

# **Doktori értekezés**

Kiss Róbert

2010

# **A kalpasztatin szerkezeti, dinamikai jellemzése és kötődés vizsgálata NMR spektroszkópiával**

Doktori értekezés

Kiss Róbert

Témavezető: Dr. Perczel András  
D.Sc., egyetemi tanár

Eötvös Lóránd Tudományegyetem  
Kémia Doktori Iskola  
Vezetője: Dr. Inzelt György egyetemi tanár

Szintetikus kémia, anyagtudomány, biomolekuláris kémia program  
Programvezető: Dr. Perczel András

Szerkezeti Kémia és Biológia Laboratórium  
ELTE Kémiai Intézet, Budapest

Budapest  
2010

# Tartalomjegyzék

<b>I</b>	<b>KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS</b>	<b>4</b>
<b>II</b>	<b>RÖVIDÍTÉSEK:</b>	<b>5</b>
<b>III</b>	<b>BEVEZETÉS, IRODALMI ÁTTEKINTÉS</b>	<b>6</b>
III.1	KALPAIN-KALPASZTATIN RENDSZER	6
III.2	RENDEZETLEN FEHÉRJÉK	11
III.3	RENDEZETLEN FEHÉRJÉK SPEKTROSKÓPIAI VIZSGÁLATA	15
III.3.1	<i>Fehérje szerkezet meghatározás</i>	15
III.3.2	<i>NMR jel-hozzárendelési stratégiák</i>	16
III.3.3	<i>Szerkezeti információk másodlagos kémiaieltolódás-értékekből</i>	25
III.3.4	<i>IUP-k dinamikai tulajdonságainak vizsgálata NMR spektroszkópiával</i>	27
III.3.5	<i>Spin-jelölés</i>	33
<b>IV</b>	<b>CÉLKITŰZÉSEK</b>	<b>34</b>
<b>V</b>	<b>ALKALMAZOTT MÓDSZEREK</b>	<b>35</b>
<b>VI</b>	<b>EREDMÉNYEK</b>	<b>39</b>
VI.1	A SZABAD KALPASZTATIN FORMÁK JELHOZZÁRENDELÉSE	39
VI.2	FIZIKAI ÉS KÉMIAI TULAJDONSÁGOK VIZSGÁLATA	40
VI.3	A KALPASZTATIN MOLEKULA SZERKEZETI TULAJDONSÁGAI	41
VI.4	H <sup>13</sup> CSD <sup>1</sup> SZERKEZETI TULAJDONSÁGAINAK VIZSGÁLATA KÉMIAI ELTOLÓDÁS-ÉRTÉKEK ALAPJÁN	44
VI.5	A SZABAD H <sup>13</sup> CSD <sup>1</sup> MOLEKULA DINAMIKAI JELLEMZÉSE	47
VI.6	KÖTŐDÉSVIZSGÁLAT	51
<b>VII</b>	<b>ÖSSZEFOGLALÁS</b>	<b>57</b>
<b>VIII</b>	<b>IRODALOMJEGYZÉK</b>	<b>60</b>
VIII.1	AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK	65
VIII.2	EGYÉB KÖZLEMÉNYEK	65
<b>IX</b>	<b>FÜGGELÉK</b>	<b>66</b>

# I **Köszönetnyilvánítás**

Elsőként szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek dr. Perczel Andrásnak, hogy biztosította számomra a hatékony kutatómunka feltételeit, irányította munkámat és lehetővé tette tapasztalataim, eredményeim hazai és külföldi közlését. Köszönöm továbbá dr. Hóllósi Miklósnak és dr. Hudecz Ferencnek, az Eötvös Loránd Tudományegyetem Szerves Kémia Tanszékének korábbi és jelenlegi tanszékvezetőjének segítő támogatását.

Köszönöm dr. Tompa Péternek, dr. Ságiné Házy Eszternek, dr. Kovács Dénesnek, dr. Bozóky Zoltánnak a kalpasztatin és kalpain variánsok előállítását és a fehérjékkel kapcsolatos hasznos tanácsokat.

Köszönet az analitikai vizsgálatokért dr. Bai Katalin Boglárkának, dr. Szabó Ildikónak, dr. Schlosser Gittának, dr. Horváti Katának, dr. Tölgycsényi Péternek és dr. Szoboszlai Norbertnek.

A kalpasztatin szerkezetének kalciumfüggésével kapcsolatos NMR mérésekben nyújtott segítségüket köszönöm dr. Rüdiger Weisemannak és dr. Dvortsák Péternek.

Köszönöm továbbá az ELTE Kémiai Intézete Szerkezeti Kémia és Biológia Laboratórium minden tagjának a kellemes munkakörnyezetet.

Végül de nem utolsó sorban köszönöm Feleségemnek és családomnak a végtelen türelmet és támogatást, amellyel munkámat segítették.

## II Rövidítések:

C', Ca, Cβ:	karbonil-, α- és β-szénatomok
CD:	<b>C</b> ircular <b>D</b> icroysm
COSY:	<b>C</b> ORrelation <b>S</b> pectroscopy
EDTE:	<b>E</b> tilén- <b>d</b> iamin- <b>N,N,N',N'</b> - <b>t</b> etraacetsav
H <sup>NH</sup> , Hα, Hβ:	amid-, α- és β hidrogénatomok
hCSD1:	<b>H</b> uman <b>C</b> alpastatin <b>D</b> omain <b>I</b>
hCSD1 <sup>67-141</sup> :	<b>H</b> umán <b>C</b> alpastatin I Doménjének <b>P</b> <sup>67</sup> - <b>K</b> <sup>141</sup> régiója
hCSD1_Ca <sup>2+</sup> :	<b>H</b> uman <b>C</b> alpastatin <b>D</b> omain I fehérje 10 mM Ca <sup>2+</sup> -t tartalmazó oldata
HNCA:	<b>H</b> ydrogen- <b>N</b> itrogen- <b>C</b> alpha correlation spectroscopy
HNCACB:	<b>H</b> ydrogen- <b>N</b> itrogen- <b>C</b> alpha- <b>C</b> beta correlation spectroscopy
HNCO:	<b>H</b> ydrogen- <b>N</b> itrogen- <b>C</b> arbonil correlation spectroscopy
HN(CA)CO:	<b>H</b> ydrogen- <b>N</b> itrogen-( <b>C</b> alpha)- <b>C</b> arbonil correlation spectroscopy
HN(CO)CA:	<b>H</b> ydrogen- <b>N</b> itrogen-( <b>C</b> arbonil)- <b>C</b> alpha correlation spectroscopy
HN(CO)CACB:	<b>H</b> ydrogen- <b>N</b> itrogen-( <b>C</b> arbonil)- <b>C</b> alpha- <b>C</b> beta corr. spectroscopy
HSQC:	<b>H</b> eteronuclear <b>S</b> ingle- <b>Q</b> uantum <b>C</b> orrelation spectroscopy
IPTG:	<b>I</b> sopropyl β-D-1- <b>t</b> hiogalactopyranoside
IR:	<b>I</b> nfra <b>R</b> ed spectroscopy
IUP:	<b>I</b> ntrinsically <b>U</b> nstructured <b>P</b> rotein (eredendően rendezetlen fehérje)
IDP:	<b>I</b> ntrinsically <b>D</b> ynamic <b>P</b> rotein (eredendően dinamikus fehérje)
MS:	<b>M</b> ass spectroscopy
NMR:	<b>N</b> uclear <b>M</b> agnetic <b>R</b> esonance spectroscopy
NOESY:	<b>N</b> uclear <b>O</b> verhauser effect <b>S</b> pectroscopy
RC:	<b>R</b> andom coil resonance value
RDF:	<b>R</b> educed <b>D</b> ensity <b>F</b> unction theory
S <sup>2</sup>	Rend paraméter
SAXS:	<b>S</b> mall angle <b>X</b> -ray scattering spectroscopy
SDS-PAGE:	<b>S</b> odium- <b>d</b> odecil-sulfate <b>p</b> olyacrilamide <b>g</b> el electrophoresis
SCS:	<b>S</b> econdary <b>C</b> hemical <b>S</b> hift
SDF:	<b>S</b> pectral <b>D</b> ensity <b>F</b> unction
TOCSY:	<b>T</b> otal <b>C</b> orrelation spectroscopy

### III Bevezetés, irodalmi áttekintés

A molekuláris biológia egyik alapvetése szerint a fehérjék működésének nélkülözhetetlen feltétele a rendezett, jól definiálható magasabb rendű térszerkezet. Az utóbbi években egyre több olyan fehérje vált ismertté melyek rendezett térszerkezet hiányában is jelentős bioaktivitást mutatnak. Az angolszász nevük alapján ezeket a biopolimereket az *IUP/IDP* (**I**ntrinsically **U**nstructured/**D**ynamic **P**rotein) névvel szokták illetni.

Sőt sok esetben a rendezetlenség funkciójuk elengedhetetlen feltétele is. Az elsődleges vagy aminosavszekvencián alapuló szerkezetjézőlő módszerekkel rámutattak arra, hogy a különböző proteomokban az aminosavak akár 20-30%-a is lehet rendezetlen konformációs állapotú {Dunker, A.K. és mts. 2002}, mely fehérjék igen gyakran jelátviteli folyamatokban vesznek részt.

Téralkatukra jellemző a konformációk dinamikus egyensúlya, ami leginkább a rendezett fehérjék denaturált állapotához hasonlítható. Bizonyított, hogy teljesen rendezetlen állapot nem létezhet {Dunker, A.K. és mts. 2002}, továbbá hogy sok esetben akár jelentős másodlagos szerkezeti elemek is felismerhetők ezekben az *IUP/IDP* rendszerekben. Még a fokozott dinamikai tulajdonságok leszűkíthetik ezen molekulák diffrakciós alapon nyugvó szerkezetvizsgálási lehetőségét, addig az NMR atomszintű információt szolgáltat a rendezetlen fehérjék dinamika és szerkezeti tulajdonságairól.

Dolgozatomban a kalpasztatin molekula vizsgálatán keresztül mutatom be azokat a ma használatos és modern NMR eljárásokat, amelyekkel lehetővé vált ezen új és fokozottan mozgékony molekulatípus vizsgálata. Bemutatom, hogy a jelhozzárendelés ismeretében hogyan követhető egyszerű NMR kísérletekkel nyomon a fizikai és kémiai környezet szerkezetbefolyásoló hatása az *IUP/IDP* molekulák esetében. Részletezem továbbá a molekula szerkezeti és dinamikai jellemzőit, és végül kitérek a kalpain-kalpasztatin kötődés NMR vizsgálatára. A legfontosabb eredményeinket két nemzetközi folyóiratban tettük közzé. {Kiss, R. és mts. 2007; Kiss, R. és mts. 2008}

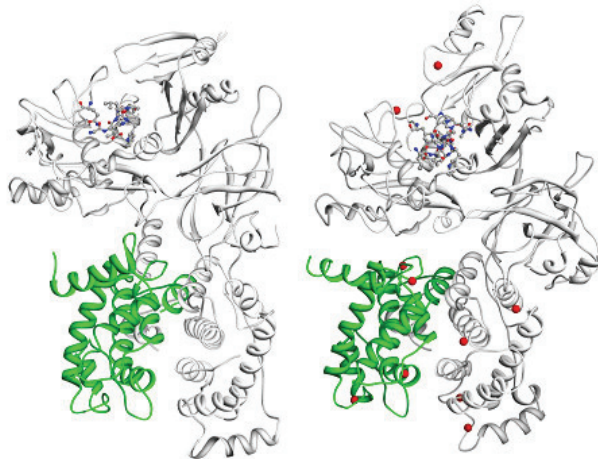
#### III.1 Kalpain-kalpasztatin rendszer

A kalpasztatin molekula vizsgálatával 2005-ben kezdtem foglalkozni doktori képzésem

keretében, mikor az MTA Enzimológiai Intézetéből Tompa Péter és Kovács Dénes kereste meg csoportunkat, hogy a humán kalpasztatin 1. domén 74 aminosavas C-terminális szakaszának (hCSD1<sup>67-141</sup>) szerkezetét vizsgáljuk NMR spektroszkópiai módszerekkel. A kezdeti eredményeken felbuzdulva később a teljes hCSD1 domén jelhozzárendelését és NMR dinamikai jellemzését elvégeztük, valamint a kalpainhoz való kötődését vizsgáltuk.

A kalpain egy intracelluláris cisztein endo proteáz (EC# 3.4.22.52 ill. 3.4.22.53) melynek a gerincesek között számtalan izoformája ismert. {Goll, D.E. és mts. 2003} A  $\mu$ - és m-kalpain általánosan előfordul, még pl. a p94 vagy p82, szövet specifikus fehérjék. Két leggyakrabban előforduló formája a  $\mu$ - illetve m-kalpain, aktivitását neutrális pH-n, redukáló környezetben megfelelő kalciumkoncentráció mellett fejt ki. A  $\mu$ - mikro az m-kalpain mili moláris mennyiséget igényel megfelelő működéséhez. A két alegységből álló heterodimerben a 28 kDa kis alegység szabályozó funkciót lát el és mindkét kalpain típusban azonos, még a 80 kDa nagy alegység, amely az aktív centrumot tartalmazza a két típusban 55-56%-os szekvencia homológiát mutat. Mindkét alegység tartalmaz egy kalmodulinnal homológiát mutató kalcium-kötő domént, mely kalcium kötésének kulcsszerepe van az enzim aktiválódásában. Eukariótákban közönséges és limitált proteolízissel részt vesz többek között olyan alapvető sejtfunkciók szabályozásában, mint sejtosztódás, differenciálódás és sejtmozgás {Goll, D.E. és mts. 2003}. A kalpain szabályozás hiánya többféle betegség kialakulásában játszik szerepet, mint *catartact*, izomsorvadás és cukorbetegség.

A molekula több röntgenszerkezete ismert különféle ligandumokkal, valamint kalcium és kalciummentes formában (1. ábra). {Moldoveau, T. és mts. 2008; Srtobl, S. és mts. 2000}.

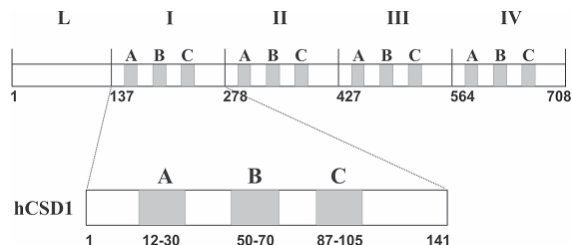


**1. ábra.** Az m-kalpain apo- és holo-formájának röntgenszerkezete jelentős szerkezeti eltéréseket mutat. A kis alegységet zöld, a 80 kDa-os alegységet fehér, míg az apo forma  $\text{Ca}^{2+}$  ionjait piros színnel jelöltem, továbbá az aktív centrum oldalláncait kiemeltem.

