

Szerkezeti rendezetlenség szerepe a fehérjék chaperone aktivitásában

Kovács Sándor Dénes

Doktori értekezés

Témavezető:

Dr. Tompa Péter

Eötvös Loránd Tudományegyetem Doktori Iskolája,
Szerkezeti Biokémia Doktori Program

Programvezető:

Dr. Gráf László

Készült:

A Magyar Tudományos Akadémia
Szegedi Biológiai Központjának Enzimológiai Intézetében

Budapest

2008

Köszönetnyilvánítás

Mindenekelőtt köszönettel tartozom témavezetőmnek, Dr. Tompa Péternek, hogy munkám figyelemmel kísérte és támogatta. Köszönetemet szeretném kifejezni továbbá Friedrich Péter akadémikusnak, aki az Enzimológiai Intézet igazgatójaként lehetővé tette, hogy doktori dolgozatomat az Intézetben készíthessem el. Köszönettel tartozom Dr. Tompa Kálmánnak (MTA Szilárdtestfizikai és Optikai Kutató Intézet) a szilárdtest NMR vizsgálatok elvégzéséért, Dr. Török Zsoltnak (MTA SzBK) a fluoreszcens anizotrópia vizsgálatokban nyújtott segítségéért, Dr. Kalmár Évának és Dr. Sóti Csabának (Semmelweis Egyetem, Orvosi Biokémiai Intézet) a közreműködésért és a segítségükért chaperone vizsgálatok kezdeti elindításában és a HSP90 expressziós vektorért, Dr. Perczel Andrásnak (Eötvös Loránd Tudományegyetem, Szerves Kémia Tanszék) a ^1H -NMR mérések elvégzéséért. Külön köszönettel tartozom a Tompa és Friedrich csoport minden tagjának segítségükért a munkám során.

Végül, de nem utolsó sorban köszönöm családomnak, hogy dolgozatom elkészítésének éveitől mindvégig mellettem álltak és támogattak.

Tartalomjegyzék

I. Bevezetés	3
II. Irodalmi áttekintés	4
II.1 A szerkezet-funkció nézet fejlődése	4
II.1.1 Statikus szemlélet	4
II.1.2 Dinamikus szemlélet	4
II.2 Rendezetlen fehérjék	6
II.2.1 Szerkezetileg rendezetlen régiók detektálása, karakterizálása	7
II.2.2 A rendezetlen régiók kialakulásának alapja, az elsődleges szerkezet	9
II.2.3 A rendezetlen régiók gyakoriságának becslése szekvencia-analízis alapján	12
II.2.4 Fehérje-szenháromság, a szerkezet dinamikájának határmezsgyéi	13
II.2.5 Rendezetlen fehérjék molekuláris felismerése	14
II.2.5.1 Kölcsönhatás több partnerrel (moonlighting)	16
II.2.6 Rendezetlen fehérjék funkciója	17
II.2.6.1 Chaperone aktivitás	19
II.3 Növényi stresszfehérjék	20
II.3.1 Az abiotikus stressz hatások vizsgálata, általános jellemzők	20
II.3.2 Fagyás által okozott sérülések és a hidegben indukált gének	21
II.3.3 A LEA fehérjék	22
II.3.4 LEA D-II család : A dehidrin fehérjék	23
II.3.4.1 Funkcionális jellemzés	25
II.3.4.2 ERD fehérjék	26
II.4 Riboszomális fehérjék	26
II.4.1 Stresszhatás	27
III. Célkitűzés	29
IV. Anyagok és módszerek	30
IV.1 Vizsgált fehérjék előállítása	30
IV.1.1 ERDk expressziós vektorainak előállítása	30
IV.1.1.1 cDNS előállítása	30
IV.1.1.2 cDNS ligálása vektorba	33
IV.1.1.3 Plazmid szelekció	34
IV.1.2 Fehérje expresszió és tisztítás	34
IV.1.2.1 ERDk expressziója	34
IV.1.2.2 ERDk tisztítása	35
IV.1.2.3 Riboszomális fehérjék expressziója	35
IV.1.2.4 Riboszomális fehérjék tisztítása	36
IV.1.2.5 Hsp90 expressziója és tisztítása	36
IV.2 Biofizikai vizsgálatok	36
IV.2.1 Rendezetlenség in silico predikciója	36
IV.2.2 Hőstabilitás vizsgálat	37
IV.2.3 CD és ¹ H-NMR spektroszkópia	37
IV.2.4 Limitált proteolízis	38
IV.2.5 Relaxációs NMR vizsgálatok, hidrátburkok méretének meghatározása	38
IV.2.6 Membrán-kötés vizsgálata gélfiltrációval	38
IV.2.7 Membrán fluiditás vizsgálat fluoreszcencia anizotrópia méréssel	39
IV.3 Chaperone aktivitás meghatározása	40
IV.3.1 Alkohol dehidrogenáz hőindukált aktivitásvesztés	40
IV.3.2 Lizozim kémiaiailag indukált aktivitásvesztés	40

IV.3.3 Luciferáz hőindukált aggregációja.....	40
IV.3.4 Citrát szintáz hőindukált aggregációja.....	41
IV.3.5 Teljesen denaturált lizozim reaktiválása.....	41
V. Eredmények és tárgyalásuk.....	43
V.1 ERD10 és ERD14: elsődleges szerkezet és rendezetlenség jóslása.....	43
V.1.1 Rendezetlenség in silico predikciója.....	45
V.2 Biofizikai vizsgálatok.....	46
V.2.1 ERDk rezisztensek a hőindukált agregációval szemben.....	46
V.2.2 CD és NMR spektroszkópia.....	47
V.2.3 Limitált proteolízis.....	49
V.2.4 Relaxációs NMR vizsgálatok, hidrátburok méretének meghatározása.....	51
V.2.5 Membrán kötés vizsgálat.....	52
V.2.6 ERD fehérjék hatásának vizsgálata a membránfluiditásra.....	53
V.3 Chaperone hatás vizsgálata.....	54
V.3.1 Alkohol dehidrogenáz aktivitásvesztés.....	54
V.3.2 Lizozim aktivitásvesztés.....	56
V.3.3 Luciferáz aggregáció.....	58
V.3.4 Citrát szintáz aggregáció.....	58
V.3.5 Lizozim reaktiváció.....	59
V.3.6 Chaperone hatékonyság összesítése.....	60
VI. Diskusszió.....	63
VII. Összefoglalás.....	67
VIII. Summary.....	68

I. Bevezetés

A rendezetlen fehérjék szokatlan tulajdonságaira történő utalások már a '80-as évekre visszamenőleg megtalálhatóak a tudományos szakirodalom cikkeiben. Ezek után számos munkában olvashatunk a rendezetlen fehérjék vizsgálatáról, és felfedezéséről, bár akkor még a szerkezeti rendezetlenség nem volt ismert fogalom. 1998-ban definiálták a rendezetlenség fogalmát. Ennek köszönhető, hogy e terület felderítése számottevően felgyorsult. A rendezetlen fehérjék mindössze 10 éves múltira tekintenek vissza, ezért biokémiai jellemzésük, illetve a funkcióik felderítése még nem széleskörű. A gyakorlatban ez azt jelenti, hogy számos fehérjéről ismeretes annak rendezetlensége, de azok pontos funkciói vagy a fehérjék molekuláris mechanizmusai még nem ismertek. Ebben az értekezésben a rendezetlen fehérjék egy eddig még kevésbé vizsgált területét tanulmányoztam, ez a dajka vagy más néven chaperone funkció. Ehhez két rendezetlen növényi stresszfehérjét, illetve négy bakteriális (*E. coli*) riboszómális fehérjét választottam ki. Mint a munkámban részletesen is ismertetni fogom, a növényi stresszfehérjék minimális lokális szerkezeti preferencián kívül teljesen rendezetlenek, míg a riboszómális fehérjékről már számos munkában kimutatták, hogy a rendezetlen és/vagy a molten globula szerkezeti osztályba tartoznak. A tanulmányomban részletes eredményeket mutatok be a növényi stresszfehérjék biofizikai tulajdonságairól, illetve mindkét fehérjecsalád chaperone aktivitásának vizsgálatáról.

II. Irodalmi áttekintés

II.1 A szerkezet-funkció nézet fejlődése

A fehérjék szerkezete és funkciója közötti összefüggésről alkotott nézeteink az elmúlt több mint 100 év alatt folyamatosan változtak. Kezdetekben a jól meghatározott 3D szerkezet és funkció közötti szoros összefüggés volt uralkodó. Ez kizárta az olyan fehérjék lehetőségét, amelyek stabil 3D szerkezet nélkül is oldhatóak és biokémiai funkcióval rendelkeznek. A teljesen merev szerkezetet feltételező kezdeti nézetet a szerkezeti mozgékonyágnak is funkcionális jelentőséget tulajdonító szemlélet váltotta fel. Így napjainkra eljutottunk annak felismeréséig, hogy a fehérjék jelentős része natív körülmények között nem rendelkezik jól definiálható konformációval. Az ilyen típusú fehérjék azonosítása, szerkezeti flexibilitásának vizsgálata és funkcionális jellemzése újfajta kihívást jelent a biokémia és a szerkezeti biokémia számára.

II.1.1 Statikus szemlélet

A 80-90-as évekig a tudományos köztudatban a jól meghatározott 3D szerkezet és funkció összefüggésének paradigmája volt uralkodó. Ez az elképzelés 1894-ből ered, amikor Fischer a sörélesztő invertáz enzim vizsgálata közben arra a következtetésre jutott, hogy az enzim és a cukor úgy illenek egymáshoz, mint a kulcs a zárhoz. 1936-ban Mirsky és Pauling (Mirsky and Pauling 1936) szintén hasonló következtetésre jutottak, a pepszin denaturációja és az enzimaktivitás csökkenése közötti összefüggés vizsgálata során. Munkájukból azt a következtetést vonták le, hogy a natív, enzimaktivitással rendelkező fehérjék sajátossága a jól meghatározott térszerkezet, míg a denaturált fehérjékre ennek hiánya jellemző.

A XX. század folyamán számtalan tudományos munkában jelent meg a statikus 3D szerkezet, mint a fehérjeaktivitás alapvető feltétele. Ennek a szemléletnek a kialakulása megalapozott, mivel az akkori műszerezettséggel vizsgált fehérjék valóban statikus képet mutattak.

II.1.2 Dinamikus szemlélet

A fehérjék dinamikus volta utaló első megfigyeléseket 1950-ben Karush tette, a szérum albumin ligandkötőhelyei vizsgálata során. Azt találta, hogy a kötőhelyek egymással

egyensúlyban lévő, nagy számú hasonló energiájú konformációs állapottal rendelkeznek, amelyek közül a partner molekulához legjobban illeszkedő szerkezet stabilizálódik (Karush 1950). Karush ezt *konformációs adaptációnak* nevezte el. Karush-tól függetlenül Koshland is felismerte ezt a jelenséget (Koshland et al. 1958), és *indukált illeszkedésnek* nevezte el. Utóbbi - már a nevéből következőleg - fordított ok-okozati rendet képvisel, ugyanis ebben az esetben az szubsztrát, előbbinél a random szerkezetváltozás határozza meg a molekula szerkezetet. Ezek voltak az első felismerések, amelyek a fehérje funkciót szerkezetváltozáshoz kötötték.

A fehérje konformáció változásra utaló első kísérleti bizonyíték 1978-ban került napvilágra, a hexokináz kisszögű röntgendiffrakciós vizsgálata során. A megfigyelések szerint az enzim szerkezetében a szubsztrát (glükóz) nagy mértékű domén mozgást idéz elő (Bennett and Steitz 1978). Ez Koshland indukált illeszkedés modelljét igazolja, ami után számos további bizonyíték is napvilágra került a fehérjék konformáció változással kapcsolt funkcióiról.

A '80-as években a kutatók felfigyeltek arra, hogy némely funkcionálisan aktív fehérje tulajdonságai eltérnek az addig más fehérjéknél megismert biofizikai jellemzőktől. Ilyen típusú fehérjék például:

- mikrotubulus assziciált fehérje 2 (MAP2) (Hernandez et al. 1986) amely hőstabil, és forralás hatására sem veszíti el az aktivitását,
- caldesmon, (Lynch et al. 1987) amely nyújtott flexibilis szerkezettel rendelkezik
- mielin bázikus fehérje (Sedzik and Kirschner 1992) erősen bázikus, nem kristályosodó fehérje
- sejt transzkripció faktorainak nagy része (Sigler 1988) is említhető, amelyek túlnyomó részben poláris töltött aminosavakból épülnek fel

Mindegyikük a globuláris fehérjéktől eltérő tulajdonságokkal rendelkeznek, ami kiemeli őket a többi fehérje közül. Mint a későbbiekben kiderült, a fent felsorolt fehérjék mindegyike részben vagy teljesen rendezetlen.

A már bemutatott és ehhez hasonló eredmények alapján 1998-ban Dunker és munkatársai definiálták a szerkezeti rendezetlenség fogalmát (Dunker et al. 1998; Garner et al. 1998). Ezt követően bioinformatikai számításokkal kimutatták, hogy ennek a fehérjecsaládnak több ezer tagja található meg a különböző élőlények proteomjában (Romero et al. 1998; Garner et al. 1999), ami még inkább a terület jelentőségét.

Ma már leszögezhetjük, hogy a rendezetlen fehérjékben nem alakul ki stabil kompakt fehérjeszerkezet, a harmadlagos szerkezeti elemek nagyon lazák, vagy teljesen hiányoznak belőlük, továbbá a másodlagos szerkezeti elemek is számos esetben csak átmeneti jelleggel alakulnak ki. A rendezetlen fehérjék szerkezete fehérje-fehérje kölcsönhatás kialakulása közben lokálisan stabilizálódhat, amely a klasszikus kölcsönhatásoktól merőben eltérő tulajdonságokkal rendelkező kölcsönhatás kialakulását teszi lehetővé (lásd II.2.5 fejezet). Ez a fajta szerkezeti stabilizáció figyelhető meg a PKI α (Hauer et al. 1999), p53 (Kussie et al. 1996), riboszómális fehérjék (Ban et al. 2000), p21^{Waf1/Cip1/Sdi1} (Kriwacki et al. 1996), p27^{Kip1} (Russo et al. 1996) és számos más fehérje esetében. A lac represszor DNS-kötő doménjének N-terminális részén is található egy 61 aminosavból álló rendezetlen régió, amely az NMR vizsgálatok alapján a DNS kötődés során egy rendezetlenből rendezett állapotba való átalakuláson megy keresztül (Slijper et al. 1997). A fentiek ebből a nézőpontból még nem igazolják a szerkezeti rendezetlenség szükségességét a funkció kialakulásához, azonban megkövetelik a statikus szemlélet újragondolását, és kibővítését a nagyobb fehérje-flexibilitás felé (lásd II.2.4. fejezetet).

II.2 Rendezetlen fehérjék

A rendezetlen régiókat először röntgenkristallográfiai vizsgálatok során azonosították szisztematikusan, mint a kristályszerkezet láthatatlan régióit. Ezek a régiók nagy flexibilitással és számos egymástól nagy mértékben eltérő szerkezettel rendelkeznek a kristályon belül is, ezért azok láthatatlannak kristallográfiás technikákkal. Később NMR segítségével is azonosították szerkezet nélküli régiókat, majd olyan natív fehérjéket is találtak, amelyek teljes egészükben rendezetlenek voltak. Első megközelítésben ezeket a fehérjéket a denaturált globuláris fehérjék szerkezetével azonosították, amiből a „random coil” elnevezés is származik. Ez a modell csak két fehérje állapotot különböztet meg: a rendezett globuláris és a rendezetlen denaturált szerkezetet (Anfinsen 1973). Mára azonban már számos kísérleti eredmény igazolta, hogy a rendezetlen és rendezett állapotok között ureában, vagy guanidin-HCl-ban részben feltekeredett intermedier állapotok is megfigyelhetők, ami a rendezetlen fehérjék esetében is helytálló (Kuwajima et al. 1976; Dolgikh et al. 1981) (részletesebben lásd II.2.4 fejezetet).

II.2.1 Szerkezetileg rendezetlen régiók detektálása, karakterizálása

A rendezetlen fehérjéket eltérő biofizikai tulajdonságaik következtében számos módszerrel lehet megkülönböztetni a globuláris fehérjéktől. Szerkezetnélküliségre utalhat például a CD spektrum, az extrém proteolitikus érzékenység, röntgenkristallográfia illetve számos nem műszeres vizsgálat is. A másodlagos szerkezeti elemek hiányára az NMR vagy a Fourier-transzformált infravörös (FTIR) spektrumok utalhatnak. Ezek többségével a denaturált fehérjékre jellemző tulajdonságokat határozzuk meg és ennek alapján következtethetünk a fehérje rendezetlenségére. Ezeket a vizsgálatokat azonban nem denaturáló körülmények között végezzük. Kiemelendő, hogy a rendezetlenség igazolására nem elegendő egy biofizikai módszert alkalmazni. Ennek oka, hogy számos jól meghatározott szerkezettel rendelkező fehérje is a rendezetlen fehérjékre jellemző jellegzetességeket mutatja, egy-egy mérési módszer esetén (Tompá 2002). Ilyen fehérjék például a „loopy” fehérjék (Liu et al. 2002), amelyek jól meghatározott szerkezettel rendelkeznek, mégis a rendezetlen fehérjékre jellemző CD-spektrumot adnak. A következőkben olyan technikákat sorolok fel, amelyek közül több együttes alkalmazása lehetővé teszi a rendezetlen fehérjék, vagy rendezetlen régiók azonosítását:

1. *SDS poliakrilamid gélelektroforézis* során számos rendezetlen fehérje esetén figyeltek meg anomális mobilitást, amikor a tényleges molekulatömeghez képest nagyobb molekulatömegnél jelenik meg a fehérje (Hernandez et al. 1986; Weinreb et al. 1996; Tompa 2002). Ez annak tulajdonítható, hogy a rendezetlen fehérjékhez poláris aminosav összetétele következtében kevesebb nátrium dodecilsulfát (SDS) kötődik, ami miatt alacsonyabb lesz a fehérje nettó töltése, ezáltal az elektroforézis során a mobilitása.

2. *A hőstabilitás* a legtöbb rendezetlen fehérje diagnosztikus tulajdonsága, ami a kompakt szerkezet hiányával, és a jó szolubilitással magyarázható. Gyakorlatban ez a fehérje rezisztenciáját jelenti a hőindukált aggregációval szemben, tehát forralás után is az oldatfázisban marad a fehérje. Ezen felül a specifikus funkcióval rendelkező fehérjék forralás után sem veszítik el aktivitásukat. Továbbá a rendezetlen fehérjéknek ez a tulajdonsága elősegíti a globuláris fehérjéktől történő elválasztásukat is.

3. Már az 1940-es évek végén felismerték a *proteolitikus érzékenység* és a fehérjeszerkezet közötti összefüggést. Fontana, Thorton és Hubbard (Fontana et al. 1986; Fontana et al.

1997) voltak azok, akik bizonyították, hogy a proteolízis sebességét nem pusztán a felszíni fekvés (hozzáférhetőség) határozza meg, hanem a lehetséges hasítóhelyek flexibilitása is. Egy strukturált régióknak több mint 10 aminosavnyi szakaszon kell letekerednie ahhoz, hogy egy átlagos proteáz el tudja hasítani. Ezáltal az emésztés sebességének az aránya (rendezetlen/rendezett) az $e^{-\frac{\Delta G}{RT}}$ kifejezéssel számítható, ahol a ΔG a szegmens letekeredésének szabadentalpiája. Egy tipikus fehérje esetében a letekeredés szabadentalpiája 7 és 10 kcal/mol között mozog, így azt várhatjuk, hogy egy rendezetlen régió 10^5 - 10^7 -szer gyorsabban hasad, mint egy rendezett régió. A proteázokkal szembeni érzékenységgel kapcsolatban érdemes azonban szem előtt tartanunk, hogy a módszer pozíció-specifikus információt ad, ezáltal a proteáz szekvencia szelektivitása nagyban behatárolja a rendezett régiók pontos azonosítását.

4. A *cirkuláris dikroizmus (CD) spektroszkópia* oldatfázisú fehérjék szerkezetének meghatározására alkalmas. A távoli UV CD spektrum jó becslést ad a másodlagos szerkezetek mennyiségéről (többek között a rendezetlen régiókról is), és alkalmas a rendezett és molten globula állapotok a random coil-tól (II.2.4 fejezet) történő megkülönböztetésére is. A közeli UV CD-vel az aromás csoportokat lehet vizsgálni, amely alapján jól elkülöníthetők egymástól a rendezett (éles aromás sávok) illetve a molten globule és random coil állapotok (aromás sávok eltűnnek). A módszer hiányossága, hogy csak fél-quantitatív információt nyújt. A globuláris és rendezetlen régiókat is vegyesen tartalmazó fehérjék esetében a szerkezetvizsgálat nehézkes, továbbá az egyes szerkezeti elemek hozzárendelése az aminosav szekvenciához nem lehetséges.

5. A *Stoke's sugár* meghatározásával is lehet jellemezni random coil fehérjéket. Gyakran először a hidrodinamikai viselkedése alapján sikerül figyelni egy fehérje lehetséges rendezetlenségére. Ezt különböző módszerekkel, pl. kisszögű röntgenszórás, gélszűrés vagy ultracentrifugálás segítségével lehet meghatározni. Egy adott molekulásúlyhoz tartozó szokatlanul nagy sugár a rendezetlenség erős bizonyítéka.

6. Az *NMR spektroszkópia* alkalmas az oldatfázisban lévő fehérjék 3D szerkezetének meghatározására és a fehérje dinamikájának jellemzésére. A rendezetlen fehérjék vizsgálatában ez a technika elsődleges fontosságúvá vált, mivel a segítségével szekvencia-specifikus információhoz juthatunk. Legalkalmasabb módszer a ^{15}N - ^1H heteronukleáris NOE, mely so-

rán a rendezett régiók pozitív jelet adnak, míg a rendezetlen régiók negatívát. Ugyanakkor a molten globula szerkezetek meghatározása nehézkes NMR-rel, mivel a méréshez szükséges koncentrációnál a fehérjék aggregálódnak, illetve a fehérjelánc mozgási időintervalluma miatt kiszélesednek az NMR spektrum sávjai. A NOE módszeren kívül más relaxációs mérések is alkalmasak a rendezetlen fehérjék vizsgálatára, illetve a másodlagos kémiai eltolódás értékek is diagnosztikusak. Érdekességképpen megjegyzendő, hogy a rendezetlen fehérjék egyik leg-erősebb definíciója az NMR spektroszkóiahoz kapcsolódik. Eszerint az a régió tekinthető rendezetlennek, aminek csúcsai teljes mértékben átfednek egy, a régióval azonos 15 aminosav hosszúságú peptid csúcsaival (HSQC mérésnél).

7. *Röntgenkristallográfia* segítségével meghatározott szerkezetvizsgálatok során számos fehérjeszerkezetben elektrondenitász hiányt tapasztaltak, amely rendezetlen régiók-ra utal. Dunker és munkatársai az ilyen régiókat „intrinsically disordered”-nek nevezték el (Dunker et al. 1998).

II.2.2 A rendezetlen régiók kialakulásának alapja, az elsődleges szerkezet

Az Anfisen paradigma szerint a fehérje térszerkezetét az aminosav szekvencia határozza meg (Ellis 2003). Ez az elmélet helytálló a rendezetlen fehérjék esetében is, mivel azok aminosav összetétele, illetve elsődleges szerkezetük diagnosztikus, és egyben meghatározó a rendezetlenség kialakulásához.

Aminosav összetétel vizsgálatok alapján elmondható, hogy ezekben a fehérjékben lényegesen kisebb mennyiségben fordulnak elő a Trp, Cys, Phe, Ile, Tyr, Val, Leu, és Asn aminosavak, ugyanakkor jellemzően gyakoriak az Ala, Arg, Gly, Gln, Ser, Pro, Glu, és Lys aminosavak. Előbbieket „rendezettség támogató” (order-promoting), utóbbiakat "rendezetlenséget támogató" (disorder-promoting) aminosavaknak nevezzük. A His, Met, Thr és az Asp gyakorisága nem mutat szignifikáns eltérést a fehérjék két csoportja között (Dunker et al. 2001; Tompa 2002) (1. táblázat).

