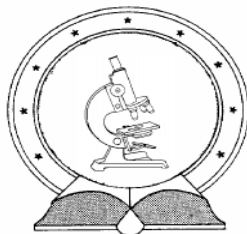


DE TTK



1949

**A *PENICILLIUM* ANTIFUNGÁLIS FEHÉRJE
SZERKEZETÉNEK, DINAMIKÁJÁNAK, HŐMÉRSÉKLETI
KITEKEREDÉSÉNEK ÉS REJTETT KONFORMÁCIÓINAK
VIZSGÁLATA**

Egyetemi doktori (PhD) értekezés

a szerző neve: Fizil Ádám

témavezető neve: Dr. Batta Gyula, egyetemi tanár

DEBRECENI EGYETEM

Természettudományi és Informatikai Doktori Tanács

Kémia Doktori Iskola

Debrecen, 2018

Ezen értekezést a Debreceni Egyetem Természettudományi Doktori Tanács Kémia Doktori Iskola Szénhidrátok és Heterociklusok Kémiája és Kémiai Biológiája programja keretében készítettem a Debreceni Egyetem természettudományi doktori (PhD) fokozatának elnyerése céljából. Nyilatkozom arról, hogy a tézisekben leírt eredmények nem képezik más PhD disszertáció részét.

Debrecen, 2018. . .

a jelölt aláírása

Tanúsítom, hogy Fizil Ádám doktorjelölt 2011. - 2014. között a fent megnevezett Doktori Iskola Szénhidrátok és Heterociklusok Kémiája és Kémiai Biológiája programjának keretében irányításommal végezte munkáját. Az értekezésben foglalt eredményekhez a jelölt önálló alkotó tevékenységével meghatározóan hozzájárult. Nyilatkozom továbbá arról, hogy a tézisekben leírt eredmények nem képezik más PhD disszertáció részét. Az értekezés elfogadását javasolom.

Debrecen, 2018. . .

a témavezető aláírása

**A *PENICILLIUM* ANTIFUNGÁLIS FEHÉRJE SZERKEZETÉNEK,
DINAMIKÁJÁNAK, HŐMÉRSÉKLETI KITEKEREDÉSÉNEK ÉS
REJTETT KONFORMÁCIÓINAK VIZSGÁLATA**

Értekezés a doktori (Ph.D.) fokozat megszerzése érdekében
a kémia tudományágban

Írta: Fizil Ádám okleveles biológus

Készült a Debreceni Egyetem Kémia Doktori Iskolája
(szénhidrátok és heterociklusok kémiája és biológiája programja) keretében

Témavezető: Dr. Batta Gyula, egyetemi tanár

A doktori szigorlati bizottság:

elnök:	Dr. Bányai István.....
tagok:	Dr. E. Kövér Katalin.....
	Dr. Bodor Andrea.....

A doktori szigorlat időpontja: 2017. 06. 08.

Az értekezés bírálói:

Dr.
Dr.
Dr.

A bírálóbizottság:

elnök:	Dr.
tagok:	Dr.
	Dr.
	Dr.
	Dr.

Az értekezés védésének időpontja: 2018. . . .

Köszönetnyilvánítás

Ugyan egy disszertációnak csak egyetlen szerzője lehet, az abban foglalt tudományos eredmények kizárólag csapatmunka eredményeként születhetnek meg. Ezért szeretnék köszönetet mondani mindazoknak, akik valamilyen formában hozzájárultak ehhez. Az alábbiakban név szerint is szeretném felsorolni azokat, akiknek hozzájárulása kiemelkedő volt.

Köszönettel tartozom témavezetőmnek, Dr. Batta Gyulának, amiért megmutatta, mennyi izgalmat tartogat a tudományos kutatás. Nyolc évig tartó közös munkánk során többször is bebizonyította nekem, hogy a triviálisnak tűnő állítások mögött is végtelen mélységek húzódnak, és hogy az alap kutatásokban minden egyes megválaszolt tudományos kérdés legalább három újabbat vet fel. Különösen hálás vagyok neki azért, amiért munkám irányítása mellett bőséges teret adott saját ötleteim kidolgozására. Ennek természetes következményeként jutottam legértékesebb tapasztalataim birtokába, ugyanis saját hibáimból tanulhattam. Köszönet illeti Dr. Florentine Marx-Ladurner professzor asszonyt folyamatos szakmai és baráti támogatásáért, és hogy kutatócsoportjaink együttműködését mindvégig ugyanolyan fontosnak tartotta, mint mi. Az ő segítségével nélkül a munkám során vizsgált molekulákat nem tudtuk volna előállítani. Innsbrucki laboratóriumában töltött fél év során nem csak a molekuláris biológia és a biotechnológia, hanem a tudományos kommunikáció terén is rengeteget fejlődtem általa. Köszönöm Dr. Gáspári Zoltánnak az együttműködéseinkben nyújtott kivételes lelkesedését, és hogy a szerkezeti bioinformatika területén nem csak tárgyi tudását, hanem végtelenül alapos és szkeptikus szemléletét is átadta. Köszönöm Dr. Váradi Györgyinek és Dr. Kele Zoltánnak, hogy szintetikus és analitikai munkájukkal perdöntő bizonyítékokkal szolgáltak korábban eldönthetetlen kérdésekre, és Dr. Galgóczy Lászlónak a fehérjetermeltetéssel kapcsolatos hasznos tanácsait. Köszönöm Dr. Barna Teréznek és Dr. Gyémánt Gyöngyinek hogy rendelkezésemre bocsátották laboratóriumi eszközeiket, és hogy ötleteikkel segítették a kutatást. Köszönöm Dr. Bodor Andreának a 700 MHz-es NOESY spektrumok felvételében nyújtott segítségét és Dr. Rohonczy Jánosnak a háromhelyű csere szimulációk megvalósítását.

A különböző laboratóriumokban töltött idő során azt tapasztaltam, hogy kezdő kutatóként a legértékesebb gyakorlati tudást a technikus kollégáktól lehet ellesni. Ezért szeretném megköszönni Balla Sárának (DE, Szerves Kémiai Tanszék), Lakatos Zoltánné Icának (DE, Genetika és Alkalmazott

Mikrobiológiai Tanszék) és Doris Bratshun-Khannak (Innsbruck Medical University, Division of Molecular Biology), hogy kérdéseimmel mindig fordulhattam hozzájuk. Szeretném megköszönni a debreceni NMR laboratórium minden tagjának együttműködését, támogatását és azt a derűs atmoszférát amivel jelentősen megkönnyítették a munkát. Közülük is külön köszönöm Dr. E. Kövér Katalinnak a szakmai beszélgetéseket, és hogy a csoport összetartását kiváló szociális programok szervezésével segítette elő. Köszönet illeti egyetemi és uszodai barátaimat, első sorban Nagy Katát, Úri Katalint, Nyitrai Balázst, Váradi Csabát, Timári Istvánt és Lehoczki Gábort. A közös ebédek és kávézások gyakran átlendítettek a holtpontra, ugyanerre a célra a Debreceni Szenior Úszóklub esti edzései is kiváló eszköznek bizonyultak.

Köszönöm a Nemzeti Kiválóság Programnak (TÁMOP 4.2.4.A/1-11-1-2012-0001), az OTKA-FWF (OTKA-ANN-110821), és a GINOP-2.3.2-15-2016-00008 pályázatoknak az anyagi támogatást.

Végül szeretném megköszönni családomnak, elsősorban feleségemnek, Fizilné Nyitrai Mónikának a rengeteg biztatást és szeretetet.

Tartalomjegyzék

Rövidítések és jelölések jegyzéke.....	1
I. Bevezetés és célkitűzések.....	3
II. Irodalmi előzmények.....	8
II. 1. Mikrobiális gombafertőzések jelentősége és a jelenleg elérhető antifungális hatóanyagok.....	8
II. 2. Új antifungális stratégiák.....	11
II. 2. 1. Új stratégiák az antifungális terápiában.....	11
II. 2. 2. Az antimikrobiális peptidek.....	12
II. 2. 3. Antifungális hatású fehérjék.....	13
II. 2. 4. A <i>Penicillium</i> antifungális fehérje működése és szerkezete.....	14
II. 3. A fehérjék hőmérsékletváltozás hatására történő kitekeredése.....	17
II. 4. Fehérjék szerkezetvizsgálata NMR spektroszkópiával.....	21
II. 4. 1. A harmadlagos szerkezet meglétének vizsgálata: ¹ H NMR.....	22
II. 4. 2. Fehérjék NMR jelhozzárendelése.....	23
II. 4. 3. H-H távolságok meghatározása NOESY módszerekkel.....	29
II. 4. 4. Fehérjék szerkezetének modellezése NMR mérésekből származó paraméterek alapján.....	33
II. 4. 5. Fehérjedinamika vizsgálata ¹⁵ N-relaxáció mérésével.....	37
II. 4. 6. Lassú konformációs csere vizsgálata: CEST-NMR.....	40
II. 4. 7. Fehérje-oldószer cserefolyamatok vizsgálata: CLEANEX-NMR.....	42
III. Anyagok és módszerek.....	43
III. 1. A vizsgált anyagok előállítása.....	43
III. 1. 1. Biotechnológiai úton előállított PAF változatok.....	43
III. 1. 2. Kémiai szintézissel előállított PAF.....	46
III. 1. 3. Szelektív ¹⁵ N jelöléssel ellátott tetrapeptid.....	46
III. 2. Az alkalmazott NMR módszerek.....	47
III. 2. 1. ¹ H NMR.....	47
III. 2. 2. Jelhozzárendelés és szerkezeti paraméterek gyűjtése.....	47
III. 2. 3. Fehérjedinamika vizsgálata.....	48
III. 2. 4. Cserefolyamatok vizsgálata.....	49
III. 2. 5. A hőmérsékletváltozás hatására történő konformációs változások követése.....	50
III. 2. 6. Fehérjék és peptidek mennyiségi analízise.....	53
III. 2. 7. Műszerek, mérési körülmények és szoftverek.....	54
IV. Eredmények és értékelésük.....	56
IV. 1. A PAF de novo térszerkezet-meghatározása.....	56
IV. 1. 1. A PAF ¹³ C- ¹⁵ N- ¹ H NMR jelhozzárendelése.....	56
IV. 1. 2. A PAF diszulfidhíd mintázatának meghatározása.....	58
IV. 1. 3. A PAF térszerkezetének modellezése távolság-, diszulfid- és torziós szög-jellegű kényszerfeltételek figyelembevételével.....	62

IV. 2. Hőmérsékletváltozás hatására történő konformációs változások vizsgálata a PAF-ban.....	68
IV. 2. 1. A PAF részleges kitekeredése magas és alacsony hőmérsékleten.....	68
IV. 2. 2. A hőmérséklettől függő HSQC spektrumok értelmezése.....	69
IV. 2. 3. A PAF kitekeredésének termodinamikai modellezése.....	74
IV. 2. 4. A rejtett konformációk jellemzése.....	81
IV. 2. 6. A rejtett cserepartnernek jelentősége az NMR-alapú szerkezetmodellezésben és a fehérjeanalitikában.....	87
IV. 3. A rejtett konformációk lehetséges szerepe a biológiai funkcióban: a PAF ^{D19S} szerkezetének, dinamikájának és rejtett konformációinak vizsgálata.....	88
V. Összefoglalás.....	99
V. Summary.....	101
Irodalomjegyzék.....	104
VI. Függelék.....	119
VI. 1. Tudományos publikációk.....	119
VI. 1. 1. Az értekezés témájához szorosan kapcsolódó, nemzetközi folyóiratban megjelent publikációk.....	119
VI. 1. 2. Az értekezés témájához szorosan nem kapcsolódó, nemzetközi folyóiratokban megjelent publikációk.....	119
VI. 1. 3. Magyar nyelven megjelent publikációk.....	120
VI. 2. Konferencián bemutatott poszterek.....	120
VI. 3. Konferencián bemutatott előadások.....	121

Rövidítések és jelölések jegyzéke

1D, 2D...	egydimenziós, kétdimenziós, stb.
Å	Ångström, atomi távolságok mérésére szolgáló mértékegység. $1 \text{ Å} = 10^{-10}$ méter
ABC ^{X12Y}	Pontmutációk általános jelölésmódja: „ABC” fehérje 12. pozíciójában álló „X” egységét „Y” helyettesíti
AFP	<i>Aspergillus giganteus</i> által termelt antifungális fehérje ¹
AMP	antimikrobiális peptid
ARIA	Ambiguous Restraints for Iterative Assignments: NOESY NMR spektrumok automatikus jelhozzárendelést végző algoritmus betűszavas elnevezése
ATNOS	Automated NOESY peak picking: egy csúcslisztázó algoritmus betűszavas elnevezése
C'	karbonil szénatom
C _α , C _β , stb...	peptidek, fehérjék alfa, béta, stb. pozíciójú szénatomja
CANDID	Combined Automated NOE Assignment and Structure Determination Module: algoritmus automatikus NOESY jelhozzárendelésre
CEST	Chemical Exchange Saturation Transfer, kémiai csere telítésátvitel
CLEANEX	CLEAN chemical exchange, tiszta kémiai csere (NMR spektroszkópiai módszer)
COSY	correlation spectroscopy, korrelációs spektroszkópiai módszerek gyűjtőneve, mellyel 2-3 skaláris csatolásra lévő homonukleáris atomok rendelhetők egymáshoz
CYANA	Combined Assignment and Dynamics Algorithm for NMR Applications: NMR adatokat alkalmazó molekuladinamikai programcsomag betűszavas elnevezése
Da	Dalton, atomi tömegegység
H ^N	amidcsoport hidrogénatomja
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Correlation: NMR spektroszkópiai módszer(ek), mellyel egymástól egy kötés távolságra lévő heteroatomok rendelhetők egymáshoz
MD	Molekuladinamika

MS	tömegspektrometria
ms	milliszekundum
MWCO	Molecular Weight Cutoff, molekulatömeg szerint vett határ: a molekulaméret szerinti elválasztáshoz használt dialízismembránok jellemző paramétere
N ^H	amidcsoport nitrogénatomja
NMR	mágneses magrezonancia
NOE	Nuclear Overhauser Effect (mag Overhauser hatás)
NOESY	Nuclear Overhauser Effect spektroszkópia
ns	nanoszekundum
PAF	<i>Penicillium chrysogenum</i> által termelt antifungális fehérje ²
ppm / ppb	parts per million / ~ billion, milliomod, ill. milliárdod rész
ps	pikoszekundum
RMSD	Root Mean Square Deviation, átlagos eltérés négyzetösszegek négyzetgyöke
TOCSY	total correlation spectroscopy, teljes korrelációs spektroszkópia módszerek gyűjtőneve mellyel egy adott spinrendszer elemei rendelhetők egymáshoz

I. Bevezetés és célkitűzések

Arra a kérdésre, hogy milyen az ideális gyógyszermolekula, a tünetegyüttestől és a kezelés módjától függően igen sokféle választ kaphatunk. Annyi bizonyos, hogy az adott esetben támasztott kritériumok az alábbi tulajdonságok valamilyen kombinációját fogják alkotni: specifikusság, a célmolekulához való megfelelő kötődési affinitás, megfelelő oldhatóság, stabilitás és biztonságosság. Ipari szempontból továbbá az anyagi megtérülés is fontos kritérium: a termék előállítása legyen megtérülő és az előírásoknak megfelelően reprodukálható. A biztonságosság érdekében szigorú hatósági előírások követelik meg, hogy maga a termék és a gyártási folyamat minden lépése jól követhető legyen a rendelkezésre álló analitikai eszközökkel.³

Az utóbbi szempontnak a kémiai szintézissel gyártott, hagyományos ún. „kismolekulás” (kisebb, mint 2000 Da tömegű) hatóanyagok az esetek többségében igen jól megfelelnek, azonban gyakran nem tesznek eleget elegendő mértékben a specifikusság és megfelelő affinitás kritériumának. A gyógyszeriparban az elmúlt évtizedekben egyre nagyobb teret hódítottak a biológiai úton előállított terápiás célokra alkalmas molekulák, más néven biologikumok, melyek között nagy arányban találhatók igen nagy molekulatömegű hatóanyagok is. Ide sorolhatók a már régebb óta használatban lévő hormonok, növekedési faktorok és polipeptidek. Az újabb hatóanyagok között pedig már szép számmal találhatunk igen összetett molekulákat például monoklonális antitesteket, melyek fehérjealapú gyógyszerek csoportjába tartoznak. Ezek a hatóanyagok a természetben betöltött szerepüknél fogva nagyon specifikus hatású, ugyanakkor sok esetben nem kimondottan stabil molekulák, melyeknek molekulaszervezete a hagyományos gyógyszerekéhez viszonyítva rendkívül komplex.⁴ Ez a kismolekulákhoz viszonyított nagymértékű szerkezeti komplexitás és heterogenitás, illetve bizonyos esetekben kisebb fokú stabilitás új kihívások elé állítja az analitikai tudományokat. A biotechnológiai úton előállított gyógyszerek gyors fejlesztése és biztonságos gyógyszerek előállításának érdekében az alkalmazott analitikai eljárásoknak lépést kell tartania azokkal a kritériumokkal, melyeket a hatóságok a biologikumokkal szemben követelnek. Ez nem csupán azt jelenti, hogy az analitikai módszereink teljesítőképességét kell megnövelnünk nagyobb információtartalmat, gyors és megbízható adatfeldolgozást nyújtó módszerek kifejlesztésével. A fehérjegyógyszerek térhódításával a szerkezetkutatás területén szemléletbeli átalakulás is folyamatban van, ami érinti mind a szabályozást (például két készítmény azonossági kritériumainak

megfogalmazását⁵), mind az alkalmazott analitikai módszerek az adott problémának megfelelő használatát, figyelembe véve az adott analitikai módszer erősségeit és korlátait.⁶

Az alap kutatások szintjén a biológiai tudományokban, azon belül is a szerkezeti biológia területén ez a szemléletváltás már régóta folyamatban van. Azok a kutatók, akik a fehérjeszerkezetek biológiai funkcióval való kapcsolata iránt érdeklődnek, már régen felismerték a kis- és makromolekulák közötti fundamentális különbségeket. Amíg egy kismolekulás készítmény fő komponensének, polimorf módosulatainak, szennyezőinek és metabolitjainak szerkezetmeghatározása az esetek nagy hányadában néhány napos „rutin műveletnek” tekinthető a jelenleg elérhető analitikai eszközökkel (ami közel sem jelenti azt hogy nem igényel tekintélyes analitikai háttérrel és komoly intellektuális kihívást), addig akár egy kisebb méretű (5-10 kDa) fehérje szerkezetének felderítése több hónapos munkát és jelentős anyagi ráfordítást jelenthet, még a legmodernebb analitikai módszerek használata mellett is. Két fehérje primer aminosav szekvencia azonossága ugyanis közel sem jelent feltétlenül szerkezeti azonosságot is. Ennek egyik oka például a poszttranszlációs módosítások széles skálája. A poszttranszlációs módosítások és azok heterogenitása miatt egy fehérjekészítmény soha nem annyira homogén az azt tartalmazó molekulák szerkezetét tekintve, mint egy kismolekula.⁷ Ami talán ennél is érdekesebb a makromolekulákkal kapcsolatban az az, hogy a méret növekedésével nem csupán a lehetséges konstitúciók és konfigurációk száma növekszik nagyságrendekkel, hanem a molekuláris mozgások során létrejövő egymástól olykor jelentősen eltérő konformációk lehetséges száma is, melyek az időskálák nagyon széles tartományában alakulhatnak át egymásba. A fehérjék dinamikus tulajdonsága egy sor – a kismolekulákhoz képest – új paraméter felderítését teszi szükségessé, ugyanis a belső mozgás jelentős szerepet tölt be a fehérjék működésében. Az utóbbi években egyre több, már régóta ismert és kutatott fehérjéről derült ki, hogy finom biokémiai szabályozottsága mögött látványosan nagy mértékű konformációváltozások, például allosztérikus szerkezetváltozási mechanizmusok állnak. Klasszikus példa erre a hemoglobin O₂-kötésének allosztérikus szabályozottsága. Ennél valamivel újabb felfedezés, hogy a glikolízis első lépését katalizáló glükokináz enzim működése is allosztérikusan szabályozott⁸. Ugyanakkor nem csak a szubsztrátkötődés hatására megfigyelhető fehérjemozgások fontosak: sok esetben a szabad állapotú fehérje belső dinamikus folyamatai is jelentősek lehetnek, melynek a funkcionális natív szerkezet

kialakulásában és biológiai funkció mechanizmusában is kritikus szerepe van; a szakirodalomban mindkét esetre egyre több példát találhatunk.⁹⁻¹¹ Legfrissebb példaként érdemes megemlíteni az eukarióták fehérjefoszforiláció szabályozásának egyik központi elemét a protein kináz A-t. E fehérje oldatbeli szerkezetének részletes vizsgálata révén nemrégiben derült fény arra¹², hogy a fehérje működéséhez elengedhetetlen, hogy saját belső mozgásai révén egymástól olyan jelentősen eltérő konformációkat vegyen fel, melyek egyenként lehetővé teszik a különböző ligandumokhoz való kötődést, vagyis ez a rendszer jó példa a konformációs szelekció szubsztrátkötődési modelljére.

Disszertációmban egy kisméretű antifungális (gomba ellenes) hatású fehérje példáján keresztül azt szeretném bemutatni, hogy már a fehérjék mérettartományának alsó határán is komoly szerkezetkutatósi kihívások merülhetnek fel. Kutatásaink rámutattak, hogy a makromolekulák viszonylatában egyszerűbbnek vélt rendszerek esetében is meglepően változatos konformációs sokaság alakulhat ki, már a fehérje natív állapotában, szobahőmérsékleten is. Vizsgálataim tárgya egy a *Penicillium chrysogenum* fonalas mikroorganizmus által termelt fehérje (röviden PAF), mely figyelemre méltó antimikrobiális aktivitással és nagyfokú stabilitással bír, emellett az emlős szervezetre nincs toxikus hatása¹³, ezért potenciális biológiai úton termelt gyógyszermolekulaként tartjuk számon. A PAF fehérje kis mérete, előállításának jól megalapozott módszerei és szinte korlátlan vízdoldhatósága miatt a szerkezeti biológiai alap kutatások és spektroszkópiai módszerfejlesztés kiváló modell molekulájának bizonyult^{14,15}. Kutatásaim során a mágneses magrezonancia spektroszkópiai (NMR) technikák széles körét alkalmaztam a PAF oldatbeli térszerkezetének jellemzésére, belső molekuláris mozgásainak és – a hagyományos NMR módszerekkel nem detektálható – konformációs állapotainak modellezésére.

A PAF oldatfázisú térszerkezetét csoportunk 2009-ben közölte¹⁶. Az ebben a publikációban javasolt térszerkezet azonban számos kérdést vetett fel, ami további vizsgálatokra adott okot. Alapszakos hallgatóként ebben az időben kapcsolódtam a kutatásba. Doktori munkám kezdetekor azt a célt tűztem ki, hogy megválaszoljam a korábbi munka kapcsán felmerült (és a kutatás későbbi fázisában felmerülő) kérdéseket. Célkitűzéseimet az alábbi pontokban foglalom össze:

1. A PAF 2009-ben közölt oldatfázisú térszerkezeté¹⁶ esetében a diszulfidhidak kapcsolódási sorrendje tisztázatlan maradt, mert azt akkor sem a rendelkezésre álló hidrogén-hidrogén távolság adatokból, sem tömegspektrometriai vizsgálatok alapján nem lehetett meghatározni. Munkám első

célkitűzése a ciszteinek kapcsolódási sorrendjének meghatározása volt, amit a molekuláris- és szerkezeti biológia eszközeivel terveztünk megvalósítani. Ebből a célból olyan módosított PAF változatok előállítását terveztük, melyekben a ciszteineket különböző pozíciókban egyenként és az egyik feltételezett mintázat szerint páronként is szerin aminosavra cseréljük. A diszulfidmintázat meghatározását követően – a diszulfidhidak mint szerkezetet meghatározó kovalens kötés jellegű korlátok, illetve újabb és a korábbinál több szerkezeti információt tartalmazó adatok figyelembe vételével – egy a korábbinál pontosabb térszerkezeti modellt kívántam meghatározni.

2. Jóval doktori munkám kezdete előtt egy a hidrogénhíd-hálózat felderítését célzó hőmérséklettől függő kísérletsorozatot végeztem a PAF fehérjével, melynek értékelése során különös dologra lettem figyelmes: a ^1H - ^{15}N -HSQC spektrum csúcsainak térfogati integráljai nem egyforma módon függenek a hőmérséklettől. Amit különösen érdekesnek találtam, hogy a különféle lefutású görbék típusait hozzá lehetett rendelni a fehérje másodlagos szerkezeti elemeihez. Munkám egyik fő célkitűzésévé az vált, hogy ezt a megfigyelést értelmezsem és további vizsgálatokkal terjesszem ki.

A PAF oldatfázisú szerkezetének ps-ns időskálán történő mozgási tulajdonságait már leírták ^{15}N -relaxációs mérések Lipari-Szabó analízisének segítségével¹⁶. Az így kapott S^2 rendparaméterek merev molekulaserkezetre utaltak a ps-ns időskálán, ez a megfigyelés a szekvencia hosszához viszonyított nagy számú (3) diszulfid híddal és a β -redős másodlagos szerkezettel is összhangban van. Ezzel azonban ellentmondásban állt, hogy hőmérséklettől függő kísérleteink arra utaltak, hogy más időskálákon ez a viszonylag merevnek gondolt szerkezet valószínűleg sokkal nagyobb fluktuációkat mutathat a vártnál: az NMR jelek térfogat-integrál értékeinek csökkenésének mértéke magas és alacsony hőmérsékleteken a fehérje „rejtett” konformációinak jelenlétére utalt.

Második célkitűzésem tehát az volt, hogy magyarázatot adjak a hőmérséklettől függő kísérletekből nyert térfogati integrál értékek szerkezet-specifikus változásaira, és ha lehetséges, jellemezsem az NMR módszer számára „láthatatlan” konformációs állapotokat, leírjam azok szerkezetét és a részleges kitekeredés termodinamikáját. Kvantitatív ^1H és ^1H - ^{15}N -HSQC NMR mérések segítségével azt kívántam meghatározni, hogy a fehérje natív állapotában az oldat vajon milyen arányban tartalmazza a konvencionális NMR módszerekkel megfigyelhető és a közvetlenül nem-megfigyelhető, rejtett állapotokat. Ezen kívül

vizsgálni szándékoztam a hőmérsékleti stressz hatására történő – de a diszulfid hidak által korlátozott – kitekeredési folyamat mechanizmusát.

3. Partnerünkkel együttműködésben a PAF számos olyan változatát állítottuk elő a fehérjét kódoló gén célzott mutációja és megfelelő rendszerben történő kifejeztetése révén, amelyekkel a fehérje egyes régióinak működésben és a térszerkezet kialakításában betöltött szerepét kívántuk vizsgálni. Az egy aminosav cserével létrehozott változatok között találtunk olyat is, mely – előzetes vizsgálataink alapján – az eredetivel azonos térszerkezettel rendelkezett, de antimikrobiális aktivitása gyakorlatilag megszűnt. Ezért célul tűztük ki e változat szerkezetének és dinamikájának jellemzését, és az eredeti fehérjével való összehasonlítását. Vizsgálatainkkal azt szándékoztunk felderíteni, hogy mely szerkezeti és dinamikai paraméterek megváltozása hozható összefüggésbe az antifungális hatás megszűnésével.

II. Irodalmi előzmények

Doktori értekezésem egy fehérje-alapú antifungális hatóanyag fejlesztéséhez kapcsolódik. Ugyan kutatásaim nem érintették az alkalmazás szintjét, a szerkezeti biológiai eredményeink szorosan kapcsolódnak a mikrobiológiai és élettani alapkutatásokhoz, azok értelmezését értékes információkkal támogatták.¹⁶⁻²¹ Ugyanez fordítva is igaz: a makromolekulák szerkezetének felderítése önmagában, a biológiai kontextus értelmezése nélkül meglehetősen öncélú tevékenység volna. Ezért az irodalmi bevezetőben a kutatás témájához közvetlenül kapcsolódó, ezidáig közölt tudományos eredményeken kívül, és a kutatómunkám során alkalmazott szerkezetvizsgálati módszerek ismertetése mellett röviden a kutatás biológiai motivációját is bemutatom.

II. 1. Mikrobiális gombafertőzések jelentősége és a jelenleg elérhető antifungális hatóanyagok

A mikrobiális fonalas gombák okozta fertőzések elhárítása a humán gyógyászatban, a mezőgazdaságban az élelmiszeriparban és kulturális örökségeink megóvásában is egyre nagyobb kihívást jelent. Ennek egyik legfőbb oka – az antibiotikumokhoz hasonlóan – a leggyakrabban használt antimikotikumokkal szemben kialakuló rezisztencia. A megfelelő készítmény kifejlesztésének másik jelentős akadálya pedig az a tény, hogy – akárcsak mi, emberek – a fonalas gombák is az eukarióta élőlények közé sorolhatók, ezért sejtfelépítésüket, bioszintetikus útvonalait és fiziológiájukat tekintve sokkal jobban hasonlítanak az emlős sejtek működésére, mint a prokarióta mikroorganizmusok, például a baktériumok. Új antifungális hatóanyagok kifejlesztése azért nagy kihívás, mert igen nehéz olyan célmolekulát találni amelynek gátlása révén a gombák növekedését megakadályozhatjuk, ám emlős sejtekben ugyanez a célmolekula nem, vagy más formában található meg, ezért a gyógyszer hatásos, ugyanakkor nem toxikus²².

Egészséges védekezőrendszerrel rendelkező egyéneknél létfontosságú szerveket megtámadó gombás fertőzés vagy szisztémás mikózis szinte soha nem fordul elő, ezért az antimikotikumok kutatása sokáig háttérbe szorult az antibakteriális és antivirális gyógyszerek fejlesztésével szemben²³. Az immunszuppresszív terápiák elterjedésével (melyeket pl. szervátültetés vagy autoimmun kórképek esetén alkalmaznak), illetve az immunhiányos állapottal járó betegségek (pl. AIDS, leukémia) megjelenésével azonban az emberben előforduló

súlyos gombás fertőzések száma is drámaian növekedett. Ennek következtében a hatásos, de biztonságos antifungális hatóanyagok fejlesztése iránt is megnőtt az igény²⁴. Ugyanakkor az emberi szervezetre nem csak maga a mikózis jelenthet veszélyt, hanem a gombák által termelt ún. mikotoxinok is (melyek például élelmiszerekben fordulhatnak elő), más esetekben pedig a gomba-eredetű fehérjékre adott allergiás reakciónak lehetnek súlyos következményei. Ezért az antifungális szerek fejlesztése nem korlátozódhat csupán a mikózisokban előforduló két leggyakoribb genus – a *Candida* és az *Aspergillus* – elleni hatóanyagokra. Az elérhető hatóanyagoknak le kell fednie a meglehetősen diverz gombavilág igen széles csoportját. A jelenleg elérhető antifungális stratégiákat érdemes a gombaszervezeten belüli támadáspont alapján csoportosítani.²²

A gombasejtek membránjának egyik fő alkotója az ergoszterol, ezért sok hatóanyag hatásmechanizmusa az ergoszterol bioszintézisének gátlásán alapszik, vagy az ergoszterolhoz irreverzibilisen kötődő anyag. Előbbiek közé tartoznak az azolok, például a széles spektrumú ketakonazol, vagy az első aspergillózis ellen használt szer, a itrakonazol, illetve a kandidiázis ellen gyakran alkalmazott fukonazol. Az azol típusú hatóanyagok hátránya alacsony vízoldhatóságuk, és enyhe toxikus hatásuk (utóbbi alól leginkább a fukonazol kivétel). Az második generációs azol típusú antimikotikumok (pl. pozokonazol, vorikonazol) kifejlesztésével ezeket a hátrányos tulajdonságokat igyekeztek csökkenteni.²²

A szkvalén epoxidáz inhibitorok szintén az ergoszterol bioszintetikus útvonalán keresztül hatnak. Ide tartoznak a mezőgazdaságban sikeresen alkalmazott morfolinok, köztük az amorfolin melynek humán alkalmazása is van, és az ergoszterin bioszintézisén kívül a gombasejt kitinanyagcseréjét is befolyásolja. Az *Aspergillus* és *Fusarium* fajok ellen hatásos terbinafin már húsz éve van forgalomban az USA-ban. Hatása igen fajspecifikus, élesztők elleni aktivitása nagyon változó.²²

A polién típusú antifungális szerek a már kialakult sejtmembrán struktúráját károsítják azáltal, hogy az ergoszterollal képeznek komplexet. Az ilyen módon működő hatóanyagok például a széles spektrumú amfotericin B és a nisztatin. Gombákra való specifikusságuk azon alapszik, hogy az ergoszterolhoz nagyobb affinitással kötődnek, mint az emberi koleszterolhoz, ez azonban nem biztosít megfelelő mértékű szelektivitást. Az amfotericin B-t súlyos mellékhatásai miatt csak indokolt esetben, pl. szisztémás mikózisok esetén alkalmazzák, többnyire infúzió formájában.²²

A gombák másik jellegzetessége, hogy a növényekhez hasonlóan sejtjeiket a plazmamembránon kívül sejtfa veszi körül, amit összetett biopolimerek építenek fel. A gombasejt első védelmi vonalát képző sejtfa egyik fő összetevője a D-glükóz monomerekből felépülő glükán. Mivel az emlős sejtekben a sejtfallal analóg struktúra nem található, a glükán bioszintézisének útvonala ideális támadáspontja lehet az antifungális gyógyszermolekuláknak. A papulakandinok és echinokandinok a β -(1,3)-glükánszintáz gátlószerei, hatásukra a sérül a sejtfa szintézis folyamata, melynek következtében az élesztő sejteket jelentős ozmotikus stressz éri. A legfontosabb patogén gombák (*Candida*, *Aspergillus spp.*) ellen hatásos echinokandinok csoportjába tartoznak a mikózis terápiás szereként alkalmazott ciklikus peptidok, mint a kaszpofungin, mikafungin és anidulafungin. Előnyük, hogy kizárólag gombákra jellemző célmolekulájuk miatt toxikus hatásuk minimális, ez alól kivétel az anidulafungin, melynek lassú lebomlása és metabolitjai kellemetlen mellékhatásokat okoznak.²² Az echinokandinok hátránya, hogy velük szemben néhány *Fusarium* faj természetes rezisztenciával rendelkezik²⁵, más fajoknál pedig szerzett rezisztencia alakul ki.²⁶

A gombák sejtfa csupán kb. 1%-ban tartalmaz kitint, a kitintartalomnak azonban meghatározó szerepe van a sejtek alakjának kialakulásában. Amíg a gombaszervezet számára a kitin esszenciális, az emberi szervezetben egyáltalán nem található meg ez az N-acetil glükózamin egységekből β -(1,4)-kötésekkel felépülő polimer. Ezért a gombák növekedésének gátlásában kitinszintézis megzavarása is jelentős támadáspont lehet. Ilyen elven működik a nikkomicin és a polioxinok. Ezek többnyire fonalas morfológiájú organizmusok ellen hatásos szerek, amiket kaszpofunginnal kombinálva alkalmaznak például *Aspergillus fumigatus* fertőzés ellen.²²

Mivel a gombákban a nukleinsavak szintézise sok hasonlóságot mutat az emlős sejtekével, nukleinsavsintézis gátlók csak korlátozottan állnak rendelkezésre. A flucisztozin nevű hatóanyag működése a pirimidin metabolizmus megzavarásán alapszik. A flucisztozint több enzimatis lépésen keresztül 5-fluorodeoxiuridin monofoszfáttá alakul, ami a transzkripció során beépül az RNS-láncba ezzel a megzavarva a translációt, melynek során a természetesnél rövidebb peptidláncok képződnek, így végső soron a flucisztozin a fehérjeszintézist akadályozza. A tiamidátszintáz enzim gátlásán keresztül ugyanakkor a flucisztozin egyes fajok DNS szintézisét is képes gátolni. A flucisztozin leginkább patogén élesztőfajok ellen hatásos, de a gyorsan kialakuló szerzett rezisztencia miatt szinte

kizárólag kombinált terápiában alkalmazzák. A gombák fehérjeszintézisét gátló anyagok közül a szordarinokat érdemes még megemlíteni.²²

Néhány esetben a mikrotubulusok szintézisének gátlása is megfelelő antifungális támadáspont lehet. Minden eukarióta szervezet sejtjeinek vázát az α - és β -tubulin dimerekből felépülő mikrotubulusok alkotják, továbbá a mitózis folyamatát is ezek a struktúrák irányítják. Mivel a tubulinok szekvenciája evolúciósan konzervált, az emberi- és gombatubulinok felépítése között nincs olyan drámai különbség, ami az ilyen elven működő gyógyszereket megfelelően szelektívvé tehetné. Ezért az ebbe a kategóriába sorolható grizeofulvin és vinblasztin használatakor például májkárosodás léphet fel. Hatásspektrumuk is relatíve szűk, alkalmazásuk néhány bőrgombára korlátozódik.²²

II. 2. Új antifungális stratégiák

II. 2. 1. Új stratégiák az antifungális terápiában

Ahogy az előző fejezetből is látszik, az antifungális terápiákban alkalmazott gyógyszerek sok esetben nem elég specifikusak, ezért mellékhatásaik súlyosak lehetnek. A szelektívebb molekulák hatáserőssége azonban önmagában gyakran nem elegendő a fertőzés leküzdésére és csak a gombafajok igen szűk tartománya ellen hatásos. Az antibakteriális hatóanyagokhoz hasonlóan pedig a hosszas és kiterjedt klinikai használat következtében rezisztencia alakulhat ki ellenük.²⁷

Ezért az újfajta antifungális terápiák kidolgozásának egyik stratégiája a jelenleg forgalomban lévő szerek egymással és újonnan kifejlesztett gyógyszerekkel való kombinált alkalmazása. A szinergikus hatásokat intenzíven kutatják, és az *in vitro* tanulmányok meglehetősen biztatóak.^{28,29} Ugyanakkor hiába engedélyezett az egyes hatóanyagok önmagukban való használata, a kombinált terápiák addig nem alkalmazhatók, amíg a klinikai hatékonyságukat nem bizonyították.³⁰

Az elmúlt évtizedben az új, kis molekulatömegű hatóanyagok fejlesztésében elsősorban az ergoszterol szintézisgátlók, azon belül is az azol típusú vegyületek és a glükán szintézisét gátló echinokandinok körében történt jelentős előrelépés.^{22,31}

II. 2. 2. Az antimikrobiális peptidek

Az egysejtű élőlények és a növények világában már a többsejtű állatok sejtes immunválaszának kialakulása előtt is folyt az élőhelyért és táplálékforrásokért

folytatott harc. Ennek eszközeként az élőlények között kémiai fegyverkezés zajlott és zajlik ma is, hiszen egy élőhelyet nem feltétlenül a leggyorsabban szaporodó organizmus kolonizál, hanem például az, amelyik képes meggátolni a vetélytársak túlélését. Feltehetően ennek a versengésnek az eredményeként fejlődött ki a védekezés egyik legősibb formája, az antimikrobiális peptidek (AMP-k) termelésének képessége.³² Antimikrobiális hatású peptideket az élőlények minden csoportja termel a baktériumoktól növényeken, rovarokon át egészen az emlősökig, bár utóbbiak esetében az AMP-k szerepe az antimikrobiális funkció felől mára az immunmoduláció irányába tolódott el.³³ Az antimikrobiális hatású peptideknek és fehérjéknek nem csak a forrása, hanem a célpontja is változatos: találhatunk köztük antibakteriális, antivirális és antifungális³⁴ (sőt, rákos sejtek növekedését gátló³⁵) molekulákat is.

Az AMP-k kutatásában máig a legnagyobb kihívás azok elsődleges célpontjának azonosítása és hatásmechanizmusuk feltárása. Ugyan néhány AMP működési mechanizmusa részleteiben is ismert, legtöbbjük működését molekuláris szinten még nem térképezték fel.³³ A már megismert hatásmódok között találhatunk példát – a klasszikus antimikotikumokhoz hasonlóan – a gombák sejtfal komponenseihez való kötődésre³⁶ vagy membrán permeabilizációra^{37–39}, de ezeknél bonyolultabb mechanizmusokat is leírtak már, köztük olyat is, melyre a jelenleg alkalmazott hatóanyagok között nincs példa. Néhány esetben az AMP az arra érzékeny mikroorganizmus valamely receptorához kötődik, ami olyan jelátviteli útvonalat indít el, melynek révén az AMP aktív transzport révén bejut a megtámadott sejt belsejébe és ott sejten belüli célpontjához való kötődése által programozott sejthalált indukál.^{40,41}

Mivel az AMP-k többsége nem haladja meg a száz aminosav egység hosszúságot, vonzó célpontot jelent a szerkezeti biológiai kutatások számára. Az eddig ismert térszerkezetek alapján az AMP-k nem csak hatásspektrumukban és működési mechanizmusukban, hanem szerkezetükben is igen nagy változatosságot mutatnak.^{33,42} Az antimikrobiális peptidek zömére jellemző a pozitív össztöltés³², és a hidrofób oldalláncok túlsúlya. Előbbi a negatívan töltött mikrobiális plazmamembránokra való szelektivitást szolgálja, utóbbi a zsírsavakkal való interakciókat segítheti elő.

Az AMP-k kutatása több mint két évtizedre nyúlik vissza. Jelen disszertáció írásakor az antimikrobiális peptideket összesítő – manuálisan annotált, így aztán közel sem teljes – adatbázis* összesen 2961 peptidet tartalmaz, ezek közül 392-nek

*<http://aps.unmc.edu/AP/main.php>

az atomi felbontású háromdimenziós szerkezete is ismert. Figyelemre méltó adat, hogy az ismert AMP szerkezetek 87%-át NMR spektroszkópiai módszerekkel határozták meg, és csak kisebb részét röntgenkristallográfiával. Ez az arány a fehérjék szélesebb csoportjait összegyűjtő nagyobb adatbázisokban éppen fordított, ami valószínűleg az AMP-k kis méretével és nagyfokú felszíni töltöttségével és ezzel összefüggésben kristályosítási nehézségekkel magyarázható. Annak ellenére hogy ilyen sok AMP-t ismerünk, 2006-ig a hármas fázisú klinikai vizsgálatig csupán négy antimikrobiális peptid jutott el, és ezeknek egyike sem alkalmas szisztémás fertőzések leküzdésére, csak helyileg (pl. kenőcs formájában) alkalmazhatók. A klinikai alkalmazás egyik legnagyobb akadálya a hatásmechanizmusok hiányos ismerete, illetve azok igen összetett volta; előfordul, hogy egy-egy AMP-nek nem csupán egyetlen támadáspontja van, hatását egyszerre több biokémiai útvonalon keresztül fejt ki.⁴³

Mindezen okokból napjainkra az AMP-k kutatása már nem csak az új peptidszekvenciák leírására, biokémiai és hatástani jellemzésére korlátozódik, hanem feladatává vált a hatásmechanizmusok feltárása is. A hatásmechanizmus molekuláris szintű megértéséhez fontos a hatóanyagok térszerkezetének részletes ismerete, és a szerkezeti egységek biológiai funkcióban betöltött szerepének azonosítása. Új, hatékony antimikrobiális stratégiák kidolgozásához egyaránt szükség van a molekuláris biológia, a mikrobiológia, a szintetikus kémia, a farmakokinetika és a szerkezeti biológia eszközeire.⁴²

II. 2. 3. Antifungális hatású fehérjék

Az új típusú antifungális hatóanyagok kutatásának egyik ígéretes iránya az AMP-k azon csoportjának feltárása, melyek specifikusan gátolják bizonyos mikroszkopikus gomba fajok növekedését. Mivel ezek a molekulák a peptidek és fehérjék mérettartományának határán helyezkednek el (50-70 aminosav, 5-7 kDa), a szakirodalomban gyakran antifungális peptidekként is emlegetik, azonban a fehérjék tulajdonságait mutató jól definiált harmadlagos szerkezetük miatt az „antifungális fehérje” kifejezéssel találkozhatunk gyakrabban. Kutatócsoportunk olyan antifungális hatású fehérjékkal foglalkozik, melyek természetes forrása maga is valamilyen gombaszervezet. A patogén gombafajok ellen hatásos fehérjék termelői gyakran az aszkuszos gombák (*Ascomycetes*) csoportjába tartoznak.⁴⁴ Ezek a növényi β -defenzinokkal rokon antifungális fehérjék sok olyan biokémiai és szerkezeti jellegzetességet mutatnak, ami gyógyszerként való alkalmazhatóságuk szempontjából előnyös lehet.⁴⁵ Bázikus karakterű molekulák,

50-60 aminosavból álló szekvenciájuk akár hat vagy nyolc ciszteint is tartalmaz, melyek jellemzően három vagy négy diszulfid hidat alkotnak. Ennek következtében szerkezetük kompakt, széles hőmérsékleti és pH tartományban stabil, és proteázokkal szemben igen ellenálló.

Az aszkomikóták által termelt antifungális fehérjék a riboszómán szintetizálódnak, ezért túltermeltetésük és módosításuk a molekuláris genetika mára már rutinná vált eszközeivel viszonylag egyszerűen megvalósítható. Távlati szempontból további előny, hogy a termelők között található olyan törzsek is, melyek fiziológiája jól ismert, laboratóriumi körülmények között való szaporítása és genetikai manipulációjára már évtizedek óta leírt módszerek léteznek, mivel a fermentációs iparban régóta használatosak.⁴⁵ Az antifungális fehérjéknek ezen csoportjába sorolható a *Penicillium chrysogenum* által termelt antifungális fehérje (röviden PAF) is, melynek szerkezetfelderítése jelen dolgozat témája.

