tompá K. et al. 2017, 2015) és így

$$n(T_{\text{fn}}) = A + B(T_{\text{fn}} - T_{\text{fn1}}) + C(T_{\text{fn}} - T_{\text{fn2}})^2 + D(T_{\text{fn}} - T_{\text{fn3}})^3 + \dots, \quad (1)$$

ahol az összegzés a köbös tagig van elvégezve. A képletben nem szereplő, de a  $T_{\text{fni}}$ -sor első tagját képező  $T_{\text{fn0}}$  azt a legalacsonyabb hőmérsékletet jelöli, ahol már mozgékony vízmolekulát lehet észlelni.  $T_{\text{fn1}}$ -nél az olvadási diagram lefutása a hőmérséklet függvényében állandó és a hőmérséklettel lineárisan növekvő tendencia között vált. Hasonlóképpen,  $T_{\text{fn2}}$  hőmérsékleten a lefutás lineárisból négyzetessé változik,  $T_{\text{fn3}}$ -nál pedig köbös lesz. Természetesen  $T_{\text{fn0}} \leq T_{\text{fn1}} \leq T_{\text{fn2}} \leq T_{\text{fn3}}$ . Az olvadási diagramok energetikai elemzése a hőmérséklet függvényében

sűrűn felvett mérési pontokat követel meg, főleg a  $T_{fn}$  pontok környékén és általában a teljes 0 °C alatti olvadási hőmérséklet-tartományban.

A sorfejtéssel történő illesztést a legalacsonyabb hőmérsékletek felől kezdve, szakaszokban lehet végrehajtani. Ha alacsony hőmérsékleten van állandó mozgékony vízmennyiséget mutató szakasz, akkor ebből az  $A$  mennyiséget lehet meghatározni és a további elemzés céljára megtartani. Ezután a lineáris szakasz és a  $B$  arányossági tényező, valamint  $T_{fn1}$  nyerhető ki és használandó a nagyobb kitevőjű szakaszokban. A következő szakasz négyzetesen növekszik és  $C$ , valamint  $T_{fn2}$  kerül illesztésre, azután a köbös szakasz jön  $D$ -vel és  $T_{fn3}$ -mal.

A hidratációs víz olvadási folyamatára jellemző sajátságok kiemelésére az olvadási diagram deriváltját lehet használni, ami a hidratációs vízmolekulák mozgékonyágát magában foglaló potenciálgát-eloszlás tanulmányozását is lehetővé teszi. A mozgékony hidratációs vízmennyiség  $n$  arányára illesztett analitikus (1) kifejezés használatos az olvadási diagram deriváltjának differenciálással való kinyerésére. Az olvadási diagram deriváltjának meghatározása lehetővé teszi azon potenciálgátak energiaeoszlásának az egyedi feltérképezését, melyek a részben a fehérjemolekulákhoz kapcsolt vízmolekulák (hidratációs víz) mozgását akadályozzák. Az olvadási diagram differenciahányadosa adja meg az olvadási diagramnak  $T_{fn}$ -nel történő változását

$$\Delta n / \Delta T_{fn} = B + 2C(T_{fn} - T_{fn2}) + 3D(T_{fn} - T_{fn3})^2 + \dots, \quad (2)$$

melyet értelemszerűen az (1) kifejezés differenciálásával kapunk. A mérési adatokból ugyanígy, de analitikus helyett numerikus deriválással jutunk el ehhez a formához.

Ez az adott hőmérsékleten, az aktuális potenciálgát-értéknél éppen mozgékonyá váló vízmolekulák száma. A potenciálgát nagysága megmutatja, hogy mennyi energia szükséges  $\Delta n / \Delta T_{fn}$ , vagyis egységnyi hőmérséklet-változás hatására mozgékonyá váló vízmennyiség mozgásba hozásához. A deriváltat a potenciálgátak nagyságának függvényében mutató diagra-

mokat a mozgékonyra váló vízmolekulák számát megadó hisztogramoknak tekinthetjük. Fontos, hogy minden egyes mennyiség és együttható is fizikai dimenziótól mentes, és így alkalmas arra, hogy matematikai műveletek alanya legyen.

Úgy találtam, hogy az IDP-k és a globuláris fehérjék olvadási diagramjuk alapján széles jelű NMR-rel könnyen megkülönböztethetők egymástól (Bokor & Tantos 2024). Míg a globuláris fehérjék esetében a mozgékony hidratációs víz széles, gyakorlatilag az egész mozgékony vízre vonatkozó szakaszt átfogó hőmérséklet-tartományban állandó szintet mutat, az IDP-k esetében a mozgékony víz mennyisége a növekvő hőmérséklettel állandóan növekszik (Bokor et al. 2022, Tompa K. et al. 2018, 2015, 2009, Rupley et al. 1983). Az olvadási diagramok mérése képessé tesz a fehérjéket körbevevő hidratációs réteg mozgékonyságának közvetlen észlelésére, és ezáltal fontos betekintést nyújt a fehérjék szerkezeti flexibilitásába.

Részletesebben kifejtve, az IDP-k állandó olvadási diagramszakasza a globuláris fehérjékénél többszörösen keskenyebb, és egy folytonosan növekvő mennyiségű mozgékony hidrat vízzel jellemzett tartomány követi. IDP-knél a molekulafelszínnek a globuláris fehérjékénél sokkal nagyobb része érintkezik a vízzel (Bokor & Tantos 2024, Tompa K. et al. 2018). Összegezve, azt javasoltam, hogy a két fő fehérjetípust a következő általános megállapítások jellemzik (Bokor & Tantos 2024). *a)* A globuláris fehérjék olvadási diagramjának sokkal szélesebb hőmérséklet-független szakasza van az IDP-kéhez képest (21. ábra, beszúrt grafikon, 65. oldal; Tompa K. et al. 2018); és *b)* a hidratációs szint meredek emelkedése a globuláris fehérjéknél csak az  $T_m = 1$ -hez, azaz 0 °C-hoz közeli, magasabb hőmérsékleteken mutatkozik meg, ellentétben az IDP-ktől, melyek alacsony hőmérsékleten, a kezdeti rövid hőmérséklet-független szakaszt (ha van ilyen) követően induló intenzív emelkedést mutatnak (12, 14, 15. ábra, 30, 50, 51. oldal; Bokor et al. 2022, 2020a, Tompa K. et al. 2018, 2015, Házy et al. 2011). A fehérjemolekulák rendezett vagy rendezetlen állapotának mennyiségi leírására dinamikai jellemzők bevezetését javasoltuk (Bokor

et al. 2020b, Tompa et al. 2015). Ezek a mozgékony hidratációs víz mennyiségének változásai men-  
tén potenciálgát-eloszlásokat, illetve ezek alapján a fehérje–víz kölcsönhatások eloszlását írják  
le. Ehhez olyan jól meghatározott intenzív mennyiségekre van szükség, mint a heterogénen  
kötő határfelület aránya ( $HeR$ ), heterogén a kötések minőségének szempontjából, a heterogén  
fehérje–víz kötések számaránya ( $HeR_n$ ), és a heterogenitásmérték ( $HeM$ ), így a szerkezeti ren-  
dezetlenség szintjét kísérletileg modellmentesen lehet mennyiségileg meghatározni (Tompá K. et  
al. 2019, 2018). Ezeket az informatív paramétereket a pontos és részletes adatok követelményét  
felállító olvadási diagramból (42. oldal) lehet kinyerni.

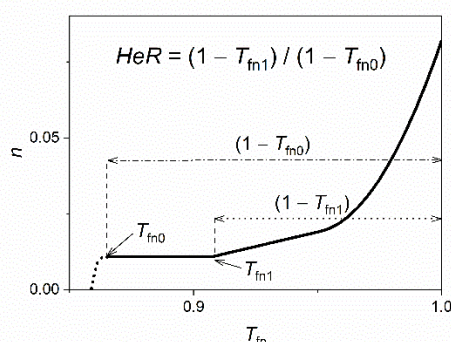
Ez az újszerű megközelítés és formalizmus lehetővé teszi, hogy a fehérjék rendezetlen  
és/vagy oldószernek jobban kitett felszíni tartományairól, annak arányáról és a fehérje–víz kö-  
tések energiaviszonyairól is mennyiségi következtetéseket vonjunk le (Tompá K. et al. 2018).

### Heterogenitásarány ( $HeR$ )

A fehérjemolekulák a víz megkötésének energiaeloszlás szerinti heterogenitása alapján  
jellemezhetők és osztályozhatók. A  $HeR$  dinamikai jellemző paramétert (Tompá K. et al. 2019,  
2018, 2015) ad a fehérjék kötések szempontjából heterogén energiaeloszlású határfelületének az  
egész fehérje oldószernek kitett határfelületéhez képest vett arányára. Az osztályozás alapjául  
szolgáló összefüggés a heterogenitás-arány mérésére (16. ábra):

$$HeR = (1 - T_{fn1}) / (1 - T_{fn0}) \quad (3)$$

Az olvadási diagramban a hőmérséklettől független rész kezdetét  $T_{fn0}$ , ennek az állandó moz-  
gékony hidratációs vízmennyiséget mutató szakasznak a végét pedig  $T_{fn1}$  jelöli. A kizárólag



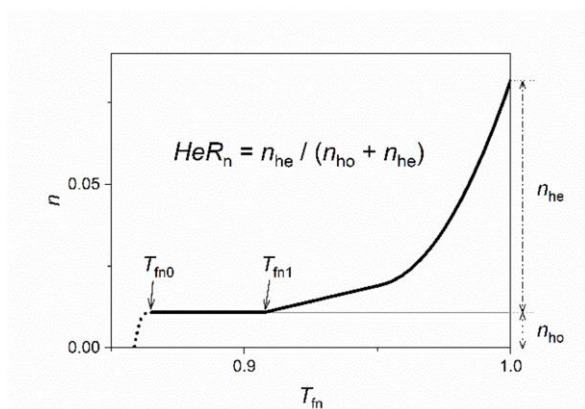
**16. ábra.**  $HeR$  dinamikus paraméter definíciójá-  
ban szereplő  $(1 - T_{fn0})$  és  $(1 - T_{fn1})$  mennyiségek  
viszonya az olvadási diagramhoz.

heterogén energiaszétosztású kötésekkel jellemzett rendszerekre  $HeR = 1$ , mivel a homogén energiaszétosztású kötések teljességgel hiányoznak, tehát a kötések szempontjából heterogén energiaszétosztású határfelület egyenlő az egész fehérje teljes oldószernek kitett határfelületével, vagyis  $T_{fn1} = T_{fn0}$ . A csak homogén energiaszétosztású kötésekkel és semmi másból nem álló rendszerekre ( $T_{fn1} = 1$ ), hasonló gondolatmenettel  $HeR = 0$  (például víz  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$  alatt). A részben heterogén energiaszétosztású kötések alkotta rendszerekben  $HeR = (0,1)$ , vagyis  $HeR$  aktuális értéke arról nyújt rendparaméter jellegű információt, hogy a fehérjemolekula felszínét milyen mértékig lehet heterogénnek tekinteni.

Tehát ez a dinamikai paraméter a lehetséges két energiatartomány kiterjedésének összehasonlítása alapján, és nem a bennük megvalósuló kötések száma alapján méri a heterogenitás arányát.  $HeR$  értéke a szerkezeti rendezetlenség mérője és a fehérjék fontos, működéshez kapcsolódó tulajdonságait is leírja. Ez a mérték a konkrét fehérje olvadási diagramjának az adott energiaszétosztásából ered és a fehérje és a vízmolekulák közötti kölcsönhatások energiarégióival van kapcsolatban. Közvetlenül kapcsolható a fehérjefunkció termodinamikai és kinetikai tulajdonságaihoz, és jól használható a fehérje–fehérje kölcsönhatásokat leírására.

### Heterogén fehérje–víz kötések számaránya ( $HeR_n$ )

Egy második heterogenitásarány is definiálható (Tompai K. et al. 2019, 2018), melyben az első hidráthéjban lévő vízmolekulák  $n_{ho}$  száma és a heterogén régióban lévő vízmolekulák  $n_{he}$



**17. ábra.**  $HeR_n$  dinamikus paramétert definiáló  $n_{he}$  és  $n_{ho}$  mennyiségek viszonya az olvadási diagramhoz.

száma szerepel

$$HeR_n = n_{he} / (n_{ho} + n_{he}) \quad (4)$$

$n_{ho}$  értékét a legalacsonyabb gerjesztési energiatartományban mérhetjük, ahol állandó a mozgékony vízmolekulák száma, amit az  $n$  vs.  $T$  négyszög területe adja meg (17. ábra).  $n_{he}$ -t pedig a nagyobb kitevőjű tagok által leírt  $n$  vs.  $T_{fn}$  síkidomok területe határozza meg. A mennyiség a  $T_{fn} = 1$ -re extrapolált mozgékony vízmennyiséggel egyenlő.

### Heterogenitásmérték (HeM)

A  $HeM$  heterogenitásmérték a kötési energiaeloszlás szerinti heterogenitást tudja leírni és a különböző fehérjemolekulákról energetikai ujjlenyomatot képes adni (Tompá K. et al. 2019, 2018, 2015).  $HeM$  értéke pozitív szám, a kvázi ekvipotenciális molekulafelületű (kb. gömb alakú) fehérjékre értéke zéró, tehát rendparaméter jellegű mennyiségnek tekinthető. Arról nyújt információt, hogy 0 °C-hoz közelítve milyen gyorsan nő a mozgékony hidratációs víz mennyisége. Ezt a mennyiséget a következőképpen lehet bevezetni (Tompá K. et al. 2019, 2018, 2015).

$$HeM = (B + 2C + 3D)/(1 - T_{fn1}), \quad (5)$$

ahol a számlálóban szereplő  $B, C, D$  mennyiségek azonosak az (1) egyenletben bevezetettekkel. A nevező azt az energiatartományt jelöli ki, ahol a hőmérséklettel változó nagyságú (heterogén potenciáeloszlású) fehérje-víz kötések vannak,  $B + 2C + 3D$  pedig a két (homogén és heterogén energiaeloszlású) tartományban előforduló kötések számának a növekedési sebessége. A  $HeM$  kifejezésének számlálójának közeli rokona az (1) egyenlettel leírt  $n$  deriváltjának, a (2) összefüggésnek. Az arány így az olvadási diagram differenciahányados-szerű mennyisége. Értékeit nem lehet a  $[0,1]$  intervallumba szorítani. Minél nagyobb  $HeM$ , annál nagyobb a vízmolekulák mozgását akadályozó potenciálgátak energiaeloszlás szerinti heterogenitása az  $E_a = 6,01$  kJ mol<sup>-1</sup>-hoz, azaz  $T_{fn}=1$ -hez, vagyis 0 °C-hoz közeli tartományban. A legyőzött potenciálgátak mért eloszlásán, azaz az olvadási diagram deriváltján keresztül lehet ezt meghatározni.

A rendezett fehérjék heterogenitásaránya alacsony értéket vesz fel,  $HeR^{rendezett} < 0,5$ .

Jellegzetesen a heterogén fehérje–víz kötések számaránya,  $HeR_n$  is kis értékű esetükben. Az IDP-knek ezzel ellentétben, ha van is hőmérsékletfüggetlen olvadási diagramszakaszuk, az nem szélesebb néhány foknál, és ezt követően folytonosan emelkedik a mozgékony víz hidráthéjbeli mennyisége egészen 0 °C-ig. Ebből következően  $HeR^{rendezettlen} > 0,5$  és 1-hez is lényegesen közelebb van.

A heterogenitásmérték,  $HeM$  a fehérjemolekulák méret szerinti eloszlásának inhomogenitására, és nem csupán egy adott fehérjemolekula 0 °C-hoz közel mozgékonyvá váló hidratációs vízmolekuláinak kötési energia szerinti heterogenitására jellemző, ha a tömbvíz olvadáspontja alatti meredeken emelkedő olvadási diagramszakasz széles a méret szerint homogén fehérjékben tapasztalathoz képest.

## B. Vad típusú és mutáns $\alpha$ -szinukleinek

A korábbiakban bemutatott széles jelű NMR módszert itt betegségben szerepet játszó IDP-k, az  $\alpha$ -szinukleinek jellemzésére használom. Munkám fontos következménye, hogy az alkalmazott mérési és értelmezési eljárások a betegség előfordulásában szerepet játszó molekuláris kölcsönhatások, például oligomerizáció és amiloidképződés vizsgálatát is lehetővé teszik.

Az emberi  $\alpha$ -szinuklein fehérje központi szerepet játszik a Parkinson-kór kóroktanában (Goedert 2001), és fibrilláris aggregátumokat képez, melyek az agyban találhatók meg általában egy jól körülhatárolt területen, a középagy substantia nigra (feketeállomány) képletében (Shults et al. 2006, Spillantini & Goedert 1998, Spillantini et al. 1997). A korai Parkinson-kórhoz három, családban öröklődő pontmutáció társul, ezek: A30P, E46K, és A53T (Parihar et al. 2019, Zarranz et al. 2004, Krüger et al. 1998, Polymeropoulos et al. 1997). A betegség molekuláris alapjainak megértéséhez elengedhetetlen a mutációk szerkezeti hatásainak tisztázása. Dolgozatomban a vad típusú és az A30P, E46K, A53T mutáns  $\alpha$ -szinuklein-változatokon elért eredmények szerepelnek, pontosabban e fehérjék monomerjein, illetve a vad típus és az A53T esetében az oligomer és amiloid formákon is.

Termodinamikai szempontból meg tudjuk egymástól különböztetni az egyes  $\alpha$ -szinuklein pontmutánsokat (Tompá K. et al. 2018, 2015). Az  $\alpha$ -szinuklein hidratációs héjában lévő víz mozgását szabályozó potenciálgát energetikai leírását adtuk (Bokor et al. 2022, 2020b). Molekuladinamikai szimulációk segítségével megmutattuk, hogy a széles jelű  $^1\text{H}$  NMR-eredmények az első hidratációs héjnak felelnek meg (Házy et al. 2011). Az A53T  $\alpha$ -szinuklein monomer több (Bokor et al. 2020b, Házy et al. 2011), míg az A30P és az E46K  $\alpha$ -szinuklein monomer kevesebb (Bokor et al. 2022) vizet köt meg a vad típusúnál. Ez az A53T mutáns nyitottabb konformációjának bizonyítékát adja. Az oligomerizáció során megvalósuló rendeződésre utal, hogy az  $\alpha$ -szinuklein oligomerek globuláris fehérjékre jellemző oladási diagramokat mutatnak. A fehérjéből kialakuló amiloid-szálak a monomereknél kevesebb vizet kötnek és az oldószernek hozzáférhető felszínük a fehérje–víz kölcsönhatás tulajdonságai tekintetében heterogén, ugyanakkor a szálak maradék szerkezeti rendezetlenséggel is bírnak (Bokor et al. 2020b). Ezt a fuzzy tulajdonságot (18. oldal) más fehérjékből kialakuló amiloidok esetében is leírták (Tompá P. 2009).

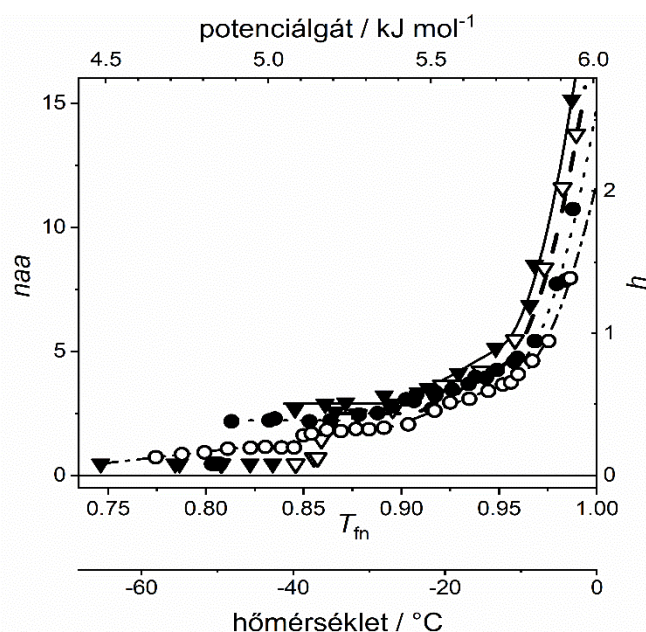
Kutatásunk az adott hőmérsékleti energiánál eltérő polimerizációjú, illetve eltérő mutációjú változatok körüli hidratációs víz mozgására vonatkozó potenciálgát-eloszlás vizsgálatára irányult (Bokor et al. 2022, Tompa K. et al. 2015, 2013, 2012, 2010a).

Azt tapasztaltuk, hogy a családban öröklődő Parkinson-kórt okozó, itt vizsgált mindhárom  $\alpha$ -szinuklein mutánsváltozat legnagyobb részt ID szerkezetű. Az  $\alpha$ -szinuklein különböző formáiban nagyon eltérő nagyságú potenciálgátak befolyásolják a fehérjéhez leglazábban kötött hidratációs vízmolekulák mozgását. Az oladási diagramok a teljes, mozgékony vizet jellemző potenciálgát-tartományban fehérjetípustól függően különbözőképpen viselkednek (Bokor & Tantos. 2024).

## I. $\alpha$ -szinuklein monomerek

Irodalmi adatok szerint a vad típusú és az A30P, az E46K, valamint az A53T mutáns monomerformájának majdnem azonos szerkezeti és konformációs tulajdonságai vannak (Frendenburg et al. 2007, Li et al. 2001). Saját megfigyeléseink szerint az  $\alpha$ -szinuklein monomer vad típusú és mutáns változatai tiszta vízben feloldva IDP-kre jellemző olvadási diagramot mutatnak (18. ábra; Bokor et al. 2022, Tompa K. et al. 2018, 2015, Házay et al. 2011). Valamennyi monomer olvadási diagramja a hidratációs víz mozgását befolyásoló potenciálgát nagyságának függvényében gyorsan változó lefutást mutat, kivéve alacsony energiáknál megfigyelhető rövid, állandó szakaszt.

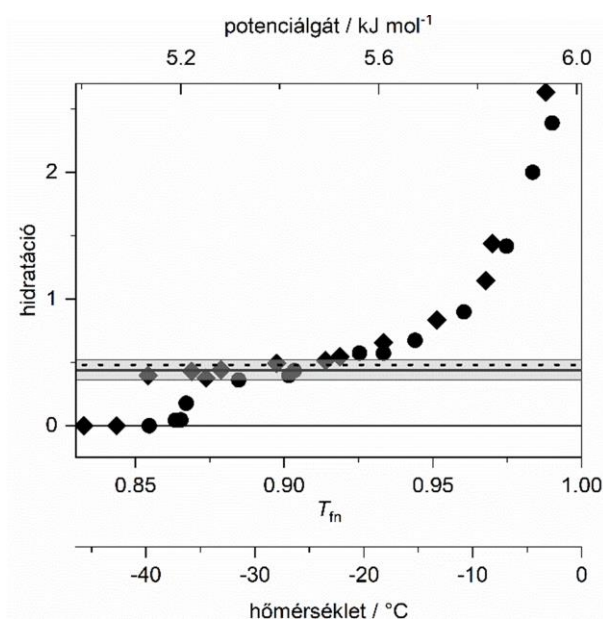
Ezen az állandó olvadási diagramszakaszon a monomerek  $h = 0,33(6)$  átlagos mozgékony hidratációs vízmennyisége elég nagy ahhoz, hogy az E46K mutáns kivételével körülbelül egy vízmolekulányi mozgékony vízrétegű lefedettségük legyen. Az E46K  $\alpha$ -szinuklein monomer olvadási diagramján a kezdeti lineárisan emelkedő szakaszt két konstans tartomány követi. A nagyobb kölcsönhatási energiáknál megjelenő második állandó  $naa$  értékű szakaszon a mozgékony hidratációs víz mennyisége  $h = 0.249(4)$ , vagyis itt már van körülötte annyi mozgékony víz, hogy működőképes legyen (ehhez legalább  $h = 0,2$  szükséges, Rupley et al. 1983). A működéshez elengedhetetlenek a fehérje-víz együttesének spontán fluktuációi, melyekhez szükséges feltétel a kritikus hidratációs szint (Rupley & Careri 1991). Ez a hidratációs szint egyben az a pont is, ahol a felszíni vízmolekulák



18. ábra. Az  $\alpha$ -szinuklein monomer változatok olvadási diagramjai – mol víz aminosavegységenként,  $naa$  a hőmérséklet / potenciálgát függvényében (vad típus: üres háromszög, A30P: teli kör, E46K: üres kör, A53T: teli háromszög), a jobb ordináta a hidratációs érték (átlagos molekulatömeggel számolva).

között kiépül a hosszútávú konnektivitás lehetősége. A hidratációs szint az  $E_{a,0} \leq E_a \leq E_{a,1}$  potenciálgát-tartományban, mikroszkopikus skálán mérve E46K: 200(3), A30P: 252(2), vad típus, A53T:  $3,5(6) \cdot 10^2$  H<sub>2</sub>O/fehérjével egyenlő (zárójelben: utolsó számjegy hibája). Ez utóbbi a molekuladinamikai szimulációk alapján a vad típusú és az A53T  $\alpha$ -szinuklein monomerek első hidratációs rétegének felel meg (Házy et al. 2011).

Kiszámoltam, hogy összesen hány fehérje-víz hidrogénkötés lehetséges az egyes monomerváltozatoknál. Ezek számosságára az irodalomban közölt kísérleti (NMR) és elméleti (számítás) eredmények átlagaként kapott értékeket használtam (Derbyshire 1982, Kuntz 1971). Az aminosavak egyedi hidratációjának korábbi NMR-mérései és molekuladinamikai szimulációi jóslásként a vad típusra és a mutánsokra a teljes aminosavszekvenciájának hidratációja  $4(1) \cdot 10^2$  H<sub>2</sub>O/fehérje értéket ad (Matsuoka & Nakasako 2013, van Raaij et al. 2006, Bizzarri et al. 1995). A széles jelű <sup>1</sup>H NMR-mérések szerint (Bokor et al. 2020) a vad típusú és az A53T  $\alpha$ -szinuklein monomerek összesen  $3,4(6) \cdot 10^2$  mol vizet kötnek mol fehérjénként az  $E_{a,0} \leq E_a \leq E_{a,1}$  szakaszon, ami jól egyezik a teljes molekulára számolt értékkel (19. ábra). Tehát az alacsony hőmérsékleteken mért konstans hidratációjú szakaszon ennél a két változatnál már az összes elsődleges hidratációs hely be van töltve mozgékony vízmolekulákkal. A monomerváltozatok molekulánként 386,5(6) vízmolekulával tudnak hidrogénkötést létesíteni. A hidrogénkötésekkel kapcsolt víz



**19. ábra.** A vad típusú (kör) és az A53T mutáns (rombusz)  $\alpha$ -szinuklein monomerek hidratációja, valamint a  $h(E_{a,0})$  homogénen kötött hidratációs víz mért mennyisége (sötétszürke vonal, hiba: világosszürke sátozás) és az elméletileg lehetséges hidrogénkötések száma (pontosított vonal).