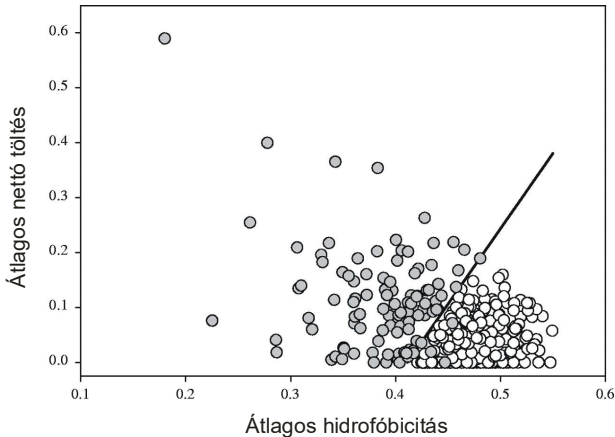
		Rendezetlen	Swiss-Prot	Globuláris
Ala	(A)	7,15	7,62	8,15
Arg	(R)	4,21	5,19	4,61
Asn	(N)	2,06	4,36	4,66
Asp	(D)	5,50	5,25	5,78
Cys	(C)	0,61	1,62	1,64
Gln	(Q)	4,46	3,93	3,69
Glu	(E)	14,26	6,47	5,98
Gly	(G)	4,31	6,85	7,99
His	(H)	1,51	2,25	2,33
Ile	(I)	3,67	5,85	5,43
Leu	(L)	5,44	9,54	8,37
Lys	(K)	10,43	5,97	6,05
Met	(M)	1,30	2,37	2,03
Phe	(F)	1,66	4,10	3,95
Pro	(P)	12,07	4,89	4,61
Ser	(S)	6,91	7,08	6,31
Thr	(T)	5,14	5,57	6,15
Trp	(W)	0,32	1,21	1,55
Tyr	(Y)	1,42	3,16	3,64
Val	(V)	8,02	6,61	7,00

1. táblázat Aminosav összetétel

A táblázatban a rendezetlen, Swiss-Prot adatbázisban található fehérjék és a globuláris fehérjék átlagos aminosav összetétele van összehasonlítva.

Az aminosav összetétel jelentőségének felderítéséhez Uversky és munkatársai mintegy 92 olyan fehérjét vizsgáltak, amelyek CD, NMR, FTIR vizsgálatok és hidrodinamikai viselkedésük alapján rendezetlennek mutatkoztak (Uversky et al. 2000). A vizsgálatban felhasznált fehérjék hossza 50 és 1827 aminosav között változott, nettó töltésük pH 7,0-nél +59 és -117 érték közötti értékeket vett fel. A statisztikai analízis azt mutatta, hogy a kicsi, globuláris fehérjék, valamint a rendezetlen fehérjék átlagos nettó töltése 0,04 +/- 0,04 illetve 0,12 +/- 0,09. Ebből arra lehet következtetni, hogy a nagy nettó töltés szükséges, de nem elégséges feltétele a fehérje rendezetlenségének. A rendezetlen fehérjék hidrofobicitása jól elkülöníthető a globuláris fehérjék hidrofobicitásától, ami az aminosav összetételből is következik. Ugyanis a rendezetlen fehérjékben kis arányban fordulnak elő a hidrofób aminosavak, és

nagy arányban a poláris aminosavak. Ezt a megfigyelést kihasználva Uversky és munkatársai a globuláris és a rendezetlen fehérjék átlagos nettó töltését a hidrofobicitás függvényében ábrázolták. Itt jól megfigyelhető, hogy a rendezetlen fehérjék láthatóan elkülönülnek a globuláris fehérjéktől (1. ábra). Ezt az ábrázolást „Uversky-plot”-nak, vagy „töltés-hidrofobicitás-plottnak” nevezzük.



1. ábra Uversky-plot

Globuláris (világos kör) és rendezetlen (szürke kör) fehérjék átlagos nettó töltésének ábrázolása a hidrofobicitás függvényében. Az ábrán látható egyenes a rendezetlen és globuláris fehérjék határvonalát jelöli

A szerkezeti rendezetlenséget a nagy nettó töltés és az alacsony átlagos hidrofobicitás mellett a prolinok nagy száma is biztosítja (Sigler 1988; Uversky et al. 2000). A prolin megakadályozza a másodlagos szerkezeti elemek (α -hélix, β -lemez) létrejöttét, ugyanakkor gyakran balmenetes PP II hélix kialakulását segíti elő (Uversky et al. 1998; Syme et al. 2002).

A rendezetlen fehérjék jelentős részére jellemző, hogy ismétlődő szakaszokat tartalmaznak, amelyek úgynevezett „repeat expansion” útján jönnek létre (Tompa 2003). Ezek a régiók létrejöhettek egy aminosav ismétlődéséből, vagy akár 10-15 aminosav hosszú régió többszöröződésével. Nagy számban tartalmaznak S, T, P vagy Q aminosavakat, esetenként erősen savas, vagy bázikus jelleget mutatnak. Az ilyen régiókat alacsony komplexitású doméneknek nevezzük, amelyek többnyire rendezetlen régiókban találhatóak meg, illetve maguk is rendezetlenek. Erre egy prominens példa a humán illetve *ecetmuslica* mastermind

fehérje, amely a szekvencia csaknem teljes hosszában ismétlődő szakaszokból épül fel (Smoller et al. 1990). Ez a fehérje elengedhetetlen muslica idegi differenciálódásának lejtárszódásában.

II.2.3 A rendezetlen régiók gyakoriságának becslése szekvencia-analízis alapján

A rendezetlenség jósolható az aminosav szekvencia alapján. Erre számos különböző megközelítésen alapuló algoritmusok készültek, és érhetőek el a világhálón. Ezek közül csak néhányat emelek ki, és azok közül is csak a jelentősebb eredmények bemutatására szorítkozom. Wooton és munkatársai az ún. Shannon-féle entrópia meghatározásával vizsgálták a fehérjeszekvenciák komplexitását, ugyanis azt vették észre, hogy a szekvencia komplexitási függvénye korrelál a rendezettséggel (Dunker et al. 2000). Az analízis során a *Swiss-Prot* adatbázist használták fel, és azt találták, hogy az adatbázisban megtalálható fehérjék 34%-a tartalmaz alacsony szekvencia komplexitású régió(ka)t. Dunker és munkatársai „neurális hálózat” algoritmust használtak a globuláris és rendezetlen fehérjék elkülönítésére. Megfigyeléseik szerint a *Swiss-Prot* adatbázisban lévő fehérjék 29%-a tartalmaz legalább 40 aminosavból álló rendezetlen régió(ka)t és kb. 7 %-a teljesen rendezetlen (Dunker et al. 2001). Uversky és munkatársai szintén a *Swiss-Prot* adatbázist vizsgálva 130 olyan fehérjét azonosítottak, amelyek egymásnak nem homológjuk és jellemzően alacsony az átlagos hidrofobicitásuk és magas a nettó töltésük. Ezek a fehérjék nagy valószínűséggel rendezetlenek, és mivel számtalan homológjuk létezik, így a rendezetlen fehérjék száma ennél valószínűleg jóval nagyobb.

Dunker és munkatársai 31 genomra (Archeabaktérium, Eubaktérium és Eukarióta fajok) a teljesen rendezetlen és az 50 aminosavnál hosszabb rendezetlen régiót tartalmazó fehérjék meghatározása céljából, szekvencia alapján történő predikciót végeztek el. Azt találták, hogy a szerkezeti rendezetlenség elterjedt jelenség a fehérjék körében. Az eukarióta genomok 30-40%-ban tartalmaznak olyan fehérjéket, amelyek 50 aminosavnál hosszabb rendezetlen régióval rendelkeznek, és mintegy 6-17%-ot tesznek ki a teljesen rendezetlen fehérjék (Dunker et al. 2000); *Arabidopsis thaliana* fehérjéinek 23%-a teljesen rendezetlen (Oldfield et al. 2005)

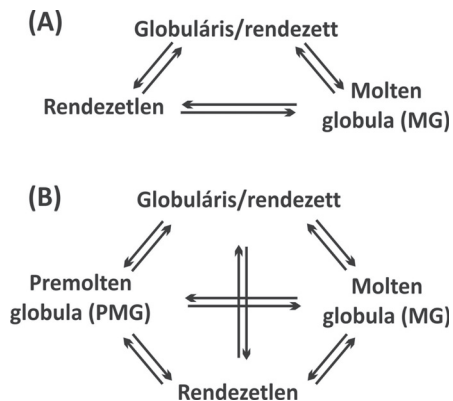
Ezek alapján azt a konklúziót vonhatjuk le, hogy a rendezetlenség gyakori jelenség az élővilágban. Itt megjegyzendő, hogy a területen elismert kutatók véleménye megoszlik azon

a téren, hogy az „első fehérjék” rendezetlen vagy jól meghatározott szerkezettel rendelkeznek-e.

II.2.4 Fehérje-szenháromság, a szerkezet dinamikájának határmezsgyéi

Az első definíció a rendezetlen fehérjéket a globuláris fehérjék denaturáló körülmények között felvett teljes hosszában nyújtott – random coil – szerkezetével azonosította. Ez a definíció a rendezetlen fehérjéket egy típusú konformációs állapotban lévő fehérje családként definiálja. Későbbi vizsgálatok tükrében ez az egyszerűsítő nézet nem tartható fenn. Többek között megjegyzendő, hogy Shorte és munkatársai már a globuláris fehérjék denaturációjának vizsgálata közben is arra a következtetésre jutottak, hogy még erősen denaturáló körülmények között sem jön létre tényleges random coil szerkezet, minden esetben marad reziduális másodlagos szerkezet a polipeptid láncban (Shortle 1996). A rendezetlen fehérjék ma elfogadott definíciója szerint, a fehérjék a polipeptid lánc által energetikailag megengedett szerkezetek mindegyikét, azonos valószínűséggel, egyensúlyi állapotban veszik fel. Ez a definíció a rendezetlen fehérjék „szerkezeti sokaság” definíciójaként ismert.

A rendezetlen fehérjék majdnem minden esetben tartalmaznak a polipeptid láncban lokálisan kialakuló tranziens vagy permanens másodlagos szerkezeteket, vagy ennél kompaktabb, másodlagos szerkezetek laza halmazaként épülnek fel (un. molten globula, illetve premolten globula szerkezetek). A rendezett fehérjék jelentősége abban nyilvánul meg, hogy ezeket a szerkezeteket a nagy flexibilitásuk következtében szabadon képesek bejárni, natív körülmények között. A globuláris fehérjék esetében ezeknek a szerkezeteknek a kialakulása a különböző mértékű denaturáltsági állapotoktól függ. A szerkezet ilyen szabad átalakulását a „fehérje szentháromság”, illetve a „fehérje kvartett” modell írja le (2. ábra).



2. ábra „Fehérje szentháromság” és „fehérje kvartett” modell

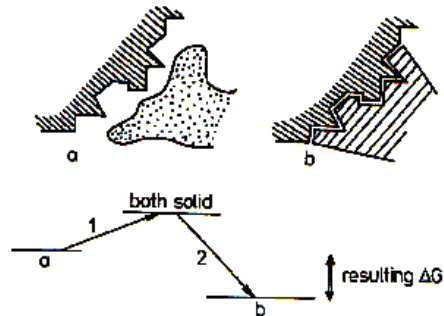
(A) A fehérje szentháromság modell alapján egy fehérjének három szerkezeti állapota lehet, míg a **(B)** kvartett modell alapján a szerkezeti állapotok kibővülnek egy negyedik „premolten globula” állapottal

A fehérje szentháromság modell a rendezetlen fehérjék teljes hosszában kialakuló szerkezet változását modellezi. A rendezetlenség egy másik alternatívája, amikor a fehérje csak egy része rendezetlen. Példaként felhozható a Kennedy neurodegeneratív betegség kialakulásáért felelős androgén receptor (He et al. 2004). Az androgén receptor funkcionálisan a szteroid hormon receptor családba tartozik. Stimulus hatására transzkripciót inicializál. A fehérje receptor része szerkezettel rendelkező régió, a transzaktivátor régió rendezetlen. A receptor ezen kívül rendelkezik egy regulátor alegységgel is a molekulán belül, amely szintén rendezetlen. A fehérje neurodegeneratív hatása a regulátor alegységgel hozható kapcsolatba, ugyanis az itt található glutamin régió extrém expanziója amiloid képzéshez, majd apoptózishoz vezet. Hasonló vegyes szerkezettel rendelkezik a prion-, és számos más fehérje is (II.2.3. fejezet).

II.2.5 Rendezetlen fehérjék molekuláris felismerése

A rendezetlen fehérjék legtöbb ismert funkciója molekuláris kölcsönhatáson alapul (lásd II.2.6 fejezet), aminek feltétele (vagy következménye) a lokális szerkezet kialakulása. Ennek a szerkezeti átmenetnek a termodinamikai jelentőségét, és annak funkcionális következményét elsőként Schulz termodinamikai gondolat kísérlete írta le (Dunker et al. 1998). A

gondolatkísérlet azon alapul, hogy a sztérikusan gátolt fehérje-fehérje kölcsönhatás kialakulása során az egyik partner szerkezetváltozáson megy át, ami energetikai változással jár együtt.



3. ábra Schulz diagramm, rendezetlen fehérjék molekuláris felismerése

Az 1. lépésben a rendezetlen partner konformációváltozása növeli a rendszer szabadentalpiáját; a 2. lépésben a kialakuló erős kötés csökkenti a rendszer szabadentalpiáját, így a kialakuló kölcsönhatás kedvezővé válik.

A jelenlegi ismereteink szerint a fehérje kötődése egy kevésbé mozgékony magból indul ki, az úgynevezett MoRE-ből (Molecular Recognition Element), amely az első kölcsönhatási felület a két molekula között. Ez az elsődleges kötődés indukálja a szerkezet további kialakulását, amely stabilizálja a két molekula kötődését (Romero et al. 2004; Fuxreiter et al. 2007). A fent említett mechanizmust indukált feltekeredésnek nevezzük.

Schulz termodinamikai elgondolásából azt a következtetést vonhatjuk le, hogy a szerkezetváltozás energetikai tulajdonságainak következtében a rendezetlen fehérjék *nagy specificitású, de kis affinitású* kötést alakítanak ki. A szerkezetváltozás csökkenti a fehérje entrópiáját, ami kedvezőtlen, de a kölcsönhatás kialakulása stabilizálja a szerkezetet. Ezen kívül az is több esetben alátámasztást nyert, hogy a természetes ligandumokkal történő kölcsönhatás megváltoztatja a rendezetlen fehérje nettó töltését és hidrofobicitását, amely a polipeptidlánc feltekeredését eredményezi (Uversky et al. 2000). Az ilyen típusú kölcsönhatások hatékony eszközei a sejtszintű szabályozási mechanizmusoknak.

A rendezetlen fehérjék kötődésének egy további fontos tulajdonsága, hogy a partner-molekulához több helyen tudnak kapcsolódni. A kalmodulin például a megkötött hélixet egy flexibilis régióval teljesen körbeveszi, illetve a kalpasztatin három különböző és egymástól elkülönülő régióján keresztül kapcsolódik a kalpainhoz. A PPI2 szintén több ponton kötődik a szubsztrájához a foszfatáz 1-hez, és annak természetes inhibitoraként funkcionál (Hurley et al. 2007). A másik lehetőség, hogy a fehérje több ligandot köt meg. Erre jó példa a kazein $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ kötése.

Ezzel ellentétben Tompa és Csermely (Tompa and Csermely 2004) által, a rendezetlenséggel kapcsolatba hozott fehérje-, és RNS chaperone funkció, csak ettől eltérő kölcsönhatáson keresztül jöhet létre. Ezt az un. „entrópia transzfer” modell írja le, amit részletesen a II.2.6.1 fejezetben ismertetek.

II.2.5.1 Kölcsönhatás több partnerrel (moonlighting)

A fehérjék kettős funkciója, úgynevezett *Moonlighting* tulajdonsága már régóta ismert a biokémiai körében (2. táblázat). Az ilyen tulajdonsággal rendelkező fehérjék egynél több egymástól eltérő funkciót képesek ellátni. A globuláris fehérjék esetében a funkció ilyen formájú divergenciája a fehérjék felszínén sztérikusan különálló kötőhelyek kialakulása esetében jöhet létre. A rendezetlen fehérjék ettől eltérő, sok esetben átfedő kötőhellyel rendelkeznek, és funkciójuk tekintetében számos esetben ugyanarra a szubsztrátra gyakorolnak ellentétes hatást, a körülményektől függően (Tompa et al. 2005) (2. táblázat, szürkével kiemelt rész).

Fehérje	Funkció 1.	Funkció 2.	Referencia
Crystallin	Szemlencse szerkezeti fehérjéje	Chaperone aktivitás	(Piatigorsky 1998)
Phosphoglucose isomerase	Foszfoglükóz izomerációja	Neuroleukin, autocrine motility factor,	(Gurney et al. 1986; Watanabe et al. 1996; Xu et al. 1996)
Transzferrin receptor	Transzferrin receptor	Glicerinaldehid-3-foszfát dehidrogenáz	(Modun et al. 2000)
Mitokondriális Lon proteáz	Fehérje bontás	Chaperone	(Suzuki et al. 1997)
Bacterial FtsH chaperone	Chaperone	Metalloproteáz	(Suzuki et al. 1997)
Calpastatin	Kalpain inhibitor	Kalpain aktivátor	(Zhang et al. 1994; Tompa et al. 2002)
CFTR (R domén)	CFTR inhibitor	CFTR aktivátor	(Ma 2000; Dunker et al. 2002)
DHPR (C peptid)	RyR inhibitor	RyR aktivátor	(Haarmann et al. 2003)
MDM2 (180–298)	P21 szintjének csökkentése	Ösztrogén receptor aktiválása	(Saji et al. 2001; Zhang et al. 2004)
p21 ^{Cip1} és p21 ^{Kip1}	Cdk gátlás	Cdk aktiválás	(Kriwacki et al. 1996; Cheng et al. 1999; Pavletich 1999)
PIAS1 (392–541)	Aktív STAT gátlása	p53 aktiválása	(Megidish et al. 2002)
I-2	PP1 gátlása	PP1 aktiválása	(Yang et al. 2000; Tompa 2003)
Riboszómális L5	MDM2 ubiquitin ligáz gátlása	Riboszóma chaperone	(DiNitto and Huber 2003; Dai and Lu 2004)
Securin	Szerparáz gátlás	Szerparáz chaperone fehérjéje	(Hornig et al. 2002; Tompa 2002)

2. táblázat Moonlighting effektus

A táblázat felső részében néhány példa látható a moonlighting effektusra a globuláris fehérjék köréből (forrás: (Jeffery 2004)), a szürkével kiemelt rész a rendezetlen fehérjék moonlighting kettős funkcióit mutatja be (forrás: (Tompa et al. 2005))

II.2.6 Rendezetlen fehérjék funkciója

Eddigi ismereteink szerint a rendezetlen fehérjék a sejtszintű regulációban, és sejt szerveződésében látják el szerepüket. A fehérjelánc magas mozgékonyága miatt a rendezetlen fehérjékben nem tud kialakulni katalitikus centrum, ennek következtében ezek a fehérjék nem rendelkeznek katalitikus aktivitással. A rendezetlen fehérjék az eddig megismert funkciók alapján hat funkcionális osztályba sorolhatóak, amit a 3. táblázat foglal össze (Tompa 2002). Számos rendezetlen fehérje vesz részt a molekuláris felismerésben, amelyekben a partner lehet egy másik fehérje, DNS illetve RNS. A DNS kötő fehérjék között vannak, amelyek transzkripció faktor DNS kötő motívumaként jelennek meg, vagy a DNS lecsavarásában illetve meghajlításában vesznek részt. A membrán-asszociált fehérjék a kötődés folyamán α-

helikális szerkezetet vesznek fel. A nyújtott szerkezet folytán távolságtartóként is funkcionálnak (MAP2, titin). A poszttranszlációs módosítások során az enzimek csak könnyen hozzáférhető peptidszakaszokat képesek módosítani, ennek megfelelően számos poszttranszlációs módosítás, mint például az acetiláció, glikolizáció, metiláció, foszforiláció (Iakoucheva et al. 2004), ADP-ribilizáció és ubikvitináció (Cox et al. 2002) a rendezetlen régiókban történik.

	Rendezetlen fehérje / domén	Target / partner	Funkció / működés
Entrópikus láncok	MAP2 projekciós domén	nem releváns	Entrópikus sörte
	Titin PEVK szegmens	nem releváns	Entrópikus rugó
	SNAP-25 linker régió	nem releváns	Flexibilis linker a kötő domének között
Effektorok	Kalpasztatin	Ca ²⁺ -aktivált proteáz (kalpain)	Kalpain inhibitor
	p21 / p27	Ciklin-dependens kinázok	Sejtclust szabályozó inhibitorok
	Szekurin	Szeparáz	Kromoszóma szeparációban szerepet játszó inhibitor
	FlgM	Szigma 28 transzkripció faktor	Flagellin-specifikus gének expresszió inhibitora
Raktározók	Kazeinek	Ca(PO ₃) ₂	A Ca ₃ (PO ₃) ₂ precipitáció gátlása tejben
	Nyál Pro-gazdag fehérje (PRP)	tannin	A növényi polifenolok összetevők kötése és neutralizációja
	Dsp16	víz	Megakadályozza a növény kiszáradását. víz visszatartás
Összeszerelők	MAP2 mikrotubulus-kötő doménje	Tubulin dimerek	Mikrotubulus polimerizáció
	Bob-1	Oct1 transzkripció faktor, Igk promoter és TAF _{II} 105	Immunoglobulin gének B-sejt specifikus expressziója
	Caldesmon	Ca ²⁺ / calmodulin, F-aktin, miozin, tropomiozin	Aktin polimerizáció
Módosítási helyek	CREB TAD	Protein kinázok	Szabályozás foszforiláció révén
	MAP2 mikrotubulus-kötő domén	Protein kinázok	Szabályozás foszforiláció révén
	PKC linker régió	Proteázok (kalpain)	Szabályozás limitált proteolízis által
Chaperone-ok	hnRNP A1	RNS	Komplementer szálak renaturációja
	α-synuclein	észteráz	Hőindukált aggregáció elleni védelem

3. táblázat Rendezetlen fehérjék funkcionális osztályozása

A táblázat az irodalomban leírt eredmények alapján készült (Tompa 2002), a példák reprezentatívak.

A rendezetlen régiók a fehérje szabályozásában mint inhibitor, aktivátor, vagy akár mint autoregulátorokként is részt vehetnek. A rendezetlen régiók a kiterjedt szerkezetüknek köszönhetően akár több fehérjével is képesek kölcsönhatást kialakítani, így például részt vehetnek komplexek felépítésében, stabilizálásában, mint például a riboszóma felépítésében.

II.2.6.1 Chaperone aktivitás

A chaperone-ok RNS, vagy fehérje partnerek szerkezetének kialakulását, védelmét látják el, komplex biokémiai folyamatok útján. Jelenlétük alapvetően fontos a makromolekulák natív szerkezetének kialakulásához, ami alapfeltétele a funkció ellátásának. A fehérjeszerkezetet az aminosav szekvencia határozza meg, azonban a natív szerkezet nem minden esetben alakul ki a fehérje szintézis után, hanem megreked egy lokális energiaminimummal rendelkező szerkezetben. A chaperone fehérjék funkciója ezeknek a szerkezeteknek a feloldása, a fehérje tekeredésének gyorsítása, illetve a fehérjék denaturációjának megakadályozása a számukra kedvezőtlen körülmények között.

Az eddig ismert legtöbb chaperone fehérje globuláris, mint az ismert Hsp fehérjecsaládba tartozó chaperone-ok többsége (Csermely 2001). Ellenben ismertek olyan chaperone fehérjék is, amelyek a rendezetlen fehérjék családjába tartoznak. Az érdekesség ebben az esetben az, hogy a chaperone funkciót 3D szerkezet nélkül is képesek elvégezni. Elméleti szinten ez, az ún. „entrópia-transzfer” mechanizmus alapján történik meg (Tompá and Csermely 2004). Ennek lényege, hogy a rendezetlen fehérje átadja entrópiájának egy részét a szubsztrátnak (RNS vagy fehérje). Ennek hatására a szubsztrát szerkezete fellazul, így újabb lehetőséget kap a konformációs tér bejárására és a helyes szerkezet felvételére. A feltételezett mechanizmus alapján a chaperone tranziens asszociáció-disszociáció útján mozdítja ki a szubsztrátot a lokális energiaminumból. Ebből kifolyólag a nem alakul ki hosszú távú és stabil kölcsönhatás a kötő régió teljes hosszában, hanem (1) legfeljebb egy horgonyzó szegmens köti a chaperone fehérjét a partner molekulához, és a kötő régió többi része végzi el az „entrópia átadását”, vagy (2) a kötő régió teljes hossza tranziens asszociáció-disszociáció ciklusokon megy keresztül a helyes szerkezet elnyeréséig.