A kalpain egyetlen ismert specifikus endogén fehérje-inhibitora a kalpasztatin {Wendt, A. és mts. 2004}. Ez egy nem szövet-specifikus rendezetlen fehérje, mennyisége lokálisan legtöbbször meghaladja a kalpainét. {Farkas, A. és mts. 2004}. *Takashi Musachi* 1979-ben izolálta izom extraktumokból a kalpainnal együtt és nevezte el kalpasztatinnak. A kalpasztatint *Tompa P.* a rendezetlen fehérjéken belül az *effektorok* csoportjába sorolja {Tompa, P. és mts. 2002}. Az effektorok esetében a nagy felületen való kötődés képessége valamint a több kötőhely a reakció specifitását növeli és csökkenti a kötése erősség befolyását a kötődésre. A rendezetlen fehérjék esetében a kötődés sebességét jelentősen befolyásolja, hogy a molekula milyen gyorsan találja meg a kötődéshez szükséges térszerkezetet. A rendezetlenségből adódó nagy mozgékonyaság biztosítja, hogy rövid idő alatt a konformációs tér több pontját bejárhassa. Továbbá a hatékony szabályozását is lehetővé teszi a nyújtott konformációból adódó proteolízis érzékenység.

A kalpasztatin funkcionális szempontból 5 doménre osztható. Az L-domén szerepe még kevésbé ismert, az ezt követő 4 (I, II, III, IV) homológ gátló domén egy-egy kalpain molekula gátlására képes {Emori, Y. és mts. 1988; MA, H. és mts. 1994; Maki, M. és mts. 1989}. Munkánk nagy részében a kalpasztatin 1 gátló doménjével dolgoztunk és a továbbiakban hCSD1-ként fogok rá hivatkozni (2. ábra).





**2. ábra.** A humán kalpasztatinban 5 különböző domént különíthetünk el. Az L domén funkciója még nem ismert, míg a I. II. III. IV. domének külön-külön is képesek gátolni egy-egy kalpint. Mind a négy inhibitor domén három szekvenciálisan konzervált régiót tartalmaz. Az A- ill. C-alegységek a molekula kalpainhoz való kötődéséért felelősek, még a B-szubdomén fejt ki a gátló hatást.

A gátló doménekben belül három szekvenciálisan konzervált rövidebb szakasz azonosítható (A, B, C funkcionális alegység vagy szubdomén). Részletes biokémiai vizsgálatok alapján tudjuk, hogy elsősorban ezek a szakaszok felelősek a kalpasztatin kalpainhoz való kötődéséért és az enzim gátlásáért. {Yang, H.Q. és mts. 1994} A három szubdomén közül az A(S<sup>12</sup>-G<sup>30</sup>) és a C(S<sup>87</sup>-C<sup>105</sup>) (számozás az 2. ábra kiemelt szakasza alapján) Ca<sup>2+</sup>-függő módon kapcsolódik a kalpainhoz és feltehetően a molekula lehorgonyzásáért felelős. {Goll, D.E. és mts. 2003} A gátló hatást a B(M<sup>50</sup>-R<sup>70</sup>)-szubdomén fejt ki úgy, hogy az enzim aktív centrumához kötődve kompetitíven gátolja a szubsztrátok hozzáférését. {Branca, D. és mts. 2004} Az egyes funkcionális alegységek szerepét pont mutációs kísérletekkel bizonyították (1. táblázat). {Crawford, C. és mts. 1993; Croall, D.E. és mts. 1994}

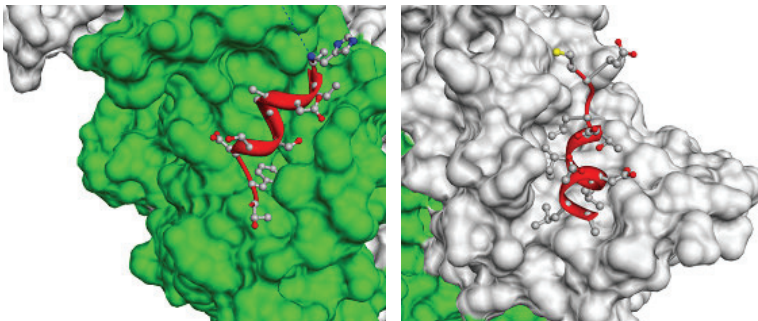
**1. táblázat. Néhány az irodalomból ismert hCSD1 mutáns bioaktivitás és a kalpainhoz való kötődési/gátlási képesség megváltozásának százalékos értéke. A kontrollmolekula a humán kalpasztatin 1-es doménje (hCSD1).**

Mutációk	Mutáció helye a hCSD1-ben	Kalpain gátlási képesség %-ban, a hCSD1 molekulához viszonyítva	Kalpain kötési képesség %-ban a hCSD1 molekulához viszonyítva
Kontroll 137-272	-1-135	100	84
L <sup>236</sup> P	L <sup>99</sup> (C szubdomén)	93	68
L <sup>161</sup> P	L <sup>24</sup> (A szubdomén)	85	7
L <sup>161</sup> P/L <sup>236</sup> P	L <sup>24</sup> , L <sup>99</sup> (A és C szubdomén)	65	0
ΔT <sup>201</sup> -R <sup>207</sup>	T <sup>64</sup> -R <sup>70</sup> (B szubdomén)	45	82
L <sup>161</sup> P/L <sup>236</sup> P/ΔT <sup>201</sup> -R <sup>207</sup>	L <sup>24</sup> , L <sup>99</sup> , T <sup>64</sup> -R <sup>70</sup> (A, B és C szubdomén)	0	0
ΔM <sup>187</sup> -A <sup>211</sup>	M <sup>50</sup> -A <sup>74</sup> (B szubdomén)	0	80
ΔT <sup>201</sup> -P <sup>204</sup>	T <sup>64</sup> -P <sup>67</sup> (B szubdomén)	46	-
ΔK <sup>196</sup> -L <sup>209</sup>	K <sup>59</sup> -L <sup>72</sup> (B szubdomén)	39	-
Szekvencia darab: D <sup>185</sup> -A <sup>211</sup>	D <sup>18</sup> -A <sup>74</sup> (kiterjesztett B szubdomén)	50	0
Szekvenciadarab: S <sup>152</sup> -K <sup>197</sup>	S <sup>15</sup> -K <sup>60</sup>	38	66
Mutáció a B szubdoménben		Maradék kalpain aktivitás 0,1 μM-ban használva	
G <sup>196</sup> E	G <sup>59</sup>	71%	
P <sup>203</sup> T	P <sup>66</sup>	< 2%	
Y <sup>206</sup> L	Y <sup>69</sup>	5%	
R <sup>207</sup> Q	R <sup>70</sup>	3%	

A mutációk által okozott funkcióvesztés módosulások jelentős patológiai elváltozásokat okoznak. {Branca, D. és mts. 2004, Zatz, M. és mts. 2005} A kötődés hatékonysága jellemzően az A- és C-alegység mutációjával csökkenthető, még a gátlási képességére főképp a B-szubdomén mutáció voltak hatással. Habár a kötődő szakaszok fizikai szétválasztása az enzimkötődés erősödéséhez vezet, molekula egészének kötődése

biztosítja a folyamat specificitását.

Ismert továbbá, hogy az A- és C-szubdomének az enzimhez való kötődés során helikális konformációt vesznek fel (3. ábra).



**3. ábra.** A kalpasztatin A (K<sup>14</sup>-G<sup>30</sup> piros hélix jobbra) és C (S<sup>87</sup>-C<sup>105</sup> piros hélix balra) alegységei a kalpainhoz való kötődés során helikális konformációt vesznek fel (pdb kód: 3NX0). A kalpain nagy alegységét fehér, míg a kis alegységét zöld színnel jelöltem.

A kalpasztatin előzetes vizsgálatok alapján, erősebben kötődik a kalpainhoz, mint szubsztrátja. Ez a tény igen gyors a feltekeredést feltételez a molekula részéről. A molekula C- és A-alegységei kötött állapotban helikális szerkezetűek és szabad állapotban is bizonyos valószínűséggel  $\alpha$ -helikális szerkezetet vesznek fel. CD mérésekkel megállapították, hogy szabad állapotban az A- és C-szubdomén már alacsony 16%-25% TFE hatására is helikális konformációt vesz fel. {Konno, T. és mts. 1997}

Ezek a mérések rámutattak arra, hogy az előre kialakuló szerkezeti elemeknek fontos szerepe lehet a kötődési konformáció gyors elérésében, valamint szerepe lehet a felismerésben vagy felismerő motívumként vagy megelőlegezi a kötött állapotot. {Fuxreiter, M. és mts. 2004}.

### III.2 Rendezetlen fehérjék

A Biokémia egyik fontos alapvetése a fehérje szerkezet-hatás összefüggés alapján a fehérje szekvencia meghatározza a molekula magasabb rendű szerkezetét, valamint a fehérje funkció feltétele a 3D szerkezet. A *Kulcs-Zár* hipotézist, 1893-ban különböző fehérjéken végzett kísérletei alapján, *Emil Fisher* írta le először. Kísérletei során

különböző enzimekkel hasított  $\alpha$  illetve  $\beta$  glikozidos kötéseket. 1930-ig nyilvánvalóvá vált, hogy a globuláris fehérjék elveszítik biológiai aktivitásukat, ha az oldatbeli környezetük megváltozik (sókoncentráció, hőmérséklet, stb). 1925-ben *Anson és Mirsky* sikeresen renaturáltak denaturált hemoglobint ezzel megerősítve, hogy a natív és denaturált állapotok termodinamikailag különböznek. Ez a kísérlet vezetett oda, hogy kimondják a funkció feltétele a magasabb rendű fehérje szerkezet. Egész pontosan az a felismerés miszerint a fehérjének van szerkezete, hisz azt le lehet rombolni. *Amfinsen* ribonukleáz enzimmel végzett denaturációs kísérletei alapján megállapította, hogy adott környezetben a fehérje szekvencia meghatározza a legkisebb energiájú, natív konformációt. *Merrifield* és kollegái szilárdfázison fehérjeszintézissel állítottak elő natív ribonukleázt, ezzel is megerősítve azt a feltételezést, amely alapjára fehérje szekvencia meghatározza a magasabb rendű fehérjeszerkezetet. Hamarosan elterjedt az a feltételezés, hogy a legtöbb fehérje natív vagy denaturált termodinamikai állapotban létezhet. 1960 *Kendrew és Perutz* röntgen kristallográfia segítségével meghatározták a mioglobint és hemoglobint atomi szintű szerkezetét. A kísérletek segítettek megérteni, hogy a kialakult és ismert hélix és redő szerkezetek hogyan formálnak natív konformációt. 1965-ben *Philips* megoldotta a lizozim szerkezetét és az inhibitor pozíciójából, meghatározta az aktív centrum pontos helyét és konformációját. Kiderült az oldalláncok precíz orientációja a katalízis kulcsa. Mindezeket összevetve úgy tűnt a kérdés lezárult: minden fehérje natív állapotban rendelkezik biológiai aktivitással és stabil harmadlagos szerkezettel, ezért az aktivitás feltétele a szerkezet. {Daughdrill, G.W. és mts. 2002}

Azonban korán felmerültek kétségek a tétellel kapcsolatban. Előfordult, hogy a kristály szerkezetekben a funkcióhoz nélkülözhetetlenek hitt loopok koordinátái hiányoztak, és NMR adatokból is ismertek voltak olyan fehérjék melyek biológiai aktivitásához nem társul szerkezet.

A szerkezet-funkció elméletet erősítette az is, hogy sokáig elválasztási nehézségek miatt csak globuláris fehérjéket izoláltak expressziós rendszerekből és csak a 80-as évektől sikerült térszerkezettel nem rendelkező fehérjéket előállítani {Williams, R.J. és mts. 1978}. Ezek a fehérjék túlélték az ún. *cellular soup*ot, azaz sikerült megakadályozni a proteolízist az elválasztás korai szakaszában. A humán genom feltérképezése világított rá igazából a rendezetlen fehérjék – *Intrinsically unstructured protein (IUP)* –biológiai jelentőségére.

Szerkezetjóló módszerekkel kimutatták, hogy az ismert rendezetlen vagy részben rendezetlen fehérjeszakaszok előfordulása a fejlettebb élőlényekben meghaladja a 30 %-ot. {Uversky, V.N., 2002; Tompa, P., 2002 Trends Biochem. Sci.} Sokszor a biológiai

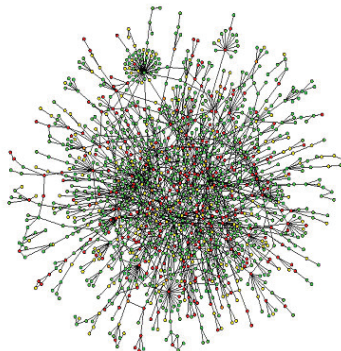
funkció közvetlenül a rendezetlen részhez kapcsolódik, más esetekben közvetett összefüggés tapasztalható. {Lacy, E.R. és mts. 2004}

A „rendezetlen szerkezet” megértéséhez el kell mondanunk, hogy még a rendezettség szerkezeti és termodinamikai állapot egyben, addig a rendezetlenség kizárólag termodinamikai állapot. A rendezett fehérje mintában minden egyes molekula, kisebb fluktuációktól eltekintve, azonos egyensúlyi szerkezettel rendelkezik. Ellenben a natív rendezetlen fehérjemolekulák dinamikusan változó konformer együttesek időben változó *Ramachandram* szögekkel equilibrium értékek nélkül. {Dyson, H.J. és mts. 2002}

Az *IUP*-kat sokszor *random coil* szerkezetekkel jellemzik, habár ilyen szerkezetet még erős denaturációs körülmények között sem tudtak előállítani. Számos példa bizonyítja, hogy rendezetlen molekulák nem járják be a teljes konformáció teret, sőt egyes szerkezeti elemeket preferálhatnak. Ezt a képet az  $\alpha$ -*synuclein* esetében kísérletek, valamint MD számítások eredményeként kapott hidrodinamikai sugárértékek összevetésével is alátámasztották. {Eliezer, D. és mts. 2001} *IUP*-kban a másodlagos szerkezeti elemek létezését többször bizonyították szerkezetjóló módszerekkel és *cirkuláris dikroizmus (CD)* mérésekkel {Mucsi, Z. és mts. 2003}.

Az irodalomban a rendezetlen szakaszok számos elnevezése található meg, mint *flexibile, mobile, partially folded, natively denaturated, natively unfolded, intrinsically unstructured* és *intrinsically disordered*.

A rendezetlenségből származó előnyök és tulajdonságok többek között a proteolízis érzékenység, multipartneritás, nagy felületű kötődés, specifikus és gyenge kötődés. {Tompá, P., 2002 Trends Biochem. Sci.}. Szerkezeti adottságaikból kifolyólag, az *IUP*-k a fehérje-kölcsönhatási hálózatok ún. HUB pozícióiban nagy gyakorisággal fordulnak elő (4. ábra). {Uversky V.N., 2002}



**4. ábra.** Az élesztőgomba fehérje-kölcsönhatási hálózatában a teljes fehérjeállomány majd 30%-a rendezetlen. A rendezetlen fehérjeszakaszok gyakoriak, az un. „HUB” vagy csomóponti-fehérjék között, amelyek egyszerre akár több partnermolekulával is képesek kölcsönhatásba lépni. {Uversky V.N., 2002}

Az *IUP*-kra jellemző fizikai-kémiai tulajdonság a nagy hőstabilitása, *SDS-PAGE* (*sodium-dodecil-sulfate polyacrilamide gel electrophoresis*) mutatott mozgékonyasága és proteolízis érzékenysége. Az *IUP*-k gazdagok rendezetlenséget generáló (A, R, G, Q, S, P, E, K) és szegények szerkezetstabilizáló aminosavakban (W, C, F, I, Y, V, L, N), ami alapul szolgál a szekvenciális információkból dolgozó, rendezetlenséget jósoló programok működéséhez {Oldfield, C.J. és mts. 2005; Fuxreiter, M. és mts. 2004}.