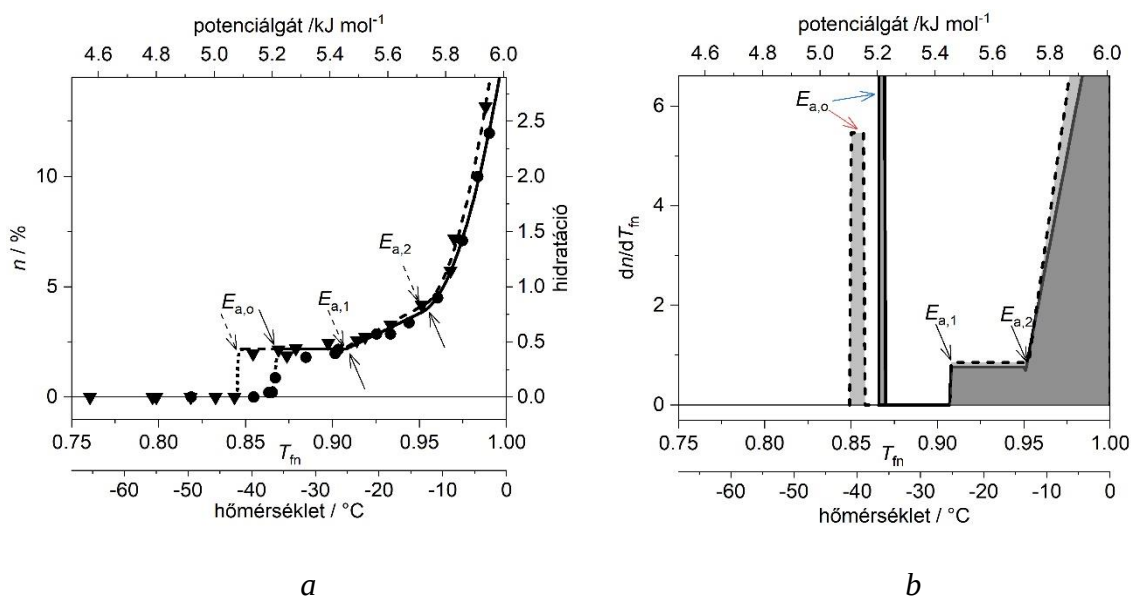
menyisége  $h = 0,5(1)$  g H<sub>2</sub>O/g fehérje. Ez hibán belül egyenlő az általunk mért értékkel (19. ábra, Bokor et al. 2022, Bokor et al. 2020b). Az állandó olvadási diagramszakaszon az  $\alpha$ -szinuklein monomerek  $h = 0,33(6)$  átlagos mozgékony hidratációs vízmennyisége elég nagy ahhoz, hogy körülbelül egy vízmolekulányi mozgékony vízrétegű lefedettséggel az  $E_a$  alatti legkisebb potenciálgátaknál már elég flexibilisek, és ezért, ha korlátozottan is, de működőképesek legyenek, kivéve az E46K mutánst. Az E46K  $\alpha$ -szinuklein monomer olvadási diagramján a kezdeti lineárisan emelkedő szakaszt két konstans tartomány követi. A nagyobb kölcsönhatási energiáknál megjelenő második állandó  $naa$  értékű szakaszon a mozgékony hidratációs víz mennyisége  $h = 0,249(4)$ , vagyis itt már van körülötte annyi mozgékony víz, hogy működőképes lehessen. A hidratációs szint  $E_{a,0} \leq E_a \leq E_{a,1}$  potenciálgát-tartományban, mikroszkopikus skálán mérve E46K: 200(3), A30P: 252(2), vad típus, A53T:  $3,5(6) \cdot 10^2$  H<sub>2</sub>O/fehérjével egyenlő (zárójelben: utolsó számjegy hibája). Ez utóbbi a molekuladinamikai szimulációk alapján a vad típusú és az A53T  $\alpha$ -szinuklein monomerek első hidratációs rétegének felel meg (Házy et al. 2011), igazolva, hogy az elsőként mozgékonná váló hidratációs víz mennyiségileg elég ahhoz, hogy minden lehetséges hidrogénkötést megvalósítson a fehérjével.

Az eredményeink és az előrejelzett értékek közötti összehasonlításom arra utal, hogy amint a hidratációs héjbeli vízmolekuláknak elég hőmérsékleti energiájuk van, többé már nem merevek a jégfázisban, úgy a monomerekben az oldószernek hozzáférhető aminosavak mozgékony vízmolekulákkal jelentősen hidratálva vannak.

Az  $\alpha$ -szinuklein monomerekkel kölcsönhatásban lévő víz E46K < A30P < vad típus < A53T sorrendben növekvő potenciálgátnál mozdul meg (1. táblázat, 66. oldal,  $E_{a,0}$ , 18. ábra 20. ábra, 21. ábra). Minél gyengébben hat kölcsön egy adott fehérje a vízzel, annál lazábbak a fehérje–víz kötése. Az alacsony potenciálgátaknál lévő állandó mozgékony hidratációs vízmennyiségekkel járó szakasz másodlagos szerkezetet jelez, annak ellenére, hogy IDP-kről van szó

(1. táblázat,  $E_{a,0}$ -tól  $E_{a,1}$ -ig). Az  $E_{a,0}$ -tól  $E_{a,1}$ -ig terjedő szakasz túskeként és azt követő zéró értékeként jelenik meg az olvadási diagram deriváltjában (20. *ábra*, 21. *ábra*, *b* panelek).

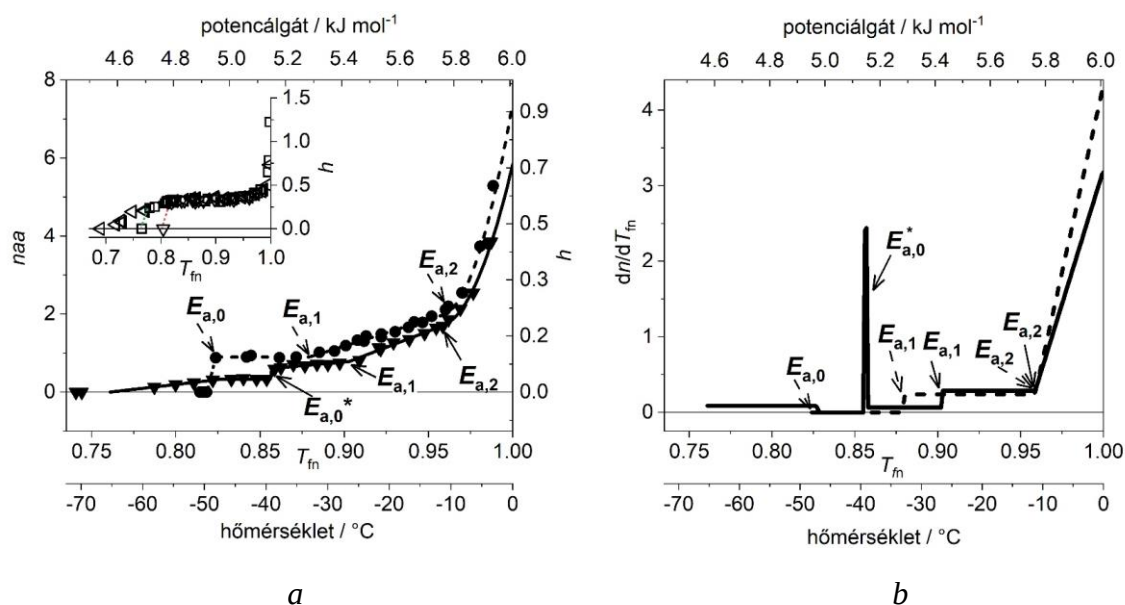
Az E46K mutáns  $\alpha$ -szinuklein monomer olvadási diagramja a legkisebb potenciálgát értékeknél lineárisan emelkedő, így a fehérje-víz kölcsönhatási energia is változik, határozott hőmérsékletfüggése van, ami a fehérje-víz kölcsönhatás folytonos erősségváltozásának következménye. A kötési erősség folytonos változását a kötés távolságfüggésével magyarázom. A folytonos távolságfüggés folytonos potenciálgát-eloszlással jár (ha a tartományban nincs nem megvalósuló távolság, akkor hiányzó potenciálgát sincs). Az ilyen távolságfüggés a van der Waals kölcsönhatás sajátossága. A vad típusú, A30P és A53T  $\alpha$ -szinuklein monomer változa-



**20. ábra.** Tiszta vízben oldott vad típusú (kör, folytonos vonal) és A53T mutáns (háromszög, szaggatott vonal)  $\alpha$ -szinuklein monomer. **(a)** Olvadási diagram: mért mol  $H_2O$ /mol aminosav-egység a (fundamentális normalizált) hőmérséklet, ill. az annak megfelelő potenciálgát-érték függvényében. Vonal: illesztett (1) egyenlet. **(b)** Az olvadási diagram deriváltja, azaz a mozgó hidratációs vízhez kapcsolódó potenciálgát-eloszlás. A  $-1-0$  °C ( $0,995-1,00$   $T_m$ ;  $5,98-6,01$   $\text{kJ mol}^{-1}$   $E_a$ ) tartományban nincsenek megbízható adatok.  $E_{a,i}$  potenciálgát-értékek az (1) egyenlet  $T_{mi}$  hőmérsékletei szerint (1. táblázat). A görbék  $50 \text{ mg ml}^{-1}$  fehérjekoncentrációra vonatkoznak.

toknál viszont a mozgékony hidratvíz mennyisége nulláról lépcsőjellegűen ugrik egy konkrét értékre, vagyis ez a pont diszkrét potenciálgát-értéket mutat, mely egy konkrét kötéshosszhoz rendelhető. Következésképpen ebben az energiatartományban csak egy potenciálgát-típus vagy fehérje-víz kölcsönhatásfajta felelős a vízmolekulák mozgásáért. A kölcsönhatás a vad típusú

és az A30P, illetve az A53T  $\alpha$ -szinuklein monomer esetén nem van der Waals jellegű, mert nincs folytonos távolságfüggése, hanem állításom szerint hidrogénkötés képződését mutatja ez a viselkedés. Az E46K mutánsnál a két állandó olvadási diagramszakasz eltérő  $naa$ -értéke és lépcsőszerű indulásuk két különböző, diszkrét potenciálgáttal jellemezhető, azaz eltérő kölcsönhatási erősséggel kötött mozgékony hidratációs víztípust mutat.



**21. ábra.** Tiszta vízben oldott A30P (kör, szaggatott vonal) és E46K mutáns (háromszög, folytonos vonal)  $\alpha$ -szinuklein monomer. **(a)** Olvadási diagram: mért mol H<sub>2</sub>O/mol aminosav-egység a (normalizált fundamentális) hőmérséklet, ill. az annak megfelelő potenciálgát érték függvényében. Vonal: illesztett (1) egyenlet. A **beszúrt grafikonon** globuláris fehérjék olvadási diagramjai vannak feltüntetve (BSA négyzet, lizozim felfelé háromszög,  $\beta$ -kazein balra háromszög). Itt az ordinátán hidratáció (g H<sub>2</sub>O/g fehérje) szerepel. **(b)** Az olvadási diagram deriváltja, azaz a mozgó hidratációs vízhez kapcsolódó potenciálgát-eloszlás. A  $-1-0$  °C ( $0,995-1,00$   $T_m$ ;  $5,98-6,01$  kJ mol<sup>-1</sup>  $E_a$ ) tartományban nincsenek megbízható adatok.  $E_{a,i}$  potenciálgát-értékek az (1) egyenlet  $T_{m,i}$  hőmérsékletei szerint (1. táblázat). A görbék 50 mg ml<sup>-1</sup> fehérjekoncentrációra vonatkoznak.

**1. táblázat.** Paraméterértékek az  $\alpha$ -szinukleinvariánsokra (az (1) polinomiális viszony leírja az n mozgékony vízfrakciót).<sup>a</sup>

| <i>polimerizáció</i>                          | <i>monomer</i>      |                   |                                 |                   | <i>oligomer</i>   |                   | <i>amiloid</i>     |
|-----------------------------------------------|---------------------|-------------------|---------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|--------------------|
| <i>variáns</i>                                | <i>vad</i>          | <i>A30P</i>       | <i>E46K</i>                     | <i>A53T</i>       | <i>vad</i>        | <i>A53T</i>       | <i>vad, A53T</i>   |
| $A = n(T_{\text{fn}0}) = n(T_{\text{fn}1})^b$ | 0,022(4)            | 0,0156(2)         | 0,0058(1)                       | 0,022(4)          | 0,0174(6)         | 0,0153(4)         | 0,0039(3)          |
| $naa(E_{a,0}) = naa(E_{a,1})$                 | 2,5(4)              | 0,90(1)           | 0,67(1)                         | 2,5(4)            |                   |                   |                    |
| $h(E_{a,0}) = h(E_{a,1})$                     | 0,44(8)             | 0,313(4)          | 0,7(1)                          | 0,44(8)           | 0,35(1)           | 0,306(8)          | 0,077(6)           |
| <i>B</i>                                      | 0,38(5)             | 0,24(1)           | 0,07(1)<br>0,29(2) <sup>c</sup> | 0,43(3)           | 0                 | 0                 | 0,12(1)            |
| <i>C</i>                                      | $4,5(7) \cdot 10^1$ | $5(1) \cdot 10^2$ | $3,6(5) \cdot 10^1$             | $6(1) \cdot 10^1$ | 0                 | 0                 | 2,9(4)             |
| <i>D</i>                                      | 0                   | 0                 | 0                               | 0                 | $4(1) \cdot 10^2$ | $4(1) \cdot 10^2$ | $10(2) \cdot 10^2$ |
| $T_{\text{fn}0}^b$                            | 0,869(2)            | 0,824(3)          | 0,828(3)                        | 0,854(5)          | 0,816(4)          | 0,8257(2)         | 0,784(2)           |
| $E_{a,0} / \text{kJ mol}^{-1}$                | 5,22(1)             | 4,95(2)           | 4,97(2)                         | 5,13(3)           | 4,90(5)           | 4,963(1)          | 4,71(1)            |
| $t_0 / ^\circ\text{C}$                        | -35,8(5)            | -48,2(8)          | -47,1(8)                        | -40(1)            | -50(1)            | -47,60(5)         | -58,9(6)           |
| $T_{\text{fn}1}$                              | 0,908(4)            | 0,879(2)          | 0,875(4)                        | 0,906(2)          | 0,940(5)          | 0,940(5)          | 0,838(5)           |
| $E_{a,1} / \text{kJ mol}^{-1}$                | 5,46(2)             | 5,28(1)           | 5,26(2)                         | 5,44(1)           | 5,65(3)           | 5,65(3)           | 5,14(3)            |
| $t_1 / ^\circ\text{C}$                        | -25(1)              | -33,0(7)          | -34(1)                          | -25,7(5)          | -16(1)            | -16(1)            | -44(1)             |

<sup>a</sup> Az utolsó számjegy hibája zárójelben látható. Az  $n(i)$  értékek 50 mg/ml fehérjekoncentrációra vannak megadva.<sup>b</sup>  $T_{\text{fn}0}^*$  az E46K mutáns esetén.<sup>c</sup>  $T_{\text{fn}} = 0,903$  alatt, illetve felett.

**1. táblázat.** Paraméterértékek az  $\alpha$ -szinukleinváriánsokra (az (1) polinomiális viszony leírja az  $n$  mozgékony vízfrakciót).<sup>a</sup>  
(folytatás)

| <i>polimerizáció</i>                  | <i>monomer</i> |             |             |             | <i>oligomer</i> |             | <i>amiloid</i>   |
|---------------------------------------|----------------|-------------|-------------|-------------|-----------------|-------------|------------------|
| $\alpha$ -szinukleinváltozat          | <i>vad</i>     | <i>A30P</i> | <i>E46K</i> | <i>A53T</i> | <i>vad</i>      | <i>A53T</i> | <i>vad, A53T</i> |
| $T_{\text{fn}2}$                      | 0,951(3)       | 0,959(4)    | 0,959(2)    | 0,953(4)    | –               | –           | 0,914(3)         |
| $E_{a,2} / \text{kJ mol}^{-1}$        | 5,72(2)        | 5,76(2)     | 5,76(1)     | 5,73(2)     |                 |             | 5,49(2)          |
| $t_2 / ^\circ\text{C}$                | –13,3(8)       | –11(1)      | –11,2(5)    | –13(1)      |                 |             | –23,5(9)         |
| $n(T_{\text{fn}2})$                   | 0,039(3)       | 0,0345(2)   | 0,030(2)    | 0,042(8)    | –               | –           | 0,013(2)         |
| $naa(E_{a,2})$                        | 4,4(4)         | 3,96(2)     | 3,4(2)      | 4,8(9)      |                 |             | –                |
| $h(E_{a,2})$                          | 0,77(6)        | 0,689(4)    | 0,60(3)     | 0,8(2)      |                 |             | –0,26(4)         |
| $T_{\text{fn}3}$                      | –              | –           | –           | –           | 0,940(5)        | 0,940(5)    | 0,965(2)         |
| $E_{a,3} / \text{kJ mol}^{-1}$        |                |             |             |             | 5,65(3)         | 5,65(3)     | 5,80(1)          |
| $t_3 / ^\circ\text{C}$                |                |             |             |             | –16(1)          | –16(1)      | –9,6(7)          |
| $n(T_{\text{fn}3})$                   | –              | –           | –           | –           | 0,0174(6)       | 0,0153(4)   | 0,027(1)         |
| $h(E_{a,3})$                          |                |             |             |             | 0,35(1)         | 0,306(8)    | 0,54(3)          |
| $n(T_{\text{fn}} = 1)$                | 0,164(8)       | 0,13(2)     | 0,10(2)     | 0,20(1)     | 0,105(5)        | 0,103(5)    | 0,088(4)         |
| $naa(E_a = 6,01 \text{ kJ mol}^{-1})$ | 18,7(9)        | 15(2)       | 12(2)       | 23(1)       | –               | –           | –                |
| $h(E_a = 6,01 \text{ kJ mol}^{-1})$   | 3,3(2)         | 2,6(4)      | 2,0(3)      | 4,0(2)      | 2,1(1)          | 2,0(1)      | 1,75(9)          |

<sup>a</sup> Az utolsó számjegy hibája zárójelben látható. Az  $n(i)$  értékek 50 mg/ml fehérjekoncentrációra vannak megadva.

A mutánsok esetén az állandó hidratációjú szakasz sokkal szélesebb ( $\Delta E_{a,(1-0)}^{\text{átlag}} = 0,052(7) \text{ kJ mol}^{-1}$ ), mint a vad típusnál ( $\Delta E_{a,(1-0)}^{\text{vad típus}} = 0,039(5) \text{ kJ mol}^{-1}$ ).  $E_{a,1}$  ugyanakkora a vad típusú és az A53T mutáns változatnál ( $E_{a,1\text{vad}, A53T} = 5,450(2) \text{ kJ mol}^{-1}$ ), míg az A30P és az E46K mutánsnál ez az érték jelentősen alacsonyabb ( $E_{a,1A30P, E46K} = 5,270(2) \text{ kJ mol}^{-1}$ ). Ez azt jelenti, hogy a vad típusú és az A53T mutáns  $\alpha$ -szinuklein monomer esetén az A30P és az E46K mutánsénál szélesebb a nem betöltött fehérje–víz kölcsönhatási energiasáv (olyan potenciálgát-értékek, melyeknél nincs éppen mozgékonyá váló vízmolekula) és a potenciálgátrés a derivált olvadási diagramban (olvadási diagram konstans, ezért zéró deriválttal rendelkező szakasza). Az  $E_{a,0} \leq E_a \leq E_{a,1}$  szakasz túskeként és azt követő zéró értékeként jelenik meg az olvadási diagram deriváltjában (20. *ábra*, 21. *ábra*. *ábra*, *b* panelek). A potenciálgát-független szakasz szélessége a vad típusú  $\alpha$ -szinuklein monomerre a legkeskenyebb, a mutánsoké viszont ennél lényegesen szélesebb.

Az  $\alpha$ -szinuklein monomereknek vannak a legnagyobb arányban oldószernek kitett hidrofíli csoportjai a két más polimerizációs fokú változathoz, az oligomerhez, illetve az amiloidhoz képest. Ennek megfelelően például az első hidratációs héjukban az  $\alpha$ -szinuklein amiloidoknál ötször több mozgó vízzel vannak körülvéve az  $\alpha$ -szinuklein monomerek, de az oligomereknél is jobban hidratáltak itt.

Az  $E_{a,1}$  pont kiemelt jelentőségét az is jelzi, hogy általánosan mind a globuláris fehérjék, mind az IDP-k kvázi elasztikus neutronszerzési spektruma az ennek megfelelő hőmérséklet körül megváltoztatja a lefutását (Fujiwara et al. 2016). A neutronszerzés egyedi eszköz a fehérjedinamika ps-ns idő- és ångström hosszúságskálájú közvetlen mérésére (Smith 1991). Az inkohérens kvázi elasztikus neutronszerzés (QENS) az atomok diffúzív mozgásának korrelációs idejéről és amplitúdójáról, tehát az egész fehérje (a hidrogénatomok) átlagos mozgásáról szolgáltat információt.

A magasabb hidratációs szinteknél a hidrogénkötések is és a van der Waals-erők is felelősek a fehérje–víz kölcsönhatásokért mindegyik monomerváltozatnál. A potenciálgátak eloszlása folytonos ebben a tartományban, ami kizárólagosan hidrogénkötések révén nem valósulhatna meg. A potenciálgátak heterogén energia szerinti eloszlása miatt lehetséges, hogy az  $\alpha$ -szinuklein monomerek lineáris olvadási diagram szakasza ( $E_{a,1} < E_a < E_{a,2}$ ) igen meredek. Az  $\alpha$ -szinuklein monomereknél körülbelül négyszer meredekebb, mint az amiloid esetében ( $B$  paraméter, 1. táblázat, 66. oldal). Az  $\alpha$ -szinuklein monomerek között nagy különbségek vannak a  $B$  meredekségértékekben, az A30P és az E46K sokkal lassabban emelkedő lineáris szakaszt mutat, mint a vad típus és az A53T mutáns. Az oldószernek kitett, azaz a vízzel érintkező különféle aminosav oldalláncok fehérje–víz kölcsönhatási energia szempontjából nagyon heterogén oldószernek hozzáférhető felszínt eredményeznek. A lineáris szakasz a derivált formájú olvadási diagramokon konstans szakaszként jelenik meg, ezek magassága a meredekségnek felel meg értelemszerűen. A derivált megadja a hidratációs vízmolekulák mozgékonyágát befolyásoló potenciálgátak energetikai heterogenitásának mennyiségi leírását (20. *ábra*, 21. *ábra*, *b* panelek).

A hőmérsékletet tovább emelve, és így a potenciálgátak energiáját növelve,  $E_{a,2}$  fölött mindegyik  $\alpha$ -szinuklein monomer változatnál négyzetesen lefutó olvadási diagramszakaszt lehetett kimutatni (18. *ábra*, 20. *ábra*, 22. *ábra*,  $E_{a,2} = 5,750(9) \text{ kJ mol}^{-1}$ ). A tömbvíz olvadáspontjánál a vad típusú és az A53T  $\alpha$ -szinuklein monomer változatok a másik két mutánshoz, valamint az  $\alpha$ -szinuklein oligomerekhez és –amiloidokhoz képest messze a legnagyobb hidratációs szintet érik el (1. táblázat, 66. oldal). Az egyes  $\alpha$ -szinuklein monomer változatok hidratációja a következőképpen változik itt:  $h(\text{E46K}) < h(\text{A30P}) < h(\text{vad típus}) < h(\text{A53T})$ . Az E46K mutánsnak az A30P mutánsnál alacsonyabb kezdeti és általános hidratációja alapján azt a következtetést vontam le, hogy az E46K  $\alpha$ -szinuklein monomer kompaktabb, mint az A30P változat. A tömbvíz olvadáspontjánál az  $\alpha$ -szinuklein monomer változatok az  $\alpha$ -szinuklein oligomerekhez

és -amiloidokhoz képest magasabb hidratációs szintet érnek el, ezzel bizonyítva, hogy a szerkezet a monomerek esetén a legnyitottabb.

## II. $\alpha$ -szinuklein oligomerek

Az  $\alpha$ -szinuklein oligomer-formák olvadási diagramját széles állandó hidratációjú szakasz uralja (22. ábra; Tompa K. et al. 2019). A derivált olvadási diagramok alapján nincs olyan vízmolekula, melynek mozgását az állandó hidratációjú olvadási diagramszakaszba eső energiájú potenciálgát szabályozná. A legalacsonyabb potenciálgátnál megmozduló vízmennyiség a két  $\alpha$ -szinuklein oligomer-változatra (vad típusú és A53T mutáns, 1. táblázat, 66. oldal) átlagosan  $h(E_{a,0}) = 0,32(2)$ . Az  $\alpha$ -szinuklein oligomerek hidratációja csak kissé alacsonyabb az  $\alpha$ -szinuklein monomerekénél az  $E_{a,0} \leq E_a \leq E_{a,1}$  szakaszon. A hidratációs vízmolekulák mozgásáért egyetlen potenciálgát felelős, a tömbvíz olvadáspontja alatti  $\Delta E_a = 0,36 \text{ kJ mol}^{-1}$ -ig. Az  $\alpha$ -szinuklein oligomerek ezért  $E_{a,1}$  alatt homogén energiaeloszlású kötési tulajdonságokkal rendelkeznek. A vad változat körül lényegesen több mozgékony hidratációs vizet mérünk  $h(E_{a,0})^{\text{vad}} = 0,35(1)$ , mint az A53T mutánsnál  $h(E_{a,0})^{\text{A53T}} = 0,306(8)$ . Az  $\alpha$ -szinuklein oligomerek is, mint az  $\alpha$ -szinuklein monomerek rögtön a mozgékony víz első megjelenésekor már működőképesek lehetnek, mivel hidratációjuk ehhez elég nagy lehet.

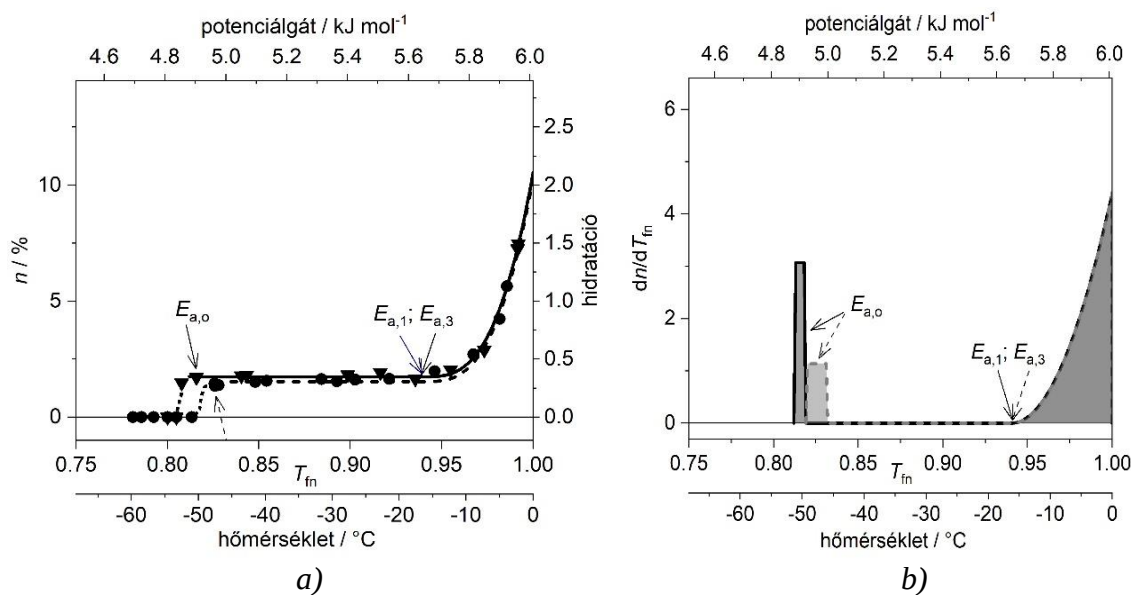
A széles állandó hidratációjú szakasz, melynek szélessége  $\Delta E_{a,\text{vad}} = 0,75(8) \text{ kJ mol}^{-1}$  és  $\Delta E_{a,\text{A53T}} = 0,69(3) \text{ kJ mol}^{-1}$ , a derivált formájú olvadási diagramon zero értékként jelenik meg. A nagyon széles állandó mozgékony hidratációjú szakaszt a nagyobb kiterjedésű oldószernek kitett hidrofób felület okozza (Chen et al. 2015). Az  $\alpha$ -szinuklein oligomerek hidratációs héjában a mozgékonyág korlátozottabb, mint az  $\alpha$ -szinuklein monomerek vagy az  $\alpha$ -szinuklein amiloidok esetében. Az állandó hidratációjú szakasz  $E_{a,0}$ -tól egészen  $E_{a,1} = E_{a,3} = 5,65(3) \text{ kJ mol}^{-1}$  potenciálgátszintig tart. Itt homogén energiaeloszlású fehérje–víz kölcsönhatásokat mutatnak az oligomerek.  $E_{a,1} = E_{a,3}$  ugyan egyenlő a vad típusú és az A53T mutáns  $\alpha$ -szinukleinre, az előbbi mozgékony hidratációs vízmennyisége azonban lényegesen kisebb, mint az utóbbié (1.

táblázat, 66. oldal). A homogén energiaszétosztású fehérje–víz kölcsönhatások szakasza lényegesen szélesebb az IDP  $\alpha$ -szinuklein monomerekénél és az amiloidokénál.

Az  $\alpha$ -szinuklein oligomer-forma a globuláris fehérjékhez hasonlóan rendezett, felgomblyodott (Tompai K. et al. 2019, Háy et al. 2011), ugyanis a vad típusú és az A53T  $\alpha$ -szinuklein oligomer egyaránt a globuláris fehérjékéhez hasonló olvadási diagramokat mutat (Tompai K. et al. 2018). 35(5)%  $\beta$ -redős szerkezetet tartalmaznak (Meade et al. 2019), összhangban az eredményeinkkel (2. táblázat,  $HeR^{\text{monomer, átlag}} = 0,34(2)$ ), szemben az oldható  $\alpha$ -szinuklein monomerek 0%-ával és az  $\alpha$ -szinuklein amiloidok 65(10)%-ával (Miyake et al. 2002).