Az rendezetlen chaperone fehérjék között ismert a MAP2 (Sarkar et al. 2004), ami megakadályozza a fehérje aggregációt, illetve elősegíti a fehérje foldingot. Az α -synuclein észteráz szubsztrátot véd meg a hőindukált aggregációval szemben (Ahn et al. 2006). Az

AavLEA1 (a LEA-3 családból) védi a laktát dehidrogenázt a fagyás okozta aktivitásvesztéstől, illetve *in vivo* megakadályozzák poli-alanin, poli-glutamin szekvenciák amiloid képzését (Chakrabortee et al. 2007). Az α -, és β -kazeinek gátolják a κ -kazein amilod szálakba való tömörülését (Thorn et al. 2005). A fenti fehérjék között található olyat, amely a szubsztrát védelmében játszanak szerepet, de olyat is, amelyek aktívan részt vesznek a szubsztrátfehérje konformációjának kialakulásában.

II.3 Növényi stresszférjék

II.3.1 Az abiotikus stressz hatások vizsgálata, általános jellemzők

A növényi szervezeteken végzett kutatások alapján régóta ismert, hogy az abiotikus stresszhatásnak kitett növényi sejtben különböző fiziológiai és molekuláris folyamatok indulnak meg, amit egyaránt okozhat kiszáradás, só koncentráció-növekedés illetve alacsony hőmérséklet. Ahogy egy növényi sejtben vízhiány lép fel, a sejt alkalmazkodik az új körülményekhez. A növekedési és fejlődési mechanizmusok leállításával párhuzamosan szabályozási, védelmi és felismerő mechanizmust ellátó molekulák kifejeződése indul meg. A növényeket érő abiotikus stressz-hatás során a molekuláris mechanizmusokat fizikai folyamatok előzik meg. Ezek közül a legjelentősebbek a turgornyomás, illetve a légrések nyitottságának változása (Ingram and Bartels 1996). Hasonló folyamatok játszódnak le a mag-érés utolsó szakaszában, amikor az eredeti víztartalomhoz képest akár 90%-os vízvesztés is bekövetkezhet. Ebben az alvó időszakban metabolikus folyamatok nem zajlanak. A csírázás megindulásakor azonban az „embrió” a megszerzett tolerancia képességet elveszti. Minden esetben elmondható, hogy a hatásokra adott válasz függ a stresszhatás időtartamától, erősségétől és egyéb környezeti faktoroktól.

A stressz indukált gének kifejeződése a növényben szövet, szerv és fejlődési állapot függvénye. Néhány fehérje természetes körülmények között a magban ugyanúgy kifejeződik, mint stressz körülmények között egyéb szervekben. A tanulmányozást tovább nehezíti, hogy a stresszhatások alatt kifejeződött gének csak egy részének van védő funkciója. A további géntermékek megjelenése a sejt sérülésének következménye lehet, más gének pedig a kifejeződés ellenére sem okoznak változást a stressztolerancia kialakulásában.

II.3.2 Fagyás által okozott sérülések és a hidegben indukált gének

A fagyás által okozott sérüléseket a sejten belüli és az extracelluláris jégképződés hatására történő kiszáradás, és a sejtmembrán sérülése okozza. Mivel a víz az alacsonyabb kémiai potenciálú tér felé áramlik, -10 fokon a sejt ozmotikusan aktív víztartalmának akár 90%-a is eltávozhat. A fagyás elleni védelemben a sejtmembrán stabilizálása kulcsfeladat (Strauss and Hauser 1986).

A génexpresszió megváltozását hideg-stressz hatására elsőként 1985-ben fedezték fel (Guy et al. 1985). Az elmúlt évek során nagyszámú hideg hatására indukálódó gént izoláltak és rendszereztek. Ilyen a chaperone aktivitással bíró Hsp90 (*Brassica napus*), Hsp70 (spenőt), a lipidmembránt védő zsírsav desaturáz enzim (*Arabidopsis thaliana*), jelátviteli, szabályzó molekulák (pl.: mitogén aktivált protein kináz), stb. Ezen kívül még számos hideg hatására indukálódó gén ismert (pl LEA fehérjék), azonban azok pontos funkciója még nagyrészt ismeretlen (Gibson et al. 1994).

A funkció szempontjából a hideg és szárazságstressz fehérjéket hat alapvető csoportba lehet sorolni (Ingram and Bartels 1996):

I. *Metabolizmus*: A stresszhatásra adott egyik elsődleges válasz az anyagcserében bekövetkező lényegi változás. Alapos vizsgálatoknak vették alá a *gliceraldehid-3-foszfát dehidrogenáz* kifejeződését (*Craterostigma plantagineumban*), és azt találták, hogy stresszhatásra (vagy ABA adására) jelentősen megnő az enzim kifejeződése. A *proteázok* mennyiségének növekedése azért lehet fontos, mert a vakuoláris és a sejt számára felesleges fehérjék bontásával az aminosavak felszabadításában játszanak fontos szerepet. A *cukrok* metabolizmusa is fontos része a stresszre adott válaszreakciónak, mivel a cukrok a vízháztartás szabályozásában vesznek részt, és megakadályozzák a fehérjék aktív szerkezetének elvesztését.

II. *Ozmotikus szabályozás*: Enyhe szárazságstressz hatására a növény jól hidratálódó metabolitok (pl.: cukrok) koncentrációjának növelésével reagál (Bohnert et al. 1995), ami erősebb szárazság-, vagy hidegstressz esetén kevésnek bizonyul. Ekkor megnövekszik azon fehérjék termelődése, amelyek a membrán ioncsatornáinak szabályozásában vesznek részt, és ezáltal befolyásolják azok áteresztőképességét.

III. *Strukturális szabályozás*: Szárazságstressznek kitett növények vizsgálata során kiderült, hogy a szárazság következtében megváltozik a sejtmembrán és a sejtfal kémiai összetétele és fizikai tulajdonsága. Ezek a változások az S-adenozil-metionin szintetáznak expressziós mintázatának tulajdonítható, amely a sejtfal összetételével hozható összefüggésbe. Stressz nélküli állapotban csak az elfásodó régiókban aktív, míg stresszállapotban a vegetatív sejtek sejtfalában is aktív (Espartero et al. 1994), ezzel befolyásolva a sejt strukturális felépítését.

IV. *Degradáció, javítás*: Borsóból és *Arabidopsis thaliana*-ból olyan szárazságstressz hatására kifejeződő cDNS-eket izoláltak, amelyek proteázokkal szekvenciális hasonlóságot mutatnak. Ezek fiziológias jelentősége valószínűleg a helyrehozhatatlanul sérült fehérjék degradációjával hozható összefüggésbe (Guerrero et al. 1990). Shinozaki és munkatársai kimutatták, hogy stresszhatás alatt a növényi sejtekben megnő az ubiquitinálást végző fehérjék mRNS szintje, amelyek szintén a fehérjedegradáció folyamatában vesznek részt.

V. *Toxinok lebontása*: Az oxidatív metabolizmus során toxikus intermedierek is keletkeznek. Eltávolításuk a sejt működésének feltétele. Ezt a bontást és metabolizmust végrehajtó enzimek, például a glutation reduktáz vagy szuperoxid dizmutáz végezzék el.

VI. Ezekon kívül a LEA (Late Embryogenesis Abundant) fehérjék expressziós mintázatában is változást tapasztaltak. LEA fehérjéket először a késői magérés állapotában fedezték fel, ahonnan az elnevezés is származik. Később további vizsgálatok igazolták, hogy a családot alkotó számos fehérje a kifejlett növényben, stressz körülmények között is kifejeződik.

II.3.3 A LEA fehérjék

A LEA elnevezés (Late Embryogenesis Abundant) a fehérjék általános kifejeződésére utal, amely a magérés késői szakaszára tehető. Ennek oka, hogy a magok hidratáltsági foka igen alacsony, és előnytelen állapot mellett is életképesnek kell maradniuk.

A fehérjecsaládba számos, funkcionálisan eltérő fehérje tartozik, amelyek minden esetben a növényi sejtet védik. A védelem két fő ponton jelenik meg: egyrészt a LEA fehérjék befolyásolják a sejten belüli jelátvitelt. Ez a sejt fehérje-összetételében illetve a poszttranszlációs módosításokban jelenik meg. A másik fő funkció a sejtmembrán és a sejt fehérjéinek védelmében (Chakrabortee et al. 2007; Kovacs et al. 2008), vízvisszatartásban nyilvánul meg (Garnczarska et al. 2008). Ezen folyamatok molekuláris mechanizmusa a leg-

több esetben ismeretlen, illetve számos további feltételezett funkció (lásd: II.3.2. fejezet) eddig még nincs is bizonyítva. A jellemzően szárazság alatt expresszáladó hidrophil LEA fehérjék kiszáradás, hideg, ozmotikus stressz, magas UV sugárzás hatására fejeződnek ki a kifejlett növényekben illetve a magérés folyamán normál körülmények között is. A csoport néhány képviselőjéről (ERD10 és ERD14) kimutatták továbbá, hogy normál (stresszmentes) körülmények között az aktívan osztódó sejtekben is kifejeződik (Nylander et al. 2001). A LEA fehérjék különböző sejtípusokban jelennek meg, és különböző koncentrációban fordulnak elő, azonban stressz hatására a sejt összfehérje-tartalmának akár 4%-át is elérhetik (Wise and Tunnacliffe 2004).

II.3.4 LEA D-II család : A dehidrin fehérjék

A dehidrinek főleg - de nem kizárólag - növényekből, tipikusan az alacsony víztartalmú szövetekből és a fejlődő magokból izolálható fehérjék (Allagulova Ch et al. 2003). Először az Európában őshonos *Arabidopsis thaliana* nevű növényből találták meg őket, de egyéb magasabb rendű növényekben továbbá algákban, élesztőkben és cianobaktériumokban is megtalálhatóak (Rorat 2006). A dehidrinek fontos védelmi szerepet töltenek be a magok érése alatt és a környezeti hatásokhoz való alkalmazkodásban. Akumulációjukat ozmotikus stresszre visszavezethető környezeti hatások idézik elő, úgy mint az alacsony hőmérséklet, szárazság illetve sókoncentráció növekedés. Ehhez hasonló állapotok a mag érése alatt természetes körülmények között is bekövetkeznek. A dehidrinek bizonyítottan védik a növényt a szárazságtól, illetve a hideg okozta károsodástól, hiányuk a stressz tolerancia csökkenését, vagy teljes hiányát eredményezi. Normál körülmények között a magban, stressz hatására azonban kifejlett növényi szövetekben is kifejeződnek.

A dehidrinekre általánosan jellemző a magas nettó töltés és a poláris aminosavak jelenléte. Gazdagok glicin és lizin aminosavakban, ellenben ciszteinre és triptofánra nézve hiányosak (Ismail et al. 1999; Wisniewskia et al. 1999; Allagulova Ch et al. 2003), ami a rendszertlen jellegre utal. Kezdeti jellemzésük az őket felépítő szegmens alapján történik (Close 1996). A 4. ábra az ERD10 és ERD14 rokon fehérjék szegmens felépítését mutatják példaként.

```

      10      20      30      40      50      60      70      80
ERD10 MAEEYKNTVPEQETPKVATESSAPEIKERGMFDL-KKKEVVKQETTLLASEFEHKTQISEPEFVVAHEEEHKPTL
ERD14 MAEEIKN-VPEQEVPRVATESSA-EVTDRLGFLDFLGKKKDETKPEE-TPIASEFEQKVHISEPE-----
      **** * *****:***** *:.*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*
      90      100     110     120     130     140     150     160
ERD10 LEQLHQHKEHEEEENKPSLLDKLHRSNSSSSSSDEEGEDGEKKKKKEKKKIVEGDHVKTVEENQGVMDRIKKEKFLGK
ERD14 -----PEVKHESLLEKLHRSNSSSSSSDEEGSDGKRRKKKKEK-----KK
      * :.***:*****:*****:***:***:***:***:
      170     180     190     200     210     220     230     240
ERD10 PGGDVFPVVTMPAPHSVEDHKPEEIEKKGFMDKIKEKLPGHSKKPEDSQVNTTPLVETATPIADIPEEKGFMDKIKE
ERD14 P-----TTEVEVKEIEKKGFMEKLEKLPKH-KKPEDGSAVAAPVVVPPVVEAHVPEKKGLEKIKE
      * :. :.*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****
      250     260
ERD10 KLPGYHAKTTEEEKKKEKVS
ERD14 KLPGYHPKTVVEEKDKK--
      ***** ** *****:

```

4. ábra ERD10 és ERD14 illesztése és szegmens felépítése

Az ábra az ERD10 (NP_564114) és ERD14 (NP_177745) szekvencia illesztését mutatja (clustalw). A fehérjéket felépítő szegmensok: S szegmens (piros szövegdoboz), CHP1 szegmens (zöld szövegdoboz) K szegmens (kék szövegdoboz),

K-szegmens (EKKGIMDKIKEKLPG):

Minden hideg hatására kifejeződő dehidrinben jelen lévő, lizinben gazdag, 15 aminosav hosszú konzervált motívum. A K-szegmens egy-egy fehérjén belül 1-12-szer ismétlődik, számítógépes jóslások szerint amfipatikus α -hélix szerkezet felvételére képes és membránnal történő kölcsönhatás kialakításában játszhat szerepet (Baker et al. 1994). Ez utóbbira kísérleti bizonyíték még nem áll rendelkezésre.

S-szegmens (LHRSGS₄₋₁₀(E/D)3)

Szerinben gazdag szakasz, amely a fehérje foszforilálható szakaszának bizonyult. Legtöbb esetben a K-szegmensok közé ékelődve található meg. A foszforiláció pontos funkciója még nem ismert, valószínűleg szerepe lehet a fehérje sejtmagba való átjutásában (Close 1996) vagy a membrán stabilizálásban.

Y-szegmens (DEYGNP):

A fehérje N-terminális végén található, konzervált szakasz. Homológiát mutat a növényi fehérjék nukleotid kötő részével és bakteriális chaperone fehérjékkel (Close 1996).

ChP-1 szegmens (EEGEDGEK₄₋₁₀EK₂₋₅)

Erősen töltött, lizingazdag régió. Nagy hasonlóságot mutat az állati szervezetekben előforduló Hsp-90 chaperone fehérje töltött linker régiójával.

θ-szegmens:

Glicin vagy prolin és alanin aminosavakból felépülő, kevésbé konzervált apoláris szakasz, amely általában két K-szegmens között helyezkedik el (Ismail et al. 1999).

II.3.4.1 Funkcionális jellemzés

A dehidrinek funkcionális annotációja még távolról sem teljes, de számos feltételezett funkciót foglal magába. Ezek között szerepel a sejtmembrán stabilizálása, a fehérje szerkezet védelme, a jégnövekedés gátlása, a szabad gyökök semlegesítése, ionpuffer hatás, vízvisszatartás és szolvatációs ágensek. Kísérleti bizonyíték azonban csak néhány esetben áll rendelkezésre.

A dehidrinek erősen hidrofilek, innen származik a „hydrophilin” elnevezés is (Garay-Arroyo et al. 2000). Erre alapozva McCubin parányi szivacsnak nevezte el ezeket a fehérjéket, amelyek feltételezése szerint magas ozmotikus potenciálon, a sejten belüli vízvisszatartásért felelősek. Számos dehidrin natív körülmények között rendezetlen (Alsheikh et al. 2003; Mouillon et al. 2006; Rorat 2006; Kovacs et al. 2008), néhány tagjáról azonban kimutatták, hogy membrán-szerű képződményekkel képes kölcsönhatást kialakítani, miközben részleges α -helikális szerkezetet vesz fel (Koag et al. 2003). Immunolokalizációs vizsgálatok kimutatták, hogy a savas dehidrinek a citoszol membránban gazdag régiókban akumulálódnak, lipid és fehérje testekkel körülvéve (Asgar et al. 1994), viszont hidegstressz hatására a plazma-membrán közelébe transzlokálódnak (Danyluk et al. 1998). Koag és munkatársai a DHN1-ről kimutatták (*Vigna unguiculata* – tehénborsó; LEA-D11 csoport), hogy α -helikális szerkezeti motívumok felvétele közben nagy affinitással kötődik savas, kis méretű vezikulákhoz (Koag et al. 2003). A szerkezeti változást foszfolipid vezikulákon és SDS micellákon végzett CD spektroszkópiás mérésekkel is megerősítették. A rendeződés lehetőségét más fehérjéken is megvizsgálták, például a Dsp16 (Caterostigma plantagineum; LEA-2) (Lisse et al. 1996) és rGmD-19 (szójabab; LEA-1) (Soulages et al. 2002) CD spektroszkópiával trifluor-etanol (TFE), és/vagy SDS mellett. A vizsgálatok azt mutatták, hogy a natív állapothoz képest megnövekedett a másodlagos szerkezeti elemek mennyisége. A fehérjék magas töltöttsége miatt ionos jellegű kölcsönhatás kialakulása is lehetséges.

II.3.4.2 ERD fehérjék

Az ERD10 és ERD14 (ERD-k) fehérjék *Arabidopsis thaliana*-ban kifejeződő dehidrin családjába tartozó fehérjék. Ahogy nevük is mutatja (ERD, Early Response to Dehydration) a szárazságstressz korai szakaszában jelennek meg, de természetes körülmények között a magban, a magérés késői szakaszában akkumulálódnak. Ezen kívül jelen vannak a gyorsan osztódó szövetekben, így a merisztémában, a gyökér és a hajtáscsúcsokban is (Nylander et al. 2001). Stresszhatásra a növény valamennyi szervében kifejeződnek. A két fehérje aminosav szekvenciája 52,2%-os azonosságot mutat, szegmensszerkezetük SK₃(Chp-1) struktúrájú (4. ábra).

A dehidrinek egyik ismert jellemzője, hogy képesek fémionokat kötni illetve foszforilálhatók, aminek funkcionális jelentősége eddig ismeretlen. Az ERD-k Ca²⁺ kötő képességére vonatkozó vizsgálatok szerint 1 mól foszforilált ERD14, 3 mól Ca²⁺ megkötésére képes, míg az ERD10 foszforilált változata csupán 1 mólnyi mennyiséget köt (Alsheikh et al. 2005). A vizsgálatok ezenfelül azt is mutatták, hogy az ERDk foszforilálatlan állapotukban is kötnek Ca²⁺-t, bár sokkal kisebb mennyiségben.

II.4 Riboszomális fehérjék

Az RNS-ek számos esetben vesznek fel lokálisan stabil, de biológiailag inaktív konformációt (Herschlag 1995). Ennek megakadályozására illetve feloldására számos olyan fehérje áll rendelkezésre, amelyek a nem megfelelő konformációjú RNS-ek szerkezetét fellazítják, és elősegítik a helyes konformáció kialakulását (Herschlag 1995; Ramakrishnan and White 1998; Rajkowitsch et al. 2005). Az ilyen RNS chaperone aktivitással rendelkező fehérjéket az utóbbi tíz évben nagy részletességgel tanulmányozták funkció, lokalizáció (a riboszómán illetve a sejten belül is) és szerkezet szempontjából is (Thirumalai and Hyeon 2005). Számos ilyen fehérje a riboszóma részeként is funkcionál, és a riboszomális fehérjék családjába tartoznak.

A riboszóma kristályszerkezete alapján a riboszomális fehérjék elhelyezkedése és szerkezete atomi szinten ismert (Evers et al. 1994; Ban et al. 2000). A kristályszerkezet azt mutatja, hogy a riboszomális fehérjék nyújtott szerkezettel kötődnek a riboszómához, ami a rendezetlen fehérjék jellegzetessége. Ezt más munkák részletes vizsgálatokkal szintén alátámasztották (Tompa and Csermely 2004; Ivanyi-Nagy et al. 2008). A szerkezetvizsgálatok azt

mutatták, hogy szerkezetük csak részben rendezetlen (Gunasekaran et al. 2003; Timsit et al. 2006) vagy molten globula jellegű (Uversky 2002; Woestenenk et al. 2002; Nishimura et al. 2004). A riboszómális fehérjék a riboszóma felépítésében, és szabályozásában játszanak szerepet.

A közelmúltban némely riboszómális fehérjéről transz-splicing vizsgálatokban kimutatták, hogy RNS chaperone aktivitással rendelkeznek (Semrad et al. 2004). Vizsgálataik során azt találták, hogy az *E.coli* riboszóma nagy alegységének riboszómális fehérjei (összesen 34 db) közül kilenc szignifikáns chaperone aktivitást mutat. Aktivitás szempontjából ún. passzív chaperone-ok, azaz a funkciójukhoz nem használnak ATP-t. Chaperone aktivitásuk pontos mechanizmusát eddig még nem sikerült meghatározni. Hatásukat vélhetőleg több aspecifikus kölcsönhatás útján fejtik ki az RNS és szerkezetileg rendezetlen régiók között, az entrópia transzfer modellnek megfelelően (Ivanyi-Nagy et al. 2008). (lásd II.2.5).

II.4.1 Stresszhatás

A riboszómális fehérjék expressziós szintje a sejten szigorúan szabályozva van, ami úgy az mRNS (Presutti et al. 1991), mind a fehérje szintjén is megvalósul (Tsay et al. 1988). Részletes vizsgálatok azt mutatták, hogy a riboszómális fehérjék a riboszóma felépítésén túl kapcsolatban vannak a sejt stressz válasz kialakulásával (Zhang et al. 2001), illetve daganatos sejtekben is megváltozott funkcióval rendelkeznek. Daganatos sejtek vizsgálatakor bizonyos riboszómális fehérjék szintjének emelkedését tapasztalták. Az L19 riboszómális fehérje szintje akár 64-szeresére is megnő humán mellrák sejtekben (Henry et al. 1993). Ennek biológiai, molekuláris jelentősége eddig még ismeretlen. A zebrahal riboszómális fehérjeinek csendesítése, ami a rákos sejtek nagyobb arányú megjelenését eredményezte. amiből arra következtettek, hogy a riboszómális fehérjék tumor szupresszorként funkcionálhatnak (Amsterdam et al. 2004). Ezen kívül a riboszómális fehérjék szintje gyors sejtosztódás során is megemelkedik (Ramagopal and Subramanian 1974; Bernstein et al. 2007).

Ezek a jelenségek vélhetőleg a riboszómális fehérjék riboszómán kívüli, úgynevezett extrariboszómális funkcióival hozhatóak kapcsolatba (Wool 1996). Ezek a funkciók sok esetben DNS-sel és RNS-sel kapcsolatos funkciókat jelentenek, mint a fent említett RNS chaperone aktivitás a transz-splicing vizsgálatok során. Előfordul azonban, hogy az extrariboszómális funkció más fehérjékkel történő kölcsönhatáson alapul. Példaként említ-

hetők az S10 ami az NUS B-vel alkot fehérje komplexet, és hatás szempontjából az mRNS szintézis során a terminációt gátolja (Friedman et al. 1981). Az L5, L11 és L23 az MDM2 onkogén fehérje termékkel lép kölcsönhatásba, és gátolja annak aktivását. Az MDM2 a p53 tumor szupresszor fehérje gátlásáért és degradációjáért felelős fehérje, aminek gátlása a sejtciklus befagyásához és apoptózishoz vezet (Dai and Lu 2004). Az egyik példa a multifunkcionálisra a B23, amit ugyan nem valódi riboszómális fehérjeként tartunk számon, azonban szerepet játszik a riboszóma összeszerelésében, továbbá stimulálja a DNS polimeráz alfa aktivitását (Umekawa et al. 2001). Ezenkívül gátolja a fehérjeaggregációt és elősegíti az inaktív fehérjék feltekeredését (Szebeni and Olson 1999; Szebeni et al. 2003). Továbbá a B23 a magmembránon keresztül zajló fehérjetranszportban is szerepet játszik. A sejtmagban jelen lévő nucleolin mind az RNS (Angelov et al. 2006) mind a fehérje foldingban (Allain et al. 2000) részt tud venni (nagy mértékű predikált rendezetlenséggel rendelkezik). A fenti eredmény rávilágított annak lehetőségére, hogy bizonyos fehérjék kettős chaperone funkcióval rendelkezhetnek.

