

OTKA NK 71582**Rendezetlen fehérjék: a szerkezet-funkció paradigma kiterjesztése****Zárójelentés**

A pályázat célkitűzése abból a felismerésből fogant, hogy a fehérjék rendezetlenségének és a rendezetlenség funkcionális fontosságának felismerése megköveteli a szerkezet-funkció paradigma újragondolását és kiterjesztését. Az általunk megfogalmazott munkatervben ebbe az irányba mutató szisztematikus vizsgálatsorozatot irányoztunk elő, amely a rendezetlen fehérjék szerkezet-funkció összefüggéseinek sokféle aspektusból történő megközelítését tűzte ki célul. A várható eredmények révén a rendezetlenség pontosabb szerkezeti leírását és a szerkezeti részletek funkcióval való kapcsolatának részletes feltárását reméltük. Mivel a szokatlan kérdésfeltevés újszerű megközelítést igényelt, lényeges súlyt fektettünk az elméleti, bioinformatikai és kísérletes módszerek kombinálására. Mivel a rendezetlenség előfordulása a genomokban/proteomokban nagyon magas, többféle rendszeren és sokféle technikai megközelítés alkalmazásával szerteágazó vizsgálatokat folytattunk. Eredményeink röviden az alábbiakban foglalhatók össze (zárójelben az adott eredményhez kapcsolódó publikációk).

1) Részletesen tanulmányoztuk rendezetlen chaperonok hatását, rámutattunk riboszomális fehérjék kettős (Janus-) chaperona hatására, vagyis arra a képességére, hogy fehérje és RNS szubsztrátok feltekeredését egyaránt elő tuják segíteni. Ezen vizsgálatok részeként kimutattuk, hogy a rendezetlen fehérjék a rendezett fehérjékkel ellentétben ellenállóak hideg-denaturációval szemben. (publ. 7, 8, 18).

2) A fehérjék felületi hidratációjának elemzése területén is fontos eredményeket értünk el, a széles-sávú (wide-line) NMR alkalmazásával kigmutattuk, hogy rendezett és rendezetlen fehérjék hidratációja mennyiségi és dinamikai szempontból is lényegesen eltér. Ez a jelenség alkalmas a két fehérjeosztály tagjainak egyszerű megkülönböztetésére, és a rendezetlen fehérjék kötési funkciója szempontjából kritikus felületi tulajdonságainak elemzésére is. Rámutattunk továbbá, hogy a rendezett és rendezetlen fehérjék hidrátburkában található vízmolekulák lokális translációs és rotációs mozgásában különbségek mutatkoznak, illetve új módszert dolgoztunk ki a rendezetlenség liofilizált minták esetében történő gyors kimutatására is. (publ. 11, 15)

3) Megállapítottuk a szerkezeti rendezetlenség és kromoszomális transzlokáció erős korrelációját. (publ. 1)

4) A CASKIN, egy neuronális scaffold (állványfehérje) részletes szerkezeti vizsgálatával, valamint bioinformatikai elemzésekkel rámutattunk, hogy az állványfehérjék magas, funkcionálisan is fontos szerkezeti rendezetlenséggel rendelkeznek. A jelenséget funkcionális szempontból általánosságban is elemeztük, és javaslatot tettünk az állványfehérjék funkcionális osztályozására. (publ. 2, 12, 13)

5) Új, lényeges érzékenység-növekedéssel járó NMR technikát (H-start) vezettünk be, és rámutattunk, hogy ez lényegesen megkönnyíti a rendezetlen fehérjék rezonancia- asszignációját, NMR paramétereik érzékeny meghatározását, és így szerkezetük elemzését. Megvalósítottuk a teljesen rendezetlen növényi chaperone fehérje, ERD14, NMR jelhozrendelését és lokális szerkezeti-dinamikai jellemzését. Ezek a megfigyelések lehetővé teszik további részletes *in vitro* és *in vivo* szerkezeti-funkcionális vizsgálatok kivitelezését. (publ. 5, 20)

6) Az androgén receptor rendezetlen, repetitív régiója polimorfizmusának genetikai elemzésével rámutattunk, hogy a régió hossza (az ismétlődő szekvenciális elemek száma) kapcsolatban van a kognitív teljesítménnyel. (publ. 6)

7) Megfigyeltük, hogy a rendezetlen fehérjék crowding körülmények között kompaktabbá válnak, de nem tekerednek fel. Ezeket az eredmények publikáció alatt vannak, és alapját képezik további, *in vivo* szerkezeti megfigyeléseknek (in-cell NMR). (publ. előkészületben)