Az  $\alpha$ -szinuklein oligomerek az oligomerizációs fok és morfológia szempontjából többféle méretben léteznek, amelyek  $\beta$ -redőtartalmának nagysága, természete, valamint a kitett hidrofób felületük kiterjedése is eltér (Santos et al. 2023). A mérési eredményeink alapján megmutattam, hogy a vizsgált oligomer mintánkban, az  $\alpha$ -szinuklein oligomerek felszíne általában a méretüktől függetlenül alapvetően ugyanolyan  $E_{a,3} = 5,65(3) \text{ kJ mol}^{-1}$ -ig. Az olvadási diagramok szerint  $E_{a,3}$  alatt csak egyféle  $\alpha$ -szinuklein oligomer-típust lehet látni az irodalomban közltekkel ellentétben, méréseink szerint ebből következően itt az egész fehérjesokaságra egyetlen hidrogénkötési vagy fehérje–víz kölcsönhatási energia létezik. Mivel az  $\alpha$ -szinuklein oligomereknek egységes általános felületük van, olvadási diagramjaik szerint a köbös olvadási diagramszakasz alatti potenciálgát-értékek mellett csak egyetlen típusú oligomer létezik, ami arra utalhat, hogy a különböző oligomerek hasonló fehérje-fehérje kölcsönhatásokra lehetnek képesek, és így hasonló patológias funkciókat láthatnak el.

Az  $\alpha$ -szinuklein oligomerek esetében nincs lineárisan emelkedő olvadási diagramszakasz, a konstans mozgékony hidratációjú szakasz után rögtön köbös emelkedésű rész következik mindkét  $\alpha$ -szinuklein oligomer változatnál. Ez a köbös lefutású szakasz széles heterogén részként jelenik meg  $E_a = 6,01 \text{ kJ mol}^{-1}$  alatt,  $\Delta E = 0,36(3) \text{ kJ mol}^{-1}$  potenciálgát-szélességben (1. táblázat, 66. oldal). A derivált formán négyzetesen változó szakaszként látható a hirtelen



**22. ábra.** Tiszta vízben oldott vad típusú (háromszög, folytonos vonal) és A53T mutáns (kör, szaggatott vonal)  $\alpha$ -szinuklein oligomer. **(a)** Olvadási diagram: mért mozgó vízhányad százalék a (normalizált fundamentális) hőmérséklet, ill. az annak megfelelő potenciálgát érték függvényében. Vonal: illesztett (1) egyenlet. **(b)** Az olvadási diagram deriváltja, azaz a mozgó hidratációs vízhez kapcsolódó potenciálgát-eloszlás. A  $-1-0$  °C ( $0,995-1,00$   $T_{fn}$ ;  $5,98-6,01$  kJ mol<sup>-1</sup>  $E_a$ ) tartományban az adatok nem megbízhatóak.  $E_{a,i}$  potenciálgát-értékek az (1) egyenlet  $T_{fn}$  hőmérsékletei szerint (1. táblázat). A görbék  $50$  mg ml<sup>-1</sup> fehérjekoncentrációra vonatkoznak.

emelkedés. Eredményeink többféle  $\alpha$ -szinuklein oligomer-méretet tükröznek ebben a potenciálgát energiatartományban ( $E_a > E_{a,3}$ ) azáltal, hogy a globuláris fehérjékkel összehasonlítva viszonylag széles energiatartományban intenzíven nő a mozgékony hidratációs vízmennyiségük (Bokor et al. 2020b). Azaz az ebben a potenciálgát-tartományban mozogni kezdő vízmolekulák számára az adott potenciálgátak nagyon heterogén energieloszlást mutatnak. A mozgékony hidratációs víz mennyisége gyorsan nő, ahogy a tömbvíz olvadáspontját a rendszer megközelíti, vagyis a növekedés sebessége emelkedik, amit az olvadási diagram formális matematikai leírásában, az ebben a tartományban belépő köbös tag is jellemez.

### III. $\alpha$ -szinuklein amiloidok

A fehérjék dinamikája fontos szerepet játszik az amiloid képződés folyamatában (Fujiwara et al. 2016). Az  $\alpha$ -szinuklein amiloid konformációja nagyrészt párhuzamos  $\beta$ -redős szerkezetekből áll (Chen et al. 2015). A  $\beta$ -redőket hidrogénkötések tartják egyben, ezek erőssége  $6,62(4)$  kJ mol<sup>-1</sup> (Shen et al. 2003). Az  $\alpha$ -szinuklein oligomerhez kötött víznek nagyobb energiára van

szüksége a mozgáshoz, mint az  $\alpha$ -szinuklein amiloidoknál, és a monomerek hidratációs vizét lehet a legnagyobb energiárfordítással megmozdítani.

A családban öröklődő Parkinson-kórral összefüggésbe hozott mutációk, például az A53T, megnöveli az  $\alpha$ -szinuklein oldhatatlan polimerek képzésére való hajlamát, valamint alakilag eltérő polimerfajtákat hozhat létre (Oliveira & Silva 2019, Ghosh et al. 2017). Eszerint a vad típusú amiloidszálak egyenes szerkezetet mutatnak az A53T felgombolyodott szerkezetéhez képest. Az amiloid állapotot a fehérjeszekvenciától nagyrészt független, megkülönböztető szerkezeti tulajdonságokon jellemzik (Dobson 2003). Ezzel a jellegzetességgel összhangban, a szerkezeti különbségek ellenére az amiloidok vad típusú és A53T változataira vonatkozóan azonos oladási diagramokat mértünk (23. ábra, 75. oldal), ezért nem tárgyaljuk őket külön.

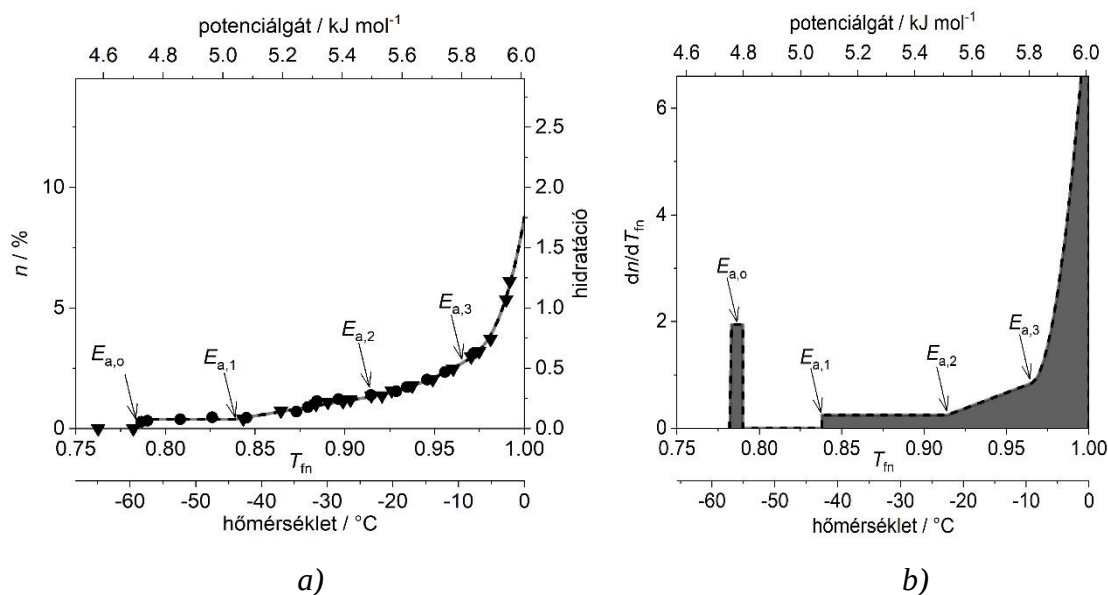
A mozgékony víz kezdeti mennyisége körülbelül egyenlő az  $\alpha$ -szinuklein monomerekben és az  $\alpha$ -szinuklein oligomerekben, ezzel szemben az  $\alpha$ -szinuklein amiloidok esetében a legalacsonyabb potenciálgátak mellett mozgó hidratációs víz mennyisége öt-hatszor kevesebb. A három  $\alpha$ -szinukleinforma oladási diagramjának összehasonlítása azt mutatja, hogy az állandó mozgékony hidratáció szakasza felett a mozgékony hidratációs víz körülbelül fele eltűnik az  $\alpha$ -szinuklein oligomerek vagy az  $\alpha$ -szinuklein amiloidok képződési folyamata közben. Az  $\alpha$ -szinuklein monomerek polimerizációja miatt a hidratációs héjből eltűnő vízmolekulák az oldószernek hozzáférhető fehérjefelület meglehetősen hidrofíl részeihez kapcsolódnak. Az polimerizáció a hidrofíl aminosavak jelentős részét eltemeti és ezek az aminosavak a víz, mint oldószer számára hozzáférhetetlenné válnak. Az  $\alpha$ -szinuklein oligomereket és az  $\alpha$ -szinuklein amiloidokat összetartó szerkezeti részleteket ezek az eltemetett aminosavak alkotják, amelyek a  $\beta$ -redők részei.

A mozgás kezdetekor a mozgékony hidratációs víz mennyisége ( $h(E_{a,0}) = 0,077(6)$ ) messze a legkisebb a más polimerizációjú  $\alpha$ -szinukleinek változatokhoz viszonyítva. Ennek alapján feltételezhetjük, hogy az amiloidoknak van a legnagyobb kiterjedésű oldószernek kitett

hidrofób felülete. Majdnem hatszor kisebb ez a kezdetben megmozduló vízmennyiség az  $\alpha$ -szinuklein monomerekénél és több mint négyszer kisebb az oligomerekénél (1. táblázat, 66. oldal, 18. ábra, 22. ábra, 23. ábra). Ez még jóval a működőképességhez szükséges vízmennyiség alatt van, azaz a funkcionalitáshoz minimálisan szükséges értéknél számottevően kisebb. Az amiloidoknak vízzel töltött határfelülettel rendelkező hosszú hengeres szerkezete van (Fitzpatrick et al. 2013).

Ez a megfigyelés a legjobban úgy magyarázható, hogy az amiloidszálakon belül jelentős oldószerter van, mely a szálon belüli  $\alpha$ -szinukleinmolekulák konformációs eloszlására jellemző. A szerkezeten belüli vizet korlátozott mobilitása miatt a széles jelű  $^1\text{H}$  NMR nem látja mozgékonynak. Ez a tény hozzájárul az  $\alpha$ -szinuklein amiloidok körülötti mozgékony víz kis mértékéhez. A hidrátvíz megmozdulásához tartozó nagyon alacsony potenciálgátérték ( $E_{a,0} = 4,71(1) \text{ kJ mol}^{-1}$ ) az amiloidok jellemző tulajdonsága (Tompai K. et al. 2015). A működéshez szükséges mozgékony hidratációs vízmennyiséget az  $\alpha$ -szinuklein amiloidok  $E_a = 5,34(2) \text{ kJ mol}^{-1}$ -nál éri el, ami már a lineárisan emelkedő olvadási diagramszakaszba esik. Az  $\alpha$ -szinuklein monomerekhez és az oligomerekhez képest az  $\alpha$ -szinuklein amiloidok hidratációs héjában lévő vízmolekulákat lehet a legkönnyebben mozgékonytá tenni.

A vízzel az oldószernek hozzáférhető hidrofób fehérjefelület-részek vannak a leggyengébb kölcsönhatásban, így az ezek környezetében lévő vízmolekulák tudnak a legkisebb energiabefektetéssel megmozdulni. Az alacsony  $E_{a,0}$  és az olvadási diagram deriváltjában az ezt követő nullaértékű tartomány az amiloidszálak oldószernek hozzáférhető felületének hidrofób foltjaira utal, melyek általában a másodlagos szerkezetek sajátosságai. A másodlagos fehérjeszerkezet jelenlétére utaló konstans mozgékony hidratációval bíró olvadási diagramszakasz  $E_{a,0} \leq E_a \leq E_{a,1}$  tartományban van és  $\Delta E_a = 0,054 \text{ kJ mol}^{-1}$  szélességű a potenciálgát-skálán. Ez az érték kicsit kevesebb, mint az  $\alpha$ -szinuklein oligomerek konstans olvadási szakasza szélességének a fele. Az elsőnek mozgékonytá váló vízmennyiséget követően a következő adag víz



**23. ábra.**  $\alpha$ -szinuklein amiloid, tiszta vízben oldott vad típusú (háromszög, folytonos vonal) és A53T mutáns (kör, szaggatott vonal) változata. **(a)** Olvadási diagram; a két változatra az adatok teljesen egybeesnek. **(b)** Az olvadási diagram deriváltja, azaz a mozgó hidratációs vízhez kapcsolódó potenciálgát-eloszlás. A  $-1-0^{\circ}\text{C}$  ( $0,995-1,00 T_m$ ;  $5,98-6,01 \text{ kJ mol}^{-1} E_a$ ) tartományban az adatok nem megbízhatóak.  $E_{a,i}$  potenciálgát-értékek az (1) egyenlet  $T_{mi}$  hőmérsékletei szerint. A görbék  $50 \text{ mg ml}^{-1}$  fehérjekoncentrációra vonatkoznak.

csak jelentősen nagyobb energiaköltség árán,  $E_{a,1}$  potenciálgátértéknél tud mozgóvá válni, ezért viszonylag széles olyan potenciálgát-energiatartományt tapasztalunk, amelyen energiával egyetlen mozgékony hidratációs vízmolekulára vonatkozó gát sem jellemezhető.

$h = 0,3-0,4$ -hez, azaz az egy molekularétegű hidratációhoz (Nakasako 2004) szükséges vízmolekula-mennyiséghez  $E_a = 5,54-5,67 \text{ kJ mol}^{-1}$ -nál nem magasabb potenciálgátszint tartozik az  $\alpha$ -szinuklein amiloidok esetében, vagyis a négyzetesen emelkedő olvadási diagramszakaszon,  $E_{a,2}$  és  $E_{a,3}$  között.

A tömbvíz olvadáspontjánál az  $\alpha$ -szinuklein amiloidok mért mozgékony hidratációs vízmennyisége,  $h(E_a = 6,01 \text{ kJ mol}^{-1}) = 1,75(9)$  kisebb a többi  $\alpha$ -szinukleinváltozaténál (1. táblázat, 66. oldal). Eszerint nem csak az  $\alpha$ -szinuklein oligomereknek, hanem az  $\alpha$ -szinuklein amiloid  $\beta$ -redőkben résztvevő központi fehérjerészeinek is kompakt a szerkezete. A törzsszerkezetet kivéve viszont az  $\alpha$ -szinuklein amiloidszálak IDP-k (Fujiwara 2017). Ezzel teljes összhangban azt találtuk, hogy az  $\alpha$ -szinuklein amiloidformájában az oldószernek kitett felület igen nagy mértékben,  $75(3)\%$ -ban rendezetlen (HeR, 2. táblázat, 82. oldal).

A két tény nem mond ellent egymásnak, mert a sok, oldószernek kitett oldallánc (Fujiwara et al. 2016), nem pedig a  $\beta$ -redős központi fehérjerész a felelős a mozgékony hidratációs víz mozgására ható, főként heterogén potenciálgát-eloszlásért  $E_{a,1} \leq E_a < 6,01 \text{ kJ mol}^{-1}$  között (23. ábra), vagyis a heterogén fehérje–víz kölcsönhatásokért is. További, a heterogén energiaeoszlást növelő tulajdonság az oldalláncok mozgásának nagy amplitúdója (nagyobb az amiloidszáll állapotban, mint a monomer állapotban; az amiloidállapot entrópiusan kedvező (Fujiwara et al. 2016), valamint az amiloidszálak konformációs eloszlása is kedvező).

Az  $\alpha$ -szinuklein amiloidszál, illetve -szerkezet az amiloidfelgombolyodás sok stabilizáló jellemzőjét mutatja, köztük a hidrofób aminosav-oldalláncok és a hidrofób pakolás térbeli cipzárját (Tuttle et al. 2016). A kereszt- $\beta$ -szerkezetbe csak az amiloid fehérjelánc speciális szegmensei épülnek be, a lánc többi része a szerkezet törzselemeiből kizáródnak. Az  $\alpha$ -szinuklein amiloidszálak magját az  $\alpha$ -szinuklein 31-109. aminosavának (a teljes monomer fehérje fele) a megfelelő központi része alkotja (Miake et al. 2002). Az  $\alpha$ -szinuklein amiloidban a hosszú aminoláncvég- és karboxilláncvég-szegmens védelem nélkül marad (1~38. és 102-140. aminosav), bár az aminoláncvég-szegmens a potenciálgátak energiaeoszlásában mutat valamennyi heterogenitást. A folytonos középső szegmens hidrogénkötésekkel szisztematikusan egyben tartott kereszt- $\beta$ -szerkezettel erősen védett állapotot biztosít (Del Mar et al. 2005). Az  $\alpha$ -szinuklein monomerek N- és C-terminális szakaszai sokkal inkább töltöttek, mint a középső szakasz. A végszakaszok az egész fehérjéhez viszonyítva a vízmolekulák 55%-át kötik meg névlegesen. Mivel a középső szegmens képezi a  $\beta$ -redős szerkezetet és így kevésbé hidratálódik, ezek a fenti hidratációarányok magyarázhatják, hogy az  $\alpha$ -szinuklein amiloidszálak mozgékony hidratációja körülbelül fele az  $\alpha$ -szinuklein monomerekének.

#### IV. Eltérő polimerizációfokból következő különbségek

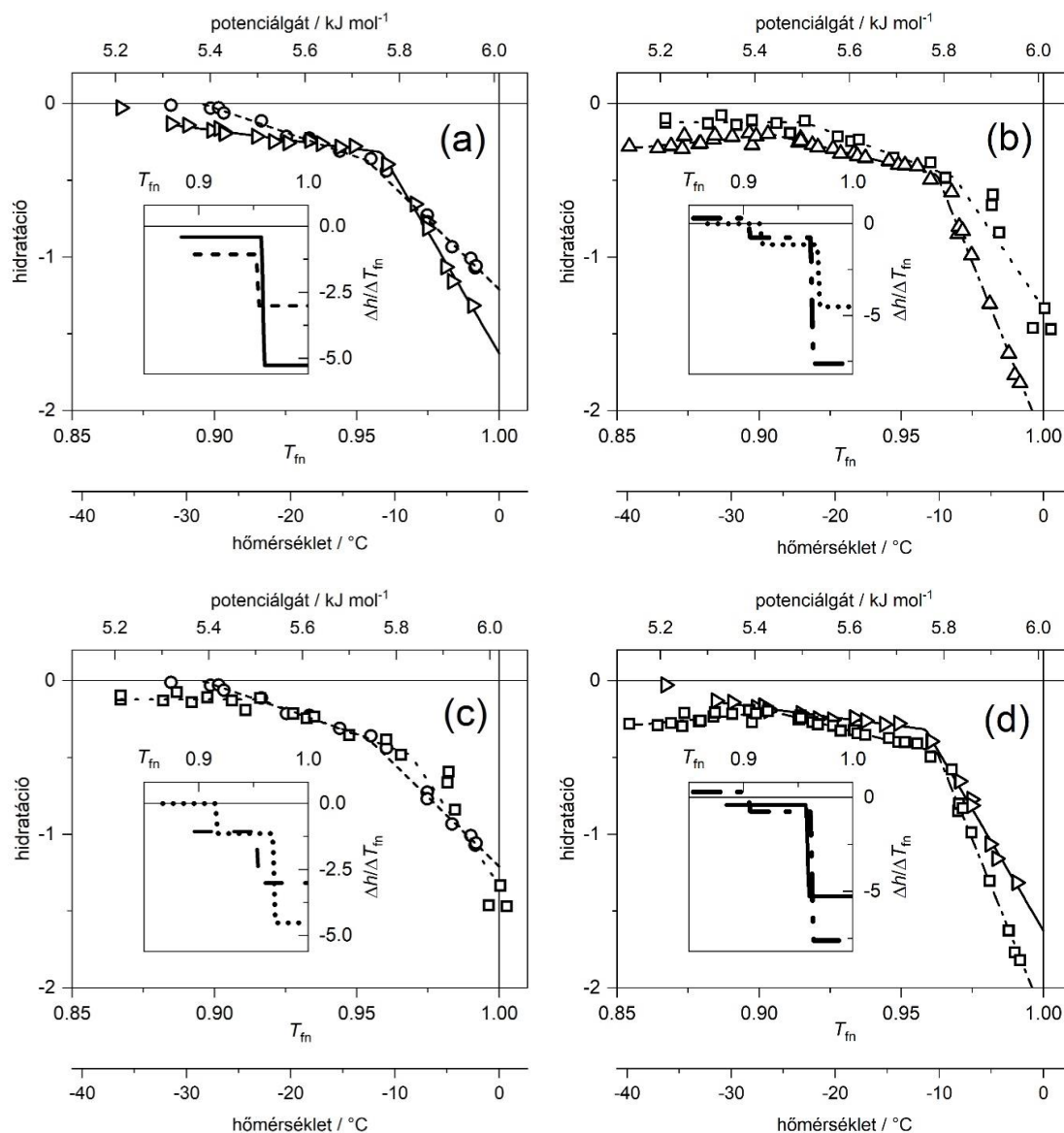
A polimerizálódott változatokban, azaz az oligomerekben és az amiloidokban a mono-

meregségek közötti kötések mennyisége és minősége a képződésük közben a monomerek felületéről távozó vízmolekulák tulajdonságai alapján jellemezhetők. A mozgékony hidratációs vízmennyiség, mely az oligomereknek, illetve az amiloidoknak a monomerekből való képződésekor felszabadul a polimerizáció miatt, a polimereket egyben tartó kötésekről ad információt. A mozgékony hidratáció szerinti különbség az  $\alpha$ -szinuklein monomerek és az -oligomerek, illetve -amiloidok között heterogén energiaeloszlású viselkedést mutat, vagyis energiaeloszlásukat tekintve a létrejövő kötések is heterogének.

Az  $\alpha$ -szinuklein monomereknek, -oligomereknek és -amiloidoknak jellegzetesen eltérő olvadási diagramjai vannak (18. *ábra*, 22. *ábra*, 23. *ábra*). Az oligomerek, illetve az amiloidok keletkezésekor a monomerek hidratációjából kieső mozgékony hidratációs víz mennyisége látható a 24. *ábra*án – amelyen kivontam egymásból a megfelelő olvadási diagramokat (Bokor & Tantos 2021a). Az oligomer–monomer és az amiloid–monomer olvadási diagram-különbségek minden egyes variánsra nagyon hasonlóak. Az olvadási diagramkülönbségek deriváltjai beszűrt grafikoként jelennek meg az egyes ábrákon. A vad típusú és az A53T változatokra jellegzetesen különböző alakjuk van az olvadási diagram különbségeknek és azok deriváltjainak. A vad  $\alpha$ -szinuklein oligomer–monomer különbségi olvadási diagramjának két különböző meredekségű szakasza van, az A53T mutánsnak pedig három.

Az A53T oligomer–monomer és amiloid–monomer különbséggörbéinek kis potenciál-gáthoz tartozó állandó hidratációjú, vagy csak kissé emelkedő szakaszait a mutáns többlet  $\beta$ -redő tartalmának (Brucalé et al. 2009) tulajdonítom (24. *ábra*, 78. oldal). ezt a következtetést alátámasztja, hogy az alanin inkább hélixet, míg a treonin inkább  $\beta$ -redőt formál (Podoly et al. 2010), azaz az A53T változat hajlamosabb a vad típusnál  $\beta$ -redők képzésére. Figyelembe véve a kereszt- $\beta$ -redő modell lokális természetét, egyszeres mutációk a módosított aminosav-szekvencia  $\beta$ -redő aggregátumok vagy amiloidszálak képzésére való hajlamát alapjaiban meg tudják változtatni.

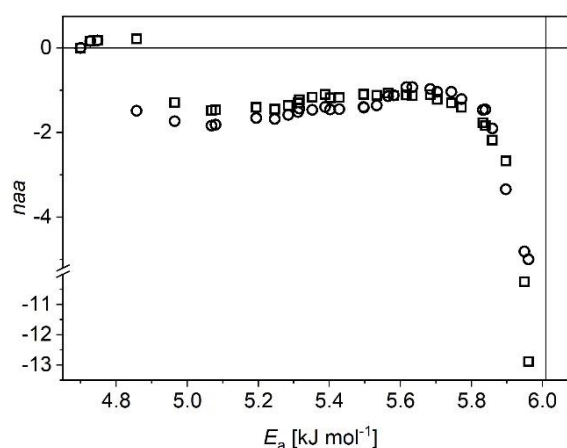
A felvetést szintén megerősíti az oligomer–monomer és az amiloid–monomer különbségek összehasonlítása a vad típusú és az A53T változatokra. Továbbá, hogy a vad típusnak és az A53T mutánsnak az oligomer–monomer, illetve amiloid–monomer olvadási diagram-különbségei szembetűnően konzekvens viszonyt tükröznek (24. ábra, d. ábra). A mozgékony hidratációs víz mennyiségében az amiloidok az oligomerekhez képest szélesebb energiatartományt



**24. ábra.** A mozgékony hidratáció mennyiségének változása az  $\alpha$ -szinuklein polimerizációfoka függvényeként, a polimerek és a monomerek különbségi olvadási diagramjai. Beszúrt grafikonok: A különbségi olvadási diagramok differenciáhányadosai. **(a)** Vad típusú  $\alpha$ -szinuklein: oligomer – monomer (kör és szaggatott vonal), amiloid – monomer (jobbra néző háromszög és folytonos vonal). **(b)** A53T  $\alpha$ -szinuklein: oligomer – monomer (négyzet és pontozott vonal), amiloid – monomer (felfelé néző háromszög és pont-vonás vonal). **(c)** Vad típusú (kör és szaggatott vonal) és A53T (négyzet és pontozott vonal) oligomer – monomer  $\alpha$ -szinuklein. **(d)** Vad típusú (jobbra néző háromszög és folytonos vonal) és A53T (felfelé néző háromszög és pont-vonás vonal) amiloid – monomer  $\alpha$ -szinuklein.

átfogó és kevésbé intenzíven változó különbséget mutatnak  $5.8 \text{ kJ mol}^{-1}$  alatt. Eszerint az A53T oligomerek alakja kompaktabb, ami részben magyarázza, hogy a mutáns a vad típusnál miért sokkal hajlamosabb amiloidot képezni. Örökletes Parkinson-kórban szenvedő betegeknél az A53T mutáció a fehérje amfipatikus hélix N-végén helyezkedik el. Ráadásul az alaninról treoninra való aminosavhelyettesítések felszínileg kitettek és könnyen kölcsönhatnak a környezettel. Amiloidképző fehérjékben ez a változás olyan kölcsönhatásokhoz vezethet, melyet önaggregáció követ, valamint olyan fehérjékben, melyek amiloidképző folyamatokat indukálnak, ez a változás fehérje-fehérje kölcsönhatásokat segíthet elő. A monomereket oligomerekké vagy amiloidokká építő kölcsönhatások és a polimerizáció folyamata során képződő másodlagos szerkezetek energiatartománya a  $5,41 \text{ kJ mol}^{-1} \leq E_a \leq 5,77 \text{ kJ mol}^{-1}$  potenciálgát-tartományba esik. A legerősebben kötött vízmolekulák kezdenek mozogni a tömbvíz olvadásához közeli potenciálgát-tartományban. Néhány erős mozgékony hidratációs fehérje-víz kötés felszakad, és így a fehérje intermolekuláris kapcsolatokat képezhet az oligomerekben és az amiloidokban. Ezek az új kötések tartják össze az oligomereket és az amiloidokat. Az A53T mutáns polimerek többlet  $\beta$ -redő tartalommal rendelkeznek. A felszakadó mozgékony hidratációs fehérje-víz kötések részben megfeleltethetők a képződő polimereken belüli fehérje-fehérjekötéseknek. Ezek a kötések energiaceloszlásukat tekintve heterogének. Az oligomerek körülbelül fele annyi fehérje-víz kötést hoznak létre a képződésükkor, mint az amiloidok. Annak eredményeként áll ez elő, hogy a tömbvíz olvadáspontjánál akár 3-4 molekularétegnyi víz is távozhatt az egyes  $\alpha$ -szinuklein monomerek felszínéről. Ez a mennyiség körülbelül a monomer által megkötött mozgékony hidratációs víznek a vad típus esetén oligomereknél 2,5(7)-ed, illetve amiloidoknál 1,8(4)-ed része, vagyis a fele. Az A53T mutáns esetében ezek hányadok csak igen nagy bizonytalansággal állapíthatók meg, de a vad típusnál tapasztaltétól nem térnek el gyökeresen. Az amiloidoknak az oligomerekhez képest kisebb az egy aminosavra eső oldószernek hozzáférhető felszínük és ezért az amiloidoknak kisebb a mozgékony hidratációjuk, mint az oligomereknek.