III. Célkitűzés

Vizsgálataim célja a rendezetlen fehérjék szerkezeti és funkcionális vizsgálata. Ezen belül disszertációm hat rendezetlen fehérje, ezek közül két növényi stresszfehérje (ERD10 és ERD14, *Arabidopsis thaliana*), és négy riboszómális fehérje (L15, L16, 18, 19, *Escherichia coli*) vizsgálatáról szól. A két növényi stresszfehérje a dehidrinek családjába tartozik, amelyeknek rendezetlensége mindeztáig még nem lett részletesen bizonyítva. A riboszómális fehérjék szerkezeti rendezetlensége azonban már ismert tény. Munkám első célkitűzése a két dehidrin fehérje szerkezeti rendezetlenségének részletes vizsgálata, és azok membránkötésének felderítése. A két fehérjecsalád megváltozott viselkedést mutat stressz körülmények között, azonban azok pontos funkciója eddig még nincs felderítve. Feltételezések alapján ez a funkció más fehérjék védelme, azaz chaperone aktivitás is lehet. Munkám második célkitűzése a hat kiválasztott fehérje chaperone aktivitásának vizsgálata, azaz azok funkcionális vizsgálata volt, *in vitro* körülmények között. A két fehérjecsalád chaperone aktivitásának vizsgálata lehetőséget nyújt arra, hogy azok stressz körülmények között játszott szerepét mélyebb összefüggéseikben is meg lehessen érteni.

IV. Anyagok és módszerek

IV.1 Vizsgált fehérjék előállítás

A vizsgálni kívánt fehérjéket rekombináns úton, génexpresszióval állítottam elő. Az ehhez szükséges expressziós vektorokat a riboszómális fehérjék (L15: P66072, L16: P02414, L18: P0C020, L19: P0A7K8) esetében Dr. Renee Schroeder (Max Perutz Laboratories, Institute of Microbiology and Genetics, Bécs, Ausztria) bocsátotta rendelkezésemre (pET24b vektorban), míg az ERD10 (NP_564114) és ERD14 (NP_177745) (továbbiakban ERDk) expressziós vektorokat laboratóriumunkban állítottam elő. A chaperone mérésekhez használt Hsp90 kontroll fehérjét, szintén rekombináns génexpresszióval állítottam elő. Az Hsp90 (P11501.3) expressziós vektort (pMAL expressziós vektor) Dr. Sőti Csaba (Semmelweis Orvostudományi Egyetem, Orvosi Biokémiai Intézet) bocsátotta rendelkezésemre.

IV.1.1 ERDk expressziós vektorainak előállítása

Az ERDk-et kódoló DNS szekvenciákat egyik elérhető cDNS könyvtárból sem sikerült amplifikálnom, ezért először a teljes gént izoláltam genomiális DNS-ből, majd a kódoló szakaszt a 2 -2 exon amplifikációjával és összekapcsolásával állítottam elő PCR-es eljárással.

IV.1.1.1 cDNS előállítása

A genomiális DNS-t, az irodalomban leírt eljárás alapján izoláltam, *Arabidopsis thaliana* magvakból (Sambrook et al. 1989). A magvakat egy éjszakán át duzzasztottam +4°C-on ioncserélt vízben, majd lízis pufferben vittem át (10mM TRIS, 1M EDTA, 20 µg/ml RNáz, 0,5% SDS, pH 8,0). A feltárást fizikai eljárással végeztem, amit követően a fehérjéket 100 µg/ml végkoncentrációjú proteináz K hozzáadásával távolítottam el (3 óra, 50°C). Az oldatot centrifugáltam, és a felülúszót háromszor extraháltam fenollal (pH 8,0, TRIS-el egyensúlyba hozott fenol), 10 perces inkubációs lépésekkel. Az utolsó extrakciós lépés után a DNS-t 0,2 térfogat 10 M ammónium-acetát (pH = 8,2), és 2 térfogat 96% etanol hozzáadásával szobahőfokon kicsapattam, centrifugálással ülepítettem és 70%-os etanollal mostam.

A gének a két exonon kívül egy intront is tartalmaznak (amelyek pontos helyét, és az exon-intron határokat BLAST kereséssel határoztam meg). Az ezekből az adatokból tervezett

gélelektroforézissel ellenőriztem, a koncentrációt specifikus DNS létrával (GIBCO) határoz-
tam meg.

Az exonokat speciális primerrel amplifikáltam, amelyek az exonok belső feléhez
annellálódtak. Ezek a primerek felerész az egyik, felerész a másik exon belső terminális ré-
széhez annellálódnak, amely az exonok későbbi összekapcsolásához szükséges. A belső pri-
mereket a két szélső primerrel használtam párban (ERD10/14_F és R).

ERD10_endo_F: CCAACAGCTCTTCTCTCT TCGAGTGATGAAGAAGGTGAAG

ERD10_endo_R: CTTACCTTCTCATCACTCGA AGAGGAAGAAGAGCTGTTGG

ERD14_endo_F: CGAAGCGACAGTTCTTCTAGCTCC TCAAGTGAGGAAGAAGGTTGAGATGG

ERD14_endo_R: CCATCTGAACCTTCTTCTCACTTGA GGAGCTAGAAGAACTGTCGCTTCG

(piros: 1. exonhoz annellálódó rész, zöld: 2. exonhoz annellálódó rész)

Exonok amplifikációjához használt reakcióelegyek és a reakció paramétereit:

<u>Exon1:</u>	<u>Exon2:</u>	<u>Hőmérséklet program:</u>
• 1 Unit PFU polimeráz	• 1 Unit PFU polimeráz	2x 94°C 3p
• 5 µl PFU puffer	• 5 µl PFU puffer	57°C 30mp
• 0,5 mM dNTP	• 0,5 mM dNTP	72°C 2p 30mp
• 0,3 µM ERD10/14_endo_R	• 0,3 µM ERD10/14_endo_F	33x 94°C 15mp
• 0,3 µM ERD10/14_F	• 0,3 µM ERD10/14_R	62°C 30mp
• 1 µl gén	• 1 µl gén	72°C 2p 30mp
V = 50 µl	V = 50 µl	1x 72°C 5p

A termékeket *NE kit*-tel tisztítottam, majd koncentrációjukat és tisztaságukat agaróz
gélelektroforézissel határozta meg. Az exonokat ezután 1:1 molarányban kevertem össze
és az alábbi hőmérséklet programmal kapcsolta. A teljes kódoló szakaszt ezután ugyanab-
ban a reakcióegyben a szélső primerek hozzáadásával amplifikáltam:

• 0,5 Unit PFU polimeráz	1x	94°C 2p
• 2 µl PFU puffer	6x	94°C 30mp
• 0,3 mM dNTP		53°C 1p
• 100 ng Exon1		72°C 40s
• 100 ng Exon2		
V = 20 ml		
+ 0,3 µM ERD10/14_F	25x	94°C 20mp
+ 0,3 µM ERD10/14_R		63°C 30mp
		72°C 1p
	1x	72°C 5p

A terméket *NE kit*-tel tisztítottam, majd meghatároztam a tisztaságát és koncentrációját (70 ng/μl és 80 ng/μl).

IV.1.1.2 cDNS ligálása vektorba

A fentiekben előállított cDNS-t *pET22b (Novagene)* expressziós vektorba ligáltam. A vektor Ampicillin (Carbenicillin) rezisztenciát hordoz, illetve C-terminális His-taggal látja el a expresszált fehérjét. A ligálás első lépése az emésztés, amely olyan helyspecifikus restriktációs enzimmel történik, mely nem hasít a cDNS kódoló régiójában, illetve a vektorban is csak klónozás során beépített terminális hasító helyeket emészt.

A cDNS és a vektor emésztését 3 órán át végeztem, Not1, Nde1 enzimekkel az alábbi körülmények között:

- | | |
|------------------------|-----------------|
| • 2,5 μg ERD10/14 cDNS | • 2,5 μg pET22b |
| • 5 μl puffer | • 5 ml puffer |
| • 20 mg/ml BSA | • 20 mg/ml BSA |
| • 1 Unit Not1 | • 1 Unit Not1 |
| • 1 Unit Nde1 | • 1 Unit Nde1 |
| V = 50 μl | V = 50 ml |

Az emésztési reakcióelegyet agaróz gélelektroforézissel választottam szét, a várt tömegnél megjelenő sávot szikével kivágtam, és az emésztett vektort, illetve cDNS-t *NE kit*-tel nyertem ki az agaróz gélből.

Ligálás Quick Ligation (QL) enzimmel:

- | | |
|--------------------------|-----------------------------|
| • 25 ng pET22b vektor | |
| • 60 ng ERD10/14 inszert | |
| • V = 9 ml | 65°C, 2p, majd hűtés 0°C-ra |
| <hr/> | |
| + • 10 μl QL puffer | |
| • 1 Unit QL enzim | 5p szobahőmérsékleten |
| <hr/> | |

Kísérleteim a His-tag nagy töltöttsége miatt hibás eredményeket adott volna, ezért azokat mutagenzissel eltávolítottam. Ennek az eljárásnak a pontos menetét itt nem ismertetem.

IV.1.1.3 Plazmid szelekció

Mivel az emésztés-ligálás nem kvantitatív, ezért szélesztéssel szelektáltam a plazmidokat, majd PCR-rel ellenőriztem az inszert jelenlétét.

A vektort hősokk alkalmazásával transzformáltam XL1blue kompetens sejtbe:

- 10 µl ligálási reakcióelegy
- 100 µl kompetens sejt
- 30 perc jégen
- 2 perc, 42°C
- 100 µl NZYM tápoldat hozzáadása, 1 h, 37°C

A baktérium-kultúrát Carbenicillint tartalmazó szilárd táptalajon szélesztettem 37°C-on, egy éjszakán át. A másnapra kialakuló, elkülönült telepeket az ERDk cDNS-ére szűrtem PCR-rel. Majd egy inszertre pozitív telepből izoláltam a vektort Nucleospin Plasmid kit-tel. A plazmidot kicsaptam, és az inszertet szekvenálással ellenőriztem (MWG Biotech AG.)

- 2,5 µg plazmid
- 80 µl 96%-os EtOH, 4 µl 3 M NH₄Ac, pH 8,2 hozzáadása
- 30 perc, -20°C
- centrifugálás 30 perc, 13000rpm, 4°C, felülúszó eltávolítása
- mosás 70%-os EtOH, centrifugálás 10 perc, 13000 rpm 4°C, felülúszó eltávolítása
- szárítás 10 p-ig steril boxban

A szekvenálás eredménye megegyezet az adatbázisban található szekvenciákkal.

IV.1.2 Fehérje expresszió és tisztítás

IV.1.2.1 ERDk expressziója

A fent izolált expressziós vektorokat tiszta formájukban BL21 (DE3) sejtekbe transzformáltam, és az expressziót 500ml-es NZYM tápoldatban végeztem, az alábbi lépésekben:

- Növesztés 37°C-on A_{600nm} = 0,6-ig
- Indukció 0,5 mM isopropyl-b-D-thiogalactopyranoside-vel (IPTG) 3 órán át, 37°C-on
- Centrifugálással 4000 g, 20 perc, 4°C
- Sejtek átvitele lízis pufferbe (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 1mM EDTA, 1 mM fenilmetil szulfonil fluorid, 2 mM benzamidin, 5 mM merkaptóetanol, pH 7,5)
- Szonikálás 6x15 s, 30 s-os szünetekkel, jégen
- Centrifugálás 15000 g, 30 perc, 4°C

A felülúszót ezután hőfrakcionálásnak vettem alá, 5 percig 100°C-on. A kicsapódott fehérjekelet és az oldatban maradt egyéb törmelékelt centrifugálásal eltávolítottam (100.000 g, 30 perc, 4°C).

IV.1.2.2 ERDK tisztítása

A tisztítás két lépésben kationcserélő-, és anioncserélő állófázison történt. A fehérje oldatot első lépésben puffer B-be (50 mM Ac⁻, 1 mM EDTA, pH 5) dializáltam át, majd a teljes mennyiséget 7 cm³ térfogatú CM-Sepharose (Pharmacia) kationcserélő oszlopra vittem fel.

Tisztítási lépések:

- Mosás 2 x 5 ml puffer B-vel
- Gradiens elúció 50 – 500 mM NaCl puffer B-ben.
- Frakcionálás: 2 ml-es frakciók gyűjtése
- Frakciók vizsgálata 12,5%-os SDS-PAGE futtatással

Az ERDK fehérjékénél a tisztítási lépésnél nem, a szennyezések azonban kikötöttek az oszlopra. Az áteső és a mosó frakciókat összegyűjtöttem, és átdializáltam a következő tisztítási módszerben használt puffer A-ba (50 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7,5). A fehérjemintát 7 ml-es DEAE-Cellulose (Pharmacia) oszlopra vittem fel. A tisztítási lépések az előző módszerrel megegyező lépésekben zajlott. Elúció után a fehérjét tartalmazó frakciókat egybegyűjtöttem, átdializáltam 50 mM NH₄Cl, pH 7 pufferbebe és liofilizáltam.

IV.1.2.3 Riboszómális fehérjék expressziója

Dr. Renee Schroeder laboratóriumából kapott expressziós vektorokat módosítás nélkül használtam fel a fehérje expresszió során. Négy *E.coli* riboszómális fehérje expressziója és tisztítása az irodalomban közölteknek megfelelően (Semrad et al. 2004) történt meg (L15, L16, L18 és L19). Mind a négy fehérje expresszióját BL21(DE) sejtekben végeztem 4 órás indukcióval 0,5 mM IPTG mellett 30°C-on. A sejteket ezután 20 mM Tris, 1 M KCl, 6 mM merkaptotanol, pH 7 pufferbe vittem át. A sejtek feltárása szonikálásal történt, 6 x 10 s szonikálás, 30 s szünetekkel. Az L16, L18 és L19 esetében az üledéket feloldottam PFB puf-

ferben (20 mM Tris, 6 M UREA, pH 8) és egy éjszakán át dializáltam PFB pufferrel szemben, míg L15 esetében a feltárás után a felülúszót közvetlenül dializáltam PFB pufferrel szemben.

IV.1.2.4 Riboszómális fehérjék tisztítása

A fehérjéket ezt követően egyenként 10 cm^3 -es Sp-Sepharose (GE Healthcare) oszlopon tisztítottam, 20-1000 mM KCl gradiens elúcióval, amit szükség esetén ugyanilyen összetételű pH 9,5 pufferben megismételtem. A frakciókat és a fehérje tisztaságát 15% UREA-SDS-PAGE gélelektroforézissel ellenőriztem. A fehérjéket -, tárolási pufferbe (20 mM Tris, 4 mM MgAc₂, 400 mM NH₄Cl, 0,2 mM EDTA, 5 mM mercaptoethanol, pH 7,4) dializálva 20°C-on tároltam a későbbi felhasználásig.

IV.1.2.5 Hsp90 expressziója és tisztítása

A rendelkezésemre bocsátott csirke Hsp90/pMAL konstrukciót BL21 star sejtekben transzformálva fejeztettem ki, 30°C -on 0,5 mM IPTG koncentráció mellett. A sejteket lízis pufferbe (20 mM Tris, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 7,5) szuszpendáltattam, és 6x10 s-os szonikálási lépésekkel tártam fel, jégen. Ezt követően a csapadékot eltávolítottam, és a felülúszót 3 ml térfogatú amilóz gyantára (Sigma) vittem fel. Három mosási lépés után (lízis pufferrel), 10 mM koncentrációjú maltózzal eluáltam. A mosó frakciókat illetve az elúciós frakciókat 12,5%-os SDS-PAGE gélelektroforézissel ellenőriztem. A fehérjét tartalmazó frakciókat egyesítettem, és puffer A-ba (50 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7,5) dializáltam át. A Hsp90-hez fúzionált maltóz kötő fehérjét proteolízissel hasítottam le, 0,5 Unit / ml végkoncentrációjú Factor Xa-val, 24 óra alatt. Az emésztés végén az elegyet 7 ml-es DEAE cellulóz oszlopra vittem fel, és 0 – 500 mM NaCl gradienssel eluáltam. A frakciókat 12,5% -os SDS PAGE gélelektroforézissel vizsgáltam és a Hsp90-t tartalmazó frakciókat tároló pufferbe (15 mM NaH₂PO₃, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,5 mM, 2 mM benzamidin, 0,1 mM fenilmetil szulfonil fluorid, pH=7,5) dializáltam át, és -80°C-on tároltam.

IV.2 Biofizikai vizsgálatok

IV.2.1 Rendezetlenség *in silico* predikciója

Az *in silico* jóslást két szabadon elérhető predikciós algoritmussal végeztem el: IUPred (Dosztanyi et al. 2005) (<http://www.enzim.hu/iupred>), és PONDR VL-XT (Romero et al. 2004)

(<http://www.pondr.com>). Az IUPred páros aminosav-aminosav kölcsönhatási energiákat becslül a szekvencia teljes hosszában egy-egy aminosavhoz rendelve. Ebből becslülhető, hogy az adott régió milyen valószínűséggel alakít ki intermolkeuláris kölcsönhatást. A PONDR tanított neurális hálózat elven működő prediktor. A predikció kettő adathalmazra épül (egy rendezetlen, és egy globuláris adathalmaz), amelyek alapján olyan paramétereket határoz meg, ami alapján a két adathalmaz elkülöníthető egymástól. Ezután ezeket a paramétereket használja fel egy ismeretlen szekvencia a rendezetlenségének a becslésére. A predikciót minden esetben a teljes aminosav szekvenciákkal végeztem, az interneten található alapbeállításokkal.

IV.2.2 Hőstabilitás vizsgálat

Két rendezetlen (ERD10, ERD14) és két globuláris fehérjét (BSA, ovalbumin) – mint kontrollt – használtam fel a kísérlet során. A fehérje oldatokat 5 p-ig 100°C-os vízfürdőbe raktam, majd centrifugálás (20000g, 10p) után 12,5% SDS PAGE-n vizsgáltam ($C_{ERD10} = 0,2$ mg/ml, $C_{HCD1} = 0,3$ mg/ml, $C_{BSA} = 0,1$ mg/ml, $C_{Ovib.} = 0,25$ mg/ml).

IV.2.3 CD és ¹H-NMR spektroszkópia

A cirkuláris dikroizmus vizsgálatokat pufferes (10 mM Na₂HPO₄, pH 7,5) és emelkedő trifluoro-ethanol-os közegekben (0–100% TFE) végeztem. A méréseket Jasco J-720 spektropolariméteren, termosztált (25°C) közegben végeztem el.

Spektrumfelvételek paraméterei:

- Felvétel tartománya: 190 – 260 nm
- Felbontás: 1 nm
- Mérési sebesség: 50 nm/min
- Spektrum átlagolás: 9
- Válaszidő: 2 s
- Sáv szélesség: 1 nm
- Érzékenység: 10 mdeg

Az ¹H-NMR spektrumot Dr. Perczel András laboratóriumában, 25°C-on Millipore vízben vettük fel, Bruker DRX 500-MHz spektrométerrel, 1 mM koncentrációban. A liofilizált fehérje mintát H₂O:D₂O (9:1, v/v)-ban oldottam fel, majd centrifugálást követően azonnal felvettük a

spektrumokat. Az oldószer 2,2-Dimethyl-2-silapentane-5-sulfonic acid-ot (DSS) tartalmazott, mint skála-referencia vegyület.

IV.2.4 Limitált proteolízis

ERDk és BSA limitált proteolízis vizsgálatát négy különböző proteázzal, szubtilizinnel és proteináz K-val (széles specificitás) illetve tripszinnel és kimotripszinnel (szűk specificitás) végeztem el. A fehérjék koncentrációja minden esetben 0,5 mg/ml volt, amihez 1:50 arányban adtam a fent felsorolt proteázokból egyet és az emésztést 30 s-ig végeztem, 30°C-on. Az emésztést SDS-PAGE mintapufferrel (SDS, DTE) és forralással állítottam le. Az emésztést alacsonyabb proteáz koncentrációk mellett is megismételtem (1:250, 1:600, 1:900, 1:1500), amelyek során az emésztési idő egységesen 30 s volt.

Az emésztést foszfolipid vezikula jelenlétében is megismételtem, 0,5 mg/ml ERD10 ill. ERD14, 500 µg/ml foszfolipidből készített vezikula mellett. Az emésztést 1:9000 arányban hozzáadott subtilisinnel végeztem, 30°C-on. Az alábbi időpontokban vettem mintát (0 perc, 30 s, 1 perc, 2 perc, 5 perc, 10 perc, 15 perc), a reakciót SDS-PAGE mintaoldattal és 3 perc forralással állítottam le.

IV.2.5 Relaxációs NMR vizsgálatok, hidrátburok méretének meghatározása

A vizsgált ERD10, ERD14 és BSA fehérjéket 20 mM Tris, 150 mM NaCl, 1mM EDTA, pH 7,5 pufferban oldottam fel 25 mg/ml koncentrációban. Az NMR méréseket az MTA Szilárdtestfizikai és Optikai Kutató Intézetében, Tompa Kálmán laboratóriumában végeztük, Bruker SXP 4-100 készüléken 210 - 298K hőmérséklet tartományban. A fehérje hidrátburokának jellemzésére a szabad precessziós FID t=0 időpontra extrapolált intenzitását határoztuk meg, ami a puffer és fehérje együttes hidrátburok nagyságával arányos (azaz a folyékony víz mennyiségével). Az így kapott hidrátburok nagyságot a pufferből adódó hidrátburok nagyságával korrigáltam, és víz mennyiségét molárisan, a fehérje méretére kifejezve adtam meg.

IV.2.6 Membrán-kötés vizsgálata gélfiltrációval

A membránkötés vizsgálatot egy az irodalomban leírt eljárás alapján végeztem el (Tompa et al. 2001). Az vizsgálat során az ERD10, ERD14 és foszfatidilszerin(PS) :

foszfatidilkolin(PC) (1 : 1, m/m) arányú elegyből készített foszfolipid vezikulák közötti kötődést vizsgáltam. A vezikulákat (PLV) 500 µg/ml koncentrációjú lipid szuszpenzióból állítottam elő 4x10 s szonikálással, jégen. Ezután a centrifugálással (15000 g, 10 p) eltávolítottam a nagy asszociátumokat, és a mintát további felhasználásig jégen tartottam. A vizsgálatokat az alábbi elegyek felhasználásával végeztem el: 1) 0,5 mg/ml ERDk fehérje; 2) 0,5 mg/ml ERDk + 100 µM CaCl₂; 3) 0,5mg/ml fehérje + 250 µg/ml PLV; 4) 0,5 mg/ml fehérje + 250 µg/ml PLV + 100 µM CaCl₂ (a kísérleteket minden esetben 50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,5 alappufferben végeztem). A fenti mintákat elkészítésük után 5 percig jégen inkubáltam, majd előre ekvibrált 0,5 cm³ Sephadex G200 (Pharmacia) gélfiltráló oszlopokra vittem fel, 20 µl-t. A mintafelvitel után az oszlopokat azonnal egy lengőrotoros centrifugába helyeztem, és 200 g-n centrifugáltam 1 percig, 4°C-on. Az átfolyt mintát ezután 12,5% SDS-PAGE gélelektroforézissel vizsgáltam, a kiértékelést Quantity One (BioRad) programmal végeztem el.

IV.2.7 Membrán fluiditás vizsgálat fluoreszcencia anizotrópia méréssel

Az ERDk a vezikulák viszkozitására gyakorolt hatását fluoreszcencia anizotrópia méréssel vizsgáltam meg, az MTA SzBK Biokémiai tanszéken, Prof. Vígh László laboratóriumában, Dr. Török Zsolt segítségével. A kísérleteket az irodalomban leírtakhoz hasonlóan végeztük (Torok et al. 1997). A vizsgálat során egy fluoreszcens molekula (1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene (DPH)) mozgási sebességét határozzuk meg a kettősrétegen belül, amely közvetlen információt ad a lipid kettősréteg viszkozitásáról/fluiditásáról. A DPH-t tartalmazó vezikulát a szuszpenzió 10x-i lefagyasztásával állítottuk elő, amit egy extrudálási lépés követett Liposofast extruderrel (Avestin) (Mayer et al. 1986). Ezzel az eljárással nagy méretű egyrétegű vezikulákat állítottunk elő. Az anizotrópia hőmérsékletfüggését fehérjével és fehérje nélkül csak a vezikulára is meghatároztuk, ami lehetővé tette a kvantifikációt is. A kísérleteket 40 µg/ml foszfolipid koncentráció mellett, 10 – 200 µg/ml közötti ERDk koncentrációval végeztük.