Szerkezeti tulajdonságokból adódóan, és az eukariótákban meghatározó mennyiségük alapján, a jelátviteli és szabályozási folyamatokban az *IUP*-k szerepe jelentős. A jelátviteli folyamatokban résztvevő fehérjék 66%-a, a szabályozásban résztvevők 82%-a tartalmaz hosszabb rendezetlen szakaszokat. {Cheng, Y. és mts. 2006}

Szerepük a humán betegségben is jelentős. A rákbetegséghez köthető fehérjék 1,7-6,5-ször nagyobb mennyiségben tartalmaznak rendezetlen szakaszokat, mint az egyéb ismert proteinek. {Iakoucheva, L.M. és mts. 2002} A kardiovaszkuláris betegségekhez köthető kb. 480 fehérje, több mint 60%-a tartalmaz hosszabb rendezetlen szakaszokat. Az átlagtól való eltérés főleg a jelátadási folyamatokban résztvevő fehérjékre korlátozódik. Az autoimmun betegségekben, nagy mennyiségben előforduló autoantigének feltűnően gazdagok rendezetlen régiókban.

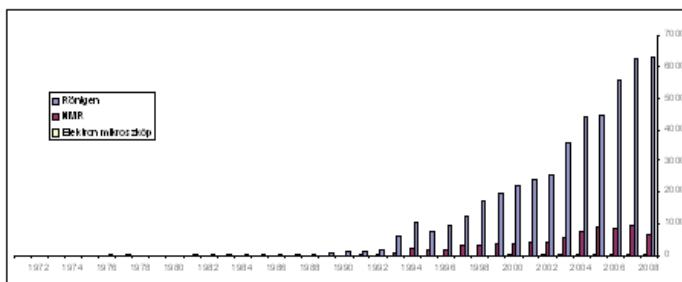
A rendezetlen fehérjék a kötődési kölcsönhatás során részben vagy egészben rendezett szerkezetet vesznek fel. A molekuláris felismerésben egy rövid szakasz vesz részt, ritkább a két kötődő régió.

### III.3 Rendezetlen fehérjék spektroszkópiai vizsgálata

A rendezetlen fehérjék dinamikai és szerkezeti vizsgálata fehérjekémiai szempontból érdekes kérdésekre adhat választ. Az *IUP*-k felismerésére és jellemzésére használt módszerek közül a *CD* spektroszkópiában az *U* típusú spektrumok nyújtanak információt a rendezetlenség mértékéről [Fassman, G.D., 1996]. Emellett meg kell említeni a kisszögű röntgenszórást (*SAXS*), a hidrodinamikai méréseket, *IR* spektroszkópiát, fluoreszcens módszereket, konformációs stabilitásvizsgálatokat, a tömegspektroszkópiát (*MS*), proteáz érzékenység vizsgálatokat valamint a különféle szekvencia alapú predikciós módszereket [Ward, J.J. és mts. 2004]. A fenti módszerekre jellemző, hogy a molekulára globálisan jellemző szerkezeti információt nyújtanak. Atomi vagy aminosav szintű információt a röntgenkristallográfia, elektronmikroszkópos módszerek valamint az *NMR* adhatnak.

#### III.3.1 Fehérje szerkezet meghatározás

A fehérjék szerkezet-meghatározásának egyértelműen legelterjedtebb módszere a röntgenkristallográfia. A *Brookhaven Protein Data Bank* (*PDB*)-ban elhelyezett fehérjeszerkezetek közel 90%-át ezzel a módszerrel határozták meg 2009-ig. Ezzel szemben az *NMR*-rel meghatározott szerkezetek száma az összes szerkezet kevesebb, mint 10%-a. (5. ábra) Az eltérés egyik oka lehet, hogy még az *NMR* szerkezet-meghatározást időigényes és méretbeli korlátai vannak, addig amennyiben sikerült a fehérjét kristályosítani a szerkezet meghatározása „rutinszerű” feladat.



5. ábra. A *Brookhaven Protein Data Bank*-ba (*PDB*) feltöltött és különböző módszerekkel meghatározott fehérjeszerkezetek számának alakulása napjainkig. A rendezett fehérjeszerkezetek meghatározásának legfontosabb eszköze még ma is a röntgenkristallográfia és nem az *NMR*-spektroszkópia. (A fenti ábrán az értékek kizárólag a rendezett vagy részben rendezett szerkezetekre vonatkoznak.)

Az interferogramm felépülésének és a röntgen szerkezet-meghatározásnak az előfeltétele a megfelelő minőségű kristály, melyben a fehérjemolekulák azonos atomjai az egyes elemi cellák azonos koordinátájú pontjaiban helyezkednek el. Ez a feltétel nem teljesül, amikor rendezett fehérje egy szerkezeti egysége (domén) a molekulán belül végez domén mozgásokat csukló-szerű régiók segítségével. A fehérje röntgenszerkezetekben a hiányzó elektronsűrűség oka, a natív rendezetlenség mellett, un *wobbling domain*-ek statikus-, illetve dinamikus rendezetlensége lehet. A statikus rendezetlenség során az adott régió más-más konformációban rögzül a kristályosítás során, még a dinamikus rendezetlenségben az adott régió folyamatosan mozog a kristályban. A statikus rendezetlenség nem függ a hőmérséklettől, még a dinamikus rendezetlenség a hőmérséklet csökkentésével „megfagyhat” egy adott konformációban. Az *IUP*-k szempontjából fontos, hogy mindkét esetben az elektronhiányos szakaszok „merev” konformációval rendelkeznek, és un csukló (hinge) régió segítségével változtatják a relatív pozícióikat a kristálycellán belül (*wobbling domain*). A fent leírtak alapján a röntgenkrisztallográfia önmagában nem képes megkülönböztetni a natív rendezetlen régiókat a *wobbling domain*-től. Fehérjemolekulák rendezetlen régiói és a teljesen rendezetlen fehérjék, hasonlóan az előző példához nem látszanak az elektronsűrűség eloszlási térképen, mivel elemi cellánként különböző konformációban kristályosodnak. A röntgenkrisztallográfiára jellemző továbbá, hogy a kristályokban a molekulák az oldatfázistól jelentősen eltérő módon „fagyott” állapotban vannak, ekkor a kisebb molekulamozgásokat a B faktorrall jellemezhetjük. Ezzel szemben az NMR méréseket oldatfázisban a natív állapothoz hasonló körülmények között végezhetjük, és lehetőségünk van a molekula dinamikai tulajdonságait is atomi szinten vizsgálni. {Daughdrill, G.W. és mts. 2002}

### **III.3.2 NMR jel-hozzárendelési stratégiák**

A röntgenkrisztallográfia mellett a fehérjeszerkezet vizsgálatának legelterjedtebb eszköze az NMR spektroszkópia. Az NMR spektroszkópia előnye az előbbivel szemben, hogy oldatfázisban a természeteshez nagyon hasonló környezetben vizsgálhatók a molekulák, továbbá azok dinamika tulajdonságai jól követhetőek mért paraméterek alapján. Az előnyök mellett a hátránya a jelentős mintaigény és a molekulaméretbeli korlátok. Jelenleg ismert NMR módszerekkel a legnagyobb vizsgált fehérjeméret ~30 kDa {Yu, H. 1999}. Ez a korlát a molekulaméret miatti jelszélesedés miatt lép fel, és az NMR *hardver* fejlődésével ez a határ csak kismértékben tolható ki.

Mivel az *IUP*-k szerkezetét különböző időskálájú mozgásokkal, dinamikus



egyénbe alakuló konformációkkal írhatjuk le, azok röntgenkrisztallográfiával csak korlátozottan vizsgálhatóak. Az NMR azonban a mérhető dinamikai paramétereken keresztül atomi szintű információt szolgáltat a rendezetlen fehérjék szerkezeti és dinamikai jellemzőiről. Ahhoz azonban hogy a nagymennyiségű szerkezeti és dinamikai információhoz hozzájuthassunk, mindennek előtt el kell végeznünk az NMR spektrum jeleinek azonosítását. A jelhozzárendelés vagy *assignáció* során, az egyes NMR aktív magok kémiaieltolódás-értékeit határozzunk meg.

A ma ismert fehérje-jelhozzárendelési stratégiák kidolgozásáért *Kurt Wütrich* kapott 2002-ben Nobel-díjat. Többféle *assignációs* és szerkezet meghatározási módszert fejlesztett rövidebb peptidok és nagyobb fehérjék vizsgálatára. Dolgozatomban három mérés-technikai alapon elkülönülő módszert említek meg: a homonukleáris, az  $^{15}\text{N}$  jelölésen alapuló, valamint az  $^{15}\text{N}$  és  $^{13}\text{C}$  jelölésen alapuló technikákat. Bővebben az utóbbi kettő ismertetésére térek ki. A számunkra megfelelő jelhozzárendelési stratégia kiválasztásában elsősorban a molekula méret és a szerkezetből adódó NMR relaxációs tulajdonságok és a rendelkezésre álló mérési idő a meghatározóak.

### **Homonukleáris módszerek**

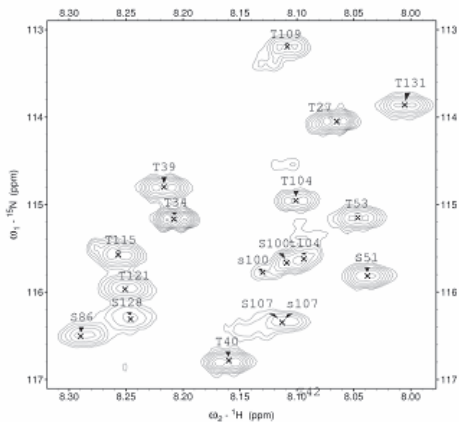
20 aminosavnál rövidebb fehérjék esetében, jó eredménnyel használhatóak a 2D homonukleáris technikák. A módszer legfontosabb kísérletei a homonukleáris COSY, TOCSY, NOESY mérések. A COSY valamint a TOCSY mérésekkel meghatározhatjuk a spinrendszereket, még a NOESY spektrumokból a szekvenciális NOE csúcsok felhasználásával, elvégezhetjük a szekvenciális jelhozzárendelést.

A kizárólag a  $^1\text{H}$  magok mérésén alapuló technikák, azaz homonukleáris módszerek kísérleti alapja az, hogy a hidrogén leggyakoribb izotópjá maga is NMR aktív mag. A fehérjékben leggyakrabban előforduló atomok (nitrogén és szén) természetes izotóp előfordulás mellett NMR vizsgálatra korlátozottan alkalmasak.

A rekombináns fehérjekifejeztetési módszerek fejlődésével lehetővé vált, természetes izotóppszététel mellett nehezen vizsgálható  $^{13}\text{C}$  és  $^{15}\text{N}$  magok külön-külön vagy együttes beépítése a molekulákba. A 20 aminosavnál hosszabb fehérjeláncok esetében a jelek nagy száma, a jelszélesedés és a jelátfedések miatt, a 2D-homonukleáris spektrumok az jelhozzárendelésre nem alkalmasak. A molekulák szén és nitrogénatomjainak NMR-aktív  $^{15}\text{N}$  és  $^{13}\text{C}$  magokra cserélésével a spektrumok kiterjeszhetőek további dimenziókba, kihasználva ezen rezonanciák jobb jeldiszperzióját és vonalszélességét.

## $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ Heteronuclear Single Quantum Correlation ( $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ HSQC) spektrum

Az izotóp jelölésen alapuló jelhozzárendelési stratégia alapvető eszköze a  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spektrum {Piotto, M. és mts. 1992}, melyben a fehérje egyes amid- vagy amin csoportjához, egy-egy csúcs rendelhető (6. ábra). Az amid-protonok a fehérjegerinc mentén helyezkednek el ezért az kémiaieltolódás-értékek igen érzékenyek a fehérje konformációjára. A legtöbb kémiai vagy biológiai folyamatban az aktív centrum amidcsoportjainak hidrogén és nitrogén atomjai is érintettek, ezért a  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spektrumok felhasználhatók fehérje kölcsönhatási kísérletekben. A fehérjekémiaiában gyorsasága valamint egyszerűsége miatt elterjedt módszer adja az alapját a 3D heteronukleáris technikák jelentős részének.

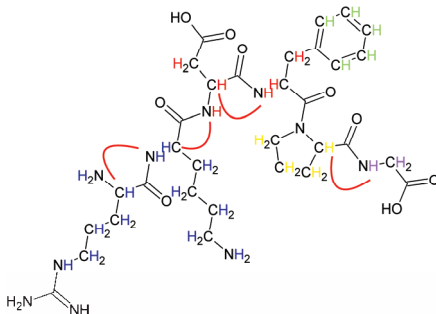


6. ábra. A hCSD1 molekula  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spektrumának egy kiemelt részlete. A spektrumban minden egyes csúcs egy-egy aminosav amidcsoportjához rendelhető. A függőleges tengelyről a  $^{15}\text{N}$ -, míg a vízszintes tengelyről a  $^1\text{H}$  NMR kémiaieltolódás-értékek olvashatók le.

### 3D ( $^1\text{H}$ , $^{15}\text{N}$ , $^1\text{H}$ )-HSQC-TOCSY mérések

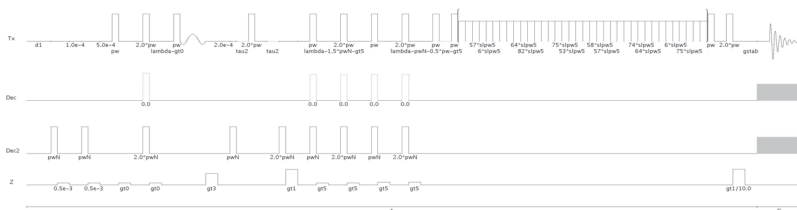
Spinrendszerekbe az egymással skaláris csatolások hálózatán keresztül kapcsolatban lévő protonokat soroljuk. A fehérjeláncban jellemzően a peptidkötés karbonilcsoportjai határolnak egy-egy aminosavhoz tartozó spinrendszert (7. ábra). A legtöbb aminosavra elmondható, hogy az amid-,  $\text{H}\alpha$ - illetve  $\text{H}\beta$ -hidrogének egy spinrendszerbe tartoznak. A prolin és glicin kivétel ez alól, mivel az előbbinél az  $\text{H}^{\text{NH}}$ , az utóbbinál a  $\text{H}\beta$ -protonok

hiányoznak. A többi aminosav további két csoportra osztható asszerint, hogy a  $\gamma$ -szénatomhoz kapcsolódik-e hidrogénatom.



7. ábra. Az eltérő színekkel jelölt hidrogénatomok azonos spinrendszerbe tartoznak és a 3D  $\{^1\text{H}, ^{15}\text{N}, ^1\text{H}\}$ -HSQC-TOCSY spektrumokban a spinrendszerhez tartozó amid-proton kémiaieltolódás-értékénél jelennek meg. A glicin  $\beta$ -protonok hiányában könnyen felismerhető, míg a prolin amid-proton hiánya miatt nem azonosítható. A vonalak a szekvenciális NOE kölcsönhatásokat jelölik, ezek segítségével a spinrendszerek sorba állíthatók és a primer szekvenciával összevetve azonosíthatók.