II. 2. 4. A *Penicillium* antifungális fehérje működése és szerkezete

A *Penicillium* antifungális fehérje (PAF) az ezidáig izolált vagy szintetizált és biokémiaailag is jellemzett antifungális hatású fehérjék közül⁴⁶⁻⁵⁵ az egyik legsokoldalúbban vizsgált molekula. A PAF fehérje kutatása több mint két évtizedre nyúlik vissza. A *paf* gént és a fehérje izolálását 1995-ben írta le egy osztrák kutatócsoport⁴⁷. Ez a csoport és később a kutatáshoz kapcsolódott kutatócsoportok azóta is rendszeresen közölnek újabb eredményeket; évente átlagosan egy publikáció jelenik meg a PAF fehérje biokémiai^{16,40,47,56}, fiziológiai^{17,18,20,41,57-63} vagy szerkezeti^{16,20,64,65} vonatkozásában.

Az elmúlt években több olyan tanulmány is megjelent, ami a PAF hatásmechanizmusának molekuláris hátterét vizsgálta.^{20,40,41,66} A PAF gyógyszerként való alkalmazhatóságának szempontjából lényeges, hogy ezidáig sem emlős sejtkultúrákon⁶⁷, sem *in vivo* vizsgálatokban⁶⁵ nem mutattak ki emlősökre toxikus hatást. A fenti tanulmányok alapján a PAF működése során megzavarja az arra érzékeny gombaszervezetek ionháztartását és hatásának első tüneteként percekben belül mérhetővé válik a plazmamembrán hiperpolarizációja. Ezt követően a mitokondriumok szétesnek, és a „megtámadott” gombában a programozott sejthalál folyamata indul be, melynek morfológiai és fiziológiai jeleit *Aspergillus nidulans* modellszervezet esetében egyértelműen kimutatták.^{41,69} Annak ellenére, hogy az antifungális működés folyamata ilyen részletesen ismert – a legtöbb AMP-hez hasonlóan – máig megválaszolatlan maradt a PAF elsődleges támadáspontjának kérdése. A rendelkezésre álló kísérleti adatok alapján két hipotézis feltételezhető:

(1) a PAF a plazmamembrán felszínén vagy a citoplazmában G-fehérje kapcsolt receptorokon, illetve azok alegységein keresztül hat, vagy (2) a PAF közvetlenül a plazmamembrán komponenseivel lép kölcsönhatásba, és ilyen módon zavarja meg a lipidra fthoz kapcsolódó jelátviteli útvonalakat.⁶⁹ A hatásmechanizmus molekuláris szintű megértéséhez esszenciális a hatóanyag térszerkezetének ismerete. A fehérje kis mérete lehetővé tette az oldatfázisú NMR vizsgálatokat, és ebből a célból a PAF ¹⁵N-dúsított változatát állították elő az eredeti termelő törzsből. Az PAF oldatfázisú szerkezetét elsőként csoportunk írta le 2008-ban¹⁶, amit disszertációm közvetlen irodalmi előzményeként az alábbiakban foglalok össze.

A PAF szerkezetvizsgálatát biokémiai vizsgálatok előzték meg, melyek során a fehérjét dithiotreitollal redukálták, és a keletkező tiol csoportokat jódcetamiddal alkilálták. Az natív és a redukált forma között az ESI-MS vizsgálatok a származékképzésnek megfelelő tömegkülönbséget mutattak (6,25 és 6,59 kDa), a redukált fehérje folyadékromatográfiás tisztítás után pedig nem mutatott antifungális aktivitást. Ezzel a vizsgálattal bizonyították, hogy a natív fehérjében a ciszteinek oxidált állapotban (azaz diszulfid kötésben) vannak, és ez elengedhetetlenül szükséges a fehérje funkcionális állapotának fenntartásához. Az ESI-MS (és a későbbi NMR) vizsgálatok megerősítették a nukleotidszekvenciából származtatható primer aminosav szekvenciát, mely a következő:

AKYTGKCTKSKNECKYKNDAGKDTFIKCPKFDNKKCTKDNNKCTVDTYNNNAVDCD

A fehérje stabilitását extrém stresszhatások között tesztelték. A PAF igen széles kémhatás-tartományban stabil maradt (pH = 1,5 – 11), és csak extrém hőmérséklet-növekedés hatására csökkent az antifungális aktivitása. 80°C-n 60 perces hőkezelés és visszahűtés után a kezeltlen fehérjével azonos antifungális aktivitást mértek, míg 95-100°C-n azonos inkubációs idő alatt kezelt fehérje esetében is csupán 21%-os aktivitáscsökkenést tapasztaltak. A PAF proteolitikus emésztéssel szemben is igen ellenállónak bizonyult: pepszinnel (pH = 4 és 5) proteináz K-val, és az ún. pronáz enzimkeverékkel sem értek el mérhető aktivitáscsökkenést 3-9 órás emésztést követően. Ugyanebből az okból azonban a fehérje részletesebb tömegspektrometriás vizsgálata céljából történő enzimatis emésztése sem volt kivitelezhető.

Az NMR spektrumokon megjelenő jelek száma és vonalszélessége arra utalt, hogy az AFP fehérjével ellentétben⁷⁰ a PAF harmadlagos szerkezetét tekintve egykomponensű rendszer: a ¹⁵N-¹H spektrumon a szekvenciának megfelelően 53 NH és hét pár NH₂ korrelációs csúcsot lehetett leolvasni. 700 MHz-es 3D NOESY-HSQC és TOCSY-HSQC spektrumok kombinációjával (és ¹H-¹³C korrelációkkal

kiegészítve) megadták a PAF ^1H -, ^{15}N - és részleges ^{13}C -jelhozzárendelését, melyben a ^1H hozzárendelés teljessége elérte a 69,3%-ot*. A másodlagos szerkezeti elemek helyzetét a $^3\text{J}_{\text{HN,HA}}$ csatolási állandók és az NOE-ből levezetett távolságok alapján modellezett szerkezeti sokaság geometriai kritériumainak együttes figyelembe vétele alapján határozták meg. A szekvencia összesen öt antiparallel lefutású β -redőt tartalmaz, melyeket mobilis hurok régiók kötnek össze: Lys2-Thr8 (β_1), Glu13-Lys17 (β_2), Asp23-Ile26 (β_3), Lys42-Asp46 (β_4) és Asn49-Asp55 (β_5). A másodlagos szerkezeti elemek elhelyezkedését a H/D (hidrogén-deutérium) csere kísérletsorozattal mért amid hidrogén deuterálódási sebességek is egyértelműen igazolták. A harmadlagos szerkezetet egyetlen 700 MHz-n felvett 2D NOESY spektrum alapján határozták meg. Az automatikus NOESY jelhozzárendelést követően (ATNOS/CANDID 1.1) a távolságjellegű kényszerfeltételeket CYANA 2.0 szimulált hűtés alapú molekuladinamikai eljárás szerint vették figyelembe mely során a modellezett térszerkezetet és a NOESY spektrumból nyert kényszerfeltételeket iteratív módon hét cikluson keresztül illesztették. Mivel az enzimes emésztések és a tömegspektrometriás vizsgálatok nem hoztak eredményt a ciszteinek kapcsolódási sorrendjének meghatározásában, többféle diszulfidmintázat figyelembevételével is megismételték a szerkezetmodellezést. Az így kapott konformációs sokaságokat és a molekuladinamikai számítások paramétereit (elsősorban az NOE-készletek a szerkezetekkel való összeegyeztethetőségét) figyelembe véve az elméletben lehetséges tizenötféle mintázatot a modellek geometriája alapján összesen két kapcsolódási sorrendre szűkítették: *abcabc* és *abbacc**. A kétféle mintázat és diszulfidhidak figyelembevétele nélkül számolt térszerkezetek paramétereit összehasonlítva a számítások paramétereit, a szerkezetek Ramachandran térképe és RMSD értékei alapján nem lehetett egyértelműen dönteni a lehetséges diszulfid mintázatok között.¹⁶

Ennek a bizonytalanságnak az az oka, hogy a kén-kén kötéssel kovalensen kötött ciszteinek hidrogénatomjai között NMR módszerekkel igen nehéz direkt módon távolságot mérni. Egy adott cisztein két geminális H_β protonja jóval közelebb van egymáshoz ($\sim 1,8 \text{ \AA}$), mint a kén-kén kötéssel keresztül kapcsolódó ciszteinek H_β -i egymáshoz képest (konformációtól függően $\sim 4\text{-}5 \text{ \AA}$), ez pedig a keresztrelaxáció sebességekben, így a mérhető NOE intenzitásokban is nagy különbséget okoz. A legtöbb esetben a több mint két nagyságrend különbség

* Az összes szén vagy nitrogénatomhoz egy kötéssel kapcsolódó hidrogént figyelembe véve.

*A diszulfidmintázat jelölése: a primer aminosavszekvenciában az N-terminális felől haladva a ciszteineket ABC sorrendben jelöljük, a kapcsolódó párok azonos jelölést kapnak. Ilyen módon az abcabc jelölés a PAF-ban a 7.-36., 14.-43. és 28.-54. ciszteinek kapcsolódását jelöli.

$((4/1,8)^6 \sim 120)$ miatt a diszulfid hídon keresztüli $H_\beta - H_\beta$ NOE-k gyakorlatilag nem detektálhatók. Ennek következtében az olyan esetekben (mint a PAF-nál is), ahol a szekvenciálisan távoli ciszteinek zömének H_β -i a térszerkezet kompaktsága miatt 4-5 Å-n belül található, az NMR NOE adatokon alapuló szerkezetmodellezés ritkán eredményezhet egyértelmű diszulfid-mintázat hozzárendelést. Ezért a PAF elsőként közölt térszerkezeti modellje a fehérje adatbázisba (Protein Data Bank) az AFP fehérjéhez hasonlóan (azonosító: 1AFP) a ciszteinek kapcsolódási sorrendjének definiálása nélkül került be (pdb azonosító: 2kcn).

A PAF ^{15}N -relaxációs paramétereinek (T_1 , T_2 és heteronukleáris NOE) Lipari-Szabó-féle modellmentes analízisével jellemezték a fehérje dinamikáját. Az ez alapján becsült globális korrelációs idő ($\tau_c = 3,0$ ns) a PAF mérettartományába eső globuláris szerkezetű monomer fehérje mozgási tulajdonságainak felel meg. A relaxációs paraméterek alapján számított rendparaméterek átlagos értéke $S^2_{\text{átl.}} = 0,81 \pm 0,05$, amittől csak kis mértékű eltérést figyeltek meg a terminális és hurok régiókban. Ezek az adatok azt jelzik, hogy a ps-ns időskálán a PAF belső mozgásai még a mozgékonyabb régiókban is elhanyagolhatók, ezért összességében egy merev molekulaszervezet feltételezhető. A gyors dinamika vizsgálatát pontosítandóan megmérték a ^{15}N és ^1H kémiai eltolódás anizotrópia/dipólus-dipólus (CSA/DD) keresztrelaxációs sebességeket is. A másodlagos szerkezettel az ^1H transzverzális keresztrelaxáció paraméterei jól korreláltak, ami a másodlagos szerkezeti elemek kiterjedt hidrogénhid hálózatával hozható összefüggésbe. Ugyanezen okokból a ^{15}N kémiai eltolódás anizotrópia is a β -szálakat alkotó aminosavainál mutatott kiugróan magas értékeket.

II. 3. A fehérjék hőmérsékletváltozás hatására történő kitekeredése

A modern biológia egyik legfontosabb és egyben talán legnehezebb kérdése, hogy pontosan milyen tényezők alakítják ki a riboszómán megszintetizálódott polipeptidlánc adott fizikokémiai körülmények között kialakuló konformációját, vagyis milyen mechanizmusok játszanak szerepet a lineáris aminosavszekvencia harmadlagos szerkezetének kialakításában és a feltekeredett szerkezet megtartásában – azaz a fehérjeszerkezet stabilitásában. Az elfogadott biokémiai dogma szerint a globuláris fehérjék működése megmagyarázható azok natív, funkcionális szerkezetének (és a kölcsönható partnerek szerkezetének) ismeretében. Ugyanakkor ma már világos, hogy egy fehérje funkcionális állapothoz nem csak egyetlen konformációt rendelhetünk: a

különböző időskálákon végbemenő belső molekuláris mozgások kulcsszerepet játszhatnak a fehérjék biokémiai hatásmechanizmusában. Ezek a mozgások a jól definiált konformáció körüli apróbb fluktuációktól egészen a funkcionálisan rendezetlen fehérjék (IDP-k) nagyfokú konformációs szabadságáig terjednek.^{71–73} Mivel a fehérjefeltekeredés folyamata az atomi felbontású kísérleti módszerek megfigyelhető időskáláinál jóval hosszabb idő alatt (a milliszekundum-perc időskálán) mennek végbe, a folyamat részleteit elsősorban molekuladinamikai (MD) szimulációkkal lehet tanulmányozni. A nagyméretű fehérjék és a minden atom figyelembevételével történő több ms hosszúságú szimulációs idő még napjainkban is meghaladja az elérhető számítási kapacitásokat⁷⁴, azonban néhány kisméretű és különösen gyorsan feltekeredő fehérje feltekeredését már sikerrel modellezték speciális MD szimulációk segítségével^{75–79}. Ezek a tanulmányok igen hasznosak a feltekeredést okozó mechanizmusok részleteinek felderítésében, a szimulációk paraméterezéséhez azonban elengedhetetlenek a kísérleteken alapuló adatok. A szakirodalom alapján a kísérletes szerkezetvizsgáló módszerek közül a cirkuláris dikroizmus (CD) és az oldatfázisú NMR bizonyult hatékony módszernek fehérje fel- és kitekeredés globális és lokális folyamatainak és a másodlagos szerkezeti elemek stabilitásának tanulmányozására.^{80–85} Ezekben a vizsgálatokban az oldat fizikai körülményeinek (hőmérséklet, nyomás) megváltoztatásával vizsgálták fehérjék kitekeredésének folyamatát*. Mivel a fehérje kitekeredés a feltekeredés ellentétes folyamataként értelmezhető és adott fizikokémiai körülmények között az oldatban a feltekeredett és kitekeredett állapotok – reverzibilis kitekeredés esetében – egyensúlyban vannak egymással, a fel- és kitekeredett frakciók aránya a körülmények változtatásával eltolható. Ilyen módon a kitekeredés folyamatának jellemzésén keresztül a feltekeredést domináló tényezőkről is szerezhetünk ismereteket. A legegyszerűbb esetben ilyenkor két konformációs állapot közötti egyensúlyról van szó, melynek elméleti termodinamikai leírását Becktel és Schellman⁸⁶ alapozta meg, amit Privalov és Gill^{87,88}, később pedig Szypersky⁸⁰ terjesztett ki. A fehérjekitekeredés termodinamikai leírása szerint azzal a feltételezéssel élünk, hogy az állandó nyomáson mért hőkapacitás (ΔC_p) független a hőmérséklettől, míg a többi

*Megjegyzendő, hogy a fehérjekitekeredés fiziko-kémiai jellemzésére számos egyéb kísérleti módszer létezik, melyeket a gyógyszeriparban gyakran alkalmaznak pl. hatóanyagok stabilitásának vizsgálatára, mint pl. a „differenciál szkennig kalorimetria” (DSC), vagy a hasonló elven működő fluoreszcens elnyelést a hőmérsékletváltozás függvényében detektáló „differenciál szkennig fluorimetria” (DSF). Mivel ezek a módszerek a rendszer egészének termodinamikai jellemzésére alkalmasak, a szó szoros értelmében nem tekinthetők szerkezetvizsgáló módszereknek, ezért – és részben terjedelmi okokból – a DSC módszertanához köthető kiterjedt szakirodalmat a dolgozatban nem ismertetem.

termodinamikai paraméter (az entalpia ΔH , a szabadentalpia ΔG , és az entrópia ΔS) hőmérséklettől függ. Ha kísérleti úton meghatározzuk a kitekeredett frakció arányát a hőmérséklet függvényében ($f_{u,T}$), akkor a Gibbs-Helmholtz egyenlet alapján megadható a kitekeredés szabadentalpiájának változása ($\Delta G_{u,T}$):

$$\Delta G_{u,T} = \Delta H_{u,T_h} \left(1 - \frac{T}{T_h}\right) + \Delta C_p \left(T - T_h \ln \frac{T}{T_h}\right),$$

továbbá a kitekeredett (u) és feltekeredett (n) állapot közti egyensúlyi állandó:

$$K_{u,T} = \exp\left(\frac{-\Delta G_{u,T}}{RT}\right) = \frac{f_{u,T}}{f_{n,T}},$$

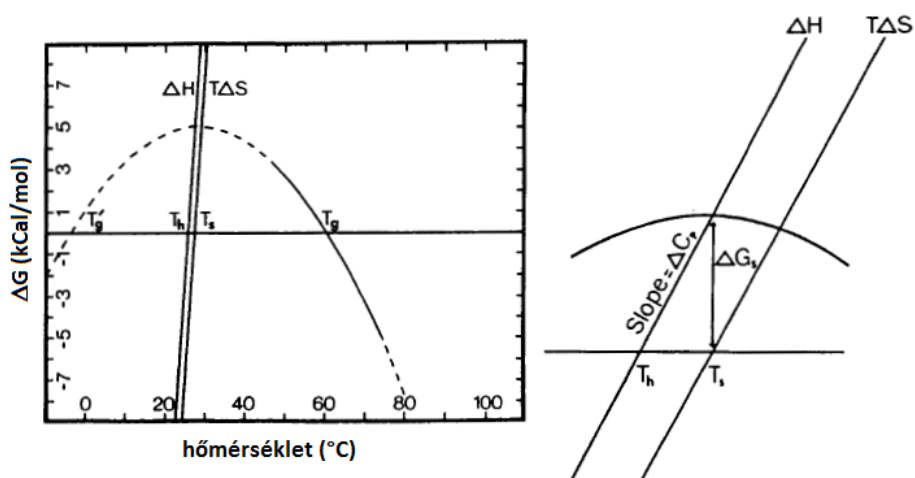
$$f_{u,T} + f_{n,T} = 1,$$

tehát

$$f_{u,T} = \frac{K_{u,T}}{1 + K_{u,T}},$$

ahol $f_{n,T}$ a feltekeredett, natív frakció súlya.

Az első két egyenlet alapján a feltekeredett vagy kitekeredett frakció hőmérséklettől függő koncentrációjának ismeretében a görbék illeszthetők, amiből megkapjuk a kétállapotú kitekeredés ismeretlen paramétereit. A $\Delta G_{u,T}$ az egyenlet két nagy tagjának (entalpia és entrópia) különbsége és fordított parabola alakú függvényt ad, melynek maximumán a feltekeredett populáció a legnagyobb arányban található meg.



1. Ábra: baloldalt: egy fehérje stabilitási görbéje, melyen a szabadenergia változást ábrázoljuk a hőmérséklet függvényében. Jobboldalt: a stabilizáció maximális szabadenergiája, a T_s és T_h közötti összefüggés ábrázolása). Az ábrát a ⁸⁶. publikációból vettem át.

Ez a hőmérséklet a fehérje maximális stabilitású hőmérséklete (T_{max}). A parabola két szárán meghatározható a magas (T_h) és alacsony hőmérsékletű olvadáspont (T_l), melyeken a kétféle állapot populációja egyenlő: $f_{u,T} = f_{n,T} = 0,5$. A tapasztalatok szerint a fehérjék magas hőmérsékletű olvadáspontja valamivel a szobahőmérséklet fölött, míg az alacsony hőmérsékletű olvadáspont gyakran a víz fagyáspontja alatt található, ezért utóbbi kísérleti úton csak az oldat túlhűtésével határozható meg. Sok kétállapotú kitekeredést mutató fehérje esetében a maximum stabilitású hőmérséklet szobahőmérséklet körül volt (293 ± 8 K), amíg T_h és T_l értékei igen nagy szórást mutattak a változatos lefutású $\Delta G_{u,T}$ görbék alapján.⁸⁹ Az elmélet gyakorlatban való alkalmazása általában azért ütközik akadályba, mert a kitekeredett frakció közvetlen detektálása igen ritkán valósítható meg, ezért az adott körülmények között a feltekeredett és kitekeredett frakciók arányát csak becsülni tudjuk. Ha azonban – akár közvetett módon – képesek vagyunk mérni a kitekeredett frakció koncentrációját, a folyamat termodinamikai leírása megadható. A kétállapotú termodinamikai modell segítségével olyan biokémiai rendszerek írhatók le, melyek átmeneti állapot nélkül két állapot (f és u) között váltakoznak. Abban az esetben, ha a kitekeredés folyamata során hosszú életidejű közbenső állapot is létre jön, a modell kibővítésére szükséges. Ezt az esetet a gondolatmenet folytonosságá érdekében a III. 3. 5. fejezetben fogom kifejteni.

A globuláris fehérjék magas hőmérsékleten történő denaturációjára természetes jelenségként gondolunk, hiszen a hétköznapi életben is gyakran és

látványos formában találkozunk vele, pl. keménytojás készítése során. Ezzel szemben az alacsony hőmérsékleten történő denaturáció képe kevésbé intuitív, hiszen a hőmérséklet csökkenésével az entrópia csökken, különös módon a rendszer adott hőmérséklet alatt mégis a rendezetlenség felé tolódik. A globuláris szerkezet hideg hatására történő elvesztését (vagyis „hideg denaturációt”) számos fehérje esetében kimutatták. Az elfogadott nézet szerint a fehérjék hideg kitekeredése a víz fizikokémiai tulajdonságaival magyarázható. A folyamat az entrópia és entalpia hűtés hatására való együttes csökkenésével és a fehérje hidrátburkának átrendeződésével jár, ami bizonyos esetekben kitekeredést okoz.⁸⁸ A hideg denaturáció azért vizsgálható nehezen, mert a fehérjék alacsony hőmérsékletű olvadáspontja sok esetben jóval a víz fagyáspontja alatt található, ezért ennek vizsgálatához a rendszer lassú túlűtése szükséges. Az ilyen szempontból legjobban jellemzett Frataxin (Yfh1) fehérje⁹⁰ esetében azt mutatták ki, hogy a meleg és hideg denaturációhoz tartozó „szerkezet” hasonló, de nem mutat azonos fizikokémiai tulajdonságokat.

Az aszkomikóták által termelt antifungális fehérjék aminosav szekvenciája nagy arányban tartalmaz töltött oldalláncot ami szerkezetüket a rendezetlenség irányába tolja, míg méretükhöz képest nagy diszulfidhid tartalmuk miatt mégis kompakt globuláris szerkezetet vesznek fel, ezért bizonyos értelemben a globuláris és rendezetlen fehérjék világának határára helyezhetők. A denaturáció mechanizmusa szempontjából a rendezett és rendezetlen fehérjék jelentős eltéréseket mutatnak (például a rendezetlen fehérjékre nem jellemző, hogy alacsony hőmérséklet hatására elveszíténék funkcionális formájukat, vagy magas hőmérséklet hatására csökkenne az oldhatóságuk,⁹¹ ez adja a motivációját a nagy nettó töltéssel rendelkező, ám rendezett szerkezetű antifungális fehérjék hőmérséklet hatására történő kitekeredésének vizsgálatára.

II. 4. Fehérjék szerkezetvizsgálata NMR spektroszkópiával

Az NMR spektroszkópia napjainkra a modern biológia nélkülözhetetlen eszközévé vált. A gyors technológiai fejlődés lehetővé tette, hogy a biológiában kulcsszerepet betöltő makromolekulák (pl. fehérjék és nukleinsavak) térszerkezetének és belső mozgásának vizsgálatához elegendő érzékenységet és spektrális felbontást érjünk el. Ha a vizsgált fehérjét olyan biotechnológiai módszerrel állítjuk elő, melyben tetszőlegesen megváltoztathatjuk a szén- és nitrogénforrást, akkor lehetőség nyílik a fehérjék stabil izotópokkal való dúsítására. Ilyen módon lehetséges a fehérjéket felépítő leggyakoribb atomok (H, C, N) 1/2-es

spinű izotópjainak NMR spektroszkópiával történő vizsgálata. A spektrométerek gyártói által biztosított könyvtárakban mára számos olyan NMR impulzusszekvencia érhető el, melyek segítségével szerkezeti információkat nyerhetünk a fehérjékről. A lehetőségek messze túlmutatnak a molekulaszaklat térbeli koordinátáinak meghatározásán: a megfelelően kiválasztott és kivitelezett NMR módszerek segítségével atomi szintű felbontással, igen széles időskálán nyerhetünk információt a makromolekulák mozgásairól és cserefolyamairól is.⁹²

II. 4. 1. A harmadlagos szerkezet meglétének vizsgálata: ¹H NMR

Amíg a kisméretű szerves molekulák szerkezetvizsgálata során az egydimenziós hidrogén NMR spektrumról leolvasható ¹H kémiai eltolódások és a jelek felhasadásából leolvasható skaláris csatolások nélkülözhetetlen információval szolgálnak a szerkezetigazoláshoz, addig a makromolekulák ¹H spektruma a nagyszámú hidrogénatom és a vonalszélesedési effektusok okozta spektrális zsúfoltság miatt relatíve kevés információt hordoz. A fehérjék NMR vizsgálata ennek ellenére többnyire mégis egy 1D ¹H spektrum felvételével kezdődik, ugyanis a többi atommaghoz viszonyítva érzékeny ½-es spinű protonok NMR spektrumából gyorsan fel lehet mérni a minta további vizsgálhatóságát. Egy adott fehérjemintáról ezzel az egyszerű kísérlettel rögtön el lehet dönteni, hogy az adott spektrométer érzékenységét figyelembe véve elegendő anyagmennyiség van-e az oldatban a jelentősen több mérési időt igénylő többdimenziós kísérletek kivitelezéséhez, illetve megfelelőek-e az oldatbeli körülmények (pl. az ionerősség és a pH), továbbá a jelek alakjából és eloszlásából az is eldönthető, hogy a fehérje feltekeredett vagy rendezetlen.⁹²

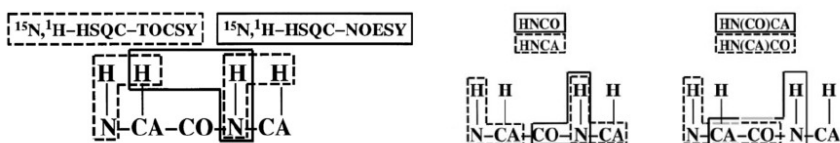
A fehérjevizsgálatoknál heteromagok (pl. a ¹³C) egydimenziós direkt detektálású NMR kísérletek alkalmazása nem jellemző, ugyanis hiába lenne nagyobb az elérhető spektrális felbontás a ¹H-nál lényegesen nagyobb kémiai eltolódás tartomány miatt, a fehérjék korlátozott oldhatósága és az esetek nagy hányadában a csekély elérhető anyagmennyiség – ezekből kifolyólag a jellemzően alacsony oldatbeli koncentráció (~ 0,1-1 mM) miatt a kisebb giromágneses hányadossal (γ) rendelkező magok esetében ritkán lehet elérni a megfelelő jel/zaj arányt. Ezért a fehérje-NMR módszerek zöménél a heteromagokról heteronukleáris kísérletek révén szerzünk információt. A heteromagokat az érzékenység növelésének érdekében indirekt módon, a proton rádiófrekvenciás csatornáján keresztül detektáljuk.⁹³

II. 4. 2. Fehérjék NMR jelhozzárendelése

Minden atomi szintű NMR vizsgálat alapja, hogy a spektrumokon megjelenő rezonancia frekvenciák közül a lehető legtöbbet rendeljük hozzá a vizsgált molekula megfelelő atomjához. Ugyan a térszerkezet atomi távolságok alapján történő meghatározásához elegendő lenne csupán a hidrogénatomok frekvenciáinak ismerete, de a ^{13}C és ^{15}N kémiai eltolódások is értékes szerkezeti információt hordoznak, illetve a heteronukleáris korrelációk révén a többi mag frekvenciájának ismerete nagyban segíti a protonok hozzárendelését. A kis molekulatömegű (~ 10-50 szénatomból álló 200-1200 Da molekulatömegű) szerves vegyületek természetes izotópgyakoriság mellett a megfelelő egy- és kétdimenziós kísérletek kombinációjával a ^1H és ^{13}C jelek azonosítása a legtöbb esetben egyértelműen megoldható. Ezért az ebbe a mérettartományba eső 10-20 aminosavból álló polipeptidek NMR ^1H jelhozzárendelése izotópdúsítás nélkül, természetes izotópgyakoriság mellett is lehetséges homonukleáris 2D COSY, TOCSY és NOESY spektrumok kombinációjával.^{92,94} Kedvező esetben (ha a 2D spektrumokon nem túl nagy a jelátfedés mértéke) ez a módszer akár kisméretű fehérjékre is kiterjeszthető, azonban igen nagy időráfordítás árán. Ezt a stratégiát a dolgozatban tárgyalt fehérjék jelhozzárendeléséhez nem használtam, ezért nem is tárgyalom részletesebben. A kismolekulák mérettartományát átlépve már a legkisebb fehérje is (minimum 50 aminosav egység) kb. 4-500 hidrogénatomot, 250-300 szénatomot és 70-100 nitrogénatomot tartalmaz, ami már a 2D spektrumokat is jelben gazdaggá teszi. A jelhozzárendelési feladatot tovább nehezíti, hogy a molekulatömeg és ezzel a globális korrelációs idő (τ_c) növekedésével nem csak a jelek száma növekszik, hanem a rezonanciajelek is kiszélesednek, mindezek következtében a spektrális felbontás válik a jelek azonosításának limitáló tényezőjévé. Ezt a korlátot egy adott határig az indirekt frekvenciadimenziók számának növelésével lehet feloldani. A kilencvenes években robbanásszerűen növekedett az olyan biomolekuláris kutatásokat célzó NMR módszerek száma, melyek ezt a stratégiát követik.⁹³ Az alábbiakban azokat az NMR módszereket ismertetem röviden, melyeket munkám során a fehérjék jelhozzárendeléséhez használtam.

A modern szerkezetvizsgálatoknál elterjedt az egységes ^{15}N -dúsítás alkalmazása, ez körülbelül 100 aminosav egységig lehet elegendő a teljes ^1H és ^{15}N , és részleges ^{13}C jelhozzárendelés megadásához. Nagyobb fehérjék esetében már a ^{15}N és ^{13}C egységes, egyidejű jelölése szükséges, ami lényegesen megnöveli a vizsgálható atomok számát, és jóval nagyobb (100-250 aminosavból felépülő) fehérjék egyértelmű (és akár teljes) ^1H - ^{15}N - ^{13}C jelhozzárendelését teszi

lehetővé.⁹² Speciális esetekben és a 250 aminosav egység hosszúságot meghaladó fehérjéknél ennél is összetettebb izotópjelölést is használnak (pl. a fentiekén túl egységes vagy részleges ^2H jelölést)^{95,96}. A munkám során vizsgált kis méretű fehérjék főláncának jelhozzárendelésére az első két megközelítést alkalmaztam:

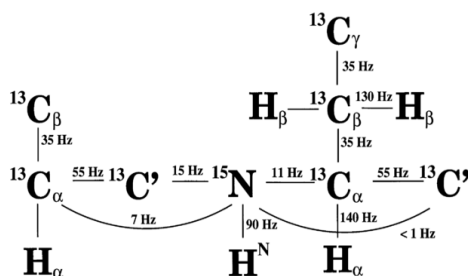


2. Ábra: Fehérjék főlánc jelhozzárendelésének két stratégiája. Baloldalt: ^{15}N -dúsított, jobboldalt: ^{15}N - ^{13}C dúsított fehérje jellemző főlánc kísérletei. Szaggatott vonal az aminosav egységen belüli, folyamatos vonal az egységek közötti korrelációt jelöli. Az ábrát a ⁹³ publikáció alapján szerkesztettem.

A 2. ábra bal oldalán szereplő stratégia esetében a polipeptidláncnak azt a tulajdonságát használjuk ki, hogy az adott egység (i -edik) amid hidrogénje az esetek többségében térben közel található az azt megelőző egység ($i-1$ -edik) H $_{\alpha}$ atomjától. ^{15}N -feloldott TOCSY és NOESY típusú NMR kísérletek kombinációjával (melyek technikai leírását később részletezem) lehetséges az egységen belüli és kívüli hidrogének megkülönböztetése, ezáltal a szomszédossági viszony az átfedő információk alapján igazolható. Ennek a módszernek az a korlátja, hogy a H $_{\alpha}$ kémiai eltolódás tartománya viszonylag szűk (kb. 3 ppm), ezért nagy az esély a jelek átfedésére, még a ^{15}N -feloldott 3D NOESY spektrumon is. A 2. ábra jobb oldalán látható módszer ezzel szemben kizárólag koherencia transzferen alapszik, azaz az egymástól egy vagy két kötés távolságra található atomokat rendeli egymáshoz a köztük lévő skaláris csatolásokat kihasználva. Ezért a szekvenciális kapcsolatokat egyértelműen igazolja, hiszen csak akkor történik információ átvitel, ha az egymáshoz rendelt magok kémiai kötéssel kapcsolódnak egymáshoz. Az utóbbi módszerek természetes ^{13}C izotópgyakoriság mellett a több lépésen keresztül történő mágnesezettség transzfer miatt nem működnének, hiszen minden lépésnél elveszítenénk a jelintenzitás kb. 99%-át. Ezért ez a stratégia mindenképpen szükségessé teszi az egységes ^{15}N - ^{13}C jelzést. A költséges ^{13}C -dúsításért cserébe viszont minden szénatom, (beleértve a karbonil szénatomokat is) egyértelműen azonosíthatóvá válik. Az alábbiakban a két stratégia jellemző kísérleteinek alapelveit és technikai megvalósítását részletezem.

A fehérjék főláncának szekvencia mentén való jelhozzárendelése azért lehetséges, mert a peptidláncot a karbonil szénatomok által elhatárolt különálló spinrendszerek alkotják, ugyanakkor a szomszédos spinrendszerek szélső elemei –

az amid N és a C_α – között is mérhető (~ 7 Hz) kétkötéses spin-spin csatolás van (3. ábra). Továbbá a spinrendszeren belüli egykötéses csatolások elég nagyok a több lépésen keresztül történő hatékony koherenciatranszferhez és értékük nem függ nagy mértékben a peptidlánc konformációjától⁹⁴. Ez lehetővé teszi olyan NMR mérések tervezését, melyekben a bejárt koherenciautat (a gerjesztett spinállapotok lecsengési ideje miatt adott határon belül) szinte tetszőlegesen változtathatjuk, ezáltal a jellemzően legalább háromdimenziós spektrumokon megjelenő keresztcsúcsokból a számunkra értékes korrelációk olvashatók le.



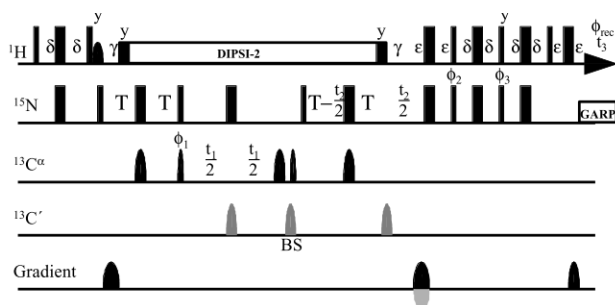
3. Ábra: A peptidláncot alkotó spinrendszerek, és a magok között mérhető egy- és kétkötéses skaláris csatolások átlagos értéke. Az ábrát a 91. publikációból emeltem át.

A főlánc kísérletek a detektált ^{13}C atommag típusonként (C' , C_α , C_β) két mérésből állnak. Az egyik a spinrendszeren belüli atomokat rendeli egymáshoz, a másik pedig a spinrendszeren belüli és a szekvenciálisan szomszédos spinrendszerek elemeiről egyaránt hordoz információt. A megfelelő spektrumrészleteket egymás mellé vetítve (5. ábra) egyértelműen igazolhatók a spinrendszerek közötti szomszédossági viszonyok, ezáltal az adott korrelációban résztvevő atomok jelhozzárendelése is megadható.⁹²

Ez a megközelítés feltételezi, hogy az amid NH csoportok protonáltak, ezért a mérések könnyűvízes, semleges vagy enyhén savas kémhatású oldatban történnek, ennek megfelelően a vízelnyomást minden esetben bele kell építeni a programba. A detektálás előtt rendszerint érzékenység-növelt back-transzfert alkalmaznak amit water-flipback-el kombinálnak. Ennek következtében kiváló vízelnyomás érhető el a cserélhető protonok telítése nélkül. Ez azért különösen fontos, mert az ilyen kísérleteknél az első besugárzási és utolsó kiolvasási lépés is az amid protonokon történik, melyek a mérés körülményei között cserében állhatnak az oldószerrel.⁹³ A főlánc mérések technikai megvalósítását a HNCQ, illetve HNCA kísérletek példáján mutatom be.

A HNCO és HNCA kísérletek szekvenciája nagyon hasonló, a kettő közti lényegi különbség, hogy a HNCO kísérletben alkalmazott C'-k tartományra szelektív impulzus helyett a HNCA során a C_α tartományra szelektív impulzus szerepel. A HNCA spektrumon kétféle (3D) keresztcsúcsot olvashatunk le. Az egyik a H^N(i), N(i) és C_α(i) atomok korrelációja, a másik pedig N(i), H^N(i) és C_α(i-1) ugyanis a két csatolás értéke hasonló (¹J_{C_α(i),N(i)} = 11 Hz és ²J_{C_α(i-1),N(i)} = 7 Hz) (3. ábra). A HNCA kísérlet négy koherencia transzfer lépésből áll: ¹H → ¹⁵N → ¹³C_α(t₁) → ¹⁵N (t₂) → ¹H (t₃), melynek első és utolsó lépése rendre INEPT és fordított INEPT, a többi lépésre pedig INEPT vagy HMQC típusú transzfer is használatos. Az alábbi konkrét példában (4. ábra) minden lépés single-quantum, azaz INEPT típusú, aminek az az előnye, hogy a ¹⁵N mágnesezettség a ¹³C evolúció ideje alatt longitudinális irányú marad, ezért a transzverzális relaxáció miatt nem veszít jelintenzitásából.

A HNCA program a protonok besugárzásával és INEPT transzferrel indul, melynek során a (főlánc) protonok mágnesezettsége ¹⁵N-re kerül ott, ahol ¹J_{HN} csatolás van. Ezt a T idő követi, mialatt a ¹⁵N-¹³C^α közötti egykötéses csatolások hatására antifázisú három-spin koherencia alakul ki: H_zN_xC^α_z. Ezt az első szelektív 90°-os ¹³C impulzus egyidejű ¹⁵N impulzussal H_zN_zC^α_y koherenciává alakítja majd t₁ evolúciós idő alatt jelölődik a ¹³C^α kémiai eltolódással. Ezt invertált idejű ¹³C 90°-os impulzus H_zN_yC^α_z antifázisú koherenciává alakítja, ezáltal a ¹³C mágnesezettség a z-tengelyre kerül. Ezt követően a három-spin koherencia ¹⁵N-koherenciává refokuszálódik és ezzel egy időben jelölődik ¹⁵N kémiai eltolódással (t₂). Végül a mágnesezettség fordított INEPT blokk segítségével kerül vissza az amid protonokra, ekkor megkezdődik az adatgyűjtés (t₃).

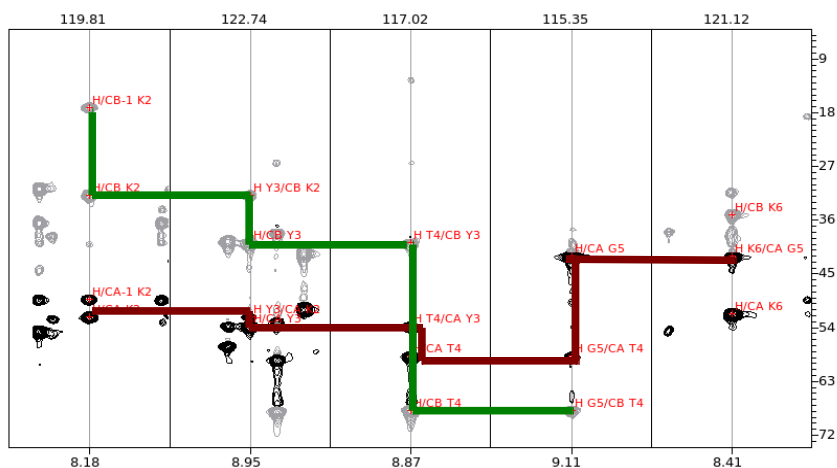


4. Ábra: A HNCA/HNCO kísérletek impulzus szekvenciájának sémája. A keskenyebb és szélesebb téglalapok 90 és 180°-os impulzusokat, a fél ellipszisek a szelektív impulzusokat jelölik. Az ábrát a ⁹⁷. publikációból vettem át.

Mivel a spektrumokat a kémiai eltolódások meghatározására használjuk, nem előnyös, ha azokban a spin-spin csatolások hatása felhasadás formájában bármelyik dimenzióban jelentkezik, ezért ^1H és ^{15}N -lecsatolásra is szükség van. A protonlecsatolást a DIPSI-2 blokk végzi. A szelvéssávú lecsatolás előnye a 180° -os impulzusok használatával szemben, hogy csökkenti a transzverzális ^{15}N -relaxáció okozta jelvesztést, amivel tovább növelhető a kísérlet érzékenysége. Az adatgyűjtés alatt történő ^{15}N -lecsatolást a GARP blokk biztosítja.⁹⁷

A HNCA kísérlet „logikai párja”, a HN(CO)CA hat lépésből áll, melyek között szerepel egy szénatomról szénatomra ($^1J_{C'Ca} = 55 \text{ Hz}$) történő transzfer is $C'(i-1)$ és $C_\alpha(i-1)$ között: $^1\text{H} \rightarrow ^{15}\text{N} \rightarrow ^{13}\text{C}' \rightarrow ^{13}\text{C}_\alpha(t_1) \rightarrow ^{13}\text{C}' \rightarrow ^{15}\text{N}(t_2) \rightarrow ^1\text{H}(t_3)$. Ennek hatására a spektrumon $\text{H}^N(i)$, $\text{N}(i)$ és $\text{C}_\alpha(i-1)$ korreláció megjelenik, viszont a $\text{H}^N(i)$, $\text{N}(i)$ és $\text{C}_\alpha(i)$ nem, hiszen ebben az irányban nincsen szén-szén kötés (3. ábra). A főlánc kísérletek további fajtái is hasonló elven működnek. Elméletileg önmagában a HNCO-HN(CA)CO páros is igazolhat a peptidláncon belül minden szekvenciális kapcsolatot, a C' tartomány átfedései miatt legtöbbször több spektrum együttes értékelése szükséges. A teljes főlánc $^1\text{H}^N$, $^{13}\text{C}'^{\alpha,\beta}$, és ^{15}N jelhozrendelést az alábbi hat kísérlet alapján (elegendő felbontást feltételezve) egyértelműen meg lehet adni: HNCO és HN(CA)CO: $\text{H}^N(i)$, $\text{N}(i)$ $\text{C}'(i, i-1)$; HNCA és HN(CO)CA: $\text{H}^N(i)$, $\text{N}(i)$, $\text{C}_\alpha(i, i-1)$; HNCACB (5. ábra) és CBCA(CO)NH: $\text{H}^N(i)$, $\text{N}(i)$, $\text{C}_\alpha(i, i-1)$, $\text{C}_\beta(i, i-1)$.^{93,94}

HNCACB



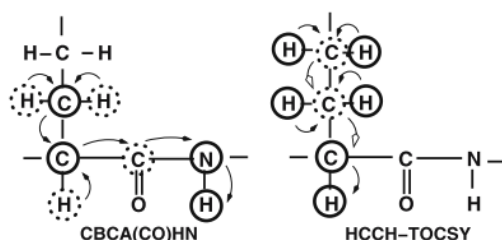
5. Ábra: A szekvencia mentén való főlánc jelhozzárendelés menete a PAF HNCACB spektrumrészletének példáján. Az egyes spektrumszeleteken a ^1H és ^{15}N frekvenciák (vízszintes skálán alul és felül jelölt értékeknél) mentén kijelölt α és β ^{13}C kémiai eltolódások láthatók, a függőleges tengely ^{13}C kémiai eltolódást jelöl. Piros vonallal a C_α , zöld vonallal pedig a C_β atomok frekvenciái által kijelölt szekvenciális kapcsolatokat kötöttem össze.

