

OTKA Nyilvántartási szám: T 042567

## SZAKMAI ZÁRÓJELENTÉS

Témavezető neve *Dr Batta Gyula*A téma címe *Biomolekuláris NMR: Szerkezet, oligomerizáció, mozgás és molekuláris felismerési jelenségek glikopeptid antibiotikumokban, cukrokban és kalcium kötő fehérjékben*

A kutatás időtartama: 2003 - 2007

### Új NMR metodikák fejlesztése és alkalmazásai:

Az NMR  $^{15}\text{N}$  és  $^1\text{H}$  kémiai eltolódás anizotrópia mérésére új, CSA/DD kereszt-korrelációs relaxáción alapuló módszereket dolgoztunk ki, amit egy modell peptid esetén az intermolekuláris H-híd kimutatására alkalmaztunk. A ciklosporin-A immunszuppresszív antibiotikum esetében összefüggést találtunk a peptid kötés síkjának torzultságát mutató  $\omega$  szög és a  $^{15}\text{N}$  kémiai eltolódás anizotrópia mértéke között. Intramolekuláris, fényel indukált, cikloaddíciós reakcióval nyert dihidro-orotidin analóg három új sztereocentrumának konfigurációját NOE mérésekkel állapítottuk meg, amit molekula-mechanika módszerekkel vetettünk össze. A metil- $\beta$ -D-glükopiranozid hidroximetil csoportjának belső dinamikáját vizsgáltuk. Több mágneses téren mértük az auto és keresztrelaxációt, valamint laboratóriumi és forgó koordináta-rendszerben a DD/DD relaxációs interferenciát. A mérések értelmezésére egy „hibrid” módszert fejlesztettünk ki. Megállapítottuk, hogy a  $\text{CH}_2$  belső mozgást legjobban a két hasonlóan populált gg-gt konformer közti átugrás modell írja le legjobban. A konformerek szögelfordulása  $50\text{-}60^\circ$ , a hőmérséklet csökkentésével az átugrás sebessége csökken. A hőmérséklet függvényében mért dinamikából megkaptuk a folyamat aktiválási energiáját. Eredményeink összhangban vannak mások ultrahang relaxációs méréseivel és *ab initio* kvantumkémiai számításokkal. Új TROSY módszert fejlesztettünk ki, amely a korábbinál is nagyobb felbontóképességet ad a távolható csatolások lecsatolása révén. A módszer alkalmas a duplán izotópjelzett fehérjékben a  $^{15}\text{N}$ - $^{13}\text{C}$  csatolás mérésére is. Proton-detektáláson alapuló (DJM)-INEPT-INADEQUATE kísérletet fejlesztettünk ki egy- és többkötésű  $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$   $^1\text{J}(\text{CC})$  skaláris spin-spin csatolások meghatározására. A kapott  $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$  multiplettek számítógépes elemzésével 2 Hz-nél kisebb csatolási állandók is mérhetőek. A módszer előnye, hogy lehetővé teszi az egy- és több-kötésű csatolási állandók egyidejű meghatározását. Új, proton-detektáláson alapuló INADEQUATE-típusú kísérleteket - IPAP DEPT-INADEQUATE és IPAP RINEPT-INADEQUATE - fejlesztettünk ki többkötésű  $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$   $^n\text{J}(\text{CC})$  skaláris spin-spin csatolások meghatározására. Az irodalomban korábban leírt módszerekhez képest jelentős érzékenység növekedést értünk el az egy-kötésű  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  csatolási evolúció refókuszálásával valamint a többkötésű  $^n\text{J}(\text{CC})$ -re csatolásra optimalizált hosszú evolúciós idő alatt proton-lecsatolás alkalmazásával. A kísérletek további módosításával azonos- valamint ellentétes-fázisú  $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$  F1-dubletteket kapunk, melyek számítógépes