$^{15}\text{N}$  izotóp dúsított mintákat használva rögzíthetünk 3 dimenziós 3D  $\{^1\text{H}, ^{15}\text{N}, ^1\text{H}\}$ -HSQC-TOCSY spektrumokat (Mori, S. és mts. 1995).



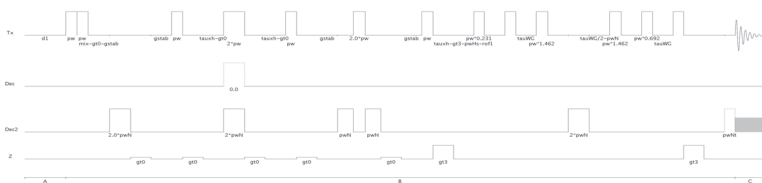
8. ábra. Egy 3D  $\{^1\text{H}, ^{15}\text{N}, ^1\text{H}\}$ -HSQC-TOCSY tipikus pulzusszekvencia sematikus rajza.

Ezekben a spektrumokban, a mágneseztséget az amid-hidrogénről az amid-nitrogénre visszük, majd korreláltatjuk a spinrendszerhez tartozó hidrogénrezonanciákkal. Szemléletesen a  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spektrum, amid-csúcsainak pozíciójában a 3. dimenzióban keresztcsúcsok jelennek meg az adott aminosav spinrendszeren belüli hidrogénjeinek kémiaieltolódás-értékénél. Az egyes aminosavakra meghatározott empirikus kémiaieltolódás-értékek felhasználásával, gyakran a primer fehérjeszekvencia egyes tagjai

a fenti mérés alapján azonosíthatóak vagy az esetek nagy részében csoportokba sorolhatóak. Ezzel az információval a HSQC spektrum megfelelő csúcsait osztályozhatjuk a spinrendszerek alapján.

### 3D $\{^1\text{H}, ^{15}\text{N}, ^1\text{H}\}$ -HSQC-NOESY mérések

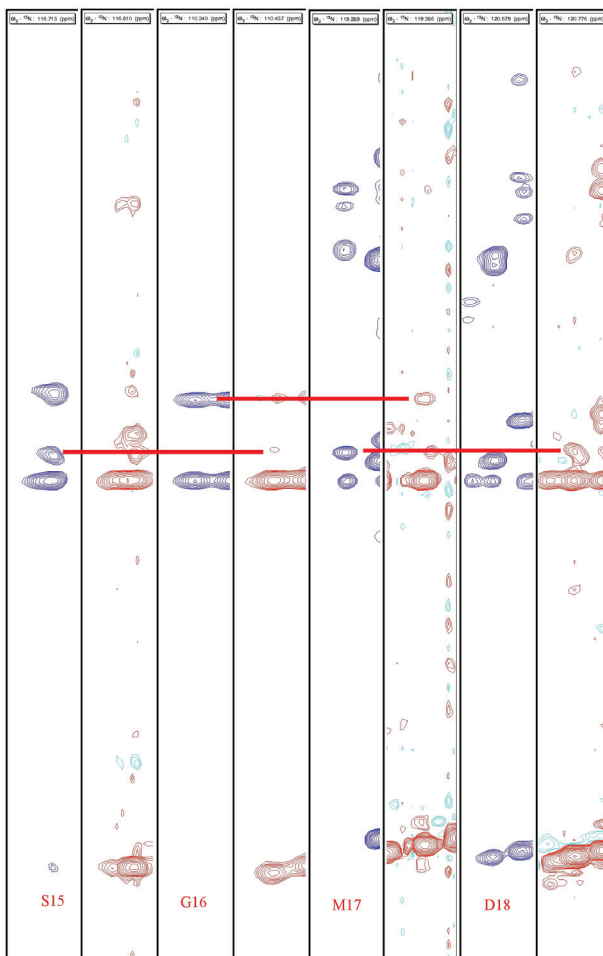
A peptidkötés sajátossága, hogy egy aminosav HN illetve az öt megelőző szomszédja  $\text{H}\alpha$  magjai egymástól minden konformáció esetén a karakterisztikus NOE távolságon ( $\leq 5 \text{ \AA}$ ) belül vannak. Ezek az úgynevezett szekvenciális NOE-k a jelhozzárendelésben fontos szerepet játszanak. A 3D  $\{^1\text{H}, ^{15}\text{N}, ^1\text{H}\}$ -HSQC-NOESY mérések során az amid-hidrogénekre szelektív tranziens NOESY spektrumot veszünk fel úgy, hogy az amid-protonokat besugározzuk, majd korreláltatjuk a kapcsolódó amid-nitrogénnel. {Talluri, S., és mts 1996}



**9. ábra.** Egy tipikus 3D  $\{^1\text{H}, ^{15}\text{N}, ^1\text{H}\}$ -HSQC-NOESY pulzusszekvencia sematikus rajza.

Szemléletesen a  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC csúcsok pozíciójában a 3. dimezióban keresztcsúcsok jelennek meg az amid-hidrogénektől  $5 \text{ \AA}$  távolságon belüli  $^1\text{H}$  magok kémiaieltolódás-értékeinél. A peptidkötés tulajdonságából adódik, hogy a spektrumokban az egyes aminosavak amidcsúcsainak pozíciójában keresztcsúcs jelenik meg az őket megelőző aminosav  $\text{H}\alpha$  kémiai rezonanciafrekvenciájánál. (10. ábra)

Ha a 3D  $\{^1\text{H}, ^{15}\text{N}, ^1\text{H}\}$ -HSQC-TOCSY mérésekből ismerjük a spinrendszereket és azok  $\text{H}\alpha$  kémiaieltolódás-értékeit, segítségével a szekvenciális hozzárendelést a 3D  $\{^1\text{H}, ^{15}\text{N}, ^1\text{H}\}$ -HSQC-NOESY spektrumok alapján elvégezhetjük. A 3D  $\{^1\text{H}, ^{15}\text{N}, ^1\text{H}\}$ -HSQC-TOCSY mérésekből származó kémiaieltolódás-értékek és a 3D  $\{^1\text{H}, ^{15}\text{N}, ^1\text{H}\}$ -HSQC-NOESY-ból gyűjtött szekvenciális NOE-k alapján a spinrendszerek hosszabb rövidebb szakaszokba rendezhetőek ezeket, a szakaszokat a primer szekvenciához illeszthetjük és így az egyes  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC-csúcsok az aminosavakhoz rendelhetőek (10. ábra).



10. ábra. A spinrendszerek azonosításához használt szalagok, melyek a 3D  $\{^1\text{H}, ^{15}\text{N}, ^1\text{H}\}$ -HSQC-TOCSY és 3D  $\{^1\text{H}, ^{15}\text{N}, ^1\text{H}\}$ -HSQC-NOESY spektrumok szuperonálása során nyerhetők. A „vetületek” a  $N^{\text{HN}}$  rezonanciafrekvenciái alapján az elsődleges szekvencia szerint vannak sorbarakva. Az amid-protonokhoz tartozó spinrendszerek kémiaieltolódás-értékei leolvashatóak és a spinrendszerek csoportosíthatók a „TOCSY szalagok” alapján. A NOESY spektrumok tartalmazzák azt a szekvenciális információt (piros vonalak), amelyek alapján a spinrendszerek sorba rendezhetők.

A 3D  $\{^1\text{H}, ^{15}\text{N}, ^1\text{H}\}$ -HSQC-TOCSY és 3D  $\{^1\text{H}, ^{15}\text{N}, ^1\text{H}\}$ -HSQC-NOESY méréseken alapuló módszerek jól alkalmazhatóak rendezett fehérjék esetében, ahol a hidrogének

rezonanciafrekvenciái jelentős eltéréseket mutatnak, és a szekvenciális NOE keresztcsúcsok mellett távoli-NOE-k is segítik az jelhozzárendelést.

Az *IUP*-k esetében az aminosavak kémiai környezete kiátlagolódik, gyakorlatilag a fehérjelánc különböző részein elhelyezkedő azonos típusú aminosavak szinte azonos  $H_{\alpha}$  kémiaieltolódás-értékeket mutatnak, továbbá a gyorsan változó szerkezet miatt a távoli-NOE-k többnyire hiányoznak. A jelhozzárendelés során így csak a szekvenciális NOE-kra hagyatkozhatunk, ami az alacsony eltolódásérték különbségek miatt nehézségeket okozhat.

A fenti problémákat orvosolhatja, hogy a minták  $^{15}\text{N}$  és  $^{13}\text{C}$  együttes izotópjelölésével lehetőségünk nyílik a szén rezonanciák vizsgálatára is. A szénkorrelációs mérésekben az amid-protonról a mágnesezettséget előbb az amid-nitrogénre majd a kiválasztott szénatomra vagy atomokra visszük, és a hidrogénrezonancián detektálunk. A skaláris  $J(\text{H}^{\text{NH}}-\text{C})$  csatolási állandók alapján választhatók ki a mérendő szénatomok, melyek például  $\text{C}'$  (HNCO);  $\text{C}_{\alpha}$  (HNCA) vagy  $\text{C}_{\alpha}/\text{C}_{\beta}$  (HNCACB) lehetnek. A kiválasztott szénatom rezonanciafrekvenciájánál, a spektrum 3. dimenziójában keresztcsúcsok jelennek meg. A legelterjedtebb duplajelölt technikák között megemlíthetjük a HNCO/HN(CA)CO, HNCA/HN(CO)CA illetve HNCACB/HN(CO)CACB módszereket.

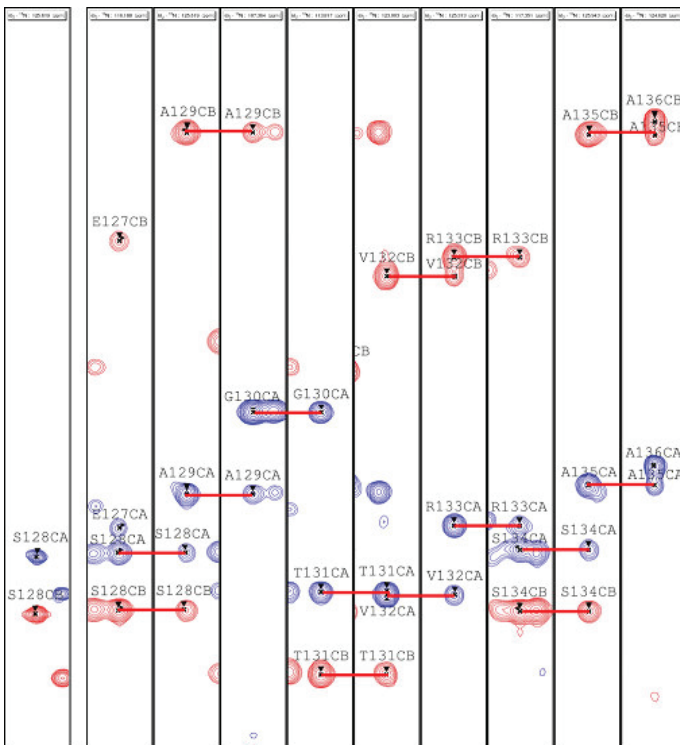
### **HNCO, HN(CA)CO mérések**

A HNCO mérések {Yamazaki, T. és mts. 1994} során az amid-protonról a mágnesezettséget előbb az amid-nitrogénre, majd **i** illetve az **i-1** aminosav karbonilcsoportjára visszük át. A módszert kiegészítő HN(CA)CO {Yamazaki, T. és mts. 1994} kísérletben a mágnesezettséget az amid-nitrogén után csak az előző aminosav (**i-1**) karbonilcsoportjára visszük át. A spektrum-párból így leolvasható egy aminosav saját és a szekvenciában öt megelőző aminosav karbonilcsoportjának kémiaieltolódás-értéke.

### **HNCA/NH(CO)CA és HNCACB/HN(CO)CACB módszerek**

A fentiekben leírtakhoz analóg módon a HNCA illetve HNCACB pulzusszekvenciákban {Yamazaki, T. és mts. 1994} az **i**, és **i-1**. aminosav  $\text{C}_{\alpha}$  illetve  $\text{C}_{\alpha}/\text{C}_{\beta}$  atomjára, még a megfelelő komplementer mérésekben (HN(CO)CA illetve HN(CO)CACB) csak az **i-1**. szomszédos aminosav megfelelő atomjaira kerül a mágnesezettség. A fenti mérések segítségével a  $^{15}\text{N}$ - $^1\text{H}$  HSQC csúcsokhoz hozzárendelhetőek az aminosav és öt megelőző szomszédjának megfelelő  $\text{C}'$ ,  $\text{C}_{\alpha}$  és  $\text{C}_{\beta}$

rezonanciafrekvenciái, és ezek alapján a HSQC csúcsok sorba rendezhetők. (11. ábra)

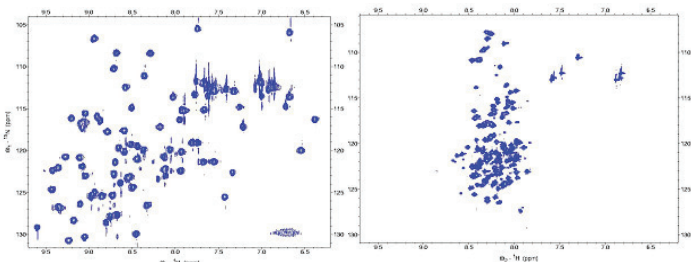


**11. ábra.** A kép bal oldali első szalagja a hCSD1 HN(CO)CACB spektrumának metszetét mutatja az A<sup>129</sup> aminosavhoz tartozó N<sup>HN</sup> kémiaieltolódás-érték mentén. A megjelenő csúcsok az S<sup>128</sup> C $\alpha$  és C $\beta$  rezonanciafrekvenciáinál jelentkeznek. A következő szalagok a HNCACB spektrum megfelelő metszetei. Minden egyes szalag megfeleltethető egy-egy csúcshoz a <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQC spektrumban. A csúcsok az adott és az azt megelőző aminosav C $\alpha$ - illetve C $\beta$ - kémiaieltolódás-értékénél jelennek meg.

A fehérjékben található NMR aktív magok rezonanciafrekvenciáit az aminosav kovalens szerkezete, a szomszédos aminosavak minősége mellett az oldószer kölcsönhatás és egyéb, az elektronsűrűséget befolyásoló hatások határozzák meg. Fontos szerepet kapnak a feltekeredés közben térbeli közelségbe kerülő lokális mágneses tereket indukáló csoportok is (aromás, erősen dipoláris csoportok). A fehérje felgombolyodása befolyásolhatja e hatások súlyát a kémiaieltolódás-értékek alakulásában. A feltekeredett fehérjék központi magjából a vízmolekulák kizáródnak, még a molekula más részein az

oldószer könnyen hozzáférhet a magokhoz. A feltekeredés során az aromás vagy dipoláris csoportokat hordozó oldalláncok a szekvenciában távoli aminosavak közelébe kerülhetnek. A másodlagos szerkezeti elemek jelentős rezonanciafrekvenciát befolyásoló hatása a fehérjegerincben előforduló magokat érinti leginkább.