Gyakran használt kiegészítő főlánc kísérlet a HNHA, mely az egységen belüli $^3J_{\text{NH}}$ csatolási állandók kvantitatív meghatározására és a H_α kémiai eltolódások azonosítására is használható.⁹⁸ A hozzárendelt C_α és H_α kémiai eltolódások kiindulásként szolgálnak az oldallánc atomok COSY és TOCSY típusú kettős rezonancia kísérletekkel történő azonosításához.⁹⁴

Az oldallánc atomok jelhozzárendelése céljából is lehet tervezni a fenti főlánc kísérletekhez hasonló többszörös INEPT transzferrel operáló hármas rezonancia módszereket. Erre példa a 6. ábra bal oldalán látható CBCA(CO)NH kísérlet, mely akár a főlánc kísérletek közé is sorolható, hiszen a $\text{H}^{\text{N}(i+1)}$ -n való detektálás miatt szekvenciális kapcsolatot is igazol, miközben leolvashatók a $C_\alpha(i)$ és $C_\beta(i)$ kémiai eltolódások. Az ilyen típusú kísérletekkel azonban gyakran felmerül az a probléma, hogy a $\text{H}^{\text{N}(i+1)}$ -re való transzfer során a jel nagy részét elveszítjük, ezért a kísérlet érzékenysége kicsi, és a hosszabb alifás aminosavak esetében (pl. lizin, arginin) a spektrumról hiányozhatnak a spinrendszer bizonyos elemei. Ezért a ^{13}C - ^{15}N -jelzett fehérjék alifás oldalláncainak jelhozzárendelésére a 6. ábra jobb oldalán ábrázolt HCCH-TOCSY és az ahhoz hasonló elven működő kísérletek bizonyulnak hatékonyabbnak.⁹⁴ Ezekben a kettős rezonancia kísérletekben proton-szén illetve szén-szén transzfer is történik, ezáltal a hagyományos $^3J_{\text{HH}}$ csatolásokon alapuló 2D

COSY és TOCSY módszereket terjeszti ki egy (vagy több) további ^{13}C frekvencia dimenzióval, aminek hatására lényegesen növekszik a jelek feloldottsága a 2D módszerekhez képest. A mágnesezettség-átvitel három lépésben történik: elsőként a besugárzott ^1H atomokról az egy kötéssel kapcsolódó ^{13}C atomokra történő transzfer ($^1J_{\text{CH}} \sim 140$ Hz), majd a szomszédos ^{13}C atomra történő átvitel ($^1J_{\text{CC}} \sim 55$ Hz), végül $^1J_{\text{HC}}$ révén a ^{13}C -hez közvetlenül kapcsolódó ^1H -ra kerül a mágnesezettség.⁹² Attól függően, hogy melyik lépések során történik a kémiai eltolódás kiolvasása és a detektálás (illetve a keverés típusától függően), számos ún. HCCH-típusú kísérletet különböztethet meg. A legtöbb esetben az alifás oldallánc jelhozzárendelés a CBCA(CO)NH és a HCCH-COSY (melyben a TOCSY-ban használatos izotróp keverés helyett 90° -os COSY-típusú keverés szerepel) kísérletek kombinációjával az oldallánc atomoknál is egyértelmű jelhozzárendelést lehet elérni.⁹²

Az oldalláncok ^1H hozzárendelését nagyban segíti, és a ^{13}C -jelzés hiányában történő szekvenciális kapcsolatok igazolásához alapvető mérés a (2. ábra bal oldalán már említett) ^{15}N -feloldott 3D TOCSY kísérlet, melynek felépítése a keverést leszámítva analóg a következő fejezetben tárgyalt ^{15}N -feloldott (3D) NOESY-val.



6. Ábra: A CBCA(CO)NH és HCCH-TOCSY kísérletek mágnesezettség átviteli útvonala.⁹⁴ Folyamatos vonallal bekarikázva a kiolvasott frekvenciákhoz tartozó atomok, szaggatott vonallal a koherenciaútban résztvevő de nem detektált atomok szerepelnek.

II. 4. 3. H-H távolságok meghatározása NOESY módszerekkel

A fehérjék szerkezetéről nyerhető távolságjellegű információk fő forrásai (és a jelhozzárendeléshez is nagy segítséget adnak) a mag-Overhauser hatáson (NOE-n) alapuló technikák. A dipoláris keresztrelaxáció folyamatai gyakorlati szempontból különösen hasznosak, mivel a keverés hatékonysága nagy mértékben függ a kölcsönhatásban lévő spinek térbeli távolságától. Ezért abban az esetben, ha

a relaxációs folyamatok közül a dipólus-dipólus kölcsönhatás a domináns, a kísérleti úton meghatározott NOE értékek kapcsolatba hozhatók a vizsgált atomok közötti távolságokkal. Ez az összefüggés szolgál a fehérjék térbeli modellezésének elméleti alapjául.^{94,99}

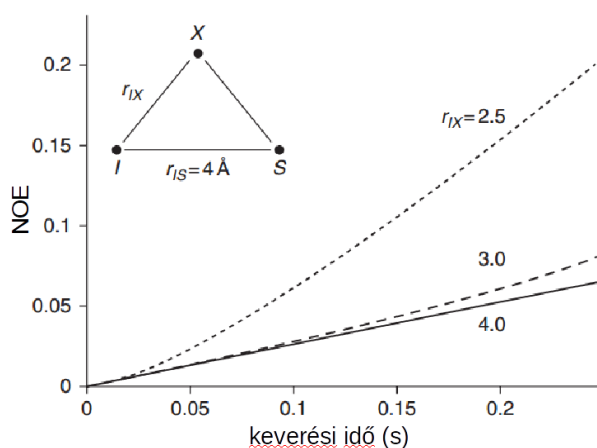
Megfelelően rövid keverési idő használata mellett és rigid fehérjeszerkezetet feltételezve a mért homonukleáris NOE intenzitások a dipoláris kölcsönhatásban lévő magok távolságának hatodik hatványával fordítottan arányosak ($A_{\text{NOE}} \sim r^{-6}$). A távolság növekedésével gyorsan csökkenő intenzitás miatt azonban csak igen rövid atom-atom távolságok határozhatók meg ilyen módon: a gyakorlat azt mutatja hogy az effektus maximálisan 5-6 Å-re található atomok között mutatható ki. Egy kisebb fehérje NOESY spektrumában több száz, közepes méretű fehérjéknél néhány ezer NOE keresztcsúcs azonosítható, amelyek intenzitásából a megfelelő referencia (ami egy adott atompár ismert távolsága, pl. egy CH₂ geminális hidrogénjeinek távolsága) birtokában a hidrogénatomok közötti távolságokra következtethetünk. I és S magok esetén, ahol A a mért NOE intenzitás,

$$r_{IS} = r_{ref} \left(\frac{A_{IS}}{A_{ref}} \right)^{-\frac{1}{6}} .$$

Ez az összefüggés azonban csak akkor teljesül, ha figyelmen kívül hagyunk olyan tényezőket, mint a fehérje belső mozgásai, és a spindiffúzió. Mivel a fehérjék dinamikus struktúrák, belső mozgásaik a molekulán belül eltérő lokális korrelációs időket eredményezhetnek ami megváltoztatja a keresztrelaxáció sebességét. Ezért a mozgékony régiókban csökken a mérhető NOE intenzitása is, a keresztcsúcs bizonyos esetekben el is tűnhet. Ezt a torzítást a fehérjeszerkezet számítógépes modellezése során egyrészt a többi korlát számbeli fölénye, másrészt az alkalmazott algoritmusok távolságkezelésének megengedő volta^{100,101} kompenzálja (ti. az elterjedt eljárások során nem egzakt távolságadatokkal számolunk, hanem az atom-atom távolságokat közeli, közepes és távoli kategóriákba soroljuk).

A spindiffúzió, más néven három spin effektus viszont a belső mozgásoknál is súlyosabb hatással lehet a mért NOE intenzitásra (7. ábra). A spindiffúzió azért jön létre, mert egy (makro)molekulában egy adott hidrogén közelében többnyire egynél több másik hidrogén található, így az NOE felépülési ideje alatt több spin láncolatán keresztül továbbterjed. Ennek következtében a mért intenzitásokból számolt távolságok torzulnak, a torzítás mértéke pedig a keverési idő növekedésével súlyosbodik (7. ábra).¹⁰⁰

A spindiffúzióból eredő pontatlanságot a keverési idő megfelelő megválasztásával lehet optimalizálni: a kísérlet paraméterezése során olyan keverési időt érdemes választani ami az adott minta fehérjekoncentrációja és a spektrométer érzékenysége mellett a szerkezet meghatározásához még elegendő számú és intenzitású NOE-t eredményez, de nem indokolatlanul hosszú.¹⁰⁰ Fontos megjegyezni, hogy a spindiffúzió hatása a gyakorlatban használt keverési idő tartományán belül is (~ 80-200 ms) látványosan nagy lehet, de az azokból számolt távolságok hibája gyakorlati szempontból a nagy molekulák esetében tolerálható mértékű. Konkrét példaként, ahogy a 7. ábráról leolvasható, ha X mag 2.5 Å távolságra van a vizsgált I és S magoktól, akkor 100 és 150 ms keverési időnél a két kísérletben megjelenő NOE_{IS} keresztcsúcsok között mérhető intenzitáskülönbség kétszeres. A fenti egyenletbe behelyettesítve, ha feltesszük, hogy $r_{\text{ref}} = 2,5$ Å és $A_{\text{ref}} = 0.7$ továbbá $A_{IS} = 1$ (illetve 150 ms-nál $A_{IS} = 2$) akkor a mért intenzitások alapján kiszámolható, hogy 100 ms keverési időt használva r_{IS} -re 2,35, 150 ms-nál pedig 2,10 Å-t kapunk. Másképpen kifejezve ez azt jelenti, hogy az NOE intenzitás 100%-os hibája az abból számolt távolságban csupán 11%-os hibát okozott.



7. Ábra: I és S mag közötti NOE felépülése 10 ns korrelációs idő és 600 MHz-es spektrométer esetében és a spindiffúzió hatása az NOE felépülésre. I és S magok egyenlő távolságra (4 Å) vannak egymástól, X pedig egyenlő távolságra van a két másik spintől. A spindiffúzió I -től S -ig X -en keresztül az NOE felépülését gyorsítja, ezért r_{IX} -től függően torzítja a mért NOE intenzitást. Pontozott vonal: $r_{IX} = 2,5$ Å; szaggatott vonal: $r_{IX} = 3$ Å; folyamatos vonal: $r_{IX} = 4$ Å. Az ábrát a¹⁰⁰. publikációból szerkesztettem át.

Ha azt is figyelembe vesszük, hogy a modellezés során ez a két érték nagy valószínűséggel egy távolságkategóriába kerül, akkor belátható, hogy az NOE intenzitások szemi-kvantitatív interpretációja igen robusztus módszere lehet a makromolekulák konformációs sokaság-alapú modellezésének, amennyiben megfelelően nagy számú távolságkorlátot adható meg. Ennek némileg ellentmond, hogy az elmúlt tíz év során Vögeli és munkatársai munkássága révén ismét előtérbe került a keresztrelaxációs sebességek pontos kvantitatív mérése (exactNOE, vagy eNOE), és ez az irány már fehérje szerkezetmeghatározási eljárásokban is kezd megjelenni.^{102–105} Ez ugyanakkor azt is jelzi, hogy az NMR adatok alapján történő fehérje szerkezetmodellezés még manapság sem tekinthető rutin feladatnak, és a módszereket napjainkban is intenzíven fejlesztik.

Kisebb fehérjék szerkezetmeghatározásához megfelelő spektrális felbontás és hatékony vízelnnyomás használata mellett elegendő lehet a hagyományos 2D NOESY spektrum. Az impulzusprogramot (a fehérjeminta izotópjelzésétől függően) ilyenkor ¹⁵N- és/vagy ¹³C-spinlecsatolással kell kiegészíteni annak érdekében, hogy a keresztcsúcsok szingulettként jelenjenek meg a spektrumon.⁹² A NOESY spektrum heteromagok mentén való feloldása azonban drámai módon megnöveli a felbontást, ugyanakkor (a ¹⁵N- és ¹³C-feloldott kísérlet kombinációja esetében) nem csökkenti a keresztcsúcsok számát, ezért összességében jobb minőségű adatokat szolgáltat a szerkezet modellezéshez.⁹³ Továbbá a ¹⁵N-feloldott NOESY spektrumokkal H-H (pl. H^N(*i*)-H^α(*i*-1)) szekvenciális kapcsolatokat is igazolhatunk (2. ábra bal oldal).

A ¹⁵N-feloldott NOESY kísérlet a 2D NOESY és egy érzékenység-növelt ¹H-¹⁵N-HSQC szekvencia elemeit tartalmazza.⁹³ A koherenciaút a következő: **1H_i(t₁) → [NOE] → ¹H_j → [¹J_{NH}] → ¹⁵N_j(t₂) → [¹J_{NH}] → ¹H_j(t₃)**. A szekvencia során minden proton frekvencia jelölődik t₁ evolúciós idő alatt, azonban a detektálás idejére (t₃) csak azokhoz a protonokhoz jut mágneszettség, melyek ¹J_{NH} csatolásban állnak. A 3D spektrum F2(¹⁵N^H)-F3(¹H_j) menti vetülete a ¹H-¹⁵N spektrummal lesz teljes átfedésben, míg F1(¹H_i)-F3(¹H_j) dimenziók projekciója csak részben fog átfedni a 2D NOESY spektrummal, hiszen az alifás oldalláncok hidrogénatomjai egymással és aromás hidrogénekkal adott keresztcsúcsai nem jelennek meg. A vízelnnyomást leggyakrabban gradiens-szelekciós módszer szolgálja, mely során a víz mágneszettsége defókuszálódik, mialatt a detektálni kívánt koherencia z-irányú marad. A proton impulzusok fázisát úgy állítják be, hogy az H^N-k vízzel való gyors cseréje ne okozzon telítésátvitelt, ezáltal jelvesztést.^{93,97} Ha a fenti szekvenciában a keverési blokkot TOCSY-típusú

szekvenciaelemre cseréljük, akkor lényegében a ^{15}N -TOCSY-HSQC (2. ábra, baloldal) kísérletet kapjuk, ami a spinrendszer összes elemének ^1H kémiai eltolódását rendeli egymáshoz. (Ez részben átfedő információt ad a H(CCCO)NH kísérlettel.) Kisebb fehérjék esetében mindkét módszer jól működhet, nagyobb fehérjéknél előnyösebb a HCCH-TOCSY használata.⁹⁷

A ^{13}C -feloldott NOESY mérés kritikus pontja, hogy (mivel csak ^{13}C -jelzett mintáról lehet szó) meg kell oldani a C'-lecsatolást, mivel a spektrumon megjelenő C_α -C' csatolás okozta felhasadás az értékeléskor előnytelen lenne. Ezt szolgálja a t_2 evolúció alatt kiadott összetett impulzus. (^{13}C -lecsatolást természetesen a ^{15}N -NOESY esetében is alkalmazni kell, ha a fehérje ^{13}C -jelzett. Ezért a lecsatolást végző blokk használata az ilyen impulzusprogramokban általában opcionális.)^{92,97} A ^{13}C -NOESY F2(^{13}C)-F3($^1\text{H}_j$) vetülete a ^1H - ^{13}C HSQC spektrummal fed át, míg F1($^1\text{H}_i$)-F3($^1\text{H}_j$) projekciója a 2D NOESY-val átfedő spektrumot ad, mely nem tartalmazza a 2D NOESY teljes információtartalmát. Mivel a fehérjékben található hidrogénatomok (a hidroxilcsoportokat leszámítva) vagy nitrogénhez, vagy szénatomhoz kapcsolódnak, a ^{15}N - és ^{13}C -feloldott NOESY spektrumok némi átfedéssel tartalmazzák a 2D NOESY teljes információtartalmát, azonban a jelek jóval nagyobb feloldottságát teszik lehetővé.

II. 4. 4. Fehérjék szerkezetének modellezése NMR mérésekből származó paraméterek alapján

A szerkezetmodellezés következő lépése a NOESY spektrumok keresztcsúcsaihoz tartozó hidrogénpárok azonosítása a ^1H jelhozzárendelés ismeretében. Míg korábban ezt a lépést manuálisan oldották meg, a kétezres évek elejétől több olyan szoftveres megoldást is kifejlesztettek, mellyel a NOE csúcsok hozzárendelését automatizálni lehet^{101,106–108}. Ezek a fejlesztések az NMR adatok alapján történő *de novo* fehérje szerkezetmeghatározás legidőigényesebb lépését gyorsították fel, ugyanis amíg manuális módszerrel egy képzett szakember több hetes-hónapos munkája szükséges az esetenként több ezer keresztcsúcs azonosításához, az automatikus hozzárendelés időtartama a mai számítási kapacitások mellett néhány órára rövidül. Fontos megjegyezni, hogy sem a manuálisan sem az automatikusan hozzárendelt NOE csúcslista sem lehet mentes a hibáktól és a bizonytalan hozzárendelésektől. Ennek oka elsősorban a spektrális zaj és jelátfedések okozta bizonytalanság, aminek feloldása a manuális módszernél a szakember szubjektív döntéseitől is függ. Ugyan az automatizálás kizárja a folyamatból a szubjektumot (legalábbis egységes módon kezel bizonyos

önkéntesen meghatározott bemeneti paramétereket), a jelátfedés és a spektrális zaj jelenléte miatt az automatizálás problematikája rendkívül összetett, ezért nem meglepő, hogy a kérdésre többféle megoldás született.

A legtöbb ilyen számítási módszer iteratív módon működik, vagyis nagy számú és sok bizonytalanságot hordozó kezdeti hozzárendelésből meghatároz egy pontatlan és kezdetben rosszul definiált térszerkezeti modellt, mely alapján az első ciklusban listázott csúcsok lehetséges hozzárendeléseit leszűkíti, amiből egy újabb, már pontosabb és jobban definiált modellt hoz létre, és így tovább. Könnyen belátható, hogy ezzel a módszerrel az a legnagyobb probléma, hogy a kezdeti sok bizonytalanságot hordozó szerkezet pontatlanságai súlyosan befolyásolhatják a további lépések kimenetelét, például helyesen hozzárendelt NOE-k következő iterációs ciklusokból való kizárásával. A szakirodalomban általánosan elfogadott, hogy akár zaj valódi csúcsként való értelmezése, akár hiányzó proton jelhozzárendelések, akár az egyes minták közötti kémiai eltolódásbeli eltérések miatt a kezdeti NOE lista mindig tartalmaz hibákat. Az egyes automatizálási módszerek között az a lényegi különbség, hogy milyen módon kezelik a kezdeti NOE listát, illetve mi alapján kalibrálják az NOE-ből levezetett távolságokat. A legújabb fejlesztések révén az algoritmusok zöme a távolságok meghatározásakor képes a spindiffúzió és a belső mozgások okozta NOE intenzitásbeli torzulások korrekciójára is.¹⁰⁰ Az automatizált NOE hozzárendelésre fejlesztett megoldások nagy száma miatt az alábbiakban csak a két legszélesebb körben használt program, az ARIA és a CYANA működését mutatom be röviden (melyek jól reprezentálják a létező megközelítések főbb sajátosságait).

Az ARIA¹⁰⁷ (Ambiguous Restraints for Iterative Assignments) elsőként azokat az NOE-ket szűri ki a listából, melyek a felhasználó által definiált tolerancia alapján nem felelnek meg egyik hozzárendelt protonfrekvenciának sem. Ezután a megmaradt, de csúcsonként gyakran több lehetséges hozzárendelést is tartalmazó NOE készletből bizonytalan távolságkorlátokat generál, melyeket úgy számít ki, mintha az összes lehetséges hozzárendelés adna járulékot a távolsághoz:

$$d_{ambig} = \left(\sum d^{-6} \right)^{(-1/6)}$$
. Amennyiben az így kiszámolt távolságkészlet alapján optimalizált modellben a bizonytalan távolságkorlát megfelel valamelyik NOE-nek, akkor az addig feltételezett többi hozzárendelést elveti. A módszer fejlesztői úgy találták, hogy a végső szerkezet minősége és a kísérleti adatokkal való összeegyeztethetősége szempontjából nem az a legfontosabb tényező, hogy az első ciklusban a lehető legnagyobb számú távolságkorlátot határozzuk meg, hanem az, hogy a bizonytalanul hozzárendelt NOE-k minél nagyobb része tartalmazza a

helyes jelhozzárendelést is. Ezért a végeredmény szempontjából kritikus a csúcslistázás során beállított kémiai eltolódás tolerancia értéke.¹⁰⁹ Az ARIA-t napjainkban is fejlesztik: az újabb verziók egyre többféle korlát és korrekció figyelembevételére alkalmas beállításokat tartalmaznak, és a szimulált hűtés elvén működő molekuladinamikai modulok közül többféleképpen is kombinálható (pl. CNS, XPLOR).

A másik széleskörűen használt programsomag a CYANA (Combined Assignment and Dynamics Algorithm for NMR Applications, korábbi nevén DYANA¹¹⁰, Dynamics Algorithm for NMR Applications) szimulált hűtés alapú molekuladinamikai programra épül, és a CANDID (Combined Automated NOE Assignment and Structure Determination Module) algoritmussal kombinálva az automatizálást az ARIA-tól némileg eltérő módon valósítja meg. Ez a megközelítés két módszer kombinációját alkalmazza: a „hálózati horgonyzást” (network-anchoring) és a „kényszerfeltétel-kombinációt” (constraint-combination). Előbbi azon alapszik, hogy egy aminosav hidrogénjei a szekvenciálisan közeli (± 1 vagy 2 egység) aminosav hidrogénjeivel jellemzően egynél több NOE-t adnak. A szomszédos aminosavak hidrogénjeinek jellemző NOE jelsorozatai részben átfednek, ezért ebben a hidrogén-hidrogén távolság-hálózatban sok ^1H frekvencia többször is szerepel, mely csúcsait a program nagyobb súllyal veszi figyelembe a „magányos” csúcsoknál. A kényszerfeltétel-kombináció módszere a (zaj csúcsként való értelmezéséből vagy más okból) hibásan azonosított NOE-k kiszűrését szolgálja. A folyamat során a program a listából véletlenszerűen kiválasztott NOE-eket bizonytalanként azonosít (akkor is, ha csak egyetlen hozzárendelést talált az adott csúcsához), ezzel jelentősen csökkenti annak az esélyét, hogy kis számú az atompárok között hibásan azonosított kapcsolat nagy változásokat okozzon a modellben. Ezt a kezdeti lépést az ARIA-hoz hasonlóan iteratív ciklusok sorozata (jellemzően hét ciklus) követi, melyekben a CANDID által „megszűrt” és már kevesebb bizonytalanságot tartalmazó távolságkorlátokat a CYANA újabb szerkezetek optimalizálására használja fel. Az új ciklusban felépített szerkezetből az algoritmus meghatározza a várható NOE-k listáját, és ez alapján a kísérletileg mért csúcslistából további NOE-eket távolít el. A csúcslista többszöri szűrésének következtében (az ARIA és a CANDID esetében is) a kiindulási listához viszonyítva jelentős mennyiségű NOE-t hagyunk figyelmen kívül a végső szerkezet meghatározásakor, hiszen az összes lehetséges jelhozzárendelés figyelembevétele a szerkezettel inkonzisztens távolságokat eredményezne. Güntert (a CYANA és a CANDID fejlesztője) javaslata szerint¹¹⁰ a szerkezetmodellezés szempontjából az

az ideális, ha az utolsó iterációs ciklusban fel nem használt távoli (4-5 Å) NOE-k nem haladják meg az összes távoli NOE 25%-át. Az eljárás automatizáltsága tovább fokozható az ATNOS algoritmus (automated NOESY peak picking) alkalmazásával, mely a jel/zaj viszony meghatározása után közvetlenül a transzformált NOESY spektrum alapján végzi el a csúcslistázást, és az adatokat továbbítja a CANDID-nak. Ezzel a módszerrel tovább csökkenthető a felhasználó szubjektív megítélései következtében hibásan azonosított csúcsok száma, cserébe a felhasználó szabadsága a bemeneti adatok felülbírálásának tekintetében korlátozottabb.^{100,101}

A molekulaszerkezettel összefüggésbe hozható NMR paraméterek közül egyértelműen az NOE, illetve az abból kiszámított távolságjellegű kényszerfeltételek szolgáltatják a legértékesebb információt, mely alapján felépített modell további NMR paraméterek figyelembevételével pontosítható. A szerkezetfinomítás során további, pl. kötőszög-jellegű információk is felhasználhatók. A kötőszög-jellegű információ forrásai lehetnek a skaláris csatolások¹¹¹ (melyet pl. a fentebb már említett HNHA kísérletből nyerhetünk), maradék dipoláris csatolások, vagy főlánc kémiai eltolódások is¹¹². Utóbbi használata azért is kézenfekvő, mert ez a pontosan mérhető és a lokális szerkezetváltozásra igen érzékeny paraméter a jelhozzárendelés eredményeként egyébként is rendelkezésre áll. A kémiai eltolódáson alapuló szerkezetfinomítási módszer (CSI, kémiai eltolódás index¹¹³) azon a megfigyelésen alapszik, hogy a fehérje főlánc másodlagos kémiai eltolódásai (ami a mért és az ún. „random coil” kémiai eltolódások különbségéből határozható meg) korrelációt mutatnak a fehérjék másodlagos szerkezetével. A másodlagos kémiai eltolódás és a szekvencia ismeretében jól becsülhető bizonytalansággal előrejelezhetők a főlánc diéderes (ϕ és ψ) szögei, melyek a szerkezetfinomítás során további kényszerfeltételként alkalmazhatók. Ahogy az NOE-hozzárendelésre, a kötőszög-jellegű korlátok kiszámítására is több megközelítés létezik.

A TALOS¹¹² algoritmus a másodlagos kémiai eltolódásokat nagy felbontású fehérjeszerkezeteket tartalmazó adatbázis alapján az aminosav-szekvenciát átfedő tripeptidekre bontva ismert kötőszögekhez társítja, és kilistázza az egyes tripeptidekre vonatkozó 10 legjobb találatot. A találatok közötti ϕ , ψ kötőszögek-beli konszenzus mértéke alapján tripeptidek középső aminosavának főlánc lapsedőgeit előrejelzi és kiszámítja a kapott érték bizonytalanság mértékét. A program továbbfejlesztett változata (TALOS+¹¹⁴) ezen felül ún. mesterséges neurális háló-alapú osztályozás során valószínűsíti, hogy az adott aminosav milyen

másodlagos szerkezeti elemhez tartozik, ezzel tovább növelve az előrejelzés szempontjából jól használható aminosav egységek számát. További fejlesztés, hogy a TALOS+ az S^2 paraméterek becslése révén a rendezetlen régiókat is képes előrejelezni, és szükség szerint kizárni az elemzésből. A torziós szögek kémiai eltolódás és aminosavszekvencia alapján való becslésére egyéb algoritmusokat is fejlesztettek (népszerű pl. a DANGLE¹¹⁵), melyek működését itt nem részletezem.

A kémiai eltolódás index¹¹³ (CSI) módszer alkalmazása homológiamodellezéssel kombinálva bizonyos esetekben önmagában is alkalmas térszerkezet modellezésre, ami jó minőségű homológ fehérjeszerkezetek birtokában meglepően jó és gyors eredményt adhat, ami például a későbbi részletes, távolságadatokon alapuló modellezés folyamatát is segítheti, vagy hiányos adatok esetén adhat támpontot. Az ilyen típusú bioinformatikai eszközökre számos példa található, pl. a CS23D¹¹⁶, a PREDITOR¹¹⁷ és a CS-ROSETTA^{118,119} programok.

II. 4. 5. Fehérjedinamika vizsgálata ¹⁵N-relaxáció mérésével

Oldatfázisban a fehérjemolekulákon belül ps-ns időskálán történő molekuláris mozgások vizsgálatára az NMR spektroszkópia speciális módszerei különösen hatékony eszköznek bizonyulnak, mivel a spinrelaxáció (vagyis a gerjesztett magspinnek termikus egyensúlyának exponenciális függvény szerinti visszaállása) forrása maga a mozgás, pontosabban a molekulák mozgásai által keltett fluktuáló elektromágneses tér. Ezért, ha kellő pontossággal mérjük a relaxációs paramétereket, azok megfelelő interpretálásával betekintést nyerünk a fehérje globális és belső, lokális mozgásaiba. $\frac{1}{2}$ -es spinű izotóppal (legalább ¹⁵N) jelzett fehérjék esetében a leggyakoribb alkalmazás a ¹⁵N T_1 (spin-rács v. longitudinális), T_2 (spin-spin, v. transzverzális) relaxációs idő és a heteronukleáris (¹H-¹⁵N) NOE kísérleti meghatározása, mely paramétereket globuláris szerkezettel rendelkező fehérjék esetében leggyakrabban az ún. modellmentes Lipari-Szabó-féle közelítéssel értelmezzük.¹²⁰ A relaxációs paraméterek és a molekuláris mozgások meglehetősen összetett módon függenek össze, ezért a fehérjedinamika interpretálására többféle megközelítés létezik, melyek közül itt csak a leggyakrabban alkalmazott módszereket ismertetem.

A makromolekulán belüli fluktuációk frekvencia szerint szétbontva a spektrális sűrűségfüggvény ($J(\omega)$) segítségével írhatók le. A teljes spektrális sűrűségfüggvény megadásával meghatározható a proton-proton dipoláris relaxációs sebesség, viszont ehhez hat egyenlet megoldása és hatféle kísérleti paraméter ismerete lenne szükséges¹²¹, melyek precíz mérése és interpretálása nehézkes lenne.

Ezt elkerülendő, gyakran alkalmazzák a redukált spektrális sűrűség térképezés módszert, mely során azzal az egyszerűsítéssel élnek, hogy a függvény nagyfrekvenciás tagjait ($J(\omega_H+\omega_N)$, $J(\omega_H)$ és $J(\omega_H-\omega_N)$) egyetlen taggal helyettesítik ($J(0,87 \omega_H)$). Ezzel a közelítéssel a módszer a spektrális sűrűség három frekvencián történő meghatározására egyszerűsödik. Ehhez háromféle relaxációs paraméter mérése szükséges, melyek a következő egyenletek szerint függenek össze a frekvenciákkal:

$$J(0) = \frac{-3}{4(3d^2+c^2)} R_1 + \frac{3}{2(3d^2+c^2)} R_2 + \frac{-9}{10(3d^2+c^2)} \frac{\gamma_N}{\gamma_H} R_1 (NOE-1) ,$$

$$J(\omega_N) = \frac{1}{(3d^2+c^2)} R_1 + \frac{-7}{5(3d^2+c^2)} \frac{\gamma_N}{\gamma_H} (NOE-1) ,$$

$$J(0,87\omega_H) = \frac{1}{5d^2} \frac{\gamma_N}{\gamma_H} R_1 (NOE-1) ,$$

ahol $R_1 = 1/T_1$, $R_2 = 1/T_2$, d a (^1H - ^{15}N) dipoláris relaxáció, c konstans pedig a kémiai eltolódás anizotrópia (CSA), mely értékek egyéb, a mérés körülményei és a használt atommagok szerint vett konstansokból számíthatók ki. A redukált spektrális sűrűség térkép grafikus ábrázolása önmagában is informatív kvalitatív információt szolgáltat a molekulán belüli mozgásokról, és rendezetlen fehérjékre is használható.

Globuláris fehérjék esetében a relaxációs paraméterek N^{H} kötésvektorok mozgásával való összefüggése hatékonyan interpretálható a Lipari-Szabó (ún. modell-mentes) megközelítéssel. Ez a megközelítés abból a feltételezésből indul ki, hogy a globális és lokális sztochasztikus mozgások frekvenciája között legalább egy (még előnyösebb, ha két) nagyságrendnyi különbség van, és a kétféle mozgás egymástól független. Ilyenkor a (C_i) korrelációs függvény globális és lokális komponensekre bontható. Izotróp diffúziót feltételezve a spektrális sűrűség függvény a következők szerint számítható ki:

$$J(\omega) = \frac{2}{5} \left[S^2 \frac{\tau_c}{1+\omega^2\tau_c^2} + (1-S^2) \frac{\tau}{1+\omega^2\tau^2} \right] ,$$

$$\tau = \tau_c + \tau_e ,$$

ahol τ_c a globális, τ_e a globális korrelációs idő és S^2 a rendparaméter, mely a N-H kötésvektor mozgását jellemzi. Az S^2 értéke 0 és 1 között változhat, ahol a 0 érték a kötésvektor teljesen szabad mozgásának, 1 pedig a (lokálisan) mozdulatlan vektornak felel meg. A rendparaméter aminosav-szekvencia mentén való ábrázolása

szemléletes információt szolgáltat a fehérje belső dinamikájáról, és az S^2 értékeiben felfedezhető trendek általában jól megfelelnek a másodlagos szerkezeti elemek mintázatának, mivel a hidrogén-kötésben résztvevő egységek mozgása beszűkül. A fehérjedinamikai adatok ilyen ábrázolása különböző körülmények között mért, vagy egymástól kis mértékben eltérő (pl. pontmutációval létrehozott variáns) fehérjék dinamikájának összehasonlítására is célszerű.

Attól függően, hogy egy molekulán belül milyen időskálájú mozgások jelennek meg, a belső mozgások leírásához a Lipari-Szabó-féle megközelítés öt szintjét alkalmazhatjuk. Az első megközelítés szerint a τ_c értéke eleve ismert (más kísérleti módszerből vagy a T_2/T_1 alapján való becslésből), és csak a rendparamétert illesztjük. Az egy fokozattal bonyolultabb leírás szerint – mely egyben talán a leggyakrabban alkalmazott leírasmód – a globális rotáción kívül a gyors ($\tau_c \leq 200$ ps) mozgások dominálnak, ilyenkor S^2 -t és τ_c -t illesztjük. Ha μ s-ms időskálájú mozgás jellemzi a rendszert (pl. konformációs csere esetében) akkor egy új tag jelenik meg (R_{ex}) a T_2 járulékaként, ilyenkor az S^2 -et és az R_{ex} -et illesztjük. A további két megközelítést akkor alkalmazzák, ha egyszerre többféle időskálájú mozgás jellemzi a belső dinamikát, mindkét esetben háromféle paraméter illesztése történik. A vizsgált rendszerhez leginkább megfelelő megközelítés kiválasztása előzetes ismeretek és próbálkozás alapján történik, mely során célszerű törekedni a még tolerálható illesztési hiba mellett a lehető legkevesebb paraméter illesztésére.¹²¹

A T_1 és T_2 időállandók úgy határozhatók meg, hogy a megfelelően megtervezett impulzusszekvenciába inkrementált várakozási idő sorozatot építenek, melynek következtében a kísérletsorozat eredményeként a spektrumokon – mely tipikusan ^1H - ^{15}N HSQC-jellegű 2D-sorozat vagy pszeudo-3D mérés – megjelenő csúcsok intenzitása a késleltetési idő függvényében változik. Az egyedi csúcsok intenzitás vagy térfogati integrál értékeit illesztve az adott kísérletekhez tartozó várakozási idő ismeretében megkapjuk a T_1 és T_2 értékeket minden egyedi ^{15}N -re. A heteronukleáris $\{^1\text{H}\}\text{X}$ „steady-state” (a legtöbb esetben $\text{X} = ^{15}\text{N}$) NOE mérésével pedig a dipoláris csatolásban álló magok közötti keresztrelaxációt vizsgáljuk. Ez a kísérlet egy olyan mérésből áll, melyek egyikénél alkalmazunk proton preszaturációt, a másikonál ezt elhagyjuk. Mivel ebben az esetben a H-H NOESY kísérlettől eltérően nem a két atom közti távolság meghatározása a cél, ezért a távolságot állandó értéknek tekintjük ($r_{\text{HN}} = 1,02 \text{ \AA}$), és a NOE differencia ($\text{NOE}_{\text{telített}}/\text{NOE}_{\text{telítetlen}}$) változásait figyeljük meg, és hozzuk összefüggésbe a molekuláris mozgással.¹²¹

II. 4. 6. Lassú konformációs csere vizsgálata: CEST-NMR

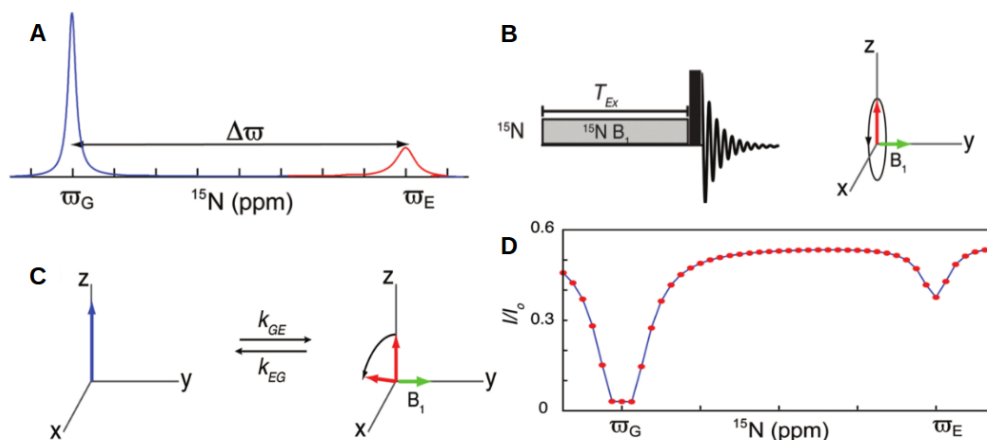
Ahogy az előző fejezetekből láthattuk, a fehérjék ps-ns időskálán létrejövő mozgásai befolyásolják a mérhető NMR paramétereket, melyek megfelelő értelmezésével jellemezhetjük magukat a mozgásokat. Az NMR néhány speciális módszere alkalmas az előzőekben leírtaktól eltérő időskálán az oldatban létrejövő dinamikus egyensúlyok vizsgálatára is. A ps-ns-nál lassabb (μs - ms) időskálára eső mozgások tanulmányozásának bevett módszere a CPMG (Carr-Purcell_Meiboom-Gill) relaxációs diszperzió. Az ilyen mozgások a T_2 relaxációhoz járulnak hozzá, és speciális mérés technikai módszerekkel a hozzájárulás mértéke megadható. Mivel jelen dolgozat eredményei között nem szerepel ilyen módszerből származó eredmény, a CPMG technikai megvalósítását nem részletezem.

A CEST módszer néhány évvel ezelőtt jelent meg a szakirodalomban, először a mágneses magrezonancia képalkotó (MRI) módszerek között.¹²² Lényege, hogy cserélhető protonokat tartalmazó molekulákat (melyek lehetnek például kontrasztanyagok) szelektíven besugároznak, és a jeleket indirekt módon – a vízzel való kémiai csere révén – a közeg vízmolekuláinak NMR jelén keresztül detektálják, és ezzel jelentős érzékenységnövekedést érnek el. Lewis Kay és munkatársai csupán néhány éve vetették fel az ötletet, hogy hasonló kísérleti összeállítás – ám a vízmolekulákkal való csere nélkül – a lassú konformációs cserefolyamatok vizsgálatára is alkalmas lehet.¹²³

Az eddig bemutatott NMR kísérletekben első lépésként a vizsgált frekvenciatartományt átfogó szélessávú gerjesztést alkalmaztunk. Az ilyen módszerrel rögzített spektrumokon a kis populációban jelenlévő lassan cserélő partnerek jelei beleolvadnak a zajszintbe, ezért nem megfigyelhetők. A CEST kísérlet során ezzel szemben gyenge (szelektív) B_1 térrel pásztázzuk a spektrum frekvencia tartományát miközben a „látható”, fő konformáció jeleinek intenzitásváltozásait követjük. Ha az oldatban rejtett cserepartner található, akkor a B_1 frekvenciájától függő intenzitásváltozásokból következtetni lehet a minor állapotok kémiai eltolódására, életidejére és populációjára is.¹²³

Fehérjék főlánc konformációjának változásaira nagyon érzékenyek a $^{15}\text{N}^{\text{H}}$ atomok, ezért fehérjevizsgálatok során kézenfekvő a ^{15}N -CEST alkalmazása. A kísérlet sematikus ábrázolása a 8/B. ábrán látható. A fő konformáció NMR jelétől (ω_G , „Ground state”) adott frekvenciatávolságra ($\Delta\omega$) gyenge B_1 gerjesztő impulzust adunk ki annyi ideig (~ 4 s), amíg igen sok csere megvalósulhat, amennyiben a konformációváltozás sebessége $T_{\text{ex}} \sim 100\text{-}1000$ s⁻¹ tartományba esik.

Ezt egy 90° -os impulzus, majd a ^{15}N kémiai eltolódás (az amid protonon keresztül) kiolvasása követi. Ezután változtatunk a $\Delta\omega$ értékén, és addig ismétljük a kísérletet, amíg az alkalmazott B_1 frekvenciákkal lefedjük a teljes ^{15}N spektrumot. Abban az esetben, ha $\Delta\omega$ távol esik ω_E -től (ω_E , „excited state”) a ω_G intenzitása egyenlő lesz azzal az esettel, mikor $B_1 = 0$. Viszont ha a B_1 frekvenciája ($8/C$, zöld színű vektor) megközelíti ω_E értékét, akkor a minor konformációhoz tartozó ^{15}N spinek az y -tengely körüli precesszióba kezdenek (8. ábra C), ami a csere következtében (a kék vektorral jelzett) ω_G polarizációját csökkenti. Ha ω_G intenzitását ábrázoljuk az alkalmazott $\Delta\omega$ értékek függvényében, akkor ω_E -nél intenzitáscsökkenést tapasztalunk (8. ábra D).



8. Ábra: A CEST módszer elve. **A:** „G” major (kék) és „E” minor konformációk elméleti ^{15}N spektruma (piros). Az ábrázolás kedvéért „E” állapot kémiai eltolódása is látható intenzitású, de a valóságban ez a jel nem detektálható a hagyományos NMR spektrumon. **B:** Baloldalt a CEST kísérlet egyszerűsített sémája, jobboldalt E állapot gerjesztésének bemutatása vektor modellel. **C:** Cserében lévő G és E állapotok mágneszettsége vektor modelles ábrázolásban. **D:** ω_G intenzitásváltozás a B_1 offset ($\Delta\omega$) függvényében. Az ábrát a ¹²³. publikációból szerkesztettem át.

A CEST módszer előnye a CPMG relaxációs diszperzióval szemben, hogy annál érzékenyebb és robusztusabb. Ennek az az oka, hogy amíg a diszperziós módszernél a major populációhoz tartozó állapotot gerjesztjük és a keverés a transzverzális relaxáció során történik, a CEST kísérlet esetében a gerjesztett minor populáció (a gyakran egy nagyságrenddel hosszabb) longitudinális relaxáció során befolyásolja a másik állapot polarizációját, az adatok kiolvasása azonban már a major populáción keresztül történik. Ezáltal a CEST-tel jelentős jelerősítési effektus érhető el, így a minor cserepartner jóval kisebb populációja is kimutatható, és annak kémiai eltolódása is pontosabban meghatározható.

A mérhető effektus nagysága természetesen ennél a módszernél is függ az alkalmazott B_1 tér erősségétől és a keverési idő hosszától, ezért a szerzők a kezdeti vizsgálatoknál nagy ν_1 és hosszú T_{ex} értékek alkalmazását javasolják. Ezután, ha láthatatlan cserepartnerek jelét észleljük, többféle B_1 térerősségnél is érdemes megvizsgálni a rendszert, így kompromisszumot köthetünk a detektált effektus erőssége és a megfigyelhető vonalszélesség között.

II. 4. 7. Fehérje-oldószer cserefolyamatok vizsgálata: CLEANEX-NMR

Az oldószerrel való cserefolyamatok vizsgálatára már régóta sikerrel alkalmaznak mágneszettség-transzferen alapuló NMR cserespektroszkópiás méréstechnikákat.¹²⁴ A módszer megvalósítása leggyakrabban az oldószer (mely makromolekulák esetében általában víz) szelektív gerjesztésével és mágneszettség cserében résztvevő protonokon való detektálásával történik. Az ilyen kísérletek során az okozhat méréstechnikai nehézséget, hogy a víz frekvenciájához közel eső H_α eltolódások az NOE révén, illetve az oldószerrel gyors cserében álló protonok NOE járuléka a spektrumon műtermékeket eredményezhetnek. Előbbi kiküszöbölését sikerrel oldották meg ^{13}C -jelzett minták esetében szelektív elnyomási szekvenciával^{124,125}, jelöletlen minták esetében pedig spin-echo szűrő beépítésével.¹²⁶ Az utóbbi hatás hozzájárulásának mértékét NOESY és ROESY spektrumok (igen időigényes) összehasonlításával lehetett azonosítani, de a cserespektrumok értelmezését a gyors csere jelenléte így is nagyon komplikálttá tette. A CLEANEX „tisztá” cserespektroszkópiai módszerrel¹²⁷ a spinek z-tengely mentén való tartása révén mindkét NOE járulékot egyszerre szüntették meg, ezáltal lehetővé vált a csere sebesség pontos meghatározása. A módszer hatékonyságát egy spin-lock szekvenciablokk beépítésével továbbfejlesztették¹²⁸, ezzel a fejlesztéssel a TOCSY-járulékokat is kiiktatták. Az amidproton csere sebességek vizsgálata céljából később a CLEANEX-PM módszert fast-HSQC-vel kombinálták, ami a gyors adatgyűjtést, a jó spektrális feloldást és az egyszerű kiértékelést egyszerre teszi lehetővé.¹²⁸

III. Anyagok és módszerek

III. 1. A vizsgált anyagok előállítása

III. 1. 1. Biotechnológiai úton előállított PAF változatok

A kutatás kezdeti szakaszában méréseinket a vad típusú *Penicillium chrysogenum* Q176 (ATCC 10002) törzsből termeltetett PAF fehérjén végeztük a korábbiakban leírtak szerint¹⁶. Mivel ezzel a törzssel csak limitált (~ 1 mg/l) mennyiségű fehérje termelhető, kísérleteink előrehaladtával felmerült az igény egy nagyobb fehérjekihozatalra képes termelő (ún. expressziós) rendszerre.