8) A szerkezeti rendezetlenséggel kapcsolatban számos elméleti megfigyelést, javaslatot is tettünk, mint például a kötött állapotban megfigyelhető rendezetlenség (bolyhosság) további elemzése, a domén koncepció rendezetlen állapotra való kiterjesztése, és az amiloidokban mutatkozó rendezetlenség megfigyelése. (publ. 3, 4, 9, 10)

9) Az eredeti célkitűzésnek megfelelően kiterjedten alkalmaztunk bioinformatikai megközelítéseket is a szerkezeti rendezetlenségre funkcionális/evolúciós elemzésére. A rendezetlenség és a baktériumok optimális növekedési hőmérsékletének viszonyát vizsgálva megfigyeltük, hogy a várakozással ellentétben a magas hőmérsékletet kedvelő (hipertermofil) baktériumokban a rendezetlenség aránya nagyon alacsony, valószínűleg azért, mert a hőmérsékleti adaptáció funkcionális egyszerűsödéshez vezetett. Kimutattuk, hogy a humán genomban az alternatív splicing gyakran vezet a leolvasási keret eltolódásához. Az így létrejövő kettős kódolású szakaszok léte ellentmond a fehérjéről kialakított szerkezeti nézeteinknek. Részletes vizsgálatokkal rámutattunk, hogy a kettős kódolású szakaszokról átíródó fehérjék szerkezeti rendezetlensége teszi lehetővé az alternatív fehérjék létét. A rendezetlenség humán genomban mutatott hossz-eloszlását tanulmányozva rámutattunk, hogy hatványfüggvényt követ. A jelenséget úgy értelmeztük, hogy a rendezetlenség közvetlen kapcsolatban van a fehérje funkciójával, vagyis inkább harmadlagos, mintsem másodlagos szerkezeti elemnek tekinthető. Az alternatív splicing jelenségét abból a szempontból is részletesen vizsgáltuk, hogy megállapítsuk a szekvenciális tulajdonságok és a fehérje termék stabilitásnak összefüggését. Rámutattunk, hogy az splicing helyének rendezetlensége és lokális hidrofobicitása alapján hatékonyan tudjuk predikálni a fehérje termék életképességét. (publ. 14, 16, 17, 19)

10) Egy virális fehérje (poty-vírus Vpg) részletes vizsgálata révén kimutattuk, hogy sokféle funkcióban vesz részt, és ebben valószínűleg lényeges szerepet játszik szerkezeti flexibilitása. Ennek révén a fehérje képes többféle szerkezetet is felvenni, és ezek révén többféle partnerhez is adaptálódni. (publ. 22)

11) A szerkezeti rendezetlenséggel kapcsolatban egy kiemelkedően fontos, felkért review-t is írtunk, amelyben az elemezzük, hogy a rendezetlenség kutatása új szakaszához ért, amelyben a kvalitatív megállapításokat felváltják a kvantitatív megfigyelések és az ezekre épülő szerkezeti-funkcionális modellek. (publ. 21)

Összességében megállapítható, hogy a támogatási periódusban a kitűzött részterületek csaknem mindegyikén részletes eredményeket értünk el. Egyetlen területen nem sikerült előrelépni, az eredeti tervben célul tűztük ki a fehérjék feltekeredésének elemzésére kidolgozott Phi-érték analízisnek a rendezetlen fehérjék kötődésére vonatkozó kiterjesztését. Ennek során a kalpain-kalpaszatin rendszer vizsgálatában jelentős erőfeszítéseink ellenére sem sikerült áttörést elérni, ezért ezt a vizsgálatsorozatot más támogatásból más rendszeren (CREB KID – CBP KIX komplex) vizsgáljuk tovább. Ettől eltekintve megállapítható, hogy összességében a fehérjék rendezetlenségének tárgykörében jelentős előrehaladást értünk el, nem csak a pályázat célkitűzéseit valósítottuk meg, de a terület egyik legelismertebb kutatóhelyévé váltunk.

Publikációk (OTKA NK 71582 támogatás megjelölésével)

1. Hegyi, H., Buday, L., and Tompa, P. (2009) Intrinsic structural disorder confers cellular viability on oncogenic fusion proteins, *PLoS Comput Biol* 5, e1000552.