A vad és az A53T oligomer–monomer különbségi olvadási diagramok egyenlők az  $5,41 \text{ kJ mol}^{-1} \leq E_a \leq 5,77 \text{ kJ mol}^{-1}$  potenciálgát-tartományban (25. ábra). A mozgékony hidratvízvesztés a tömbvíz olvadáspontjához közeli potenciálgát-értékeknél a legintenzívebb. A csökkenés meredeksége az oligomer–monomer görbéken kisebb,



25. ábra. Az amiloid és az oligomer  $\alpha$ -szinukleinváltozatok mozgékony hidratáció szerinti különbsége a vad típusra (kör) és az A53T mutánsra (négyzet).

mint az amiloid–monomer görbéknél (24. ábra). A mozgékony hidratvíz-vesztés az amiloid–monomer görbéken a legnagyobb, azaz itt észlelhetjük a monomerekhez képest a legnagyobb különbséget. A monomerek sokkal több, az NMR által mozgékonnak látott hidratvizet veszítenek amiloidképzés közben, mint az oligomerek képződésekor. Az  $\sim 5,8\text{--}6,01 \text{ kJ mol}^{-1}$  potenciálgát-tartományban az A53T  $\alpha$ -szinuklein amiloidok veszítik a legtöbb mozgékony hidratációs vizet,  $\Delta h = 1,7$ , míg a vad típusú  $\alpha$ -szinuklein amiloidok kevesebb ilyen vizet vesztenek,  $\Delta h = 1,3$ . Az oligomerek az amiloidokhoz képest körülbelül fele annyi víz–fehérje kötést létesítenek. Az amiloid–oligomer mozgékony hidratációkülönbség (Bokor & Tantos 2021a) azt mutatja, hogy az oligomerek jobban hidratáltak az amiloidoknál (25. ábra), ami közvetlenül kapcsolódik a két fehérjeszerkezet kompaktság szerinti különbségeihez. A különbség  $\Delta h = -0,16$  és  $\Delta h = -0,31$  között változik, kivéve az  $5,85 \text{ kJ mol}^{-1} \leq E_a \leq 6,01 \text{ kJ mol}^{-1}$  tartományt, ahol a differencia a  $\Delta h \approx -2,7$  értéket is eléri. A különbség a vad típusú  $\alpha$ -szinukleinnél az A53T mutáns eseténél többet változik, a  $4,86 \text{ kJ mol}^{-1} \leq E_a \leq 5,85 \text{ kJ mol}^{-1}$  potenciálgát-tartományban a medián  $-0,25$  a vad típusra,  $0,13$ -as variancia mellett, míg az A53T  $\alpha$ -szinukleinre ugyanebben az energiatartományban a különbség mediánja  $-0,211$  és ennek varianciája  $0,007$ . Az amiloidoknak az oligomerekhez képest monomeregységenként kisebb oldószernek hozzáférhető felszíne van.

## V. Dinamikai paraméterek

A fehérjék állapotának a rendezettség vagy rendezetlenség szempontjából való mennyiségi leírására dinamikai jellemzők szolgálnak. Ezek a heterogén kötő határfelület aránya ( $HeR$ , 56. uúp), a heterogén fehérje–víz kötések számaránya ( $HeR_n$ , 57. oldal) és a heterogenitásmérték ( $HeM$ , 58. oldal). Ezen paraméterek segítségével modellmentesen lehet a szerkezeti rendezetlenség szintjét mennyiségileg meghatározni.

A  $HeR$ -paraméter az egyes  $\alpha$ -szinukleinváltozatok rendezetlenségével összhangban változik. Értéke az  $\alpha$ -szinuklein monomerekre magas, 0,5-nél nagyobb,  $HeR^{\text{monomer}} = 0,69(1)$  (2. táblázat). Eszerint az  $\alpha$ -szinuklein monomerek láthatóan nem véletlen gombolyagok (random coils), a megfigyelt  $HeR$  heterogenitásarány nem a teljesen rendezetlenség esetén elvárt 1 értékű, hanem 31(1)% homogén potenciálgát-eloszlást mutat átlagosan. Ez a tény összhangban van azzal, hogy az  $\alpha$ -szinuklein monomerek szerkezeti sokasága kompaktabb, mint ahogy az véletlen gombolyag állapot esetén elvárható lenne (Waudby et al. 2013).

Meghatározóan és jelentősen kisebb az  $\alpha$ -szinuklein oligomerek  $HeR$ -értéke (átlagosan  $HeR^{\text{oligomer}} = 0,34(2)$ ), ami teljesen összhangban van azzal a korábbi megállapítással, hogy szerkezetük nagymértékben rendezett, a  $HeR$  szerint az oldószernek hozzáférhető felületükön 66(2)%-ban homogén energiaeloszlású fehérje–víz kölcsönhatások találhatók.

Az  $\alpha$ -szinuklein amiloid formáját úgy tekinthetjük, hogy az oldószernek hozzáférhető felszínét tekintve 75%-ban rendezetlen, vagyis heterogén energiaeloszlású fehérje–víz kölcsönhatások jellemzik, vagy fordítva, 25%-os mértékben rendezett, azaz kölcsönhatásai ilyen mértékben homogén energiaeloszlásúnak tekinthetők ( $HeR = 0,75(3)$ , 2. táblázat, 82. oldal). Az  $\alpha$ -szinuklein amiloidok a legnagyobb rendezetlenséget mutatják a három különböző polimerizációs fokú  $\alpha$ -szinukleinváltozat közül. Ez összhangban van azzal a megállapítással, hogy az amiloidban a polipeptidlánc egy része rendezetlen marad és nem válik a rendezett mag részévé, ez a szerke-

zeti rendezetlenség a fuzzy kölcsönhatás speciális esete (Tompá P 2009). A nagymértékű heterogenitás oka, hogy az  $\alpha$ -szinuklein amiloidok oldószernek kitett oldalláncai heterogén fehérje–víz kölcsönhatásokat eredményeznek, valamint hogy az oldalláncok jelentős amplitúdójú mozgásokat végeznek és az amiloidszálak konformációs eloszlása is hozzájárul a heterogén viselkedéshez. Csak a központi, 61-95. aminosavra kiterjedő szakasz vesz részt az amiloidszálak másodlagos szerkezetét jelentő  $\beta$ -redők kialakításában és ennek következményeképpen ez a rész merevebb. Átlagos értéként a heterogénen kötött vízmennyiség arányára a teljes mozgékony hidratációs vízmennyiséghez képest, az összes  $\alpha$ -szinukleinváltozatra  $HeR_n = 0,882(6)$ -ot számoltam a

**2. táblázat.**  $\alpha$ -szinuklein monomer fehérjék és oligomer, illetve amiloid változataik  $HeR$  heterogenitáсарánya,  $HeR_n$  heterogén fehérje–víz kötéseinek aránya és  $HeM$  heterogenitásmértéke.  $n_{ho}$ : az energiaeloszlás tekintetében homogénen,  $n_{he}$ : az energiaeloszlás tekintetében heterogénen kötött vízmolekulák aránya.

| polimerizáció                             | monomer             |                   |                     |                      |
|-------------------------------------------|---------------------|-------------------|---------------------|----------------------|
| $\alpha$ -szinukleinváltozat              | vad                 | A30P              | E46K                | A53T                 |
| $HeR = (1 - T_{fn1}) / (1 - T_{fn0})$     | 0,70(4)             | 0,68(2)           | 0,72(3)             | 0,65(4)              |
| $n_{ho}$                                  | 0,022(4)            | 0,0156(2)         | 0,058(1)            | 0,022(4)             |
| $n_{he}$                                  | 0,14(1)             | 0,11(2)           | 0,10(2)             | 0,18(1)              |
| $HeR_n = n_{he} / (n_{ho} + n_{he})$      | 0,87(3)             | 0,9(1)            | 0,9(1)              | 0,89(3)              |
| $HeM = (B + 2C \cdot 3D) / (1 - T_{fn1})$ | $9,8(5) \cdot 10^2$ | $8(1) \cdot 10^2$ | $5,0(9) \cdot 10^2$ | $1,30(6) \cdot 10^2$ |

| polimerizáció                         | oligomer            |                     | amiloid              |
|---------------------------------------|---------------------|---------------------|----------------------|
| $\alpha$ -szinukleinváltozat          | vad                 | A53T                | vad, A53T            |
| $HeR = (1 - T_{fn1}) / (1 - T_{fn0})$ | 0,32(2)             | 0,35(2)             | 0,75(3)              |
| $n_{ho}$                              | 0,0174(6)           | 0,0153(4)           | 0,0039(3)            |
| $n_{he}$                              | 0,08790(7)          | 0,09(1)             | 0,084(5)             |
| $HeR_n = n_{he} / (n_{ho} + n_{he})$  | 0,83(4)             | 0,85(4)             | 0,96(5)              |
| $HeM = (B + 2C + 3D) / (1 - T_{fn1})$ | $2,1(1) \cdot 10^4$ | $2,0(5) \cdot 10^4$ | $1,82(9) \cdot 10^4$ |

fehérjéken mért  $n_{ho}$  (homogén energiaeloszlással kötött vízmolekulák száma), és  $n_{he}$  (heterogén energiaeloszlással kötött vízmolekulák száma) értékekből. Ezen értékek szerint a képzett fehérje–víz kötések természetüket tekintve mindegyik  $\alpha$ -szinukleinváltozat esetén nagy heterogenitással jellemezhetők. Ha a polimerizáció foka szerint nézzük az egyes változatokat, akkor kiviláglik, hogy az  $\alpha$ -szinuklein amiloidok hidrátburkában vannak a legnagyobb arányban heterogénen kötött mozgékony vízmolekulák, az  $\alpha$ -szinuklein oligomereknél pedig a legkisebb ez

az arány ( $HeR_n$  monomer = 0,882(6),  $HeR_n$  oligomer = 0,84(1),  $HeR_n$  amiloid = 0,96(5)). Ezek a különbségek nem jelentősek. Az  $\alpha$ -szinuklein oligomerek kisebb  $HeR_n$  értékkel rendelkeznek az  $\alpha$ -szinuklein monomereknél, tehát homogénebb energiaszétválasztásúak az általuk létesített fehérje–víz kötések, mint az  $\alpha$ -szinuklein monomerek esetében. Kicsi bennük a heterogén energiaszétválasztású fehérje–víz kölcsönhatások aránya az összes ilyen kölcsönhatáshoz viszonyítva.  $HeR_n$  az  $\alpha$ -szinuklein amiloidokra mutatja a legnagyobb, egyhez közeli értéket, ezzel a heterogén energiaszétválasztású kötések szinte kizárólagosságát mutatva. Ez jelzi az  $\alpha$ -szinuklein amiloidok szerkezete egy részének nagyfokú rendezetlenségét, vagyis az ahhoz tartozó fehérje–víz kölcsönhatások heterogén energiaszétválasztását.

A kötési energiaszétválasztás szerinti heterogenitást leíró  $HeM$  dinamikai paraméterek az  $\alpha$ -szinuklein monomerekre két nagyságrenddel kisebbek, mint az  $\alpha$ -szinuklein oligomerekre, vagy az  $\alpha$ -szinuklein amiloidokra (2. táblázat, 82. oldal). Átlagosan  $HeM^{\text{monomer}} = 9(1) \cdot 10^2$ ;  $HeM^{\text{oligomer}} = 2,1(2) \cdot 10^4$ ;  $HeM^{\text{amiloid}} = 1,82(9) \cdot 10^4$ . Nehéz összehasonlítani a különböző  $\alpha$ -szinukleinváltozatokat, mert az olvadási diagramjaik leírásánál az olvadási görbét leíró (1) egyenlet szerinti sorfejtésből (53. oldal) eltérő kitevőig veszünk figyelembe tagokat. Az  $\alpha$ -szinuklein monomerek esetében csak a négyzetes tagig kell elmenni a kívánt illeszkedéshez, míg az  $\alpha$ -szinuklein oligomereknél elsőrendű és négyzetes tagra nincs szükség, de köbös tagra igen, az  $\alpha$ -szinuklein amiloidoknál viszont a köbös kitevőig bezárólag a teljes sorfejtésre szükség van. Így a tömbvíz olvadáspontját megelőző szakaszon eltérő karakterisztikájú olvadási görbéket tapasztalunk. A vad típusú és a mutáns  $\alpha$ -szinuklein monomerek mért hidratációja az oligomerekével és az amiloidokéval szemben  $E_{a,2}$ -nél is már eleve nagymértékű és heterogén energiaszétválasztású.  $E_a = 6,01$  kJ mol<sup>-1</sup>-höz közelítve már nem nő tovább olyan intenzíven a mozgékony hidratáció szintje, ezért nem olyan nagy a  $HeM$ -értékük. Lényegében csak az  $\alpha$ -szinuklein oligomereket és az  $\alpha$ -szinuklein amiloidokat lehet fenntartásokkal ugyan, de összevetni. Az  $\alpha$ -szinuklein oligomerek

annak ellenére magasabb *HeM*-értékkel rendelkeznek, hogy a leírásukban nincs egyszeres kitevőjű és négyzetes tag. Nagyobb *HeM*-értékük annak tudható be, hogy az  $(1 - T_{fn1})$  osztó sokkal kisebb, mint az  $\alpha$ -szinuklein amiloidoknál (0,06 vs. 0,162). Tehát az  $\alpha$ -szinuklein oligomer sokkal kisebb szélességű potenciálgát vagy hőmérséklet-tartományban jut el a legkisebb, konstans mozgékony vízmennyiségértéktől a tömbvíz olvadás-pontjánál mutatott viszonylag magas értékig. Azaz a víz olvadáspontja alatti emelkedés az  $\alpha$ -szinuklein oligomerek esetében sokkal intenzívebb, mint az  $\alpha$ -szinuklein amiloidoknál, ugyanakkor az emelkedés mértéke ( $h(E_a = 6,01 \text{ kJ mol}^{-1}) - h(E_{a,0}) = 1,78(2)$ ) nem különbözik. A nem állandó szakaszon újabb vízmolekulák mozgásba hozásához nagy potenciálgátat kell legyőzni, az itt megmozduló vízmolekulák az oligomerekhez igen erősen kötődnek.

### C. $\beta_4$ -timozin, stabilin-2 citoplazmadomén és 1:1 komplexük

Bár nincs jól-dokumentált, közvetlen kölcsönhatás a  $\beta_4$ -timozin és stabilin-2 citoplazmadomén között, mindkettő kritikus folyamatokban érintett a sejt homeosztázis és a szövetintegritás fenntartásában. A sebgyógyulásban, a gyulladásban, és az immunválaszban játszott szerepük arról árulkodik, hogy a funkciójukban bekövetkező zavar hozzájárulhat számos betegség kialakulásához. Betegségek soránál vezethet új terápiás stratégiára a  $\beta_4$ -timozin és a stabilin-2 citoplazmadomén molekuláris mechanizmusainak és potenciális kölcsönhatásainak a megértése.

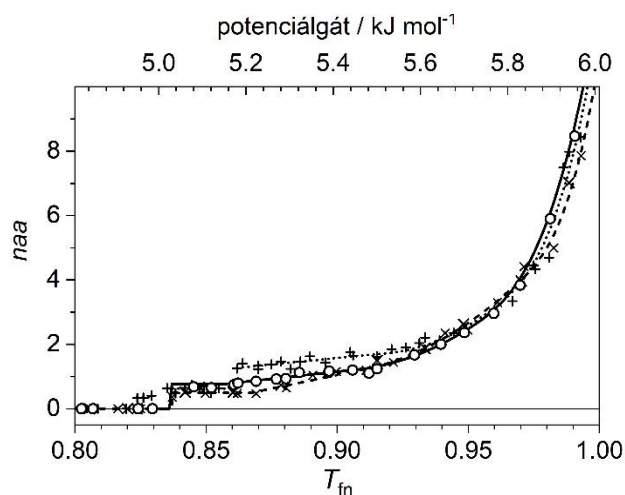
Az olvadási diagramok hőmérsékleti lefutása azt mutatja, hogy az izolált  $\beta_4$ -timozin és stabilin-2 citoplazmadomén éppúgy IDP, és 1:1 komplexük is nagymértékű rendezetlenséggel bír, vagyis valószínűleg fuzzy komplex (Tantos et al. 2013). Méréseink szerint a stabilin-2 citoplazmadomén a  $\beta_4$ -timozinnál rendezettebb, valamint kevésbé erősen köti a vizet. A  $\beta_4$ -timozin és a stabilin-2 citoplazmadomén között gyenge kötés igazolódott és felvetésünk szerint a fehérjék az 1:1 komplexben rendezetlenebbé válnak, mint önálló állapotukban. A moonlighting (30.

oldal)  $\beta_4$ -timozin fehérje stabilin-2 citoplazmadoménnel fuzzy fehérjekomplexet (18. oldal) képez. A kísérleti eredmények termodinamikai értelmezése során a hangsúly a két molekula kölcsönhatásának mennyiségi eredményein van. Az olvadási diagram változásai az 1:1 komplexképződés során a fehérjék körüli hidrátréteg mozgékony részéről mennyiségi leírást nyújtanak, vagyis energetikai jellemzést adnak. Az oldószernek hozzáférhető felszín és a felszínhez kapcsolódó kötések energiaeoszlásának heterogenitása alapján meghatároztuk a két egyedi fehérje közötti kölcsönhatást, és a három rendszerrel részletes energetikai jellemzést is adó leírást adunk.

Részletes széles jelű  $^1\text{H}$  NMR kísérletek alkalmazásával mennyiségileg és energetikailag jellemezzük a  $\beta_4$ -timozin és a stabilin-2 citoplazmadomén körüli mozgékony víz tulajdonságainak változását az 1:1 komplex ( $\beta_4$ -timozin–stabilin-2 citoplazmadomén) képződése folyamán. Meghatározzuk a spektrális tulajdonságokat a  $\beta_4$ -timozinra és a stabilin-2 citoplazmadoménre, valamint az 1:1 komplexükre is, és így a fehérjékkel kölcsönható mobilis vízmolekulák mozgásaira ható potenciálgátak energiaeoszlását is meg tudjuk állapítani. A víz-fehérje kölcsönhatások elemzését mind az egyes izolált fehérjékre, mind az 1:1 komplexükre megadjuk potenciálgát-energiaeloszlás felőli közelítésben. Ennek során megmértük a potenciálgát nagyságának függvényében a mozgékony vízmolekulák számát, vagyis kimértük az olvadási diagramjaikat.

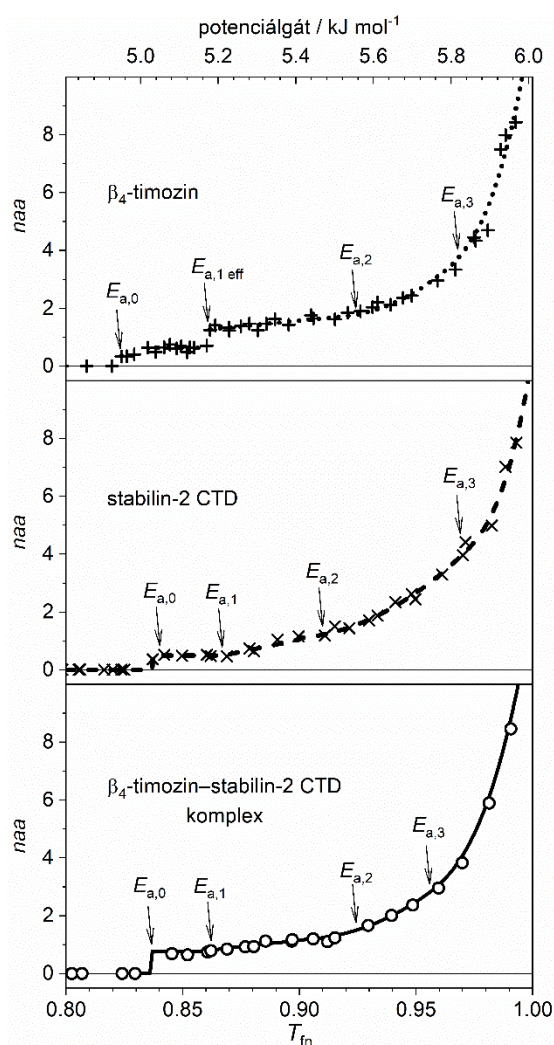
A három rendszert összehasonlítva, a  $\beta_4$ -timozin olvadási diagramja különbözik leginkább a stabilin-2 citoplaz-

**26. ábra.** Olvadási diagramok összehasonlítása:  $\beta_4$ -timozin (+, pontozott vonal), stabilin-2 citoplazmadomén (×, szaggatott vonal), és 1:1 komplexük (kör, folytonos vonal). A vonalak az (1) egyenlet szerint illesztett mozgékony vízmolekulaszám aminosavanként (3. táblázat, 90. oldal).



madoménnek és a két fehérje komplexének az olvadási diagramjától (26. *ábra*, 27. *ábra*). A leg-  
 alacsonyabb a  $\beta_4$ -timozin körül lévő mozgékony vízmolekulák mozgását meghatározó potenci-  
 álgát, minimális mozgékony vízmennyiségre hat (aminosavankénti mozgékony vízmolekula-  
 szám:  $naa = 0,36(2)$ ; vagy  $16(1)$  (mol  $H_2O$ )(mol fehérje) $^{-1}$ ). Nem kötnek vizet az 1:1 komplex-  
 hez és a stabilin-2 citoplazmadoménhez az olyan kölcsönhatáscentrumok, melyek  $5,04(3)$  kJ  
 $mol^{-1}$ -nál kisebb mozgási potenciálgáttal járnak (26. *ábra*, 27. *ábra*), vagyis vannak olyan víz-  
 molekulák, amelyek gyengébben kötődnek a  $\beta_4$ -timozinhoz, mint a stabilin-2 citoplazmado-  
 ménhez vagy az 1:1 komplexhez. Az 1:1  
 komplex és a stabilin-2 citoplazmadomén ér-  
 telemszerűen magasabb  $E_{a,0}$  értékekkel rendel-  
 kezik (3. táblázat, 90. oldal). Az olvadási di-  
 agram deriváltjában túske jelzi a legkisebb po-  
 tenciálgátnál az első mozgékony vízpopuláció  
 megjelenését a fehérje körül (28. *ábra*, 29.  
*ábra*, 88, 89. oldal). Az, hogy az 1:1 komplex  
 esetében  $5,03(5)$  kJ  $mol^{-1}$ -nál alacsonyabb  
 energiájú potenciálgát hatása alatt álló mozgé-  
 kony vízmolekula nincs, arra utal, hogy a  $\beta_4$ -  
 timozinnak ezek a kölcsönhatási központjai  
 egyik lehetőségként az 1:1 komplexben a sta-  
 bilin-2 citoplazmadoménhez történő kapcsolódásban vannak lekötve, vagy másik lehető-  
 ségként az 1:1 komplex képződése során elte-  
 metődnek és a víz számára hozzáférhetetlenné  
 válnak.

27. *ábra*. Olvadási diagram  $\beta_4$ -timozinra (+, ponto-  
 zott vonal), stabilin-2 citoplazmadoménre (x, szag-  
 gatott vonal), és 1:1 komplexükre (kör, folytonos vo-  
 nal). Az  $E_{a,i}$  potenciálgát-értékek az (1) egyenlet  $T_{fi}$   
 hőmérsékletei szerint, valamint a vonalak az így il-  
 lesztett mozgékony vízmolekulaszám aminosavan-  
 ként (3. táblázat, 90. oldal).



A  $\beta_4$ -timozin olvadási diagramjában a mozgó víz megjelenését követően,  $E_a = 5,00(2)$  kJ mol<sup>-1</sup>-nál lépcső található, mely után állandó mozgó vízmennyiségű szakasz következik. Ezt a magasabb energiánál jelentkező lépcsőt effektív  $E_{a,0}$  értéként tekintjük. A mozgékony víz mennyisége ennél a lépcsőnél a  $\beta_4$ -timozin körül megduplázódik, de az olvadási diagram továbbra is hőmérséklet-független, amíg el nem éri  $E_{a,1\text{eff}} = 5,175(4)$  kJ mol<sup>-1</sup>-t (27. ábra). Ez azt jelenti, hogy két különböző módon, különböző kölcsönhatási energiával kötött vízmolekula van a  $\beta_4$ -timozin oldószerrel érintkező felületénél, és az ezek mozgását szabályozó potenciálgátak kis energiájúak. A lépcső előtt  $naa = 0,36(2)$ , a lépcső után  $naa = 0,63(3)$ , vagyis 16(2) (mol H<sub>2</sub>O)(mol fehérje)<sup>-1</sup>, illetve 28(1) (mol H<sub>2</sub>O)(mol fehérje)<sup>-1</sup> a mozgékony hidratációs víz mennyisége. Bár a  $\beta_4$ -timozin kölcsönható határfelületét a fehérje eléggé töltött részein térképezték fel (van Troys et al. 1996), az ezt a szegmensét tarkító hidrofób aminosavak lehetnek felelősek az állandó mozgékony hidratációjú szakaszokon megfigyelt változásokért.

A  $\beta_4$ -timozin derivált olvadási diagramjában megfigyelhető második túske a jelentkező lineárisan növekvő szakasz kezdetének felel meg (26. ábra, 27. ábra), azaz ezt tekintjük  $E_{1\text{ a},1}$  értéként. Ez a plusz túske hiányzik mind a stabilin-2 citoplazmadomén, mind az 1:1 komplex olvadási diagramjának deriváltjából (28. ábra). Tehát a  $\beta_4$ -timozinnal ellentétben  $E_{a,1}$ -nél az olvadási diagramban nincs lépcső. Ezeknél a fehérjéknél a hidratációs vízmolekulák mozgásának megindulása egy lépésben történik, vagyis egyféle kölcsönhatási energiával kötöttek a legalacsonyabb potenciálgátaknál megmozduló vízmolekulák. Mind a három fehérje olvadási diagramjának a közös, hőmérséklettől független szakaszán az 1:1 komplex körül a legnagyobb, a

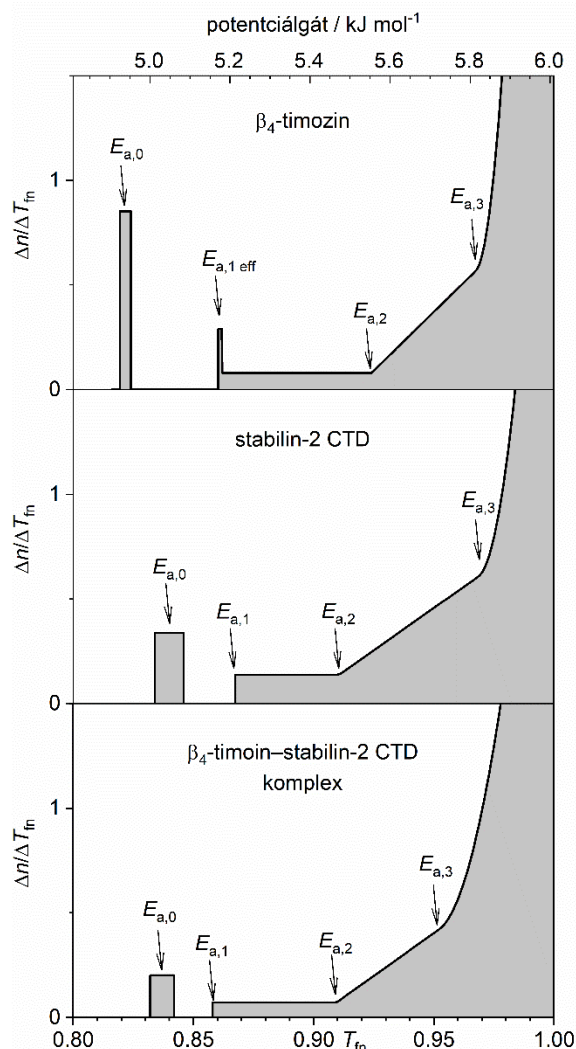
$\beta_4$ -timozin körül pedig a legkisebb a mozgékony vízmolekulák száma (26. ábra, 3. táblázat,  $naa(T_{fn0}, T_{fn1})$ ). A stabilin-2 citoplazmadomén körül nincsenek olyan mozgékony vízmolekulák, melyekre a mozgásukat korlátozó potenciálgát energiája  $5,031(2) \text{ kJ mol}^{-1}$  és  $5,22(1) \text{ kJ mol}^{-1}$  közé esik. Itt  $naa(E_{a,0}) = 0,500(8) (25,5(4) (\text{mol H}_2\text{O})(\text{mol fehérje})^{-1})$ , illetve az 1:1 komplex esetén  $5,03(5) \text{ kJ mol}^{-1}$  és  $5,14(5) \text{ kJ mol}^{-1}$  tartományba eső nagyságú potenciálgátak nem léteznek a mozgékony vízmolekulák számára és itt  $naa(E_{a,0}) = 0,77(3) (73(3) (\text{mol H}_2\text{O})(\text{mol fehérje})^{-1})$ .