Erre az egyik megoldás a *Pichia pastoris* élesztő rendszerben való heterológ termeltetés volt, melyről már korábbi vizsgálatok kimutatták, hogy alkalmas az eredetivel azonos szerkezetű PAF termelésére.¹⁶ A *Pichia pastoris* expressziós rendszer előnye (az elterjedt prokarióta szervezettel pl. *E. coli*-val való fehérjetermeléssel szemben), hogy az antifungális fehérjék eredeti termelőjéhez hasonlóan eukarióta szervezet, ezért a fehérjeszintézist követő érési folyamatokért felelős útvonalak nagyban hasonlítanak az eredeti termelő szervezetben lejátszódó folyamatokra. Ezért az élesztő-alapú rendszer egy prokarióta rendszerekhez viszonyítva nagyobb valószínűséggel alkalmas az eredetivel azonos módon feltekeredett fehérje előállítására¹²⁹. A *Pichia* rendszerrel megfelelő szignálszekvencia alkalmazásával elérhető extracelluláris fehérjetermelés, amivel a technológia során elkerülhető a sejtek feltörésének lépése, ezáltal jelentősen egyszerűsíthető az elválasztás (hiszen a sejteket elegendő centrifugálással kiülepíteni, és a felülúszót tisztítani). A klónozás és termeltetés lépéseinél az expressziós rendszer gyártója által javasolt eljárást¹³⁰ követtük. A diszulfidmintázat feltérképezését célzó fehérjeváltozatokban adott cisztein oldalláncokat egyesével vagy párosával szerin oldalláncra cseréltünk. Ezzel a módszerrel az alábbi változatok készültek el: PAF^{C7S}, PAF^{C14S}, PAF^{C28S}, PAF^{C7S-C36S}, PAF^{C28S-C54S}.

A kutatás még későbbi szakaszában partnereink biotechnológiai fejlesztései révén a *Pichia* rendszerrel is nagyobb kihozatalt értük el egy olyan *Penicillium chrysogenum* törzssel, melyből az eredeti *pafl* gént eltávolították²¹, ezáltal elkerülték a natív és módosított termék együttes termelődését (enélkül ugyanis jelentős elválasztástechnikai problémába ütköztünk volna). Ez a PAF variánsokat túltermelő törzs az ún. *Δpafl Penicillium C3*, mely a korábbi rendszereknél jóval magasabb

kihozatalt produkált és a *Pichianál* technológiailag is könnyebben kezelhető (pl. a rövidebb kultivációs idő és a sejtek egyszerűbb eltávolítása miatt). A PAF^{D19S} változatot és a hőmérséklettől függő mérésekhez használt ¹⁵N-jelzett fehérjeminták egy részét is ezzel a törzssel állítottuk elő²¹.

A *Δpaf Penicillium C3* rendszer esetében a fehérjetermeltetés fermentációs körülményeit (kisebb változtatásokkal) a korábban leírtak szerint állítottuk be¹⁶: Steril Petri csészén vagy Pasteur flaskában steril fülke alatt a 2% agart tartalmazó szilárd PCMM táptalajra csészénként a termelő törzs 100 μl 2·10⁸ spóráját tartalmazó szuszpenzióját szélesztettünk. (PCMM: *Penicillium chrysogenum* minimal medium: 35,3 mM NaNO₃ (¹⁵N-jelzés esetében Na¹⁵NO₃), 2 mM MgSO₄, 6,7 mM KCl, 0,18 mM FeSO₄, 58 mM szacharóz (¹³C jelzés esetében szacharóz helyett 99.9%-ban egységesen ¹³C-jelzett glükóz). A tápközeg összetevőit 25 mM káliumfoszfát pufferben (pH = 5,8) oldottuk fel, majd a tápközeg a következő nyomelemeket tartalmazó oldattal egészítettük ki: 0,1% FeSO₄·7 H₂O, 0,9% ZnSO₄·7 H₂O, 0,04 % CuSO₄·5 H₂O, 0,01% MnSO₄·H₂O, 0,01% H₃BO₃, 0,01% Na₂MoO₄·2 H₂O, mely törzsoldatot a kész táptalaj ezerszeres hígításban tartalmazott.) A 25°C-n, 4-5 nap alatt felnőtt (a spórázást a tenyészet fehérből zöld színűvé válása egyértelműen jelzi) tenyészet felszínére 5 ml steril nemionos detergenst tartalmazó fiziológiás sóoldatot (0,9% NaCl, 0,01% Tween 80) pipettáztunk, amivel a frissen kinyert konídiumokat szuszpenzióba vittük. A szilárd szennyezőket a konídiumok kiülepítésével távolítottuk el (centrifugálás 2500 rpm fordulaton, 5 percig szobahőmérsékleten 2-3 ciklusban, míg a felülúszó áttetszővé vált). Az így nyert spórasuszpenziót két héten belül használtuk fel, ezután a konídiumok életképessége tapasztalataink szerint jelentősen csökken. Mivel a keletkező biomassza és a termelődő fehérje mennyisége szempontjából kritikus a kiindulási csíraszám, megfelelő hígítás után Bürker-kamra segítségével meghatároztuk a szuszpenzió térfogatára vonatkoztatott konídiumok számát. Az optimális fehérjekihozatal érdekében 100 ml folyékony PCMM tápközeghez 10⁸ spórát inokuláltunk. A kultúrákat ½, 1, vagy 2 literes üveg Erlenmeyer lombikokban rázattunk. A megfelelő levegőztetés céljából a tápközeg a lombik térfogatának legfeljebb 1/5-ét töltötte ki. A lombikokat két réteg steril alufóliával vagy cellulózdugóval zártuk le, és 210 rpm fordulatszámmon 25°C-n 72-96 órán át rázattuk.

A fehérjét a fermentáció felülúszójából szintén a korábban közölt módszer szerint izoláltuk¹⁶. Ez az elválasztási stratégia a fehérje magas izoelektromos pontján és kis méretén alapszik és három lépésben hajtható végre:

(1.) molekulatömeg szerinti szűrés 30 kDa áteresztőképességű membránnal, (2.) a fehérje kromatográfiás elválasztása kationcserélő kromatográfiával, majd (3.) az elúcióhoz használt só eltávolítása és a fehérje koncentrációja MWCO = 3 kDa dialízis membrán vagy ugyanilyen paraméterekkel rendelkező membránnal ellátott centrifugacső (Millipore Amicon® Ultra) segítségével. A termeltetés és tisztítás fázisait 18 V/V% akrilamid tartalmú nátriumdodecilszulfát poliakrilamid gélelektroforézis (SDS-PAGE) segítségével követtük, a gélen megjelenő fehérjesávokat Comassie festéssel tettük láthatóvá. A megtisztított termék tömegét és tisztaságát minden esetben ESI-MS tömegspektrometriás módszerrel igazolták (az MS adatok a vonatkozó publikációk^{15,16,20} kiegészítő anyagaiban találhatóak).

A fehérjeelválasztáson a *Pichia* rendszer használatakor módosítani kellett, ugyanis a *Penicillium* rendszerrel alkalmazott tápközeghez képest a *Pichia* fermentáció tápközege jóval nagyobb ionerősségű oldat, ami csökkenti a fehérjék kationcserélő töltethez való kötődésének mértékét. Ezért a fermentáció lecentrifugált felülúszóját addig hígítottuk desztillált vízzel, amíg elektromos vezetőképessége 9 mS/cm alá csökkent.

A debreceni laboratóriumban az ottani körülményeknek megfelelően optimalizáltuk a fent leírt elválasztást. Ennek során a lépések sorrendjén és az oszloptölteten is változtattunk (CM Sephadex C-25, Pharmacia Fine Chemicals AB Uppsala, Sweden). A két réteg gézen átszűrt felülúszót közvetlenül atmoszférikus nyomáson üvegoszlopra vittük, majd a sókoncentrációt öt lépésben keresztül 100 ml-ként növeltük (100, 200, 500, 800 mM és 1M NaCl oldattal). Az elúció során 5 ml térfogatú frakciókat gyűjtöttünk, melyek abszorbanciáját 280 nm gerjesztési hullámhossz mellett spektrofotométerrel határoztuk meg. A legmagasabb abszorbanciát mutató frakciókat összegyűjtöttük, és két lépésben (MWCO = 30 kDa, 3 kDa) méret szerint szűrtük Millipore Amicon® Ultra típusú centrifugacsőbe illeszhető membrán segítségével. Az első méret-szerinti szűrés a 30 kDa-nál nagyobb fehérjék eltávolítását szolgálja, ekkor a membrán áteresztőképessége alatti mérettartomány a centrifugacső alsó részében gyűlik össze, mely rögtön továbbítható a 3 kDa áteresztőképességű membránra. A második lépés során a 3 kDa-nál kisebb szennyezőket távolítjuk el, ilyenkor a kívánt (6,3 kDa méretű) fehérje a membrán feletti térrészben dúsul. A folyamat végén a teljes termelődött PAF mennyiség egyetlen centrifugacsőbe került. A sómentesítéshez a fehérjét szintén a MWCO = 3 kDa membrán segítségével koncentráltuk, majd a kívánt oldatkörülményeknek megfelelő puffert adtunk hozzá. Ezt a lépést a kiindulási

sókoncentrációtól függően 5-10 ciklusban ismételtük a kívánt oldatkörülmények eléréséig.

A hármas rezonancia kísérletekhez használt ^{15}N - ^{13}C izotóppal „kétszeresen” jelzett változatát és a ^{15}N -PAF^{D19S} változatot partnerünk, Dr. Florentine Marx (Innsbruck Medical University, Institute of Molecular Biology) kutatócsoportjában állították elő. Később a továbbfejlesztett technológiát²¹ Debrecenben is sikerrel alkalmaztuk, és a PAF számos egyéb változatát állítottuk elő, többféle izotópjelölési stratégiával.

Sok esetben a nagy anyagköltség miatt az izotóppal dúsított fehérjeminták korlátozott mennyiségben álltak rendelkezésünkre, ezért amikor az lehetséges volt, a fehérjét fentebb leírt kromatográfias, vagy (a szennyező természetétől függően) klasszikus dialízis segítségével nyertem vissza. Ilyen módon egy adott mintát a tisztaság és a fehérjekoncentráció ellenőrzése után többször is felhasználtam.

III. 1. 2. Kémiai szintézissel előállított PAF

A kémiai szintézissel előállított PAF fehérjét Dr. Váradi Györgyi (Szegedi Tudományegyetem, Orvosi Vegytani Intézet) szintetizálta natív kémiai ligáció és oxidatív feltekerés módszerek kombinációjával¹³¹.

A PAF lineáris (redukált) és annak oxidált formáit azonos összetételű pufferben vizsgáltuk ($\text{H}_2\text{O}:\text{D}_2\text{O} = 93:7$, 20 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$, pH = 6.0, 0.04% NaN_3 , 40mM NaCl), mindkét esetben 1 mg fehérjét oldottunk 275 μl pufferben, és a méréseket Shigemi NMR csőben végeztük.

III. 1. 3. Szelektív ^{15}N jelöléssel ellátott tetrapeptid

A PAF fehérjében közvetlenül nem megfigyelhető konformációk mennyiségi meghatározásához⁶⁵ referencia vegyületként szükségem volt olyan rövid peptide, amely nem rendelkezik harmadlagos szerkezettel és legalább az egyik (nem az N-terminális végen található) amid nitrogén szelektíven ^{15}N jelzett. Erre a célra az Arg-[(^{15}N)Ala]-Gln-Ile tetrapeptidet használtuk, amit szintén Dr. Váradi Györgyi szintetizált ^{15}N -Alanin (Cambridge Isotope Laboratories Inc.) felhasználásával.

III. 2. Az alkalmazott NMR módszerek

III. 2. 1. ^1H NMR

Mivel munkám során csak rendezett, globuláris fehérjéket vizsgáltam, minden új minta esetében először a fehérje feltekeredett állapotát kellett igazolni. Ezért minden mérési sorozat első kísérlete egy könnyűvízben felvett ^1H -NMR spektrum volt, ahol watergate-5¹³² vagy 3-9-19¹³³ szekvencia-blokkot tartalmazó vízelnyomási technikát alkalmaztunk. Amennyiben az amid protonok jelei az 5-10 ppm régióban diszperzen oszlanak el és éles jeleket adnak, az feltekeredett, rendezett szerkezetű fehérje jelenlétére utal. Rendezetlen vagy denaturálódott fehérje esetében az amid protonok jelei a peptidlánc nagyfokú mobilitása miatt sokkal kisebb spektrális régióba (~7-9 ppm) zsúfolódnak össze, gyakran kiszélesednek, és nehezen elkülöníthető csúcsokat eredményeznek (pl. 59. oldal, 10. ábra).

III. 2. 2. Jelhozárrendelés és szerkezeti paraméterek gyűjtése

A ^{15}N - ^{13}C -jelzett PAF esetében a főlánc ^1H , ^{15}N és ^{13}C atomok jelhozárrendelését a Bruker Topspin 2.1 szoftver szekvenciakönyvtárban hozzáférhető két- és háromdimenziós NMR kísérletek alapján oldottam meg. Minden ^1H - ^{15}N korreláció alapjául az érzékenységnövelt¹³⁴ ^1H - ^{15}N HSQC spektrum szolgált. A fehérje főlánc N^{H} , H^{N} illetve C_{α} , C_{β} atomjait és az aminosavmaradékok közti szekvenciális kapcsolatokat a HNCA^{135} - $\text{HN}(\text{CO})\text{CA}^{136}$, HNCACB^{137} - $\text{CBCA}(\text{CO})\text{NH}^{138}$ és $\text{HN}(\text{CA})\text{CO}^{136}$ - HNCO^{139} kísérletek alapján azonosítottam. A 3D kísérletek ^{13}C -dimenziójának spektrális ablakát a 2D ^{13}C - ^1H HSQC-n megjelenő jelek alapján optimalizáltuk.

A ^{13}C - ^{15}N -jelzett PAF-ban az oldallánc ^1H és ^{13}C atomok azonosítását $\text{HCC}(\text{H})\text{-TOCSY}^{140}$ - $\text{HCC}(\text{H})\text{-COSY}$, $\text{CBCA}(\text{CO})\text{NH}^{138}$, és ^{15}N -feloldott $\text{HSQC}\text{-TOCSY}^{141}$ spektrumok manuális elemzésével végeztem, az aromás protonok hozzárrendeléséhez 2D $\text{CB}(\text{CGCD})\text{HD}$ és $\text{CB}(\text{CGCDCE})\text{HE}$ kísérleteket¹⁴² használtam. A $\text{PAF}^{\text{D}19\text{S}}$ esetében, ami ^{15}N jelöléssel, de ^{13}C jelölés nélkül állt rendelkezésre, a ^{15}N -feloldott 3D NOESY és TOCSY kombinációján alapuló jelhozárrendelési stratégiát alkalmaztam (24. oldal, 2. ábra, bal oldal). A hidrogénatomok jelhozárrendelése és a szekvenciális kapcsolatok igazolása ^{15}N -feloldott $\text{HSQC}\text{-NOESY}^{125}$ és $\text{HSQC}\text{-TOCSY}^{143}$ spektrumok kombinációjával az $\text{NH}_i\text{-H}\alpha_{i-1}$ térközelség alapján történt. Ezeket az adatokat a természetes ^{13}C izotópgyakoriság mellett ^1H - ^{13}C -HSQC spektrum segítségével egészítettem ki ^{13}C

kémiai eltolódás adatokkal. Az egykötéses ^1H - ^{13}C korrelációk többségében (különösen β és γ oldallánc protonoknál), mikor a jelek nem fedtek át a ^1H dimenzióban, a szén kémiai eltolódások azonosítása az ^1H - ^{13}C -HSQC spektrum alapján lehetséges volt a proton hozzárendelés ismeretében. Kémiai eltolódás referenciának minden esetben 4,4-dimetil-4-szilapentán-1-szulfonsavat (DSS) használtunk külső referenciaként, melynek ^1H spektumát az előzőleg felsorolt kísérletekkel megegyező körülmények között vettünk fel és a heteromagokra indirekt módon referáltunk.^{144,145}

A hidrogén-hidrogén távolságkorlátokat a 700 MHz-n felvett ^{15}N -feloldott HSQC-NOESY és ^{13}C -feloldott HSQC-NOESY spektrumok keresztcsúsaiból nyertem a ^{13}C - ^{15}N jelzett PAF esetében. A keverési idő minden esetben 130 ms volt. A PAF^{D19S} változatnál ^{13}C jelzés hiányában az összes NOE keresztcsúcsot a ^{15}N -lecsatolt homonukleáris 2D ^1H - ^1H NOESY spektrum szolgáltatta. Mindkét esetben sikerrel alkalmaztam az ATNOS-CANDID¹¹⁰ módszert a NOESY spektrumok keresztcsúcsainak azonosítására és intenzitásának meghatározására. Ezt a lépést a CYANA 2.1 molekuladinamikai programcsomaggal kombinálva, a szerkezetmodellezéssel egyszerre végeztem. A szerkezetmeghatározást 7 iterációs ciklusban 80 tagból álló sokaságokat generáltam, melyekből a 20 legalacsonyabb energiájú konformációt választottuk ki a végső konformációs sokaság kialakításához.

A számításokban felmerülő hibák keresése érdekében az iterációs ciklusok során kimenetként létrejött esetleges hibaüzeneteket és a H-H távolságokat listázó fájlokat a végső térszerkezettel összevetve manuálisan is elemeztem. Ezen kívül szisztematikusan – egyes H-H atompárok figyelmen kívül hagyásával – is ellenőriztem a számítások robusztusságát. Az így kapott szerkezeteket a főlánc ^{13}C kémiai eltolódásokból számított torziós szög jellegű kényszerfeltételekkel finomítottam, amihez a TALOS+ módszert alkalmaztam¹¹⁴.

III. 2. 3. Fehérjedinamika vizsgálata

A PAF^{D19S} dinamika vizsgálatára a korábbi mérésekkel megegyező körülmények között¹⁶ ^{15}N - T_1 , T_2 relaxációs idő és heteronukleáris NOE meghatározásával végeztük. A T_1 mérését a Topspin 2.1-ben kiadott gyártó által ajánlott programmal (*hsqct1etf3gpsi3d.2*) 10, 20, 40, 80, 120, 160, 240, 320, 640, 1280 és 2560 ms várakozási időkkel mértük, T_2 méréssorozat (*hsqct2etf3gpsi3d*) esetében 16.74, 33.47, 50.21, 66.94, 83.68, 100.42, 117.15, 150.62, 200.83, 251.04 és 301.25 ms késleltetési időt állítottunk be. Mindkét kísérletet pszeudo-3D

spektrumként rögzítettük. A $\{^1\text{H}\}^{15}\text{N}$ felvételére *hsqcnoef3gpsi* programot használtuk. A ps-ns időskálán történő molekuláris mozgásokat a három mért paraméter modell-mentes (Lipari-Szabó) értékelésével jellemeztük a Bruker Protein Dynamics Center szoftver segítségével a II. számú modell szerint. Ezzel a megközelítéssel (n számú aminosav egységenként értelmezett) n számú S^2 és n számú τ_e lokális-, illetve egy globális korrelációs (τ_c) paramétert illesztettük a mért $3n$ számú (T_1 , T_2 hetNOE) kísérletileg mért paraméterre.

III. 2. 4. Cserefolyamatok vizsgálta

A PAF és PAF^{D19S} oldatbeli szerkezetében a kis populációjú, de a fő konformációtól jelentősen eltérő kémiai eltolódást mutató (ám közvetlenül nem megfigyelhető) konformációk egy részét a CEST-NMR módszerrel mutattuk ki. A II. 4. 6. fejezetben leírt javaslatok szerint a kezdeti méréseknél többféle B_1 térerősséget is teszteltünk. A módszer fejlesztői kidolgozták a CEST intenzitásprofilok kvantitatív kiértékelését is, amit saját fejlesztésű programjukba (ChemEx) implementáltak.¹⁴⁶ Adatainkat eszerint a módszer szerint illesztve végeztünk kinetikai és mennyiségi meghatározást.

Mivel a módszer új volta miatt a műszergyártó könyvtárában még nem állt rendelkezésre a megfelelő szekvencia, a CEST mérésére alkalmazott programot a T_1 relaxációs idő méréséhez használt program módosításával hoztuk létre. A teljes ^{15}N kémiai eltolódás tartomány lefedésére 0,5 ppm egységenként összesen 61 szelektív ^{15}N besugárzási frekvenciát használtunk és az adatgyűjtést külön 2D spektrumok felvételével valósítottuk meg. A méréseknél a ^{15}N oszcilláló tér erősségét $\gamma B_1 = 25$ Hz-re állítottuk (az optimalizálás során ennek felét és kétszeresét is kipróbáltuk). Egy kísérleten belül (adott besugárzási frekvenciánál) négy szkent vettünk fel, a ^{15}N dimenzióban 128 inkrementumot állítottunk be. A szkenek között időt 1,7 s-ra, a kis teljesítményű besugárzó impulzusok hosszát pedig 0,4 s-ra állítottuk. Ezekkel a beállításokkal a 62 spektrumból álló kísérlet összesített időtartama kb. 24 óra volt. A kísérleteket háromszor ismételtük, a kiértékelés előtt a spektrumokat összeadtuk. A keresztcsúcsok térfogati integrálját Topspin 3.1 szoftverrel határoztuk meg és saját fejlesztésű Matlab szkriptek segítségével értékeltük ki. A ^{15}N -CEST profilokat a módszer fejlesztői által írt programmal, a ChemEx-szel illesztettük.¹²³ A ChemEx program segítségével a minor forma kémiai eltolódása mellett kinetikai paraméterek és a minor konformációs izomer populációja is kiszámítható volt.

A PAF^{D19S} változat esetében a megváltoztatott oldallánc és környezetének amid H^N-H₂O cseresebességét CLEANEX-PM¹²⁸ módszerrel határoztuk meg, és hasonlítottuk az eredeti fehérje azonos körülmények között meghatározott cseresebességeihez. A nyers adatokat a Topspin 3.0 lineshape-fitting funkciójának alkalmazásával nyertük, a görbék illesztését és a cseresebesség meghatározását Matlab programmal végeztük. A teljes görbe illesztésből kaptuk a cseresebességet és két relaxációs paramétert. A kezdeti sebesség közelítésből kapott görbe meredeksége $t = 0$ időpontban ugyanazt a (k) cseresebesség értéket adta. Az értékelésnél az adott keverési idejű kísérlet kis csúcsainak integrálját úgy lehetett megbízhatóan a referencia kísérlet nagy csúcsára normálni, ha az alapértelmezett integrálási rutin helyett a Topspin 3.0 3D csúcsillesztő rutinjával adtuk meg a térfogatokat.

III. 2. 5. A hőmérsékletváltozás hatására történő konformációs változások követése

A hőmérsékletváltozás térszerkezetre gyakorolt hatásait HSQC spektrumok sorozatával vizsgáltuk, melyekben a kémiai eltolódásokat és a keresztcsúcsok térfogati integrál változásait széles hőmérsékleti tartományban (-20 - +80°C). követtük. Az amid keresztcsúcs térfogatok pontos mérésére érzékenységnövelt ¹⁵N-HSQC kísérletet^{93,134} alkalmaztunk, a szkenelek között eltelt időt 2,5 s-ra állítottuk (kontrollként néhány hőmérsékleten D₁ = 5 s időt is alkalmaztunk). Ezekhez a kísérletekhez ¹⁵N-PAF 1,75 mM-os oldatát könnyűvízes pufferben készítettük elő (10 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄, pH = 6,0, 0,04% NaN₃ 40mM NaCl). Az alacsony hőmérsékletű denaturáció vizsgálatára a -8-tól -20°C-os tartományban a fentivel azonos módon előkészített fehérjeoldatot – az oldat fagyását elkerülendő – 1 mm átmérőjű kapillárisokba egyforma magassáig töltöttük. Ezekkel a kapillárisokkal egy hagyományos 5 mm átmérőjű üveg NMR csövet töltöttünk meg hézagmentesen. A mérőfej hűtését szárított levegő befúvása mellett hagyományos levegőátáramoltatásos hűtőegységgel valósítottuk meg.

Az ¹H-¹³C korrelációk mérésére konstans idejű HSQC-t⁹⁸ használtunk a ¹⁵N-¹³C-jelzett minta esetében. Minden új hőmérsékleti pont felvétele előtt megvártuk, míg a hőmérsékletszabályozó egység stabilizálódik (10-15 perc). A mérőfej hangolását és a protonimpulzusok kalibrációját minden hőmérsékleti ponton megismételtük. A 90°-os ¹H impulzusok a vizsgált hőmérsékleti tartományban a 10-15 μs között változtak, míg a ¹⁵N impulzus kalibrációja nem változott (37 μs). Néhány hőmérsékleten kontroll kísérletként a szkenelek közötti

időt $D_1 = 5$ s-ra állítottuk, ennek a csúcstérfogatok értékére gyakorolt hatása minden esetben 5% alatt maradt. Minden spektrumot 2045·1024 pontban Fourier-transzformáltunk, a transzformáció előtt mindkét dimenzióban \cos^2 súlyfüggvényt alkalmaztunk.

Mivel a keresztcsúcsok pozíciója mindkét dimenzióban hőmérsékleti pontonként változott, ezt a mozgást az eredmények értelmezéséhez a jelhozzárendelést tekintve spektrumról spektrumra követni kellett. Erre a célra egy saját fejlesztésű Matlab szkriptet használtunk, mely követi a Topspin szoftverből exportált csúcslisták kémiai eltolódás változásait. A ^{13}C CT-HSQC kísérletek követésére az ^1H - ^{15}N korrelációknál lényegesen nagyobb számú (és a 4,7 ppm közelében T_1 -zajjal terhelt) ^1H - ^{13}C HSQC spektrumról leolvasható jelek hozzárendelés-átvitelére a CCPN programcsomag „copy assignment” funkcióját használtuk, mely alkalmas a pontról pontra történő szemi-automatikus átvitelére.

A hőmérséklet függvényében aminosavegységenként mért térfogati integrálokat a feltekeredett állapot oldatban jelenlevő koncentrációjával hoztuk összefüggésbe, ez alapján két-és háromállapotú termodinamikai modell alapján is illesztettük. Ahogy a II. 3. fejezetében már kifejtettem, a fehérjekitekeredés termodinamikai leírásakor egy olyan egyensúlyi helyzetet feltételezünk, melyben a fel- és kitekeredett állapotok közötti váltakozás során az állandó nyomáson mért hőkapacitás (ΔC_p) független a hőmérséklettől, míg a többi termodinamikai paraméter (az entalpia ΔH , a Gibbs potenciál ΔG , és az entrópia ΔS) a hőmérséklettől függ. Azokban az esetekben, mikor a fehérje hőmérséklet hatására történő kitekeredése (legalább egy) átmeneti állapoton keresztül történik – melynek NMR jele kiszélesedés és/vagy alacsony intenzitása miatt nem látható a spektrumon – a mért integrálok alapján a kétállapotú modellel való illesztés hibája jelentősen megnő, tehát ezzel az egyszerű modellel már nem írható le jól a rendszer. Egy ilyen cserefolyamat összetettségének következő foka, ha kettő helyett három (egy feltekeredett megfigyelhető f és két kitekeredett u_1 , u_2 nem megfigyelhető) állapotot feltételezünk: $f \leftrightarrow u_1 \leftrightarrow u_2$, ahol f u_1 átmeneti állapoton keresztül alakul át u_2 -be. A három állapot egymásba való alakulása során két cserefolyamat valósul meg, melyek egyensúlyi állandói:

$$K_1(T) = \frac{u_1(T)}{f_n(T)}, \quad K_2(T) = \frac{u_2(T)}{f_{u_1}(T)}$$

$$f_n(T) + f_{u_1}(T) + f_{u_2}(T) = 1$$

Ekkor a teljes nem-megfigyelhető frakció:

$$u = f_u(T) = f_{u_1}(T) + f_{u_2}(T) \quad ,$$

a megfigyelhető frakció pedig:

$$f_n(T) = 1 - u = [1 + K_1(T) + K_1(T) K_2(T)]^{-1} \quad .$$

Ez alapján az egyensúlyi állandók a következőképpen adhatók meg:

$$\begin{aligned} u &= K_1(T) f_n(T) + K_1(T) f_n(T) K_2(T) = K_1(T) f_n(T) [1 + K_2(T)] \\ u &= K_1(T) (1 - u) (1 + K_2(T)) = K_1(T) + K_1(T) K_2(T) - u K_1(T) - u K_1(T) K_2(T) \\ u [1 + K_1(T) + K_1(T) K_2(T)] &= K_1(T) + K_1(T) K_2(T) \\ u &= \frac{K_1(T) [1 + K_2(T)]}{1 + K_1(T) + K_1(T) K_2(T)} \\ u_1 &= \frac{K_1(T)}{1 + K_1(T) + K_1(T) K_2(T)} \\ u_2 &= \frac{K_1(T) K_2(T)}{1 + K_1(T) + K_1(T) K_2(T)} \\ K_1(T) &= \exp \frac{-\Delta G_1(T)}{RT} \\ K_2(T) &= \exp \frac{-\Delta G_2(T)}{RT} \quad . \end{aligned}$$

A Gibbs-Helmholtz egyenletekkel¹⁴⁷ analóg módon ahogy a kétállapotú kitekeredés esetében is, a teljes kitekeredett frakció $u = f_u(T)$ egy átmeneti állapoton keresztül illeszthető a háromállapotú modell paramétereivel. A modell úgy is átalakítható, ha két független kitekeredett állapotot feltételezünk átmeneti állapot jelenléte nélkül.

A térfogati integrál adatok illesztése a kétállapotú modell esetében a II. 3. fejezetben leírtak szerint, a háromállapotú modell esetében a fent leírt kiterjesztett Gibbs-Helmholtz egyenletek segítségével, minden egységre függetlenül Matlab optimalizációs rutinnal történt. Az illesztés során fontos, ismeretlen paraméter a láthatatlan konformer aránya a maximális stabilitású hőmérsékleten, a számításokat

ezen ismeretlen paraméter változtatásaival is megismételtük. A modellezés során az együttes összegzett hiba minimalizálására törekedtünk. A nyers adatokat a kísérleti körülményektől függően lent részletezett okokból az illesztés előtt korrigálnunk kellett. Mivel a reciprocitási elv szerint¹⁴⁸ egy NMR kísérlet érzékenysége adott minta és adott rádiófrekvenciás tekercs esetében fordítottan arányos a kiadott impulzus hosszával, és az egyensúlyi állapotban az α és β állapotú spinek aránya az abszolút hőmérséklettől is függ, az illesztés előtt a kapott térfogati integrálok értékét a hőmérséklet (Boltzmann egyensúly módosító hatásával) és kalibrált 90°-os proton impulzushossz figyelembevételével a PULCON¹⁴⁹ eljárásnak megfelelően korrigáltuk.

A mérési eredményeink mélyebb interpretálása és a nem megfigyelhető konformációkhoz való térszerkezeti modellek rendelésének céljából partnerünk* speciálisan paraméterezett molekuladinamikai szimulációkat futtatott. Ezek rövid, leíró jellegű ismertetését a gondolat sor folytonossága kedvéért az *Eredmények és értékelésük* c. fejezet IV. 2. 5. alfejezetében fejtem ki.

III. 2. 6. Fehérjék és peptidek mennyiségi analízise

A PAF oldatbeli koncentrációjának meghatározását UV spektrofotometriával (280 nm) végeztem az aminosav szekvencia alapján becsült moláris abszorbancia¹⁵⁰ figyelembevételével. A sómentes közegből történő liofilizálást követően száraz tömeg mérést is alkalmaztam. További kontroll méréseket végeztem a fenti módszerekkel jellemzett fehérjeminták és referencia vegyületek (szacharóz és a RAQI szekvenciájú tetrapeptid) nehézvízben felvett kvantitatív ¹H NMR kísérletekkel, ahol ¹H-preszaturációt használtam a maradék víz jelének szelektív elnyomására. Ebben az esetben a PAF azonos körülmények között felvett ¹H NMR spektrumának 0-0,5 ppm régiójában található izoleucin metil jeleinek, illetve néhány jól elkülönülő aromás proton jelének integrálásával oldottam meg a mennyiségi meghatározást. A vízelnyomás jelintenzitást torzító hatása ezekben a régiókban nem volt kimutatható. Ezen kívül az NMR jelek intenzitását befolyásoló paramétereket a PULCON¹⁴⁹ módszert szerint korrigáltuk. A PULCON eljárás során a kapott integrál értékeket a referencia vegyület abszolút integráljaival való összehasonlításán túl a fizikai és mérési körülményeket is figyelembe vettük (impulzus kalibráció és abszolút hőmérséklet).

* Dr. Gáspári Zoltán (PPK)

III. 2. 7. Műszerek, mérési körülmények és szoftverek

Az NMR mérések többségét a Debreceni Egyetemen egy 500 MHz protonfrekvenciával jellemezhető, TXI protondetektálású, 5 mm-es háromcsatornás z-gradiens mérőfejjel felszerelt Bruker Avance II típusú (Bruker BioSpin GmbH, Rheinstetten, Németország) NMR spektrométeren végeztük. A hőmérséklettől függő kísérletsorozathoz ugyanezt a spektrométert BBI szélessávú protondetektálású mérőfejjel felszerelve használtuk. A távolságadatokat gyűjtéséhez használt NOESY kísérleteket az ELTE-n egy Bruker Avance II-700 spektrométeren is megismételtük, amihez Dr. Bodor Andrea nyújtott segítséget.

A fehérjeszerkezetek meghatározáshoz minden mérés pH=6,0-n, 10 mM nátrium-foszfát puffer és 40 mM NaCl jelenlétében történt, 298K hőmérsékleten. A hőmérséklettől függő kísérleteket is ugyanebben a közegben végeztük.

Az NMR adatok gyűjtését Topspin 2.1, a FID-ek elsődleges feldolgozását *Topspin* 3.0 szoftverrel végeztem. A szekvenciaspecifikus jelhozzárendelést a *CARA* 2.8.1 szoftver¹⁵¹ segítségével oldottam meg, a szerkezetmeghatározáshoz és szerkezetfinomításhoz szükséges bemeneti fájlokat a *CARA* program *Lua* programnyelven íródott szkriptjei segítségével hoztam létre. A ¹³C-¹H kémiai eltolódás változások követéshez a *CCPN Analysis*¹⁵² programcsomag 2.2 verzióját használtam, a *CARA* és *CCPN* közti adattípusok konverzióját az utóbbi csomag *Format Converter* moduljának segítségével oldottam meg. Az NOE keresztcsúcsok listázásához, jelhozzárendeléséhez és a szerkezetszámoláshoz az *ATNOS*¹⁵³ és a *CANDID*¹⁵³ algoritmusokkal kombinálva a *Cyana*¹¹⁰ 2.1 programcsomagot használtam. Ehhez a folyamathoz a kezdeti bemeneti fájlokat az egységesített *UNIO'10* grafikus felület segítségével hoztam létre, amin a bemeneti paraméterek módosításait a szövegfájlok manuális szerkesztéssel oldottam meg. A diéderes szög jellegű kényszerfeltételeket a *TALOS+*¹¹⁴ algoritmus segítségével határoztam meg. A *TALOS+*-t a módszer fejlesztői által üzemeltetett webszerveren* futtattam. A molekulaserkezetek ábrázolásához, az atom-atom távolság és kötésszögek méréséhez, felületi töltéseloszlás becsléséhez és ábrakészítéshez a *PyMOL*TM *Molecular Graphics System*¹⁵⁴, 1.7.0.0. verzióját használtam. A hőmérséklet hatására történő kitekeredés illesztéséhez Matlab 7.7 környezetben írt, laboratóriumunkban fejlesztett programokat használtunk.

Partnerünk a molekuladinamikai szimulációkhoz a GROMACS programcsomag 4.5.5 verzióját AMBER99SB¹⁵³ erőteret és a TIP4P vízmodellt használta. A ps-ns időskálára jellemző mozgásokat reprezentáló sokaság-alapú MD

*<https://spin.niddk.nih.gov/bax/nmrserver/talos/>

során, melyhez a kísérletileg meghatározott S^2 adatokat kényszerfeltételként használták fel, az ún. MUMO protokollt alkalmazták. A trajektóriákból kapott konformációs sokaság kísérleti adatoknak való megfelelését a CoNSEnsX¹⁵⁴ webszerver segítségével elemezték.

IV. Eredmények és értékelésük

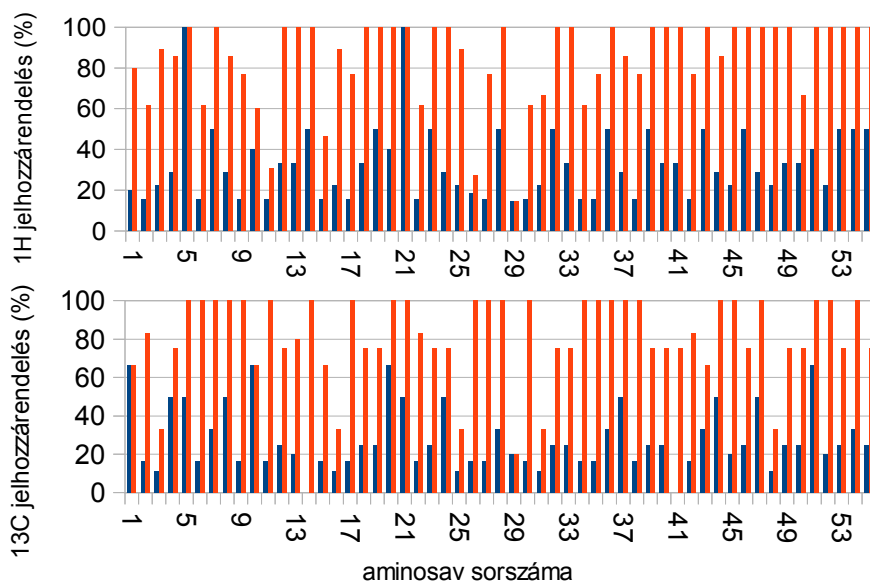
Ebben a fejezetben a dolgozat alapjául szolgáló publikációk eredményei közül azokat foglalom össze, melyek közvetlenül saját munkám részét képezik. Mivel mindegyik kutatás együttműködés keretein belül zajlott, az értelmezéshez bizonyos mértékig társszerzőim eredményeit is szükséges bemutatni. Ezért az eredmények összefoglalása és értékelése során ezekre az adatokra is támaszkodom, de minden esetben jelölöm, ha egy eredmény nem közvetlenül saját munkám révén született.

IV. 1. A PAF *de novo* térszerkezet-meghatározása

IV. 1. 1. A PAF ^{13}C - ^{15}N - ^1H NMR jelhozzárendelése

A rendelkezésre álló NMR spektrumok alapján megadtam a PAF ^1H , ^{15}N , ^{13}C jelhozzárendelését. A kémiai eltolódás listát az adatok validálása után feltöltöttem a „Biological Magnetic Resonance Data Bank” (<http://www.bmrb.wisc.edu/>) adatbázisba (BMRB azonosító: 19657). A korábban közölt (BMRB: 16087) és az újabb ^1H és ^{13}C jelhozzárendelés* teljességének aminosav egységenként való százalékos összehasonlítását a 9. ábra szemlélteti. Ahogy korábban már kifejtettem, az egységes ^{13}C -jelzés jóval több korrelációs spektrum felvételét tette lehetővé, ezért az egyértelműen hozzárendelhető szénatomok száma is növekedett. A szerkezetmodellezés szempontjából a ^{13}C -jelzés további előnye, hogy a HCCH-típusú kísérletek révén korábban bizonytalan ^1H hozzárendelések is egyértelművé váltak, ezért a hozzárendelt ^1H -k száma is növekedett. Az új jelhozzárendelés eredményeként a főlánc ^1H -k (H^{N} , H_{α}) jelhozzárendelése 97,3%-os, az oldalláncoké 82,2%-os. Az összes szén vagy nitrogénatomhoz egy kötéssel kapcsolódó hidrogént figyelembe véve a korábbi 69,3%-os ^1H hozzárendelés 87,5%-ra növekedett. Továbbá a ^{15}N - és ^{13}C -feloldott NOESY kísérletek kombinációjával a 2D NOESY spektrumon korábban nem feloldható jelek is egyértelműen azonosíthatóvá válhatnak, ami a potenciálisan hibás NOE hozzárendelések számát csökkentheti.

* A ^{15}N jelhozzárendelés a korábbi és az újabb hozzárendelés esetében is teljes volt (a prolin 29 kivételével).



9. Ábra: A PAF ^1H (felül) és ^{13}C (alul) NMR jelhozzárendelésének aminosav egységenként való értékelése. Kék oszlopokkal a korábban közölt¹⁶, pirossal az újabb jelhozzárendelést⁶⁵ jelöltem.

aminosav	C_α jelhozzárendelés HSQC spektrum alapján (ppm) BMRB: 16087	C_α jelhozzárendelés HNCA alapján (ppm) BMRB: 19657
C7	50,50	50,38
C14	-	51,00
C28	54,10	52,50
C36	49,50	53,37
C43	51,10	50,90
C54	53,50	51,05

1. Táblázat: A ciszteinek C_α jelhozzárendeléseinek korrekciója. A C7 és C43 jelhozzárendelése korábban is helyes volt, a ~ 0.2 ppm eltérést az eltérő hőmérséklet ($\Delta T = 5\text{K}$) okozta.

A ^1H - ^{15}N - ^{13}C jelhozzárendelést a korábbi eredmények figyelembevételével, azoktól függetlenül oldottam meg. Az új jelhozzárendelést a régebbivel összevetve a korábbi adatsorban csupán néhány cisztein C_α hozzárendelésében találtam téves hozzárendelést, amit az 1. táblázatban foglaltam össze. Megjegyzendő, hogy a korábban közölt szerkezetmeghatározás során a ^{13}C kémiai eltolódásokat nem vették figyelembe, és mivel a csere a kapcsolódó protonokat

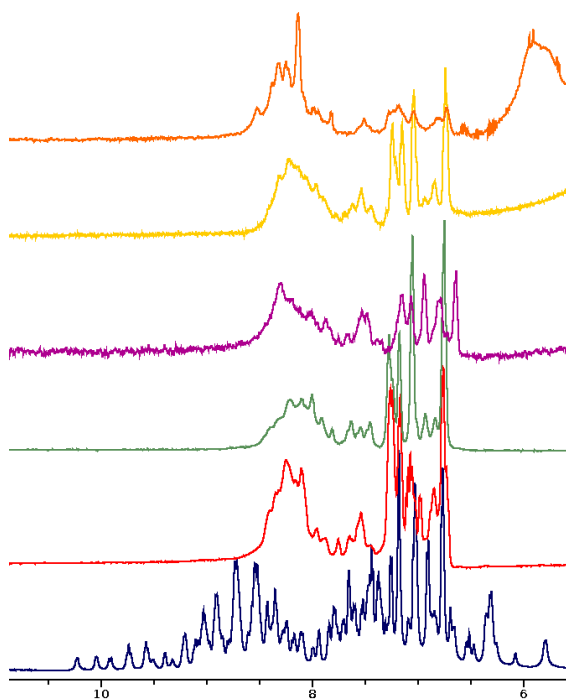
nem érintette, az összecserélt hozzárendelések a korábbi szerkezetmodellezést nem befolyásolhatták.

IV. 1. 2. A PAF diszulfidhíd mintázatának meghatározása

A bioinformatikai eszközök között – valószínűleg a probléma rendkívül összetett természete miatt – igen kevés olyan algoritmus érhető el, mellyel a peptidekben és fehérjékben található ciszteinek kapcsolódási sorrendjét előre lehet jelezni. A diszulfidmintázatot aminosavszekvencia alapján jósló DISULFIND¹⁵⁵ algoritmus a PAF esetében első találatként az *abcabc* mintázatot valószínűsítette. A webszerveren keresztül hozzáférhető* program ezt a kapcsolódási sorrendet 66% biztonsággal jelezte előre, míg a második legvalószínűbb lehetőségként az *abcacb*-t jelölte meg 35% valószínűséggel. A korábbi szerkezetvizsgálatok alapján ezzel szemben az *abcabc* és *abbacc* mintázatokot feltételeztük¹⁶. Ezzel ellentmondásban áll, hogy korábbi adatok¹⁶ alapján az *abcabc* mintázat a Ramachandran-féle térkép alapján várható geometriai kritériumoknak jobban megfelelt, mint az *abbacc*, míg az NOE távolságkészletnek való megfeleltethetőség inkább az *abbacc* mintázatnak kedvezett.

A helyes diszulfidmintázat meghatározására első kísérleti megközelítésként cisztein-szerin pontmutációk beépítésével ciszteinben szegényített PAF változatokat állítottunk elő rekombináns fehérjeexpressziós technika segítségével, majd a módosított fehérjéket NMR spektroszkópiával vizsgáltuk. A ciszteinek, illetve cisztein párok szisztematikus, szerin aminosavra való cseréje azonban nem hozta meg a várt eredményt, miszerint a keletkező három helyett két diszulfid hidat tartalmazó fehérjeformák valamelyikének szerkezetéből következtetni lehet a natív fehérje diszulfid mintázatára, ugyanis a cisztein-szerin csere következtében a kipróbált összesen ötféle kombináció egyikénél sem jött létre rendezett szerkezetű fehérje. A kísérletsorozat ugyanakkor egyértelműen bizonyította, hogy a PAF esetében a harmadlagos szerkezet kialakulásához mind a hat cisztein jelenléte elengedhetetlen.