A fentiek alapján a rendezett és rendezetlen fehérjékben a kémiaieltolódás-értékeket befolyásoló tényezők közül más-más súllyal jutnak az egyes hatások szerephez. Még a rendezett fehérjékben a rezonanciafrekvenciákat az előbbieken felsorolt hatások mind jelentősen befolyásolják, az *IUP*-k esetében a nyújtott konformáció miatt a legtöbb aminosav közvetlenül érintkezik az oldószerrel, a mozgékonyág miatt a szerkezeti tényezők hatása kiátlagolódik ezért eltolódásértékeik az úgynevezett *random coil* értékekhez közelítenek {Dyson, H.J., 2005}. Térszerkezet hiánya miatt az azonos aminosavak kémiaieltolódás-értékeit leginkább a kovalens szerkezet határozza meg, amit egyrészt az aminosav típusa, másrészt a szomszédos aminosavak minősége definiál. A fentiek következménye, hogy a rendezett fehérjék  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spektrumában a jelek szélesebb tartományt fednek le, mint a hasonló méretű rendezetlen fehérjék esetében, ezért a  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spektrum a rendezetlenség egyszerű indikátorai. (12. ábra)

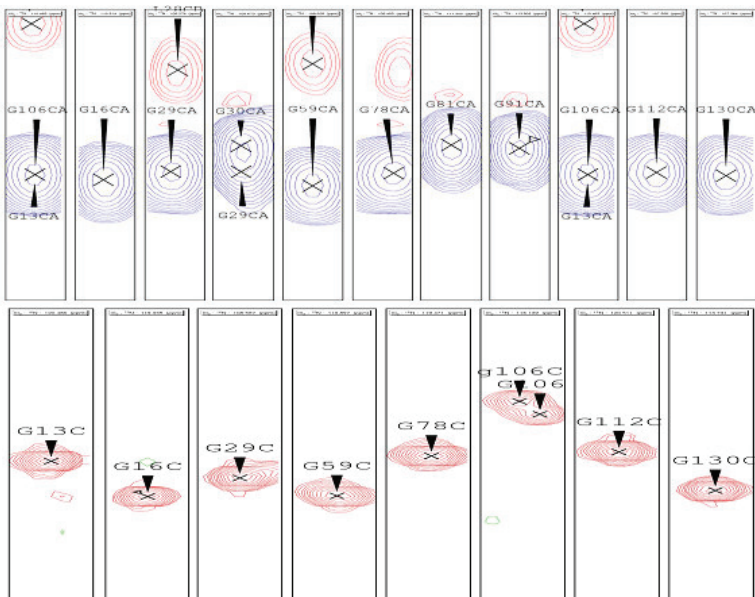


**12. ábra.** Míg a rendezett fehérjéké (pl. CCP2 baloldali ábra) tágabb, addig az olyan rendezetlen fehérjéké mint a hCSD1  $\text{H}^{\text{NH}}$  és  $\text{N}^{\text{NH}}$  keresztcsúcsai szűkebb  $^1\text{H}$ -frekvenciatartományban találhatóak. A fentiek alapján egy fehérje rendezetlenségének jó indikátora lehet a molekula  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spektruma.

A magok rezonanciafrekvenciáit egy rendezetlen fehérje esetében leginkább a szekvenciális szomszédok befolyásolják, és ez a hatás a fehérjegerinc atomja, a  $\text{N}^{\text{NH}}$ ,  $\text{H}^{\text{NH}}$  illetve a karbonil-szén ( $\text{C}'$ ) rezonanciafrekvenciák esetében érvényesül leginkább. A  $\text{H}\alpha$  rezonanciafrekvenciák az azonos típusú aminosavakban kevésbé jelentős eltéréseket mutatnak. Ez nehézséget jelent a HSQC-NOESY módszer használatában, mivel a spinrendszerek sorbarendezését csak a szomszédos aminosavak közötti, úgynevezett



szekvenciális-NOE-k, ( $H\alpha(i-1)-H^{NH}(i)$ ) alapján végezhetjük. A HNCA és HNCACB spektrumok alkalmazásakor is hasonló problémával kerülünk szembe, mivel a  $C\alpha$  és  $C\beta$  kémiaieltolódás-értékek egy aminosav típuson belül kis eltéréseket mutatnak. A fenti módszerekkel mérhető rezonanciafrekvenciák közül a legnagyobb jeldiszperziót a  $N^{HN}$  és  $C'$  értékek mutatják.(13. ábra)



13. ábra. A kalpastatin glicinjeinek  $^{13}C\alpha$  kémiaieltolódás-értékei csak csekély mértékben térnek el (fent), míg ugyanezen aminosavak  $C'$  kémiaieltolódás-érték jeldiszperziója jelentős mértékű.

Gyakorlati tapasztalat azt mutatja, hogy a  $C'$  rezonanciafrekvenciák jeldiszperziója miatt a HNC(O)/HN(CA)CO spektrumok kiemelt szerepet kapnak a rendezetlen fehérjék jelhozzárendelése során.

### III.3.3 Szerkezeti információk másodlagos kémiaieltolódás-értékekből

Az NMR spektrumokból kiolvasható egyik elsődleges információ a kémiaieltolódás-érték, mely szoros összefüggésben van a fehérje szerkezetével. A térszerkezettől független, úgynevezett *random coil* (RC) eltolódásértékeinek meghatározásával {Wishart, D.S. és mts. 1991; Braun, D. és mts. 1994; Merutka, G. és mts. 1995} mód nyílt

az egyes másodlagos szerkezeti elemek és a kémiaieltolódás-értékek közötti összefüggések vizsgálatára.

A mért kémiaieltolódás-értékek és a kísérletileg meghatározott *RC* értékek különbsége adja a másodlagos kémiai eltolódás értéket (*Secondary Chemical Shift SCS*). Ismert, hogy a  $\text{Ca}$ ,  $\text{Ha}$  és  $\text{C}\beta$  magok jeldiszerzióját érinti leginkább a másodlagos szerkezeti elemek típusa. Pozitív  $\text{Ca}$  és  $\text{C}'$  valamint negatív  $\text{Ha}$  *SCS* értékek  $\alpha$ -hélixekre, még a fordítottja a  $\beta$ -redőkre utal {Wishart, D.S. és mts. 1991}. A minél magasabb *SCS* értékek ( $\text{SCS}_{\text{Ca}} > 2$  ppm) a másodlagos szerkezeti elem stabilitásának jelei. A *IUP*-k szerkezete több konformáció súlyozott dinamikus egyensúlyával írható le, ahol az egyes állapotok közötti átmenet az NMR időskáláján gyors és a mért rezonanciafrekvenciák a konformációs állapotokhoz tartozó kémiaieltolódás-értékek súlyozott átlaga. Kémiaieltolódás-értékek a *RC* értékekhez közelítenek, így *SCS* értékek alacsonyabbak rendezett társaikénál.

A másodlagos kémiai eltolódások (*SCS: Secondary Chemical Shift*) vizsgálata során kísérletileg meghatározott kémiai eltolódásértékeket vetjük össze az irodalomban leírt *random coil (RC)* értékekkel, szekvenciális korrekciók figyelembevételével. Az irodalomból ismert *RC* érték többnyire a denaturáció módjában és az alkalmazott modellpeptidekben térnek el. Alkalmazásukkor fontos figyelembe venni, hogy a mérési körülményeink és a *RC* meghatározásának körülményei lehetőleg minél jobban hasonlítsanak.

Ahhoz, hogy az értékek tisztán a szerkezeti viszonyokat tükrözzék, meg kell szabadulni a szekvenciális szomszédok kémiaieltolódás-értéket befolyásoló hatásaitól. Ilyen szekvencia korrekciós probléma például a prolinok előtti aminosavat jellemző jelentős pozitív  $\text{Ha}$  és  $\text{Ca}$  eltolódás. A szekvencia korrekcióra két elterjedt módszert ismerünk {Schwarzinger, S. és mts. 2000, Wishart D., S. és mts. 1994}. A *Wishart* által kidolgozott módszer csak a szomszédos prolinok kémiaieltolódás-értékeket befolyásoló hatását veszi figyelembe, még *Schwarzinger* munkája az adott aminosavat megelőző és követő 2-2 aminosav hatásával is számol.

A  $\text{Ca}$ ,  $\text{C}\beta$ ,  $\text{C}'$ ,  $\text{H}^{\text{NH}}$ ,  $\text{N}^{\text{HN}}$   $\text{Ha}$   $\text{H}\beta$  magok a legtöbb aminosavban előfordulnak, ezek mért kémiaieltolódás-értékeinek a *RC* értéktől való eltérését vizsgáljuk a *SCS* analízis során. Az *SCS* értékekből származtatható az *Chemical-shift index (CSI)*, amivel a térszerkezet becslés megbízhatóságát javíthatjuk. {Wishart, D., S. és mts. 1994}

Ismertek olyan *IUP*-k, melyek konformációs állapotai között vannak a funkcióhoz

nélkülözhetetlen, ismert másodlagos szerkezeti elemek {Csizmok, V. és mts. 2005}. Ezeket a szerkezeteket a másodlagos kémiaieltolódás-értékeken keresztül vizsgálhatjuk {Dyson, H., J. 1988}. Az *IUP*-k jellemző másodlagos kémiaieltolódás-értékei az őket generáló szerkezeti elemek statisztika súlyának megfelelően alacsonyabbak (*SCS\_Ha*: ~0,5 ppm), mint a rendezett fehérjékben (*SCS\_Ha*: ~3 ppm).

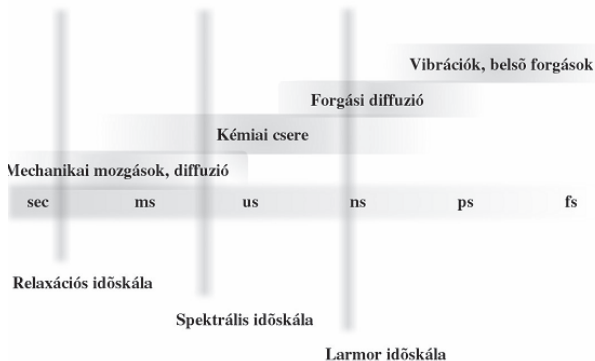
Mivel a kémiaieltolódás-értékek függenek a molekula térszerkezetétől, a molekulát érő fizikai és kémiai változások követhetők rajtuk keresztül. Ilyen változások lehetnek a pH vagy a hőmérséklet változása, de akár a molekulakötődés is. A  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spektrumban minden csúcs egy amid (vagy amin) csoporthoz tartozik és „vándorlásuk a spektrumban” a fehérjegerincet érintő változások indikátora.

### **III.3.4 IUP-k dinamikai tulajdonságainak vizsgálata NMR spektroszkópiával**

Az NMR mérések során az atommagok spinállapotai közötti átmeneteket gerjesztjük. Relaxációnak nevezzük azt a folyamatot, amikor a magspinek a gerjesztett állapotból visszajutnak az egyensúlyi állapotba. A spontán relaxáció lassú folyamat, valószínűsége  $W \approx 10^{-21} \text{ s}^{-1}$ . A  $1/2$ -spinű magok relaxációját elsősorban a  $B_0$  térre merőlegesen oszcilláló lokális mágneses terek okozzák. Oldatfázisban a fehérjéket felépítő atommagok környezetében mikroszkopikus és változó mágneses tereket hoznak létre a *dipól-dipól kölcsönhatások (DD)*, a *kémia eltolódás anizotrópiájának* jelensége (CSA), valamint a *spin-forgások*. A fenti kölcsönhatások az atommagokhoz kötöttek, ezért azok a változó mozgások, amelyek a magok egymáshoz vagy a  $B_0$  térhez viszonyított helyzetét megváltoztatják, és időskálájuk összevethető a *Larmor*-időskálával relaxációt okoznak. Az *Larmor*-frekvenciákkal összevethető időskálájú mozgásokra igaz, hogy a mozgásra jellemző korrelációsidő ( $\tau$ ) és az érintett mag *Larmor*-frekvenciája ( $\omega_0$ ) nagyságrendileg összevethető.

$$|\omega_0 \tau| \cong 1$$

Protonok relaxációja esetében, 500 MHz-en ez jellemzően 0,27-0,33 ns időskálájú mozgásokat jelent. Ebbe a tartományba esnek a kémiai csere (ns-ms), a rotációs diffúzió (ps-ns) és a vibrációs belső mozgások (ps). (14. ábra)



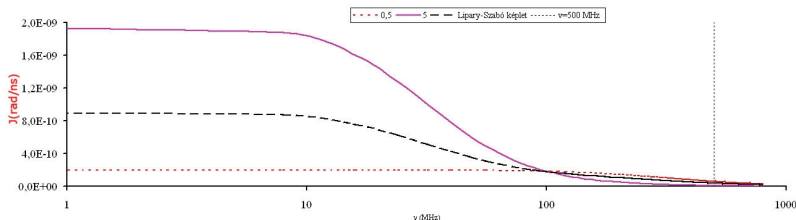
**14. ábra.** A relaxációt befolyásoló mozgások és az NMR időskálák viszonyának sematikus kapcsolata. A *Larmor*-frekvenciákkal összevethető időskálájú mozgások a kémiai csere (ns-ms), a rotációs diffúzió (ps-ns) és a vibrációs belső mozgások (ps) befolyásolják a relaxációs folyamatok sebességét.

A relaxációt befolyásoló mozgások  $B_0$  térre merőleges komponenseinek frekvencia eloszlását a spektrális sűrűségfüggvény ( $J(\omega)$ ) írja le. A fehérjék NMR dinamikai jellemzése során mérhető relaxációs paraméterek ( $T_1$ ,  $T_2$ , het-NOE) felhasználásával meghatározzuk a spektrális sűrűségfüggvényt, majd mozgási modellek felhasználásával a molekula belső és külső mozgásait jellemző korrelációs időket. {Lipari, G. és mts. 1982}

A spektrális sűrűség függvény megmutatja azon mozgások frekvencia eloszlását, amelyek hatással vannak a relaxációra. Mervek kismolekulák relaxációját többnyire a forgási diffúzió határozza meg és a spektrális sűrűségfüggvény egyetlen korrelációs idővel írható le. Ekkor az ún. *single motion* kritérium teljesül és a spektrális sűrűségfüggvény a következő formára egyszerűsödik:

$$J(\omega) = \frac{2}{5} \frac{\tau}{1 + (\omega\tau)^2}$$

ahol  $\tau$  a forgási diffúzió korrelációs ideje. Gyors mozgásokat (kismolekulák forgási diffúziója, belső mozgások) rövidebb, még lassabb mozgásokat (nagyobb molekulák forgási diffúziója, kémiai csere) hosszabb  $\tau$  érték jellemez. A korrelációs idő befolyásolja a spektrális sűrűségfüggvény alakját is. (15. ábra) Rövidebb korrelációs idővel a  $J(\omega)$  a frekvencia tartomány nagy részében egyenletes eloszlást mutat, még növekedő korrelációs idővel a lassabb mozgások gyakorisága jelentősen megnő.



15. ábra. Amenyiben a spektrális sűrűség függvényt egyetlen korrelációs idővel jellemezhetjük, a molekulaméret és forgási korrelációs idő ( $\tau=5$  ns) növekedésével az alacsonyabb frekvenciájú mozgások dominanciája jellemző, míg kismolekulák ( $\tau=0,5$  ns) esetében az eloszlás a spektrumban egyenletesebb.