elemzésével - a multiplettek összeadásával ill. kivonásával – a dublett vonalai külön-külön spektrumban szerkeszthetők, így akár 1-2 Hz-nél kisebb csatolási állandók is pontosan mérhetők. A módszerek teljesítőképességét jól jellemzi, hogy 20-25 mg-os monoszacharid ill. diszacharid mintán, 24 óra alatt (600 MHz-es kriomérőfej alkalmazásával) az összes többkötéses  $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$  csatolási állandót meghatároztuk. A távolható heteronukleáris spin-spin csatolások mérésének eddiginél pontosabb módszerét dolgoztuk ki, az ún. CPMG-HSQMBC technikát. A módszer azon alapul, hogy a zavaró homonukleáris csatolások által okozott modulációt a kísérlet elején beiktatott, összetett impulzusokból felépített CPMG szekvenciával elimináljuk. Így a 2D NMR spektrumban nyert multiplettek tiszta fázisúak lesznek, és az antifázisú részből a heteronukleáris csatolás pontosan megállapítható. A kísérlet hasznát szénhidrátokon és glikopeptid antibiotikumon demonstráltuk a  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  illetve  $^{15}\text{N}$ - $^1\text{H}$  csatolások meghatározásával. A mérési eredmények szerves molekulák térszerkezetének vizsgálatára általában is jól hasznosíthatók. Spanyol együttműködés keretében DOSY- transzlációs diffúziós NMR módszereket fejlesztettünk biopolimerek oligomerizációjának és konformációjának vizsgálatára könnyűvízes közegben. A módszereket kiterjesztettük  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$  editált és szűrt változatokra. Telítés átvitel különbség (STD) kísérleteket fejlesztettünk fehérje-ligandum interakciók kimutatására könnyűvízes közegben. Kidolgoztuk a  $^{15}\text{N}$  csoport-szelektív telítés módszerét, amely akkor is lehetővé teszi a fontos STD módszer alkalmazását, amikor a gazdamolekula és a ligandum NMR jelei átfednek. Példaként a  $^{15}\text{N}$  jelzett glikopeptid antibiotikum / sejtfa - analóg peptid rendszerben igazoltuk a kötődést.

### **Fehérjék vizsgálata:**

A 2002-ben lezárt T 029089 pályázatunkban hivatkozott és a Protein Science-ben 2003-ban megjelent munkánk szerint a calretinin (CR) kalcium kötő fehérjére a homológia modellezés azt jósolja, hogy a hat "EF-hand" szerkezeti egysége egyetlen doménban rendeződik. NMR módszerekkel bizonyítottuk, hogy a CR I-II (1-100) és a CR III-VI (100-271) - a várakozással ellentétben- független doménokat alkot. Ez a különbség a rokon Calbindin D28k fehérjéhez képest magyarázhatja, hogy a CR nem mutat kölcsönhatást a programozott sejtfa sejtfa szerepet játszó caspase-3-al, egyúttal felhívja a figyelmet a homológia modellezés potenciális veszélyeire. A korábban általunk NMR módszerekkel karakterizált (BMRB 5156) calretinin kalcium kötő fehérje N-terminális CR I-II doménját vizsgáltuk a pH 5.2-8.5 tartományban. A  $^{15}\text{N}$ - $^1\text{H}$  korrelációs HSQC spektrumok elemzéséből azt kaptuk, hogy az első EF-Hand modul His12 és His27 egységeinek környezetében a legnagyobbak a változások, pH  $7.0 \pm 0.2$  értéknél. A másodlagos struktúrában a pH nem okozott változást. Adataink azt a modellt támogatják, miszerint az érintett hisztidinek protonálódásának hatására elsősorban az N-terminális hurok és az A hélix átmenete továbbá a B hélix közepe változhat. Hidrofób hely alakul ki a fehérje globális hidrofób sajátságainak jelentősebb változása nélkül. További vizsgálatok lehetségesek a hipotetikus pH kapcsoló ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{H}^+$ ) funkció vizsgálatára. A  $^{15}\text{N}$  jelzett CR fragmensek előállításához használt *Pichia pastoris* élesztőgombák mannóz tartalmú poliszacharidot is termelnek. Ennek a zavaró terméknek a

konkanavalin agarózzal történő eltávolítására NMR-el kontrollált módszert vezettünk be. Fehérje standardok alkalmazásával az NMR diffúziós (DOSY) módszer molekulásúly kalibrálásához fejlesztettünk ki módszert. Ez alkalmas globuláris fehérjék oligomerizációs állapotának meghatározására. Öt különböző fehérje/ligandum rendszeren végzett szaturáció-transzfer differencia kísérletekben igazoltuk, hogy ezekben az interakciókban a mérési hőmérséklet befolyásolhatja a kötés erősségét, a kinetikát és a fontos oldalláncok dinamikáját. Ezért a mérések sikeres megvalósításához fontos a hőmérséklet optimalizálása.

### **Oligopeptidek, antibiotikumok és más bioaktív molekulák NMR vizsgálata :**

Szelektív/Gradiens NMR technikákkal (COSY, TOCSY, NOESY) azonosítottuk a stigmasterol szteroid vázának és oldalláncainak összes jelét, valamint a csatolási állandókat. Ezekkel a módszerekkel a bonyolult spektrumú szteroidok szerkezete meghatározható. Az újonnan szintetizált, potenciálisan enzimgátló dihidrooritidin három új sztereocentrumának határoztuk meg a konfigurációját NOESY és molekula-mechanika módszerekkel.