* A korábban <http://disulfind.dsi.unifi.it/> címen elérhető bioinformatikai webszerver a disszertáció írásának időpontjában már nem elérhető.



10. Ábra: A Cys-Ser mutációval létrehozott PAF változatok ^1H NMR spektrumainak amid és aromás régiója. Felülről lefelé: PAF^{C54S} , PAF^{C14S} , PAF^{C7S} , $\text{PAF}^{\text{C28S-C54S}}$, $\text{PAF}^{\text{C7S-C36S}}$, natív (feltekeredett) PAF.

A ciszteinek kapcsolódási sorrendjének egyértelmű meghatározását szegedi partnereink (Dr. Váradí Györgyi és munkatársai) szintetikus munkája tette lehetővé¹⁵⁶. A natív PAF enzimés emésztésére tett korábbi kísérletek nem voltak sikeresek, ezért a korábbi vizsgálatok során a proteolitikusan keletkező peptidfragmensek tömegspektrometriás vizsgálata sem volt lehetséges¹⁶. A kémiai szintézis révén azonban lehetővé vált a PAF olyan alternatív formáinak vizsgálata is, amelyek a fermentációval történő előállítás során nem jönnek létre. A tömegspektrometriás vizsgálatok előtt optimalizálták az enzimátikus emésztést is, melynek során a korábbi kísérletekben nem használt proteolitikus enzimeket is kipróbáltak. A szintézis termékeinek vizsgálatára a tripszin-kimotripszin eleggyel való emésztés bizonyult a leghatékonyabbnak.¹⁵⁷ A korábbi eredményeket¹⁶ megerősítette, hogy a PAF természetes formája ezekben a kísérletekben is igen ellenálló volt az enzimés emésztéssel szemben: még 12 óra

proteolitikus emésztés után is jelentős mennyiségű emésztetlen fehérjét tartalmazott.

Partnereink natív kémiai ligáció módszerével megszintetizálták a PAF teljes aminosavszekvenciáját, és (első megközelítésként) a lineáris forma tiolcsoportjait az *abcabc* mintázatnak megfelelően (11. ábra felül) páronként szelektíven védtek. Ezt követően megkísérelték a ciszteinek páronként való kapcsolását. Amíg a 7-36 és 28-54 cisztein kapcsolása a várt termékeket eredményezte, az utolsó védőcsoportok eltávolításakor a diszulfidhidak átrendeződését tapasztalták.

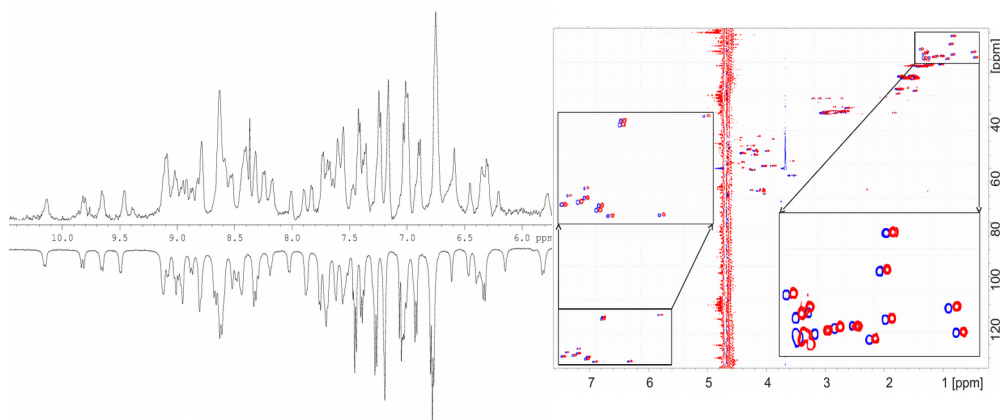


11. Ábra: A PAF két legvalószínűbb diszulfid kapcsolódási sorrendje. Fent: *abcabc*, lent *abbacc*.

A diszulfid-átrendeződéssel keletkezett termék diszulfidmintázatát enzimatis emésztés és tömegspektrometriás elemzés segítségével határozták meg. A várakozásokkal ellentétben a termék az *abcabc* helyett az *abbacc* mintázatnak megfelelő (11. ábra, alul) peptidfragmenset tartalmazta, ami arra utalt, hogy a már korábban kialakított diszulfidhidak átrendeződtek. A HPLC kromatogram alapján az átrendeződéssel keletkezett termék retenciós ideje eltért a natív fehérjéétől. A biológiai aktivitás vizsgálatok azt is igazolták, hogy sem a lineáris (redukált), sem az *abbacc* mintázatot tartalmazó fehérjeforma nem mutatott antifungális aktivitást. A korábbi szerkezetvizsgálataink alapján feltételezett kétféle lehetséges diszulfidmintázat közül tehát egyértelműen ki lehetett zárni a natívval nem megegyező formát, ezek alapján közvetett módon az *abcabc* mintázatot találtuk a legvalószínűbbnek.

A natív fehérjével megegyező forma szintézisét a reakciókörülmények optimalizálása után oxidatív feltekerés módszerével oldották meg. Ebben a kísérletben nem-szelektív védőcsoportokat használtak, melyeknek eltávolítását követően a lineáris PAF $0,2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ koncentrációjú oldatát ammónium-acetát ($0,1 \text{ M}$, $\text{pH} = 7,4$) pufferben intenzíven kevertették katalitikus mennyiségű ($0,2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) cisztein jelenlétében. Az így kapott termék retenciós ideje analitikai HPLC alapján megegyezett a natív PAF retenciós idejével, ami a két molekula azonos diszulfidmintázatra utalt. Ezt követően ^1H és $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ NMR vizsgálatokkal egyértelműen igazoltuk, hogy az oxidatív feltekerés során keletkezett termék

térszerkezete azonos a *Penicillium* rendszerben előállított eredeti fehérjével (12. ábra).

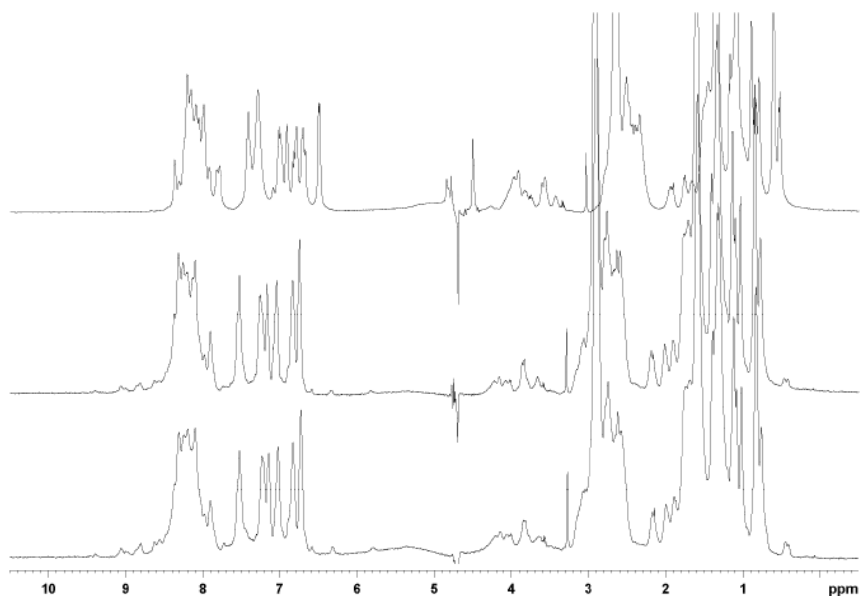


12. Ábra: A fermentációval és kémiai szintézissel előállított PAF NMR spektruma. Baloldalt felül: szintetikus, alul megfordított fázissal a *Penicillium* rendszerrel termeltetett PAF ^1H NMR spektrumának amid és aromás proton régiója. Jobboldalt a ^{13}C - ^1H korrelációs spektrumok egymásra vetítve, a metil és aromás régió kinagyítva látható (kék: *Penicillium* által termelt, piros: szintetikus PAF.) A 2D spektrumokat a jobb láthatóság kedvéért az F2 (^1H) dimenzió mentén eltolva ábrázoltuk.

Az optimalizált tömegspektrometriás vizsgálatok során sikert értek el a natív és szintetizált PAF diszulfidmintának meghatározásában is. Az emésztmények tömeganalízise során mindkét esetben az *abcabc* mintázatnak megfelelő fragmenthosszúságokat mutattak ki, ami közvetlen bizonyítékul szolgált a PAF-ban található ciszteinek természetes kapcsolódási sorrendjét illetően.¹⁵⁶

A védőcsoportokat nem tartalmazó lineáris PAF könnyűvízes oldatát a spontán oxidáció elkerülése végett argon atmoszféra alatt vizsgáltuk. Az így előkészített minta ^1H NMR spektruma egyértelműen szerkezet nélküli fehérje jelenlétére utalt (13. ábra, felül). Miután a mintát négy héten keresztül 4°C -n tartottuk (ezalatt valószínűleg levegő került a mintát tartalmazó csőbe), a natív PAF-ra jellemző rezonanciajelek kezdtek megjelenni a spektrumon (13. ábra, középen). Ezután argon atmoszférát levegőre cseréltük és az oldaton is levegőt buborékolattunk át, ezt követően a mintát egy héten keresztül szobahőmérsékleten állni hagytuk, majd az NMR mérést megismételtük. A légköri oxigén beoldódásának hatására a spontán oxidatív feltekeredés bizonyos mértékig cisztein jelenléte nélkül is végbement: az NMR spektrumon láthatóvá váltak a feltekeredett PAF jellegzetes rezonanciajelei (13. ábra). Ez a megfigyelés megerősíti szerzőtársaink eredményeit, miszerint a PAF spontán oxidatív feltekeredése során a

natívval egyező térszerkezetet vesz fel. Azonban ez az oxidációs folyamat szabad cisztein hiányában nem volt teljes, néhány százaléknyi a natívval egyező PAF képződésénél megállt, feltehetően valamilyen kinetikai csapda miatt.



13. Ábra: A lineáris PAF spontán oxidatív feltekeredésének követése. A három reprezentatív $^1\text{H-NMR}$ spektrumon fentről lefelé: felül: a lineáris PAF Ar atmoszféra alatt. A 8,5 – 6,5 ppm régióban látható jelek egyértelműen szerkezet nélküli fehérjére utalnak. Középen: ugyanez a minta egy hét elteltével. A feltekeredett formára jellemző 45. valin metil jelek kezdenek láthatóvá válni 0,5 ppm-nél. Alul: a minta beoldása után 9 héttel, melyből 8 hetet szobahőmérsékleten, a levegő oxigénjével érintkezve töltött. A 9-9,5 ppm régióban azonosíthatóak Thr 37, Cys 7 és Cys 14 H^N jelei, és a 0,5 ppm-nél látható 45. valintól származó metil ^1H jele. Az integrálok alapján a feltekeredett frakció koncentrációja a korábbihoz képest kétszeresére növekedett, de az átalakulás ezek között a körülmények között nem folytatódott tovább.

IV. 1. 3. A PAF térszerkezetének modellezése távolság-, diszulfid- és torziós szög-jellegű kényszerfeltételek figyelembevételével

A teljesebb jelhozzárendelés és a helyes diszulfidmintázat birtokában a korábbi szerkezetvizsgálatokhoz képest bőségebb adatok alapján modelleztem a PAF térszerkezetét. Első közelítésként a modellezéshez kizárólag a távolságkorlátokat vettem figyelembe. Ezután teszteltem a távolságadatok alapján számított modellek robusztusságát: a számításokat úgy is megismételtem, hogy a bemenetből szisztematikusan kihagytam egy-egy aminosav proton

hozzárendeléseit, és a főlánc konformációs sokaságokat vizuálisan összehasonlítottam. Ha az így kapott szerkezetek főlánc konformációja jelentősen megváltozott, ellenőriztem az érintett protonok jelhozzárendelését. Ezzel a módszerrel két karboxamid oldallánc ^1H hozzárendeléseinek cseréjét lehetett korrigálni. A diszulfid- és kötésszög-jellegű korlátokat csak ezután használtam fel. Az így kapott konformációs sokaságok RMSD értékeit, Ramachandran statisztikáját¹⁵⁸, és a szimulált hűtés paramétereit összehasonlítottam (2. táblázat).

A 2. táblázatból leolvasható, hogy a korábbi 2D NOESY mérésekhez képest a 3D NOESY spektrumok alkalmazása növelte a távolsághatárok számát, és önmagában nem volt jelentős hatással a szerkezetek minőségére. A diszulfidmintázat kovalens korlátként való beépítése ezzel szemben minden esetben csökkentette az RMSD értékeket, de az adott modellhez illeszkedő távolsághatárok számát is (viszont ez akkor is igaz volt, ha a kísérletileg meghatározottól eltérő diszulfidmintázatot használtam).

Utolsó lépésként a főlánc ^{13}C kémiai eltolódások alapján előrejelzett diéderes szög jellegű korlátokat vezettem be szerkezetfinomítás céljából. Ez az eljárás szintén az RMSD csökkenéséhez vezetett, és nem meglepő módon a Ramachandran statisztika is jobb paramétereket mutatott az így számolt szerkezetek esetében, hiszen a kötésszög jellegű korlátok megadásánál csak azokat a kémiai eltolódásokat vesszük figyelembe, melyek alapján jó biztonsággal becsülhető a ϕ és ψ lapszög. Ezekben az esetekben a megadott kötésszög jellegű korlát mindig megfelel a peptidekkel szemben támasztott geometriai kritériumoknak. Más szavakkal az ilyen módon finomított modell a geometriai paramétereket a Ramachandran térkép „kedvezményezett” régiói felé tolja el, ezért „idő előtti” használata félrevezető lehet.

kényszerfeltételek	PDB: 2KCN			PDB: 2MHV
	#1 NOE	#2 NOE	#3 NOE SS: abcabc	#4 NOE SS: abcabc Diédes szögek
NOE távolsághatárok száma a 7. iterációs ciklusban	757	782	777	758
főlánc RMSD	0,65 ± 0,18	0,76 ± 0,18	0,60 ± 0,13	0,40 ± 0,08
nehéz atom RMSD	1,15 ± 0,23	1,16 ± 0,21	1,04 ± 0,09	0,88 ± 0,07
Ramachandran kedvező	73,9%	76,9%	75,7%	97,8%
Ramachandran megengedett	20,3%	15,9%	19,8%	0,5%
Ramachandran nem megengedett	5,8%	7,2%	4,5%	1,7%
	#5 NOE SS: abbacc	#6 NOE SS: abbacc Diédes szögek		
NOE távolsághatárok száma a 7. iterációs ciklusban	693	679		
főlánc RMSD	0,68 ± 0,10	0,39 ± 0,11		
nehéz atom RMSD	1,26 ± 0,11	0,90 ± 0,09		
Ramachandran kedvező	72,70%	94,6%		
Ramachandran megengedett	19,5%	4,5%		
Ramachandran nem megengedett	7,7%	0,8%		

2. Táblázat: A ^{13}C - ^{15}N PAF szerkezetmeghatározásának paraméterei. Felül a korábban közölt és az új adatokból számolt szerkezetek paraméterei szerepelnek a helyes abcabc diszulfidmintázattal. Alul a nem természetes abcabc diszulfidmintázat feltételezésével számolt szerkezet paraméterei láthatók.

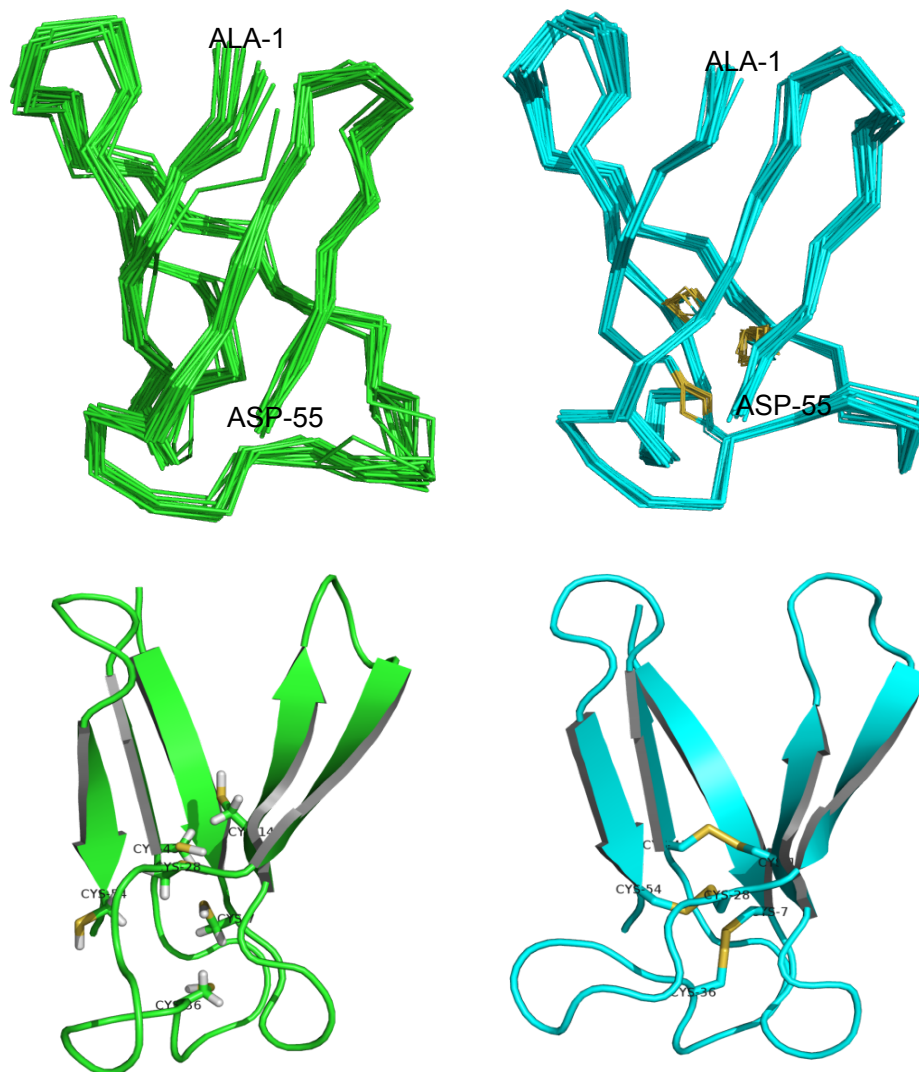
A modellezés során kritikus kérdés, hogy a végső modell meghatározásához a kísérleti adatokat és a származtatott paramétereket milyen arányban vegyük figyelembe. A kísérletileg mérhető szerkezeti paraméterek és a szerkezeti bioinformatika eszközeinek széles tárháza áll rendelkezésre a modell megalkotása és finomítása céljából, de nincs konszenzus abban a tekintetben, hogy milyen adatokat mely módszerek szerint és milyen kombinációban vegyünk figyelembe, illetve a kapott szerkezetek értékelése során mely paramétereket tekintsünk irányadónak. A PAF modellezése során azt tartottam szem előtt, hogy a molekula modellezésének célja a valóság lehető legpontosabb leírása, ezért a számítások során elsősorban a közvetlen kísérleti adatainkra támaszkodtam: a távolságadatokra, és a már ismert diszulfidmintázatra. Szerkezetfinomítást csak abban az esetben végeztem, amikor a szerkezet minősége már enélkül is kielégítő volt.

A szerkezetek értékelése és összehasonlítása sem teljesen magától értetődő, mert az adott problémától is függ, hogy a szerkezetet jellemző paraméterek közül melyik a legfontosabb. A főlánc RMSD értéke például azt jelzi, hogy a sokaság tagjai között mekkora térbeli eltérés van, más szavakkal mennyire biztosan tudjuk

megadni a főlánc konformációját. Ha csak önmagában a főlánc RMSD értékeit vennénk figyelembe*, akkor a legjobb minőségű szerkezet a helytelen *abacc* diszulfidmintázat feltételezésével készült modell lenne. (Ennél a modellenél azonban nem szabad figyelmen kívül hagyni, hogy a végső térszerkezettel összeegyeztethető NOE-k száma itt a legalacsonyabb). Ugyanígy önmagában az utolsó iterációs ciklus NOE találatainak száma sem lehet döntő szempont a szerkezet minőségéről: ha csak ezt vennénk figyelembe, akkor az új modellt kizárólag távolságadatok alapján kellene kiszámolnunk, a ciszteinek kovalens kapcsolódásainak figyelembevétele nélkül. A korábbi biokémiai vizsgálatol és az előző fejezetben leírt független kísérleti adatok alapján azonban tudjuk, hogy a PAF térszerkezete nem alakulhat ki diszulfidhidak nélkül, ezért a modellezés során akkor járunk el helyesen, ha figyelembe vesszük ezt a kovalens kötés jellegű korlátot még akkor is, ha bizonyos mért H-H távolságokkal ez nem egyeztethető össze.

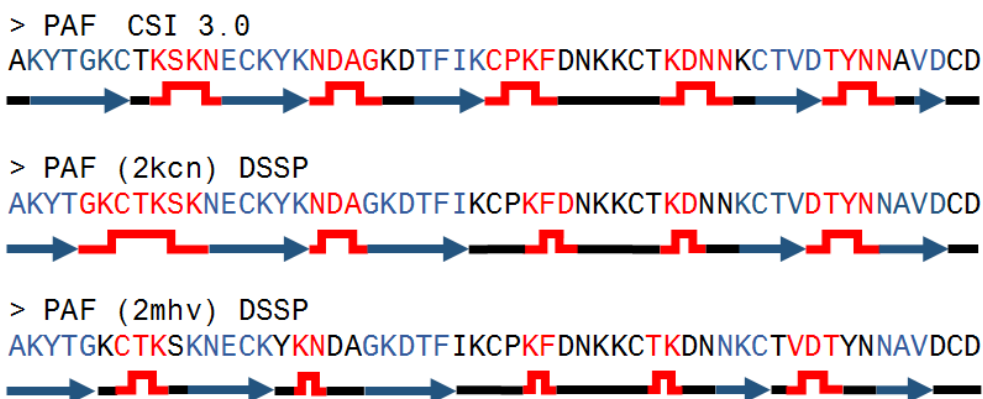
Mindezek alapján a (2. táblázatban) #3 sorszámmal jelölt modell felel meg legjobban a kísérleti adatoknak, hiszen a helyes diszulfidmintázatot tartalmazza, emellett a többi szerkezetet jellemző paraméter is javult a korábbi számítások eredményeihez képest. Ezek a paraméterek a szerkezetfinomítás után (#4) tovább javultak a főlánc lefutásának látványos változásai nélkül. A adatbázisba a szerkezet validálása után a #4 sorszámmal jelölt számítás eredményei kerültek be. Az így kapott szerkezet (14. ábra) megfelelt a legnagyobb nemzetközi fehérjeszerkezeteket összegyűjtő adatbázis (Protein Data Bank; www.rcsb.org) minőségi kritériumainak, ezért az adatokat más kutatók számára is hozzáférhetővé tehattük. (PDB azonosítók: korábban közölt, diszulfidhidakat nem tartalmazó modell: 2KCN; új, diszulfidhidakat tartalmazó modell: 2MHV). Az új modell főlánc konformációja és másodlagos szerkezete nem mutat szignifikáns különbségeket a régebbi modellhez képest. A diszulfidhidak megadása és a szögkorlátok alkalmazásának hatására a főlánc RMSD $0,65 \pm 0,18$ Å-ről $0,40 \pm 0,08$ Å-re csökkent, ami a főlánc vizuális megjelenítésekor is jól érzékelhető (14. ábra fent), továbbá a korábbi szerkezethez képest a Ramachandran statisztika is jelentősen javult (2. táblázat). A két szerkezet között a teljes szekvenciára vonatkoztatott nehéz atomra számított főlánc RMSD különbsége $1,3 \pm 0,58$ Å, amiért főleg a 3. hurok 28. és 36. cisztein közötti szakaszának konformációs különbsége okolható.

*Ez azért sem lenne helyes, mert az NMR vizsgálatok oldatfázisban történtek, ezért a belső molekuláris mozgásokat, az NOE-k és az atom-atom távolságokon alapuló számítások bizonytalanságait a sokaság eltérései is bizonyos mértékig reprezentálják. A legtöbb esetben nem létezik olyan egyedi konformáció, ami minden távolságnak megfeleltethető, ezért jellemezzük az NMR szerkezeteket konformációs sokaságokkal.



14. Ábra: A PAF térszerkezetének korábbi (baloldalt, zöld) és újabb modellje (jobbaldalt, világoskék). Fent a 20 konformerből álló konformációs sokaság főlánc (NH, C', Ca atomok összekötésével kirajzolt) megjelenítése, alul a reprezentatív konformáció másodlagos szerkezeti elemeket és diszulfidhidakat mutató szalagos megjelenítése látható.

Mivel a két modell főlánc konformációja hasonló, nem meglepő, hogy a geometriai kritériumok alapján történő másodlagos szerkezet hozzárendelés sem mutatott drámai különbséget.



15. Ábra: Felül: a CSI módszer alapján becsült másodlagos szerkezeti elemek. Középen a korábban közölt térszerkezetből, alul az új modellből DSSP alapján számított másodlagos szerkezet. A fekete vonalak a másodlagos szerkezettel nem rendelkező régiókat, a kék nyilak β -szálakat, a piros elemek a hurkokat jelölik.

A kémiai eltolódás index alapján^{113,159} a másodlagos szerkezeti elemek száma és minősége egyezett a korábban geometriai, és proton-deutérium cseresebesség és dinamikai tulajdonságok alapján meghatározottal, hosszuk és szekvenciában elfoglalt helyük azonban kisebb különbségeket mutatott a térszerkezetet leíró sokaság reprezentatív, első eleme alapján DSSP módszerrel számíthatóhoz képest a régebben közölt és az új modell esetében is. A DSSP módszerrel¹⁶⁰ a harmadlagos szerkezet birtokában geometriai kritériumok alapján jól becsülhető a fehérje hidrogén-híd hálózata, így a β -szálak elhelyezkedése is (a 14. ábra készítéséhez használt PyMol szoftver is a DSSP-t alkalmazza a másodlagos szerkezeti elemek meghatározásához). A korábbi és újabb modell sokaságainak első, reprezentatív tagjaira DSSP módszerrel meghatározott másodlagos szerkezet között is megfigyelhetők apróbb különbségek (15. ábra középen és alul), ezek elsősorban a β -szálak hosszát érintik.

IV. 2. Hőmérsékletváltozás hatására történő konformációs változások vizsgálata a PAF-ban

IV. 2. 1. A PAF részleges kitekeredése magas és alacsony hőmérsékleten

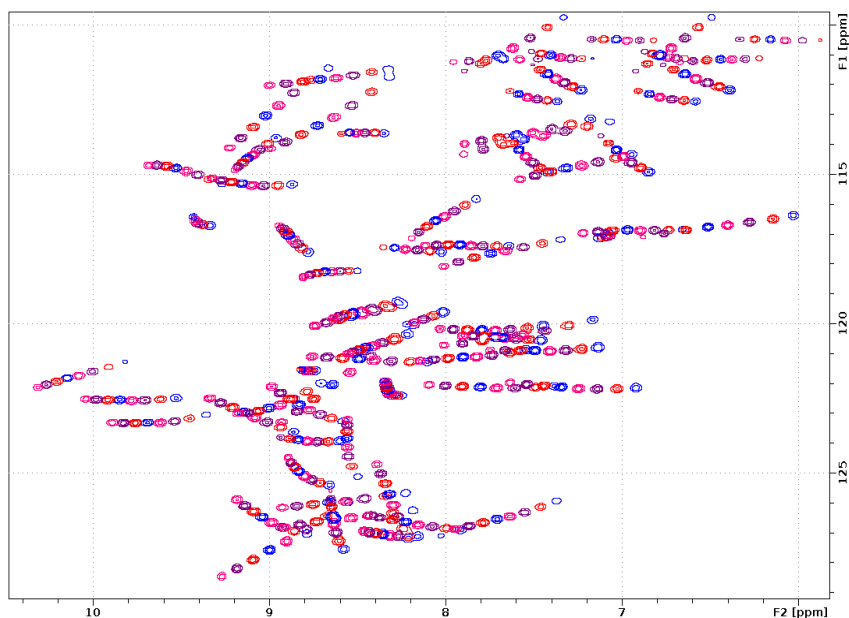
Abban az esetben, ha nem áll fenn gyors konformációs csere, az NMR spektrumokon megjelenő kémiai eltolódások az oldatban jelenlévő major konformációs sokaság időátlagát jellemzik. Ezért a kémiai eltolódások hőmérséklet függvényében történő vizsgálatával kvalitatív módon megfigyelhetők a major

konformáció szerkezetében végbemenő lokális és globális szerkezetváltozások. A ^{15}N - ^1H keresztcsúcsok kémiai eltolódásainak elemzésére praktikus bevezetni kombinált kémiai eltolódás¹⁶¹ fogalmát:

$$\Delta\delta^{\text{NH}} = ((\Delta\delta^{\text{H}})^2 + (\Delta\delta^{\text{N}}/6,5)^2)^{1/2}.$$

A 265-347 K hőmérsékleti tartományban az aminosavegységtől függően 50 - 800 ppb kombinált kémiai eltolódás változást figyeltünk meg (16. ábra). A széles hőmérsékleti tartományhoz viszonyított kis mértékű változás alapján egyértelmű, hogy a PAF NMR módszerrel közvetlenül megfigyelhető szerkezete nagyrészt megtartja másodlagos és harmadlagos szerkezetét: ami megerősíti, hogy a PAF hőmérsékleti stresszel szemben különösen ellenálló, ez összhangban van a korábbi biokémiai vizsgálatokkal.¹⁶ A vizsgált tartományt az alacsony hőmérséklet irányába kiterjesztettük a fehérjeoldat 1 mm átmérőjű üvegapillárisban 258 K-ig történő túlűtésével. Mind a ^{15}N - ^1H , mind a ^{13}C - ^1H spektrumok nagy mennyiségű, szerkezettel rendelkező fehérje jelenlétét bizonyították a legalacsonyabb és legmagasabb hőmérsékleti pontok kivételével. Az alacsony hőmérsékleti tartományban (valószínűleg a kitekeredés diszulfidhidakkal való korlátozott volta miatt) sem a ^{15}N - ^1H jelek hirtelen eltűnését, sem új rezonanciajelek megjelenését nem tapasztaltuk még a legalacsonyabb mért hőmérsékleten sem, vagyis a PAF nem mutatta a más fehérjéknél leírt hideg denaturáció jeleit.

A kísérletek során nem tapasztaltunk ugrásszerű változások feltűnő jeleit (pl. adott hőmérsékleten jelek kollapszus-szerű eltűnését), a szerkezetváltozás a hőmérséklet változtatásával folytonosan történt (16. ábra), ami a részleges kitekeredés „konformációs drift” modelljének felel meg. A hűtés, illetve melegítés után (a vizsgált tartományon belül) minden esetben reprodukálható volt a 298 K hőmérsékleten felvett NMR spektrum. Ez a megfigyelés is arra utal, hogy a diszulfidhidak által kovalens kötésekkel is stabilizált másodlagos szerkezeti elemek a hőmérsékleti stressz során nem szenvednek irreverzibilis módosulást.



16. Ábra: a PAF ^{15}N - ^1H HSQC spektrumai a 265-347 K tartományban egymásra vetítve, azonos kontúrszintekkel kirajzolva. Az ábrán megfigyelhető az egyes jelek kémiai eltolódás változásainak eltérő mértéke és a csúcsok intenzitásváltozása is. A legkisebb intenzitások a jelsorozat két szélén, a magas és alacsony hőmérsékleten figyelhetők meg.

IV. 2. 2. A hőmérséklettől függő HSQC spektrumok értelmezése

A következő fejezetekben tárgyalt konformációs változások modellezése azon a feltevésen alapszik, hogy az NMR spektrumokon megjelenő jelek térfogati integrál értéke az adott kémiai eltolódáshoz rendelhető lokális térszerkezet oldatban jelenlévő koncentrációjával arányos. Ez a feltevés azonban csak akkor használható kiindulópontként, ha a kísérletek során minden oldatbeli és mérési körülmény figyelembevételével meg tudjuk becsülni, hogy a spektrumok milyen mértékben tekinthetők kvantitatívnak. Mivel kísérleteinkkel a PAF lokális szerkezetváltozásait szándékoztunk követni, a kvantitatív szempontjából könnyebben kivitelezhető 1D NMR mérések nem jöhetnek szóba (de amint azt a későbbiekben látni fogjuk, kontroll kísérletként használhatók). A lokális szerkezeti információt nyújtó HSQC mérések kiértékelése során viszont mindenképpen számolni kell a 2D módszerből adódó hibalehetőségekkel is.^{162,163} A HSQC spektrumok kvantitatív értékelése nem szokványos, de a kísérletek megfelelő kivitelezésével, illetve az adatok kritikus értékelésével használható ilyen célra, erre a szakirodalomban is található példát.¹⁶⁴

A kísérlet paraméterezésénél figyelembe kell venni, hogy 2D mérések során az indirekt dimenzióban képződő csúcsok intenzitását befolyásolhatja a T_2 relaxációs idő, a kísérlet INEPT periódusának hossza, továbbá az egymáshoz rendelt magok között mérhető heteronukleáris spin-spin csatolási állandó nagysága. A ^{15}N T_2 hőmérsékletfüggését ezért kísérleti úton meghatároztuk.

hőmérséklet (K)	átlagos ^{15}N T_2 relaxációs idő (ms)
273	101±7
300	201±32
320	258±25

3. Táblázat: A PAF átlagos ^{15}N T_2 értékeinek hőmérsékletfüggése.

A 3. táblázatban látható, hogy a vizsgált hőmérsékleteken az átlagos ^{15}N T_2 relaxációs idő a 100-300 ms tartományba esik. A spinrelaxáció elméletével összhangban az látható, hogy a T_2 relaxációs idő a hőmérséklet monoton függvénye¹²¹.

A PAF esetében az $^1\text{J}_{\text{NH}}$ csatolási állandók az F1 dimenzióban nem-lecsatolt ^{15}N - ^1H HSQC spektrumok alapján nem mutatnak jelentős eltéréseket a szekvencia mentén: három aminosav kivételével (6., 24. és 39.) minden $^1\text{J}_{\text{NH}}$ csatolás a 90-95 Hz tartományba esik (4. táblázat). Ha összevetjük az $^1\text{J}_{\text{NH}}$ csatolási állandók értékeit a hőmérséklettől függő integrálokkal, nem lehet összefüggést találni a csatolás nagysága és az abszolút integrál maximális értéke között.

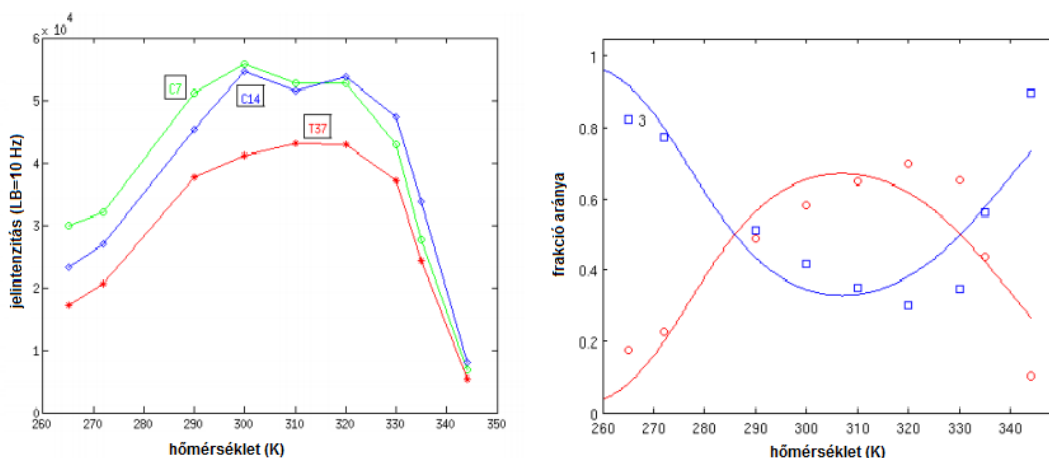
aminosav sorszáma	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
$^1\text{J}_{\text{NH}}$ (Hz)	92.9	94.7	92.6	93.0	89.5	93.8	93.8	93.7	90.6	90.9	94.7
aminosav sorszáma	13	14	16	17	18	19	20	22	23	24	25
$^1\text{J}_{\text{NH}}$ (Hz)	92.9	93.9	96.0	92.2	96.3	94.1	92.4	93.7	95.5	101.6	93.8
aminosav sorszáma	26	27	28	30	31	32	33	34	35	36	37
$^1\text{J}_{\text{NH}}$ (Hz)	93.2	95.3	91.0	91.4	92.7	91.3	92.6	91.6	93.2	93.6	91.6
aminosav sorszáma	38	39	40	41	42	44	45	46	47	48	49
$^1\text{J}_{\text{NH}}$ (Hz)	93.7	102.4	92.8	95.7	92.8	94.7	92.9	94.0	94.1	92.7	91.5
aminosav sorszáma	50	51	52	53	54	55					
$^1\text{J}_{\text{NH}}$ (Hz)	94.2	93.6	92.9	94.7	94.2	93.2					

4. Táblázat: $^1\text{J}_{\text{NH}}$ spin-spin csatolások a PAF szekvenciája mentén.

Az alkalmazott HSQC kísérletekben az INEPT periódusok összesített ideje kb. 22 ms volt, ezért a ^{15}N transzverzális relaxációból adódó elvesztés egyrészt nem lehet jelentős, másrészt (a fentiek miatt) a legtöbb aminosav esetében közel egyforma mértékű. Ugyanezen okokból a T_2 relaxáció következtében létrejövő, az egyes korrelációk esetében potenciálisan eltérő mértékű vonalszélesedés sem

okozhat szignifikáns torzulást a térfogati integrálok egymáshoz viszonyított értékében az elemzésünk során használt integrálási módszer használata mellett (III. 2. 5. fejezet). Az alkalmazott *hsqcetgpsi* szekvenciákban azonban az INEPT periódusokban a proton transzverzális relaxáció okozhatott veszteséget az alacsony hőmérsékletű tartományokban.

A vonalszélesedés és az alkalmazott integrálási módszer torzító hatását egy alternatív adatfeldolgozási módszerrel szimuláltuk (17. ábra). A később leírtakkal azonos nyers adatokból kiindulva Fourier transzformáció előtt a FID-en a szokásos 1 Hz helyett $lb = 10$ Hz paraméterezéssel \cos^2 súlyfüggvényt alkalmaztunk. Három jól elkülönülő jelre a mesterségesen kiszélesített jelek esetében is megismételtük a kiértékelést, de ezúttal nem a csúcsok állandó intenzitáson vett térfogatát, hanem abszolút intenzitását figyelembe véve. Ez az értékelési módszer hasonló lefutású görbéket eredményezett, mint a korábbi integrálási módszer ($T_{\max} = 302 \pm 2\text{K}$; 17. ábra baloldalt). A három vizsgált amid ^1H - ^{15}N csúcs integráljait a kétállapotú termodinamikai modellel illesztve (a következő fejezetben tárgyalt) eredményeinkhez nagyon hasonló termodinamikai paramétereket kaptunk ($\Delta H_u = 57 \pm 3 \text{ kJ/M}$, $T_h = 328 \pm 2\text{K}$, $T_l = 276 \pm 3\text{K}$, $\Delta C_p = 2.1 \pm 0.2 \text{ kJ/M/K}$, $\Delta G_{u,\max} = 2.4 \pm 0.1 \text{ kJ/M}$), de a másik módszerhez képest az illesztés hibája valamelyest növekedett (17. ábra, jobboldalt). Mindezek alapján feltételezhető, hogy a PAF esetében a ^{15}N T_2 relaxációs idő eltérései nem okozhatnak jelentős hibát a térfogati integrálok értékében, amennyiben az elemzés során a jelek állandó intenzitáson vett integráljait vesszük figyelembe. Nem lehet azonban kizárni, hogy a víz viszkozitásának változása alacsony hőmérsékleten befolyásolhatja a ^1H T_2 értékét, és így az INEPT blokkot tartalmazó kísérlet kvantitatívitasát is.



17. Ábra: Erős exponenciális súlyfüggvény hatása a ^{15}N - ^1H -HSQC keresztcsúcsok kiértékelésére. Bal oldalt: három jól elkülönülő amid (NH) jel (C7: zöld, C14: kék, T37) intenzitása a hőmérséklet függvényében. Jobboldalt: a T37 NH csúcs illesztése a kétállapotú termodinamikai modellel. Kék: kitékeredett, piros: feltekeredett frakció aránya.

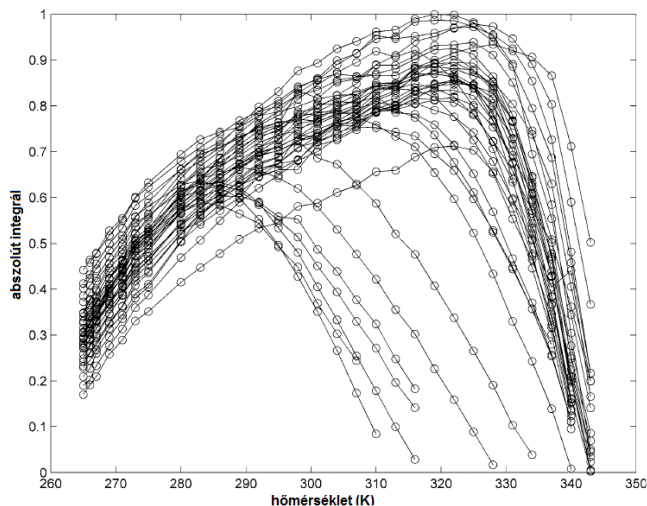
Figyelembe kell venni, hogy az oldat kémhatása is befolyásolhatja a keresztcsúcsok intenzitását, mivel az egyedi amid hidrogének cseresebessége eltérő lehet. A ^{15}N - ^1H HSQC spektrumok legnagyobb integrál értéket mutató csúcsához (N^{H} , Lys 42) viszonyítva pH = 6,0-n az összes csúcsot figyelembe véve az átlagos maximális intenzitás $86 \pm 7\%$. Ahogy a 18. ábrán látható, a csúcsok többségénél az integrálok maximális értéke a legtöbb jel esetében 310-330 K között, míg más csúcsoknál ennél alacsonyabb hőmérsékleten volt. Ezért kontroll kísérletként sósav, illetve nátrium-hidroxid oldattal való titrálással megvizsgáltuk a keresztcsúcsok intenzitását a pH = 2-11 tartományban, a kémhatást 0,2-0,3 értékenként változtatva. Azt találtuk, hogy a jelek többségénél az intenzitás maximuma pH ~ 6,0. A többi aminosav (2, 10, 11, 19, 23, 32, 33. és 48.) maximális intenzitása pH ~ 4,0 volt. Ezt a jelenséget a következők alapján kezeltük:

1.) Méréseink során a legtöbb aminosav cseresebességének megfelelően az oldat kémhatását pH = 6.0-ra állítottunk be foszfát pufferrel. A nátrium-foszfát puffer további előnye más pufferekkel szemben, hogy az oldat kémhatásának hőmérséklettől való függése csekély mértékű: a vizsgált hőmérsékleti tartományon belül (265-344 K) $\Delta\text{pH} \leq 0,25$.¹⁶⁵⁻¹⁶⁷ Ekkora változás a csúcsok térfogati integrálját kevesebb mint 1%-al befolyásolhatja, ezért a puffer kémhatásának hőmérsékletfüggését az elemzés során elhanyagoltuk.

2.) Mivel a pH-t az 1. pont alapján állandónak tekintettük, az egyes csúcsok térfogati integráljának maximális értékét vettük 100%-nak. Más szóval a relatív

intenzitást nem a (globálisan) legnagyobb integrálra, hanem az aminosav egységenként vett legnagyobb (NH vagy CH) térfogati integrálra normáltuk.

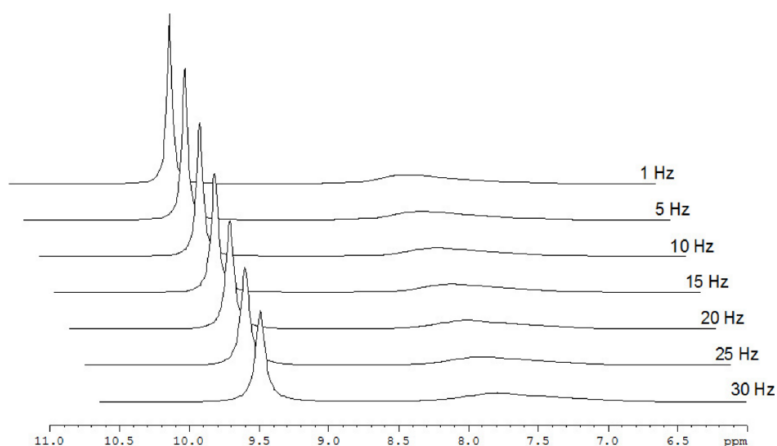
3.) Az oldószerrel való csere egzakt figyelembevétele magas és alacsony hőmérsékleteken nagyon bonyolult lenne. Annak érdekében, hogy ezt elkerüljük, a kísérlet figyelmes kivitelezésével – a 90°-os impulzusok minden egyes hőmérsékleten való kalibrálásával a hőmérsékleti egyensúly beállta után – igyekeztünk az oldószerrel való csere intenzitástorzító hatását a lehető legnagyobb mértékben csökkenteni, mivel a helyes kalibráció mellett kivitelezett HSQC kísérlet során a víz mágnesezettsége a +z irányban marad az adatgyűjtés kezdete előtt, ezzel minimalizálni lehet az amid protonok cseréjéből adódó intenzitástorzulást.