Fehérjékben az amidcsoportok mozgása összetett, a forgási diffúzió mellett „belső mozgások” is befolyásolják, ezért esetükben  $J(\omega)$  Lorentz-görbék lineáris kombinációjaként írható fel. {Ishima, R. és mts. 1995}

$$J(\omega) = \frac{2}{5} \sum_{j=0}^{m-1} a_j \frac{\tau_j}{1 + (\omega\tau_j)^2}$$

$$\sum_{j=0}^{m-1} a_j = 1$$

A globuláris fehérjékre felállított Lipari-Szabó féle „Modelfree” formalizmus {Lipari, G. és mts. 1982} alapján spektrális sűrűségfüggvényt a molekula forgási diffúzióját jellemző  $\tau_c$  és amidcsoportok belső mozgását jellemző  $\tau_e$  illetve  $S^2$  paraméterek segítségével írjuk fel.

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

$$\frac{1}{\tau} = \frac{1}{\tau_c} + \frac{1}{\tau_e}$$

Az egyenlet első tagja a molekula forgási diffúziójához köthető, még a második tag az amidcsoport molekulán belüli mozgását írja le izotrop rendezett molekulák esetében. A fehérjék dinamikai jellemzésének célja, hogy a mérhető relaxációs paramétekből kiszámoljuk a spektrális sűrűség függvényt vagy egyes pontjait; majd megfelelő mozgási modell segítségével meghatározzuk a relaxációt befolyásoló korrelációs időket és a rendparamétert ( $S^2$ ).

A fehérjegerinchen az amidcsoportok nitrogénjeinek relaxációját az  $H^{NH}$ -  $N^{HN}$  dipol-dipol kölcsönhatás (DD) és a kötés kémiai eltolódás anizotrópiája (CSA) befolyásolja

elsősorban. A mérhető NMR relaxációs paraméterek értékeit  $^{15}\text{N}$   $T_1$ ,  $T_2$  illetve  $^{15}\text{N}^{\text{NH}}\text{-}^1\text{H}^{\text{NH}}$  hetero-nukleáris steady-state NOE adatok, és az amidcsoportot jellemző mozgásokat leíró spektrális sűrűségfüggvény kiemelt pontjai között az alábbi egyenletek teremtenek kapcsolatot {Peng J.W. és mts. 1992}.

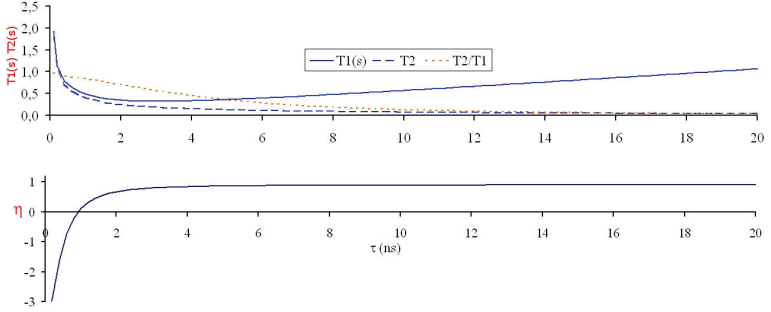
$$T_1^{-1} = \frac{d^2}{4} \{J(\omega_H - \omega_N) + 3J(\omega_N) + 6J(\omega_H + \omega_N)\} + c^2 J(\omega_N)$$

$$T_2^{-1} = \frac{d^2}{8} \{4J(0) + 6J(\omega_H) + J(\omega_H - \omega_N) + 3J(\omega_N) + 6J(\omega_H + \omega_N)\} + \frac{c^2}{6} \{4J(0) + 3J(\omega_N)\}$$

$$\text{NOE} = 1 + \frac{d^2}{4} \frac{\gamma_H}{\gamma_N} \{6J(\omega_H + \omega_N) - J(\omega_H - \omega_N)\} T_1$$

ahol  $d = (\mu_0 h \gamma_H \gamma_N / 8\pi^2) \langle r_{\text{NH}}^{-3} \rangle$ ;  $c = \omega_N \Delta\sigma / \sqrt{3}$  és  $d$  a dipól-dipól kölcsönhatás erősségét jellemzi, még  $c$  a kémiai eltolódás anizotrópia hozzájárulását. A  $h$  Planck állandót,  $\gamma$  a megfelelő giromágneses állandót,  $\mu_0$  a vákuum permeabilitást  $r$  a spinek közötti távolságot,  $\Delta\sigma$  a kémiai eltolódás anizotrópia különbségét jelöli. A  $T_1$  értékét a magasabb frekvenciájú mozgások  $J(\omega_N)$ ,  $J(\omega_H - \omega_N)$  és  $J(\omega_H + \omega_N)$  befolyásolják, ugyanakkor  $T_2$  tartalmazza  $T_1$  értékének a felét és az egyenletben megjelennek az alacsonyabb frekvenciájú mozgások is.

A fenti egyenletek felhasználásával *single motion* feltételek teljesülése esetén felírható a relaxációs paraméterek ( $T_2/T_1$ , het-NOE) függése a mozgások korrelációs idejétől ( $\tau_c$ ). Látható, hogy a rövidebb korrelációs idők (pl merev kismolekulák) esetében a  $T_1$  és  $T_2$  értéke közel azonos a  $T_2/T_1$  hányados 1 értéket vesz fel. A korrelációs idő növekedésével  $T_1$  egy minimum után nő, még  $T_2$  értékében a  $J(0)$  tagnak mind nagyobb szerep jut, értéke folyamatosan csökken. A NOE értékére ugyanakkor igaz, hogy rövid korrelációs idők esetén negatív, lassabb mozgások esetén pozitív ( $<1$ ) lehet.



**16. ábra.** A magasabb forgási korrelációs idővel jellemezhető makromolekulák amidcsoportjaira jellemző  $T_1/T_2$  hányados, a korrelációs idő növekedésével csökken. A heteronuklális „steady state” NOE negatívtól pozitív irányba halad, de értéke nem nagyobb, mint 1. A görbék  $B_0 = 500$  MHz-re vonatkoznak.

Rendezett fehérjék dinamikai jellemzése során a mért paraméterekből ( $T_1$ ,  $T_2$ , het-NOE), *Lipari-Szabó* féle modell alapján a spektrális sűrűségfüggvény értékeit az egyenletben szereplő pontokon kiszámoljuk, majd a pontokból a korrelációs időket ( $\tau_c$ ,  $\tau_c$ ) és a rend paramétert ( $S^2$ ) meghatározzuk. Az *IUP*-k molekulaformája azonban nem izotróp, {Elizer, D. és mts. 2001} ezért esetükben a 3 mért paraméterből az ún. redukált spektrális sűrűségfüggvény (*reduced density function RDF*) módszer használatával a spektrális sűrűségfüggvény 3 kiemelt pontját ( $J(0)$ ,  $J(\omega_N)$ ,  $J(0,87\omega_H)$ ) határozzuk meg az alábbi képletek alapján {Lefevre, J., F. és mts. 1996}.

$$J(0) = -\frac{3R_1}{4(3d^2 + c^2)} + \frac{3R_2}{2(3d^2 + c^2)} - \frac{9\sigma_{NH}}{10(3d^2 + c^2)}$$

$$J(\omega_N) = \frac{R_1}{(3d^2 + c^2)} - \frac{7\sigma_{NH}}{5(3d^2 + c^2)}$$

$$J(0,87\omega_H) = \frac{\sigma_{NH}}{5d^2}$$

ahol

$$\sigma_{NH} = R_1(NOE - 1) \frac{\gamma_N}{\gamma_H}$$

és

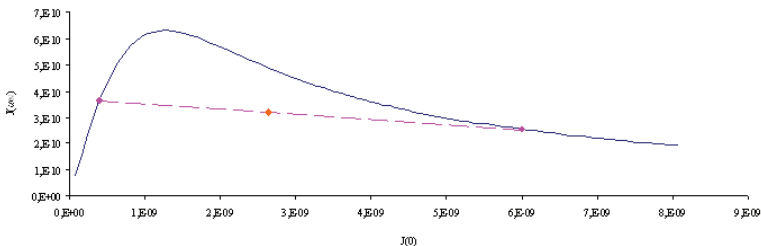
$$d = \mu_0 h \gamma_H \gamma_N / 16\pi^2 r^3 \quad c = \omega_N \Delta\sigma / \sqrt{3}$$

A relaxációt befolyásoló folyamatok vizsgálatára nyújt lehetőséget az adott

aminosavakhoz tartozó  $J(0)/J(\omega_N)$  illetve  $J(0)/J(\omega_H)$  pontpárok ábrázolása az ún. *single motion* görbéhez viszonyítva. A *single motion* görbe pontjai jelölik azokat a  $J(0)/J(\omega_N)$  értékpárokat, amelyekre igaz, hogy egyetlen mozgásformával jellemezhetőek. Az egyetlen korrelációs idővel jellemezhető spektrális sűrűségfüggvény egyenletébe a  $\omega=0$  értéket helyettesítve a következő egyenlőséghez jutunk [Krizova H. és mts. 2004]:

$$J(0) = \frac{2}{5} \tau \rightarrow \tau = \frac{5}{2} J(0)$$

$\tau$  értékét kifejezve ( $\tau=5/2 \cdot J(0)$ ) az behelyettesíthető az eredeti képletbe, így minden  $J(0)$  értékhez kiszámolható a megfelelő  $J(\omega_N)$  és  $J(\omega_H)$  értéke. (17. ábra) A görbe baloldali kiemelt pontját a gyorsabb belső mozgások ( $\tau=0,5$  ns) dominálják, még a jobb oldali pontra ( $\tau=15$  ns) a lassabb mozgások kombinációja jellemző. A fenti diagrammon a vizsgált fehérje  $J(0)/J(\omega_N)$  pontpárjait ábrázolva képet kaphatunk az egyes aminosavak jellemző mozgásáról. Mivel a kémiai csere a  $J(0)$  értékét növeli, ezért a görbe fölé eső pontok jellemzően ilyen folyamatok jelenlétére utalnak.



**17. ábra.** A *single motion* görbe (kék) pontjai azon  $J(0)/J(\omega_N)$  párokhoz tartoznak amelyekre fennáll, hogy már egyetlen mozgásformával is jellemezhetőek. A görbe baloldali kiemelt pontját gyorsabb belső mozgások ( $\tau=5/2 J(0)$ ) dominálják, még a jobb oldali pontra a lassabb forgási diffúzió a jellemző. A korrelációs idővel is felírható spektrális sűrűségfüggvény  $J(0)/J(\omega_N)$  pontpárjai a két kiemelt pontot összekötő szaggatott vonalon fekszenek és helyzetüket a  $\text{rend} (S^2)$  paraméter definiálja. A folytonos vonalon kívülre eső pontok jellemzően kémiai csere jelenségre utalnak.

Egy fehérjemolekula forgási korrelációs idejét ( $\tau_c$ ) a fehérje aminosav száma alapján a következő empirikus képlettel becsülhetjük: {Daragan, V.A. és mts. 1998}

$$\tau_c = (9,18 * 10^{-3} / T) \exp(2416/T) N^{0,93}$$

ahol T a hőmérsékletet Kelvinben mérve és, N az aminosavak számát jelöli. A képlet



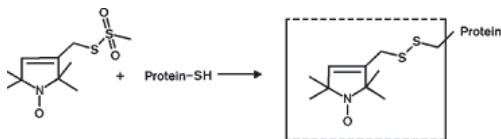
izotróp, globuláris molekulákra érvényes.

A fenti módszerek felhasználásával, a jelhozzárendelés ismeretében képet alkothatunk a fehérje egyes aminosavainak és környezetüknek mozgékonyági viszonyairól.

### III.3.5 Spin-jelölés

Egyes magok relaxációját a környezetükben előforduló párosítatlan elektronok jelentős mértékben gyorsítják. {Lietzow MA, és mts. 2002} A spin-jelölés (*spin labelling*) során a fehérje molekula egy cisztein oldalláncára párosítatlan elektront tartalmazó funkcióscsoportot kötünk, mely a ~25 Å távolságon belüli aminosavak T<sub>2</sub> relaxációját jelentősen gyorsítja. (18. ábra)

A mérések során felvesszük a spin-jelölt molekula <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQC spektrumát, majd oxidáljuk a funkcióscsoportot és így vesszük fel a referencia spetrumot. A két spektrumbeli csúcshintenzitás különbségek megmutatják, hogy az adott aminosavak térközelségbe kerülnek-e a *spin label*-el.



**18. ábra.** A spin-jelölés során a cisztein oldallánchoz egy párosítatlan elektront tartalmazó csoportot kötünk. A párosítatlan elektron jelentősen meggyorsítja a környezetében lévő magok relaxációját. A relaxációs változások követésével a hosszútávú kölcsönhatásokról kaphatunk információt.

## IV Célkitűzések

Funkcionális vizsgálatok alapján cáfolható az az állítás, miszerint a rendezetlen fehérjék másodlagos fehérje szerkezeti elemeket teljes mértékben nélkülöznek. Ezen molekulák funkciójuk hatékony ellátásához feltehetően preformált szerkezeti elemekkel rendelkeznek. Célul tűztük ki, hogy a rendezetlen kalpasztatin molekula első funkcionális alegységét (hCSD1) NMR spektroszkópiával, nagyobb fehérjékre alkalmazható jelenleg ismert NMR jelhozzárendelési stratégiákat alkalmazva vizsgáljuk. Célunk volt továbbá megismerni az jelhozzárendelés ismeretében összegyűjthető dinamikai és szerkezeti információkat és azok feldolgozásának módjait. Az így összegyűjtött adatok segítségével szándékoztunk a molekula szerkezeti és dinamikai tulajdonságait feltérképezni és vizsgálni befolyásukat a kalpainnal való kötődés folyamatára. A másodlagos szerkezeti elemek vizsgálata mellet érdekelt a pH, hőmérséklet valamint a  $\text{Ca}^{2+}$ -ion hatása a kalpasztatin konformációs viszonyaira. Spin-jelölés módszerével szerettük volna vizsgálni a molekulán belüli hosszútávú kölcsönhatásokat. Végül célul tűztük ki a kalpain-kalpasztatin 123 kDa tömegű fehérjekomplex NMR spektroszkópiai vizsgálatát.

## V Alkalmazott módszerek

Munkám során három kalpasztatin variáns hCSD1<sup>67-141</sup>, hCSD1, hCSD1-2 és a kalpain C<sup>105</sup>S mutánsának vizsgálatával foglalkoztunk részletesebben. Időrendi sorrendben legelőször a hCSD1<sup>67-141</sup> névvel hivatkozott kalpasztatin molekula részletet vizsgáltuk, amely a humán kalpasztatin 1 doménjének a C-terminális felőli P<sup>67</sup>-K<sup>141</sup> szakasza. (lásd. 2. ábra) A humán kalpasztatin 1 doménjének (hCSD1) és a hCSD1<sup>67-141</sup> molekula jelhozzárendeléséhez <sup>15</sup>N- egyszeresen és <sup>13</sup>C- <sup>15</sup>N- duplán jelölt mintákat is felhasználtunk. A hCSD1-2 molekula a humán kalpasztatin 1 és 2 doménjét tartalmazza, a jelhozzárendelést nem végeztük el, pusztán NMR jellegzetességeit vizsgáltuk <sup>15</sup>N jelölt molekulán.