IV.3 Chaperone aktivitás meghatározása

IV.3.1 Alkohol dehidrogenáz hőindukált aktivitásvesztés

Az alkohol dehidrogenáz (ADH, Sigma) aktivitásának csökkenését 43°C-on vizsgáltam, az enzimaktivitás csökkenését 10p-kénti mintavételezéssel követtem a természetes szubsztrátjaival lazajló reakció meghatározásával. 2 µM ADH-t pufferelt közegben (100 mM Na₂HPO₄, 100 mM NaCl, pH 8,8) 5 perces, 0°C-os preinkubálás után 43°C-on tartottam 1 h-n keresztül. Az enzimaktivitást 10 percenként határoztam meg, JASCO UV-550 spektrofotométerben, szobahőmérsékleten, 100 mM Na₂HPO₄, 100 mM NaCl, 1,25 mM EtOH, 2 mM NAD⁺, pH 7,5 pufferben (600 µl), 20 µl ADH oldat hozzáadásával. A relatív enzimaktivitást az A_{340nm} mért meredekség és a 0 időpontban mért meredekség hányadosaként határoztam meg százalékos értékben. A chaperone aktivitást 1 - 10 µM ERD10, ERD14, vagy 1 µM L15, L16, L18 vagy L19 mellett határoztam meg. Kontrollméréseket 1 µM Hsp90-el és 1 µM BSA-val, azonos körülmények között végeztem el.

IV.3.2 Lizozim kémiai indukált aktivitásvesztés

A lizozim-ban (csirketojás) lévő diszulfid hidakat dithiothreitol-al (DTT, Sigma) redukáltam, ami a fehérje aktív konformációjának elvesztését és egyben az enzim aktivitásának csökkenését eredményezte. 34 µM lizozim önmagában vagy 5 µM ERD10, 5 µM ERD14, 1 - 1 µM valamelyik riboszomális fehérje (L15, L16, L18, L19), 5 µM HSP90, vagy 5 µM BSA jelenlétében inkubáltam 50 mM Tris, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 20 mM DTT, pH 7,5 pufferben, 40°C-on. Az enzimaktivitás csökkenését 5 percenként határoztam meg 0,1 mg/ml *Micrococcus lysodecticus* sejtfaleszuszpenzióban (Sigma), 20 mM NaH₂PO₄, pH 7,0 pufferben 25°C-on, 20 ml minta hozzáadásával. A méréseket JASCO FP-6300 spektrofluoriméterrel, 450 nm emissziós és extinkciós hullámhosszon végeztem. A relatív enzim aktivitást minden mérésnél t = 0 időpontra vonatkoztatva, százalékos értékben adtam meg.

IV.3.3 Luciferáz hőindukált aggregációja

A luciferáz (szentjánosbogár, Sigma) hőindukált aggregációját termosztálható küvetta tartóval rendelkező fotométerben vizsgáltam (JASCO UV-550 spektrofotométer), folyamatosan követve a minta A_{400nm} változását. Az aggregációt 50 mM Tris, pH 7,5 pufferben

1 μM luciferáz koncentrációjánál önmagában, illetve 2 μM ERD10, 2 μM ERD14, 2 μM BSA vagy 2 μM Hsp90 jelenlétében vizsgáltam, 42°C-on. Minden mintát 5 p-ig preinkubáltam jégen a kísérlet megkezdése előtt.

IV.3.4 Citrát szintáz hőindukált aggregációja

Citrát szintáz (disznó szív, Sigma) hőindukált aggregációjának vizsgálata technikai szempontból megegyezett a luciferázzal végzett kísérlettel. A kísérleti körülmények az alábbi pontokban tértek el: a felhasznált puffer 50 mM Tris, 100 mM NaCl, pH 7,5, továbbá a fehérje koncentrációk 0,5 μM citrát szintáz, 0,5 μM BSA, 0,5 μM HSP90, 0,5 - 2 μM ERD10 vagy ERD14.

IV.3.5 Teljesen denaturált lizozim reaktiválása

A kísérletet az irodalomban leírtak szerint végeztem (van den Berg et al. 1999; Kim et al. 2002), módosításokkal. Csirketojás lizozim 6M GuHCl, 100 mM Tris, 1 mM EDTA, 10 mg/ml DTT, pH 8,5 pufferben 40°C-on 3 h-n át inkubáltam a teljesen denaturált állapot eléréséig. A kicsapódott fehérjét centrifugálással (15000 g, 20 perc, 4°C) izoláltam és 10 ml Millipore vízzel mostam. Az aggregátumot ezután 5 ml hangyasavban (pH 2) oldottam fel, és 10 mM HCl-el szemben dializáltam, majd liofilizáltam.

A kísérlethez 6 mg/ml koncentrációjú denaturált lizozim törzsoldatot készítettem, 8M UREA-ban. A reaktivációt a törzsoldat reaktiváló pufferrel történő gyors hígításával indítottam, az így előálló pufferben (2 M UREA, 100 mM Tris, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.5 mM redukált glutation (GSH), 0.1 mM oxidált glutation (GSSG), pH 8.5 és 20 °C), amiben a reaktiváció azonnal megindult. A reaktiváció előrehaladását az enzim pillanatnyi aktivitásának meghatározásával követtem minden 10 percben, 0,1 mg/ml koncentrációjú *Micrococcus lysodeicticus* sejtfa szuszpenzió bontási sebességének meghatározásával (20 mM NaH_2PO_4 , pH 7, V= 1 mL + 16 μL minta, 25°C, 450nm). Mindegyik mérési pontnál a natív lizozim enzim aktivitásához viszonyított relatív enzimaktivitást számoltam. A natív és a denaturált lizozim közötti koncentráció különbséget $A_{280\text{nm}}$ meghatározásával határoztam meg, amit a „K” korrekciós faktoral korrigáltam:

$$\frac{A_{denat}^{280nm}}{A_{nativ}^{280nm} \times \frac{\epsilon_{denat}^{1\%}}{\epsilon_{nativ}^{1\%}}} = K, \epsilon_{nativ}=26,3, \epsilon_{denat}=23,7$$

Az alábbi koncentrációkban használtam a szubsztrát, chaperone és kontroll fehérjéket: A lizozim koncentrációja minden mérés esetén 49 μM volt, a hozzáadott fehérjék rendre 34 μM ERD10, 34 μM ERD14, 20-20 μM riboszomális fehérje (L15, L16, L18, L19), 1,1 μM HSP90, vagy 15 μM BSA.

(Wissmann et al. 1999), azt feltételeznék, hogy funkcionálisan eltérnek egymástól. Erre eddig még sem az irodalomban, sem munkám során nem találtam utalást. Az ERDk három különböző szegmensből épülnek fel (szegmensek leírását részletesen lásd a II.3.4 fejezetben):

- Chp-1 szegmens: nagy hasonlóságot mutat az eukarióta hősokkfehérje (Hsp90) töltött linker régiójával;
- S szegmens: Ser gazdag foszforilációs hely;
- K szegmens: Lys gazdag erősen konzervált régió, amely feltételezések szerint a dehdrinek membránnal kialakított kölcsönhatásáért felelős.

Az ERDk aminosav összetétele rendezetlen jellegre utal, amire a töltött aminosavak magas gyakoriságából, és az apoláris aminosavak alacsony előfordulásából következtethetünk (4. táblázat).

	ERD10	ERD14
Ala (A)	3.5%	4.9%
Arg (R)	1.2%	1.6%
Asn (N)	1.9%	0.5%
Asp (D)	5.4%	3.8%
Cys (C)	0.0%	0.0%
Gln (Q)	2.7%	1.1%
Glu (E)	19.6%	21.1%
Gly (G)	5.0%	4.9%
His (H)	4.2%	3.2%
Ile (I)	3.1%	2.7%
Leu (L)	4.6%	4.9%
Lys (K)	16.2%	18.4%
Met (M)	2.3%	1.1%
Phe (F)	2.7%	2.2%
Pro (P)	7.3%	8.6%
Ser (S)	6.9%	8.1%
Thr (T)	6.5%	4.3%
Trp (W)	0.0%	0.0%
Tyr (Y)	0.8%	0.5%
Val (V)	6.2%	8.1%

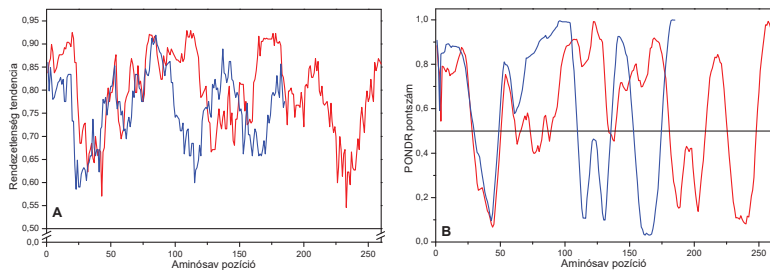
4. táblázat ERDk aminosav összetétele

Az aminosav összetétel „Expasy” szerveren található „protparam” programmal számítottam. A nagy százalékban jelen lévő E és K aminosavak, illetve a kis mennyiségben előforduló apoláris aminosavak rendezetlen jellegre utalnak (összehasonlítva : 1. táblázat)

A apoláris aminosavak hiánya nem teszi lehetővé a kompakt stabil fehérje mag kialakulását (II.2.2. fejezet). Továbbá a magas prolin arány a másodlagos szerkezetek hosszú távú kialakulását is gátolja. Természetesen ennek szerkezetvizsgáló módszerekkel történő igazolása is szükséges, amit későbbiekben mutatok be.

V.1.1 Rendezetlenség *in silico* predikciója

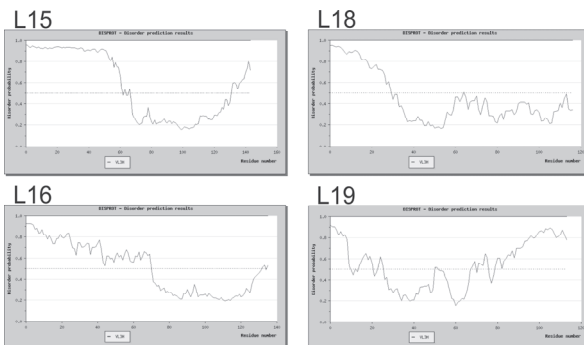
A fehérjék rendezetlenség jellegzetes aminosav-összetételből adódik, ami felhasználható a rendezetlenség jóslására. Napjainkig számos különböző elven alapuló jósló algoritmus érhető el az interneten. Az ERDk fehérjék predikciója a 7. ábrán látható, ahol az IUPred 100%-os, a PONDR ~70%-os rendezetlenséget jóslott. Minkét algoritmus rendezetlenségi valószínűséget ad meg, aminek küszöb értéke: 0,5. E fölötti értékek a rendezetlen régiókat, ez alatti a szerkezettel rendelkező régiókat jelölik.



7. ábra Rendezetlenség jóslása

Az IUPred predikció (A) a fehérje teljes hosszában rendezetlennek (0,5<) jóslta mind az ERD10 (→), mind az ERD14 (→). A PONDR algoritmus ellenben az általános rendezetlenségen felül lokális szerkezettel rendelkező régiókat jóslott mindkét fehérje esetében.

A PONDR a magas fokú rendezetlenségen kívül lokális szerkezettel rendelkező régiókat is jóslott, úgynevezett „preformed element”-eket (Fuxreiter et al. 2004), amelyek eddigi elképzelések szerint a molekuláris kölcsönhatások kialakításában játszanak fontos szerepet. Ezeket a régiókat az 6. ábrán a szekvencián is ábrázoltam, ahol látható, hogy ezek a régiók a K szegmensekkel fednek át



8. ábra Riboszómális fehérjék predikciója

A fenti ábra a riboszómális fehérjék Ponder algoritmusmal elvégzett predikcióját mutatják, a vektorban szereplő szekvenciák felhasználásával (megegyező az NCBI adatbázisban található szekvenciákkal)

A riboszómális fehérjék predikciója főképp a fehérjék N-terminális végét predikálják rendezetlennek, ahogy azt az eddigi irodalmi eredmények is mutatják. A rendezetlenség ezeknél a fehérjéknél ismert és alaposan vizsgált tulajdonság.

V.2 Biofizikai vizsgálatok

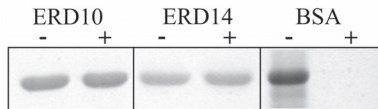
Az ERD10 és ERD14 fehérjék esetén első célom a szerkezeti rendezetlenség igazolása volt, ugyanis munkám kezdetekor erre vonatkozóan még nem állt rendelkezésre kísérleti bizonyíték. Ezért első célkitűzésem a szerkezeti rendezetlenség, és némely a dehidrinek esetében már ismert biofizikai tulajdonság vizsgálata, igazolása volt.

A riboszómális fehérjék - mint az irodalmi áttekintésben részletesen is tárgyalom - a tudományos érdeklődés egyik igen fontos elemét alkotják, mind funkció, mind szerkezet szempontjából. Ennek következtében ezeknek a fehérjéknek a biofizikai jellemzése a szerkezeti jellemzés mellett szintén igen részletesen elérhető az irodalomban, ezért csak a fehérjék funkcionális vizsgálatára szorítkoztam.

V.2.1 ERDk rezisztensek a hőindukált agregációval szemben

A rendezetlen fehérjék túlnyomórészt poláris, töltött aminosavakból épülnek fel, és hiányosak a hidrofób aminosavakra nézve. Ezeknek a tulajdonságoknak köszönhetően a rende-

zetlen fehérjék nagy része rezisztens a hőindukált aggregációval szemben. Megjegyzendő, hogy ez eltér a termofil organizmusokban található hőstabil fehérjék rezisztenciájától, mivel azok aminosav összetétele hasonló a globuláris fehérjékben található aminosav összetételhez. A hőstabilitásuk oka a stabilabb fehérjemag és a felszínen található kiterjedt ionpárhálózatok, amelyek megakadályozzák a fehérje letekeredését, és ezáltal az aggregációját. A rendezetlen fehérjék rezisztenciája, hogy hosszabb ideig tartó forralás hatására sem aggregálnak, sőt lehűtés után továbbra is megőrzik az eredeti biokémiai aktivitásukat.



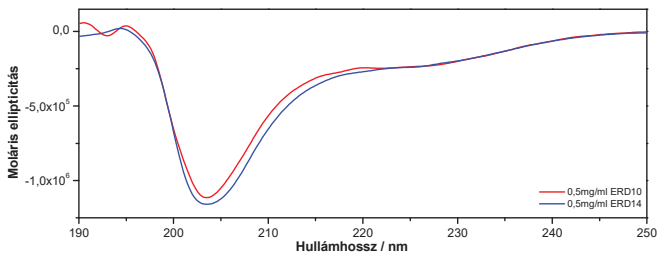
9. ábra Hőstabilitás vizsgálata

A vizsgált fehérjék (ERD10, ERD14 és BSA) 3 p-ig forraltam 100°C-on (+), illetve kontrollként forralás nélkül tartottam (-), majd centrifugálás után SDS PAGE gélelektroforézissel vizsgáltam.

Vizsgálataim során azt tapasztaltam, hogy mindkét fehérje ellenáll a hőindukált aggregációnak (9. ábra). Ezzel ellentétben a kontroll globuláris fehérje (BSA) teljes mértékben kicsapódott, és eltűnt az oldat fázisból. Ez a tulajdonság a rendezetlen fehérjék jellemzője, a felerészben rendezetlen, illetve molten globule szerkezetű fehérjék forralás hatására kicsapódnak.

V.2.2 CD és NMR spektroszkópia

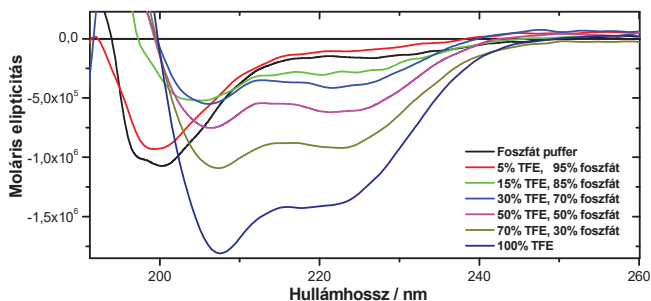
Az ERD10 és ERD14 CD spektruma nagy fokú rendezetlenséget, és egyben nagy mértékű hasonlóságot mutatnak. Mindkét spektrumban nagy negatív csúcs látható 200 nm-nél, ami a denaturált/rendezetlen fehérjék jellemzője (10. ábra). A csúcs enyhe eltolódása 203 nm-hez a nagy jelerősítés miatt történt, ami „levágta” a csúcs maradék részét. A 200nm-es csúcson kívül mindkét esetben látható egy-egy enyhe minimum 222 nm és 208 nm-nél látható váll, ami α -helikális szerkezetekre utaló csúcs-pár.



10. ábra ERD10 és ERD14 cirkuláris dikroizmus spektrumai

A CD spektrum 0,5 mg/ml koncentrációban, 10mM Na₂HPO₄, 100 mM NaCl pufferben, 1 mm-es küvétában, 25°C-on volt felvéve, JASCO J-720 spektropolariméterrel.

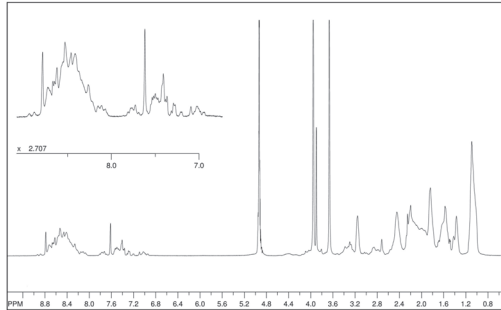
A trifluoro-etanol (TFE) titrálás 15-30% közötti α -helikális átmenetet mutat, ami erős hélix preferenciára utal (11. ábra). Az ábrán az ERD10 titrálása van feltüntetve, az ERD14 hasonló képpen viselkedett.



11. ábra CD spektroszkópia: ERD10 titrálása TFE-vel

A spektrumok 0,5 mg/ml fehérje koncentrációban vettem fel, az ábrán jelölt növekvő koncentrációjú trifluoro-etnaol jelenlétében.

Az ERD10 ¹H-NMR spektrumában (12. ábra), a fehérjéhez tartozó amid csúcsok szűk diszperziós tartományban találhatóak (8,0-8,8 ppm), ami a peptid kötésekben lévő amid csoportok hasonló kémiai környezetre utal. Ez a jelenség néhány kivételtől eltekintve csak a szerkezetüket vesztett fehérjék esetében fordul elő. Ugyanerre utal az 1 ppm-nél található metil csoportokra jellemző csúcs, amelyek jelen esetben egy széles csúcsot alkotnak. Kompakt szerkezettel rendelkező fehérjék esetében ezek a csúcsok szélesebb tartományban oszlanak el és több különálló csúcsra bomlanak a különböző kémiai környezet hatására.

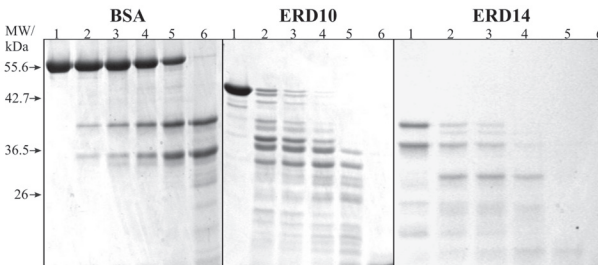


12. ábra ERD10 NMR spektruma

A spektrumot 1 mM ERD10, Millipore vízben, 25°C-on vettük fel, Bruker DRX 500-MHz spektrométerrel, 10% D₂O mellett. Skálareferenciaként DSS-t használtunk.

V.2.3 Limitált proteolízis

A limitált proteolízis közvetlen információt nyújt a fehérjelánc nyitott vagy zárt szerkezetére nézve. A hasítási hely körüli 10 aminosav hosszúságú régió nyitottság, nagy mértékben megnöveli az emésztés gyorsaságát. A vizsgálatot négy különböző specificitással rendelkező proteázzal végeztem el: subtilisin és proteinase K (széles szubsztrát specificitás), illetve tripszin és kimotripszin (szűk szubsztrát specificitás). A proteolízis minden esetben hasonló sebességgel zajlott le, ezért itt csak a proteináz K-val végzett proteolízis vizsgálatot mutatom be (13. ábra).

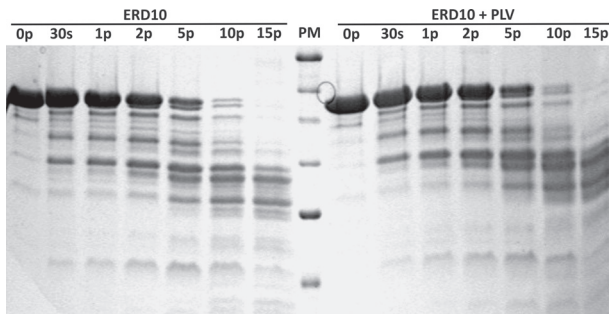


13. ábra ERD10 és ERD14 limitált proteolízise

Az emésztést különböző proteinase K koncentráció mellett végeztem 30 s időtartományban, BSA-val, ERD10-el és ERD14-el. A 1. zseb az emésztés nélküli kontrollmintát, míg a 2-6. az emelkedő proteáz koncentráció mellett végzett proteolízis mintákat mutatják (1:1500, 1:900, 1:500, 1:250, 1:50). Az ábra bal szélén a molekulatömeg létra jelei vannak feltüntetve.

Az ábrán egyértelműen eltér a kontroll globuláris fehérje (BSA) és a két rendezetlen fehérje emésztési sebessége. Ez a vizsgálat bizonyítékot szolgáltat arra nézve, hogy az ERDk fehérjék összes emésztési helye térben könnyen hozzáférhető, mivel a kontroll fehérjével összehasonlítva egy stabil fragmenst sem találtam az emésztés során. Az ERD10 esetében 36 kDa-nál megjelenő kettős sáv sem mutat hosszú távú stabilitást, annak megjelenése proteáz specifitása miatt történik meg, ezért ezt sem tekinthetjük szerkezettel rendelkező régióknak.

Ahogy későbbiekben bemutatom (V.2.5. fejezet) az ERDk kötődnek foszfolipid vezikulákhoz. A rendezetlen fehérjék molekuláris kölcsönhatások kialakítása közben lokálisan rendeződnek, ami a kölcsönhatás idajére stabilan jelen van a kölcsönható régióban. A szerkezet kialakulása és stabilizálódása, változást okozhat a fehérje emésztési mintázatán. Ennek a kérdésnek a vizsgálatára a limitált proteolízist lipidvezikula jelenlétében is elvégeztem (14. ábra).



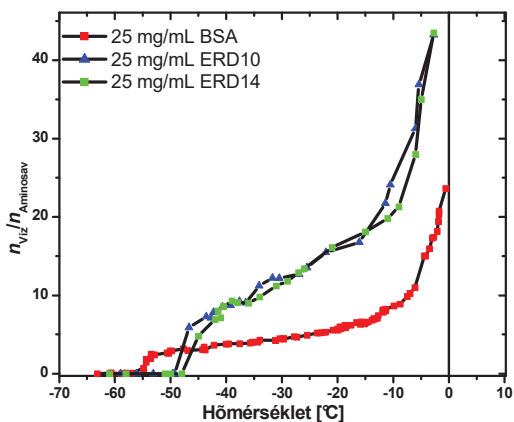
14. ábra Limitált proteolízis vezikula mellett

A vezikula nélkül (ERD10), illetve vezikula melletti (ERD10+PLV) limitált proteolízist 1:9000 arányú szubtilizin mellett végeztem el. A sávok felett látható időközökben vett minta forralás utána gélektroforézissel vizsgáltam. A két rész között található a fehérje marker (PM, felülről: 66.4, 55.6, 42.7, 36.5, 26 és 20 kDa)

A limitált proteolízis során nem látható semmilyen eltérés a két kísérleti körülmény között. Ebből két dologra következtethetünk: 1) egyik hasítási hely sincs a kölcsönhatásban résztvevő régióban, vagy annak közvetlen közelében, vagy 2) nem alakul ki stabil másodlagos szerkezet a fehérjében. A kérdés pontos megválaszolásához szükséges a kölcsönhatás szekvencia-specifikus lokalizációja, ami jelenleg ismert.

V.2.4 Relaxációs NMR vizsgálatok, hidrátburok méretének meghatározása

A szilárdtest NMR méréseket a MTA Szilárdtestfizikai és Optikai Kutató Intézetének végeztük, Tompa Kálmán laboratóriumában. A rendezetlen fehérjékben nagy arányban találhatóak poláris, töltött aminosavak, ami nagy hidrátburokra enged következtetni. A mérés során 25 mg/ml töménységű fehérjeoldatot használtunk, és a csökkenő hőmérsékletek mellett a minta FID (Free Induction Decay) intenzitását határoztuk meg. A FID intenzitás 0 időpontra történő extraplációja, a mintában jelen lévő folyékony víz mennyiségével arányos, ami közvetlen információt ad a mintában lévő molekulák hidrátburokára nézve.