18. Ábra: A PAF főlánc amid ^1H - ^{15}N keresztcsúcsainak (PULCON¹⁴⁹¹⁴⁹¹⁴⁹¹⁴⁹ szerint korrigált) térfogati integráljai a hőmérséklet függvényében.

A fent leírtak alapján nem feltételezhető, hogy magas és alacsony hőmérsékleten a térfogati integrálok a 18. ábrán látható nagymértékű csökkenését relaxációs hatások vagy az oldószerrel való csere okozná. Mivel a kísérletek során nem változott a fehérjekoncentráció, a térfogati integrálok változása a többi tényező kizárásával a fehérje más konformációval való cserefolyamataira utal. Ebben az esetben viszont felvetődik a kérdés, hogy vajon miért nem látjuk a minor konformáció jeleit az NMR spektrumokon? Erre többféle magyarázat is adódhat. (1.) Előfordulhat, hogy ezeken a hőmérsékleteken nem egy, hanem több minor konformáció is létre jön, melyek egyenként olyan alacsony populációban vannak jelen, hogy jelük nem megfigyelhető¹⁶⁸ (mint később látni fogjuk, eredményeink a

többhelyű csere lehetőségét erősítik meg). (2.) A cserepartner NMR jele akkor is rejtve maradhat, ha a fő konformációval való cseresebessége akár a ^1H , akár a ^{15}N kémiai eltolódás időskálán a közepes tartományba esik. Ennek eredményeképpen a cserepartner széles és alacsony intenzitású jelet ad, ami beleolvad az alapvonalba. A két magyarázat kombinációjaként például háromhelyű csere is okozhatja az egyik cserepartner jelének rejtve maradását, amit az alábbi szimulált* spektrumok szemléltetnek (19. ábra).



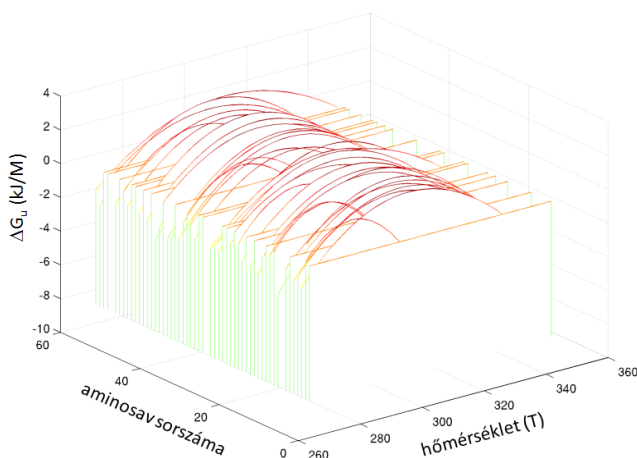
19. Ábra*: A háromhelyű csere egy esetének szimulációja. A szimulált spektrumok azt az esetet szemléltetik, mikor a megfelelő cseresebesség és populáció-arányok fennállásakor minor (de nem elhanyagolható mennyiségű) állapotok NMR jele nem emelkedik ki az alapvonalból. A szimuláció során használt paraméterek: #1 és #2, ill. #1 és #3 között $1-30\text{ s}^{-1}$ (a spektrum jobb szélén való jelzés szerint), míg a két minor populáció (#2 és #3) cseresebessége 850 s^{-1} . $LB=20\text{ Hz}$ (line broadening). Az egyes állapotok kémiai eltolódása és populációja: #1: $9,5\text{ ppm}$, $X_1=0,60$; #2: $8,0\text{ ppm}$, $X_2=0,25$; #3: $7,0\text{ ppm}$, $X_3=0,15$. A #3 állapot jele ebben az esetben teljesen eltűnik a spektrumokról, ami az NMR módszer számára láthatatlan állapotot eredményez.

IV. 2. 3. A PAF kitekeredésének termodinamikai modellezése

A HSQC keresztcsúcsok integráljainak termodinamikai modellel való illesztése meglepő eredményeket hozott. Az integrálok hőmérsékletfüggése minden aminosav esetében hasonló lefutású harang alakú görbét adott (18. ábra), de az egyes egységek integráljának maximumai eltértek egymástól és ez alapján két jól elkülönülő csoportot képeztek. Ugyanez a tendencia az illesztés alapján kapott ΔG_u

* A szimulált spektrumok Dr. Rohonczy János számításainak eredményei, melyet a disszertáció alapjául szolgáló (Fizil et al. Chemistry, 2015) publikáció kiegészítő anyagában közöltünk

értékek hőmérséklet és aminosav egység függvényében való ábrázolásakor is látványos (20. ábra). A ^{15}N - ^1H HSQC spektrumon a maximális intenzitások alapján az első csoportba a K2, S10, K11, D19, K30, F31*, D32, N33 és Y48 egységek kerültek. A második csoportba az összes többi értékelhető** egységet soroltuk (a szekvencia mentén 3, 4, 5, 7, 8, 9, 13, 14, 16, 18, 20, 21, 24, 25, 26, 27, 34, 36, 37, 38, 39, 40, 42, 44, 47, 50, 51, 54, 55 aminosavakat). Az illesztés során kapott termodinamikai paraméterek átlagos értékei alapján ugyanezt a két csoport lehetett elkülöníteni: $T_{\text{low}1} = 271 \pm 4 \text{ K}$; $T_{\text{low}2} = 281 \pm 4 \text{ K}$, $T_{\text{max}1} = 289 \pm 7 \text{ K}$; $T_{\text{max}2} = 306 \pm 4 \text{ K}$.



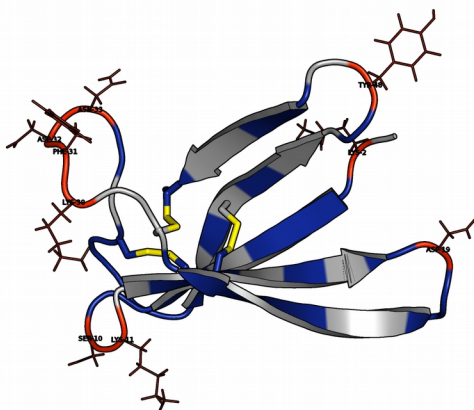
20. Ábra: A ΔG_u hőmérsékletfüggése aminosavanként a kétállapotú kitekeredési modell szerint. Az 55-nél nagyobb sorszámos az Asn NH_2 oldalláncokra vonatkoznak. A lapos ΔG_u -T értékek a nem értékelhető egységekhez rendelhetők.

A két csoport elkülönülését legmarkánsabban az mutatta, hogy fehérjekitekeredés a szakirodalomban elfogadott kétállapotú Becktel-Schelmann-féle termodinamikai modellje⁸⁶ alapján csak az első csoportba tartozó egységeket lehetett elfogadható hibahatár alatt (önkéntesen 6%-ot határoztuk meg tolerálható hibahatárnak) illeszteni. A két csoportot a PAF

* A K30 és F31 aminosavak az eredeti publikációban (Fizil et al. Chemistry, 2015) közöltek szerint az 1. csoportba sorolhatók. A publikációs folyamat során az értékelés paraméterein a bíráló javaslatára kis mértékben változtattunk, ennek következtében az illesztés hibája ezekben az esetekben valamivel 6% fölé került, ennek ellenére a két említett aminosavat továbbra is az 1. csoportba soroltuk. Az egységesség kedvéért a dolgozatban is ezt követem.

** Egyes esetekben előfordult, hogy adott hőmérsékleteken két jel átfedése miatt a térfogati integrálok nem adhatóak meg pontosan, ezeket az egységeket az értékelés során nem vettük figyelembe. Értékelhető egység alatt azokat a jeleket értem, melyek térfogati integráljai a teljes hőmérsékleti tartományban megszakítás nélkül értékelhetőek voltak.

térszerkezetén színekkel jelölve azt az eredményt kaptuk, hogy az 1. csoportot alkotó aminosavak a fehérje nem-konzervált hurok régióiban helyezkednek el, míg a 2. csoport tagjai jellemzően a konzervált régióknak felelnek meg, melyek többsége H-hidakkal stabilizált β -szálat alkot (21. ábra).

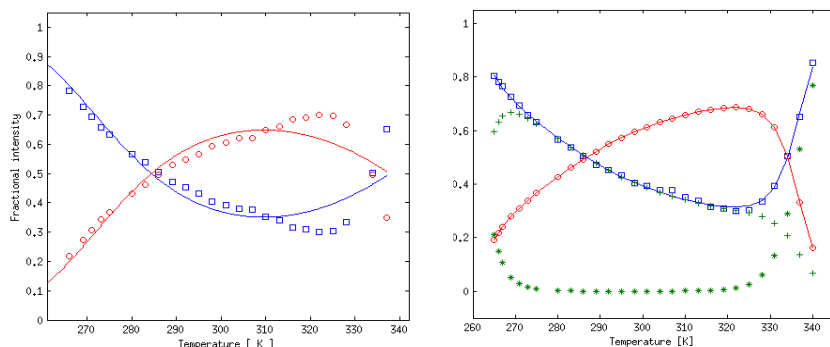


PAF (2KCN)	A	Y	T	G	K	C	T	K	E	N	E	C	K	Y	K	N	A	G	K	D	T	F	I	K	C	P	K	E	D	K	K	C	T	D	N	N	K	C	T	V	D	T	N	N	A	V	D	C	D	---								
AFP (1AFP)	A	T	Y	N	G	K	C	Y	K	K	D	N	I	C	K	Y	K	A	Q	S	G	K	T	A	I	C	K	---	Y	V	K	K	C	P	R	D	G	A	K	C	E	F	D	S	Y	K	G	K	C	Y	C	---						
XP_001262586	L	E	Y	K	G	E	C	F	T	K	D	N	T	C	K	Y	K	I	D	-	G	K	T	L	A	K	C	P	S	A	A	N	T	K	C	E	K	D	G	N	K	C	T	Y	S	N	R	K	V	K	C	D	F	R	H			
XP_384921	L	E	Y	W	G	K	C	T	K	A	E	N	R	C	K	Y	K	N	D	K	G	D	V	L	Q	N	C	P	K	F	D	N	K	K	C	T	K	D	G	N	S	C	K	W	S	A	S	K	A	L	T	C	Y	---				
EPS26293	S	K	Y	G	G	E	C	N	L	K	T	N	A	C	R	Y	T	K	G	-	G	K	S	V	F	V	P	C	G	T	A	A	N	K	R	C	K	S	D	R	H	H	C	E	Y	D	E	H	H	K	R	V	D	C	Q	T	P	V
XP_001391221	S	K	Y	G	G	E	C	S	V	E	H	N	T	C	T	Y	L	K	G	-	G	K	D	H	I	V	S	C	P	S	A	A	N	L	R	C	K	T	E	R	H	H	C	E	Y	D	E	H	H	K	T	V	D	C	Q	T	P	V

21. Ábra.: Felül: a PAF szalagos megjelenítése a kétállapotú modell illesztési hibahatárainak jelölésével. Piros: kétállapotú modellel 6%-os hibahatár alatt illeszthető régiók. Kék: háromállapotú modellel illeszthető régiók. Szürke: nem megfigyelhető régiók. Alul: a PAF szekvenciaillesztése néhány homológ fehérje szekvenciájával. Piros kiemeléssel a kétállapotú modellel illeszthető egységek láthatók, melyek nem konzervált hurok régiókban helyezkednek el.

A kétállapotú modellel való illesztés hibáját tekintve nem meglepő, hogy a két csoport tagjaira kapott átlagos termodinamikai paraméterek is eltérnek. Ez alapján úgy tűnik, hogy a PAF kitekeredése (az 1. csoport tagjait leszámítva) nem magyarázható két (egy feltekeredett és egy kitekeredett, F és U) konformációs állapottal, hanem legalább egy harmadik (I vagy U_2) állapot feltételezése szükséges. A háromállapotú modell bevezetése szignifikánsan csökkentette az illesztés hibáját minden megfigyelhető egységre nézve (illesztés hibája $< 5\%$), beleértve az 1. csoport tagjait is (i. h. $< 2,5\%$). A 2. csoport egy reprezentatív példájának* kétféle modell szerint illesztését a 22. ábra szemlélteti.

* Az összes megfigyelhető aminosav egység mindkét-féle modellel történő illesztése grafikusán ábrázolva megtalálható az eredeti publikáció kiegészítő anyagában (9-25 oldal), mely az alábbi linken érhető el: http://onlinelibrary.wiley.com/store/10.1002/chem.201404879/asset/supinfo/chem_201404879_sm_miscellaneous_information.pdf?v=1&s=d5dd97617bb99596b527c3880454882fcd1ca683



22. Ábra: A 14. cisztein amid NH keresztcsúcs hőmérséklettől függő térfogati integráljának illesztése a két és háromállapotú modellel. Baloldalt: kétállapotú kitekeredési modell, az illesztés hibája 11 %. Piros o: feltekeredett (F), kék □: kitekeredett (U) frakció populációja a hőmérséklet függvényében. Jobboldalt: illesztés a háromállapotú modellel, az illesztés hibája 1,77%. Piros o: F, zöld +: I, zöld *: U, kék □: I és U populációjának összege.

A három konformációs állapot közötti átalakulás elméletileg kétféle útvonalon is történhet: vagy egy átmeneti formán keresztül: $F \rightarrow I \rightarrow U$ (röviden „FIU” modell), vagy két egymástól független konformációváltozás történik: $F \rightarrow U_1$; és $F \rightarrow U_2$ (röviden FU_2 modell). Adataink mindkét modell segítségével jól illeszthetők; az illesztés hibájának különbsége nem utal az egyik vagy másik modell nagyobb valószínűségére. Mivel a kitekeredett konformációkról nem rendelkezünk direkt információval, az adatok interpretálásakor önkényesen a FIU modell mellett döntöttünk. Ebben az esetben a két átalakulási esemény miatt megkétszereződik a kiszámítható termodinamikai paraméterek száma és az így kapott eredmények konformációváltozási eseményenként hasonlíthatóak össze a kétállapotú modell eredményeivel. A háromállapotú modell $F-I$ átmenetére energetikailag hasonló paraméterek számolhatók ki az 1. csoport tagjaira, mint amit a kétállapotú modellel kapunk: $\Delta H_{U1} = 65 \pm 13$ vs. 66 ± 9 kJ M^{-1} , $\Delta C_p = 1,8 \pm 1,1$ vs. $3,7 \pm 1,1$ kKM $^{-1}K^{-1}$ (és ez a kétállapotú modellel rosszabbul illeszthető 2. csoportra is igaz). Ezzel szemben az $I-U$ átmenetre mindkét csoport esetében jóval nagyobb ΔH_{U2} értékeket kaptunk (melyeknek szórása is nagyobb volt). A két esemény közötti különbség a 2. csoportnál volt nagyobb, ami arra utalhat, hogy a 2. csoport esetében az $I-U$ átmenet termodinamikailag jobban gátolt folyamat mint az 1. csoportnál. Ez összhangban van azzal, hogy a 2. csoportot alkotó aminosavak zöme hidrogénhidakkal és diszulfidhidakkal stabilizált régióban helyezkedik el. Abban az esetben, mikor az elemzéshez a $^{13}C_\alpha H_\alpha$ magok jeleit használtuk, az intermedier

forma okozta jellegzetes lefutású görbék (vagyis az integrálok csökkenését a fehérje-stabilitás szempontjából extrém hőmérsékleteken) az amid ^{15}N - ^1H magokon való detektáláshoz hasonlóan itt is ki lehetett mutatni, de az így kapott termodinamikai paraméterek némileg eltértek a korábbiaktól (hiszen a fehérjén belül is eltérő lokalizációjú „megfigyelő” magokat alkalmaztunk). Továbbá az illesztések hibája alapján nem lehetett határozott különbséget tenni az 1. és 2. csoport között, az illesztési hibák összességében is magasabbak voltak.

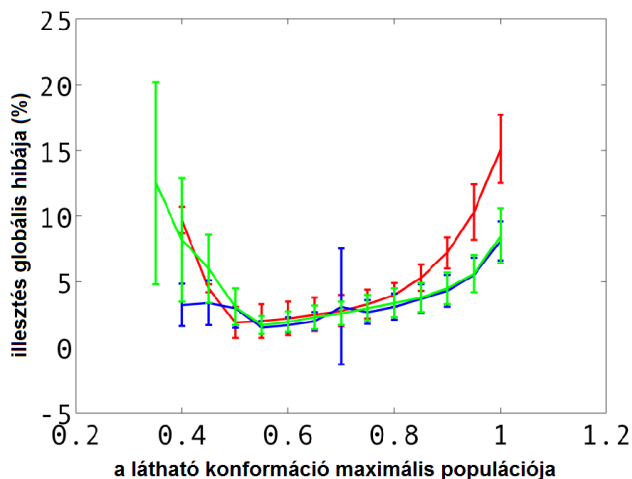
		ΔH_U (kJ/M)	T_{high} (K)	T_{low} (K)	T_{maxstab} (K)	Δc_p (kJ/M/K)	$\Delta G_{U_{\text{max}}}$ (kJ/M/K)	Hiba (%)
^{15}N - ^1H	1. csoport	66 ± 9	307 ± 10	271 ± 4	289 ± 7	$3,7 \pm 1,1$	$1,9 \pm 0,2$	4 ± 2
	2. csoport	46 ± 5	331 ± 5	281 ± 4	306 ± 4	$1,8 \pm 0,2$	$1,8 \pm 0,2$	15 ± 3
^{13}C - ^1H	1. csoport	35 ± 11	329 ± 5	290 ± 10	309 ± 15	$1,8 \pm 0,4$	$1,1 \pm 0,5$	11 ± 2
	2. csoport	36 ± 10	330 ± 16	292 ± 5	310 ± 21	$2,0 \pm 0,5$	$1,1 \pm 0,5$	10 ± 2

5. Táblázat: a kétállapotú kitekeredési modellel számolt termodinamikai paraméterek átlaga.

		ΔH_U (kJ/M)	T_{high} (K)	T_{low} (K)	T_{maxstab} (K)	Δc_p (kJ/M/K)	$\Delta G_{U_{\text{max}}}$ (kJ/M/K)	Hiba (%)
$F \rightarrow I$	1. csoport	65 ± 13	353 ± 39	271 ± 5	312 ± 44	$1,8 \pm 1,1$	$3,8 \pm 1,6$	$2,1 \pm 0,6$
	2. csoport	34 ± 3	393 ± 12	284 ± 5	338 ± 16	$0,5 \pm 0,2$	$2,7 \pm 0,4$	$2,6 \pm 0,6$
$I \rightarrow U$	1. csoport	176 ± 196	334 ± 37	246 ± 35	290 ± 72	$2,6 \pm 2,5$	$2,86 \pm 1,1$	$1,6 \pm 0,6$
	2. csoport	273 ± 78	334 ± 30	218 ± 48	276 ± 51	$3,7 \pm 3,0$	$2,49 \pm 0,2$	$2,9 \pm 0,8$

6. Táblázat: a háromállapotú kitekeredési modellel számolt termodinamikai paraméterek átlaga a FIU modell esetében külön $F \rightarrow I$ és $I \rightarrow U$ átalakulási eseményekre.

A hőmérsékleti kitekeredés modellezése során az illesztések teljes rendszerre vonatkoztatott hibájának minimalizálása alapján úgy becsültük, hogy a PAF esetében az NMR-rel megfigyelhető formához képest a rejtett konformációk aránya elérheti a 30%-ot még szobahőmérsékleten is, ahol a látható konformáció aránya a legnagyobb. Ez az adat meglepő lehet, de a szakirodalomban nem teljesen példa nélküli. A kitekeredett frakció arányát 8%-ra becsülték egy hősokk fehérje esetében¹⁶⁹, és 37%-ra az élesztő frataxin fehérjénél⁸³. A teljes rendszerre vonatkoztatott illesztési hiba a modellválasztástól függetlenül (FU , FIU vagy FU_2) akkor volt a legalacsonyabb, amikor a modellezés során a maximális stabilitású hőmérsékleten a feltekeredett frakció populációját 0,6-0,7 közötti értékekre állítottuk (23. ábra), ahol a teljes fehérjekoncentráció = 1).



23. Ábra: Az illesztés teljes rendszerre vonatkoztatott hibája a látható konformáció maximális stabilitású populációja függvényében a ^{15}N - ^1H HSQC spektrumok alapján. Modell jelölések: piros = FU, zöld = FIU, kék: FU₂.

Hogy megerősítsük a fenti modellezésből következő feltételezést, a rejtett konformációk* a láthatóakhoz viszonyított arányát független kvantitatív NMR mérésekkel is megbecsültük. Referencia vegyületként harmadlagos szerkezettel nem rendelkező** ^{15}N -jelzett alanin felhasználásával szintetizált RAQI (azaz arginin-(^{15}N)alanin-glutamin-izoleucin) szekvenciájú tetrapeptidet használtunk, mely a ^{15}N - ^1H HSQC spektrumon egyetlen jelet ad (a ^{15}N -Ala amid nitrogén és hidrogén korrelációjaként). Elsőként az ismert koncentrációjú tetrapeptid és PAF D₂O-ban feloldott oldatán preszaturációs vízelnyomás mellett (zgpr) mért 1D ^1H NMR spektrumain kiválasztottunk egy-egy alacsony kémiai eltolódású metil jelet (mivel a vízelnyomásnak ebben a régióban már nincsen jelintenzitást torzító hatása). Az 1D spektrumok integráljai alapján a várt koncentrációk közötti eltérést az 1D NMR elvárható kvantitatívitasának megfelelően 2%-on belül volt, ezt

* Az NMR módszerrel közvetlenül nem megfigyelhető konformációkra publikációkban és előadásokon időnként a közismert kozmológiai sötét anyag elmélettel analóg módon „NMR sötét anyag”-ként hivatkozunk. Az ilyen elnevezés népszerűsítő irodalomra emlékeztető jellege miatt a dolgozatban továbbra is a „rejtett”, illetve „nem megfigyelhető” kifejezéseket használom.

** A RAQI szekvenciájú tetrapeptid szerkezetét azonos oldatkörülmények között előkészített mintán előzetesen vizsgáltam. A várható aminosavvegyészen belüli és szekvenciális NOE-kon kívül (pl. $H^N_{(i)}-H^{\alpha}_{(i-1)}$) a peptid NOESY spektrumán nem láthatók szekvenciálisan távol eső atomoktól származó keresztcúcsok, ami arra utal, hogy a peptid a vizsgált időskálán rendezetlen szerkezetű. A kisméretű peptid azért alkalmas referencia molekula, mert ha rendelkezik is harmadlagos szerkezettel akkor az a peptid olyan konformációk sokaságaként jön létre, melyek között az átalakulás gyors, ezáltal a mért spektrum lehet kvantitatív, ellentétben a PAF rejtett konformációi által okozott jelenségekkel.

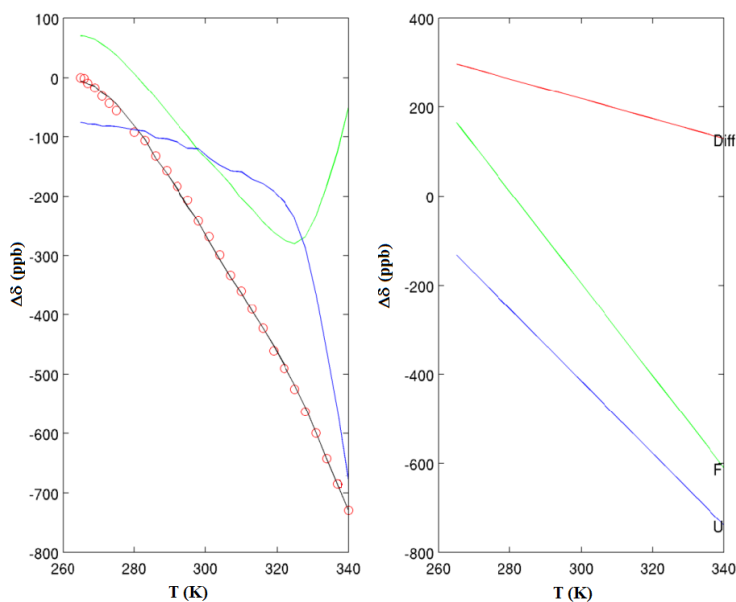
tömegbeméréssel előkészített ismert koncentrációjú szacharóz oldattal is igazoltuk. Ezzel az egyszerű módszerrel azt zártuk ki, hogy a PAF tömegbemérés és UV abszorbanca alapján való koncentráció meghatározás esetleges hibája lenne összefüggésbe hozható a hiányzó jelintenzitással. Ezzel szemben, amikor a könnyűvizes oldatban feloldott minta ^{15}N - ^1H -HSQC jeleinek térfogati integrálja alapján számoltuk ki a PAF oldatbeli koncentrációját a tetrapeptid referenciához képest, a száraz liofilizátum tömegbemérése és UV abszorbanciája alapján várhatónál szobahőmérsékleten is 20-27%-kal kisebb koncentrációt kaptunk attól függően, hogy a PAF mely keresztcsúcsának térfogati integrál értéke alapján számoltunk. Ez a jelenség a IV. 2. 2. fejezet elején már kifejtett, nagy valószínűséggel kizárható potenciális hibaforrásokon kívül további három jelenséggel magyarázható: (1.) a PAF-ban valóban vannak az adott HSQC technika körülményei között nem megfigyelhető konformerek. (2.) Rövid ^1H T_2 relaxációs idők esetében hőmérséklettől függő jelveszteség léphet fel. Utóbbi azzal magyarázható, hogy a globális korrelációs idő (τ_c) a víz viszkozitásváltozásától és azzal összefüggésben hőmérséklettől is függ¹⁷⁰, és ennek leginkább alacsony hőmérsékleten lehet a jelintenzitást torzító hatása. A valóságban valószínűleg mindkét jelenség egyszerre fejt ki hatását, és ez tovább bonyolítja a nem megfigyelhető konformáció mennyiségének meghatározását. Mivel magas hőmérsékleten (330-347K) a várható T_2 -relaxációs jelveszteség kevésbé jelentős mint alacsony hőmérsékleten, a ténylegesen mért jelveszteség viszont nagyobb mértékű (73. oldal, 18. ábra) mint a vizsgált legalacsonyabb hőmérsékleti ponton (265K), az valószínűsíthető, hogy magas hőmérsékleten a jelveszteséghez a láthatatlan konformációk is jelentősen hozzájárulhatnak. Végül, (3.) magas hőmérsékleten a ^1H T_1 relaxációs idő növekedésének hatása is csökkentheti a detektált jelintenzitást, amennyiben a HSQC spektrumok paraméterezésénél minden hőmérsékleten egyforma repetíciós időt használunk*, mert jeltelítés következhet be. Mivel legnagyobb részben ez a paraméter határozza meg az NMR mérések hosszát, az indokolatlanul hosszú repetíciós idő sem jelenthet megoldást, ezért a (D1) kísérleti paraméter optimalizálása leginkább tapasztalati úton történhet, mivel a szakirodalomban jelenleg nem található megfelelő adat fehérjék hőmérséklettől függő elméleti ^1H T_1 relaxációs idő értékeire. Ugyan kísérleteinkben állandó (D1 = 2.5 s) repetíciós időt alkalmaztunk, a III. 2. 5. fejezetben kifejtett kontroll kísérletekkel kizártuk annak a lehetőségét, hogy ez az effektus jelentős hatással lehet a detektált jelek intenzitására.

*A HSQC kísérletek paraméterezését a III. 2. 5. fejezetben fejtettem ki

IV. 2. 4. A rejtett konformációk jellemzése

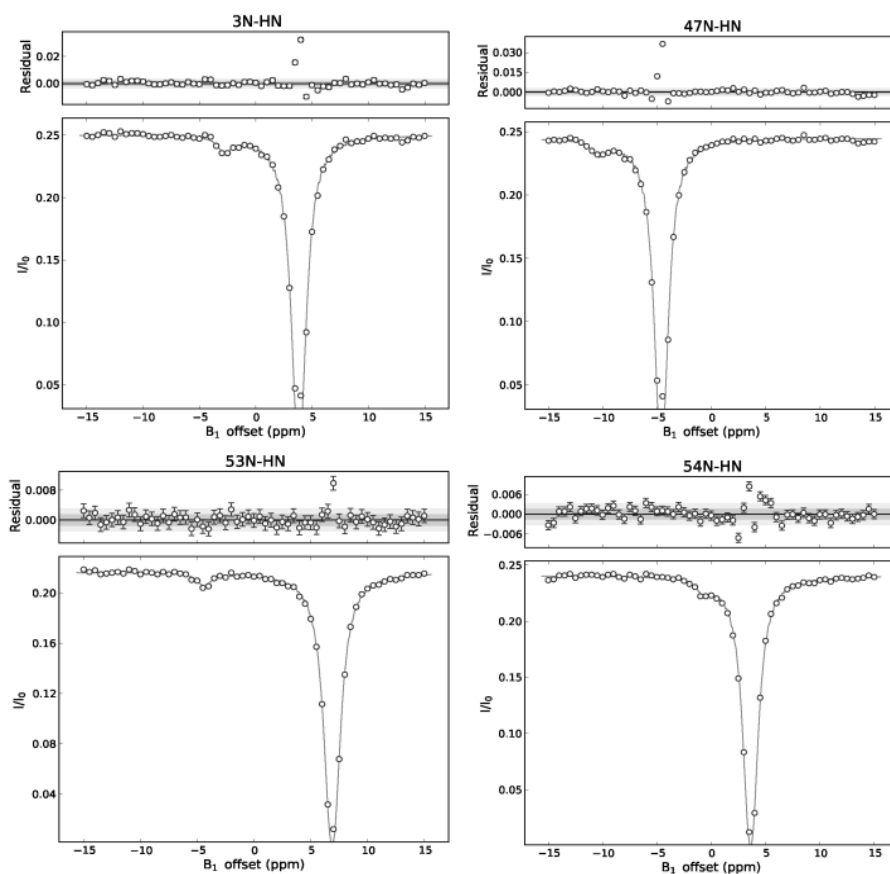
Az előző fejezetekben leírt okfejtés alapján azzal a meglepő ténnyel találjuk szemben magunkat, hogy az oldatfázisú NMR módszerekkel vizsgált fehérjeminta számottevő mennyiségben tartalmazhat olyan konformációs állapotokat, melyekről azon kívül hogy az oldatban valamilyen arányban jelen vannak a látható forma mellett, nem tudunk semmit. Ahhoz, hogy a minor konformációk szerkezetéről információt szerezzünk, háromféle megközelítést alkalmaztunk. Elsőként a ^{15}N - ^1H kémiai eltolódásokat elemeztük a fenti modellek alapján feltételezett populációk figyelembevételével, majd a rejtett cserepartnerek egy kisebb hányadát közvetlenül is azonosítottuk a ^{15}N -CEST módszer segítségével. Végül, a kísérleti úton nyert adatokkal megkötött sokaságon alapuló molekuladinamikai szimulációk segítségével alkottunk modelleket a rejtett cserepartnerek szerkezetéről.

Első megközelítésként a hőmérséklet függvényében mért kémiai eltolódásokat elemeztük azzal a feltételezéssel, hogy minden konformáció hozzájárul a megfigyelhető kémiai eltolódáshoz, és a hozzájárulás arányban áll a konformáció populációjával (melyeket a fenti két és háromállapotú modellek alapján állítottunk be). Ez a fenomenologikus megközelítés a konformációs drift modellen alapszik, mely szerint azt feltételezzük, hogy minden konformációs állapot kémiai eltolódása lineárisan függhet a hőmérséklettől. Kétállapotú kitekeredés esetében tehát azt feltételezzük, hogy a megfigyelhető kémiai eltolódás az F és az U állapotok súlyozott átlagaként adódik, így a kémiai eltolódás változása kiszámítható. Ezzel a módszerrel az U állapot kémiai eltolódása ugyan nem számolható ki, de arról szerezhethünk számszerű információt, hogy F és U szerkezete milyen mértékben különbözik egymástól a kémiai eltolódások különbsége alapján. Ezzel a számítással a legnagyobb ^{15}N kémiai eltolódás különbségeket a 3, 47, 54 és 55. aminosavakra kaptuk, melyek mind a PAF terminális régióihoz esnek közel (később látni fogjuk, hogy a CEST kísérletek során is ezek a régiók adtak mérhető effektust). Fontos megemlíteni, hogy a PAF esetében sem a ^{15}N , sem a ^{15}N - ^1H kombinált kémiai eltolódásokat nem lehetett megfelelően illeszteni olyan közelítéssel⁸⁵, mely során U és F között gyors cserét feltételezünk, és a kémiai eltolódást hőmérséklettől független mennyiségként kezeljük.



24. Ábra: A Cys7 ^{15}N kémiai eltolódásainak illesztése F és U populációk alapján. Baloldalt a piros karikák a kísérleti pontokat, a fekete vonal az illesztést jelöli. Jobboldalt F (zölddel) és U (kékekkel) feltételezett ^{15}N kémiai eltolódás változását, pirossal pedig a kettő különbségét ábrázoltuk.

^{15}N -CEST kísérletek segítségével a PAF oldatában létrejövő, lassú cserében résztvevő minor konformációk jelenlétét mutattuk ki. A kísérleti körülmények optimalizálása után 298 K-n és pH = 6.0-n a PAF rejtett konformációinak jelenlétét mutattuk ki a polipeptidlánc mindkét terminálisának közelében: CEST effektust mutatott a Tyr 3, Thr 47, Ala 51, Asp 53 és a Cys 54 N^{H} . A CEST-profilok illesztésével¹²³ kinetikai és a rejtett konformációk arányára vonatkozó paramétereket is meg lehetett határozni. Szimultán illesztést követően az öt érintett egységre vonatkoztatva a csere átlagos sebességi állandója $K_{\text{ex}} = 165 \pm 62 \text{ s}^{-1}$, a minor konformációk populációja pedig $p_{\text{B}} = 0,15 \pm 0,02\%$ -nak adódott. Ami a CEST eredmények kapcsán igazán meglepő volt, hogy a minor és major konformációk kémiai eltolódásának különbsége akár a 11 ppm-et is elérte (az Asp53 esetében), ami a fő formához viszonyítva igen jelentős mértékű szerkezeti különbségre utal.



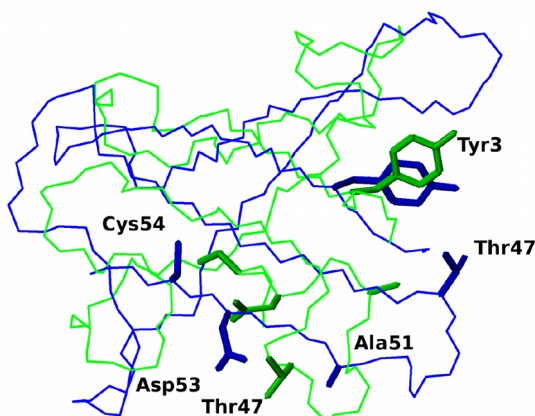
25. Ábra: Négy kémiai csere effektust mutató egység CEST profilja. Az üres karikák a kísérleti pontokat, a folytonos vonal azok illesztését jelöli.

A major konformációtól való relatív kémiai eltolódásbeli eltérés (ppm egységben kifejezve) Tyr 3 = $-6,7 \pm 0,3$; Thr 47 = $-5,9 \pm 0,2$; Ala 51 = $+5,0 \pm 0,2$; Asp 53 = $-11,3 \pm 0,4$ és Cys 54 = $-4,4 \pm 0,3$ volt. Érdekes módon a CEST kísérletekben effektust mutató öt egység közül három azok közé tartozott, melyekre az U kémiai eltolódásának becslése alapján a legnagyobb eltérést mutatta a feltekeredett formától.

Molekuladinamikai szimulációval* előállított konformációs sokaságból szelektált, a CEST kémiai eltolódásoknak leginkább megfelelő modellek olyan szerkezet jelenlétére utaltak, melyben a fehérje C-terminálisához legközelebb eső β -szál sérül az antiparallel száltól történő eltávolodása révén. (A szelekció során

*A molekuladinamikai szimulációkat Dr. Gáspári Zoltán (PPK) tervezte, kivitelezte és értékelte, melyek rövid technikai leírását és értelmezését a fejezet végén tárgyalom részletesebben.

azt feltételezték, hogy a CEST effektust nem mutató aminosavak esetében a kémiai eltolódás nem változott a mérhető konformerhez képest.) Erre a nagyfokú konformációváltozásra az Asp 53 $^{15}\text{N}^{\text{H}}$ (CEST módszerrel kimutatható) minor formájának nagy kémiai eltolódás különbsége (-11,3 ppm) utal, és az 54. ciszteinhez közeli pozíciója miatt felveti akár a diszulfidmintázat átrendeződésének¹⁷¹ lehetőségét is (26. ábra). Hasonló jelenséget már korábban is megfigyeltek a BPTI fehérje esetében.¹⁷²



26. Ábra: A PAF (zöld) és CEST (kék) a mért kémiai eltolódások alapján várható főlánc konformációja. A jelentősebb eltérést mutató helyeken az oldalláncot is kirajzoltuk.

A fentiek alapján valószínűsíthető, hogy a PAF a térszerkezetének a valóságot megfelelően fedő leírása az NMR számára látható és láthatatlan formák egymástól eltérő dinamikájú konformációs sokaságok jellemzésével adható meg. Azért, hogy ezekhez a sokaságokhoz konkrét szerkezeteket is rendelhessünk, a hőmérséklettől függő NMR mérések termodinamikai modellezését partnerünk* segítségével olyan molekuladinamikai szimulációkkal egészítettük ki, melyekben kísérleti adatainkat bemeneti adatként használták fel.

A kísérleti adatokkal összeegyeztethető konformációs sokaságok létrehozásához kétféle módszert alkalmaztak. Amikor a jól meghatározott átlagos térszerkezethez képest a ps-ns időskálán való kisebb mértékű elmozdulások leírása volt a cél, melyek az NMR módszerrel közvetlenül megfigyelhető térszerkezet változásait tükrözik, akkor az új, pontosított térszerkezetből (pdb kód: 2MHV) kiindulva bemeneti adatként használták fel a rendparamétereket¹⁶. Ezen szimulációk során a molekulák belső mozgásait az S^2 rendparamétereknek

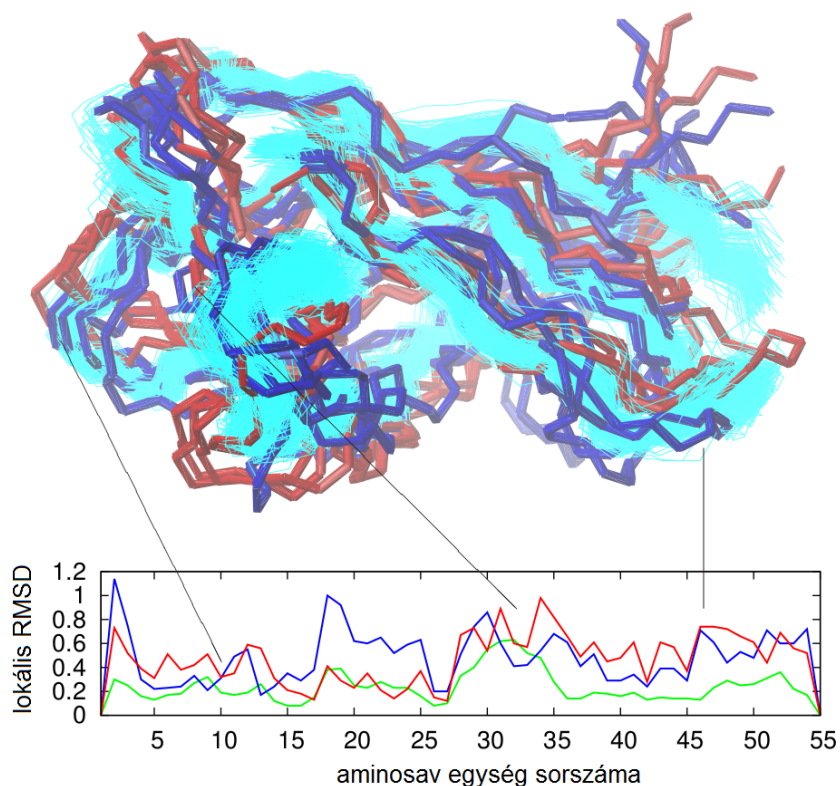
*A „MUMO” MD szimulációkat Dr. Gáspári Zoltán (PPK) tervezte, kivitelezte és értékelte.

megfelelően korlátozták, a konformációs változásokat ilyen módon feleltették meg a kísérleti adatoknak. Ezt úgy érték el, hogy egyidejűleg több molekulát szimuláltak és a paramétereket az egyes replikákon egyidejűleg értelmezték.¹⁷³

A másik módszert a nagyobb konformációs teret bejáró változások jellemzésére alkalmazták: azt kívánták vizsgálni, hogy mennyire térnek el egymástól a magas és alacsony hőmérsékleten megjelenő, részlegesen kitekeredett formák. Ekkor – az előzőekkel szemben – nem a szimulációt futtatták megkötésekkel, hanem egy megkötéseket nem alkalmazó szimuláció során létrejövő nagyszámú konformáció közül választották ki azokat, amelyek a kísérleti adatoknak, ebben az esetben az adott hőmérsékleteken (265 és 347 K-n) mért kémiai eltolódásoknak leginkább megfeleltek. A kiválasztási eljárás azon alapult, hogy a kiindulási sokaság egyes szerkezetei egyenként hányszor kerülnek bele a kétféle hőmérsékletet jellemző szelektált sokaságba, és az így kapott adatok alapján azokat választották ki, melyek közt a legnagyobb különbség mutatkozott a két szélső hőmérsékletet jellemző sokaságba való bekerülés gyakoriságában. Ez biztosította, hogy az így létrehozott sokaságok az adott hőmérsékletre jellemző térszerkezet-beli jellegzetességekben a lehető legnagyobb különbségeket mutassák. Az így kapott modellek – mivel kevés adatra támaszkodnak – nem tekinthetők olyan mértékben megbízhatónak mint az kisebb fluktuációkat reprezentáló szimulációk, de ezekre alapozva annyi megállapítható, hogy a várakozásoknak megfelelően a PAF nem tekeredik ki teljesen; a szerzeti változások leginkább a hurokrégiókat érintik, és a változás minőségileg eltér a hideg és a meleg tartományban (27. ábra*).

Kísérleti eredményeink a molekuladinamikai szimulációkkal összhangban arra engednek következtetni, hogy a PAF fehérje térszerkezete még a maximális stabilitású hőmérsékleten is egymásba átalakuló, NMR spektroszkópiával közvetlenül megfigyelhető és nem megfigyelhető állapotok sokaságaként írható le. A hőmérséklet emelkedésével vagy csökkenésével ez az egyensúly a nem megfigyelhető állapotok irányába tolható el, az extrém hőmérsékleten létrejövő formák pedig nem csak a megfigyelhetőtől, de egymástól is különböznek térszerkezetüket tekintve (27. ábra).

*A 26. és 27. ábrákt szerzőtársunk Dr. Gáspári Zoltán (PPK) készítette, ezeket a disszertációhoz az ő engedélyével használtam fel.



27. Ábra: A generált PAF konformációs sokaságok főláncának megjelenítése. Cián: a ps-ns dinamikát reprezentáló sokaság. Piros: a meleg- kék: és hideg hőmérsékletrehoz tartozó konformációk. Alul a modellek aminosavszekevecia függvényében ábrázolt lokális RMSD értékek láthatók.

A közvetlenül mérhető fizikai mennyiségek és a fenti megközelítésekkel nyert modellek illesztése arra utal, hogy azok a tényezők, melyek a kémiai eltolódások hőmérsékletváltozás hatására történő változását okozzák, a vizsgált tartományon belül lineárisan változnak a hőmérséklettel. Ezen befolyásoló tényezők közé a lokális geometria, a hidrogénhidak, solvatációs hatások és a kis-populációjú állapotokkal való csere sorolható. Ezért a hőmérsékleti stressz hatására létrejövő szerkezetváltozások leginkább az ún. „konformációs drift” modell segítségével írható le. A fentieket összefoglalva, a „láthatatlan” konformációk létének figyelembe vételével olyan cserepartnerre bukkantunk, mellyel való cserefolyamat időskálája a milliszekundum időskálára tehető. Ez a felismerés megváltoztatja a PAF szerkezetéről alkotott képünket: az oldatfázisú szerkezet egészét tekintve nem csupán egy a ps-ns időskálán kis mobilitású merev molekuláról van szó. Feltételezéseink szerint a PAF ennél jóval összetettebb

konformációs teret jár be: az NMR módszer számára látható éles ^{15}N - ^1H jeleket a létező konformációk fő tömege, kb. 70-80%-a adja, melynek detektálásával a fehérje natív állapotáról szerezhetünk információt. A maradék kb. 20-30% nagyobb részt a közepes cseresebesség tartományába esik, ezért közvetlenül nem megfigyelhető, kisebb részben pedig a natív konformációval való lassú csere révén CEST módszerrel kimutatható és jellemezhető.