A leginkább hidrofób részek mind a három tanulmányozott fehérjében olyan kölcsönhatási energiával vannak hidratálva, mely az egyedi  $E_{a,0}$  értékekkel meg-

határozott potenciálgátakat eredményezi (3. táblázat). Az itt mozgékony állapotban lévő vízmolekula-mennyiség (3. táblázat, A értékek) a leggyengébben vizet kötő fehérjefelület-részekkel van kölcsönhatásban.

Az állandó  $naa$  vs.  $E_a$  adatok, mint hidrofób fehérjefelület-részekre jellemzőek, rendezett fehérjeszerkezeti, vagyis másodlagos szerkezettel bíró részeknek tulajdonítottak (mint a globuláris fehérjékben), ennek megfelelően mind a három vizsgált fehérjének van rendezett része. Az 1:1 komplex képződésekor a fehérjék azon oldószer számára hozzáférhető felszíni

**28. ábra.**  $\beta_4$ -timozin, stabilin-2 citoplazmadomén és 1:1 komplexük, a mozgékony vízhányad (26, 27. ábra) deriváltja (azon vízmolekulák száma, melyek éppen mozogni kezdenek). Az  $E_{a,i}$  potenciálgát-értékek az (1) egyenlet  $T_{fn,i}$  hőmérsékletei szerint vannak jelölve.



területeinek hidratációja, melyek a víz mozgására vonatkozó legkisebb potenciálzárttal rendelkeznek, nem additívak. Miután az itt megmozduló vízmolekulák száma kisebb a komplexet alkotó egyedi fehérjék *naa*-összegénél, ezért arra a következtetésre jutottam, hogy bizonyos vizet kötő hidrofób fehérjefelület-részek a komplex létrejötte során eltemetődnek (4. táblázat).

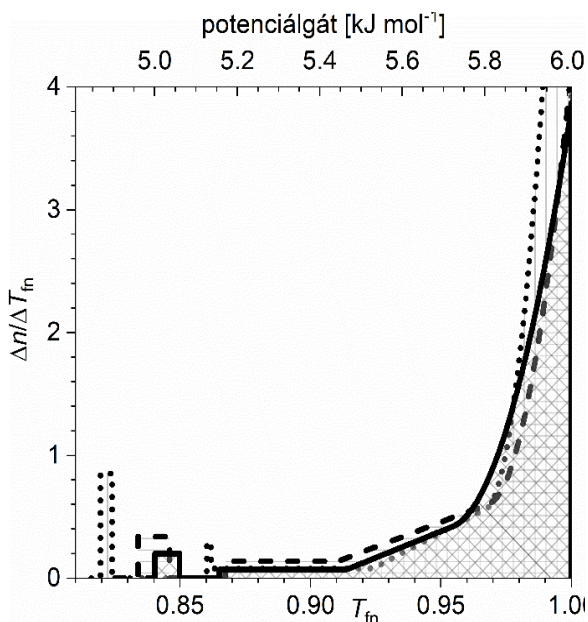
A potenciálzárt-értéktől független olvadási diagramszakaszon, a fehérjék aminosavankénti mozgékony vízmennyiségének

az egyes fehérjékre történő összehasonlítása azt mutatja, hogy az 1:1 komplexnek van a legnyitottabb szerkezete, ugyanakkor a stabilin-2 citoplazmadomén a legzártabb (26. ábra, 85. oldal).

A fehérjék nem működőképesek az itt tapasztalható mozgékony hidratációs szinten (átlagosan  $h = 0,10(1)$ ).

Az olvadási diagramok lineárisan emelkedő szakasza nagyon hasonló potenciálzárt-értéknél kezdődik mind a három tanulmányozott rendszer esetén (3. táblázat,  $E_{a,1}$ ). Az  $E_{a,1} \leq E_a \leq E_{a,2}$  energiatartományban, a stabilin-2 citoplazmadomén olvadási diagramjában a differenciáhányados (3. táblázat,  $B$ ), azaz az olvadási diagram meredeksége majdnem kétszerese a  $\beta_4$ -timozinénak és az 1:1 komplexének, vagyis itt a mozgékony hidratáció a leggyorsabban az 1:1 komplex körül épül fel. A vízmolekulák mozgását akadályozó  $E_{a,1}$  fölötti potenciálzártak a fehérje meglehetősen hidofil oldószernek hozzáférhető felszínrészének fehérje-víz kölcsönhatásaihoz kapcsolódnak, ellentétben a konstans szakasszal. Az ilyen kis fehérjék ( $\beta_4$ -timozin: 43, stabilin-2 citoplazmadomén: 51, 1:1 komplex: 94 aminosav) egy molekularétegű hidratációja

29. ábra.  $\beta_4$ -timozin (pontosított vonal), stabilin-2 citoplazmadomén (szaggatott vonal) és 1:1 komplexük (folytonos vonal), a mozgékony vízhányad (26, 27. ábra) deriváltjának (éppen mozogni kezdő vízmolekulák számának) az összehasonlítása.



által megkövetelt hidratációs vízmolekula-mennyiséget  $h = 0,3-0,4$ -nek becsülik (Nakasako 2004).

Az  $5,6 \text{ kJ mol}^{-1} \leq E_a \leq 5,7 \text{ kJ mol}^{-1}$  potenciálgát-tartományban érik el ezt a szintet a  $\beta_4$ -timozin, a stabilin-2 citoplazmadomén és az 1:1 komplexük.

Az 1:1 komplexnek a stabilin-2 citoplazmadoménénél a mozgékony víz megjelenésétől egészen a négyzetesen növekvő olvadási diagramszakaszig kiterjedtebb mozgékony hidratációs héja van. A stabilin-2 citoplazmadomén az 1:1 komplexhez viszonyítva 35%-kal kisebb  $naa$ -értékkel indul  $E_{a,1}$ -nél, és egyenlő a két fehérje  $naa$ -értéke  $E_{a,1a,2}$ -nél (26. *ábra*, 27. *ábra*, 85, 86. oldal). Ebben a tartományban a stabilin-2 citoplazmadoméné a legnagyobb differenciahányadosú olvadási

görbe, vagy a legmagasabb  $\Delta n / \Delta T_{fn}$  (28. *ábra*, 29. *ábra*; 88, 89. oldal; 3. táblázat,  $B$  kétszer nagyobb), vagyis kétszer meredekebben emelkednek az  $naa$ -értékek.

Az IDP-kre vagy fehérjerészletekre jellemző az  $E_{a,1}$  feletti potenciálgátak folyamatos eloszlása. A potenciálgátak nagyon

3. *táblázat.* Az (1) összefüggés változóértékei. Az utolsó számjegy hibája zárójelben látható.

|                                         | $\beta_4$ -timozin* | stabilin-2 CTD      | 1:1 komplex         |
|-----------------------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| $A = n(T_{fno}) = n(T_{fn1}) / 10^{-3}$ | 4,9(2)              | 4,08(7)             | 6,2(3)              |
| $naa(T_{fno}) = naa(T_{fn1})$           | 0,63(3)             | 0,500(8)            | 0,77(3)             |
| $B$                                     | 0,08(1)             | 0,14(2)             | 0,071(5)            |
| $C$                                     | 5,6(9)              | 4,0(5)              | 4,1(7)              |
| $D$                                     | $2,3(8) \cdot 10^3$ | $1,1(8) \cdot 10^3$ | $4,4(4) \cdot 10^2$ |
| $T_{fno}$                               | 0,822(2)            | 0,840(2)            | 0,837(8)            |
| $E_{a,0} / \text{kJ mol}^{-1}$          | 4,94(1)             | 5,05(1)             | 5,03(5)             |
| $t_0 / ^\circ\text{C}$                  | -48,7(6)            | -43,8(7)            | -44(2)              |
| $T_{fn1}$                               | 0,80(1)             | 0,867(3)            | 0,871(7)            |
| $E_{a,1} / \text{kJ mol}^{-1}$          | 4,84(8)             | 5,21(2)             | 5,24(4)             |
| $t_1 / ^\circ\text{C}$                  | -53(4)              | -36,2(7)            | -35(2)              |
| $T_{fn2}$                               | 0,924(4)            | 0,910(4)            | 0,923(3)            |
| $E_{a,2} / \text{kJ mol}^{-1}$          | 5,55(2)             | 5,47(2)             | 5,55(2)             |
| $t_2 / ^\circ\text{C}$                  | -21(1)              | -24(1)              | -21(1)              |
| $T_{fn3}$                               | 0,968(3)            | 0,969(6)            | 0,956(3)            |
| $E_{a,3} / \text{kJ mol}^{-1}$          | 5,81(2)             | 5,82(4)             | 5,74(2)             |
| $t_3 / ^\circ\text{C}$                  | -9(1)               | -9(2)               | -12(1)              |
| $n(T_{fn2}) / 10^{-2}$                  | 1,4(3)              | 1,0(2)              | 1,0(1)              |
| $naa(T_{fn2})$                          | 1,8(4)              | 1,2(2)              | 1,2(1)              |
| $n(T_{fn3}) / 10^{-2}$                  | 3(1)                | 3,2(9)              | 2,0(4)              |
| $naa(T_{fn3})$                          | 4(1)                | 4(1)                | 2,5(4)              |
| $n(T_{fn} = 1) / 10^{-2}$               | 13(4)               | 9(3)                | 10(2)               |
| $naa(T_{fn} = 1)$                       | 17(5)               | 11(4)               | 12(2)               |

\* Az effektív érték van  $T_{fno}$  esetén feltüntetve. A lineárisan változó olvadási diagramszakasz ténylegesen (nem matematikailag)  $T_{fn1eff} = 0,8611(7)$ ;  $E_{a,1eff} = 5,175(4) \text{ kJ mol}^{-1}$ ;  $t_{1eff} = -38(1) ^\circ\text{C}$  értéknél kezdődik. A tényleges és a matematikai értékek egybeesnek a másik két fehérjénél.

széles eloszlása a  $\beta_4$ -timozin esetén  $6,01 \text{ kJ mol}^{-1} - E_{a1,\text{eff}} = 0,835(4) \text{ kJ mol}^{-1}$  nagyságú potenciálgát-tartományra terjed ki. A komplexre az eloszlás szélessége  $6,01 \text{ kJ mol}^{-1} - E_{a,1} = 0,85(1) \text{ kJ mol}^{-1}$ , ez a legheterogénebb potenciálgát-eloszlás; míg a leghomogénebb a potenciálgát-eloszlás a stabilin-2 citoplazmadomén esetében figyelhető meg:  $0,80(2) \text{ kJ mol}^{-1}$  kiterjedéssel (27. ábra). A komplexnek  $E_{a,0}$ -tól majdnem egészen  $E_{a,2}$ -ig kiterjedtebb mozgékony hidratációs héja van, mint a stabilin-2 citoplazmadoménnek. Ezt úgy lehet értelmezni, hogy a komplexnek a stabilin-2 citoplazmadoménénél nyitottabb a szerkezete, majdnem  $E_{a,2}$ -ig több, mozgékony hidratációs héjú szabad kötőhellyel. Az energiaeoszlás heterogenitásának magas szintje azt feltételezi, hogy a fehérje–víz kölcsönhatások számára az oldószernek hozzáférhető felszín, azaz maga az 1:1 komplex rendezetlenebb a  $\beta_4$ -timozinnál vagy a stabilin-2 citoplazmadoménénél. A  $\beta_4$ -timozinnál az  $5,18(2) \text{ kJ mol}^{-1} \leq E_a \leq 5,53(2) \text{ kJ mol}^{-1}$  energiatartományba eső potenciálgátak  $naa = 0,39(2)$ -nel  $(17,4(7) (\text{mol H}_2\text{O})(\text{mol fehérje})^{-1})$  kevesebb mozgékony hidratációs vizet kötnek, mint az 1:1 komplex ugyanitt. Legnagyobb valószínűség szerint ez a vízmennyiség az egyedi fehérje hidrofíli aminosav-tartalmával van kölcsönhatásban. A fehérjének ezen oldószernek hozzáférhető felszínének a részei vagy az 1:1 komplexben kötéseket alkotnak a partnerrel, vagy tovább már nem hozzáférhetőek a víz, mint oldószer számára, mert az 1:1 komplex képzésekor a fehérjék átrendeződnek. Az első lehetőség a valószínűbb, mert a távoli UV CD-mérések bizonyossága szerint nincs nagyobb szerkezeti átrendeződés a komplexet képző két fehérjében (Tantos et al. 2013). A stabilin-2 citoplazmadoménje kölcsönhat a  $\beta_4$ -timozinnal, és ennek a kölcsönhatásnak szabályozó szerepe van a programozott sejthalálú sejtek stabilin által közvetített fagocitózisában (Lee et al. 2008). Erről a folyamatról a két molekula komplexének tekintetében semmilyen szerkezeti vagy kinetikus adat nem elérhető. Bár a molekulák kölcsönhatnak egymással, ezt bármelyik partner jelentős rendeződése nélkül teszik. A  $\beta_4$ -timozin kötődését a stabilin-2 citoplazmadoménhez polielektrosztatikus kölcsönhatások stabilizálják, melyek a lehetővé teszik a kölcsönhatást stabil szerkezetek nélkül (Tantos et al. 2013).

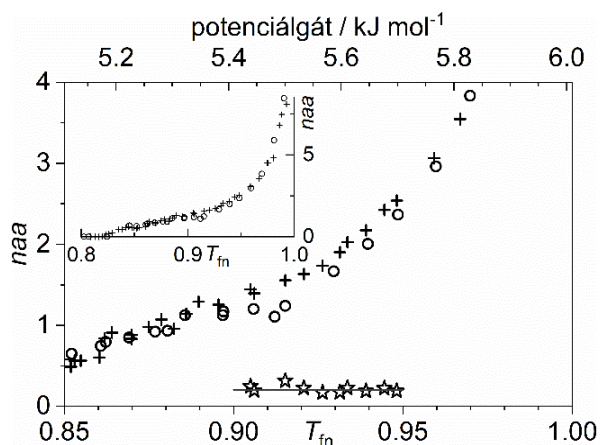
Az  $E_{a,2}$  és  $E_{a,3}$  közötti potenciálgát-tartományban (3. táblázat) az olvadási diagramokat az (1) összefüggés (53. oldal) első három tagjával lehet leírni, tehát a köbös tagra nincs szükség. Az  $E_{a,3}$ -nál nagyobb potenciálgát-értékeknél a stabilin-2 citoplazmadomén aminosavankénti mozgékony hidratációja ( $naa$ ) fokozatosan kisebbé válik a  $\beta_4$ -timozinénál és a komplexénél (26. ábra, 85. oldal). A fehérjék olvadási diagramjainak ebben a szakaszában már az (1) egyenlet köbös tagjának bevonására is szükség van, hogy jól le lehessen írni az olvadási diagram lefutását.

A tanulmányozott fehérjék olvadási diagramjaiból kialakuló általános kép szerint az izolált fehérjék és az 1:1 komplexük is IDP (Tantos et al. 2013, Bokor et al. 2020a). Ezt mutatják az olvadási diagramok (26. ábra, 27. ábra), ezek deriváltjai (28. ábra 29. ábra), és ezt jelzi a vízmolekulákra való hatását tekintve heterogén potenciálgát-eloszlás is a fehérje körül. Az állítást támogatja az a tény, hogy a komplex esetén a leginkább heterogén, azaz a legszélesebb eloszlású potenciálgátak irányítják a hidratációs víz mozgását. Az  $E_{a,1}$ -nél nagyobb potenciálgátat tapasztaló mozgékony vízmolekulák állandóan növekvő száma szintén bizonyítja (Tompá K. et al. 2015, 2017). Ezzel ellentétben  $E_{a,0}$  környékétől majdnem  $E_a = 6,01 \text{ kJ mol}^{-1}$ -ig tartó széles potenciálgát-független szakasza (állandó  $naa$ ) van a globuláris fehérjék olvadási diagramjának (21. ábra, 65. oldal; Bokor & Tantos 2021b: Supporting Information, Tompa K. et al. 2017). Az előbbiekkal

összhangban, a vízben oldott  $\beta_4$ -timozin CD- és  $^1\text{H}$  NMR-spektruma nem mutat szabályos fehérjeszerkezetet (Zarbock et al. 1990) és a nagy felbontású NMR eredmények alapján vízben nincs egyedileg felgombolyodott konformációja (Czisch et al. 1993).

Ahhoz, hogy biológiai aktivitást

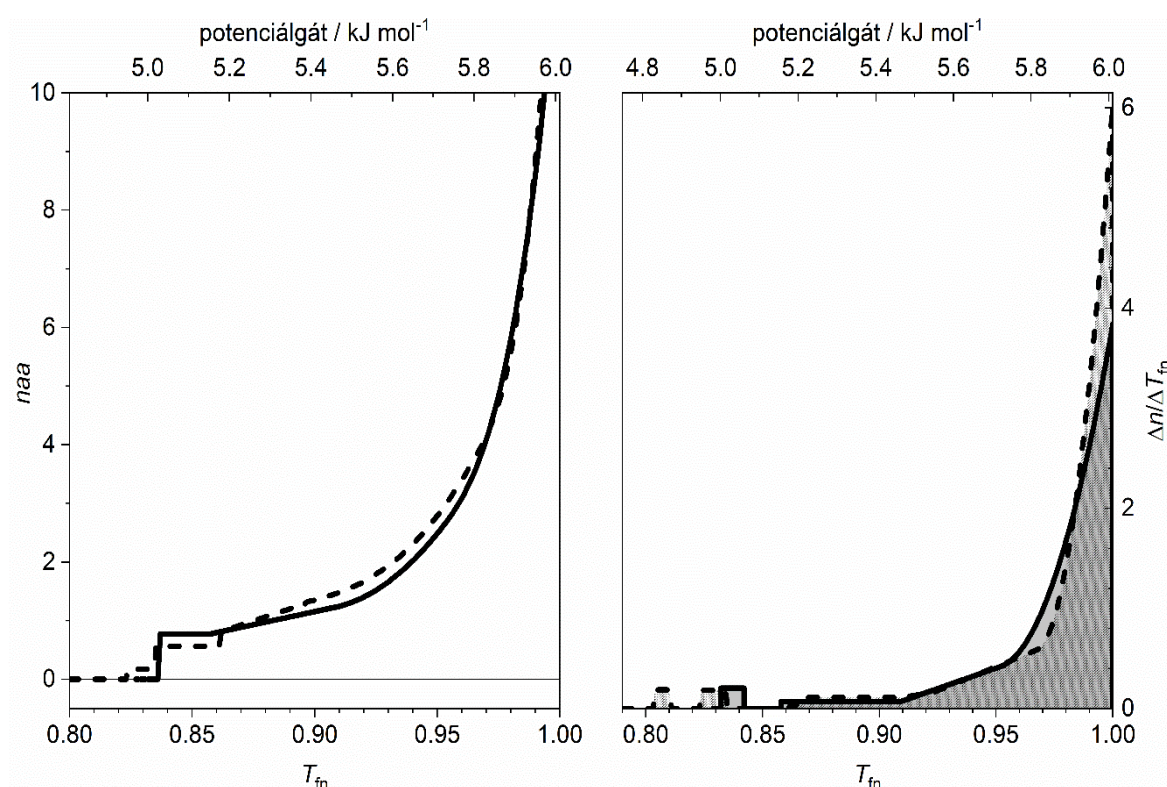
**30. ábra.** A  $\beta_4$ -timozin és a stabilin-2 citoplazmadomén olvadási görbéinek összege (+) és az 1:1 komplex mért olvadási görbéje (körök), illetve a különbségük (fekete csillagok, vonal).



fejthessenek ki, a fehérjék felületét szokásosan nagyjából legalább egyrétegnyi víznek ( $naa > 1,5$ ;  $h > 0,25$ ) kell borítania. Úgy tekinthetjük, hogy a fehérjék egészen  $naa = 1,2$  ( $h \approx 0,19$ ) hidratációs vízmennyiségig működésképtelenek, mely szintet a mozgékony hidratációs vízből a tanulmányozott fehérjék  $E_{a,2}$ -nek megfelelő hőmérsékleten érik el (3. táblázat, 90. oldal). A teljes aktivitás (működőképesség) durván  $naa = 6$  mennyiségű hidratációs vizet követel meg (Nakasako 2004, Czisch et al. 1993). Ezeknek a fehérjéknek a mozgékony hidratációja  $E_{a,a} = 6,01 \text{ kJ mol}^{-1}$ -nál jóval a teljes működőképességhez szükséges szint felett van (3. táblázat).

Az olvadási diagram deriváltján (28. ábra) kifejezettebben lehet a  $\beta_4$ -timozin és a stabilin-2 citoplazmadomén közötti különbségeket látni, mint az olvadási diagramokon (26. ábra, 27. ábra).

A  $\beta_4$ -timozin és a stabilin-2 citoplazmadomén közötti komplexképződést a fehérjék körülötte mozgékony víz tulajdonságainak változásai igazolják és jellemezik. Számításaim szerint



**31. ábra.** Az 1:1 komplex (folytonos vonal) olvadási diagramja, illetve az egyedi alkotó fehérjék olvadási diagramjának súlyozott összege (súly = a fehérje aminosavszáma; szaggatott vonal; baloldali grafikon). Az 1:1 komplex és a súlyozott alkotó fehérjeösszeg olvadási diagramjának derivált formája (jobb oldali grafikon). Az 1:1 komplex képződését bizonyítja, hogy az összegzés nem adja vissza az 1:1 komplexen mért görbét, sem annak derivált formáját.

az 1:1 komplexet alkotó fehérjék szabad állapotukban összesen több mozgékony hidratációs vizet kötnek, mint az 1:1 komplex (30. ábra, 92. oldal), így igazoltnak tekintem a  $\beta_4$ -timozin–stabilin-2 citoplazmadomén fehérjekomplex létrejöttét. Vagyis az alkotó fehérjékre az aminosavegységenkénti mozgékony hidratációs értékeket az egyes potenciálgát-értékeknél összeadtam és az összeget az 1:1 fehérjekomplex mért olvadási diagramjához hasonlítottam (31. ábra). Mivel az 1:1 komplexet alkotó két izolált fehérje olvadási görbéinek összegéből az 1:1 komplexen mért olvadási diagramot kivonva (30. ábra, különbség: csillagok és vonal) a komplex mozgékony hidratációja kisebb az egyedi fehérjék összes mozgékony hidratációjánál, a komplexképződés igazolható. Az összehasonlítás alapján az  $5,40(3) \text{ kJ mol}^{-1} \leq E_a \leq 5,70(5) \text{ kJ mol}^{-1}$  potenciálgát-értékeknél az összeg nagyobb az 1:1 komplexen mért értékeknél (31. ábra).

A kapott különbség (30. ábra) a fehérjék összekapcsolódásakor felszabaduló mozgékony hidratációs vízmennyiségnek felel meg. A különbség egyenlő  $naa = 0,20(1)$ -dal, azaz 19(1)  $\text{H}_2\text{O}$ /komplexszel, vagy  $h = 0,033(2)$ -del és megadja az 1:1 komplex képződése miatt felszakadt kötésekhez tartozott mozgékony hidratációs vízmolekulák számát vagy mennyiségét. Tehát ennyi víz megkötéséhez szükséges kölcsönhatási hely felszabadul és az 1:1 komplexet összekapcsoló kötések veszik át a helyét (Bokor & Tantos 2020a), vagyis meghatároztam az 1:1 komplexet felépítő,  $\beta_4$ -timozint és a stabilin-2 citoplazmadomént összekapcsoló, molekulák közti kötések számát. A  $\beta_4$ -timozinnak az 1:1 komplexből hiányzó, legkisebb energiájú potenciálgátjai, vagy kölcsönhatási központjai az 1:1 komplexet összetartó kölcsönhatásokban érintettek, ennek képződéséhez szükséges kötések létrehozásában vannak lekötve. A stabilin-2 citoplazmadoménél is hiányzik az ilyen alacsony energiájú potenciálgátak betöltöttsége. A nagyfelbontású NMR-eredmények ezen túlmenően azt feltételezik, hogy a stabilin-2 citoplazmadoménél a  $\beta_4$ -timozinnak csak néhány aminosav-oldallánca lép közvetlen kapcsolatba (Tantos et al. 2013). A két egyedi fehérje méretét véve, a molekulák közötti kötések száma kicsi. Mivel mindkét partner IDP izoláltan, ezért ez a kevés, molekulák közti kötés nem képes a két fehérje

mozgását korlátozni, és fuzzy komplexet eredményez. Ebben a rendszerben mind a  $\beta_4$ -timozin, mind a stabilin-2 citoplazmadomén még a kötött állapotban is megtartják szerkezeti rendezetlenségük nagy részét. Az IDP-k jól ismertek képesek még akkor is jelentős mennyiségű szerkezeti rendezetlenség megtartására, amikor kölcsönható partnerhez vannak kötve fuzzy komplex képződése mellett (Tompá P. & Fuxreiter 2008). Eredményeink támogatják azt az elgondolást, hogy a stabilin-2 citoplazmadomén- $\beta_4$ -timozin komplex a véletlenszerű fuzzy komplexek kategóriába esik, ami azt jelenti, hogy rövid, változatos kölcsönható motívumokat fuzzy domének kapcsolnak össze (Sharma et al. 2015). Ezekben az esetekben a partnerek kötése nem társul rendezetlenség-rendezettség átmenettel, mint máskor (Milles et al. 2015, Andresen et al. 2012, Mittag et al. 2010). Korábbi megfigyeléseink is feltételezik, hogy a stabilin-2 citoplazmadomén- $\beta_4$ -timozin komplex képződése nem jár együtt stabil szerkezetek kialakulásával (Bokor et al. 2020a, Tantos et al. 2013).

A kötések energiája a felszakadt kötések potenciálgát-tartományába esik.  $5,35(2) \text{ kJ mol}^{-1}$ -nál kisebb és  $5,76 \text{ kJ mol}^{-1}$ -nál nagyobb potenciálgát-értékeknél az összeg és az 1:1 komplex olvadási diagramja között nincs különbség (31. ábra). Az  $5,44(2) \text{ kJ mol}^{-1} \leq E_a \leq 5,70(2) \text{ kJ mol}^{-1}$  potenciálgát-szakaszon a stabilin-2 citoplazmadomén és az 1:1 komplex aminosavankénti hidratációja egybeesik, a  $\beta_4$ -timoziné pedig nagyobb ennél. Viszont  $E_a = 5,95 \text{ kJ mol}^{-1}$ -nél már körülbelül egyenlő mennyiségű mozgékony hidratációs vizet köt a  $\beta_4$ -timozin és az 1:1 komplex is. A stabilin-2 citoplazmadoménnek és az 1:1 komplexnek  $5,40 \text{ kJ mol}^{-1} < E_a < 5,85 \text{ kJ mol}^{-1}$  között majdnem teljesen egyező mozgékony hidratációs vízmolekulaszintje van. A stabilin-2 citoplazmadomén esetében  $5,11(2) \text{ kJ mol}^{-1}$  és  $5,35(3) \text{ kJ mol}^{-1}$  között  $naa = 0,32(3)$ -mal  $(16(2) (\text{mol H}_2\text{O}) \cdot (\text{mol fehérje})^{-1})$  kisebb a mozgékony vízmolekulák száma, mint az 1:1 komplexben. Az 1:1 komplexben a stabilin-2 citoplazmadoménhez kötött mozgékony vízmolekulák által elfoglalt helyek egy kis része eltűnik, melyek az olvadási diagram négyzetes

részének kezdeténél nagyobb potenciálgátakat tapasztaló fehérje–víz kölcsönhatásokhoz tartoznak. A stabilin-2 citoplazmadoménnek az  $E_{a,1}^{\text{stabilin-2 citoplazmadomén}} < E_a < E_{a,1}^{1:1 \text{ komplex}}$  potenciálgát-értékekhez rendelt kölcsönhatási helyei az oldószernek hozzáférhető felszínének meglehetősen hidrofíl részeihez tartoznak és az 1:1 komplexet egyben tartó kölcsönhatásokban vannak érintve.  $5,4 \text{ kJ mol}^{-1}$  potenciálgát-érték felett a stabilin-2 citoplazmadomén és az 1:1 komplex olvadási görbéje majdnem teljesen egybeesik egészen  $E_{a,3}$ -ig. A köbös olvadási diagramszakaszon is csak elenyészően kisebb a stabilin-2 citoplazmadomén mozgékony hidratációja az 1:1 komplexénél (és a  $\beta_4$ -timozinénál). Ennek megfelelően állíthatjuk, hogy a stabilin-2 citoplazmadomén mozgékony hidratációs vízmennyisége, hidratáltsága nem változik jelentős mértékben a komplexképződés folyamán.  $E_a = 5,95 \text{ kJ mol}^{-1}$ -nél, azaz majdnem a tömbvíz olvadáspontjánál, átlag  $naa = 0,8$ -del kevesebb mozgékony víz van az oldószernek hozzáférhető fehérjefelszín közelében a stabilin-2 citoplazmadomén esetében, mint az 1:1 komplexnél. Tehát az 1:1 komplex felszíne ennyivel több mozgékony vizet tud megkötni.