15. ábra ERDk relaxációs NMR vizsgálata

25 mg/ml BSA (■), 25 mg/ml ERD10 (▲) és 25 mg/ml ERD14 (■) folyékony állapotú víz tartalmát határoztuk meg, 0°C alatt. A grafikonon a fehérjekoncentrációra és méretre normált folyékony víz mennyisége van feltüntetve a hőmérséklet függvényében.

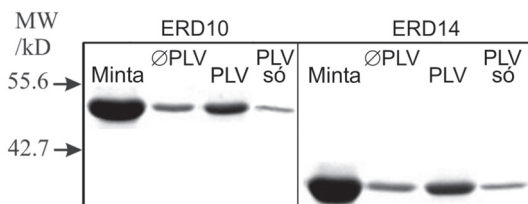
A mérés híven tükrözi a fehérjék várt viselkedését. Az ERD10 és ERD14 sokkal nagyobb hidrátburokkal rendelkezik, a globuláris kontrol (BSA) fehérjéhez képest. A grafikonon látható -2°C - -12°C közötti zuhanás a mobilis gyengén kötött víz kifagyását mutatja, míg az ezután következő régió a fehérje szorosan kötött hidrátburokával hozható összefüggésbe. A két rendezetlen fehérje molárisan 3x több vizet orientál aminosavanként a BSA-hoz képest. Azonban az ERDk hidrátburokának teljes kifagyása magasabb hőmérsékleten (49°C) történik meg

a BSA-hoz képest (58°C), ami arra utal, hogy a rendezetlen fehérjék nem rendelkeznek olyan erősen orientált vízzel, mint a globuláris fehérjék esetében ismert szerkezeti-víz.

V.2.5 Membrán kötés vizsgálata

A dehidrin fehérjékről már számos munkában kimutatták, hogy képesek lipid vezikulákhoz kötődni. Ennek lehetőségét mi is megvizsgáltuk az ERD10 és ERD14 esetében, gélfiltrációs vizsgálatokkal, szintetikus foszfolipid vezikulák felhasználásával. A mérés azon az elven alapul, hogy gélfiltrációs álló fázis visszatartja a szabad fehérjét, míg a lipid vezikulákhoz kötött fehérje átesik az állófázison, mert a vezikula kizáródik a gél pórusaiból.

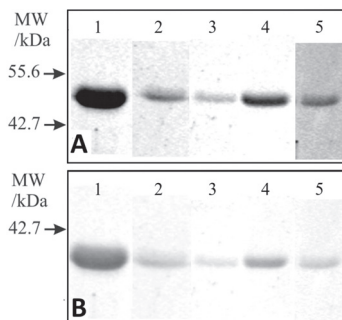
Mivel az ilyen jellegű kölcsönhatások igen erősen függenek a körülményektől, ezért a kísérleteket erősen kontrollált körülmények között hajtottam végre. A vizsgálatok azt mutatták, hogy mind az ERD10, mind az ERD14 kötődik savas jellegű foszfolipidekből álló vezikulákhoz (16. ábra).



16. ábra Kölcsönhatás foszfolipid vezikulával

A fehérje mintákat 5 percig inkubáltam jégen a gélszűrés előtt, a gélen áteső mintát ezután SDS-PAGE-el vizsgáltam. „Minta” a felhasznált fehérje mintát jelöli, gélszűrés nélkül; „∅PLV” foszfolipid nélküli gélszűrt fehérje minta; „PLV” gélszűrt fehérje minta foszfolipid vezikula mellett; „PLV só” foszfolipid vezikula és 500mM NaCl mellett.

Az ábra az ERD10 és ERD14 kötődését reprezentálja foszfolipid vezikulákhoz, amelyben a kötött fehérjét mennyisége a „∅PLV” és „PLV” közötti növekmény. Statisztikai szignifikancia vizsgálatok alapján a két jel szignifikánsan különböző, Student's teszt: $P = 0,003$ (ERD10) és $0,056$ (ERD14). Előzőek alapján az ERD10 és ERD14 Ca^{2+} kötésre is képes. Ennek hatását megvizsgáltuk a vezikula kötésre hasonló kísérleti körülmények között (17. ábra).



17. ábra Ca^{2+} hatása a vezikula kötésre

Az ERD10 (A) és ERD14 (B) gélszűrését vezikula mellett és nélkül is elvégeztem, kalcium jelenlétében és annak hiányában. (1) a gélszűrés nélküli fehérje oldatot jelöli, (2) fehérje, (3) fehérje + Ca^{2+} , (4) fehérje + vezikula, (5) fehérje + vezikula + Ca^{2+} .

Statisztikai szignifikancia számítás alapján a kalcium nem változtatja meg jelentősen az áteső fehérje mennyiségét ($P = 0,24$ és $0,20$), azonban a vezikulához való kötődésben beálló változás szignifikáns ($P = 0,003$ és $0,056$), ami a vezikula kötésben beálló csökkenésére utal. A szignifikancia számítások a Quantity One (BioRad) gélkértékelő program segítségével készültek. A kötődés mértékét a 5. táblázat mutatja százalékos értékben.

	ERD10	ERD14
Minta	100 ± 5,07	100 ± 1,55
Áteső	27,8 ± 7,51	23,01 ± 5,52
+ Ca^{2+}	19,7 ± 6,95	18,39 ± 6,15
+ PLV	60,9 ± 4,34	41,63 ± 8,58
+ PLV; Ca^{2+}	39,0 ± 3,59	31,06 ± 8,32

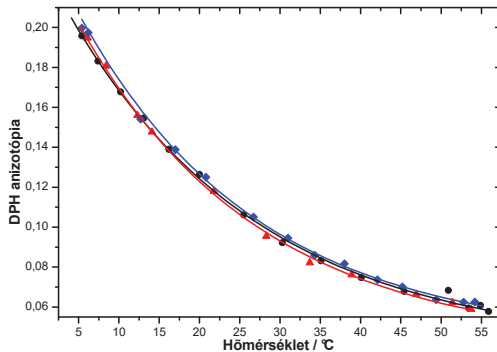
5. táblázat Kalcium hatása a vezikula kötésre

A táblázatban három párhuzamos mérés átlaga és annak standard deviációja van feltüntetve.

V.2.6 ERD fehérjék hatásának vizsgálata a membránfluiditásra

A fenti vizsgálatok igazolták, hogy az ERD10 és ERD14 kötődik savas foszfolipidekből felépülő vezikulákhoz, azonban a kötődés jellegéről, illetve annak a membránra gyakorolt hatásáról nem ad felvilágosítást. Ennek vizsgálatához membránfluiditás vizsgálatokat végeztük az MTA SzBK Biokémiai Intézetében, Prof. Vígh László laboratóriumában, Dr. Török Zsolt

segítségével. A kísérlet során egy hidrofób fluoreszcens molekula mozgékonyágát mértük a vezikulán belül, ERDk jelenlétében illetve azok hiányában. A mozgékonyágban bekövetkező változás a membrán fluiditásának megváltozására utal. Korábbi vizsgálatok arra utalnak, hogy a membránfehérjék, illetve az amfipatikus hélixen keresztül kötődő fehérjék megváltoztatják, míg a felületi ionos kölcsönhatások nem változtatják meg a membrán fluiditási paraméterét (Ohki et al. 1994). A fluoreszcencia anizotrópia mérés azt mutatta, hogy sem az ERD10 sem az ERD14 nem változtatja meg a foszfolipid vezikula fluiditását a 5-55°C-os hőmérséklet tartományban (18. ábra).



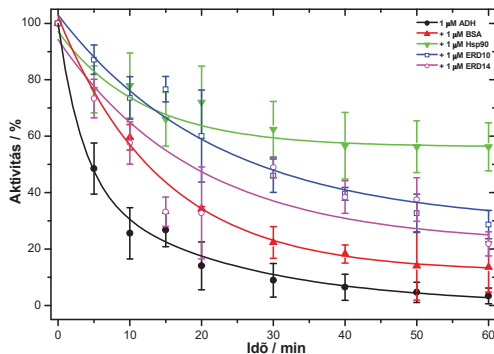
18. ábra Fluoreszcens anizotrópia

A vezikula anizotrópiáját önmagában (fekete), illetve ERD10 (piros) vagy ERD14 (kék) jelenlétében növekedő hőmérséklet mellett határozta meg. Az ábrán egy reprezentatív mérés látható.

V.3 Chaperone hatás vizsgálata

V.3.1 Alkohol dehidrogenáz aktivitásvesztés

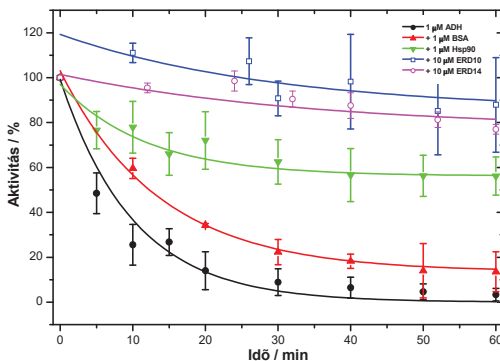
Az alkohol dehidrogenáz (ADH) 42°C-on elveszíti enzim aktivitását, amit etanol és NAD⁺ enzimszubsztrátok jelenlétében specifikusan nyomon lehet követni. A kísérleti összeállításban 1 μM ADH enzimaktivitását mértem önmagában, illetve 2 μM (19. ábra) és 10 μM (20. ábra) ERD10 vagy ERD14 vagy 1 μM riboszómális fehérje (L15, L16, L18, L19) (21. ábra) jelenlétében. Negatív kontrollként 1 μM BSA-t, pozitív kontrollként 1 μM Hsp90-t használtam. A kísérlet során azt vizsgáltam, hogy a hozzáadott fehérjék hogyan változtatták meg az ADH enzim aktivitásának csökkenésének időbeli lebontását.



19. ábra ADH hőindukált inaktiválódása, ekvimoláris ERD10 és ERD14 mellett

A fenti pontok három mérés átlagából álltak elő, relatív értéként kifejezve az adott mérés nulla időpontjához viszonyítva

Az ERD10 és ERD14 ekvimoláris koncentráció mellett (19. ábra) a Hsp90-nél gyengébb védőhatást mutatott, míg a BSA nem volt hatással az enzim inaktivációjára.

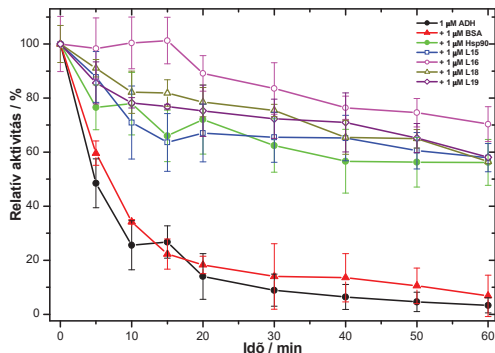


20. ábra ADH hőindukált inaktiválódása, 5x moláris felesleg ERD10 és ERD14 mellett

Az ERD fehérjék 5x-ös moláris feleslegben lettek hozzáadva az ADH-hoz. A feltüntetett pontok három mérés átlagaként álltak elő. Az értékeket relatív kifejezésként tüntettem fel, az adott mérés nulla időpontjára viszonyítva.

Az 5x-ös moláris feleslegben hozzáadott chaperone az enzimet jóval nagyobb hatékonysággal védte az aktivitásvesztéssel szemben, mint ekvimoláris arányban (20. ábra). En-

nek oka a szubsztrát nagy mérete lehet (ADH 160 kDa, az ERD10 29 kDa és az ERD14 21 kDa), mivel ilyen méretkülönbség esetében fehérje védelméhez több chaperone fehérjére van szükség. A chaperone aktivitás ebben az esetben a Hsp90 hatását is meghaladta.



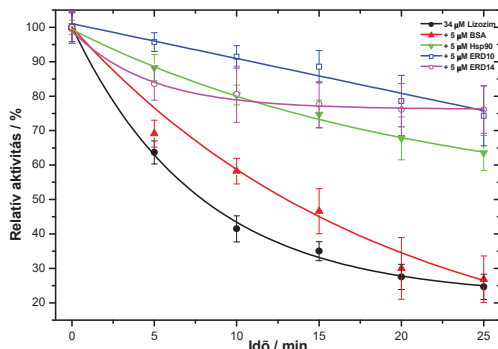
21. ábra ADH aktivitásvesztés riboszómális fehérjék mellett

Három mérés átlaga és annak szórása van feltüntetve a grafikonon. A mérési pontokat minden mérésnél a kezdeti aktivitásához viszonyítva relatív értékben kifejezve tüntettem fel.

A riboszómális fehérjék ekvimoláris koncentrációban a Hsp90-nel összemérhető védő hatást mutattak. Egyedül az L16 mutatott enyhén magasabb védő hatást.

V.3.2 Lizozim aktivitásvesztés

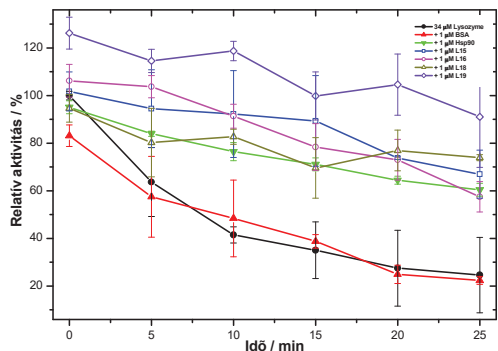
A lizozim enzim aktivitása hő és kémiai redukálószer együttes hatására csökken az idő függvényében. Az enzimaktivitás csökkenését a fehérjére jellemző enzimtikus reakció – bakteriális sejtfal bontása – sebességének mérésével lehet nyomon követni. A vizsgálatot mindkét csoport fehérjéire ERD10 és ERD14 (22. ábra), illetve a riboszómális fehérjékre (23. ábra) is elvégeztem, BSA és Hsp90 kontrollok mellett.



22. ábra Lizozim aktivitásvésztes ERD10 és ERD14 mellett

A grafikonon három párhuzamos mérés átlaga és szórása van feltüntetve. Az adott időponthoz tartozó aktivitások relatív értékben vannak kifejezve, minden esetben az adott mérés 0 időpontjára viszonyítva.

Az ERD10 és ERD14 fehérjék erős védőhatást mutattak lizozim deaktivációs mérésben. A chaperone aktivitásuk összemérhető a Hsp90 chaperone aktivitásával.



23. ábra Riboszómális fehérjék hatása a lizozim aktivitás vésztes során

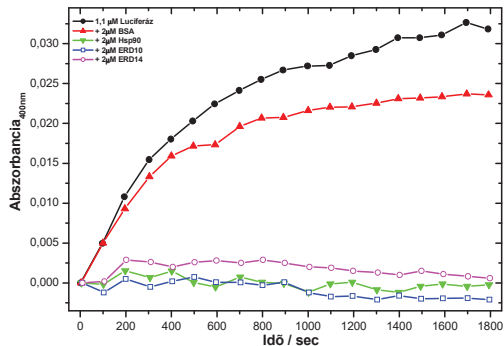
Az ábrán három párhuzamos mérés átlaga, annak szórása van feltüntetve. Az aktivitások relatív értékekben van kifejezve, a lizozim nulla időpontjához viszonyítva.

A riboszómális fehérjék szintén erős chaperone aktivitást mutattak a lizozim deaktivációs mérésnél. A relatív enzimaktivitás értékek nem ugyanabból a pontból indulnak, aminek oka a 0 időpontbeli aktivitás értékek szórása. Ezek az eltérések nagyobbak voltak mint a párhuzamos mérések szórása, emiatt indokoltnak tartottam az aktivitási értékek a

kontroll lizozim mérés $t = 0$ időpontjához való viszonyítását. A nagymértékű szórás oka eddig ismeretlen, vélhetőleg a reakció körülményeiben történik alapvető változás a riboszómális fehérjék hatására.

V.3.3 Luciferáz aggregáció

A luciferáz hő hatására elveszíti szolubilis szerkezetét és aggregál, amit fotometriás abszorbancia meghatározásával nyomon lehet követni. A vizsgálatok során a luciferáz aggregációjának mértékét hasonlítottam az ERD10 és ERD14 melletti aggregációhoz. Kontrollként itt is BSA-t és Hsp90-t használtam (24. ábra).



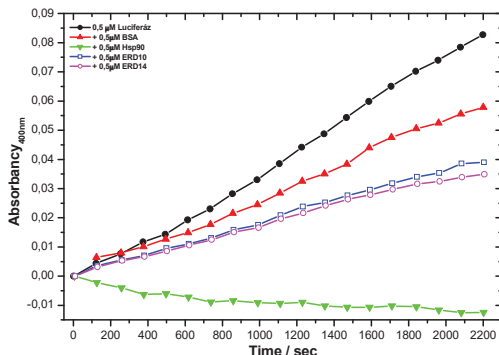
24. ábra Luciferáz hőindukált aggregációja ERD10 és ERD14 mellett

A grafikonon a minta abszorbanciája van ábrázolva az idő függvényében, egy reprezentatív kísérlet során.

A Hsp90 teljes mértékben megakadályozta a luciferáz aggregációját a mérési körülmények között, ahogy az ERD10 és ERD14 is. A BSA elhanyagolható hatást mutatott az aggregációval szemben.

V.3.4 Citrát szintáz aggregáció

A luciferáz méréssel megegyező menetű a citrát szintáz hőindukált aggregációja. A kísérlet során a citrát szintáz aggregációjának előrehaladását követtem fotometriás abszorbancia meghatározással (25. ábra).

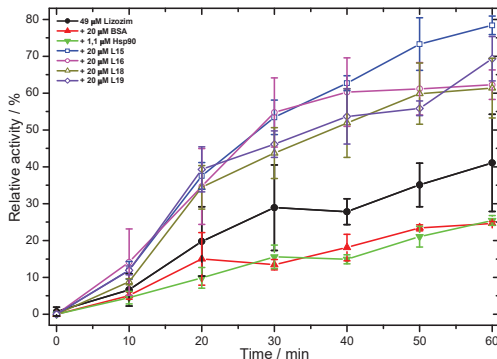


25. ábra Citrát szintáz hőindukált aggregációja ERD10 és ERD14 mellett
 A grafikon egy reprezentatív mérést ábrázol, ahol a minta abszorbanciája az idő függvényében van feltüntetve.

A Hsp90 a citrát szintáz hőindukált aggregációját is teljes mértékben megakadályozta, míg az ERD10 és ERD14 ugyanazon koncentráció mellett csak fele akkora hatásfokkal volt képes védeni a szubsztrátot. A BSA hatása ismételtelen elhanyagolható volt. Összességében az ERD fehérjék ebben a mérésben nem bizonyultak hatékony chaperone fehérjének, más koncentrációk mellett sem (nem bemutatott adat).

V.3.5 Lizozim reaktiváció

A lizozim aktivitásának visszanyerésének nyomonkövetése során a teljesen denaturált és ezért enzimatikusan is inaktív fehérje refoldingját és reaktivációját vizsgáltam. A lizozimot kémiai úton (UREA, DTT, magas hőmérséklet) denaturáltam, majd a teljesen denaturált fehérje reaktivációját vizsgáltam optimális redoxrendszerben, amit az enzim specifikus reakciójával követtem. Ehhez viszonyítva vizsgáltam a riboszómális (26. ábra) és ERD fehérjék hatását a reaktivációra.



26. ábra Lizozim reaktiválódása riboszómális fehérjék mellett

A grafikonon a lizozim relatív aktivitása van feltüntetve az idő függvényében. Az adott időpontokhoz tartozó aktivitások a natív lizozim 100%-os aktivitásához vannak viszonyítva. Az adatpontok három párhuzamos mérés átlagát és szórását mutatják.

Láthatóan a riboszómális fehérjék nagymértékben megnövelték a reaktiválódás mértékét, ami 40%-os relatív elért aktivitásról 62-78%-os aktivitásra növekedett. A leghatékonyabb chaperone-nak az L15 bizonyult a 78%-os elért maximális aktivitással. A Hsp90 és BSA csökkentette a reaktiválódás hatékonyságát, ami valószínűleg a kísérleti körülményeknek tulajdonítható (2 M UREA).

Az ERD10 és ERD14 nem mutatott reprodukálható chaperone aktivitást a lizozim reaktiválódásában.

V.3.6 Chaperone hatékonyság összesítése

A chaperone fehérjék abszolút értékben kifejezett aktivitása nem tükrözi azok tényleges hatékonyságát, emiatt a chaperone hatékonyságot relatív értékben fejezzük ki más, már ismert chaperone aktivitásához viszonyítva. Az ERDk chaperone aktivitását négy szubsztrát esetében vizsgáltuk meg, öt különböző összeállítású chaperone mérésben. Az ERDk erős védő hatást mutattak három szubsztrát esetében, ezek az ADH, a luciferáz és a lizozim aktivitás vesztés méréseknél. Enyhe védő hatás mutattak a citrát szintáz aggregációjával szemben, és semmilyen hatást nem gyakoroltak a lizozim reaktiválásánál (6. táblázat). Hatékonyságuk a legtöbb esetben meghaladta a Hsp90 hatékonyságát. A Hsp90 funkcióját tekintve eukarióta chaperone fehérjék közé tartozik, amely a szubsztrát fehérjék szerkezetének védelmében, és

a hibás konformációjú fehérjék feltekeredésében játszik szerepet. Ennek ismeretében az ERD10 és ERD14 nagy hatékonyságú chaperone-oknak tekinthetjük, a vizsgálatok során alkalmazott kísérleti körülmények között, amit további *in vivo* vizsgálatokkal is igazolni kell.

	ADH aktivitás- vesztés 1 μ M ERD	ADH aktivitás- vesztés 10 μ M ERDs	Citrát szintáz aggregációja	Luciferáz aggregációja	Lizozim aktivi- tásvesztés
BSA	20,14 \pm 9,7	20,14 \pm 9,6	26,14 \pm 3,79	23,93 \pm 4,85	4,11 \pm 6,3
Hsp90	100 \pm 10,2	100 \pm 10,4	100 \pm 3,80	100 \pm 2,64	100 \pm 9,19
ERD10	35,53 \pm 18,0	158,6 \pm 17,7	45,93 \pm 3,71	112,1 \pm 1,10	127,0 \pm 15,8
ERD14	48,30 \pm 7,8	138,2 \pm 6,5	50,28 \pm 5,49	105,8 \pm 2,20	131,7 \pm 12,4

6. táblázat ERD10 és ERD14 relatív chaperone hatékonysága

Mérésenként az utolsó időpontban vett aktivitás/abszorbancia értéket használtam fel a chaperone hatékonyság számításához. A Hsp90 mint pozitív kontroll 100%-os chaperone aktivitásnak tekintettem, és a többi fehérje chaperone hatékonysága ehhez mérten van megadva, százalékos értékben.

Az L15, L16, L18 és az L19 hatékony RNS chaperone-oknak bizonyultak transz-splicing vizsgálatokban (Semrad et al. 2004), mindemellett a rendezetlen fehérjék családjába tartoznak. Vizsgálataink során azt találtuk, hogy fehérje-chaperone hatékonyságuk rendkívül magas (7. táblázat).

	ADH aktivitás- vesztés	Lizozim aktivitás vesztés	Lizozim reaktiválás*
BSA	12,44% \pm 6,92	67,58% \pm 2,66	70,63% \pm 1,67
HSP90	100% \pm 8,35	100% \pm 3,36	72,96% \pm 1,94
L15	114,49% \pm 7,53	183,01% \pm 3,01	224,68% \pm 2,35
L16	135,76% \pm 7,62	120,37% \pm 3,19	178,48% \pm 2,86
L18	134,32% \pm 8,19	188,74% \pm 2,77	201,13% \pm 1,54
L19	125,62% \pm 8,08	231,3% \pm 4,49	198,73% \pm 3,51

7. táblázat Riboszómális fehérjék relatív chaperone hatékonyság

A chaperone hatékonyság az 6. táblázattal megegyező módon van kiszámítva. *A lizozim reaktiválódás mérésnél a Hsp90 negatívan hatott a reaktiválódásra, ezért az alap lizozim reaktiválódás utolsó időpontjában mért enzim aktivitást tekintettem 100%-nak, és ehhez mérten adtam meg a többi chaperone hatékonyságát.