A fenti fehérjepreparátumokat az enzimológiai intézetben Kovács Dénes fejeztette ki rekombináns fehérje-expresszióval E.coli BL21 törzsben, pETHCSD1 vektor felhasználásával. Az izotópjelöléshez a sejteket minimál médiumban (5 g glükóz, 6 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 3 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 g NH<sub>4</sub>CL, 0,5 g NaCl, 0,12 g MgSO<sub>4</sub>, és 0,01 g CaCl<sub>2</sub>) 37°C-on OD<sub>600</sub> ~0,4-0,5 érték eléréséig növesztették. A kifejeztetést 0,5 mM IPTG-vel indukálták majd egy éjszakán át 30°C-on tartották.

Ságiné Házy Eszter spin jelölés vizsgálatokhoz fent leírt módon kifejeztette a molekulát, majd a C<sup>105</sup> aminosavához kovalensen egy nitrozó csoportot kötött.

Az NMR méréseket megelőzően a mintákat C-18 HPLC oszlopon tisztítottuk, liofilizáltuk a minták tisztasága 96-98% között volt. A tisztaságot ESI-MS mérésekkel ellenőriztük Bruker Esquire 3000 Plus ioncsapdás tömegspektrométeren, folyamatos minta injektálás mellett (4μL/perc). A liofilizált mintákat acetonitril/víz/ecetsav 50:50:0.01 elegyben oldottuk. A spektrumokat pozitív módban vettük fel m/z 200-1500 tartományban.

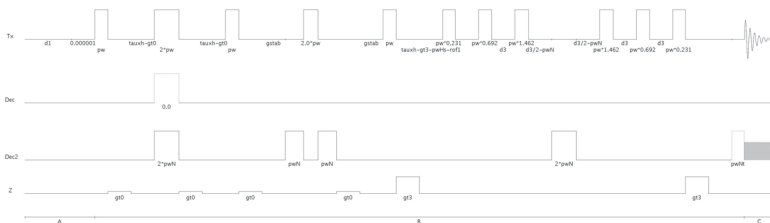
A kötődés vizsgálatokhoz Bozóky Zoltán fejeztette ki a jelöletlen és az autolízis elkerülése céljából C<sup>105</sup>S inaktív kalpain mutáns. A fehérjét kódoló vektort (amit *Prof. J.S., Elce* bocsátot rendelkezésünkre) BL21(DE3) *E.coli* törzsbe transzferáltuk. A sejteket NZYM közegben (1%N-Z-Case Plus I (Sigma), 0,5% élesztő kivonaton (Sigma), 0,5% NaCl, 0,2% MgSO<sub>4</sub>, 50 μg/mL carbenicillin, 20 μg/mL kanamycin) növesztettük 37°C-on OD<sub>600</sub> ~0,6-0,8-ig. A kifejeztetést IPTG-vel indukáltuk 30°C-on 3 órán keresztül. A sejteket lehűtöttük és centrifugálással (2500×g, 20 perc és 4°C) gyűjtöttük, majd lizis pufferbe (50mM TRIS HCl pH:7,50; 300mM NaCl; 1 mM EDTA; 5mM benzamidin;

1mM fenil-metil szulfonil-fluorid; 10 mM  $\beta$ -merkaptóetanol) oldottuk. A mintát ultrahangos feltárásnak (6×15s) vetettük alá, majd centrifugáltuk. (100000×g; 60 perc; 4°C) A fehérjét 5 ml felülzóból Ni-NTA oszlopon választottuk el és mostuk 15 ml pufferrel (50 mM TRIS HCl pH:7,50; 300 mM NaCl; 15 mM imidazol; 5 mM benzamidin; 1 mM fenilmetilszulfonil-fluorid; 10 mM  $\beta$ -merkaptóetanol), majd 250mM imidazol tartalmú pufferrel eluáltuk. Ezután kalpain pufferebe (50 mM TRIS HCl pH:7,50; 150 mM NaCl; 1 mM EDTA; 5 mM benzamidin; 1 mM fenilmetilszulfonil-fluorid; 10 mM  $\beta$ -merkaptóetanol) vittük át 4°C-on. 9 dm<sup>3</sup> közegből 17 mg fehérjét kaptunk. A mintát Amicon ultra-15 oszlopon koncentráltuk és NMR pufferbe dializáltuk (9 mM PIPES pH:6.18; 15 mM NaCl; 10  $\mu$ M CaCl<sub>2</sub>; 0,5 mM benzamidin, és 1 mM fenilmetilszulfonil-fluorid)

Az NMR mérésekhez a <sup>15</sup>N-jelölt hCSD1<sup>67-141</sup> minták koncentrációja ~ 0,5–1 mM volt, H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O 90:10 oldószer elegyben pH : 6,17 mellett. Stabilizáló szerként 0,5 mM benzamidint és 0,1 mM fenilmetilszulfonil-fluoridot használtunk.

Az egyszerűen és duplán jelölt hCSD1 minták jelhozzárendelését a Ca<sup>2+</sup> koncentráció szempontjából kétféle oldatban végeztük. A Ca<sup>2+</sup> mentes mérésekhez a 1–0,5 mM liofilizált fehérjét 15 mM NaCl, 9 mM PIPES és 0,5 mM benzamidin és 0,1 mM phenylmethylsulphonyl-fluoride mellett 90% H<sub>2</sub>O/10% D<sub>2</sub>O-ban, még a kalciumfüggőségi és a kötődési vizsgálatokhoz a mintát 10  $\mu$ M CaCl<sub>2</sub> és 15 mM NaCl mellett 90% H<sub>2</sub>O/10% D<sub>2</sub>O-ban oldottuk. A továbbiakban a kalciumot, tartalmazó mintákat az egyszerűség kedvéért „Ca<sup>2+</sup>” kiterjesztéssel jelölöm (pl: hCSD1\_Ca<sup>2+</sup>). Mindkét oldatban elvégeztük a teljes jelhozzárendelést, pH 6,07 mellett.

Az NMR spektrumokat BRUKER DRX 500–MHz készüléken rögzítettük. A <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQC spektrumokban vízjel elnyomásra 3-9-19 water gate vízelnyomást alkalmaztunk {Piotto M. és mts. 1992}.(19. ábra)



**19. ábra. A 3-9-19 watergate <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQC mérés pulzusszekvenciája.**

Mindhárom esetben a hidrogén kémiaieltolódás-értékek meghatározását 3D  $\{^1\text{H}, ^{15}\text{N}, ^1\text{H}\}$ -HSQC-TOCSY (~70ms *spinlock time*) {1024, 64 és 220 komplex pont} és 3D  $\{^1\text{H}, ^{15}\text{N}, ^1\text{H}\}$ -NOESY-HSQC (150 ms keverési idő {1024, 64 és 220 komplex pont} mérések alapján végeztük.  $^{15}\text{N}$   $^{13}\text{C}$  jelölt hCSD1 és hCSD1\_Ca<sup>2+</sup> minták esetében a gerinc atomok rezonanciafrekvenciáinak meghatározását  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC, HNCA, HN(CO)CA, HNCACB, HN(CO)CACB és C(CO)NH kísérletekből nyert információk alapján végeztük. A direkt ( $^1\text{H}$ ) dimenzióban legtöbbször 14 ppm spektrális ablak mellett 2048, még az indirekt dimenziókban 32 ( $^{15}\text{N}$ ) illetve 75 ppm ( $^{13}\text{C}$   $\alpha$  és  $\beta$ ) ablakszélesség mellett 128 ( $^{15}\text{N}$ ) illetve 64 ( $^{13}\text{C}$ ) komplex pontot gyűjtöttünk. A karbonilcsoportot érintő mérések esetében az ablakszélesség az  $^{13}\text{C}$  dimenzióban 32 ppm volt. Minden mérést 300K-en hajtottunk végre. A spektrumok feldolgozása során koszinusznygzyet ablakfüggvényt, a  $^{15}\text{N}$  dimenziókban a komplex pontok megduplázásával lineáris predikciót alkalmaztunk. A spektrumok feldolgozását az NMRPIPE programcsomaggal végeztük. {Delaglio, F. és mts. 1995} A jelhozzárendelést az UCSF-SPARKY programmal végeztem {Kneller, D.G. 1993}. Minden minta esetében a rezonanciafrekvenciákat DSS-hez referenciáltunk.

Az optimális mérési körülmények kiválasztásához, amellet hogy a fiziológias környezethez legjobban illeszkedő pH-n mérjünk, mérés technikai szempontokat kellet figyelembe vennünk.  $^{15}\text{N}$ - $^1\text{H}$ -HSQC spektrumokat vettünk fel különböző pH (hCSD1<sup>67-141</sup>: 4,3; 5,23; 6,17 hCSD1: 3,85; 5,53; 6,07; 7,25), és hőmérsékleti (hCSD1<sup>67-141</sup>): 280; 300 és 320 K) értékek mellet. A spektrumokat összehasonlítva, a mérési körülményeket 300 K illetve pH 6,07 (hCSD1<sup>67-141</sup>) és pH 6,17 (hCSD1) értékek mellett találtuk optimálisnak.

A hCSD1 és hCSD1<sup>67-141</sup> közötti a hasításból adódó szerkezeti különbségeket az  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spektrumokból gyűjtött, amid-nitrogén és az amid-proton kémiaieltolódás-értékek felhasználásával vizsgáltuk az alábbi képlet segítségével {Wishart D.S. és mts 1991}:

$$\Delta\delta = \sqrt{(\delta(^1\text{H})_{\text{hCSD1}} - \delta(^1\text{H})_{\text{hCSD1(65-141)}})^2 + 0.17(\delta(^{15}\text{N})_{\text{hCSD1}} - \delta(^{15}\text{N})_{\text{hCSD1(65-141)}})^2}$$

ahol  $\delta(^1\text{H})_{\text{hCSD1}}$  és  $\delta(^1\text{H})_{\text{hCSD1(67-141)}}$  a mért rezonancia értékek (pH=6,07 és 298 K) a két molekulára.

A *spin label* vizsgálatok során a C<sup>103</sup> jelölt molekula funkciós csoportját citromsavval oxidáltuk. Az oxidáció előtt és után is  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spektrumokat vettünk fel. A távolság becsléshez a csúcsintenzitások hányadosait használtuk. {Lietzow MA, és mts. 2002}

A *random coil* értékek kiválasztássakor a mérési körülményeinkhez legjobban

illeszkedő kísérleti körülmények mellett meghatározott  $RC$  értékeket választottuk. A mért  $Ca$ ,  $C\beta$ ,  $C'$ ,  $H\alpha$  és  $HN$  másodlagos kémiaieltolódás-értékeket a *Bundi* és munkatársai által meghatározott  $RC$  és szekvenca-korrekciós értékek felhasználásával számoltam. {Bundi, A. és mts. 1997; Richarz, R. és mts. 1978; Wütrich, K. és mts. 1975}

Az  $T_1$ ,  $T_2$  és  $^{15}N$ - $^1H$  -NOE relaxációs paraméterek meghatározásához a spektrumokat 10 ill. 23 ppm spektrális szélességgel vettük fel (2048x256 komplex pont).  $T_1$  analízis a következő késleltetési időkkel rögzítettük: 1,2; 51,2; 101,2; 251,2; 751,2; 1001,2; 2001,2 és 3251,2 ms. A  $T_2$  adatokat 17,59; 35,18; 52,77; 70,36; 105,54; 158,31; 211,08; 316,62 és 386,98 ms késleltetéssel vettük fel. A spektrumokban a *Sparky* programban alkalmazott illesztő program segítségével a csúcshintenzításra illesztett exponenciális függvény paramétereiből határoztuk meg az  $R_1$  (spin-rács) valamint a  $R_2$  (spin-spin) relaxációs állandókat. A steady-state heteronuklárís NOE adatokat a hCSD1 esetében 5 s-os relaxációs delay-el, *Palmer és munkatársai* által leírt pulzusszekvenciával gyűjtöttük. {Palmer, A., G., III és mts. 1991} A NOE erősítés méréséhez a csúcshintenzitásokat használtuk.

A  $H^N$ - $H\alpha$  csatolási állandókat a *Wiesemann és munkatársai* által leírt pulzusszekvenciával {Weisemann, R. és mts. 1994} Dvortsak Péter által fevett spektrumokból határoztuk meg.

A szekvenca illesztéshez a CLUSTAL-W programot használtuk. {Thompson, J.D. és mts. 1994}

Az adatok feldolgozását *reduced spectral density mapping* módszer felhasználásával végeztük. {Lefevre, J., F. és mts. 1996} Adott frekvencián a spektrális sűrűségfüggvény értékeit,  $R_1$ ,  $R_2$  és het-NOE értékekből számoltuk, a bevezetőben leírt függvények alapján.

A kalcium függés vizsgálata során a kalciummentes és kalciumos hCSD1 minták  $N$ -,  $NH$ - illetve  $Ca$  kémiaieltolódás-értékeit a következő képlet alapján vetettük össze:

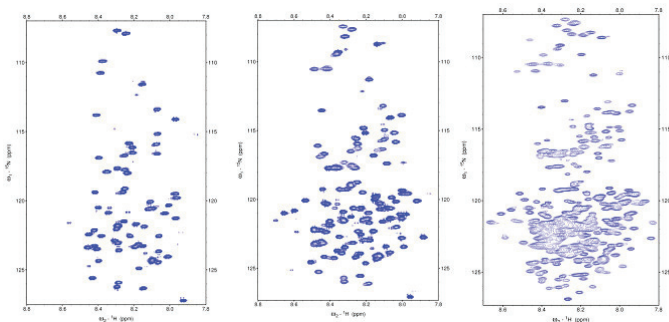
$$CCS = \sqrt{(\delta(H^{NH})_{Ca^{2+}} - \delta(H^{NH})_0)^2 + 0.17(\delta(N^{NH})_{Ca^{2+}} - \delta(N^{NH})_0)^2 + 0.32(\delta(C\alpha)_{Ca^{2+}} - \delta(C\alpha)_0)^2}$$

A kötődés vizsgálatok során  $^{15}N$  jelölt hCSD1- $Ca^{2+}$  molekula oldatához több lépésben kalpaint adagoltunk. Az első három lépésben 30  $\mu$ l majd 60  $\mu$ l-60  $\mu$ l kalpain törzsoldatot adtunk 330  $\mu$ l hCSD1 oldatához. Az egyes lépésekben a ligandum-szubsztrát arány 0%, ~60%, ~120%, ~240%, ~360% és 460% volt. Minden egyes titrálási lépésben  $^1H$ - $^{15}N$  HSQC spektrumot rögzítettünk, és a hCSD1 jelintenzitás változásait követtük. A hígulás okozta intenzitás csökkenés korrigálására a  $K^{141}$  jel intenzitását használtuk, mivel ez a csúcás biztosan nem érintett a kötődés által.