IV. 2. 6. A rejtett cserepartnerek jelentősége az NMR-alapú szerkezetmodellezésben és a fehérjeanalitikában

Ahogy korábban már utaltam rá, a kisméretű, sok töltött oldallánccal rendelkező fehérjék (mely tulajdonságok általában az antimikrobiális hatású fehérjéket jellemzik) a globuláris fehérjék között kivételesnek tekinthetők, mert csupán primer szekvenciájukat tekintve (a diszulfidhidak nélkül) spontán nem tekeredhetnének fel, inkább a rendezetlen fehérjékre hasonlítanak¹⁷⁴, ahogy azt az IV. 1. 2. fejezetben leírt kísérletsorozat is jól példázza. A szakirodalomban a fehérjék kitekeredett frakcióinak arányáról kevés kísérleti adat található, ezért nem zárható ki az a lehetőség, hogy a globuláris fehérjék világában általánosnak tekinthető, hogy dinamikai szempontból változatos de az elérhető mérőmódszerekkel nem megfigyelhető szignifikáns mennyiségű konformációs izomer – mint esetünkben is – még szobahőmérsékleten is számottevő mennyiségben alakulhat ki az oldatban. Az olyan esetekben, mikor a közvetlenül nem-detektálható formák aránya jelentős a megfigyelhetővel szemben, a spektroszkópiai paraméterek fehérjeszerkezet vonatkozásában történő értelmezése igen összetetté válhat, mivel bizonyos NMR paraméterek (pl. a ^{15}N -spinrelaxáció) csak a detektált konformációra vonatkoznak, más paraméterek viszont a teljes rendszert jellemzik (pl. skaláris csatolások, vagy gyors csere esetében⁸⁵ a kémiai eltolódások). Más szavakkal kifejezve: minél nagyobb a „láthatatlan” konformációk aránya a látható(ak)hoz képest, a spektroszkópiailag mérhető fizikai mennyiségek molekulamodellezéshez való felhasználhatósága annál nagyobb mértékben függ attól, hogy a minor formák adnak-e járulékot a mért mennyiséghez.

A rejtett konformációk továbbá hiba forrását jelenthetik az NMR módszerrel történő peptid- ill. fehérjekoncentráció mérésekor is, és magyarázatot adhat azokra az esetekre, mikor a más módszerekkel (pl. UV spektrofotometriával) mért peptidkoncentráció nem egyezik az egyébként abszolút módszernek tekintett kvantitatív NMR mérések eredményeivel.^{149,175}

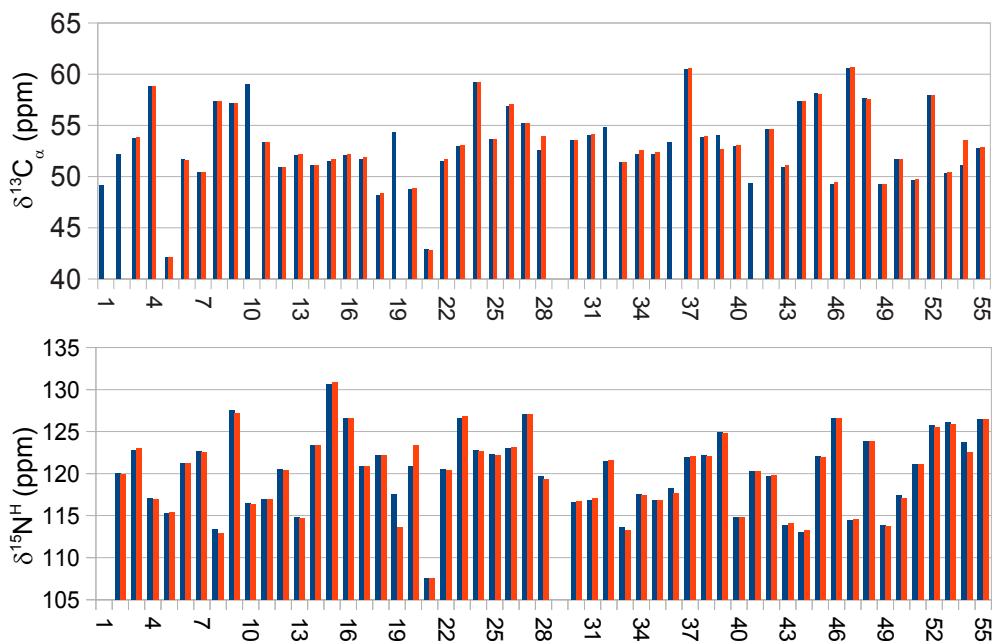
A spontán kialakuló de adott analitikai módszerrel nem detektálható állapotok léte egy sor egyéb kérdést is felvet mind a kutatás, mind az alkalmazás szintjén. Előbbire példa a fehérje és a kölcsönható partner interakciójának vizsgálata (különösen ha a partner is fehérje), mely során az abszolút fehérjekoncentráció és a a kötődésre ténylegesen képes, „aktív” koncentráció eltérhet egymástól, ami az interakció sztöchiometriájának és a kötődés termodinamikai paramétereinek meghatározásakor okozhat nehézséget, pl. izotermikus titrációs kalorimetria használatkor. Az alkalmazás szintjén pedig kiemelkedően fontos a fehérjealapú hatóanyagok esetében a biológiailag aktív- és esetleges inaktív izoformák koncentráció-arányának meghatározása.¹⁷⁶

IV. 3. A rejtett konformációk lehetséges szerepe a biológiai funkcióban: a PAF^{D19S} szerkezetének, dinamikájának és rejtett konformációinak vizsgálata

A fent leírt eredményeket tekintve biológiai szempontból az a legfontosabb kérdés, hogy vajon van-e szerepe a PAF hatásmechanizmusában annak, hogy ennyire diverz konformációs sokaság jellemzi. Valószínűleg addig, amíg nem azonosítják a PAF-fal közvetlenül kölcsönható molekulát és nem ismerjük az ahhoz való kötődésekor kialakuló konformációt és a kötődés kinetikáját, erre a kérdésre nem kaphatunk egyértelmű választ. A szakirodalomban találunk arra példát¹⁷⁷, hogy a ms-s időskálán történő fehérjemozgások a biológiai funkció szempontjából kritikus konformációváltozásokkal hozhatók összefüggésbe. Ezért nem lehet kizárni azt a lehetőséget, hogy a PAF funkcionális formája a hőmérsékleti kitekeredés során létrejövő, vagy akár a CEST módszerrel kimutatható konformációkhoz hasonló.

A PAF szerkezet-hatás összefüggéseinek felderítése során számos, egy vagy két aminosav cserét tartalmazó pontmutációt hordozó fehérjeváltozatot hoztunk létre. Az egyik ilyen fehérjeváltozat esetében melynél a 19. pozícióban található aszparaginsavat szerin aminosavra cseréltük (jelölése: PAF^{D19S}) azt találtuk, hogy amíg az antimikrobiális hatásereőség több nagyságrenddel csökkent a mutáció hatására, a PAF^{D19S} spektrális és szerkezeti tulajdonságai az előzetes szerkezetvizsgálat alapján nem változtak (28. és 30. ábra). A PAF^{D19S} ezért alkalmas modellnek tűnt az olyan szerkezet-hatás összefüggések tisztázására, melyek nem magyarázhatóak közvetlenül a látható konformáció változásaival. Ezért szerkezetét részletesebben is vizsgáltuk, majd összehasonlítottuk a natív PAF szerkezetével, cserefolyamataival, dinamikai tulajdonságaival, és hőmérsékleti kitekeredésével.

A ^{15}N -jelzett PAF^{D19S} mintán a korábbival azonos oldatkörülmények között felvettük a jelhozzárendeléshez és szerkezetmeghatározáshoz szükséges NMR spektrumokat. A 3D ^{15}N -TOCSY, ^{15}N -NOESY és 2D ^{13}C - illetve ^{15}N - ^1H HSQC spektrumok együttes értékelésével megadtam a A PAF^{D19S} ^1H , ^{15}N és részleges ^{13}C jelhozzárendelését. A kémiai eltolódás listát és a kísérleti körülményeket ebben az esetben is a BMRB adatbázis bioinformatikai eszköztárával validáltam, és közzé tettem az adatbázisban (ID: 25957). A főlánc konformációjára igen érzékeny C_α és N^{H} kémiai eltolódások összevetése egyértelműen jelzi a PAF^{D19S} és a módosítást nem tartalmazó PAF főlánc konformációjának nagyfokú hasonlóságát (28. ábra). A főlánc N^{H} kémiai eltolódások maximális különbsége a mutáció helyénél és annak közvetlen szomszédságában, az A20 esetében $\Delta\delta = 2,4$ ppm volt a ^{15}N kémiai eltolódás skálán, az összes többi esetben 0,2 ppm-en belül volt.*



28. Ábra: A PAF (kék) és a PAF^{D19S} C_α (felül) és NH (alul) kémiai eltolódásainak összehasonlítása.

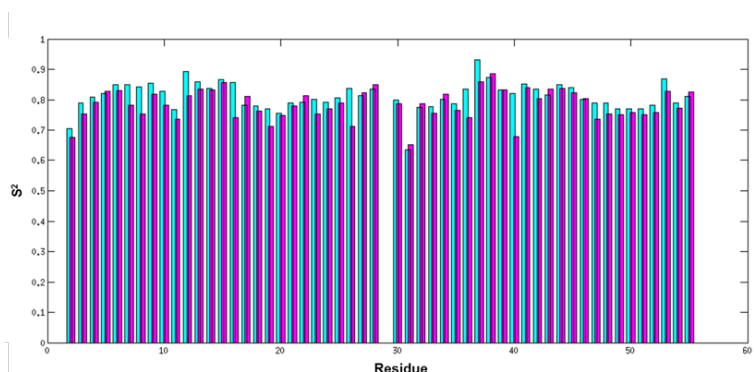
A ^{13}C jelzés hiányában az egyértelműen azonosítható ^1H rezonanciajelek aránya a natív PAF-hoz képest 87%-ról 77%-ra csökkent. A hiányzó hozzárendelések a legtöbb esetben az alifás oldalláncok γ és δ protonjait érintették, melyek jellemzően nagy számú NOE keresztcsúcsot adnak a távolságalapú

*<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5224997/bin/pone.0169920.s003.pdf>

szerkezetmodellezés során. Ezek hiányában a modellezett szerkezetekhez is jóval kisebb számú korlát állt rendelkezésre: a 7. iterációs ciklusban 573 NOE-t sikerült azonosítani abban az esetben, ha az *abcabc* diszulfidmintázat és a korábbi modellezéssel azonos módon a kémiai eltolódásból levezetett diéderes szög jellegű korlátokat is figyelembe vettem. Összességében elmondható, hogy a PAF^{D19S} térszerkezeti modellje a PAF-énál kevésbé jól definiált, de a modell minősége a két szerkezet kvalitatív összehasonlításához elegendő (pdb azonosítók: PAF: 2MHV, PAF^{D19S}: 2NBO).

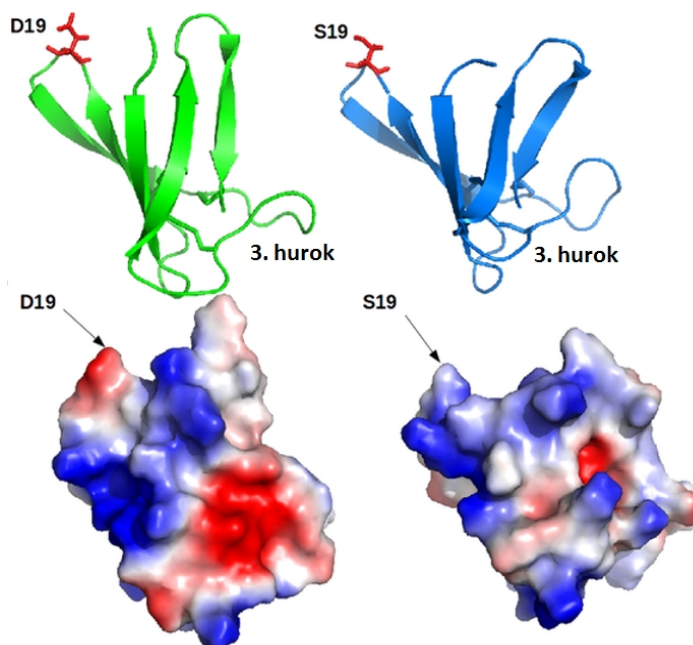
A két modellt összehasonlítva a PAF és a PAF^{D19S} főlánc konformációja között nem figyelhető meg jelentős eltérés, továbbá a ¹⁵N-spinrelaxációs mérések eredményei szerint a ps-ns időskálán történő mozgásokban globálisan értékelve hibahatáron belül nem mutatható ki változás (átlagos $S^2 =$ PAF: $0,81 \pm 0,05$; PAF^{D19S}: $0,78 \pm 0,05$). Ugyanakkor történtek kisebb mértékű lokális dinamikai változások: a rendparaméter értékekben néhány esetben a mutáció helyétől szekvenciában és térben is távol eső aminosavak esetén is kis mértékű eltérés mutatható ki. A korábbiakkal azonos módon végzett Lipari-Szabó analízis alapján az eredeti fehérjéhez képest $0,02$ - $0,1$ S^2 érték-beli csökkenést tapasztaltunk, ami a ps-ns időskálán történő fluktuáció lokális növekedésére utal (29. ábra). A főlánc mobilitásának változása a mutáció helyét és néhány távolabbi régiót érintett: a legnagyobb változás a 19, 12, 16, 26, 40, 36, 37 aminosavaknál tapasztaltunk.

Amíg a PAF és a PAF^{D19S} főlánc-konformációjában és dinamikai tulajdonságaiban nem tért el jelentősen, a két fehérje felszíni töltéseloszlásában a vártnál nagyobb különbségek mutatkoztak. A negatív töltésű 19. aszparaginsav – mely a fehérje felszínén helyezkedik el (30. ábra) – semleges töltésű szerinre való cseréje nem meglepő módon változást idézett elő a PAF^{D19S} felszíni töltésben a megváltozott aminosav környezetében, a mutáció azonban távolabbi régiók töltéseloszlására is hatással volt: számos a PAF-ban negatív töltésű régió a PAF^{D19S} esetében semleges vagy pozitív töltésű felszínt mutatott.



29. Ábra: A PAF (cián) és a PAF^{D19S} (lila) S² rendparamétereinek összehasonlítása a szekvencia mentén.

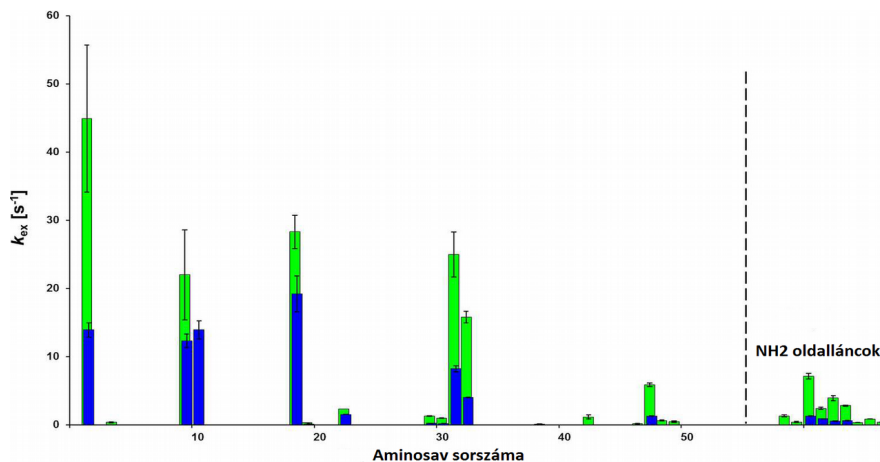
Feltételezésünk szerint ezt az „elektrosztatikus allosztériát” az okozza, hogy a negatív töltésű 19. aszparaginsav hiánya miatt a PAF^{D19S}-ben a 19. pozícióhoz térben közeli pozitív töltésű lizin oldalláncok (K17, K22) más negatív töltésű oldallánc (D23) irányába orientálódtak, ami mintegy dominó-effektusként további töltésbeli változásokat okozott a fehérje távolabbi részein is. A 3. hurokról (K27-K42) – mely felszíni töltéseloszlás megváltozásában szintén jelentősen érintett – korábbi funkcionális pontmutáció vizsgálatok^{16,17} alapján már ismert, hogy tartalmaz az antifungális hatás szempontjából mutációra érzékeny egységeket. Ugyanez igaz a konzervált 1. hurokra is, melyben a 9. lizin részt vesz a célmolekulához való kötődés szempontjából kritikus pozitív töltésű molekularészlet kialakításában. Mindezek alapján igen valószínű, hogy a felszíni töltéseloszlásban bekövetkező ilyen mértékű változás bőségesen elegendő a ligandumhoz való kötődés megszűnéséhez, ami önmagában is kielégítő magyarázatot adhat PAF^{D19S} variáns PAF-hoz viszonyított antifungális hatáserősségének és a megtámadott gombasejtekbe való internalizálódás képességének csökkenésére.²⁰



30. Ábra: fent: a PAF (baloldalt) és a PAF^{D19S} (jobbaldalt) szalagos megjelenítése. Piros színnel a 19. pozícióban lévő aminosavat emeltem ki. Lent: reprezentatív konformáció felszíni töltéseloszlása vákuumban. Piros: negatív, fehér: semleges, kék: pozitív töltés.

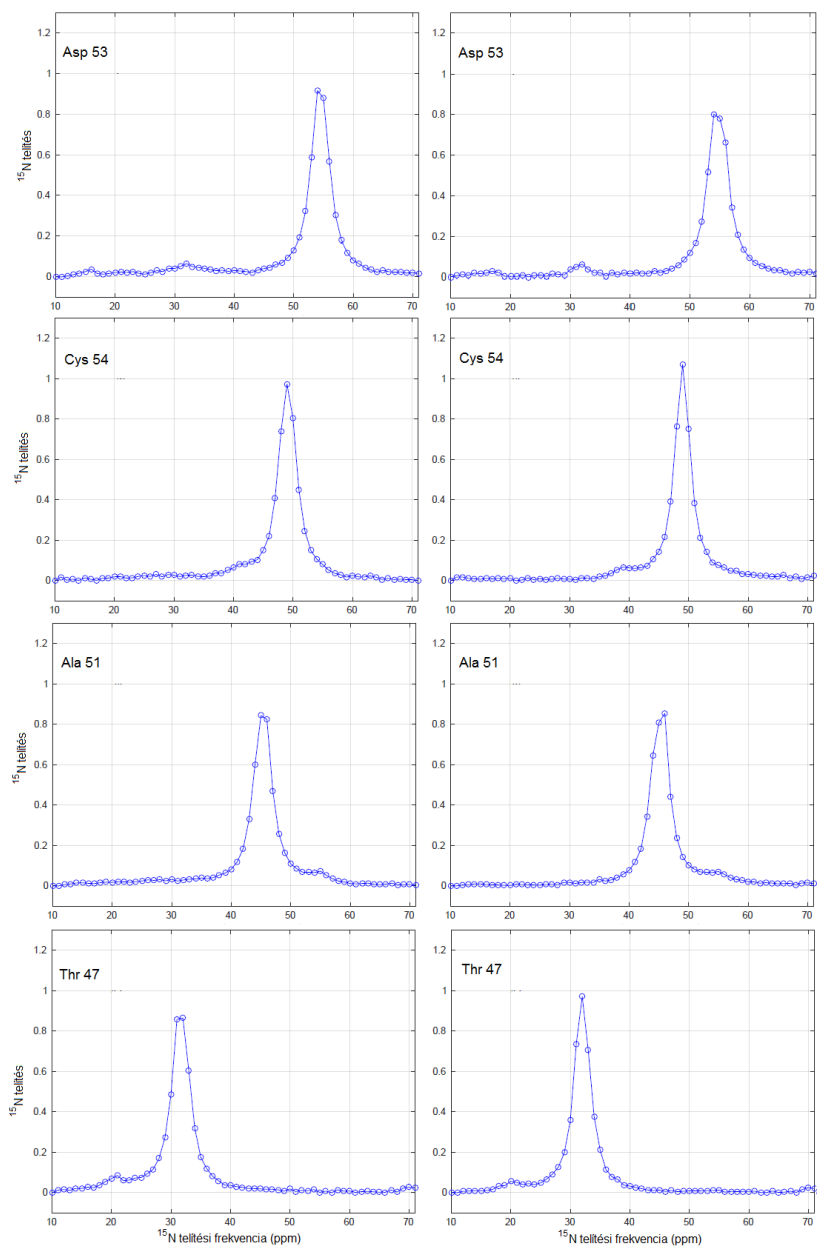
A PAF és PAF^{D19S} térszerkezetének összehasonlításával a fehérje felszíni töltéseloszlásának jelentős változásait mutathatjuk ki (30. ábra). Hogy kizárjuk annak lehetőségét, hogy a látható töltéseloszlás-különbséget esetleg a PAF^{D19S} térszerkezetének a PAF-éhoz képest való alulhatározottsága okozná, a főlánc amidprotonok oldószerrel való cseréjének CLEANEX-PM¹²⁸ módszerrel való mérésével közvetlen kísérleti adatokkal is megerősítettük a fenti megfigyelést. A CLEANEX mérések eredményei alapján a PAF esetében a H^N-H₂O cseresebesség a hurok régiókban a $k_{ex,NH-H_2O}$ a 0,1–50 s⁻¹ tartományba esett. A 2. hurokban elhelyezkedő 19. szerin ($k_{ex,NH-H_2O} = 19 \pm 3$ s⁻¹) az aszparagindra való csere után ($k_{ex,NH-H_2O} = 28 \pm 3$ s⁻¹) is az oldószerhez hozzáférő régióhoz sorolható. Ahogy a 31. ábráról leolvasható, a H^N-H₂O cseresebesség és ezzel összefüggésben az oldószerhez való hozzáférhetőség a PAF^{D19S}-nél minden CLEANEX-PM módszerrel mérhető H^N esetében csökkent a PAF-hoz képest mind a főlánc amid-, mind az aszparagin oldallánc karboxamid-protonok esetében. A csökkenés az aszparaginsav-szerin csere révén a fehérje (+6,06-ról +5,07-re való) össztöltésének

csökkenésével, illetve a felületi töltéseloszlás és ezzel összefüggésben a hidrátburok átrendeződésével magyarázható.



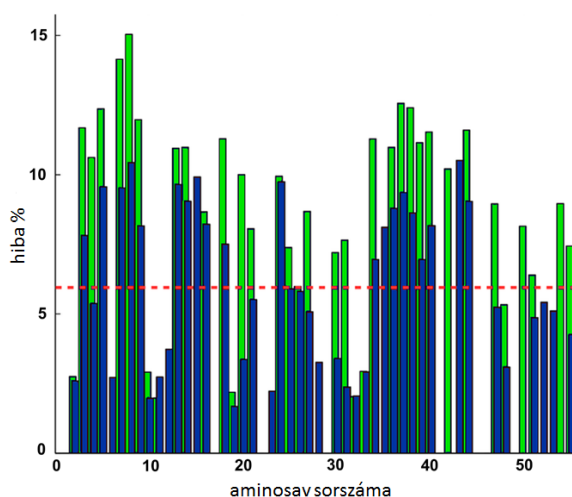
31. Ábra: Az amid H^N – víz csere sebesség (s^{-1}) a PAF (zöld) és a PAF^{D19S} esetében (kék). A β -szálakat alkotó protonok a lassú csere miatt CLEANEX módszerrel nem mérhetőek, míg a gyors tartományba eső csere csak nagyobb hibával határozható meg, amit a hibavonalak is mutatnak. A karboxamid oldallánc protonok cseresebessége a szaggatott vonaltól jobbra a következő sorrendben olvashatók le: N18, N33, N40, N49, N50.

A fenti vizsgálatokon túl a hőmérséklet hatására történő fehérjekitekeredést és a CEST kísérleteket is megismételtük a PAF^{D19S} változattal. A PAF-hoz hasonlóan a CEST módszerrel kimutatható lassú csereben álló ($k_{ex} \sim 150 s^{-1}$) minor konformációk a PAF^{D19S} terminális régióiban is megjelennek a korábbival közel azonos frekvenciáknál és intenzitás értékekkel (32. ábra), ami azt jelzi, hogy a CEST módszerrel kimutatható konformációk létrejöttét nem befolyásolta az aszparagin-szerin csere. A biológiai hatásvizsgálatok eredményeinek tükrében²⁰ ez ugyanakkor arra is utal, hogy ezek a kis populációban előforduló konformációk valószínűleg nem kritikusak az antifungális mechanizmus szempontjából.



32. Ábra. A PAF (bal oszlopban) és a PAF^{D19S} (jobb oszlopban) négy CEST effektust mutató egységének CEST profilja. A jobb vizuális összehasonlítás kedvéért nem modellel illesztett adatsort, hanem a telítési frekvencia függvényében a telítettség mértékét mutató adatpontokat jelöltem folytonos vonallal összekötött üres karikákkal. Az y-tengelyen a ¹⁵N-telítés relatív egységeként szerepel, ahol az 1 érték felel meg a maximális telítésnek.

A hőmérséklettől függő HSQC kísérletek eredményei ezzel szemben jelentős változást mutattak a PAF^{D19S} esetében a PAF-hoz képest. Míg a PAF-ban a detektálható ¹⁵N-H keresztcsúcsok közül csupán az „1. csoportba” tartozó kilenc aminosav térfogati integrálját lehetett illeszteni a kétállapotú kitekeredést feltételező modellel 6%-os hibahatár alatt (76. oldal, 21. ábra), addig a PAF^{D19S}-nél azonos paraméterek mellett a hibahatáron belül illeszthető egységek száma 23-ra emelkedett. Az illesztés hibája a modellezés során figyelembe vett egységek zöménél csökkent, vagy a korábbival azonos maradt (33. ábra).



33. Ábra: A két állapotot feltételező letekeredési modell illesztési hibái aminosavanként. Zöld: PAF, kék: PAF^{D19S}.

A PAF^{D19S} hőmérsékleti letekeredését a III. 2. 5 fejezetben leírtak szerint, a korábbiakkal azonos paraméterezéssel elemeztem. A két és háromállapotú modellel való illesztésekből kapott átlagos termodinamikai paramétereket a PAF-ra számított értékekkel összehasonlítva a 7. és 8. táblázatban foglalom össze.

Mivel az 1. és 2. csoportba sorolás a hibaszázalék kritérium alapján történt, a PAF esetében a két csoport nem ugyanazon NH keresztcsúcsok csoportját jelöli, mint a PAF^{D19S}-nél, ezért a paraméterek számszerű összehasonlítása ennek figyelembe vételével kezelendő. A termodinamikai paraméterek többségének átlagos értéke a szórásokat és hibahatárokat figyelembe véve nem mutatott szignifikáns változást a PAF-hoz képest.

IV. Eredmények és értékelésük

		ΔH_U (kJ/M)	T_{high} (K)	T_{low} (K)	Δc_p (kJ/M/K)	$\Delta G_{u,max}$ (kJ/M/K)	Hiba (%)
PAF	1. csoport	66 ± 9	307 ± 10	271 ± 4	3,7 ± 1,1	1,9 ± 0,2	4 ± 2
	2. csoport	46 ± 5	331 ± 5	281 ± 4	1,8 ± 0,2	1,8 ± 0,2	15 ± 3
PAF ^{D19S}	1. csoport	76,3 ± 27	318 ± 26	277 ± 5	5,2 ± 4,5	1,9 ± 0,1	3,5 ± 0,1
	2. csoport	63,1 ± 12	324,9 ± 10	281,9 ± 3,8	3,0 ± 1,6	2,1 ± 0,1	10,1 ± 3,1

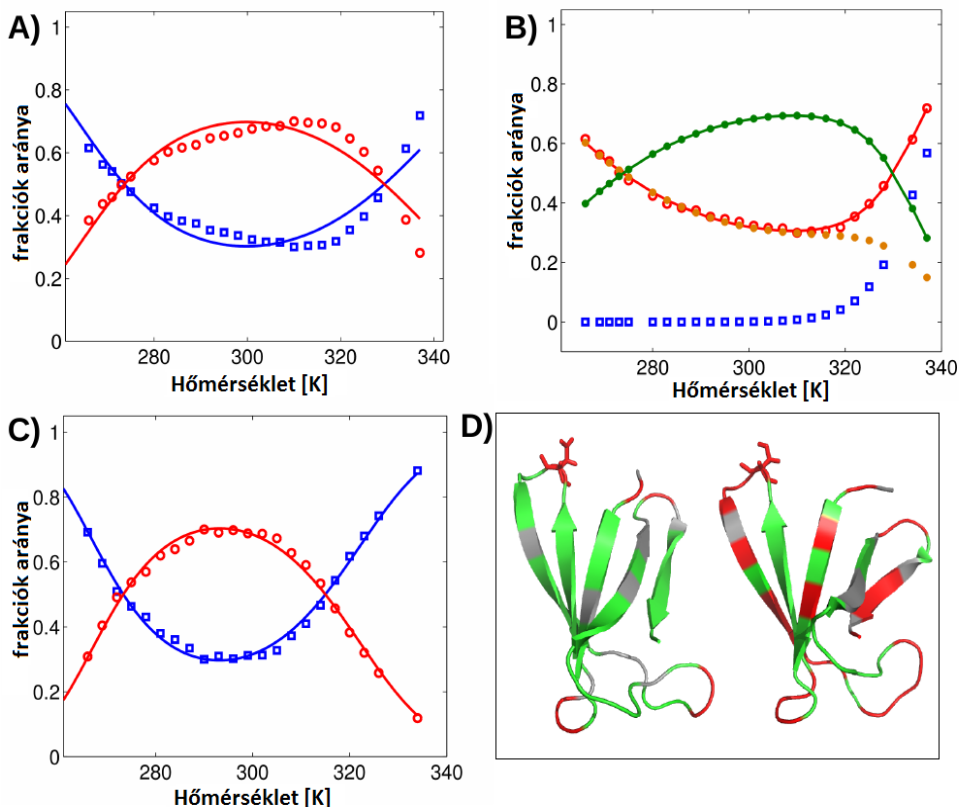
7. Táblázat: A PAF (felül) és PAF^{D19S} (alul) hőmérsékleti letekeredésének termodinamikai paramétereit a kétállapotú modell szerint, az NH keresztcsúcsok térfogati integrálja alapján.

		ΔH_U (kJ/M)	T_{high} (K)	T_{low} (K)	Δc_p (kJ/M/K)	$\Delta G_{u,max}$ (kJ/M/K)	Hiba (%)
F → I (PAF)	1. csoport	65 ± 13	353 ± 39	271 ± 5	1,8 ± 1,1	3,8 ± 1,6	2,1 ± 0,6
	2. csoport	34 ± 3	393 ± 12	284 ± 5	0,5 ± 0,2	2,7 ± 0,4	2,6 ± 0,6
I → U (PAF)	1. csoport	176 ± 196	334 ± 37	246 ± 35	2,6 ± 2,5	2,86 ± 1,1	1,6 ± 0,6
	2. csoport	273 ± 78	334 ± 30	218 ± 48	3,7 ± 3,0	2,49 ± 0,2	2,9 ± 0,8
F → I (PAF ^{D19S})	1. és 2. csoport	55,8 ± 29	344 ± 25	277 ± 9	1,7 ± 1,2	2,6 ± 1,7	3,2 ± 1,0
I → U (PAF ^{D19S})	1. és 2. csoport	221 ± 98	331 ± 24	249 ± 36	3,1 ± 3,1	2,3 ± 0,2	3,1 ± 1,0

8. Táblázat: A PAF (felül) és PAF^{D19S} (alul) hőmérsékleti letekeredésének termodinamikai paramétereit a háromállapotú modell szerint, az NH keresztcsúcsok térfogati integrálja alapján. Mivel a PAF^{D19S} esetében az illesztési hiba kritérium (6%) minden egységre teljesült, az átlag és szórás értékeket a teljes adatkészletre értelmezve számítottam ki.

A változások közül a legszembeszökőbb különbség az egyes csoport kétállapotú modell alapján adódó magas hőmérsékleten mért olvadáspontjában (T_{high}) fedezhető fel: az egyes csoport átlagos T_{high} értéke a PAF^{D19S} esetében kilenc fokkal magasabb mint a PAF-nál. Ennek részben az lehet a magyarázata, hogy a PAF^{D19S} esetében jóval több egységre illett ez a modell, továbbá a PAF^{D19S} esetében ehhez az átlaghoz azonban jóval nagyobb szórás tartozik. Ha eltekintünk a csoportonkénti értékeléstől és az összes értékelhető egységet átlagoljuk, a két átlagos érték ($T_h(\text{PAF}) = 319\text{K}$ és $T_h(\text{PAF}^{\text{D19S}}) = 321\text{K}$) bőven a szóráson belül marad a kétállapotú modell esetében: globálisan értékelve tehát nem fedezhető fel szignifikáns különbség a két fehérje olvadáspontja között. A hőmérséklet függvényében mért térfogati integrál változások vizsgálatával tehát a két fehérje közti legfőbb különbség az, hogy az egyes egységek a két fehérjeformában eltérő lefutást mutatnak. Ez alapján elmondható, hogy a PAF inkább jellemezhető a háromállapotú letekeredési modellel, a PAF^{D19S}-re pedig inkább a kétállapotú letekeredés jellemző.

IV. 3. A rejtett konformációk lehetséges szerepe a biológiai funkcióban: a PAFD19S szerkezetének, dinamikájának és rejtett konformációinak vizsgálata



34. Ábra: Ábra: A PAF és a PAF^{D19S} hőmérsékleti kitekeredésének modellezése. (A-C) Egy reprezentatív amid N-H (A20) keresztcsúcs térfogati integrál hőmérsékletfüggésének illesztése. A: a PAF, C: A PAF^{D19S} illesztése kétállapotú modellel. B: illesztés háromállapotú modellel a PAF esetében. Míg a PAF esetében az Ala20 nem illeszthető 6%-os illesztési hibahatár alatt kétállapotú modellel (A, hiba = 10,01%; F: o, U: □), egy köztes állapot feltételezése jelentősen csökkenti a hibát (B: hiba = 1,96%; F: ●, U1: o, U2: ●, U1+U2:□). A PAF^{D19S} esetében az Ala20 jele jól illeszthető a kétállapotú modellel is (C, hiba = 3,37%). D: A hibahatárok ábrázolása PAF (bal) és a PAF^{D19S} (jobb) szalagos megjelenítésén. Piros: 6% hiba alatt kétállapotú modellel illeszthető régiók; zöld: 6% alatti hibával kétállapotú modellel nem illeszthető régiók. Szürke: jelátfedés miatt nem vizsgálható régiók. A pálcikával kirajzolt rész a mutáció helyét (D/S 19.) jelöli.

A rejtett konformációk biológiai jelentősége a PAF és PAF^{D19S} szerkezetének, dinamikájának kitekeredésének és felületi töltéseloszlásának összehasonlítása alapján sem határozható meg egyértelműen, de valamelyest leszűkíti az ezzel kapcsolatos hipotézisek körét. Ha az Anfinsen dogmát úgy értelmezzük, hogy fehérjeszerkezetbe a konformációs dinamikát is beleértjük, akkor a szabály alól az általunk vizsgált fehérje sem számít kivételnek: a primer

aminosav-szekvencia ebben az esetben is meghatározza az adott fizikokémiai körülmények között kialakuló natív szerkezetet és ezen keresztül a biológiai funkciót. A szekvencia kritikus elemeinek megváltoztatása pedig drámai hatással lehet akár a harmadlagos szerkezetre ahogy a cisztein-szerin cseréknél, akár a konformációs cserefolyamatokra, ahogy a 19. aszparaginsav-szerin csere esetében láttuk, mely változások az antifungális aktivitást is jelentősen befolyásolták. Az utóbbi esettel kapcsolatban két döntő kérdés merül fel:

1. A mutáció hatására megváltozott fehérjekitekeredés vajon a felületi töltéseloszlás-változás következménye vagy más mechanizmus okozza?
2. Az antifungális aktivitás elvesztésének oka vajon a megváltozott fehérjekitekeredés, vagy a töltéseloszlás-változás (esetleg mindkettő)?

A kérdés eldöntése további vizsgálatot igényelne. A kérdések megválaszolásáig jelenlegi tudásunk alapján a PAF rejtett konformációinak biológiai szerepére az alábbi hipotézisek egyike sem zárható ki teljes bizonyossággal:

1. A rejtett konformációknak nincs szerepe a biológiai hatásban, az aktív forma megfelel az NMR módszerrel megfigyelhető konformációknak.
2. A biológiailag aktív forma valamely olyan konformáció ami NMR módszerrel közvetlenül nem megfigyelhető, és amely oldatban kialakuló egyensúly miatt folytonosan képződik a látható állapotból.

Nyilvánvaló, hogy a fenti hipotéziseknek csak az NMR spektroszkópia nézőpontjából értelmezhető, hiszen az egyensúlyi rendszerben „látható és láthatatlan” kategóriákba sorolás a megfigyelés módszerétől függ, így aztán a konformációk e szerint való csoportosítása is mesterségesnek tekinthető. Tény azonban, hogy a különböző NMR technikák egyedülálló módon kimutathatják a makromolekulák konformációjában, illetve dinamikában jelentkező heterogenitást. Ezért attól függetlenül hogy mi a válasz a fenti kérdésekre, illetve végül melyik hipotézis bizonyul igaznak, eredményeink azt erősítik meg, hogy az aktív forma a PAF ms-s időskálán változatos konformációs sokaságából jöhet létre, melynek létrejöttéhez a többi konformáció cserefolyamatok révén forrásként szolgálhat. A PAF célmolekulájának ismeretének hiányában a fehérje-ligandum interakció természetéről nem érdemes messzemenő következtetéseket levonni, ugyanakkor a fehérje oldatbeli viselkedését figyelembe véve a konformációs szelekciós modell valószínűsíthető.

V. Összefoglalás

A súlyos gombás fertőzések az immunhiányos állapot gyakoribb megjelenése miatt egyre nagyobb kihívást jelentenek az orvostudomány és a gyógyszeripar számára. A jelenleg használt gyógyszerek korlátai és az alkalmazott hatóanyagokkal szemben kialakuló rezisztencia nagy mértékben korlátozza a megfelelő antifungális terápia alkalmazását. Ahogy a rák- és immunterápiában is, az elmúlt évtizedekben az új antifungális gyógyszerjelölt molekulák körében egyre nagyobb számban jelentek meg a fehérjealapú hatóanyagok, melyek előállítására és szerkezetvizsgálata a kismolekulás készítményektől jelentősen különböző szemléletet kíván. Doktori munkám során egy ígéretes gyógyszerjelölt makromolekula, a *Penicillium* antifungális fehérje (PAF) szerkezetét és hőmérséklet hatására történő konformációs változásait vizsgáltam. A kutatáshoz molekuláris biológiai, élesztő és fonalgomba-alapú fehérjeexpressziós, preparatív folyadékkromatográfiás eszközöket, valamint számos NMR mérő módszert alkalmaztam.

Hármas rezonancia NMR kísérletek értékelésével megadtam a ^{13}C - ^{15}N jelzett PAF közel teljes ^1H - ^{15}N - ^{13}C NMR jelhozzárendelését. A kémiai eltolódás listát hozzáférhetővé tettem a „Biological Magnetic Resonance Data Bank” (<http://www.bmrb.wisc.edu/>) adatbázisban.

Pontmutációk létrehozásával ciszteinben szegényített PAF változatokat állítottam elő rekombináns fehérjeexpressziós technika segítségével, majd a módosított fehérjét NMR spektroszkópiával vizsgáltam. A ciszteinek illetve cisztein párok szisztematikus, szerin aminosavra való cseréjével bizonyítottam, hogy a PAF esetében a harmadlagos szerkezet kialakulásához mind a hat cisztein jelenléte elengedhetetlen.

NMR módszerek segítségével igazoltam, hogy a szintetikus előállított PAF térszerkezete azonos a mikrobiális úton termelt PAF szerkezetével. Ezzel azt is bizonyítottam, hogy a független tömegspektrometriai eredményekkel összhangban a PAF helyes diszulfidmintázata az „*abcabc*”. ^1H NMR kísérletek sorozatával megerősítettem, hogy a redukált állapotú lineáris PAF oxidáció révén spontán képes az eredetivel megegyező harmadlagos szerkezet kialakítására.

A helyes diszulfidmintázat figyelembevételével meghatároztam a *Penicillium* antifungális fehérje (PAF) oldatfázisú térszerkezetét hármes-rezonancia NOESY NMR mérésekből származtatott távolság-jellegű kényszerfeltételek és főlánc

kémiai eltolódásokból számított torziós szög-jellegű korlátok alapján. Az új térszerkezeti modell (pdb: 2MHV) nem tér el lényegesen a korábban javasolt szerkezettől, viszont tartalmazza a független módszerrel meghatározott explicit diszulfidhid mintázatot, és a többféle (ill. nagyobb számú) korlát alkalmazása miatt a korábbi modellnél jobban definiált.

Kimutattam, hogy a PAF oldatfázisú szerkezetében az NMR időskálán direkt módszerekkel detektálható konformációkon kívül számos közvetlenül nem megfigyelhető konformációs állapot létezik, melyek aránya hőmérséklet változtatásával eltolható. Kvantitatív NMR és kétdimenziós sorozatmérések analízisével megbecsültem az NMR módszer számára közvetlenül megfigyelhető és "láthatatlan" konformációk arányát, és széles hőmérsékleti tartományban jellemeztem az egyensúlyi folyamat termodinamikáját. A kitekeredés paraméterei függenek a másodlagos szerkezettől; amíg a mozgékonyabb szerkezeti elemek viselkedése (például terminális és hurok régiók) kétállapotú kitekeredési modellel is jól illeszthetők, addig a béta-redős szerkezeti elemek kitekeredésének modellezéséhez legalább három konformációs állapot feltételezése szükséges. A minor konformációk populációja az illesztési modell választástól függetlenül a fehérje maximális stabilitású hőmérsékletén sem elhanyagolható: a fő konformációhoz képest mintegy 20-30%-ot tesz ki, amit a kvantitatív ^1H NMR mérések is igazoltak. A közvetlenül meg nem figyelhető konformációk jellemzésének céljából ^{15}N -CEST-NMR méréseket végeztünk, melyek eredményei a fő konformációtól lényegesen eltérő, ámde igen kis populációban jelenlévő konformációs állapotok jelenlétét bizonyították.

Végül, a PAF rejtett konformációinak szerepét vizsgáltam a fehérje egy olyan pontmutációval létrehozott variánsán (PAF $^{\text{D19S}}$), melynek antimikrobiális aktivitása több nagyságrenddel csökkent az eredeti molekulához képest, ugyanakkor harmadlagos szerkezete nagy mértékben hasonlít az eredeti formára. Amíg kémiai eltolódások, a távolságalapú szerkezetmodellezés és a ^{15}N -relaxációból levezetett dinamikai paraméterek a két fehérjeváltozat nagyfokú hasonlóságát bizonyították, a két fehérje felszíni töltéseloszlása és a hőmérsékleti kitekeredés során létrejövő nem megfigyelhető konformációk aránya jelentősen eltért. Ezek az adatok arra utalnak, hogy a felületi töltéseloszlás drámai változásai erősen befolyásolják a ligandumhoz való kötődést, ezáltal az antifungális aktivitást, illetve hatással lehetnek a kitekeredés folyamatára is. Nem zárható ki az a lehetőség sem, hogy a felületi töltéseloszlás és a kitekeredés megváltozása független egymástól, ebben az esetben pedig az is feltételezhető, hogy az NMR módszerekkel közvetlenül nem

megfigyelhető konformációknak akár szerepe lehet az antifungális hatás mechanizmusában.

V. Summary

The incident of serious fungal infections in humans become more frequent in the last decades due to diseases causing immunodeficiency and to immunosuppressive therapy. The currently available antifungal drugs often lack proper specificity or efficiency. This generates an urgent need of new-type antifungal strategies. As in case of the cancer- and immunotherapy, more and more biotechnologically produced protein-based molecule appears among the newly developed antifungal drug candidates as well. The emergence of these biotechnologically produced, structurally complex macromolecules generates new challenges in the (bio)analytical sciences. The presented research in the frame of this dissertation focused on the structure investigation of a promising antifungal protein (PAF) produced by *Penicillium chrysogenum*. To this end, I used the tools of molecular biology, yeast- and filamentous fungi-based protein expression, preparative liquid chromatography, a wide range of NMR techniques, and computational *de novo* protein structure determination.

By the analysis of 3D triple resonance NMR spectra, nearly complete ^1H - ^{15}N - ^{13}C signal assignment of PAF was achieved. The chemical shift data was submitted to the Biological Magnetic Resonance Data Bank.

In order to investigate the disulfide pattern of PAF, cysteine deficient versions of the protein were designed and were expressed in the recombinant *Pichia pastoris* expression system. Structure investigation of the produced protein forms proved that the lack of any cysteine residue leads to the loss of tertiary structure and therefore all the six cysteines are necessary for proper folding process of PAF.

We have proved by ^1H and ^{13}C NMR that the tertiary structure of the chemically synthesized PAF is completely identical with the native one (which is produced by living organisms). The fact of this structural identity was the final proof for the previously ambiguous disulfide pattern. The order of cysteine connections was determined independently by mass spectrometry in case of the synthetic PAF. By a series of ^1H NMR experiments we have confirmed that correctly folded PAF spontaneously forms from the linear reduced polypeptide sequence by oxidation. This process results in identical disulfide pattern with the native protein.