Az ADH aktivitásvesztés vizsgálatokban a chaperone hatékonyságuk összemérhető a HSP90 chaperone hatékonyságával, a lizozim aktivitásvesztés mérés során hatékonyságuk jóval meghaladta a HSP90 hatékonyságát. A lizozim reaktiválódása során a riboszómális fehérjék jelentősen megnövelték a reaktiválódás mértékét (az enzim aktivitásának akár 80%-át is viz-

szanyerte), a HSP90 mellett azonban ez kisebb mértékben volt megfigyelhető, mint a kontroll mérésben (26. ábra).

Összefoglalásképpen megállapítható, hogy mind a hat rendezetlen fehérje széles szubsztrát-specifitással rendelkező chaperone fehérje. A két dehidrin fehérje az alkalmazott kísérleti körülmények között a szubsztrát fehérjék szerkezetének védelmében játszik szerepet, de a denaturált fehérjék reaktiválódásában nem. Ez a funkcióját tekintve érthető, mivel stresszhatás esetén a meglévő natív szerkezettel rendelkező fehérjék védelmét végzik, de a denaturált és a frissen szintetizált fehérjék feltekeredésében nem játszik szerepet. A sejt fehérjéinek védelme az egyik legfontosabb funkció stressz körülmények, illetve magfejlődés során. Ezzel ellentétben a riboszómális fehérjék a fehérje-foldingban is szerepet játszanak, ami a denaturált fehérjék reaktiválásában és frissen szintetizált fehérjék feltekeredésének segítésében nyilvánulhat meg. Utóbbival a sejt helyes működéséhez szükséges fehérjék előállítását segíthetik elő, például gyors sejtosztódás során.

VI. Diskusszió

Az ERD10 és ERD14 hideg-, illetve szárazságstressz hatására kifejeződő növényi fehérjék. A riboszómális fehérjék a riboszóma helyes konformációjáért és működéséért felelős fehérjék, amelyek stresszmentes körülmények között a riboszómához kötött állapotban, stressz hatására a citoszolban találhatóak. Utóbbiakról már ismeretes a primer funkció illetve a konformációjukra jellemző szerkezeti rendezetlenség, az ERD10 és ERD14-ről csak az kifejeződés körülményei voltak ismeretesek. Munkám célja a két fehérjecsalád funkcionális jellemzése, azon belül a fehérje-chaperone aktivitás vizsgálata, továbbá a rendezetlen fehérjék mint fehérjecsaládról szerzett ismereteink bővítése. Szekvenca homológia vizsgálatok alapján az ERD fehérjéket a LEA (Late Embryogenesis Abundant) fehérjék családjába sorolták, azon belül a LEA 2 osztályba, amelyeket dehidrineknek nevezünk. Ezt a besorolást a fehérjék expressziós mintázata is alátámasztotta, ugyanis kifejeződésük a mag fejlődésére, hideg illetve szárazságstressz idejére tehető, továbbá az aktívan osztódó sejtekben is megtalálhatóak. Hiányuk a növény stressztoleranciájának csökkenéséhez vezet, habár a fehérjék pontos funkciója mindeztidáig ismeretlen volt.

A fehérjék rendezetlenségének igazolását nem elegendő egy technikával elvégezni, ugyanis számos olyan fehérje létezik, amelyek jól meghatározott szerkezettel rendelkeznek, mégis rendezetlen fehérjékre jellemző jeleket mutatnak (Tomba 2002). Ebből kifolyólag az ERDk szerkezeti flexibilitását / rendezetlenségét számos technikával megvizsgáltam, és igazoltam azok rendezetlenségét. A fehérjék aminosav összetétele nagyban eltér a Swiss-Prot adatbázisban megtalálható fehérjék átlag aminosav összetételétől, illetve a globuláris fehérjékre jellemző aminosav összetételtől. Ez leginkább a hidrofób aminosavak hiányában, és a poláris/töltött aminosavak magasabb arányában nyilvánul meg. Az *in silico* predikciók, amelyek az aminosav sorrend és összetétel alapján jóslják a rendezetlenséget, az ERDk fehérjéket rendezetlennek jóslták. Az IUPred mindkét fehérjét teljesen rendezetlennek, a PONDR az ERD10-et 63%-os, az ERD14-et 64%-osan jósolta rendezetlennek (7. ábra). A PONDR jóslásban látható lokális minimumok feltételezések alapján olyan lokálisan rendezett, vagy könnyen rendeződő motívumok, amelyek a molekuláris felismerésért felelősek, ún. MoRE-k (Molecular Recognition Elements), vagy LM-k (Liner Motifs) (Dunker et al. 1998; Fuxreiter et al. 2007). Ezek minden esetben a K-szegmessel, a membránkötéssel összefüggésbe hozott

szegmenssel fednek át (6. ábra). Kiemelendő, hogy ez az eredmény mindösszesen számítógépes predikció, amely kísérletileg még egy munkában sem volt igazolva. Az elsődleges szekvencia kapcsán továbbá érdemes megjegyezni, hogy az ERD10 és ERD14 nagyon magas, 52%-os szekvencia azonosságot mutat. A szekvenciaillesztést vizsgálva az látszik, hogy az ERD14 az ERD10 szegmens delécióval kialakult variánsa. Ekkor felvetődik az a kérdés, hogy ilyen nagy homológiájú fehérjék hordoznak-e valamilyen funkcionális különbözőséget, ami fenntartotta mindkét fehérjét a növényben. Vizsgálataink során eddig semmilyen funkcionális különbözőséget sem sikerült igazolni. Zárójelben megjegyzendő, hogy előkísérleteink azt mutatták, hogy az ERD14 chaperone aktivitása függ a közeg ionerősségétől, ami az ERD10-ről eddigi vizsgálatok alapján nem mondható el (Kovacs et al. 2008).

A CD spektroszkópiai vizsgálatok alapján az ERD10 és ERD14 denaturált fehérjék jellegzetességeit mutató fehérje, a 200 nm-nél látható negatív csúcs alapján. Továbbá a 208 nm és 222 nm-nél láthatóak enyhe negatív csúcsok reziduális α -helikális szerkezetekre utalnak. Az NMR spektrumban látható tömörülő, kis diszperziójú amid csúcsok a rendezetlen fehérjékre jellemzőek (8,0-8,5 ppm), míg a globuláris fehérjéknél szélesebb diszperzió a megsokkott (9,5-6,0 ppm) (Dyson and Wright 2005). A metilcsoportok jelei is egy nagy csúcsba olvadnak össze, ami a fehérje nagy mozgékonyására utal. A rendezetlen fehérjék nyújtott polipeptid lánc könnyen hozzáférhető a proteolitikus enzimek számára, ami a fehérjék nagy érzékenységét eredményezi a proteolízisre nézve. Az ERD10 és ERD14 limitált proteolízist négy proteázzal, szubtilizin és proteináz K (széles specificitás); tripszin és kimotripszin (szűk specificitás) végeztük el. Mindegyik emésztés során azt találtuk, hogy mind az ERD10 mind az ERD14 gyorsan bomlik a kontroll BSA-hoz képest. Ezekon kívül az ERDk ellenállóak a hő indukált aggregációval szemben, ami szintén a rendezetlen fehérjék jellegzetessége. A fenti eredményeket összefoglalva kimondhatjuk, hogy az ERD10 és ERD14 nagy felxibilitással rendelkező rendezetlen fehérjék.

Néhány dehidrinről már korábban kimutatták, hogy képesek membán-szerű képződményekhez kötődni. Ezt az ERD10 és ERD14 esetében is megvizsgáltuk, és azt találtuk, hogy kötődnek savas jellegű foszfolipid vezikulákhoz (PC:PS=1:1), azonban más tulajdonságú foszfolipidekből felépülő vezikulákhoz nem (nem bemutatott adatok). Továbbá azt találtuk, hogy kalcium ion csökkenti a kölcsönhatás mértékét, eddig még ismeretlen okok folytán. A vezikula mellett felvett CD spektrumok nem mutattak eltérést az α -hélikális szerkezetek

mennyiségében, illetve magas sókoncentráció mellett drasztikusan lecsökkent a kötött fehérje mennyisége. Ezekből arra következtettünk, hogy a kölcsönhatás ionos természetű rendelkezik. Ennek bizonyítására membránfluiditás vizsgálatot is végeztünk, azzal a munkahipotézissel, hogy amennyiben a kölcsönhatás amfipatikus α -hélixen keresztül jön létre, akkor az megváltoztatja, míg a felületi ionos jellegű kölcsönhatás nem befolyásolja a vezikula fluiditását (Ohki et al. 1994). Vizsgálataink során azt találtuk, hogy az ERD fehérjék nem változtatják meg a vezikula fluiditását, ami erősíti az ionos jellegű kölcsönhatás lehetőségét. Ennek teljes értékű bizonyításához a K szegmens részletesebb vizsgálata szükséges.

A rendezetlen fehérjék között már ismert néhány chaperone fehérje, de a dehidrinek chaperone aktivitása mindeddig csak hipotézisként volt ismert. A riboszómális fehérjék - mint részben rendezetlen fehérjék - RNS chaperone aktivitása a közelmúltban vált ismerté. A riboszómális fehérjék rendelkeznek extrariboszómális funkcióval, bár ezek csak néhány fehérje esetében vannak felderítve. A riboszómális fehérjék expressziós szintje a sejtben szigorúan szabályozva van, azonban stressz körülmények között, vagy gyors sejtosztódás során, illetve bizonyos daganatos sejtekben szintjük megemelkedik. Az ERDk a dehidrinek családjába tartozó, hideg illetve szárazság stressz hatására, nagy mennyiségben kifejeződő stresszfehérjék. Funkciójuk eddig még nem került felderítésre, ámbár a számos feltételezés született már a fehérjecsalád lehetséges funkcióira nézve. Ennek a kérdésnek a felderítésére számos chaperone mérést optimalizáltam, amelyek potenciálisan alkalmasak a riboszómális fehérjék, és az ERDk esetleges fehérje-chaperone funkcióinak felderítésére. Vizsgálataink során azt találtuk, hogy mind a két fehérjecsalád képviselői potenciálisan aktív chaperone-ok számos szubsztrát esetében is. Védőhatásuk sok esetben a Hsp90 eukarióta hősokk fehérjével összemérhető, vagy akár azt meghaladó, ami potenciálisan erős chaperone-nak minősíti őket. A riboszómális fehérjék mind a fehérje védelemben, mind a denaturált fehérjék reaktíválásában aktívnak bizonyultak, azonban egyik ERD fehérje sem mutatott releváns hatást a denaturált fehérjék reaktíválásában (6. táblázat és 7. táblázat).

Az ERD10 és ERD14 fehérjék széles szubsztrátspecifitással rendelkező chaperone-ok, amelyek a meglévő fehérjék szerkezetének védelmében, aggregációjuk megakadályozásában, ezáltal a biológiai aktivitás megőrzésében játszanak fontos szerepet. Ez átfedésben van az expresszió körülményeivel is, ugyanis ezek a fehérjék sejt stressz, vagyis hideg/szárazság illetve aktív osztódás esetén expresszálnak, ami alapján meglévő fehérjék védelmét látják

el, de nem játszanak szerepet folding folyamatokban. Ezzel az eredménnyel bizonyítottá vált a fehérjecs család sokféle potenciális hatásai közül egy. Előkíséreltek azt mutatták, hogy a chaperone aktivitás részben összefüggésbe hozható a közeg ionerősségével. Mint az irodalmi áttekintésben is írtam, a rendezetlen fehérjék hajlamosak több (akár ellentétes) funkció kifejtésére is, a környezettől függően. A fentiekből kiindulva azt a hipotézist fogalmaztam meg, hogy az ERDk a körülményektől függően változtatják hatásukat, jelen esetben az ionerősségtől függő chaperone aktivitást. Ez, az eddig megszokott fehérje szabályozástól merőben eltérő képet mutatna, amely egy folytonos, a környezeti paramétereiktől függő funkcionális szabályozást feltételezne.

A riboszómális fehérjék chaperone aktivitásának vizsgálata választ ad arra, hogy milyen alternatív funkcióval rendelkeznek a sejtosztódás vagy stressz körülmények között: fehérje védő és folding funkcióval. A sejtosztódás során a riboszómális fehérjék a többi fehérjéhez viszonyítva nagy arányban vannak jelen az osztódás után lévő sejtben (Ramagopal and Subramanian 1974), ami a biológiailag aktív riboszóma összeszerelődésének feltétele, ugyanakkor a riboszómális fehérjék a sejt életének ebben a szakaszában a riboszómán kívüli feladatokat is elláthatnak extrariboszómális funkcióik révén, azaz a fenti eredmények alapján részt vesznek a frissen szintetizált fehérjék feltekeredésében illetve védelmében. Így a riboszómális fehérjék egyrészt részt vesznek a riboszóma kialakításában, illetve csökkentik a sejt chaperone rendszerére nehezedő terheket a multifunkcionalitásuk által. A vizsgált fehérjék RNS chaperone funkcióval is rendelkeznek (Semrad et al. 2004), ami a fenti eredményekkel összevetve kettős chaperone, úgynevezett „Janus” chaperone funkciót tulajdonít ezeknek a fehérjéknek. Az egymástól eltérő szubsztrátokhoz történő ilyen mértékű adaptációja, vélhetőleg csak a rendezetlen fehérjék nagy flexibilitása, és ebből kifolyólag létrejövő konformációs adaptációja miatt jöhet létre, ámbar ennek felderítése még várat magára.

VII. Összefoglalás

A rendezetlen fehérjék nagy gyakorisággal fordulnak elő az élővilágban, azonban pontos jellemzésük mind a mai napig hiányos. Számos olyan fehérje tartozik ebbe a családba, amelyeknek hiánya, vagy helytelen működése súlyos betegséget okoz. Ez a felismerés kiemeli fontosságukat, miszerint fontos szerepet kaptak az organizmusok életében. Eddigi ismereteink alapján funkcióik között megtalálható enzimszabályozás, sejtszerveződés ellátása, molekuláris komplexek összeszerelése, stabilizálása, transzkripció faktor, chaperone aktivitás, stb.

Munkám célkitűzése hat rendezetlen fehérje funkcionális vizsgálata, továbbá ezek közül kettő részletes szerkezeti jellemzése volt. A kiválasztott fehérjék között szerepelt két növényi stresszfehérje a dehidrin fehérjecsaládból, és további négy bakteriális riboszómális fehérje a riboszóma nagy alegységéből. A két dehidrin, ERD10 és ERD14 (ERDk) rendezetlenségét számos technikával igazoltam (CD, NMR, limitált proteolízis, predikciók), amelyek mindegyike azt mutatta, hogy minimális reziduális α -helikális szerkezettől eltekintve mindkét fehérje teljesen rendezetlen. Az ERDk biofizikai vizsgálata során azt találtam, hogy mindkét fehérje kötődik elsősorban savas foszfolipidekből felépülő foszfolipid vezikulákhoz. Ennek a jelenségnek a részletesebb vizsgálata azt mutatta, hogy a kölcsönhatás ionos jellegű, ami nem befolyásolja a vezikula fizikai tulajdonságait, jelen esetben a vezikula fluiditását. Továbbá hőmérsékletfüggő NMR vizsgálatok azt mutatták, hogy az ERDk nagy kiterjedésű hidrárburokkal rendelkeznek.

Mind a hat rendezetlen fehérjéről ismeretes, hogy szerepet játszik/játszhat a sejt stresszválaszában. Funkcionális vizsgálatainkban a fehérjék chaperone, azaz fehérje védő, és renaturáló funkcióját kívántuk részletesen jellemezni. Kutatási eredményeink azt mutatják, hogy az ERDk megakadályozzák négy szubsztrát hő, illetve kémiai indukált aggregációját, illetve aktivitásvesztését, azonban nem mutatnak chaperone aktivitást a denaturált fehérjék reaktiválásában. Ebből azt a következtetést vonhatjuk le, hogy az ERDk fehérje szerkezet védő hatással rendelkeznek, azonban a már sérült fehérjék reaktiválását nem képesek ellátni. A riboszómális fehérjék chaperone aktivitását három szubsztráton vizsgáltam meg. Az ERDk-kal ellentétben ezek a fehérjék chaperone aktivitást mutattak mind az aggregáció/aktivitás veszteség gátlásában, mind a denaturált szubsztrát fehérje reaktiválásában. Ebből arra következtethetünk, hogy a riboszómális fehérjék stressz körülmények között mind a meglévő fehérjék védelmében, mind a sérült fehérjék reaktiválásában szerepet játszanak. Ezzel kettős, úgynevezett Janus chaperone aktivitást mutatnak, ami elősegítheti a sejt túlélését.

VIII. Summary

Intrinsically disordered proteins (IDP) constitute a high portion of the proteome, but their functions are poorly characterized yet. Several proteins belong to this protein family, the improper activity or absence of which can cause disease. This suggests the importance of these proteins, and underlines the suggestion that they are indeed functional, carrying out important roles in the life of organisms and they are not mere by-products of evolution. In the known functions of these proteins several important regulatory functions can be found, such as regulation of enzymes, organization of the cell structure, assembly and stabilization of protein complexes, transcription factors and chaperones, etc.

The aim of my work was the functional characterization of six IDPs, and also the structural characterization of two of them. Two of the selected proteins are dehydrins, i.e belong to a subgroup of the LEA protein family, the rest are ribosomal proteins from the large subunit of bacterial ribosome. The IDP nature of the two dehydrins was characterized by several techniques (CD, NMR, limited proteolysis, heat stability, predictions), which showed an overall unstructured nature for both proteins except for some residual α -helical content. The biophysical characterization of ERDs revealed that both are able to bind to phospholipid vesicles, with a preference to vesicles composed of acidic phospholipids. The more thorough examination of the characteristics of this interaction showed that it has an ionic character, further the binding itself does not change the fluidity of the vesicles. Temperature-dependent NMR measurements revealed the big size and stability of the hydrate layer of ERDs.

From previous results it is known that both protein families have a role in the stress response of the cell. In this regard, our aim was to analyze the chaperone activity of these proteins in heat-, and chemically induced aggregation/deactivation, and renaturation assays. The chaperone assays showed that ERDs have anti-aggregation activities and protect the enzyme activity in stress conditions (with four different substrates), however they did not show any chaperone activity in a reactivation/refolding assay. This concludes that these proteins may protect the proteins in cells against inactivation, but they cannot reactivate the damaged proteins. The ribosomal proteins show both antiaggregation/inactivation and refolding activities (on two substrates). Furthermore, the ribosomal proteins analysed in this study also have RNA chaperone activity. These two accompanying chaperone activities can be denoted as dual or "Janus" chaperones. The property of L15, L16, L18 and L19 that they also assist the folding of both proteins and RNA likely comes from the highly flexible polypeptide chain and adaptability of disordered proteins.

Irodalomjegyzék

- Ahn, M., S. Kim, M. Kang, Y. Ryu and T. D. Kim (2006). "Chaperone-like activities of alpha-synuclein: alpha-synuclein assists enzyme activities of esterases." **Biochem Biophys Res Commun** 346(4): 1142-9.
- Allagulova Ch, R., F. R. Gimalov, F. M. Shakirova and V. A. Vakhitov (2003). "The plant dehydrins: structure and putative functions." **Biochemistry (Mosc)** 68(9): 945-51.
- Allain, F. H., P. Bouvet, T. Dieckmann and J. Feigon (2000). "Molecular basis of sequence-specific recognition of pre-ribosomal RNA by nucleolin." **EMBO J** 19(24): 6870-81.
- Alsheikh, M. K., B. J. Heyen and S. K. Randall (2003). "Ion binding properties of the dehydrin ERD14 are dependent upon phosphorylation." **J Biol Chem** 278(42): 40882-9.
- Alsheikh, M. K., J. T. Svensson and S. K. Randall (2005). "Phosphorylation regulated ion-binding is a property shared by the acidic subclass dehydrins." **Plant, Cell and Environment** 28: 1114-1122.
- Amsterdam, A., K. C. Sadler, K. Lai, S. Farrington, R. T. Bronson, J. A. Lees and N. Hopkins (2004). "Many ribosomal protein genes are cancer genes in zebrafish." **PLoS Biol** 2(5): E139.
- Anfinsen, C. B. (1973). "Principles that govern the folding of protein chains." **Science** 181(96): 223-30.
- Angelov, D., V. A. Bondarenko, S. Almagro, H. Menoni, F. Mongelard, F. Hans, F. Miettton, V. M. Studitsky, A. Hamiche, S. Dimitrov and P. Bouvet (2006). "Nucleolin is a histone chaperone with FACT-like activity and assists remodeling of nucleosomes." **EMBO J** 25(8): 1669-79.
- Asghar, R., R. Fenton, D. DeMason and T. Close (1994). "Nuclear and cytoplasmic localization of maize embryo and aleurone dehydrin." **Protoplasma** 177: 87-94.
- Baker, S. S., K. S. Wilhelm and M. F. Thomashow (1994). "The 5'-region of Arabidopsis thaliana cor15a has cis-acting elements that confer cold-, drought- and ABA-regulated gene expression." **Plant Mol Biol** 24(5): 701-13.
- Ban, N., P. Nissen, J. Hansen, P. B. Moore and T. A. Steitz (2000). "The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 Å resolution." **Science** 289(5481): 905-20.
- Bennett, W. S., Jr. and T. A. Steitz (1978). "Glucose-induced conformational change in yeast hexokinase." **Proc Natl Acad Sci U S A** 75(10): 4848-52.
- Bernstein, K. A., F. Bleichert, J. M. Bean, F. R. Cross and S. J. Baserga (2007). "Ribosome biogenesis is sensed at the Start cell cycle checkpoint." **Mol Biol Cell** 18(3): 953-64.
- Bohner, H. J., D. E. Nelson and R. G. Jensen (1995). "Adaptations to Environmental Stresses." **Plant Cell** 7(7): 1099-1111.
- Chakrabortee, S., C. Boschetti, L. J. Walton, S. Sarkar, D. C. Rubinsztein and A. Tunnacliffe (2007). "Hydrophilic protein associated with desiccation tolerance exhibits broad protein stabilization function." **Proc Natl Acad Sci U S A** 104: 18073-18078.
- Cheng, M., P. Olivier, J. A. Diehl, M. Fero, M. F. Roussel, J. M. Roberts and C. J. Sherr (1999). "The p21(Cip1) and p27(Kip1) CDK 'inhibitors' are essential activators of cyclin D-dependent kinases in murine fibroblasts." **Embo J** 18(6): 1571-83.
- Close, T. J. (1996). "Dehydrins: emergence of a biochemical role of a family of plant dehydration proteins." **Physiol Plant** 97: 795-803.
- Cox, C. J., K. Dutta, E. T. Petri, W. C. Hwang, Y. Lin, S. M. Pascal and R. Basavappa (2002). "The regions of securin and cyclin B proteins recognized by the ubiquitination machinery are natively unfolded." **FEBS Lett** 527(1-3): 303-8.
- Csermely, P. (2001). Stresszfehérjék, Vince kiadó.