Az 1:1 komplex körüli mozgékony hidratáció külső héjai teljesen ugyanúgy viselkednek (négyzetesen emelkedő olvadási diagramszakasz kezdetétől növekvő potenciálgátaknál), mint a szabad  $\beta_4$ -timozin és stabilin-2 citoplazmadomén körüliek. A három fehérje olvadási diagramja lényegében egybeesik a négyzetesen növekvő  $naa$  (26. *ábra*, 27. *ábra*, 85, 86. oldal), vagy az olvadási diagram deriváltjának lineárisan változó szakaszán (28. *ábra*, 29. *ábra*, 88, 89. oldal), vagyis az 1:1 komplex  $E_{a,2} \leq E_a \leq E_{a,3}$  tartományában (3. táblázat, 90. oldal). A víz olvadásához legközelebbi potenciálgát-szakaszon ( $E_{a,3} \leq E_a \leq 6,01 \text{ kJ mol}^{-1}$ ) az 1:1 komplex és a  $\beta_4$ -timozin aminosavankénti mozgékony hidratációértékei lényegében egyenlők (26. *ábra*, 85. oldal). Értelmezésként a víz mozgását szabályozó nagy energiájú potenciálgátakkal járó fehérje–víz kölcsönhatások nagyobbbrészt az 1:1 komplexben kötött  $\beta_4$ -timozinnak tulajdoníthatók (közel akkora energiájúak, mint a tömbvízben mért potenciálgátak). A stabilin-2 citoplazmadoménnek ugyanis az  $naa$ -szintje kisebb a  $\beta_4$ -timozinénál, vagy az 1:1 komplexénél (26. *ábra*, 85. oldal).

**4. táblázat.** Fehérjemolekulánkénti mozgékony vízmolekulaszám  $E_{a,3}$ -nál széles jelű  $^1\text{H}$  NMR-rel mérve, valamint NMR-spektroszkópiával mért aminosav hidratáció (Kuntz 1971), illetve molekuladynamikai szimulációval hidrogénkötésekből számolt hidratáció (Bizzarri et al. 1995).

|                                                 | $\beta_4$ -timozin | stabilin-2 citoplazmadomén | 1:1 komplex |
|-------------------------------------------------|--------------------|----------------------------|-------------|
| $E_{a,3}$ -nál mért (jelen munka)               | 137(7)             | 198(56)                    | 242(47)     |
| mért/számolt (Kuntz 1971, Bizzarri et al. 1995) | 169(31)            | 157(30)                    | 326(61)     |

Ha a  $\beta_4$ -timozinra, stabilin-2 citoplazmadoménre és az 1:1 komplexükre összegezzük az irodalomban közölt, mért aminosav-hidratációt, vagy a számolt hidrogénkötések számát, akkor az eredő vízmennyiség kísérleti hibán belül egyenlő az általunk  $E_{a,3}$ -nál mérttel (5. táblázat, 98. oldal). Az itt mért értékek és az irodalmi adatokon alapuló összegek gyakorlatilag egyenlők. Vagyis kimértük, hogy a  $\beta_4$ -timozint, stabilin-2 citoplazmadomént és az 1:1 komplexüket hidratáló vízmolekulák az egyes fehérjéknél  $5,8 \text{ kJ mol}^{-1}$ , illetve a komplexükénél  $5,7 \text{ kJ mol}^{-1}$  potenciálgát-értékénél ( $-9$ , illetve  $-13 \text{ }^\circ\text{C}$ -on) mozgékonyak, és mennyiségük akkora, mintha minden elméletileg lehetséges hidrogénkötés megvalósulna. Tehát elméletileg nincs eltemetett hidrogénkötőhelye az egyes aminosav oldalláncoknak. Értelmezésem szerint tehát  $E_{a,3}$ -nál a fehérjék meglehetősen nyitott szerkezetűek és teljesen hidratáltak.

A vízmolekulák kölcsönhatásának adott energiaskálájából levezetett heterogénen kötő határfelület-arányát leíró  $HeR$  dinamikai paraméter a vizsgált fehérjéknél nagy értékeket vesz fel (5. táblázat) – lényegesen közelebb az 1-hez, mint a 0,5-hez, ami azt jelzi, hogy ezek korlátozott renddel bíró IDP-k. A  $HeR$ -értéket a komplexképződés folyamatához való IDP vagy rendezett (felgombolyodott) fehérjedomén(ek) hozzájárulásának mennyiségi meghatározására alkalmazzuk. Értéke a  $\beta_4$ -timozinra lényegesen kisebb, mint a stabilin-2 citoplazmadoménre vagy az 1:1 komplexre. A stabilin-2 citoplazmadomén és az 1:1 komplex heterogenitásaránya hibán belül egyenlő. Az 1:1 komplexnek van a legheterogénebb oldószernek hozzáférhető felszíne a fehérje–víz kölcsönhatások tekintetében, azaz az 1:1 komplex rendezetlenebb a  $\beta_4$ -timozinnál és a stabilin-2 citoplazmadoménénél. A mért  $HeR$ -értékek alapján az izolált  $\beta_4$ -timozin, stabilin-2 citoplazmadomén fehérjének és 1:1 komplexüknek is a mozgékony vízmolekulákkal nagyon

heterogén energiaszétválású kötéseik vannak. Ezen mennyiségi mérték eredményeiből ítélve a két IDP kölcsönhatásba lépése a szerkezeti rendezetlenség általános növekedésével jár, mely a fuzzy kölcsönhatás tiszta esetének számít (Tantos et al. 2013). A *HeR*-értékkel való dinamikai jellemzés szerint a  $\beta_4$ -timozinnak, a stabilin-2 citoplazmadoménnek és az 1:1 komplexnek is ~20%-ig terjedően rendezett alkotóelemei, vagyis másodlagos szerkezeti elemei vannak. Ezek feltételezhetően helikális szerkezetek, melyeket a széles jelű  $^1\text{H}$  NMR által látott rendezett részeknek tekintjük. A rendezett részek az olvadási diagram hőmérséklet-független szakaszait adják.

5. **táblázat.**  $\beta_4$ -timozin, stabilin-2 citoplazmadomén, valamint 1:1 komplexük: *HeR* heterogenitáshány, *HeR<sub>n</sub>* heterogén fehérje–víz kötések aránya és *HeM* heterogenitásmérték (Tompá K. et al. 2018, 2017, 2015).

|                                       | $\beta_4$ -timozin  | stabilin-2 citoplazmadomén | 1:1 komplex       |
|---------------------------------------|---------------------|----------------------------|-------------------|
| $HeR = (1 - T_{fn1}) / (1 - T_{fn0})$ | 0,78(1)*            | 0,83(3)                    | 0,87(6)           |
| $HeR_n = n_{he} / (n_{ho} + n_{he})$  | 0,9(5)              | 0,95(2)                    | 0,94(1)           |
| $HeM = (B + 2C + 3D) / (1 - T_{fn1})$ | $5(2) \cdot 10^4$ * | $3(2) \cdot 10^4$          | $9(1) \cdot 10^3$ |

\*  $T_{fn1eff}$  értékkel számolva

A heterogén fehérje–víz kötések számaránya, *HeR<sub>n</sub>* mind a három entitásra kísérleti hibán belül átlagosan 0,942(3) (5. táblázat), vagyis sem a két egyedi fehérjére, sem a komplexre nem különbözik. Magas értéke azt jelzi, hogy 0 °C-hoz közel igencsak nagy a heterogén jellegű fehérje–víz kötések aránya.

A *HeM* heterogenitásmérték, mely megadja a tömbvíz olvadáspontjához közel a vízkötési heterogenitás mértékét, a  $\beta_4$ -timozinra a legnagyobb, de nem különbözik kísérleti hibán kívül a stabilin-2 citoplazmadomén értékétől, messze a legkisebb pedig az 1:1 komplexre (5. táblázat). Ennek alapján a tömbvíz olvadáspontjához közel a stabilin-2 citoplazmadomén létesíti a legkevesebb heterogén fehérje–víz kötést a három fehérje közül, az 1:1 komplex pedig a legtöbbet.

## **IV. Összefoglalás, tézisek és tervek**

## A. Összefoglalás

Két, az emberi egészséggel kapcsolatos fehérjecsaládot vizsgáltam. Az egyik fehérje-rendszer, az IDP  $\alpha$ -szinuklein vad és mutáns típusai, illetve ezek különböző polimerizációs szintjei képezik. Az  $\alpha$ -szinukleinváltozatok a Parkinson-kór kialakulásával és lezajlásával hozhatók összefüggésbe. A másik fehérjecsoportot a stabilin-2 citoplazmadomén és a  $\beta_4$ -timozin, illetve az általuk alkotott 1:1 komplex alkotja. Mindkét fehérje és 1:1 komplexük is IDP.

A vad típusú és az A30P, E46K, A53T  $\alpha$ -szinuklein monomerek a széles jelű  $^1\text{H}$  NMR-eredményeink és az irodalmi adatok szerint is IDP-k. A heterogenitásarány szerint azonban az oldószernek hozzáférhető felületük 30(3)%-a másodlagos szerkezeti elemekbe rendeződik. Ebből következően ezek a fehérjék kompaktabbak, mint ahogy az véletlen gombolyag esetében várható lenne.

Az aminosavak hidratációját megadó irodalmi eredményeket a monomerváltozatok szekvenciájára összegezve megállapítottam, hogy a legkisebb potenciálgátaknál megjelenő mozgékony hidratációs vízhányad elég nagy ahhoz, hogy a vízzel minden lehetséges hidrogénkötés kialakuljon. Az  $\alpha$ -szinuklein monomerek lefedettsége a legalacsonyabb aktív potenciálgátaknál mozgékony hidratációs vízzel körülbelül egyrétegű és így működőképesek. Az oldószernek hozzáférhető felületük energetikailag nagyon heterogén, ami a nyitott szerkezet újabb bizonyítéka. Az  $\alpha$ -szinuklein monomer változatok nyitottságának mértéke a következő sorrend szerint nő: E46K  $\approx$  A30P  $\leq$  vad típus  $\approx$  A53T. A hidratációjuk hasonlóan változik.

Ezt a mért olvadási diagramok alakja és értékei mellett a következő megfontolások magyarázzák. Az E46K mutáció általában a vad típushoz képest megnövekedett merevséggel társul. Kisebb rugalmassághoz vagy nyitottsághoz vezet, mert hajlamos stabilizálni speciális konformációkat. A többi mutánshoz képest kisebb aggregációs hajlandósághoz hozzájárulhat a lecsökkent nyitottság. Az A30P mutáció az  $\alpha$ -szinuklein szekvenciájába prolint hoz be, ami haj-

lamos az  $\alpha$ -hélixek felbontására, valamint a teljes szerkezet és dinamika megváltozásához vezethet. Az A30P az E46K-nál ugyan jobban nyitott, de a vad típusú  $\alpha$ -szinukleinnél kevésbé. A vad típus általában nagyfokú rendezetlenséget mutat, így nyitottabb és flexibilisebb lehet. Az A53T mutáció ismertén növeli a hajlamot az aggregációra és gyakran korai Parkinson-kór társul hozzá. Az A53T a vad típusúnál nyitottabbnak és flexibilisebbnek tartott, és aggregációra vezető konformációs változásokat segít elő. Miután az A53T mutáns nyitottabb és aggregációra hajlamosabb, ezért általában toxikusabbnak tartják a többi mutánsnál. Olyan neurodegeneratív betegségekkel társítható mint a Parkinson-kór, a gyorsabb aggregációhoz vezetni tudó nagyobb flexibilitása és nyitottsága miatt.

Az  $\alpha$ -szinuklein oligomerek a potenciálgát-független olvadási diagramszakaszuknak megfelelően leginkább globuláris szerkezetűek. A kötési energiaeioszlásaik homogének és az oldószernek kitett felületük 66%-a rendezett.

A legmérgezőbb  $\alpha$ -szinuklein oligomerfajta azonosítása aktívan kutatott terület és továbbra is vita tárgya (Yoo et al. 2022). Bár idegi diszfunkcióba és toxicitásba is implikáltak bizonyos oligomereket, de komplex természetük és a kísérleti megállapításoknál a konszenzus hiánya miatt továbbra is kihívást jelent végleg meghatározni, hogy melyik oligomer a legmérgezőbb. Kutatásaim szerint méretük változó, de a felületük ettől függetlenül egységes, a konstans mozgékony hidratációs vízmennyiségű szakasz hidratációs tulajdonságaiban nem megkülönböztethető, egyféle  $\alpha$ -szinuklein oligomer jelenlétéhez köthető, mások korábbi eredményeivel szemben.

A fehérjeoldalláncok mozgékonyasága az  $\alpha$ -szinuklein oligomerekben a legkorlátozottabb a másik két eltérő polimerizációjú változathoz képest (monomerek, amiloidok), ami alátámaszthatja azt az általános vélekedést, hogy az oligomerek a valódi toxikus ágensek a Parkinson-kórban.

Az  $\alpha$ -szinuklein amiloid-változatoknak a fehérjeszekvenciától függetlenül teljesen egyforma az olvadási diagramjuk, így a szerkezeti jellemzőik is. Az  $\alpha$ -szinukleinamilodok kis hidratációértékeinek oka kutatásaim szerint, hogy a szálakbéli oldószerterben lévő vizet a széles jelű  $^1\text{H}$  NMR nem látja mozgékonynak. A három különböző polimerizációjú változat közül az  $\alpha$ -szinuklein amiloidok hidratációs héjában lévő vízmolekulákat lehet a legkisebb energiabefektetéssel, a legalacsonyabb potenciálgát-értéknél megmozdítani, vagyis a fehérjéhez ezekben van a víz a leggyengébben kötve. Az  $\alpha$ -szinuklein amiloidokban a heterogenitáсарány szerint az oldószernek kitett felület 75%-a rendezetlen, vagyis nagyrészt heterogén a mozgékony hidratációs víz mozgására ható potenciálgátak eloszlása.

Az összes  $\alpha$ -szinuklein változat esetében a fehérje–víz kötések az ilyen kötések számaránya alapján nagyon heterogének (átlag  $HeR_n = 0,88$ ). A különböző változatok közül az amiloidoknál a legkevesebb az a hidratációs vízmennyiség, mely a legalacsonyabb potenciálgát-energiánál mozdul meg, a monomerek és az oligomerek körül pedig ennek többszöröse jön ekkor mozgásba. Az  $\alpha$ -szinuklein oligomerek, amiloidok képződése során a mozgékony hidratációs víz fele eltűnik, felszabadul az olvadási diagram állandó szakasza felett. Megállapításom szerint az oligomerek és amiloidok képződésekor a hidrofíl aminosavak jelentős része a víz, mint oldószer számára hozzáférhetlenné válik és  $\beta$ -redőket alkot.

Meghatároztam az  $\alpha$ -szinuklein monomerek mozgékony hidratációtöbbletét az oligomerekhez, illetve az amiloidokhoz képest. Az oligomerek és az amiloidok képződésekor felszabaduló fehérje–víz kötések mennyisége és minősége fogja jellemezni az őket összetartó kötések. Ezek a kötések minőségüket tekintve heterogének, mennyiségüket tekintve pedig körülbelül a monomereket hidratáló mozgékony vízmolekulák felének a megkötéséhez szükséges mennyiségű fehérjefelületi kötési lehetőséget foglalnak le. Az oligomerek, illetve az amiloidok képződésekor a fehérje felületén szabaddá váló kötési lehetőségek alakítják ki a polimereket

egyben tartó kapcsolatokat. A monomereket oligomerekké vagy amiloidokká építő kölcsönhatások és a polimerizáció folyamata során képződő másodlagos szerkezetek energiatartományát is meghatároztam. Az A53T mutáns polimerek többlet  $\beta$ -redő tartalommal rendelkeznek. Az A53T oligomerek alakját kompaktabbnak találtam, ami részben magyarázatot ad a mutáns gyorsabb amiloid képzésére.

A stabilin-2 citoplazmadoménra, a  $\beta_4$ -timozinra és az általuk alkotott 1:1 komplexre meghatároztuk a spektrális tulajdonságokat és a fehérjével kölcsönható vízmolekulák mozgására ható potenciálgátak energiaeioszlását. A széles jelű  $^1\text{H}$  NMR-spektroszkópiával mért olvadási diagramok elemzésével megerősítettük, hogy az egyedi fehérjék és 1:1 komplexük is IDP.

Az egyedi  $\beta_4$ -timozin és stabilin-2 citoplazmadomén fehérje aminosavszámmal súlyozott olvadási diagramösszege jelentősen különbözik a  $\beta_4$ -timozin–stabilin-2 citoplazmadomén komplex mért olvadási diagramjától, ezáltal bizonyítottam az 1:1 komplex létrejöttét. Megerősítettük, hogy az IDP  $\beta_4$ -timozin és stabilin-2 citoplazmadomén fuzzy komplexet képez. Az 1:1 komplex esetén a leginkább heterogén, azaz a legszélesebb eloszlású potenciálgátak irányítják a hidratációs víz mozgását, aminek a háttérében az áll, hogy a  $\beta_4$ -timozin–stabilin-2 citoplazmadomén komplexnek van a legheterogénebb hozzáférhető felszíne, valamint a fehérje–víz kölcsönhatások tekintetében az alkotó egyedi fehérjékhez képest a legnagyobb szerkezeti rendezetlensége.

A hidratációs víz mozgásának megjelenésekor kezdődő állandó hidratációs értékű olvadási diagramszakasz másodlagos szerkezet jelenlétét jelzi mindhárom fehérje esetén.

Az 1:1 komplex képződésekor megszűnő fehérje–víz kötések, illetve a létrejövő, az 1:1 komplexet egybetartó kölcsönhatások abba az energiatartományba tartoznak, mely a fehérjefelszín hangsúlyosabban hidrofíl részeinek hidratálására jellemző. A fehérjekomplexnek mindkét egyedi alkotó fehérjénél nyitottabb szerkezete van. A nyitottabb szerkezet a heterogenitás magasabb szintjét jeleníti meg, maga az 1:1 komplex tehát rendezetlenebb, mint az egyedi alkotó

fehérjék. Az 1:1 komplexet alkotó fehérjék szabad állapotukban számításaim szerint összesen több mozgékony hidratációs vizet kötnek, mint az 1:1 komplex. Megállapítottam, hogy a hidratációs különbség alapján az 1:1 komplex kialakulásakor 19(1) H<sub>2</sub>O/fehérje szabadul fel.

Az oldószernek hozzáférhető fehérjefelület heterogenitáсарányának megfelelően az izolált  $\beta_4$ -timozinnak, stabilin-2 citoplazmadoménnek és 1:1 komplexüknek is a mozgékony vízmolekulákkal nagyon heterogén energiaszórású kötéseik vannak. A potenciálgát-értéktől független olvadási diagramszakaszon a fehérjék aminosavankénti mozgékony vízmennyisége szerint a legnyitottabb szerkezete az 1:1 komplexnek van, míg a stabilin-2 citoplazmadomén a legkompaktabb.

A *HeM* heterogenitásmérték alapján a tömbvíz olvadáspontjához közel a stabilin-2 citoplazmadomén létesíti a legkevesebb heterogén fehérje–víz kötést a három fehérje közül, az 1:1 komplex pedig a legtöbbet.

## B. Tézisek

1. Új módszert dolgoztam ki a fagyott fehérjeoldatok széles jelű <sup>1</sup>H NMR spektroszkópiás mérésére, és ennek értelmezésére. Ezt az új módszert elsősorban IDP-kre alkalmaztam. A módszer lényege a mozgékony hidrátvíz mennyiségének mérése a hőmérséklet, illetve az annak megfelelő potenciálgát-értékek függvényében. Az így kapott olvadási diagramok minőségi elemzésével a fehérje másodlagos és harmadlagos szerkezetéről nyerünk információt.
2. A fehérjék hidratációját a széles jelű <sup>1</sup>H NMR-rel mért olvadási diagramok által lehet megmérni, jellemezni (olvadási diagram: mozgékony hidratációs víz mennyisége a hőmérséklet függvényében). Elvégeztem a vad típusú, az A30P, az E46K, az A53T mutáns  $\alpha$ -szinuklein monomereken, a vad és az A53T  $\alpha$ -szinuklein oligomereken, amiloidokon, valamint a  $\beta_4$ -timozinon, a stabilin-2 citoplazmadoménen, a  $\beta_4$ -timozin–stabilin-2 citoplazmadomén komplexen kapott olvadási diagramok értelmezését és megállapítottam rajtuk a mozgékony

hidratációs víz létesítette kötések mennyiségét.

3. Megállapítottam, hogy amikor kisebb fehérjékből felépül egy nagyobb, összetett fehérje, akkor ennek a mozgékony hidratációjának a mennyisége és minősége, illetve az ezt leíró olvadási diagramja nem egyenlő a különálló részek mozgékony hidratációinak vagy olvadási diagramjainak az egyszerű összegével. Az  $\alpha$ -szinuklein oligomerek, amiloidok mozgékony hidratációja nem állítható elő a monomerek olvadási diagramjainak összegzésével, valamint a  $\beta_4$ -timozin–stabilin-2 citoplazmadomén komplex olvadási görbéje sem egyenlő az alkotó fehérjék egyedi olvadási diagramjainak matematikai összegével. Minőségében és mennyiségében más lesz az összetett fehérje mozgékony hidratációja.
4. Azonosítottam a másodlagos kötéstípusokat, melyeket a víz az oldott fehérjékkal a legkisebb hőmérséklet-tartományban létesít. Van der Waals típusú kölcsönhatásként azonosítottam a fehérje-víz kölcsönhatást a mozgékony hidratációs víz első megjelenése után, ha lineárisan emelkedő olvadási diagramszakasz látható (E46K  $\alpha$ -szinuklein monomer a legalacsonyabb hőmérsékleteknél). Hidrogénkötést mutattam ki azoknál a fehérjéknél, melyek a hőmérséklet függvényében lépcsős ugrást mutatnak a mozgékony hidratációs víz mennyiségében, annak megjelenésekor. A vad típusú, illetve A30P és az A53T mutáns  $\alpha$ -szinuklein monomer, valamint az  $\alpha$ -szinuklein oligomerek és amiloidok, illetve a stabilin-2 citoplazmadomén, a  $\beta_4$ -timozin–stabilin-2 citoplazmadomén fehérjekomplex mutat ilyen viselkedést a legalacsonyabb hőmérsékleteknél.
5. Megállapítottam, hogy a legkisebb potenciálgátaknál megjelenő mozgékony hidratációs vízhányad az  $\alpha$ -szinuklein monomer változatokban a fehérjével minden lehetséges hidrogénkötést megvalósít a fehérjével. Az  $\alpha$ -szinuklein monomerekhez és oligomerekhez viszonyítva az amiloidokon mért kis hidratációértékek oka kutatásaim szerint, hogy az amiloidszálak belsejében, az oldószerterben lévő vizet a széles jelű  $^1\text{H}$  NMR nem látja mozgékony-

nak. Meghatároztam, hogy a fehérjeoldalláncok mozgékonyága az  $\alpha$ -szinuklein oligomerekben a legkorlátozottabb a monomerekhez és az amiloidokhoz képest.

6. A mért olvadási diagramok alapján megmutattam, hogy egyféle  $\alpha$ -szinuklein oligomer jelenlétéhez köthető a homogén energiaeioszlású fehérje–víz kötésekkel jellemzett potenciálgát-tartomány, vagyis a köbös olvadási diagramszakasz alatti potenciálgát-értékek mellett mérhető rész. Az  $\alpha$ -szinuklein oligomerek felszíne általában a méretüktől függetlenül alapvetően egységes. Megállapítottam, hogy a korábbi, irodalomban közölt véleményekkel ellentétben nem detektálhatók különböző méretű  $\alpha$ -szinuklein oligomerek a konstans olvadási diagramszakaszon.
7. Kiderítettem, hogy az oligomerek és amiloidok képződésekor a hidrofíl aminosavak jelentős része  $\beta$ -redőket alkot és a víz mint oldószer számára hozzáférhetetlenné válik. A polimerizáció során az oldószer számára a továbbiakban nem hozzáférhető aminosavak alkotják az  $\alpha$ -szinuklein oligomereket és az amiloidokat összetartó szerkezeti részleteket, a  $\beta$ -redők részei. Meghatároztam a polimerizáció folyamata során képződő másodlagos szerkezetek energiatartományát. Az oligomereket és az amiloidokat összetartó kötések megállapításom szerint minőségüket tekintve heterogének energiaeioszlásukban, mennyiségüket tekintve pedig körülbelül a monomereket hidratáló mozgékony vízmolekulák felének a megkötéséhez szükséges mennyiségű fehérjefelületi kötési lehetőséget foglalnak le.
8. Az  $\alpha$ -szinuklein amiloidok jelentős rendezetlen, a vízzel heterogén energiaeioszlással kölcsönható, védtelen végszegmenseinek, és a központi hidrofób, kompakt,  $\beta$ -redőket alkotó szakaszának létét kísérletileg igazoltam, mint rendezetlen, illetve rendezett részeket.
9. Számításaim és a mérések szerint a  $\beta_4$ -timozin–stabilin-2 citoplazmadomén fehérje-komplexet alkotó fehérjék szabad állapotukban összesen több mozgékony hidratációs vizet kötnek, mint a komplex egyedül. Ezáltal bebizonyítottam a  $\beta_4$ -timozin–stabilin-2 citoplazma-

domén fehérjekomplex megvalósulását. Megállapítottam, hogy a  $\beta_4$ -timozin–stabilin-2 citoplazmadomén fehérjekomplex kialakulásakor fehérjemolekulánként 19(1) vízmolekula szabadul fel. Meghatároztam az 1:1 komplexet felépítő fehérjemolekulák közti kötések számát, mely ez utóbbival egyenlő.

10. Meghatároztam, hogy a  $\beta_4$ -timozint, stabilin-2 citoplazmadomént és az 1:1 komplexüket hidratáló vízmolekulák az egyes fehérjéknél  $5,8 \text{ kJ mol}^{-1}$ , illetve a komplexükénél  $5,7 \text{ kJ mol}^{-1}$  potenciálgát-értékénél mozgékonyak, és a mennyiségük akkora, mintha minden elméletileg lehetséges hidrogénkötés megvalósulna. Ebből következően nincs eltemetett hidrogénkötőhelye az egyes aminosav oldalláncoknak. Értelmezésem szerint a fehérjék nyitott szerkezetűek és teljesen hidratáltak ennél a potenciálgát-tartománynál.
11. Megállapítottam, hogy a heterogén energiaeoszlással kötő határfelület aránya, a *HeR* mennyiségi mérték eredményekből ítélve a  $\beta_4$ -timozin és a stabilin-2 citoplazmadomén, mint IDP-k kölcsönhatásba lépése a szerkezeti rendezetlenség általános növekedésével jár, mely a fuzzy kölcsönhatás tiszta esetének számít. A  $\beta_4$ -timozin–stabilin-2 citoplazmadomén komplex IDP és a véletlenszerű fuzzy komplexek kategóriájába esik.

## C. Eredmények hasznosításának lehetőségei

Mindkét vizsgált fehérjecsoport kutatási eredményei olyan fontos, új információkat hordoznak, melyek jövőbeli biokémiai felfedezések alapjául szolgálhatnak és távlatosan elősegíthetik új gyógyítási módszerek létrejöttét.

A Parkinson-kór kialakulásáért leginkább az  $\alpha$ -szinukleinoligomerek tehetők felelőssé (Winner et al. 2011). Az  $\alpha$ -szinuklein A53T mutációja megnöveli mind az oligomer-, mind az amiloidképződés sebességét. Az  $\alpha$ -szinuklein oligomerek, amiloidok a Parkinson-kór és más Lewy-kórtanú rendellenességek okozójaként azok molekuláris terápiájának célpontját képezik. Széles jelű  $^1\text{H}$  NMR-kísérleti eredményeink megvilágítják a mutáció okozta eltéréseket a vad típusú és a mutáns  $\alpha$ -szinukleinváltozatok – monomerek, oligomerek, amiloidok – között. Az eltérések

szerkezeti és termodinamikai következményei, vagyis a mutáció hatásainak behatóbb megértése segíti az polimerizációt elősegítő tulajdonságok azonosítását. Mind a három különböző polimerizációjú változat és mutánsaik termodinamikai és szerkezeti összehasonlító elemzése olyan részletekre derített fényt, melyek előrébb visznek egy molekuláris terápia kifejlesztésének útján.