In the knowledge of the unambiguous disulfide pattern and in possession of uniform ^{13}C - ^{15}N enriched protein sample, a more accurate 3D structure of PAF was determined as compared to the previously published model, which was further refined by the peptide backbone torsion angle restraints derived from ^{13}C backbone chemical shifts. The resulting newly determined protein structure (pdb code: 2kcn) does not differ significantly from the previously calculated one, (new pdb code: 2mhv, RCSB:10362) with respect to its backbone conformation and secondary structure. However, during the newer structure determination, disulfides were defined explicitly as covalent bonds, which was not contradictory with the majority of the NOE the distance restraints as in case of other cysteine connection variants. This computational approach also confirmed the 'abcabc' pattern (in which 7-36, 14-43, 28-54 cysteine residues are connected). Furthermore, during the new calculation the backbone RMSD has decreased from 0.65 ± 0.18 to 0.40 ± 0.08 for the 20 conformer ensemble, as compared to the previously determined structure.

It was shown by our thermal protein unfolding experiments that the solution structure of PAF contains a significant amount of conformer which is not directly observable by conventional NMR methods and the proportion of the „visible” and „invisible” fractions could be shifted by varying the temperature. We have estimated the concentration of the unfolded fraction(s) by temperature-dependent quantitative 2D NMR and by modeling of the temperature-induced reversible protein unfolding. The modeling revealed that the local thermodynamic parameters of the unfolding are dependent from the secondary structure elements: while reversible thermal unfolding of the motile terminal and loop regions could be fitted by two-state model, in case of residues which are positioned within beta-stranded elements (at least) a third conformational state had to be supposed beyond the folded and unfolded states (and this is called the “three state model”). According to our results, the population of the minor „invisible” conformers are not negligible even at room temperature: the ratio of the invisible fraction was around 20-30% which was further supported by 1D ^1H quantitative NMR measurements. Sensitive ^{15}N -CEST-NMR experiments revealed further minor conformations with even lower population (<1%). According to our results, these conformations are in slow exchange with the major form and in case of some residues has significantly different chemical shift which indicates major structural change at these sites.

Finally, the possible biological function of the “hidden” exchange partner was investigated with the aid of a point-mutated inactive version of PAF (PAF^{D19S}). According to antifungal activity assays, exchange of one critical negatively charged

aspartate to serine by point mutation at the position 19 almost completely eliminated the antifungal activity of the protein. We have investigated the three dimensional solution structure, ps-ns dynamics, amide H^N-H₂O exchange, CEST-detectable conformers and thermal unfolding of PAF^{D19S} at identical conditions as our previous experiments with PAF. While backbone chemical shifts, NOE-derived structural ensembles at the level of overall protein fold and ¹⁵N-relaxation parameters showed high degree of similarity between the two protein forms, the local parameters of thermal unfolding and distribution of protein surface charge changed significantly in PAF^{D19S} as compared to PAF due to reshuffling of charged side-chains. The dramatic change of surface charges which relayed further from the site of mutation is able to prevent PAF from binding to its primary target which gives an acceptable explanation to the loss of antifungal activity. However, one can not exclude the possibility that the altered surface charge is not the only factor in the inactivation of PAF by this single residue exchange. According to thermal unfolding experiments, PAF^{D19S} proved to be a two-state folder while the thermal unfolding of PAF is closer to the three-state unfolding model. Therefore it can not be excluded that intermediate “invisible” conformations which are present in PAF but not (or in a less extent) in PAF^{D19S} contribute to the antifungal mechanism.

Irodalomjegyzék

1. Wnendt, S., Ulbrich, N. & Stahl, U. Molecular cloning, sequence analysis and expression of the gene encoding an antifungal-protein from *Aspergillus giganteus*. *Curr. Genet.* **25**, 519–523 (1994).
2. Marx, F. *et al.* Cloning, structural organization and regulation of expression of the *Penicillium chrysogenum* *paf* gene encoding an abundantly secreted protein with antifungal activity. *Gene* **167**, 167–171 (1995).
3. Tomlinson, I. M. Next-generation protein drugs. *Nat. Biotechnol.* **22**, 521–522 (2004).
4. Morrow, T. & Felcone, L. H. Defining the difference: What Makes Biologics Unique. *Biotechnol. Healthc.* **1**, 24–9 (2004).
5. European Medicines Agency. *Guideline on Similar Biological Medicinal Products Containing Biotechnology-Derived Proteins As Active Substance: Quality Issues. E.M.A. Publication* (2006).
6. Berkowitz, S., Engen, J., Mazzeo, J. & Jones, G. Analytical tools for characterizing biopharmaceuticals and the implications for biosimilars. *Nat. Rev. Drug Discov.* **11**, 527–540 (2013).
7. Hevér, H., Ludányi, K., Drahos, L. & Vékey, K. A tömegspektrometria alkalmazása fehérje alapú gyógyszerek szerkezetvizsgálata és jellemzésére. *Magy. Kémiai Folyóirat* **119**, 46–52 (2013).
8. Heredia, V. V., Thomson, J., Nettleton, D. & Sun, S. Glucose-induced conformational changes in glucokinase mediate allosteric regulation: Transient kinetic analysis. *Biochemistry* **45**, 7553–7562 (2006).
9. Baldwin, A. J. & Kay, L. E. STRUCTURAL BIOLOGY Dynamic binding. *Nature* **488**, 165–166 (2012).
10. Korzhnev, D. M. *et al.* Low-populated folding intermediates of Fyn SH3 characterized by relaxation dispersion NMR. *Nature* **430**, 586–590 (2004).
11. Korzhnev, D. M., Religa, T. L. & Kay, L. E. Transiently populated intermediate functions as a branching point of the FF domain folding pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109**, 17777–17782 (2012).
12. Masterson, L. R. *et al.* Dynamics connect substrate recognition to catalysis in protein kinase A. *Nat. Chem. Biol.* **6**, 821–8 (2010).

13. Palicz, Z. *et al.* In vivo test of a highly stable antifungal protein (PAF) against lung aspergillosis. *Acta Physiol. Hung.* **97**, 468 (2010).
14. Kiraly, P. *et al.* Real-time pure shift ^{15}N HSQC of proteins: a real improvement in resolution and sensitivity. *J. Biomol. NMR* **62**, 43–52 (2015).
15. Fizil, Á., Gáspári, Z., Barna, T., Marx, F. & Batta, G. ‘Invisible’ Conformers of an Antifungal Disulfide Protein Revealed by Constrained Cold and Heat Unfolding, CEST-NMR Experiments, and Molecular Dynamics Calculations. *Chem. - A Eur. J.* 5136–5144 (2015). doi:10.1002/chem.201404879
16. Batta, G. *et al.* Functional aspects of the solution structure and dynamics of PAF--a highly-stable antifungal protein from *Penicillium chrysogenum*. *FEBS J.* **276**, 2875–90 (2009).
17. Binder, U. *et al.* Protein kinase A signaling and calcium ions are major players in PAF mediated toxicity against *Aspergillus niger*. *FEBS Lett.* **589**, 1266–1271 (2015).
18. Hegedüs, N. & Marx, F. Antifungal proteins: More than antimicrobials? *Fungal Biol. Rev.* **26**, 132–145 (2013).
19. Palicz Z, Gáll T, Miszti-Blasius K, Kollár S, Kovács I, Emri M, Márián T, Leiter E, Pócsi I, Csősz E, Kalló G, Hegedüs C, Virág L, Csernoch L, Szentesi P., J. A. In vivo application of a small molecular weight antifungal protein of *Penicillium chrysogenum* (PAF). *Toxicol Appl Pharmacol.* 2013 May 15;269(1)8-16. **269**, 8–16 (2013).
20. Sonderegger, C. *et al.* D19S Mutation of the Cationic, Cysteine-Rich Protein PAF: Novel Insights into Its Structural Dynamics, Thermal Unfolding and Antifungal Function. *PLoS One* **12**, e0169920–e0169920 (2017).
21. Sonderegger, C. *et al.* A *Penicillium chrysogenum*-based expression system for the production of small, cysteine-rich antifungal proteins for structural and functional analyses. *Microb. Cell Fact.* 15:192 (2016). doi:10.1186/s12934-016-0586-4
22. Kathiravan, M. K. *et al.* The biology and chemistry of antifungal agents: A review. *Bioorganic Med. Chem.* **20**, 5678–5698 (2012).
23. Brown, G. D. *et al.* Hidden Killers: Human Fungal Infections. *Sci. Transl. Med.* **4**, 165rv13 (2012).

24. De Lucca, A. J. & Walsh, T. J. Antifungal peptides: Novel therapeutic compounds against emerging pathogens. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**, 1–11 (1999).
25. Emri, T., Majoros, L., Toth, V. & Pócsi, I. Echinocandins: Production and applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **97**, 3267–3284 (2013).
26. Pfaller, M. A. *et al.* Frequency of decreased susceptibility and resistance to echinocandins among fluconazole-resistant bloodstream isolates of *Candida glabrata*. *J. Clin. Microbiol.* **50**, 1199–1203 (2012).
27. Castelli, M. V. *et al.* Novel antifungal agents: a patent review (2011 - present). *Expert Opin. Ther. Pat.* **24**, 323–338 (2014).
28. Bartizal, K. *et al.* In vitro preclinical evaluation studies with the echinocandin antifungal MK-0991 (L-743,872). *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**, 2326–2332 (1997).
29. Kovács, R. *et al.* Effect of caspofungin and micafungin in combination with farnesol against *Candida parapsilosis* biofilms. *Int. J. Antimicrob. Agents* **47**, 304–310 (2016).
30. Steinbach, W. J., Stevens, D. a & Denning, D. W. Combination and sequential antifungal therapy for invasive aspergillosis: review of published in vitro and in vivo interactions and 6281 clinical cases from 1966 to 2001. *Clin. Infect. Dis.* **37 Suppl 3**, S188–S224 (2003).
31. Paiva, J. A. & Pereira, J. M. New antifungal antibiotics. *Curr Opin Infect Dis* **26**, 168–174 (2013).
32. Toke, O. Antimicrobial peptides: New candidates in the fight against bacterial infections. *Biopolym. - Pept. Sci. Sect.* **80**, 717–735 (2005).
33. Silva, P. M., Gonçalves, S. & Santos, N. C. Defensins: antifungal lessons from eukaryotes. *Front. Microbiol.* **5**, 97 (2014).
34. Jenssen, H., Hamill, P. & Hancock, R. E. W. Peptide antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews* **19**, 491–511 (2006).
35. Gaspar, D., Veiga, a S. & Castanho, M. a R. B. From antimicrobial to anticancer peptides. A review. *Front. Microbiol.* **4**, 294 (2013).
36. Van Der Weerden, N. L., Hancock, R. E. W. & Anderson, M. A. Permeabilization of fungal hyphae by the plant defensin NaD1 occurs through a cell wall-dependent process. *J. Biol. Chem.* **285**, 37513–37520 (2010).

37. Hancock, R. E. W. & Rozek, A. Role of membranes in the activities of antimicrobial cationic peptides. *FEMS Microbiology Letters* **206**, 143–149 (2002).
38. Thevissen, K. *et al.* Fungal membrane responses induced by plant defensins and thionins. *J. Biol. Chem.* **271**, 15018–15025 (1996).
39. Thevissen, K., Ferket, K. K. A., François, I. E. J. A. & Cammue, B. P. A. Interactions of antifungal plant defensins with fungal membrane components. *Peptides* **24**, 1705–1712 (2003).
40. Kaiserer, L. *et al.* Characterization of the *Penicillium chrysogenum* antifungal protein PAF. *Arch. Microbiol.* **180**, 204–210 (2003).
41. Leiter, É. *et al.* Antifungal Protein PAF Severely Affects the Integrity of the Plasma Membrane of *Aspergillus nidulans* and Induces an Apoptosis-Like Phenotype. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**, 2445–2453 (2005).
42. Wang, G. Antimicrobial Peptides: Discovery, Design and Novel Therapeutic Strategies. *Advances in Molecular and Cellular Microbiology* **18**, 230 (2010).
43. Hancock, R. E. W. & Sahl, H.-G. Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nat. Biotechnol.* **24**, 1551–1557 (2006).
44. Galgóczy, L. *et al.* Antifungal peptides homologous to the *Penicillium chrysogenum* antifungal protein (PAF) are widespread among *Fusaria*. *Peptides* **39**, 131–137 (2013).
45. Marx, F. Small, basic antifungal proteins secreted from filamentous ascomycetes: a comparative study regarding expression, structure, function and potential application. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **65**, 133–142 (2004).
46. Lacadena, J. *et al.* Characterization of the Antifungal Protein Secreted by the Mould *Aspergillus giganteus*. *Arch. Biochem. Biophys.* **324**, 273–281 (1995).
47. Marx, F. *et al.* Cloning, structural organization and regulation of expression of the *Penicillium chrysogenum* *paf* gene encoding an abundantly secreted protein with antifungal activity. *Gene* **167**, 167–71 (1995).
48. Skouri-Gargouri, H. & Gargouri, A. First isolation of a novel thermostable antifungal peptide secreted by *Aspergillus clavatus*. *Peptides* **29**, 1871–7 (2008).

49. Kovacs, L. *et al.* Isolation and characterization of Neosartorya fischeri antifungal protein (NFAP). *Peptides* **32**, 1724–1731 (2011).
50. Eigentler, A., Pócsi, I. & Marx, F. The anisin1 gene encodes a defensin-like protein and supports the fitness of Aspergillus nidulans. *Arch. Microbiol.* **194**, 427–37 (2012).
51. Seibold, M., Wolschann, P., Bodevin, S. & Olsen, O. Properties of the bubble protein, a defensin and an abundant component of a fungal exudate. *Peptides* **32**, 1989–1995 (2011).
52. Rodríguez-Martín, A. *et al.* Characterization of the novel antifungal protein PgAFP and the encoding gene of Penicillium chrysogenum. *Peptides* **31**, 541–547 (2010).
53. Sung, W. S., Lee, J. & Lee, D. G. Fungicidal effect of piscidin on Candida albicans: pore formation in lipid vesicles and activity in fungal membranes. *Biol. Pharm. Bull.* **31**, 1906–10 (2008).
54. Choi, H., Hwang, J.-S. & Lee, D. G. Identification of a novel antimicrobial peptide, scolopendin 1, derived from centipede Scolopendra subspinipes mutilans and its antifungal mechanism. *Insect Mol. Biol.* **23**, 788–99 (2014).
55. Hwang, J.-S. *et al.* Isolation and Characterization of a Defensin-Like Peptide (Coprinsin) from the Dung Beetle, Copris tripartitus. *Int. J. Pept.* **2009**, (2009).
56. Marx, F. *et al.* Proper folding of the antifungal protein PAF is required for optimal activity. *Res. Microbiol.* **156**, 35–46 (2005).
57. Binder, U., Oberparleiter, C., Meyer, V. & Marx, F. The antifungal protein PAF interferes with PKC/MPK and cAMP/PKA signalling of Aspergillus nidulans. *Mol. Microbiol.* **75**, 294–307 (2010).
58. Hegedűs, N. *et al.* Review The small molecular mass antifungal protein of Penicillium chrysogenum – a mechanism of action oriented review. *J. Basic Microbiol.* **51**, 561–571 (2011).
59. Galgoczy, L. *et al.* Sensitivity of different zygomycetes to the Penicillium chrysogenum antifungal protein (PAF). *J. Basic Microbiol.* **45**, 136–141 (2005).
60. Oberparleiter, C. *et al.* Active internalization of the Penicillium chrysogenum antifungal protein PAF in sensitive aspergilli. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**, 3598–3601 (2003).

61. Hegedüs, N., Sigl, C., Zadra, I., Pócsi, I. & Marx, F. The paf gene product modulates asexual development in *Penicillium chrysogenum*. *J. Basic Microbiol.* **51**, 253–262 (2011).
62. Binder, U., Chu, M., Read, N. D. & Marx, F. The Antifungal Activity of the *Penicillium chrysogenum* Protein {PAF} Disrupts Calcium Homeostasis in *Neurospora crassa*. *Eukaryot. Cell* **9**, 1374–1382 (2010).
63. Marx, F. Small, basic antifungal proteins secreted from filamentous ascomycetes: a comparative study regarding expression, structure, function and potential application. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **65**, 133–142 (2004).
64. Varadi, G., Batta, G., Kele, Z. & Toth, G. K. Synthesis of PAF, an antifungal protein from *Penicillium chrysogenum* by native chemical ligation. *J. Pept. Sci.* **18**, S68–S68 (2012).
65. Fizil, Á., Gáspári, Z., Barna, T., Marx, F. & Batta, G. ‘Invisible’ Conformers of an Antifungal Disulfide Protein Revealed by Constrained Cold and Heat Unfolding, CEST-NMR Experiments, and Molecular Dynamics Calculations. *Chemistry* 1–10 (2015). doi:10.1002/chem.201404879
66. Oberparleiter, C. *et al.* Active internalization of the *Penicillium chrysogenum* antifungal protein PAF in sensitive aspergilli. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**, 3598–3601 (2003).
67. Szappanos, H. *et al.* The *Penicillium chrysogenum*-derived antifungal peptide shows no toxic effects on mammalian cells in the intended therapeutic concentration. *Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **371**, 122–132 (2005).
68. Palicz, Z. *et al.* In vivo application of a small molecular weight antifungal protein of *Penicillium chrysogenum* (PAF). *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **269**, 8–16 (2013).
69. Marx, F., Binder, U., Leiter, E. & Pócsi, I. The *Penicillium chrysogenum* antifungal protein PAF, a promising tool for the development of new antifungal therapies and fungal cell biology studies. *Cell. Mol. life Sci. C.* **65**, 445–454 (2008).
70. Camposolivas, R. *et al.* NMR Solution Structure of the Antifungal Protein from *Aspergillus-Giganteus* - Evidence for Cysteine Pairing Isomerism. *Biochemistry* **34**, 3009–3021 (1995).
71. Dyson, H. J. & Wright, P. E. Coupling of folding and binding for unstructured proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **12**, 54–60 (2002).

72. Dyson, H. J. & Wright, P. E. Unfolded Proteins and Protein Folding Studied by {NMR}. *Chem. Rev.* **104**, 3607–3622 (2004).
73. Tompa, P. Intrinsically disordered proteins: a 10-year recap. *Trends Biochem. Sci.* **37**, 509–516 (2012).
74. Jarosaw Meller. Molecular Dynamics. *Encycl. Life Sci.* 1–8 (2001). doi:10.1021/jp909004y
75. Dill, K. A. & MacCallum, J. L. The Protein-Folding Problem, 50 Years On. *Science (80-.)*. **338**, 1042–1046 (2012).
76. Fersht, A. R. & Daggett, V. Protein folding and unfolding at atomic resolution. *Cell* **108**, 573–582 (2002).
77. Huang, D. M. & Chandler, D. Temperature and length scale dependence of hydrophobic effects and their possible implications for protein folding. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 8324–8327 (2000).
78. Freddolino, P. L., Liu, F., Gruebele, M. & Schulten, K. Ten-Microsecond Molecular Dynamics Simulation of a Fast-Folding WW Domain. *Biophys. J.* **94**, L75–L77 (2008).
79. Lindorff-Larsen, K., Piana, S., Dror, R. O. & Shaw, D. E. How fast-folding proteins fold. *Science (80-.)*. **334**, 517–520 (2011).
80. Szyperski, T., Mills, J. L., Perl, D. & Balbach, J. Combined NMR-observation of cold denaturation in supercooled water and heat denaturation enables accurate measurement of Delta C-p of protein unfolding. *Eur. Biophys. J. with Biophys. Lett.* **35**, 363–366 (2006).
81. Adrover, M., Esposito, V., Martorell, G., Pastore, A. & Temussi, P. A. Understanding Cold Denaturation: The Case Study of Yfh1. *J. Am. Chem. Soc.* **132**, 16240–16246 (2010).
82. Ascolese, E. & Graziano, G. On the cold denaturation of globular proteins. *Chem. Phys. Lett.* **467**, 150–153 (2008).
83. Pastore, A. *et al.* Unbiased cold denaturation [low- & high-temperature unfolding yeast frataxin under physiological condition]. *J. Am. Chem. Soc.* **129**, 5374–5375 (2007).
84. Vajpai, N., Nisius, L., Wiktor, M. & Grzesiek, S. High-pressure NMR reveals close similarity between cold and alcohol protein denaturation in ubiquitin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 1578 (2013).

85. Rovó, P. *et al.* Structural insights into the Trp-cage folding intermediate formation. *Chemistry* **19**, 2628–40 (2013).
86. Becktel, W. J. & Schellman, J. A. Protein stability curves. *Biopolymers* **26**, 1859–1877 (1987).
87. Privalov, P. L. & Gill, S. J. Stability of protein-structure and hydrophobic interaction. *Adv. Protein Chem.* **39**, 191–234 (1988).
88. Privalov, P. L. Cold Denaturation of Protein. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **25**, 281–306 (1990).
89. Kumar, S., Tsai, C. J. & Nussinov, R. Maximal stabilities of reversible two-state proteins. *Biochemistry* **41**, 5359–5374 (2002).
90. Adrover, M. *et al.* The Role of Hydration in Protein Stability: Comparison of the Cold and Heat Unfolded States of Yfh1. *J. Mol. Biol.* **417**, 413–424 (2012).
91. Tantos, A., Friedrich, P. & Tompa, P. Cold stability of intrinsically disordered proteins. *Febs Lett.* **583**, 465–469 (2009).
92. Cavanagh, J. *Protein NMR spectroscopy: principles and practice.* (2007). doi:10.1016/B978-012164491-8/50005-1
93. Sattler, M., Schleucher, J. & Griesinger, C. Heteronuclear multidimensional NMR experiments for the structure determination of proteins in solution employing pulsed field gradients. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **34**, 93–158 (1999).
94. S. Rule, G. & Hitchens, T. K. *Fundamentals of Protein {NMR} Spectroscopy.* **5**, (Springer-Verlag, 2006).
95. LeMaster, D. M. Deuterium labelling in NMR structural analysis of larger proteins. *Q. Rev. Biophys.* **23**, 133–174 (2009).
96. Otten, R., Chu, B., Krewulak, K. D., Vogel, H. J. & Mulder, F. A. A. Comprehensive and cost-effective NMR spectroscopy of methyl groups in large proteins. *J. Am. Chem. Soc.* **132**, 2952–2960 (2010).
97. Kovacs, H. Avance {3D} / Triple Resonance Manual. (2003).
98. Vuister, G. W. & Bax, A. Quantitative J correlation: A new approach for measuring homonuclear three-bond J(HNH α) coupling constants in ¹⁵N-enriched proteins. *J. Am. Chem. Soc.* **115**, 7772–7777 (1993).

99. Wuthrich, K. NMR studies of structure and function of biological macromolecules (Nobel Lecture). in *Journal of Biomolecular NMR* **27**, 235–267 (2003).
100. Williamson, M. P. Chapter 3. Applications of the NOE in Molecular Biology. in *Annual Reports on NMR Spectroscopy* **65**, 77–109 (Elsevier Ltd, 2009).
101. Herrmann, T., Güntert, P. & Wüthrich, K. Protein {NMR} structure determination with automated {NOE-identification} in the {NOESY} spectra using the new software {ATNOS}. *J. Biomol. {NMR}* **24**, 171–189 (2002).
102. Orts, J., Vögeli, B. & Riek, R. Relaxation Matrix Analysis of Spin Diffusion for the NMR Structure Calculation with eNOEs. *J. Chem. Theory Comput.* **8**, 3483–3492 (2012).
103. Vögeli, B., Güntert, P. & Riek, R. Multiple-state ensemble structure determination from eNOE spectroscopy. *Mol. Phys.* **111**, 437–454 (2013).
104. Chi, C. N., Strotz, D., Riek, R. & Vögeli, B. Extending the eNOE data set of large proteins by evaluation of NOEs with unresolved diagonals. *J. Biomol. NMR* **62**, 63–9 (2015).
105. Orts, J., Vögeli, B., Riek, R. & Güntert, P. Stereospecific assignments in proteins using exact NOEs. *J. Biomol. NMR* **57**, 211–218 (2013).
106. Van der Kamp, M. W. *et al.* Dynameomics: A Comprehensive Database of Protein Dynamics. *Structure* **18**, 423–435 (2010).
107. Linge, J. P., Habeck, M., Rieping, W. & Nilges, M. ARIA: Automated NOE assignment and NMR structure calculation. *Bioinformatics* **19**, 315–316 (2003).
108. Huang, Y. J., Tejero, R., Powers, R. & Montelione, G. T. A topology-constrained distance network algorithm for protein structure determination from NOESY data. *Proteins Struct. Funct. Genet.* **62**, 587–603 (2006).
109. Fossi, M., Oschkinat, H., Nilges, M. & Ball, L. J. Quantitative study of the effects of chemical shift tolerances and rates of SA cooling on structure calculation from automatically assigned NOE data. *J. Magn. Reson.* **175**, 92–102 (2005).
110. Herrmann, T., Güntert, P. & Wüthrich, K. Protein {NMR} Structure Determination with Automated {NOE} Assignment Using the New Software

- {CANDID} and the Torsion Angle Dynamics Algorithm {DYANA}. *J. Mol. Biol.* **319**, 209–227 (2002).
111. Garrett, D. S. *et al.* The impact of direct refinement against three-bond HN-C alpha H coupling constants on protein structure determination by NMR. *Journal of magnetic resonance. Series B* **104**, 99–103 (1994).
 112. Cornilescu, G., Delaglio, F. & Bax, A. Protein backbone angle restraints from searching a database for chemical shift and sequence homology. *J. Biomol. Nmr* **13**, 289–302 (1999).
 113. Wishart, D. S., Sykes, B. D. & Richards, F. M. The Chemical Shift Index: A Fast and Simple Method for the Assignment of Protein Secondary Structure through NMR Spectroscopy. *Biochemistry* **31**, 1647–1651 (1992).
 114. Shen, Y., Delaglio, F., Cornilescu, G. & Bax, A. TALOS plus: a hybrid method for predicting protein backbone torsion angles from NMR chemical shifts. *J. Biomol. Nmr* **44**, 213–223 (2009).
 115. Cheung, M. S., Maguire, M. L., Stevens, T. J. & Broadhurst, R. W. DANGLE: A Bayesian inferential method for predicting protein backbone dihedral angles and secondary structure. *J. Magn. Reson.* **202**, 223–233 (2010).
 116. Wishart, D. S. *et al.* {CS23D:} a web server for rapid protein structure generation using {NMR} chemical shifts and sequence data. *Nucleic Acids Res.* **36**, W496–502 (2008).
 117. Berjanskii, M. V., Neal, S. & Wishart, D. S. PREDITOR: A web server for predicting protein torsion angle restraints. *Nucleic Acids Res.* **34**, (2006).
 118. Shen, Y. *et al.* Consistent blind protein structure generation from NMR chemical shift data. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 4685–90 (2008).
 119. Shen, Y., Vernon, R., Baker, D. & Bax, A. De novo protein structure generation from incomplete chemical shift assignments. *J. Biomol. NMR* **43**, 63–78 (2009).
 120. Batta, G. Korszerű mérés technikák az NMR-ben. *Magy. Kémiai Folyóirat* **109-110**, 127–135 (2004).
 121. Morin, S. A practical guide to protein dynamics from ¹⁵N spin relaxation in solution. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **59**, 245–262 (2011).
 122. Kogan, F., Hariharan, H. & Reddy, R. Chemical Exchange Saturation Transfer (CEST) Imaging: Description of Technique and Potential Clinical Applications. *Curr. Radiol. Rep.* **1**, 102–114 (2013).

123. Vallurupalli, P., Bouvignies, G. & Kay, L. E. Studying 'Invisible' Excited Protein States in Slow Exchange with a Major State Conformation. *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 8148–8161 (2012).
124. Gemmecker, G., Jahnke, W. & Kessler, H. Measurement of fast proton exchange rates in isotopically labeled compounds. *J. Am. Chem. Soc.* **115**, 11620–11621 (1993).
125. Grzesiek, S. & Bax, A. Measurement of amide proton exchange rates and NOEs with water in ¹³C/¹⁵N-enriched calcineurin B. *J. Biomol. NMR* **3**, 627–638 (1993).
126. Mori, S., Berg, J. M. & van Zijl, P. C. Separation of intramolecular NOE and exchange peaks in water exchange spectroscopy using spin-echo filters. *J. Biomol. NMR* **7**, 77–82 (1996).
127. Griesinger, C., Otting, G., Wuethrich, K. & Ernst, R. R. Clean TOCSY for H spin system identification in macromolecules. *J. Am. Chem. Soc.* **110**, 7870–7872 (1988).
128. Hwang, T., Zijl, P. van & Mori, S. Accurate quantitation of water-amide proton exchange rates using the phase-modulated CLEAN chemical EXchange (CLEANEX-PM) approach with a Fast-HSQC. *J. Biomol. NMR* **221–226** (1998).
129. Rodriguez, E. & Krishna, N. R. An Economical Method for {¹⁵N/¹³C} Isotopic Labeling of Proteins Expressed in *Pichia pastoris*. *J. Biochem.* **130**, 19–22 (2001).
130. Multi-copy *Pichia* Expression Kit. *User Man.* (1999).
131. Váradi, G. *et al.* Synthesis of PAF, an Antifungal Protein from *P. chrysogenum*, by Native Chemical Ligation: Native Disulfide Pattern and Fold Obtained upon Oxidative Refolding. *Chem. - A Eur. J.* **19**, 12684–12692 (2013).
132. Liu, M. *et al.* Improved WATERGATE Pulse Sequences for Solvent Suppression in NMR Spectroscopy. *J. Magn. Reson.* **132**, 125–129 (1998).
133. Piotto, M., Saudek, V. & Sklenar, V. Gradient-Tailored Excitation for Single-Quantum Nmr-Spectroscopy of Aqueous-Solutions. *J. Biomol. Nmr* **2**, 661–665 (1992).
134. Schleucher, J. *et al.* A general enhancement scheme in heteronuclear multidimensional NMR employing pulsed field gradients. *J. Biomol. NMR* **4**, 301–306 (1994).

135. Yamazaki, M., Revington, D. L., Mattiello, F. W., Dahlquist, C. H., Arrowsmith, L. E., Kay, W. L. An HNCA pulse scheme for the backbone assignment of ^{15}N , ^{13}C , ^2H -labeled proteins: Application to a 27-kDa Trp repressor-DNA complex. *J. Am. Chem. Soc.* **116**, 6464–6465 (1994).
136. Grzesiek, S. & Bax, A. Correlating backbone amide and side chain resonances in larger proteins by multiple relayed triple resonance NMR. *J. Am. Chem. Soc.* **114**, 6291–6293 (1992).
137. Wittekind, M. & Mueller, L. HNCACB, a high-sensitivity 3D NMR experiment to correlate amide-proton and nitrogen resonances with the α - and β -carbon resonances in proteins. *J. Magn. Reson.* **101**, 201–205 (1993).
138. Grzesiek, S. & Bax, A. AMINO-ACID TYPE DETERMINATION IN THE SEQUENTIAL ASSIGNMENT PROCEDURE OF UNIFORMLY $\text{C-}^{13}\text{N-}^{15}$ -ENRICHED PROTEINS. *J. Biomol. Nmr* **3**, 185–204 (1993).
139. Wang, Y. X. *et al.* Measurement of $^3\text{hJNC}$ ' connectivities across hydrogen bonds in a 30 kDa protein. *J. Biomol. NMR* **14**, 181–4 (1999).
140. Kay, L. E., Xu, G. Y., Singer, A. U., Muhandiram, D. R. & Formankay, J. D. A Gradient-Enhanced HCCH TOCSY Experiment For Recording Side-chain H-1 and C-13 Correlations in H_2O Samples of Proteins. *J. Magn. Reson. Ser. B* **101**, 333–337 (1993).
141. Schmieder, P., Kurz, M. & Kessler, H. Determination of heteronuclear long-range couplings to heteronuclei in natural abundance by two- and three-dimensional NMR spectroscopy. *J. Biomol. NMR* **1**, 403–20 (1991).
142. Yamazaki, T., Forman-kay, J. D. & Kay, L. E. K. Two-Dimensional NMR Experiments for Correlating ^{13}C and ^1H Chemical Shifts of Aromatic Residues in ^{13}C -Labeled Proteins via Scalar Couplings Toshio. *J. Am. Chem. Soc.* **115**, 11054–11055 (1993).
143. Bax, A. & Davis, D. G. MLEV-17-based two-dimensional homonuclear magnetization transfer spectroscopy. *J. Magn. Reson.* **65**, 355–360 (1985).
144. Wishart, D. S. *et al.* ^1H , ^{13}C and ^{15}N chemical shift referencing in biomolecular NMR. *J. Biomol. NMR* **6**, 135–140 (1995).
145. Zhang, H. Y., Neal, S. & Wishart, D. S. RefDB: A database of uniformly referenced protein chemical shifts. *J. Biomol. Nmr* **25**, 173–195 (2003).

146. Vallurupalli, P., Bouvignies, G. & Kay, L. E. Studying {‘Invisible’} Excited Protein States in Slow Exchange with a Major State Conformation. *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 8148–8161 (2012).
147. Atkins, P. & De Paula, J. *Physical chemistry*. Oxford University Press (2006).
148. Hoult, D. I. & Richards, R. E. The signal-to-noise ratio of the nuclear magnetic resonance experiment. *J. Magn. Reson.* **24**, 71–85 (1976).
149. Wider, G. & Dreier, L. Measuring protein concentrations by NMR spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 2571–2576 (2006).
150. Gasteiger, E. *et al.* Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. in *The Proteomics Protocols Handbook* 571–607 (2005). doi:10.1385/1592598900
151. Keller, R. L. J. The Computer Aided Resonance Assignment Tutorial. (2004).
152. Vranken, W. F. *et al.* The CCPN data model for NMR spectroscopy: development of a software pipeline. *Proteins* **59**, 687–696 (2005).
153. Herrmann T., Güntert P. & Wüthrich K. Protein NMR structure determination with automated NOE-identification in the NOESY spectra using the new software ATNOS. *J. Biomol. NMR* **24**, 19 (2002).
154. Schrödinger, LLC. *The {PyMOL} Molecular Graphics System, Version~1.3r1*. (2010).
155. Ceroni, A., Passerini, A., Vullo, A. & Frasconi, P. Disulfind: A disulfide bonding state and cysteine connectivity prediction server. *Nucleic Acids Res.* **34**, (2006).
156. Varadi, G. *et al.* Synthesis of PAF, an Antifungal Protein from *P. chrysogenum*, by Native Chemical Ligation: Native Disulfide Pattern and Fold Obtained upon Oxidative Refolding. *Chem. Eur. J.* **19**, 12684–12692 (2013).
157. Váradi, G. *et al.* Synthesis of PAF , an Antifungal Protein from *P . chrysogenum* by Native Chemical Ligation : Disulfide Pattern and Fold Recovered in Oxidative Refolding. *Chem. - a Eur. J. (publication Accept.*
158. Lovell, S. C. *et al.* Structure validation by Calpha geometry: phi,psi and Cbeta deviation. *Proteins* **50**, 437–450 (2003).
159. Hafsa, N. E., Arndt, D. & Wishart, D. S. CSI 3.0: A web server for identifying secondary and super-secondary structure in proteins using NMR chemical shifts. *Nucleic Acids Res.* **43**, W370–W377 (2015).

160. Kabsch, W. & Sander, C. Dictionary of protein secondary structure: Pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. *Biopolymers* **22**, 2577–2637 (1983).
161. Schumann, F. H. *et al.* Combined chemical shift changes and amino acid specific chemical shift mapping of protein-protein interactions. *J. Biomol. NMR* **39**, 275–289 (2007).
162. Giraudeau, P. Quantitative 2D liquid-state NMR. *Magn. Reson. Chem.* **52**, 259–272 (2014).
163. Fardus-Reid, F., Warren, J. & Le Gresley, A. Validating heteronuclear 2D quantitative NMR. *Anal. Methods* **8**, 2013–2019 (2016).
164. Sanfelice, D., Tancredi, T., Politou, A., Pastore, A. & Temussi, P. A. Cold Denaturation and Aggregation: A Comparative NMR Study of Titin I28 in Bulk and in a Confined Environment. *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 11662–+ (2009).
165. Ellis, K. J. & Morrison, J. F. Buffers of constant ionic strength for studying pH-dependent processes. *Methods Enzymol.* **87**, 405–26 (1982).
166. Good, N. E. & Izawa, S. Hydrogen ion buffers. *Methods Enzymol.* **24**, 53–68 (1972).
167. Good, N. E. *et al.* Hydrogen ion buffers for bifological Research. *Biochemistry* **5**, 467–477 (1966).
168. Whitten, S. T., Kurtz, A. J., Pometun, M. S., Wand, A. J. & Hilser, V. J. Revealing the nature of the native state ensemble through cold denaturation. *Biochemistry* **45**, 10163–10174 (2006).
169. Szyperski, T., Mills, J. L., Perl, D. & Balbach, J. Combined NMR-observation of cold denaturation in supercooled water and heat denaturation enables accurate measurement of $\Delta C(p)$ of protein unfolding. *Eur. Biophys. J.* **35**, 363–6 (2006).
170. Daragan, V. A. & Mayo, K. H. Motional model analyses of protein and peptide dynamics using ^{13}C and ^{15}N NMR relaxation. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **31**, 63–105 (1997).
171. Taniyama, Y., Kuroki, R., Omura, F., Seko, C. & Kikuchi, M. Evidence for intramolecular disulfide bond shuffling in the folding of mutant human lysozyme. *J. Biol. Chem.* **266**, 6456–6461 (1991).

172. Grey, M. J., Wang, C. Y. & Palmer, A. G. Disulfide bond isomerization in basic pancreatic trypsin inhibitor: Multisite chemical exchange quantified by CPMG relaxation dispersion and chemical shift modeling. *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 14324–14335 (2003).
173. Richter, B., Gsponer, J., Varnai, P., Salvatella, X. & Vendruscolo, M. The MUMO (minimal under-restraining minimal over-restraining) method for the determination of native state ensembles of proteins. *J. Biomol. Nmr* **37**, 117–135 (2007).
174. Uversky, V. N. Intrinsically disordered proteins from A to Z. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 1–14 (2011). doi:10.1016/j.biocel.2011.04.001
175. Conibear, A. C., Daly, N. L. & Craik, D. J. Quantification of small cyclic disulfide-rich peptides. *Biopolymers* **98**, 518–24 (2012).
176. Teague, S. J. Implications of protein flexibility for drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2**, 527–541 (2003).
177. Feher, V. a & Cavanagh, J. Millisecond-timescale motions contribute to the function of the bacterial response regulator protein Spo0F. *Nature* **400**, 289–293 (1999).

VI. Függelék

VI. 1. Tudományos publikációk

VI. 1. 1. Az értekezés témájához szorosan kapcsolódó, nemzetközi folyóiratban megjelent publikációk

1. Váradi, G., Tóth, G., Kele, Z., Galgóczy, L., Fizil, Á., Batta, G. **Synthesis of PAF, an Antifungal Protein from *P. chrysogenum*, by Native Chemical Ligation: Native Disulfide Pattern and Fold Obtained upon Oxidative Refolding.** Chemistry - A European Journal 19, 12684–12692 (2013).

2. Fizil, Á., Gáspári, Z., Barna, T., Marx, F. & Batta, G. **‘Invisible’ Conformers of an Antifungal Disulfide Protein Revealed by Constrained Cold and Heat Unfolding, CEST-NMR Experiments, and Molecular Dynamics Calculations.** Chemistry – A European Journal 21(13), 5136–5144 (2015). doi:10.1002/chem.201404879

3. Sonderegger C., Galgóczi L, Garrigues S., Fizil Á., Borics A., Manzanares P., Hegedüs N., Anna Huber, Jose F. Marcos, Gyula Batta, Marx F. **A *Penicillium chrysogenum*-based expression system for the production of small, cysteine-rich antifungal proteins for structural and functional analyses.** Microbial Cell Factories, 15:192 (2016)

4. Sonderegger, C., Fizil Á., Burtscher L., Hajdu, D., Munoz A., Gáspári, Z., Hegedüs N., Read, N., Batta, G. and Marx F. **D19S Mutation of the Cationic, Cysteine-rich Protein PAF: Novel Insights into Structural Dynamics, Thermal Unfolding and Antifungal Function.** PLoS One. (2017) Jan 10; 12(1):e0169920. doi: 10.1371/journal.pone.0169920.

VI. 1. 2. Az értekezés témájához szorosan nem kapcsolódó, nemzetközi folyóiratokban megjelent publikációk

5. Virágh M, Vörös D, Kele Z, Kovács L, Fizil Á, Lakatos G, Maróti G, Batta G, Vágvolgyi C, Galgóczy L. **Production of a defensin-like antifungal protein NFAP from *Neosartorya fischeri* in *Pichia pastoris* and its antifungal activity against filamentous fungal isolates from human infections.** Protein Expression and Purification, 94:79-84. (2014)

6. Bereczki I, Mándi A, Róth E, Borbás A, Fizil Á, Komáromi I, Sipos A, Kurtán T, Batta G, Ostorházi E, Rozgonyi F, Vanderlinden E, Naesens L, Sztaricskai F, Herczegh P. **A few atoms make the difference: Synthetic, CD, NMR and computational studies on antiviral and antibacterial activities of glycopeptide antibiotic aglycon derivatives.** Eur. J. Med. Chem. 94, 73–86 (2015).

7. Binder U, Benčina M, Fizil Á, Batta G, Chhillar AK, Marx F. **Protein kinase A signaling and calcium ions are major players in PAF mediated toxicity against *Aspergillus niger*.** FEBS Lett. 589, 1266–1271 (2015).

8. Kiss R, Fizil Á, Szántay C Jr. **What NMR can do in the biopharmaceutical industry.** J. Pharm. Biomed. Anal. (2017) pii: S0731-7085(17)31357-2 (Review).

9. Huber, A., Hajdu, D., Bratschun-Khan, D., Gáspári, Z., Varbanov, M., Philippot, S., Fizil, Á., Czajlik, A., Kele, Z., Sonderegger, C., Galgóczy, L., Bodor, A., Marx, F., Batta, Gy. **New Antimicrobial Potential and Structural Properties of PAFB: A Cationic, Cysteine-Rich Protein from *Penicillium chrysogenum* Q176.** Scientific Reports 8, 1751. (2018).

VI. 1. 3. Magyar nyelven megjelent publikációk

10. Fizil Ádám., Gáspári Zoltán., Batta Gyula. **Egy gombaellenes gombaféherje – PAF, a bővös hatóanyag.** Természet Világa Természettudományi Közlöny 148. évf. 6. füzet 265-268 (2017)

11. Kiss Róbert., Fizil Ádám., Szántay Csaba. **Az NMR spektroszkópia szerepe a biologikumok analitikájában.** Magyar Kémikusok Lapja, LXXIII. Évfolyam 2. SZÁM: 49-55. (2018)

VI. 2. Konferencián bemutatott poszterek

1. Ádám Fizil*, Mónika Nyitrai, Florentine Marx and Gyula Batta: **^{13}C - ^{15}N - ^1H assignment, structure determination and thermal unfolding study of a highly stable antifungal protein from *Penicillium chrysogenum*;** 2nd EAST NMR Young Investigators' Meeting; May 16-18, 2012, Bratislava, Slovakia

2. Ádám Fizil*, Laura Burtscher, Florentine Marx and Gyula Batta: **Structural and functional effects of calcium saturation and mutations on the calcium-binding site on an antifungal protein;** 3rd Annual User group Meeting

of BioNMR and protein dynamics in structural biology, June 10 - 13, **2013**, Budapest, Hungary

3. Ádám Fizil*, Gyula Batta, András Czajlik, István Komáromi, Laura Burtscher, Christoph Sonderegger, and Florentine Marx: **Calcium binding of a defensin-like antifungal protein does not contribute to the inhibition of antimicrobial activity – a structural biology approach**; Annual Meeting of the Hungarian Biochemical Society, 24-27 August, **2014**, Debrecen, Hungary

4. Ádám Fizil*, Gyula Batta, István Komáromi, Christoph Sonderegger, and Florentine Marx: **Search for primary targets and cation binding properties of the defensin-like antifungal protein PAF: a structural biology approach**; Antimicrobial Peptides; Gordon Research Seminar: Mechanism, Function and Application. May 2-3, **2015**, Renaissance Tuscany Il Ciocco Resort Lucca (Barga), Italy

VI. 3. Konferencián bemutatott előadások

1. Fizil Ádám*, Nyitrai Mónika, Tomori Valéria, Batta Gyula: **A PAF antifungális fehérje interakciói – NMR és ITC módszerek**; NMR munkabizottsági ülés; Balatonszemes, **2011. 11. 19.**

2. Fizil Ádám*: **Antifungális fehérjék szerkezete és kitekeredése a PAF példáján**; TÁMOP "Cseppben a tenger II." konferencia, Debrecen, **2012. 04. 19.**

3. Batta Gyula, Fizil Ádám*, Florentine Marx: **Antifungális diszulfid minifehérjék: szerkezet és mozgás**, Peptidkémiai munkabizottsági ülés; Balatonszemes, **2013. 05. 30.**

4. Fizil Ádám*, Batta Gyula, Gáspári Zoltán: **A kvantitatív fehérje-NMR csapdái**; NMR munkabizottsági ülés, Balatonszemes, **2015. 04. 25.**

5. Fizil Ádám*, Doris Bratschun-Khan, Hajdu Dorottya, Florentine Marx, Batta Gyula **Egy új antifungális fehérje (sfPAFB) szerkezete**; NMR munkabizottsági ülés, Debrecen, **2016. 05. 21.**