- Dai, M. S. and H. Lu (2004). "Inhibition of MDM2-mediated p53 Ubiquitination and Degradation by Ribosomal Protein L5." **J Biol Chem** 279(43): 44475-82.
- Danyluk, J., A. Perron, M. Houde, A. Limin, B. Fowler, N. Benhamou and F. Sarhan (1998). "Accumulation of an acidic dehydrin in the vicinity of the plasma membrane during cold acclimation of wheat." **Plant Cell** 10(4): 623-38.
- DiNitto, J. P. and P. W. Huber (2003). "Mutual induced fit binding of *Xenopus* ribosomal protein L5 to 5S rRNA." **J Mol Biol** 330(5): 979-92.
- Dolgikh, D. A., R. I. Gilmanshin, E. V. Brazhnikov, V. E. Bychkova, G. V. Semisotnov, S. Venyaminov and O. B. Ptitsyn (1981). "Alpha-Lactalbumin: compact state with fluctuating tertiary structure?" **FEBS Lett** 136(2): 311-5.
- Dosztanyi, Z., V. Csizmek, P. Tompa and I. Simon (2005). "IUPred: web server for the prediction of intrinsically unstructured regions of proteins based on estimated energy content." **Bioinformatics** 21(16): 3433-4.
- Dunker, A. K., C. J. Brown, J. D. Lawson, L. M. Iakoucheva and Z. Obradovic (2002). "Intrinsic Disorder and Protein Function." **Biochemistry** 41(21): 6573-6582.
- Dunker, A. K., E. Garner, S. Guillot, P. Romero, K. Albrecht, J. Hart, Z. Obradovic, C. Kissinger and J. E. Villafranca (1998). "Protein disorder and the evolution of molecular recognition: theory, predictions and observations." **Pac Symp Biocomput**: 473-84.
- Dunker, A. K., E. Garner, S. Guillot, P. Romero, K. Albrecht, J. Hart and Z. Obradovic (1998). "Protein disorder and the evolution of molecular recognition: theory, predictions and observations." **Pac. Symp. Biocomputing** 3: 473-484.
- Dunker, A. K., J. D. Lawson, C. J. Brown, R. M. Williams, P. Romero, J. S. Oh, C. J. Oldfield, A. M. Campen, C. M. Ratliff, K. W. Hipps, J. Ausio, M. S. Nissen, R. Reeves, C. Kang, C. R. Kissinger, R. W. Bailey, M. D. Griswold, W. Chiu, E. C. Garner and Z. Obradovic (2001). "Intrinsically disordered protein." **J Mol Graph Model** 19(1): 26-59.
- Dunker, A. K., Z. Obradovic, P. Romero, E. C. Garner and C. J. Brown (2000). "Intrinsic protein disorder in complete genomes." **Genome Inform Ser Workshop Genome Inform** 11: 161-71.
- Dyson, H. J. and P. E. Wright (2005). "Intrinsically unstructured proteins and their functions." **Nat Rev Mol Cell Biol** 6(3): 197-208.
- Ellis, R. J. (2003). "Protein folding: importance of the Anfinsen cage." **Curr Biol** 13(22): R881-3.
- Espartero, J., J. A. Pintor-Toro and J. M. Pardo (1994). "Differential accumulation of S-adenosylmethionine synthetase transcripts in response to salt stress." **Plant Mol Biol** 25(2): 217-27.
- Evers, U., F. Franceschi, N. Boddeker and A. Yonath (1994). "Crystallography of halophilic ribosome: the isolation of an internal ribonucleoprotein complex." **Biophys Chem** 50(1-2): 3-16.
- Fontana, A., G. Fassina, C. Vita, D. Dalzoppo, M. Zamai and M. Zambonin (1986). "Correlation between sites of limited proteolysis and segmental mobility in thermolysin." **Biochemistry** 25(8): 1847-51.
- Fontana, A., P. Polverino de Laureto, V. De Filippis, E. Scaramella and M. Zambonin (1997). "Probing the partly folded states of proteins by limited proteolysis." **Fold Des** 2(2): R17-26.
- Friedman, D. I., A. T. Schauer, M. R. Baumann, L. S. Baron and S. L. Adhya (1981). "Evidence that ribosomal protein S10 participates in control of transcription termination." **Proc Natl Acad Sci U S A** 78(2): 1115-8.

- Fuxreiter, M., I. Simon, P. Friedrich and P. Tompa (2004). "Preformed structural elements feature in partner recognition by intrinsically unstructured proteins." **J Mol Biol** 338(5): 1015-26.
- Fuxreiter, M., P. Tompa and I. Simon (2007). "Local structural disorder imparts plasticity on linear motifs." **Bioinformatics** 23(8): 950-6.
- Garay-Arroyo, A., J. M. Colmenero-Flores, A. Garciarubio and A. A. Covarrubias (2000). "Highly hydrophilic proteins in prokaryotes and eukaryotes are common during conditions of water deficit." **J Biol Chem** 275(8): 5668-74.
- Garnczarska, M., T. Zalewski and L. Wojtyla (2008). "A comparative study of water distribution and dehydrin protein localization in maturing pea seeds." **J Plant Physiol**.
- Garner, E., P. Cannon, P. Romero, Z. Obradovic and A. K. Dunker (1998). "Predicting Disordered Regions from Amino Acid Sequence: Common Themes Despite Differing Structural Characterization." **Genome Inform Ser Workshop Genome Inform** 9(10): 201-213.
- Garner, E., P. Romero, A. K. Dunker, C. Brown and Z. Obradovic (1999). "Predicting Binding Regions within Disordered Proteins." **Genome Inform Ser Workshop Genome Inform** 10(3): 41-50.
- Gibson, S., V. Arondel, K. Iba and C. Somerville (1994). "Cloning of a temperature-regulated gene encoding a chloroplast omega-3 desaturase from *Arabidopsis thaliana*." **Plant Physiol** 106(4): 1615-21.
- Guerrero, F. D., J. T. Jones and J. E. Mullet (1990). "Turgor-responsive gene transcription and RNA levels increase rapidly when pea shoots are wilted. Sequence and expression of three inducible genes." **Plant Mol Biol** 15(1): 11-26.
- Gunasekaran, K., C. J. Tsai, S. Kumar, D. Zanuy and R. Nussinov (2003). "Extended disordered proteins: targeting function with less scaffold." **Trends Biochem Sci** 28(2): 81-5.
- Gurney, M. E., S. P. Heinrich, M. R. Lee and H. S. Yin (1986). "Molecular cloning and expression of neuroleukin, a neurotrophic factor for spinal and sensory neurons." **Science** 234(4776): 566-74.
- Guy, C. L., K. J. Niemi and R. Brambl (1985). "Altered gene expression during cold acclimation of spinach." **Proc Natl Acad Sci U S A** 82(11): 3673-7.
- Haarmann, C. S., D. Green, M. G. Casarotto, D. R. Laver and A. F. Dulhunty (2003). "The random-coil 'C' fragment of the dihydropyridine receptor II-III loop can activate or inhibit native skeletal ryanodine receptors." **Biochem J** 372(Pt 2): 305-316.
- Hauer, J. A., S. S. Taylor and D. A. Johnson (1999). "Binding-dependent disorder-order transition in PKI alpha: a fluorescence anisotropy study." **Biochemistry** 38(21): 6774-80.
- He, B., S. Bai, A. T. Hnat, R. I. Kalman, J. T. Mingos, C. Patterson and E. M. Wilson (2004). "An androgen receptor NH2-terminal conserved motif interacts with the COOH terminus of the Hsp70-interacting protein (CHIP)." **J Biol Chem** 279(29): 30643-53.
- Henry, J. L., D. L. Coggin and C. R. King (1993). "High-level expression of the ribosomal protein L19 in human breast tumors that overexpress erbB-2." **Cancer Res** 53(6): 1403-8.
- Hernandez, M. A., J. Avila and J. M. Andreu (1986). "Physicochemical characterization of the heat-stable microtubule-associated protein MAP2." **Eur J Biochem** 154(1): 41-8.
- Herschlag, D. (1995). "RNA chaperones and the RNA folding problem." **J Biol Chem** 270(36): 20871-4.
- Hornig, N. C., P. P. Knowles, N. Q. McDonald and F. Uhlmann (2002). "The dual mechanism of separase regulation by securin." **Curr Biol** 12(12): 973-82.

- Hurley, T. D., J. Yang, L. Zhang, K. D. Goodwin, Q. Zou, M. Cortese, A. K. Dunker and A. A. DePaoli-Roach (2007). "Structural basis for regulation of protein phosphatase 1 by inhibitor-2." **J Biol Chem** 282(39): 28874-83.
- Iakoucheva, L. M., P. Radivojac, C. J. Brown, T. R. O'Connor, J. G. Sikes, Z. Obradovic and A. K. Dunker (2004). "The importance of intrinsic disorder for protein phosphorylation." **Nucleic Acids Res** 32(3): 1037-49.
- Ingram, J. and D. Bartels (1996). "The Molecular Basis of Dehydration Tolerance in Plants." **Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol** 47: 377-403.
- Ismail, A. M., A. E. Hall and T. J. Close (1999). "Purification and partial characterization of a dehydrin involved in chilling tolerance during seedling emergence of cowpea." **Plant Physiol** 120(1): 237-44.
- Ivanyi-Nagy, R., J. P. Lavergne, C. Gabus, D. Ficheux and J. L. Darlix (2008). "RNA chaperoning and intrinsic disorder in the core proteins of Flaviviridae." **Nucleic Acids Res** 36(3): 712-25.
- Jeffery, C. J. (2004). "Moonlighting proteins: complications and implications for proteomic research." **Drug Discovery Today: targets** 3: 71- 78.
- Karush, F. (1950). "Heterogeneity of the Binding Sites of Bovine Serum Albumin." **J. Am. Chem. Soc** 72: 2705-2713.
- Kim, T. D., S. R. Paik and C. H. Yang (2002). "Structural and functional implications of C-terminal regions of alpha-synuclein." **Biochemistry** 41(46): 13782-90.
- Koag, M. C., R. D. Fenton, S. Wilkens and T. J. Close (2003). "The binding of maize DHN1 to lipid vesicles. Gain of structure and lipid specificity." **Plant Physiol** 131(1): 309-16.
- Koshland, D. E., Jr., W. J. Ray, Jr. and M. J. Erwin (1958). "Protein structure and enzyme action." **Fed Proc** 17(4): 1145-50.
- Kovacs, D., B. Agoston and P. Tompa (2008). "Disordered plant LEA proteins as molecular chaperones." **Plant Signalling & Behaviour**.
- Kovacs, D., E. Kalmar, Z. Torok and P. Tompa (2008). "Chaperone activity of ERD10 and ERD14, two disordered stress-related plant proteins." **Plant Physiol** 147(1): 381-90.
- Kriwacki, R. W., L. Hengst, L. Tennant, S. I. Reed and P. E. Wright (1996). "Structural studies of p21Waf1/Cip1/Sd1 in the free and Cdk2-bound state: conformational disorder mediates binding diversity." **Proc Natl Acad Sci U S A** 93(21): 11504-9.
- Kussie, P. H., S. Gorina, V. Marechal, B. Elenbaas, J. Moreau, A. J. Levine and N. P. Pavletich (1996). "Structure of the MDM2 oncoprotein bound to the p53 tumor suppressor transactivation domain." **Science** 274(5289): 948-53.
- Kuwajima, K., K. Nitta, M. Yoneyama and S. Sugai (1976). "Three-state denaturation of alpha-lactalbumin by guanidine hydrochloride." **J Mol Biol** 106(2): 359-73.
- Lisse, T., D. Bartels, H. R. Kalbitzer and R. Jaenicke (1996). "The recombinant dehydrin-like desiccation stress protein from the resurrection plant *Craterostigma plantagineum* displays no defined three-dimensional structure in its native state." **Biol Chem** 377(9): 555-61.
- Liu, J., H. Tan and B. Rost (2002). "Loopy proteins appear conserved in evolution." **Journal of Molecular Biology** 322: 53-64.
- Lynch, W. P., V. M. Riseman and A. Bretscher (1987). "Smooth muscle caldesmon is an extended flexible monomeric protein in solution that can readily undergo reversible intra- and intermolecular sulfhydryl cross-linking. A mechanism for caldesmon's F-actin bundling activity." **J Biol Chem** 262(15): 7429-37.
- Ma, J. (2000). "Stimulatory and Inhibitory Functions of the R Domain on CFTR Chloride Channel." **News Physiol Sci** 15: 154-158.

- Mayer, L. D., M. J. Hope and P. R. Cullis (1986). "Vesicles of variable sizes produced by a rapid extrusion procedure." **Biochim Biophys Acta** 858(1): 161-8.
- Megidish, T., J. H. Xu and C. W. Xu (2002). "Activation of p53 by protein inhibitor of activated Stat1 (PIAS1)." **J Biol Chem** 277(10): 8255-9.
- Mirsky, A. E. and L. Pauling (1936). "On the Structure of Native, Denatured, and Coagulated Proteins." **Proc Natl Acad Sci U S A** 22(7): 439-47.
- Modun, B., J. Morrissey and P. Williams (2000). "The staphylococcal transferrin receptor: a glycolytic enzyme with novel functions." **Trends Microbiol** 8(5): 231-7.
- Mouillon, J. M., P. Gustafsson and P. Harryson (2006). "Structural investigation of disordered stress proteins. Comparison of full-length dehydrins with isolated peptides of their conserved segments." **Plant Physiol** 141(2): 638-50.
- Nishimura, M., T. Yoshida, M. Shirouzu, T. Terada, S. Kuramitsu, S. Yokoyama, T. Ohkubo and Y. Kobayashi (2004). "Solution structure of ribosomal protein L16 from *Thermus thermophilus* HB8." **J Mol Biol** 344(5): 1369-83.
- Nylander, M., J. Svensson, E. T. Palva and B. V. Welin (2001). "Stress-induced accumulation and tissue-specific localization of dehydrins in *Arabidopsis thaliana*." **Plant Mol Biol** 45(3): 263-79.
- Ohki, S., E. Marcus, D. K. Sukumaran and K. Arnold (1994). "Interaction of melittin with lipid membranes." **Biochim Biophys Acta** 1194(2): 223-32.
- Oldfield, C. J., Y. Cheng, M. S. Cortese, C. J. Brown, V. N. Uversky and A. K. Dunker (2005). "Comparing and combining predictors of mostly disordered proteins." **Biochemistry** 44(6): 1989-2000.
- Pavletich, N. P. (1999). "Mechanisms of cyclin-dependent kinase regulation: structures of Cdks, their cyclin activators, and Cip and INK4 inhibitors." **J Mol Biol** 287(5): 821-8.
- Piatigorsky, J. (1998). "Gene sharing in lens and cornea: facts and implications." **Prog Retin Eye Res** 17(2): 145-74.
- Presutti, C., S. A. Ciafre and I. Bozzoni (1991). "The ribosomal protein L2 in *S. cerevisiae* controls the level of accumulation of its own mRNA." **EMBO J** 10(8): 2215-21.
- Rajkowitsch, L., K. Semrad, O. Mayer and R. Schroeder (2005). "Assays for the RNA chaperone activity of proteins." **Biochem Soc Trans** 33(Pt 3): 450-6.
- Ramagopal, S. and A. R. Subramanian (1974). "Alteration in the acetylation level of ribosomal protein L12 during growth cycle of *Escherichia coli*." **Proc Natl Acad Sci U S A** 71(5): 2136-40.
- Ramakrishnan, V. and S. W. White (1998). "Ribosomal protein structures: insights into the architecture, machinery and evolution of the ribosome." **Trends Biochem Sci** 23(6): 208-12.
- Romero, P., Z. Obradovic and A. K. Dunker (2004). "Natively disordered proteins: functions and predictions." **Appl Bioinformatics** 3(2-3): 105-13.
- Romero, P., Z. Obradovic, C. R. Kissinger, J. E. Villafranca, E. Garner, S. Guillot and A. K. Dunker (1998). "Thousands of proteins likely to have long disordered regions." **Pac. Symp. Biocomputing**, 3: 437-448.
- Rorat, T. (2006). "Plant dehydrins--tissue location, structure and function." **Cell Mol Biol Lett** 11(4): 536-56.
- Russo, A. A., P. D. Jeffrey, A. K. Patten, J. Massague and N. P. Pavletich (1996). "Crystal structure of the p27Kip1 cyclin-dependent-kinase inhibitor bound to the cyclin A-Cdk2 complex." **Nature** 382(6589): 325-31.
- Saji, S., N. Okumura, H. Eguchi, S. Nakashima, A. Suzuki, M. Toi, Y. Nozawa and S. Hayashi (2001). "MDM2 enhances the function of estrogen receptor alpha in human breast cancer cells." **Biochem Biophys Res Commun** 281(1): 259-65.

- Sambrook, J., E. F. Fritsch and T. Maniatis (1989). *Isolation of DNA from Mammalian Cells*. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sarkar, T., G. Mitra, S. Gupta, T. Manna, A. Poddar, D. Panda, K. P. Das and B. Bhattacharyya (2004). "MAP2 prevents protein aggregation and facilitates reactivation of unfolded enzymes." **Eur J Biochem** 271(8): 1488-96.
- Sedzik, J. and D. A. Kirschner (1992). "Is myelin basic protein crystallizable?" **Neurochem Res** 17(2): 157-66.
- Semrad, K., R. Green and R. Schroeder (2004). "RNA chaperone activity of large ribosomal subunit proteins from *Escherichia coli*." **Rna** 10(12): 1855-60.
- Shortle, D. (1996). "The denatured state (the other half of the folding equation) and its role in protein stability." **FASEB J** 10(1): 27-34.
- Sigler, P. B. (1988). "Transcriptional activation. Acid blobs and negative noodles." **Nature** 333(6170): 210-2.
- Slijper, M., R. Boelens, A. L. Davis, R. N. Konings, G. A. van der Marel, J. H. van Boom and R. Kaptein (1997). "Backbone and side chain dynamics of lac repressor headpiece (1-56) and its complex with DNA." **Biochemistry** 36(1): 249-54.
- Smoller, D., C. Friedel, A. Schmid, D. Bettler, L. Lam and B. Yedvobnick (1990). "The *Drosophila* neurogenic locus mastermind encodes a nuclear protein unusually rich in amino acid homopolymers." **Genes Dev** 4(10): 1688-700.
- Soulages, J. L., K. Kim, C. Walters and J. C. Cushman (2002). "Temperature-induced extended helix/random coil transitions in a group 1 late embryogenesis-abundant protein from soybean." **Plant Physiol** 128(3): 822-32.
- Strauss, G. and H. Hauser (1986). "Stabilization of lipid bilayer vesicles by sucrose during freezing." **Proc Natl Acad Sci U S A** 83(8): 2422-2426.
- Suzuki, C. K., M. Rep, J. M. van Dijl, K. Suda, L. A. Grivell and G. Schatz (1997). "ATP-dependent proteases that also chaperone protein biogenesis." **Trends Biochem Sci** 22(4): 118-23.
- Syme, C. D., E. W. Blanch, C. Holt, R. Jakes, M. Goedert, L. Hecht and L. D. Barron (2002). "A Raman optical activity study of rheomorphism in caseins, synucleins and tau. New insight into the structure and behaviour of natively unfolded proteins." **Eur J Biochem** 269(1): 148-56.
- Szebeni, A., K. Hingorani, S. Negi and M. O. Olson (2003). "Role of protein kinase CK2 phosphorylation in the molecular chaperone activity of nucleolar protein b23." **J Biol Chem** 278(11): 9107-15.
- Szebeni, A. and M. O. Olson (1999). "Nucleolar protein B23 has molecular chaperone activities." **Protein Sci** 8(4): 905-12.
- Thirumalai, D. and C. Hyeon (2005). "RNA and protein folding: common themes and variations." **Biochemistry** 44(13): 4957-70.
- Thorn, D. C., S. Meehan, M. Sunde, A. Rekas, S. L. Gras, C. E. MacPhee, C. M. Dobson, M. R. Wilson and J. A. Carver (2005). "Amyloid fibril formation by bovine milk kappa-casein and its inhibition by the molecular chaperones alphaS- and beta-casein." **Biochemistry** 44(51): 17027-36.
- Timsit, Y., F. Allemand, C. Chiaruttini and M. Springer (2006). "Coexistence of two protein folding states in the crystal structure of ribosomal protein L20." **EMBO Rep** 7(10): 1013-8.
- Tompa, P. (2002). "Intrinsically unstructured proteins." **Trends Biochem Sci** 27(10): 527-33.
- Tompa, P. (2003). "Intrinsically unstructured proteins evolve by repeat expansion." **Bioessays** 25(9): 847-55.

- Tompa, P. and P. Csermely (2004). "The role of structural disorder in the function of RNA and protein chaperones." **FASEB J** 18(11): 1169-75.
- Tompa, P., Y. Emori, H. Sorimachi, K. Suzuki and P. Friedrich (2001). "Domain III of calpain is a ca2+-regulated phospholipid-binding domain." **Biochem Biophys Res Commun** 280(5): 1333-9.
- Tompa, P., Z. Mucsi, G. Orosz and P. Friedrich (2002). "Calpastatin subdomains A and C are activators of calpain." **J Biol Chem** 277(11): 9022-6.
- Tompa, P., C. Szasz and L. Buday (2005). "Structural disorder throws new light on moonlighting." **Trends Biochem Sci** 30(9): 484-9.
- Torok, Z., I. Horvath, P. Goloubinoff, E. Kovacs, A. Glatz, G. Balogh and L. Vigh (1997). "Evidence for a lipochaperonin: association of active protein-folding GroESL oligomers with lipids can stabilize membranes under heat shock conditions." **Proc Natl Acad Sci U S A** 94(6): 2192-7.
- Tsay, Y. F., J. R. Thompson, M. O. Rotenberg, J. C. Larkin and J. L. Woolford, Jr. (1988). "Ribosomal protein synthesis is not regulated at the translational level in *Saccharomyces cerevisiae*: balanced accumulation of ribosomal proteins L16 and rp59 is mediated by turnover of excess protein." **Genes Dev** 2(6): 664-76.
- Umekawa, H., K. Sato, M. Takemura, Y. Watanabe, S. Usui, T. Takahashi, S. Yoshida, M. O. Olson and Y. Furuichi (2001). "The carboxyl terminal sequence of nucleolar protein B23.1 is important in its DNA polymerase alpha-stimulatory activity." **J Biochem** 130(2): 199-205.
- Uversky, V. N. (2002). "Natively unfolded proteins: a point where biology waits for physics." **Protein Sci** 11(4): 739-56.
- Uversky, V. N., J. R. Gillespie and A. L. Fink (2000). "Why are "natively unfolded" proteins unstructured under physiological conditions?" **Proteins** 41(3): 415-27.
- Uversky, V. N., S. Winter, O. V. Galzitskaya, L. Kittler and G. Lober (1998). "Hyperphosphorylation induces structural modification of tau-protein." **FEBS Lett** 439(1-2): 21-5.
- van den Berg, B., E. W. Chung, C. V. Robinson, P. L. Mateo and C. M. Dobson (1999). "The oxidative refolding of hen lysozyme and its catalysis by protein disulfide isomerase." **Embo J** 18(17): 4794-803.
- Watanabe, H., K. Takehana, M. Date, T. Shinozaki and A. Raz (1996). "Tumor cell autocrine motility factor is the neuroleukin/phosphohexose isomerase polypeptide." **Cancer Res** 56(13): 2960-3.
- Weinreb, P. H., W. Zhen, A. W. Poon, K. A. Conway and P. T. Lansbury, Jr. (1996). "NACP, a protein implicated in Alzheimer's disease and learning, is natively unfolded." **Biochemistry** 35(43): 13709-15.
- Wise, M. J. and A. Tunnacliffe (2004). "POPP the question: what do LEA proteins do?" **Trends Plant Sci** 9(1): 13-7.
- Wisniewskia, M., R. Webba, R. Balsamob, T. Closec, X. Yud and M. Griffithd (1999). "Purification, immunolocalization, cryoprotective, and antifreeze activity of PCA60: A dehydrin from peach (*Prunus persica*)." **Physiologica Plantarum** 105: 600-608.
- Wissmann, R., T. Baukrowitz, H. Kalbacher, H. R. Kalbitzer, J. P. Ruppersberg, O. Pongs, C. Antz and B. Fakler (1999). "NMR structure and functional characteristics of the hydrophilic N terminus of the potassium channel beta-subunit Kvbeta1.1." **J Biol Chem** 274(50): 35521-5.
- Woestenenk, E. A., G. M. Gongadze, D. V. Shcherbakov, A. V. Rak, M. B. Garber, T. Hard and H. Berglund (2002). "The solution structure of ribosomal protein L18 from *Thermus thermophilus* reveals a conserved RNA-binding fold." **Biochem J** 363(Pt 3): 553-61.

- Wool, I. G. (1996). "Extraribosomal functions of ribosomal proteins." **Trends Biochem Sci** 21(5): 164-5.
- Xu, W., K. Seiter, E. Feldman, T. Ahmed and J. W. Chiao (1996). "The differentiation and maturation mediator for human myeloid leukemia cells shares homology with neuroleukin or phosphoglucose isomerase." **Blood** 87(11): 4502-6.
- Yang, J., T. D. Hurley and A. A. DePaoli-Roach (2000). "Interaction of inhibitor-2 with the catalytic subunit of type 1 protein phosphatase. Identification of a sequence analogous to the consensus type 1 protein phosphatase-binding motif." **J Biol Chem** 275(30): 22635-44.
- Zhang, H., G. J. Hannon and D. Beach (1994). "p21-containing cyclin kinases exist in both active and inactive states." **Genes Dev** 8(15): 1750-8.
- Zhang, S., J. M. Scott and W. G. Haldenwang (2001). "Loss of ribosomal protein L11 blocks stress activation of the Bacillus subtilis transcription factor sigma(B)." **J Bacteriol** 183(7): 2316-21.
- Zhang, Z., H. Wang, M. Li, S. Agrawal, X. Chen and R. Zhang (2004). "MDM2 is a negative regulator of p21WAF1/CIP1, independent of p53." **J Biol Chem** 279(16): 16000-6.