A  $\beta_4$ -timozinnak a szöveti regenerációhoz kapcsolódó funkciói sok orvosi alkalmazási lehetőséget mutatnak, melyek még nincsenek teljesen kiaknázva. A  $\beta_4$ -timozinnak a szövetregenerációban játszott szerepét hasznosító új terápiás eljárások kifejlesztéséhez a kutatásaim lényeges termodinamikai ismereteket nyújtanak. A stabilin-2 citoplazmadoménjének minél teljesebb szerkezeti, termodinamikai megismerése például a bakteriális fertőzések leküzdésében játszott szerepének köszönhetően lényeges segítséget nyújthat új gyógyszerek tervezésekor. A stabilin-2 citoplazmadoménje megköti a  $\beta_4$ -timozint. A két fehérje kölcsönhatásaként létrejövő fehérjekomplex képződési folyamata egyelőre nem kellőképpen tanulmányozott. Az egyedi fehérjék hidratációjának az összekapcsolódáskor történő változásai segítenek ennek tisztázásában. A kölcsönhatás jobb megértése az enzimológiatudomány segítségével szintén az orvostudományban kamatoztatható.

## D. További kutatási tervek

Gyógyszermolekulák lehetséges kölcsönhatásainak vizsgálata célfehérjéikkel fontos további célja kutatásaimnak. Annak megállapítása, hogy egy adott gyógyszerjelölt vegyület ténylegesen kölcsönhat-e a céllal, eleve nagy jelentőséggel bír. Módszerünk ezt pár nap alatt tisztázni tudja. Választ tudok adni arra a kérdésre, hogy a gyógyszer és célpontja közötti reakció hatására milyen hidratációjú termék képződik? A kiindulási anyagok és a végtermék hidratációja nagyságának és termodinamikai tulajdonságainak meghatározása célként szerepel az elérni kívánt eredmények között.

A fehérjék hidratációját eddig oldószerként csak tiszta vizet alkalmazva vizsgáltam. A

testben viszont a fehérjék oldott sókat is tartalmazó, egyéb szerves anyagokkal zsúfolt oldatban találhatóak, ezért kívánatos vizsgálataimat ezen kémiai környezeti körülmények között folytatni. Ebbe az irányba tett fontos lépés a pufferoldatok használata (például Tompa K. et al. 2009). Az általam használni kívánt oldószerek fiziológiás mennyiségben tartalmaznak NaCl-ot, valamint a kémhatást állandó értéken tartó puffert, mely gyakran egyszerű szerves molekula. Külön kérdés, hogy az oldott só miként és milyen koncentrációviszonyok között lép kölcsönhatásba a vizsgált fehérjével. A hidratációs víz részletes tanulmányozásával választ kaphatok erre a kérdésre.

## E. Értekezés alapjául szolgáló közlemények

- Bokor M**, Házy E, Tantos Á. (2022). Wide-line NMR melting diagrams, their thermodynamic interpretation, and secondary structure predictions for A30P and E46K  $\alpha$ -synuclein. *ACS Omega*, **7**, 18323-18330. DOI: 10.1021/acsomega.2c00477; *impact factor*: 3,512
- Bokor M**, Tantos Á. (2021a). Protein–Protein Connections—Oligomer, Amyloid and Protein Complex—By Wide Line  $^1\text{H}$  NMR. *Biomolecules*, **11**, 757. DOI: 10.3390/biom.11050757; *impact factor*: 5,88
- Bokor M**, Tantos Á. (2024). General characterization of properties of ordered and disordered proteins by wide-line  $^1\text{H}$  NMR. *ACS Omega*, **9**, 23468-23475, DOI: 10.1021/acsomega.4c00517; *impact factor*: 4,1
- Bokor M**, Tantos Á, Mészáros A, Jenei B, Haminda R, Tompa P, Tompa K. (2020a). Molecular motions and interactions in aqueous solutions of thymosin- $\beta_4$ , stabilin CTD and their 1:1 complex, studied by  $^1\text{H}$ -NMR spectroscopy. *ChemPhysChem*, **21**, 1420-1428. DOI: 10.1002/cphc.202000264; *impact factor*: 2,85
- Bokor M**, Tantos Á, Tompa P, Han KH, Tompa K. (2020b). WT and A53T  $\alpha$ -synuclein systems: melting diagram and its new interpretation. *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 3997. DOI: 10.3390/ijms21113997; *impact factor*: 4,556

Házy E, **Bokor M**, Kalmár L, Gelencsér A, Kamasa P, Han KH, Tompa K, Tompa P. (2011).

Distinct hydration properties of wild-type and familial point mutant A53T of  $\alpha$ -synuclein associated with Parkinson's disease. *Biophys. J.*, 101, 2260-2266. DOI: 10.1016/j.bpj.2011.08.052; *impact factor*: 3,653

Tantos A, Szabo B, Lang A, Varga Z, Tsylonok M, **Bokor M**, Verebelyi T, Kamasa P, Tompa

K, Perczel A, Buday L, Lee SH, Choo Y, Han KH, Tompa P. (2013). Multiple fuzzy interactions in the moonlighting function of thymosin- $\beta_4$ . *Intrinsically Disordered Proteins*, 1, e26204. DOI: 10.4161/idp.26204; *impact factor*: 1,7

Tompa K, **Bokor M**, Tompa P. (2010b). Chapter 12. Hydration of intrinsically disordered

proteins from wide-line NMR. Könyvben: Instrumental Analysis of Intrinsically Disordered Proteins: Assessing Structure and Conformation. Wiley Series in Protein and Peptide Science (Szerk.: Uversky VN, Longhi S.) John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, 345-368. oldal. DOI: 10.1002/9780470602614.ch12

Tompa K, **Bokor M**, Tompa P. (2012). Chapter 13. Wide-line NMR and protein hydration.

Könyvben: Methods and Experimental Tools – Methods in Molecular Biology (Szerk.: Uversky VN, Dunker AK.) Humana Press Inc., 895, 167-196. oldal. DOI: 10.1007/978-1-61779-927-3\_13

Tompa K, **Bokor M**, Tompa P. (2018). The melting diagram of protein solutions and its

thermodynamic interpretation. *Int. J. Mol. Sci.*, 19, 3571. DOI: 10.3390/ijms19113571; *impact factor*: 4,183

## V. Irodalomjegyzék

- Allison JR, Varnai P, Dobson CM, Vendruscolo M. (2009). Determination of the free energy landscape of  $\alpha$ -synuclein using spin label nuclear magnetic resonance measurements. *J. Am. Chem. Soc.*, **131**, 18314-18326. DOI: 10.1021/ja904716h
- Amoutzias G, Van de Peer Y. (2010). Single-gene and whole-genome duplications and the evolution of protein–protein interaction networks. *evolutionary genomics and systems biology*. Könyvben: Caetano-Anolles G (szerk.). *Evolutionary genomics*. 413-429. oldal. doi:10.1002/9780470570418.ch19
- Andresen C, Helander S, Lemak A, Farès C, Csizmók V, Carlsson J, Penn LZ, Forman-Kay JD, Arrowsmith CH, Lundström P, Sunnerhagen M. (2012). Transient structure and dynamics in the disordered c-Myc transactivation domain affect Bin1 binding. *Nucleic Acids Res.*, **40**, 6353-6366. DOI: 10.1093/nar/gks263
- Badamchian M, Damavandy AA, Damavandy H, Wadhwa SD, Katz B, Goldstein AL. (2007). Identification and quantification of thymosin  $\beta_4$  in human saliva and tears. *Ann. NY Acad. Sci.*, **112**, 458–465. DOI: 10.1196/annals.1415.046
- Balázs A, Csizmók V, Buday L, Rakács M, Kiss R, Bokor M, Udupa R, Tompa K, Tompa P. (2009). High levels of structural disorder in scaffold proteins as exemplified by a novel neuronal protein, CASK-interactive protein. *FEBS J.*, **276**, 3744-3756. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2009.07090.x
- Baldwin AJ, Knowles TPJ, Tartaglia GG, Fitzpatrick AW, Devlin GL, Shammass SL, Waudby CA, Mossuto MF, Meehan S, Gras SL, Christodoulou J, Anthony-Cahill SJ, Barker PD, Vendruscolo M, Dobson CM. (2011). Metastability of native proteins and the phenomenon of amyloid formation. *J. Am. Chem. Soc.*, **133**, 14160-14163. DOI: 10.1021/ja2017703
- Bartels T, Choi JG, Selkoe DJ. (2011).  $\alpha$ -Synuclein occurs physiologically as a helically folded tetramer that resists aggregation. *Nature*, **477**, 107–110. DOI: 10.1038/nature10324
- Bertoncini CW, Fernandez CO, C, Jovin TM, Zweckstetter M. (2005a). Familial mutants of  $\alpha$ -synuclein with increased neurotoxicity have a destabilized conformation. *J. Biol. Chem.*, **280**, 30649-30652. DOI: 10.1074/jbc.C500288200
- Bertoncini CW, Jung YS, Fernandez CO, Hoyer W, Griesinger C, Jovin TM, Zweckstetter M. (2005b). Release of long-range tertiary interactions potentiates aggregation of natively unstructured  $\alpha$ -synuclein. *P. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 1430-1435. DOI: 10.1073/pnas.0407146102
- Bhattacharya S, Xu L, Thompson D. (2019). Molecular simulations reveal terminal group mediated stabilization of helical conformers in both amyloid- $\beta_{42}$  and  $\alpha$ -synuclein. *ACS Chem. Neurosci.*, **10**, 2830-2842. DOI: 10.1021/acschemneuro.9b00053
- Bisi N, Feni L, Peqini K, Pérez-Peña H, Onger S, Pieraccini S, Pellegrino S. (2021).  $\alpha$ -Synuclein: an all-inclusive trip around its structure, influencing factors and applied techniques. *Front. Chem.*, **9**, 666585 DOI: 10.3389/fchem.2021.666585
- Bizzarri AR, Wang CX, Chen WZ, Cannistraro S. (1995). Hydrogen bond analysis by MD simulation of copper plastocyanin at different hydration levels. *Chem. Phys.*, **201**, 463-472. DOI: 10.1016/0301-0104(95)00267-7
- Bokor M, Csizmók V, Kovács D, Bánki P, Friedrich P, Tompa P, Tompa K. (2005). NMR relaxation studies on the hydrate layer of intrinsically unstructured proteins. *Biophys. J.*,

- 88**, 2030-2037. DOI: 10.1529/biophysj.104.051912
- Bokor M, Házay E, Tantos Á. (2022). Wide-line NMR melting diagrams, their thermodynamic interpretation, and secondary structure predictions for A30P and E46K  $\alpha$ -synuclein. *ACS Omega*, **7**, 22, 18323–18330. DOI: 10.1021/acsomega.2c00477
- Bokor M, Tantos Á. (2021a). Protein–Protein Connections—Oligomer, Amyloid and Protein Complex—By Wide Line  $^1\text{H}$  NMR. *Biomolecules*, **11**, 757. DOI: 10.3390/biom.11050757
- Bokor M, Tantos Á. (2021b). Secondary structures of proteins: a comparison of models and experimental results. *J. Proteome Res.*, **20**, 1802-1808. DOI: 10.1021/acs.jproteome.0c00986 93
- Bokor M, Tantos Á. (2024) General characterization of properties of ordered and disordered proteins by wide-line  $^1\text{H}$  NMR *ACS Omega*, **9**, 23468-23475 DOI: 10.1021/acsomega.4c00517
- Bokor M, Tantos Á, Mészáros A, Jenei B, Haminda R, Tompa P, Tompa K. (2020a). Molecular motions and interactions in aqueous solutions of thymosin- $\beta_4$ , stabilin CTD and their 1:1 complex, studied by  $^1\text{H}$ -NMR spectroscopy. *ChemPhysChem*, **21**, 1420-1428. DOI: 10.1002/cphc.202000264
- Bokor M, Tantos Á, Tompa P, Han KH, Tompa K. (2020b). WT and A53T  $\alpha$ -synuclein systems: Melting Diagram and its new Interpretation. *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 3997. DOI: 10.3390/ijms21113997
- Borgia A, Borgia MB, Bugge K, Kissling VM, Heidarsson PO, Fernandes CB, Sottini A, Soranno A, Buholzer KJ, Nettels D, Kragelund BB, Best RB, Schuler B. (2018). Extreme disorder in an ultrahigh-affinity protein complex. *Nature*, **555**, 61-66. DOI: 10.1038/nature25762
- Böhm I, Schild H. (2003). Apoptosis: the complex scenario for a silent cell death. *Mol. Imaging Biol.*, **5**, 2-14. DOI: 10.1016/s1536-1632(03)00024-6
- Breydo L, Wu JW, Uversky VN. (2012).  $\alpha$ -Synuclein misfolding and Parkinson's disease. *BBA - Mol. Basis Dis.* **1822**, 261-285. DOI: 10.1016/j.bbadis.2011.10.002
- Brodie NI, Popov KI, Petrotchenko EV, Dokholyan NV, Borchers CH. (2019). Conformational ensemble of native  $\alpha$ -synuclein in solution as determined by short-distance crosslinking constraint-guided discrete molecular dynamics simulations. *PLOS Comput. Biol.*, **15**, e1006859. DOI: 10.1371/journal.pcbi.1006859
- Brotzakis ZF, Groot CCM, Brandenburgo Bakker HJ, Bolhuis PG. (2016). Dynamics of hydration water around native and misfolded  $\alpha$ -lactalbumin. *J. Phys. Chem. B*, **120**, 47564766. DOI: 10.1021/acs.jpcb.6b02592
- Brucale M, Sandal M, Di Maio S, Rampioni A, Tessari I, Tosatto L, Bisaglia M, Bubacco L, Samori B. (2009). Pathogenic mutations shift the equilibria of alpha-synuclein single molecules towards structured conformers. *ChemBioChem*, **10**, 176-183. DOI: 10.1002/cbic.200800581
- Burre J, Vivona S, Diao J, Sharma M, Brunger AT, Südhof TC. (2013). Properties of native brain  $\alpha$ -synuclein. *Nature*, **498**, E4-E6. DOI: 10.1038/nature12125
- Carr HY, Purcell EM. (1954). Effects of diffusion on free precession in nuclear magnetic resonance experiments. *Phys. Rev.*, **94**, 630-638. DOI: 10.1103/PhysRev.94.630
- Chandra S, Chen XC, Rizo J, Jahn R, Südhof TC. (2003). A broken  $\alpha$ -helix in folded  $\alpha$ -synuclein. *J. Biol. Chem.*, **278**, 15313-15318. DOI: 10.1074/jbc.M213128200

- Chen J, Zaer S, Drori P, Zamel J, Joron K, Kalisman N, Lerner E, Nikolay V, Dokholyan NV. (2021). The structural heterogeneity of  $\alpha$ -synuclein is governed by several distinct subpopulations with interconversion times slower than milliseconds. *Structure*, **29**, 1048-1064.e6, DOI: 10.1016/j.str.2021.05.002.
- Chen SW, Drakulic S, Deas E, Ouberaï M, Aprile FA, Arranz R, Ness S, Roodveldt C, Guillems T, De-Genst EJ, Klennerman D, Wood NW, Knowles TPJ, Alfonso C, Rivas G, Abramov AY, Valpuesta JM, Dobson CM, Cremades N. (2015). Structural characterization of toxic oligomers that are kinetically trapped during  $\alpha$ -synuclein fibril formation. *P. Natl. Acad. Sci. USA*, **112**, E1994-E2003. DOI: 10.1073/pnas.1421204112
- Chen X, Webert I, Harrison RW. (2008). Hydration water and bulk water in proteins have distinct properties in radial distributions calculated from 105 atomic resolution crystal structures. *J. Phys. Chem. B*, **112**, 12073-12080. DOI: 10.1021/jp802795a
- Chiti F, Dobson CM. (2017). Protein misfolding, amyloid formation, and human disease: a summary of progress over the last decade. *Annu. Rev. Biochem.*, **20**, 27-68. DOI: 10.1146/annurev-biochem-061516-045115
- Choi BK, Choi MG, Kim JY, Yang Y, Lai Y, Kweon DH, Lee NK, Shin YK. (2013). Large  $\alpha$ -synuclein oligomers inhibit neuronal SNARE-mediated vesicle docking. *P. Natl. Acad. Sci. USA*, **110**, 4087-4092. DOI: 10.1073/pnas.1218424110
- Choi W, Zibae S, Jakes R, Serpell LC, Davletov B, Crowther RA, Goedert M. (2004). Mutation E46K increases phospholipid binding and assembly into filaments of human  $\alpha$ -synuclein. *FEBS Lett.*, **576**, 363-368. DOI: 10.1016/j.febslet.2004.09.038
- Choy WY, Forman-Kay JD. (2001). Calculation of ensembles of structures representing the unfolded state of an SH3 domain. *J. Mol. Biol.*, **308**, 1011-1032. DOI: 10.1006/jmbi.2001.4750
- Cooke R, Kuntz ID. (1974). The Properties of Water in Biological Systems. *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.*, **3**, 95-126. DOI: 10.1146/annurev.bb.03.060174.000523
- Coskuner O, Wise-Scira O. (2013). Structures and free energy landscapes of the A53T mutant-type  $\alpha$ -synuclein protein and impact of A53T mutation on the structures of the wild-type  $\alpha$ -synuclein protein with dynamics. *ACS Chem. Neurosci.*, **4**, 1101-1113. DOI: 10.1021/cn400041j
- CRC Handbook of Chemistry and Physics, 101. kiadás. (2020). Szerk.: Rumble J. CRC Press, USA. ISBN 978036741246
- Cremades N, Chen SW, Dobson CM. (2017). Chapter Three - Structural Characteristics of  $\alpha$ -Synuclein Oligomers. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.*, **329**, 79-143. DOI: 10.1016/bs.ircmb.2016.08.010
- Csizmók V, Bokor M, Bánki P, Klement É, Medzihradský KF, Friedrich P, Tompa K, Tompa P. (2005). Primary contact sites in intrinsically unstructured proteins: The case of calpastatin and microtubule-associated protein 2. *Biochemistry*, **44**, 3955-3964. DOI: 10.1021/bi047817f
- Czisch M, Schleicher M, Horger S, Voelter W, Holak TA. (1993). Conformation of thymosin  $\beta_4$  in water determined by NMR spectroscopy. *Eur. J. Biochem.*, **218**, 335-344. DOI:10.1111/j.1432-1033.1993.tb18382.x
- Del Mar C, Greenbaum EA, Mayne L, Englander SW, Woods Jr. VL. (2005). Structure and properties of  $\alpha$ -synuclein and other amyloids determined at the amino acid level. *P. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 15477-15482. DOI: 10.1073/pnas.0507405102 94

- Derbyshire W. (1982). The dynamics of water in heterogeneous systems with emphasis on sub-zero temperatures. Water and aqueous solutions at subzero temperatures. Water (A Comprehensive Treatise), vol 7. Szerk.: Franks F. Springer/Boston, MA. 339-430. oldal. DOI: 10.1007/978-1-4757-6952-4\_4
- Dobson CM. (2003). Protein folding and misfolding. *Nature*, **426**, 884-890. DOI: 10.1038/nature02261
- Dosztányi Z, Csizmók V, Tompa P, Simon I. (2005). IUPred: web server for the prediction of intrinsically unstructured regions of proteins based on estimated energy content. *Bioinformatics*, **21**, 3433–3434. DOI: 10.1093/bioinformatics/bti541
- Dunker AK, Babu MM, Barbar E, Blackledge M, Bondos SE, Dosztányi Z, Dyson HJ, Forman-Kay J, Fuxreiter M, Gasponer J, Han KH, Jones DT, Longhi S, Metallo SJ, Nishikawa K, Nussinov R, Obradovic Z, Pappu RV, Rost B, Selenko P, Subramaniam V, Sussman JL, Tompa P, Uversky VN. (2013). What's in the name? Why these proteins are intrinsically disordered? *Intrinsically Disordered Proteins*, **1**, e24157. DOI: 10.4161/idp.24157
- Dunker, AK, Lawson, JD, Brown, CJ, Williams, RM, Romero, P, Oh, JS, Oldfield, CJ, Campen, AM, Ratliff, CM, Hipps, KW, Ausio, J, Nissen, MS, Reeves, R, Kang, C, Kissinger, CR, Bailey, RW, Griswold, MD, Chiu, W, Garner, EC, Obradovic, Z. (2001). Intrinsically disordered protein. *J Mol. Graph. Model.*, **19**, 26-59. DOI: 10.1016/s1093-3263(00)00138-8
- Dunker AK, Obradovic Z. (2001). The protein trinity—linking function and disorder. *Nat. Biotechnol.*, **19**, 805-806. DOI: 10.1038/nbt0901-805
- Durchschlag H, Zipper P. (2001). Comparative investigations of biopolymer hydration by physicochemical and modeling techniques. *Biophys. Chem.*, **93**, 141–157. DOI: 10.1016/S0301-4622(01)00217-4
- Eads TM. (1995). Wide-line and High-resolution  $^1\text{H}$  NMR of Food Materials. *Ann. R. NMR S.*, **31**, 143-156. DOI: 10.1016/S0066-4103(08)60147-7
- Eisenberg D.; Nelson R, Sawaya MR, Balbirnie M, Sambashivan, S, Ivanova MI, Madsen AO, Riekel C. (2006). The Structural Biology of Protein Aggregation Diseases: Fundamental Questions and Some Answers. *Acc. Chem. Res.*, **39**, 568-575. DOI: 10.1021/ar0500618
- Fauvet, B, Mbefo, MK, Fares, MB, Desobry, C, Michael, S, Ardah, MT, et al. (2012).  $\alpha$ -Synuclein in central nervous system and from erythrocytes, mammalian cells, and *Escherichia coli* exists predominantly as disordered monomer. *J. Biol. Chem.*, **287**, 15345-15364. DOI: 10.1074/jbc.M111.318949
- Fitzpatrick AWP, Debelouchina GT, Bayro MJ, Clare DK, Caporini MA, Bajaj VS, Jaroniec CP, Wang L, Ladizhansky V, Müller SA, MacPhee CE, Waudby CA, Mott HR, De Simone A, Knowles TPJ, Saibil HR, Vendruscolo M, Orlova EV, Griffin RG, Dobson CM. (2013). Atomic structure and hierarchical assembly of a cross- $\beta$  amyloid fibril. *P. Natl. Acad. Sci. USA*, **110**, 5468-5473. DOI: 10.1073/pnas.1219476110
- Fredenburg RA, Rospigliosi C, Meray RK, Kessler JC, Lashuel HA, Eliezer D, Lansbury Jr. PT. (2007). The impact of the E46K mutation on the properties of  $\alpha$ -synuclein in its monomeric and oligomeric states. *Biochemistry*, **46**, 7107-7118. DOI: 10.1021/bi7000246.
- Fujiwara S. (2017). Dynamic Aspects of amyloid fibrils of  $\alpha$ -synuclein related to the pathogenesis of Parkinson's disease. *J. Alzheimers Dis. Parkinsonism*, **7**, 310. DOI:

10.4172/2161-0460.1000310

- Fujiwara S, Araki K, Matsuo T, Yagi H, Yamada T, Shibata K, Mochizuki H. (2016). Dynamical Behavior of Human  $\alpha$ -Synuclein Studied by Quasielastic Neutron Scattering. *PLoS ONE*, **11**, e0151447. DOI: 10.1371/journal.pone.0151447
- Fuxreiter M. (2020). Classifying the Binding Modes of Disordered Proteins. *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 8615. DOI: 10.3390/ijms21228615
- Ghosh D, Mehra S, Sahay S, Singh PK, Maji SK. (2017).  $\alpha$ -synuclein aggregation and its modulation. *Int. J. Biol. Macromol.*, **100**, 37-54. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2016.10.021
- Goedert M. (2001). Alpha-synuclein and neurodegenerative diseases. *Nat. Rev. Neurosci.*, **2**, 492-501. DOI: 10.1038/35081564.
- Goldstein AL, Hannappel E, Sosne G, Kleinman HK. (2012). Thymosin- $\beta_4$ : A multi-functional regenerative peptide. Basic properties and clinical applications. *Expert Opin. Biol. Th.*, **12**, 37–51. DOI: 10.1517/14712598.2012.634793
- Goldstein AL, Kleinman HK. (2015). Advances in the basic and clinical applications of thymosin- $\beta_4$ . *Expert Opin. Biol. Th.*, **15**, S139-S145. DOI: 10.1517/14712598.2015.1011617
- Gregory RB, Protein-solvent interactions, szerk. Gregory RB, kiadó: M. Dekker, New York, 1995, 3. fejezet, 191-264 oldal ISBN 9780824792398
- Grootveld M, Percival B, Gibson M, Osman Y, Edgar M, Molinari M, Mather ML, Casanova F, Wilson PB. (2019). Progress in low-field benchtop NMR spectroscopy in chemical and biochemical analysis. *Anal. Chim. Acta*, **1067**, 11-30. DOI: 10.1016/j.aca.2019.02.026.
- Hahn EL. (1950). Spin echoes. *Phys. Rev.*, **80**, 580-594. DOI: 10.1103/PhysRev.80.580
- Házy E, Bokor M, Kalmár L, Gelencsér A, Kamasa P, Han KH, Tompa K, Tompa P. (2011). Distinct hydration properties of wild-type and familial point mutant A53T of  $\alpha$ -synuclein associated with Parkinson's disease. *Biophys. J.*, **101**, 2260-2266. DOI: 10.1016/j.bpj.2011.08.052
- Higo J, Nakasako M. (2002). Hydration structure of human lysozyme investigated by molecular dynamics simulation and cryogenic X-ray crystal structure analyses: On the correlation between crystal water sites, solvent density, and solvent dipole. *J. Comp. Chem.*, **23**, 1323-1336. DOI: 10.1002/jcc.10100 95
- Ho JH, Tseng KC, Ma WH, Chen KH, Lee OK, Su Y. (2008). Thymosin- $\beta_4$  upregulates anti-oxidative enzymes and protects corneal epithelial cells against oxidative damage. *Br. J. Ophthalmol.*, **92**, 992-997. DOI: 10.1136/bjo.2007.136747
- <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/55576>
- <https://www.uniprot.org/uniprotkb/P62328/entry>
- <https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q8WWQ8/entry>
- Huang A, Stultz CM. (2008). The effect of a DeltaK280 mutation on the unfolded state of a microtubule-binding repeat in Tau. *PLoS Comput. Biol.*, **4**, e1000155. DOI: 10.1371/journal.pcbi.1000155
- Huang CM, Wang CC, Barnes S, Elmets CA. (2006). In vivo detection of secreted proteins from wounded skin using capillary ultrafiltration probes and mass spectrometric proteomics. *Proteomics*, **6**, 5805–5814. DOI: 10.1002/pmic.200600163