A humán nyál-amiláz enzim katalizálja bizonyos galaktozil-maltozidok hidrolízisét, amit pl. a tannin gátolhat és így szerepe lehet a fogszuvasodás megelőzésében. Az általunk vizsgált galotannin szerkezetazonosításához NMR módszereket használtunk. Spiro-hidantoidin egységet tartalmazó akarbóz analóg pszeidotetraszacharidot állítottak elő Kandra és munkatársai, amely az  $\alpha$ -amiláz hatásos inhibitora. Teljes  $^1\text{H}/^{13}\text{C}$  jelhozrendelést követően igazoltuk hogy a tio-hidantoidin előtti új glikozidos kötés típusa 1>6. ROESY mérésekből azt kaptuk, hogy az akarbózhoz képest a gyűrűkonformációk nem változtak. Kisebb különbségek ellenére az akarbózzal megegyező A, B, C gyűrűk interglikozidos konformációja is hasonlít az akarbózhoz, és elkülönült hidrofil és hidrofób felületeket kínál fel a target fehérje számára. Az új, 1>6 interglikozidos kötés flexibilitása esetleg magyarázhatja a mért nagyobb aktivitást. Herczegh és munkatársai D-glükálból 2,3 telítetlen hexapiranoz egységekből álló polisacharidokat állítottak elő, amelyek az  $\alpha$ -amiláz inhibitorai. Az elválasztott di-és triszacharidok szerkezetét teljes  $^1\text{H}/^{13}\text{C}$  jelhozrendeléssel igazoltuk, míg a nyert polimer keverékben NMR alapján csak 10%  $\beta$  izomert találtunk, ami a poli-glikozilezés jó sztereoselektivitását igazolja. MALDI-TOF tömegspektrometriás mérések szerint a kovalens polimerek mintegy 5.5 kDa (30 egység) mérethatárig képződnek, míg az NMR diffúziós mérések alapján 30 kDa móltömegű aggregátumok jelennek meg  $\text{CDCl}_3$  oldatban. Bisz-(alfa-béta-D-glükopiranozil)-poli-izobutilén  $\text{CDCl}_3$  oldószerben lejátszódó (koncentrációtól függő) önasszociálódását diffúziós (DOSY) módszerrel figyeltük meg mintegy 65 kDa mérethatárig. A NOESY mérések tanúsága szerint az aggregátumok „belső” PIB része flexibilis, míg a külső szénhidrát rész ( $^4\text{C}_1$  konformáció) a merevebb a reverz micellaképződés során. Egyéb módszerekkel összhangban (CD, transzmissziós elektronmikroszkóp, kvantum-kémiai számítások) diffúziós NMR vizsgálatok során igazoltuk, hogy az izopropilidén-guanozin polietilén-glikollal (PEG) kialakított telekelikus dimerje  $\text{K}^+$  ion jelenlétében ún. G4 kvadruplexeket alkot  $\text{CDCl}_3$  oldószerben. A

képződő gyöngyfüzér-szerű szupramolekuláris polimerek (20 kDa - 10 MDa tömegtartomány, kísérleti körülményektől függően) makromonomerje G4-(PEG)4-G4 szerkezetű, amely képes kisméretű hidrofób ligandum (pl. TMS) „becsomagolására”. Bár a jelen vegyületek nem mutattak telomeráz enzim gátlást, ilyen jellegű potenciális aktivitás nem kizárható, miként kisméretű gyógyszer-molekulák célbajuttatása sem.

Főleg alaninból álló, de tirozint is tartalmazó, helikális modell peptideket használva, kombinált NOE és molekula-dinamikai módszerekkel aromás oldalláncok és a váz között észleltünk kölcsönhatásokat. Ez a megfigyelés valószínűsíti az aromás-főlánc kölcsönhatások gyakoriságát helikális fehérjékben. Antraciklin-glikozid antibiotikumok új, biológiailag hatásos, négyszögsavval képzett származékait (pl. kovalens dimereket) teljes  $^1\text{H}/^{13}\text{C}$  NMR jelhozzárendeléssel karakterizáltuk. Egyes származékok daganatellenes hatást mutattak. A glikopeptid antibiotikumok ligandumfüggő oligomerizációs sajátosságait hazai és külföldi konferenciákon ismertettük, közlemények előkészületben. A négy alapvető glikopeptid antibiotikum heptapeptid aglikonjainak teljes  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$  NMR jelhozzárendelését követően biológiailag hatásos négyszögsav származékaik szerkezetét is igazoltuk.