2. Balazs, A., Csizmok, V., Buday, L., Rakacs, M., Kiss, R., Bokor, M., Udupa, R., Tompa, K., and Tompa, P. (2009) High levels of structural disorder in scaffold proteins as exemplified by a novel neuronal protein, CASK-interactive protein1, *FEBS J* 276, 3744-3756.
3. Tompa, P. (2009) Structural disorder in amyloid fibrils: its implication in dynamic interactions of proteins, *FEBS J* 276, 5406-5415.
4. Hazy, E., and Tompa, P. (2009) Limitations of induced folding in molecular recognition by intrinsically disordered proteins, *Chemphyschem* 10, 1415-1419.
5. Bermel, W., Bertini, I., Csizmok, V., Felli, I. C., Pierattelli, R., and Tompa, P. (2009) H-start for exclusively heteronuclear NMR spectroscopy: the case of intrinsically disordered proteins, *J Magn Reson* 198, 275-281.
6. Kovacs, D., Vassos, E., Liu, X., Sun, X., Hu, J., Breen, G., Tompa, P., Collier, D. A., and Li, T. (2009) The androgen receptor gene polyglycine repeat polymorphism is associated with memory performance in healthy Chinese individuals, *Psychoneuroendocrinology* 34, 947-952.
7. Tantos, A., Friedrich, P., and Tompa, P. (2009) Cold stability of intrinsically disordered proteins, *FEBS Lett* 583, 465-469.
8. Kovacs, D., Rakacs, M., Agoston, B., Lenkey, K., Semrad, K., Schroeder, R., and Tompa, P. (2009) Janus chaperones: assistance of both RNA- and protein-folding by ribosomal proteins, *FEBS Lett* 583, 88-92.
9. Tompa, P., Fuxreiter, M., Oldfield, C. J., Simon, I., Dunker, A. K., and Uversky, V. N. (2009) Close encounters of the third kind: disordered domains and the interactions of proteins, *Bioessays* 31, 328-335.
10. Fuxreiter, M., and Tompa, P. (2009) Fuzzy interactome: the limitations of models in molecular biology, *Trends in Biochemical Sciences* 34, 3.
11. Tompa, K., Banki, P., Bokor, M., Kamasa, P., Lasanda, G., and Tompa, P. (2009) Interfacial Water at Protein Surfaces: Wide-Line NMR and DSC Characterization of Hydration in Ubiquitin Solutions, *Biophysical Journal* 96, 2789-2798.
12. Buday, L., and Tompa, P. (2010) Accessory proteins in signal transduction: scaffold proteins and beyond, *FEBS J* 277, 4347.
13. Buday, L., and Tompa, P. (2010) Functional classification of scaffold proteins and related molecules, *FEBS J* 277, 4348-4355.
14. Tompa, P., and Kalmar, L. (2010) Power law distribution defines structural disorder as a structural element directly linked with function, *J Mol Biol* 403, 346-350.
15. Tompa, K., Banki, P., Bokor, M., Kamasa, P., Racz, P., and Tompa, P. (2010) Hydration water/interfacial water in crystalline lens, *Exp Eye Res* 91, 76-84.
16. Kovacs, E., Tompa, P., Liliom, K., and Kalmar, L. (2010) Dual coding in alternative reading frames correlates with intrinsic protein disorder, *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 5429-5434.
17. Burra, P. V., Kalmar, L., and Tompa, P. (2010) Reduction in structural disorder and functional complexity in the thermal adaptation of prokaryotes, *PLoS One* 5, e12069.
18. Tompa, P., and Kovacs, D. (2010) Intrinsically disordered chaperones in plants and animals, *Biochem Cell Biol* 88, 167-174.
19. Hegyi, H., Kalmar, L., Horvath, T., and Tompa, P. (2011) Verification of alternative splicing variants based on domain integrity, truncation length and intrinsic protein disorder, *Nucleic Acids Res* 39, 1208-1219.
20. Szalaine Agoston, B., Kovacs, D., Tompa, P., and Perczel, A. (2011) Full backbone assignment and dynamics of the intrinsically disordered dehydrin ERD14, *Biomol NMR Assign* 5, 189-193.
21. Tompa, P. (2011) Unstructural biology coming of age, *Curr Opin Struct Biol* 21, 419-425.
22. Rantalainen, K. I., Eskelin, K., Tompa, P., and Makinen, K. (2011) Structural flexibility allows the functional diversity of potyvirus genome-linked protein VPg, *J Virol* 85, 2449-2457.