- Jasutkar HG, Oh SE, Mouradian MM. (2022). Therapeutics in the pipeline targeting  $\alpha$ -synuclein for Parkinson's disease. *Pharmacol. Rev.*, **74**, 207-237. DOI: 10.1124/pharmrev.120.000133
- Jeffery C. (2018). Intracellular proteins moonlighting as bacterial adhesion factors. *AIMS Microbiology*, **4**, 362-376. DOI: 10.3934/microbiol.2018.2.362
- Jeffery CJ. (1999). Moonlighting proteins. *Trends Biochem. Sci.*, **24**, 8-11. DOI: 10.1016/S0968-0004(98)01335-8
- Jeffery CJ. (2003). Moonlighting proteins: old proteins learning new tricks. *Trends Genet.*, **19**, 415-417. DOI: 10.1016/S0168-9525(03)00167-7
- Jónsson SÆ, Mohanty S, Irbäck A. (2012). Distinct phases of free  $\alpha$ -synuclein—A Monte Carlo study. *Proteins*, **80**, 2169-2177. DOI: 10.1002/prot.24107
- Jumper J, Evans R, Pritzel A, Green T, Figurnov M, Ronneberger O, Tunyasuvunakool K, Bates R, Židek A, Potapenko A, Bridgland A, Meyer C, Kohl SAA, Ballard AJ, Cowie A, Romera-Paredes B, Nikolov S, Jain R, Adler J, Back T, Petersen S, Reiman D, Clancy E, Zielinski M, Steinegger M, Pacholska M, Berghammer T, Bodenstein S, Silver D, Vinyals O, Senior AW, Kavukcuoglu K, Kohli P, Hassabis D. (2021). Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*, **596**, 583-589. DOI: 10.1038/s41586-021-03819-2
- Kamasa P, Bokor M, Pyda M, Tompa K. (2007). DSC approach for the investigation of mobile water fractions in aqueous solutions of NaCl and Tris buffer. *Thermochim. Acta*, **464**, 29-34. DOI: 10.1016/j.tca.2007.08.001
- Kim DH, Lee J, Mok K, Lee J, Han K-H. (2020). Salient features of monomeric  $\alpha$ -synuclein revealed by NMR spectroscopy. *Biomolecules*, **10**, 428-515. DOI: 10.3390/biom10030428
- Kittel C, Kroemer H. (1980). Thermal physics. 2. kiadás, 41, oldal. W. H. Freeman, San Francisco. Appendix B, Temperature scales, 445. oldal. ISBN-10 : 0716710889
- Krüger R, Kuhn W, Müller T, Woitalla D, Graeber M, Kösel S, Przuntek H, Epplen JT, Schöls L, Riess O. (1998). Ala30Pro mutation in the gene encoding  $\alpha$ -synuclein in Parkinson's disease. *Nat. Genet.*, **18**, 106-108. DOI: 10.1038/ng0298-106
- Kuntz ID. (1971). Hydration of Macromolecules. III. Hydration of Polypeptides. *J. Am. Chem. Soc.*, **93**, 514-516. DOI: 10.1021/ja00731a036
- Kuntz Jr. ID, Kauzmann W. (1974). Hydration of Proteins and Polypeptides. *Adv. Protein Chem.*, **28**, 239-345. DOI: 10.1016/S0065-3233(08)60232-6
- Laage D, Elsaesser T, Hynes JT. (2017). Water Dynamics in the Hydration Shells of Biomolecules. *Chem. Rev.*, **117**, 10694-10725. DOI: 10.1021/acs.chemrev.6b00765
- Law KY. (2014). Definitions for hydrophilicity, hydrophobicity, and superhydrophobicity: getting the basics right. *J. Phys. Chem. Lett.*, **5**, 686-688. DOI: 10.1021/jz402762h
- Lee SJ, So IS, Park SY, Kim IS. (2008). Thymosin  $\beta_4$  is involved in stabilin-2-mediated apoptotic cell engulfment. *FEBS Lett.*, **582**, 2161-2166. DOI: 10.1016/j.febslet.2008.03.058
- Li B, Ge P, Murray KA, Sheth P, Zhang M, Nair G, Sawaya MR, Shin WS, Boyer DR, Ye S, Eisenberg DS, Zhou ZH, Jiang L. (2018). Cryo-EM of full-length  $\alpha$ -synuclein reveals fibril polymorphs with a common structural kernel. *Nat. Commun.*, **9**, 3609. DOI: 10.1038/s41467-018-05971-2

- Li J, Uversky VN, Fink AL. (2001). Effect of familial Parkinson's disease point mutations A30P and A53T on structural properties, "stability", aggregation and fibrillation capability of human  $\alpha$ S. *Biochemistry*, **40**, 11604-116013. DOI: 10.1021/bi010616g
- Lieutaud P, Ferron F, Uversky AV, Kurgan L, Uversky VN, Longhi S. (2016). How disordered is my protein and what is its disorder for? A guide through the "dark side" of the protein universe. *Intrinsically Disordered Proteins*, **4**, e1259708. DOI: 10.1080/21690707.2016.1259708
- Low TL, Goldstein AL. (1984). Thymosins: structure, function and therapeutic applications. *Thymus*, **6**, 27-42. PMID: 6087503
- Martini S, Bonechi C, Foletti A, Rossi C. (2013). Water-protein interactions: the secret of protein dynamics. *Sci. World J.*, **2013**, 138916. DOI: 10.1155/2013/138916
- Matsuoka D, Nakasako M. (2013). Application of empirical hydration distribution functions around polar atoms for assessing hydration structures of proteins. *Chem. Phys.*, **419**, 59-64. DOI: 10.1016/j.chemphys.2012.12.040
- McGee TD. (1988). Principles and methods of temperature measurement. 1. kiadás. John Wiley & Sons, ISBN-10: 0471627674. 32. oldal.
- Meade RM, Fairlie DP, Mason JM. (2019). Alpha-synuclein structure and Parkinson's disease – lessons and emerging principles. *Mol. Neurodegener.*, **14**, 29 (14 oldal). DOI: 10.1186/s13024-019-0329-1
- Meiboom S, Gill D. (1958). Modified spin-echo method for measuring nuclear relaxation times. *Rev. Sci. Instrum.*, **29**, 688-691. DOI: 10.1063/1.1716296
- Meyer EE, Rosenberg KJ, Israelachvili J. (2006). Recent progress in understanding hydrophobic interactions. *P. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 15739-15746. DOI: 10.1073/pnas.0606422103
- Mészáros B, Hatos A, Palopoli N, Quaglia F, Salladini E, van Roy K, Arthanari H, Dosztányi Z, Felli IC, Fischer PD, Hoch JC, Jeffries M, Longhi S, Maiani E, Orchard S, Pancsa R, Papaleo E, Pierattelli R, Piovesan D, Pritsanac I, Tenorio L, Viennet T, Tompa P, Vranken W, Tosatto SCE, Davey NE. (2023). Minimum information guidelines for experiments structurally characterizing intrinsically disordered protein regions. *Nat. Methods*, **20**, 1291-1303 DOI: 10.1038/s41592-023-01915-x
- Miake H, Mizusawa H, Iwatsubo T, Hasegawa M. (2002). Biochemical characterization of the core structure of  $\alpha$ -synuclein filaments. *J. Biol. Chem.*, **277**, 19213-19219. DOI: 10.1074/jbc.M110551200
- Milles S, Mercadante D, Aramburu IV, Jensen MR, Banterle N, Koehler C, Tyagi S, Clarke J, Shammass SL, Blackledge M, Gräter F, Lemke EA. (2015). Plasticity of an ultrafast interaction between nucleoporins and nuclear transport receptors. *Cell*, **163**, 734-745. DOI: 10.1016/j.cell.2015.09.047
- Mittag T, Kay LE, Forman-Kay JD. (2010). Protein dynamics and conformational disorder in molecular recognition. *J. Mol. Recognit.*, **23**, 105-116. DOI: 10.1002/jmr.961
- Mohring T, Kellmann M, Jurgens M, Schrader M. (2005). Top-down identification of endogenous peptides up to 9 kDa in cerebrospinal fluid and brain tissues by nonelectrospray quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.*, **40**, 214–226. DOI: 10.1002/jms.741
- Mondal S, Mukherjee S, Bagchi B. (2017). Protein hydration dynamics: much ado about

- nothing? *J. Phys. Chem. Lett.*, **8**, 4878-4882. DOI: 10.1021/acs.jpcllett.7b02324
- Morris R, Black KA, Stollar EJ. (2022). Uncovering protein function: from classification to complexes. *Essays in Biochemistry*, **66**, 265-285. DOI: 10.1042/EBC20200108
- Murali MG, Felli IC, Pieratelli R. (2020). Adenoviral E1A exploits flexibility and disorder to target cellular proteins. *Biomolecules*, **10**, 1541. DOI: 10.3390/biom10111541
- Nakasako M. (1999). Large-scale networks of hydration water molecules around bovine  $\beta$ -trypsin revealed by cryogenic X-ray crystal structure analysis. *J. Mol. Biol.*, **289**, 547-564. DOI: 10.1006/jmbi.1999.2795
- Nakasako M. (2004). Water-protein interactions from high-resolution protein crystallography. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, **359**, 1191-1206. DOI: 10.1098/rstb.2004.1498
- Nelson R, Sawaya MR, Balbirnie M, Madsen AØ, Grothe R, Eisenberg D. (2005). Structure of the cross- $\beta$  spine of amyloid-like fibrils. *Nature*, **435**, 773-778. DOI: 10.1038/nature03680
- Nooren IM, Thornton JM (2003). Diversity of protein interactions. *EMBO J.*, **22**, 3486-3492. DOI: 10.1093/emboj/cdg359
- Nyitrai L, Pál G. (2013). A biokémia és molekuláris biológia alapjai. Szerk.: Nyitrai L, Pál G., Eötvös Loránd Tudományegyetem, 179. oldal
- Oldfield CJ, Chen K, Kurgan L. (2019). 4. fejezet: Computational prediction of secondary and supersecondary structures from protein sequences. A könyvben: Protein supersecondary structures Szerkesztő: Kister AE. Kiadó: Humana New York, NY. DOI: 10.1007/978-1-4939-9161-7
- Oliveira GAP, Silva JL. (2019). Alpha-synuclein stepwise aggregation reveals features of an early onset mutation in Parkinson's disease. *Commun. Biol.*, **2**, 374. DOI: 10.1038/s42003-019-0598-9
- Parihar A, Parihar P, Solanki I, Parihar MS. (2019). 1. fejezet:  $\alpha$ -synuclein and Parkinson's disease. A könyvben: Pathology, prevention and therapeutics of neurodegenerative disease. Szerkesztők: Singh S, Joshi N. Kiadó: Springer Nature Singapore Pte Ltd. DOI: 10.1007/978981-13-0944-1\_1
- Peng Z, Yan J, Fan X, Mizianty MJ, Xue B, Wang K, Hu G, Uversky VN. (2015). Exceptionally abundant exceptions: comprehensive characterization of intrinsic disorder in all domains of life. *Cell. Mol. Life Sci.* **72**, 137-151. DOI: 10.1007/s00018-014-1661-9
- Persson F, Söderhjelm P, Halle B. (2018). The geometry of protein hydration. *J. Chem. Phys.*, **148**, 215101. DOI: 10.1063/1.5026744
- Podoly E, Hanin G, Soreq H. (2010). Alanine-to-threonine substitutions and amyloid diseases: Butyrylcholinesterase as a case study. *Chem.-Biol. Interact.*, **187**, 64-67. DOI: 10.1016/j.cbi.2010.01.003
- Polymeropoulos MH, Lavedan C, Leroy E, Ide SE, Dehejia A, Dutra A, Pike B, Root H, Rubenstein J, Boyer R, Stenroos ES, Chandrasekharappa S, Athanassiadou A, Papapetropoulos T, Johnson WG, Lazzarini AM, Duvoisin RC, Di Iorio G, Golbe LI, Robert L. Nussbaum. (1997). Mutation in the  $\alpha$ -synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science*, **276**, 2045-2047. DOI: 10.1126/science.276.5321.2045
- Purkiss A. (2001). The protein-solvent interface: a big splash. *Philos. T. Roy. Soc. A*, **359**, 15151527. DOI: 10.1098/rsta.2001.0863

- Ramis R, Ortega-Castro J, Casasnovas R, Mariño L, Vilanova B, Adrover M, Frau J. (2019). A coarse-grained molecular dynamics approach to the study of the intrinsically disordered protein  $\alpha$ -synuclein. *J. Chem. Inf. Model.*, **59**, 1458-1471. DOI: 10.1021/acs.jcim.8b00921
- Raschke TM. (2006). Water structure and interactions with protein surfaces. *Curr. Opin. Struc. Biol.*, **16**, 152-159. DOI: 10.1016/j.sbi.2006.03.002
- Roberts BC, Mancera RL. (2008). Ligand-protein docking with water molecules. *J. Chem. Inf. Model.*, **48**, 397-408. DOI: 10.1021/ci700285e
- Rupley JA, Careri G. (1991). Protein hydration and function. *Adv. Protein Chem.*, **41**, 37-172. DOI: 10.1016/s0065-3233(08)60197-7
- Rupley JA, Gratton E, Careri G. (1983). Water and globular proteins. *Trends Biol. Sci.*, **8**, 18-22. DOI: 10.1016/0968-0004(83)90063-4
- Santos J, Pallarès I, Ventura S. (2023). A glimpse into the structural properties of  $\alpha$ -synuclein oligomers. *BioFactors*, **50**, 439-449. DOI: 10.1002/biof.2021
- Sawaya MR, Sambashivn S, Nelson R, Ivsona MI, Sievers SA, Apostol MI, Thompson MJ, Balbirnie M, Wiltzius JJW, McFarlane HT, Madsen AØ, Riekel C, Eisenberg D. (2007). Atomic structures of amyloid cross- $\beta$  spines reveal varied steric zippers. *Nature*, **447**, 453-457. DOI: 10.1038/nature05695
- Sachsenhauser V, Deng X, Kim H, Jankovic M, Bardwell JCA. (2020). Yeast tripartite biosensors sensitive to protein stability and aggregation propensity. *ACS Chem. Biol.*, **15**, 1078-1088. DOI: 10.1021/acscchembio.0c00083
- Serpell LC, Berriman J, Jakes R, Goedert M, Crowther RA. (2000). Fiber diffraction of synthetic alpha-synuclein filaments shows amyloid-like cross-beta conformation. *P. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 4897-4902. DOI: 10.1073/pnas.97.9.4897
- Sharma R, Raduly Z, Miskei M, Fuxreiter M. (2015). Fuzzy complexes: specific binding without complete folding. *FEBS Lett.*, **589**, 2533-2542. DOI: 10.1016/j.febslet.2015.07.022
- Shen SY, Yang DY, Selzle HL, Schlag EW. (2003). Energetics of hydrogen bonds in peptides. *P. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 12683-12687. DOI: 10.1073/pnas.2133366100
- Shiro G, Fichou Y, Gallat FX, Wood K, Gabel F, Moulin M, Härtlein M, Heyden M, Colletier JP, Orecchini A, Paciaroni A, Wuttke J, Tobias DJ, Weik M. (2015). Translational diffusion of hydration water correlates with functional motions in folded and intrinsically disordered proteins. *Nat. Commun.*, **6**, 6490. DOI: 10.1038/ncomms7490
- Shults CW, Barrett JM, Fontaine D. (2006).  $\alpha$ -Synuclein from platelets is not phosphorylated at serine 129 in Parkinson's disease and multiple system atrophy. *Neurosci. Lett.*, **405**, 223-225. DOI: 10.1016/j.neulet.2006.07.006
- Slichter CP. (1990). Principles of magnetic resonance. Harmadik, kibővített és korszerűsített kiadás. Springer Series in Solid-State Sciences 1. kötet, Springer Verlag Berlin Heidelberg. 213. oldal. DOI 10.1007/978-3-662-09441-9
- Sluchanko NN, Bustos DM. (2019). Chapter Two - Intrinsic disorder associated with 14-3-3 proteins and their partners. *Prog. Mol. Biol. Transl.*, **166**, 19-61. DOI: 10.1016/bs.pmbts.2019.03.007
- Smith JC. (1991). Protein dynamics: comparison of simulations with inelastic neutron scattering experiments. *Q. Rev. Biophys.*, **24**, 227-291. DOI: 10.1017/s0033583500003723

- Sosne G, Qiu, P, Goldstein AL, Wheeler M. (2010). Biological activities of thymosin- $\beta_4$  defined by active sites in short peptide sequences. *FASEB J.*, **24**, 2144-2151. DOI: 10.1096/fj.09142307
- Spillantini MG, Goedert M. (1998). Tau protein pathology in neurodegenerative diseases. *Trends Neurosci.*, **21**, 428-433. DOI: 10.1016/s0166-2236(98)01337-x
- Spillantini MG, Schmidt ML, Lee VM, Trojanowski JQ, Jakes R, Goedert M. (1997). Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature*, **388**, 839-840. DOI: 10.1038/42166
- Sung YH, Eliezer D. (2018). Structure and dynamics of the extended-helix state of alpha-synuclein: Intrinsic lability of the linker region. *Protein Sci.* **27**,1314-1324. DOI: 10.1002/pro.3426
- Szöllősi E, Bokor M, Bodor A, Perczel A, Klement É, Medzihradszky 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. DOI: 10.1021/pr700720c
- Tanaka M, Kim YM, Lee G, Junn E, Iwatsubo T, Mouradian MM. (2004). Aggresomes formed by  $\alpha$ -synuclein and synphilin-1 are cytoprotective. *J. Biol. Chem.*, **279**, 4625-4631. DOI: 10.1074/jbc.M310994200
- Tantos A, Szabo B, Lang A, Varga Z, Tsylonok M, Bokor M, Verebelyi T, Kamasa P, Tompa K, Perczel A, Buday L, Lee SH, Choo Y, Han KH, Tompa P. (2013). Multiple fuzzy interactions in the moonlighting function of thymosin- $\beta_4$ . *Intrinsically Disordered Proteins*, **1**, e26204. DOI: 10.4161/idp.26204
- Taricska N, Bokor M, Menyhárd D, Tompa K, Perczel A. (2019). Hydration shell differentiates folded and disordered states of a Trp-cage miniprotein, allowing characterization of structural heterogeneity by wide-line NMR measurements. *Sci. Rep.*, **9**, 2947. DOI: 10.1038/s41598019-39121-5
- Theillet FX, Binolfi A, Bekei B, Martorana A, May Rose H, Stuiwer M, Verzini S, Lorenz D, van Rossum M, Goldfarb D, Selenko P. (2016). Structural disorder of monomeric  $\alpha$ -synuclein persists in mammalian cells. *Nature*, **530**, 45–50. DOI: 10.1038/nature16531
- Tompa K, Bánki P, Bokor M, Kamasa P, Lasanda G, Tompa P. (2009). Interfacial water at protein surfaces: wide-line NMR and DSC characterization of hydration in ubiquitin solutions. *Biophys. J.*, **96**, 2789-2798. DOI: 10.1016/j.bpj.2008.11.038 98
- Tompa K, Bánki P, Bokor M, Kamasa P, Rácz P, Tompa P. (2010a). Hydration water/interfacial water in crystalline lens. *Exp. Eye Res.*, **91**, 76-84. DOI: 10.106/j.exer.2010.04.005
- Tompa K, Bokor M, Tompa P. (2010b). Chapter 12. Hydration of intrinsically disordered proteins from wide-line NMR. Könyvben: Instrumental Analysis of Intrinsically Disordered Proteins: Assessing Structure and Conformation. Wiley Series in Protein and Peptide Science (Szerk.: Uversky VN, Longhi S.) John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, 345-368. oldal. DOI: 10.1002/9780470602614.ch12
- Tompa K, Bokor M, Ágner D, Iván D, Kovács D, Verebelyi T, Tompa P. (2017). Hydrogen mobility and protein-water interactions in proteins in the solid state. *ChemPhysChem*, **18**, 677682. DOI: 10.1002/cphc.201601136
- Tompa K, Bokor M, Han KH, Tompa P. (2013). Hydrogen skeleton, mobility and protein architecture. *Intrinsically Disordered Proteins*. **1**, e25767. DOI: 10.4161/idp.25767

- Tompa K, Bokor M, Tompa P. (2012). Chapter 13. Wide-line NMR and protein hydration. Könyvben: *Methods and Experimental Tools – Methods in Molecular Biology* (Szerk.: Uversky VN, Dunker AK.) Humana Press Inc., **895**, 167-196. oldal. DOI: 10.1007/978-1-61779-927-3\_13aa
- Tompa K, Bokor M, Tompa P. (2018). The melting diagram of protein solutions and its thermodynamic interpretation. *Int. J. Mol. Sci.*, **19**, 3571. DOI: 10.3390/ijms19113571
- Tompa K, Bokor M, Tompa P. (2019). Globuláris szerkezetű fehérjék vizes oldatainak olvadási diagramja és termodinamikai értelmezésük. *Magyar Kémia Folyóirat*, **125**, 147-155. DOI: 10.24100/MKF.2019.04.147
- Tompa K, Bokor M, Verebélyi T, Tompa P. (2015). Water rotation barriers on protein molecular surfaces. *Chem. Phys.*, **448**, 15-25. DOI: 10.1016/j.chemphys.2014.12.008
- Tompa P. (2002). Intrinsically unstructured proteins. *Trends Biochem. Sci.*, **27**, 527-533. DOI: 10.1016/S0968-0004(02)02169-2
- Tompa P. (2009). Structural disorder in amyloid fibrils: its implication in dynamic interactions of proteins. *FEBS J.*, **276**, 5406-5415. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2009.07250.x
- Tompa P. Structure and function of intrinsically disordered proteins. CRC Press, (2010). ISBN: 9781420078923
- Tompa P, Bánki P, Bokor M, Kamasa P, Kovács D, Lasanda G, Tompa K. (2006). Protein-water and protein-buffer interactions in the aqueous solution of an intrinsically unstructured plant dehydrin: NMR intensity and DSC aspects. *Biophys. J.*, **91**, 2243-2249. DOI: 10.1529/biophysj.106.084723
- Tompa P, Fuxreiter M. (2008). Fuzzy complexes: polymorphism and structural disorder in protein-protein energiát egyenlőnek tekintjükinteractions. *Trends Biochem. Sci.*, **33**, 2-8. DOI: 10.1016/j.tibs.2007.10.003
- Tompa P, Han KH, Bokor M, Kamasa P, Tantos Á, Fritz B, Kim DH, Lee C, Verebélyi T, Tompa K. (2016). Wide-line NMR and DSC studies on intrinsically disordered p53 transactivation domain and its helically pre-structured segment. *BMB Rep.*, **49**, 497-501. DOI: 10.5483/BMBRep.2016.49.9.037
- Tompa P, Szász C, Buday L. (2005). Structural disorder throws new light on moonlighting. *Trends Biochem. Sci.*, **30**, 484-489. DOI: 10.1016/j.tibs.2005.07.008
- Tuttle MD, Comellas G, Nieuwkoop AJ, Covell DJ, Berthold DA, Kloepper KD, Courtney JM, Kim JK, Barclay AM, Kendall A, Wan W. (2016). Solid-state NMR structure of a pathogenic fibril of full-length human  $\alpha$ -synuclein. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **23**, 409-415. DOI: 10.1038/nsmb.3194
- Uversky VN. (2002). Natively unfolded proteins: a point where biology waits for physics. *Protein Sci.*, **11**, 739-756. DOI: 10.1110/ps.4210102
- Uversky VN. (2013). Unusual biophysics of intrinsically disordered proteins. *Biochim. Biophys. Acta*, **1834**, 932-951. DOI: 10.1016/j.bbapap.2012.12.008
- Uversky VN. (2019). Intrinsically Disordered Proteins and Their “Mysterious” (Meta)Physics. *Front. Phys.*, **7**, article 10. DOI: 10.3389/fphy.2019.00010
- Uversky VN, Dunker AK. (2010). Understanding protein nonfolding. *Biochim. Biophys. Acta*, **1804**, 1231-1264. DOI: 10.1016/j.bbapap.2010.01.017

- Uversky VN, Oldfield CJ, Dunker AK. (2008). Intrinsically disordered proteins in human diseases: introducing the D2 concept. *Annu. Rev. Biophys.*, **37**, 215-246. DOI: 10.1146/annurev.biophys.37.032807.125924
- van der Lee R, Buljan M, Lang B, Weatheritt RJ, Daughdrill GW, Dunker AK, Fuxreiter M, Gough J, Gsponer J, Jones DT, Kim PM, Kriwacki RW, Oldfield CJ, Pappu RV, Tompa P, Uversky VN, Wright PE, Babu MM. (2014). Classification of intrinsically disordered regions and proteins. *Chem. Rev.*, **114**, 6589-6631. DOI: 10.1021/cr400525m
- van Raaij ME, Segers-Nolten IM, Subramaniam V. (2006). Quantitative morphological analysis reveals ultrastructural diversity of amyloid fibrils from  $\alpha$ -synuclein mutants. *Biophys. J.*, **91**, L96-L98. DOI: 10.1529/biophysj.106.090449
- van Troys M, Devitte D, Goethals M, Carlier MF, Vandekerckhove J, Ampe C. (1996). The actin binding site of thymosin beta 4 mapped by mutational analysis. *EMBO J.*, **15**, 201-210. DOI: 10.1002/j.1460-2075.1996.tb00350.x
- Varkey J, Isas JM, Mizuno N, Jensen MB, Bhatia VK, Jao CC, Petrova J, Voss JC, Stamou DG, Steven AC, Langen R. (2010). Membrane curvature induction and tubulation are common features of synucleins and apolipoproteins. *J Biol Chem.*, **285**, 32486-32493. DOI: 10.1074/jbc.M110.139576
- Vilar M, Chou H-T, Lührs T, Maji SK, Riek-Loher D, Verel R, Manning G, Stahlberg H, Riek R. (2008). The fold of  $\alpha$ -synuclein fibrils. *P. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 8637-8642. DOI: 10.1073/pnas.0712179105
- Vymětal J, Vondrášek J, Hlouchová. (2019). Sequence versus composition: what prescribes IDP biophysical properties? *Entropy*, **21**, 654. DOI: 10.3390/e21070654
- Wang W, Perovic I, Chittuluru J, Kaganovich A, Nguyen LTT, Liao J, Auclair JR, Johnson D, Landner A, Simorellis AK, Ju S, Cookson MR, Asturias FJ, Agar JN, Webb BN, Kang CH, Ringe D, Petsko GA, Pochapsky TC, Hoang QQ. (2011). A soluble  $\alpha$ -synuclein construct forms a dynamic tetramer. *P. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 17797-17802. DOI: 10.1073/pnas.1113260108
- Wang W, Wang D. (2019). Extreme Fuzziness: Direct Interactions between Two IDPs. *Biomolecules*, **9**, 81. DOI: 10.3390/biom9030081
- Watson JD, Baker TA, Bell SP, Gann A, Levine M, Losick R, Harrison SC. (2014). Molecular biology of the gene, 7. kiadás. Kiadó: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 121. oldal ISBN 13: 978-0-321-90264-1
- Waudby CA, Camilloni C, Fitzpatrick AWP, Cabrita LD, Dobson CM, Vendruscolo M, Christodoulou J. (2013). In-cell nmr characterization of the secondary structure populations of a disordered conformation of  $\alpha$ -synuclein within *E. coli* Cells. *PLoS ONE*, **8**, e72286. DOI: 10.1371/journal.pone.0072286
- Waugh JS, Fedin EI. (1962). *Fiz. Tverd. Tela* (Leningrad). **4**, 2233-2237. Angol fordítás: (1963). On the determination of hindered rotation barriers in solids. *Sov. Phys. Solid State*, **4**, 1633-1636.
- Ward JJ, McGulfin LJ, Bryson K, Buxton BF, Jones DT. (2004). The DISOPRED server for the prediction of protein disorder. *Bioinformatics*, **20**, 2138-2139. DOI: 10.1093/bioinformatics/bth195
- Webber, JBW. (2021). A review of the use of simple time-domain NMR/MRI for material-science. *SN Appéldául Sci.*, **3**, 809. DOI: 10.1007/s42452-021-04791-2

- Winner B, Jappeli R, Maji SK, Desplats PA, Boyer L, Aigner S, Hetzer C, Loher T, Vilar M, Campioni S, Tzitzilonis C, Soragni A, Jessberger S, Mira H, Consiglio A, Pham E, Masliah E, Gage FH, Riek R. (2011). In vivo demonstration that alpha-synuclein oligomers are toxic. *P. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 4194-4199. DOI: 10.1073/pnas.1100976108
- Wise-Scira O, Aloglu AK, Dunn A, Sakallioğlu IT, Coskuner O. (2013a). Structures and free energy landscapes of the wild-type and A30P mutant-type  $\alpha$ -synuclein proteins with dynamics. *ACS Chem. Neurosci.*, **4**, 486–497. DOI: 10.1021/cn300198q
- Wise-Scira O, Dunn A, Aloglu AK, Sakallioğlu IT, Coskuner O. (2013b). Structures of the E46K mutant-type  $\alpha$ -synuclein protein and impact of E46K mutation on the structures of the wildtype  $\alpha$ -synuclein protein. *ACS Chem. Neurosci.*, **4**, 498-508. DOI: 10.1021/cn3002027
- Wright, PE, Dyson HJ. (1999). Intrinsically unstructured proteins: re-assessing the protein structure-function paradigm. *J Mol. Biol.*, **293**, 321-331. DOI: 10.1006/jmbi.1999.3110
- Yoo JM, Lin Y, Heo Y, Lee YH. (2022). Polymorphism in alpha-synuclein oligomers and its implications in toxicity under disease conditions. *Front. Mol. Biosci.*, **12**, 959425. DOI: 10.3389/fmolb.2022.959425
- Zarbock J, Oschkinat H, Hannappel E, Kalbacher H, Voelter W, Holak TA. (1990). Solution conformation of thymosin  $\beta_4$ : a nuclear magnetic resonance and simulated annealing study. *Biochemistry*, **29**, 7814-7821. DOI: 10.1021/bi00486a006
- Zarranz JJ, Alegre J, Gómez-Esteban JC, Lezcano E, Ros R, Ampuero I, Vidal L, Hoenicka J, Rodriguez O, Atarés B, Llorens V, Gomez Tortosa E, del Ser T, Muñoz DG, Yébenes JG. (2004). The new mutation, E46K, of  $\alpha$ -synuclein causes parkinson and Lewy body dementia. *Ann. Neurol.*, **55**, 164-173. DOI: 10.1002/ana.10795
- Zhang Y, Hashemi M, Lv Z, Williams B, Popov KI, Dokholyan NV, Lyubchenko YL. (2018). High-speed atomic force microscopy reveals structural dynamics of  $\alpha$ -synuclein monomers and dimers. *J. Chem. Phys.*, **148**, 123322. DOI: 10.1063/1.5008874