## VI Eredmények

### VI.1 A szabad kalpasztatin formák jelhozzárendelése

Mindhárom általam vizsgált kalpasztatin fragmens rendezetlen szerkezetű. A rendezetlen fehérjékre jellemző, hogy a szekvencián belül az azonos típusú aminosavak megfelelő magjai hasonló kémiaieltolódás-értéket mutatnak, így a spektrumok a direkt dimenzió ( $^1\text{H}$ ) mentén zsúfolttá válnak. Emiatt van szükség a jelhozzárendeléshez még viszonylag kismolekulák esetében is ( $M_w < 10$  kDa) izotóp jelölésre. {Dyson, H.J és mts. 2002} Izotóp jelöléssel lehetőségünk nyílik többdimenziós spektrumok felvételére, ahol a jelek „széthúzhatóak” a nitrogén vagy szén rezonanciafrekvenciáik szerint is. Az *IUP*-kat jellemző relaxációs tulajdonságok miatt, a hasonló méretű rendezett fehérjékhez képest a jelek félérték-szélessége jelentősen lecsökken, így már a kalpasztatin két homológ doménjéből felépülő hCSD1-2 molekula  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spektrumában a nagy molekulaméret (280 as) ellenére is, megfelelő jeldisziperziót és jel-zaj viszonyt kapunk. (20. ábra)



**20. ábra.** A hCSD1<sup>67-141</sup>, a hCSD1 és a hCSD1-2 298 K-en és -6.1 pH-n felvett  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spektruma alacsony jeldisziperziót mutat a direkt dimenzióban. Ugyanakkor a jelek alacsony félértékszélessége miatt, a 280 aminosavból álló hCSD1-2  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spektruma értékelhető jeleket tartalmaz.

A bevezetőben ismertetett dupla- és triplarezonancia módszerekkel elvégeztük a hCSD1<sup>67-141</sup> hidrogén és nitrogén jeleinek, illetve a hCSD1 hidrogén, szén és nitrogén jeleinek jelhozzárendelését két különböző  $\text{Ca}^{2+}$  ion koncentráció mellett. A hidrogén

kémiaieltolódás-értékeket 3D  $\{^1\text{H}, ^{15}\text{N}, ^1\text{H}\}$ -TOCSY-HSQC spektrumokból még a C', C $\alpha$  és C $\beta$  szén rezonanciákat HNCO, HNCA és HNCACB spektrumokból gyűjtöttük. A hCSD1<sup>67-141</sup> esetében a  $^{15}\text{N}$ - $^1\text{H}$  HSQC spektrumban 63 spinrendszert azonosítottunk a 66 nem-prolin aminosavhoz. A hiányzó aminosavak: K<sup>68</sup>, R<sup>70</sup> és S<sup>100</sup>. A Ca<sup>2+</sup>-ot tartalmazó hCSD1 esetében (hCSD1\_Ca<sup>2+</sup>) a 126 nem prolin aminosavból 121 HSQC jelet azonosítottunk (azonosítatlan aminosavak: A<sup>1</sup>, E<sup>62</sup>, K<sup>76</sup>, E<sup>77</sup> és S<sup>87</sup>). A kalcium-mentes formában az A<sup>1</sup>, I<sup>25</sup>, K<sup>76</sup> és E<sup>77</sup> kivételével 122 aminosav jelét találtuk meg. A molekula flexibilitása által okozott csökkent T<sub>2</sub> relaxáció miatt az élesebb jelek már 0,5 mM-os fehérje koncentráció mellett is jó jel-zaj arányt eredményeztek. A hCSD1 és hCSD1\_Ca<sup>2+</sup>  $^{15}\text{N}$ -HSQC spektrumaiban további 18-18 kis intenzitású csúcsot azonosítottunk. Mivel a minták tisztaságát MS mérésekkel és SDS-PAGE-el igazoltuk, az aggregációt valamint a degradációt kizárhattuk. A kis intenzitású csúcsok az egyes aminosavakhoz egyértelműen hozzárendelhetők és jelenlétük olyan lassú időskálájú konformációs mozgások eredménye, mint a prolinok cisz-transz izomerizációja. A hCSD1<sup>67-141</sup> minta esetében a C $\alpha$  és C $\beta$ , még a hCSD1 és hCSD1\_Ca<sup>2+</sup> esetében C', C $\alpha$ , C $\beta$  szén kémiaieltolódás-értékeket határoztuk meg. A C $\alpha$  rezonanciákat az utóbbi két minta esetében három prolin kivételével (P<sup>66</sup>, P<sup>82</sup>, P<sup>137</sup>) minden aminosavra meg tudtuk határozni. (lásd függelék)

## VI.2 Fizikai és kémia tulajdonságok vizsgálata

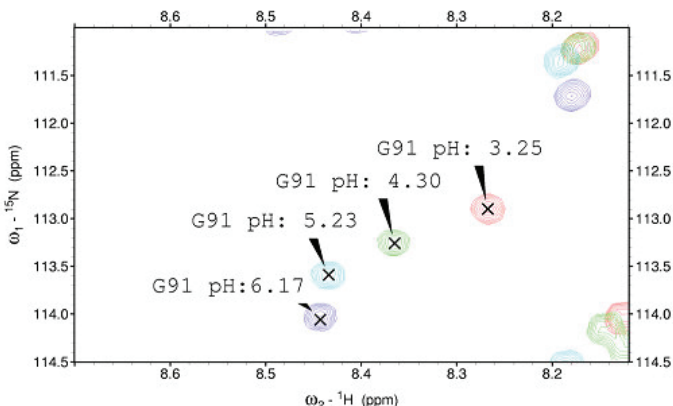
A hőmérséklet vagy pH változtatása egy rendezett fehérje esetében konformációs változást indukálhat, aminek következtében a kémiaieltolódás-értékek is megváltozhatnak. A konformációs változásokra leginkább érzékeny magok (N<sup>HN</sup>, H<sup>N</sup>, C $\alpha$ , Ha, C') a fehérjegerinc mentén helyezkednek el. Ezen magok kémiaieltolódás-értékeinek változásai a fizikai környezet megváltozásának érzékeny indikátorai.

A hCSD1<sup>(67-141)</sup> spektrumaiban a hőmérséklet változtatása a 280-320 K tartományban nem okoz jelentős kémiaieltolódás-érték változásokat, ami megfelel a rendezetlen fehérjéktől elvárt viselkedésnek {Dyson, J. és mts. 2002}. A  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spektrumban a hőmérséklet által indukált amid-nitrogén és proton kémiaieltolódás-érték változás átlagos mértéke kisebb mint 0,01 ppm/K. A hCSD1<sup>(67-141)</sup> molekulában a hőmérsékletre legérzékenyebb aminosav a Gly<sup>91</sup> mely,  $\Delta\delta/\Delta T=2.3$  ppb/K változást mutatott.

A pH hatását az egyes minták spektrumaira a hCSD1<sup>(67-141)</sup> esetében pH= 4,30; 5,23 és 6,17 még a hCSD1 10 mM kalciumion koncentrációjú oldatában (hCSD1\_Ca<sup>2+</sup>) pH: 3,85;



5,53; 6,07 és 7,25 pontokon vizsgáltuk. Szerettük volna minél jobban megközelíteni a fiziológias pH-t (pH=7) úgy, hogy közben a jel-zaj arány az adott koncentráció mellett még elfogadható legyen. A pH titrálások során azt találtuk, hogy a pH 4,3-6,4 tartományban a  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spektrum jelei, azonos jelalak mellett jelentősen elmozdulnak. Ez a savas karakterű oldalláncok és az amidcsoportok eltérő protonáltsági állapotával van összhangban. pH 6,5 felett a  $\text{H}^{\text{N}}$  és  $\text{N}^{\text{HN}}$  jelek „vándorlása” lassult ellenben a jel-zaj arány rohamosan romlani kezdett. A fenti eredmények tükrében a kalpasztatin mintákat 298 K-en és 6,1 körüli pH-n vizsgáltuk.



**21. ábra.** A hCSD1<sup>67-141</sup> molekulában a hőmérséklet- és pH-változásokra leginkább érzékenynek a G<sup>91</sup> aminosav bizonyult. A fenti spektrumokban a G<sup>91</sup> pH hatására bekövetkező „elvándorlását” ábrázoltam.

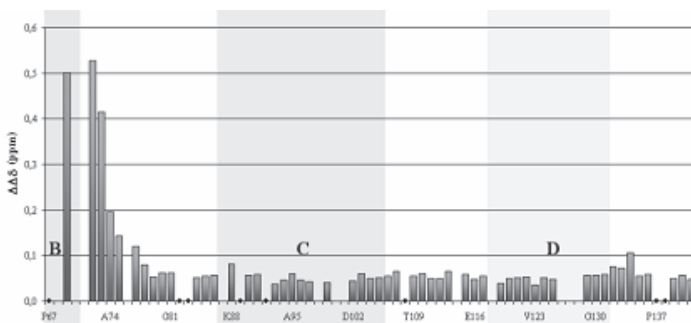
Rendezetlen fehérjék  $^3\text{J}_{\text{HN}\alpha}$  csatolási állandói kevés információt hordoznak. {Dyson, H.J. és mts. 2005}. Rendezett fehérjék jellemző  $^3\text{J}_{\text{HN}\alpha}$  csatolási állandó  $\alpha$ -hélixekre 4 Hz alatti redőkre 13 Hz körüli értékek. Esetünkben a csatolási állandók 5-7 Hz közé esnek, és nem mutatnak jellegzetes szerkezeti elemekhez köthető mintázatot.

### VI.3 A kalpasztatin molekula szerkezeti tulajdonságai

Az  $\text{N}^{\text{HN}}$  és  $\text{H}^{\text{HN}}$  rezonanciák érzékenysége a kémiai környezet változásaira, lehetővé teszi, hogy rajtuk keresztül kövessünk konformációs változásokat. {Wishart, D., S. és mts. 1991}. A pH, oldószer és hőmérséklet mellett mind az  $^{15}\text{N}^{\text{HN}}$  és  $^1\text{H}^{\text{HN}}$  magok

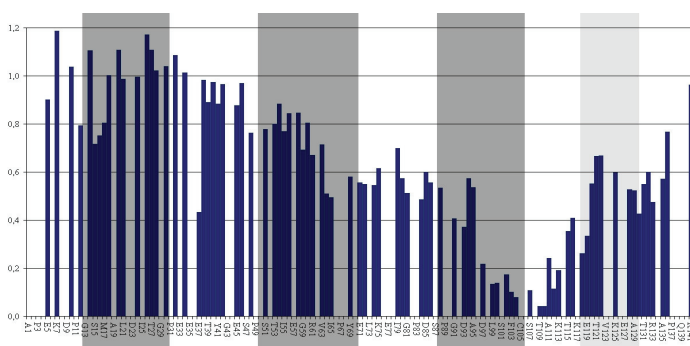
kémiaieltolódás-értékei függenek a kovalens szerkezettől, valamint a molekula másod- és harmadlagos konformációjától. {Wishart, D., S. és mts. 1995} Az általunk létrehozott 74 aminosav hosszú hCSD1<sup>(67-141)</sup> tartalmazza a C-alegységet, valamint a hasítással kettévágtuk az inhibíció szempontjából fontos TIPPXYR molekularészletet. A molekula vizsgálatával és hCSD1-el való összehasonlításával az intramolekuláris hosszútávú kölcsönhatások vizsgálatára nyílik módunk. A hCSD1 N- és C terminális fragmensén végzett CD mérések valamint hCSD1-ből származó kémiaieltolódás-értékek eltérése arra utal, hogy a kérdéses régióban hosszútávú kölcsönhatások vannak jelen. {Mucsi, Z. és mts. 2003}.

Mindkét molekula rezonanciafrekvenciáinak ismeretében hCSD1<sup>67-141</sup> és a hCSD1 megfelelő szakaszainak kémiaieltolódás-értékeit összevettük. A kombinált N<sup>HN</sup> és H<sup>HN</sup> kémiaieltolódás-érték különbségek nulla körüli értékei ( $0,02 \pm 0,012$  ppm) hasonló szerkezetre utalnak a vizsgált régió nagy részében, az I<sup>79</sup>-K<sup>141</sup> szakaszon. (22. ábra). Ennek két oka lehet, vagy a két molekula hasonló szerkezete, vagy pedig a hasonló mértékű rendezetlensége. Másrésztől a hasítás közeli régiókban (P<sup>67</sup>-G<sup>78</sup>) a kombinált N<sup>HN</sup>-H<sup>HN</sup> kémiaieltolódás-értékek szignifikánsan eltérnek nullától ( $0,3 \pm 0,03$  ppm). Látható hogy az új N-terminális hatása több aminosavat érint, mint a hiányzó szomszédos aminosavak és a megváltozott oldószer kitétségből következne. A fentiek alapján tehát a jelentős kémiaieltolódás-érték eltérés oka a B-szubdomént stabilizáló szerkezeti motívumok elvesztése.



22. ábra. A hCSD1 és C-terminális fragmensének hCSD1<sup>67-141</sup> N<sup>HN</sup> és H<sup>HN</sup> kombinált kémiaieltolódás-értékei a szekvencia nagy részén hasonló szerkezetet és/vagy a hasonló mértékű rendezetlenséget jeleznek. Az N-terminális közelében a nagyobb eltérés értékek (P<sup>67</sup>-G<sup>78</sup>) azt mutatják, hogy a hCSD1<sup>67-141</sup> flexibilitása megnőtt ezen a szakaszon a távolható kölcsönhatások megszűnése miatt.

A *spin labelling* vagy spin jelölés információt nyújthat a hCSD1 molekulán belüli hosszútávú kölcsönhatásokról. {Lietzow MA, és mts. 2002} Elvégeztük a C<sup>105</sup> aminosav spin jelölését, hogy a C-szubdomén aminosavainak intramolekuláris kölcsönhatásait vizsgáljuk. A eredményeink alapján elmondható, hogy a molekula fokozott mozgékonyasága miatt a spin jelölés hatása, bár eltérő mértékben, a szekvencia teljes hosszában érzékelhető. A legjelentősebb intenzitás veszteség a C<sup>105</sup> közvetlen környezete szenvedte el. Ilyen mértékű intenzitás csökkenést más aminosavknál nem tapasztaltunk, azt mutatja, hogy stabil, hosszútávú, molekulán belüli kölcsönhatások nem alakulnak ki. (23. ábra)

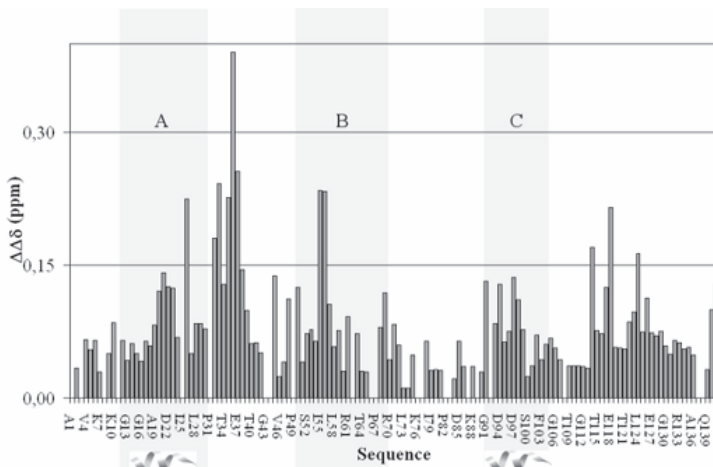


**23. ábra.** A molekula mozgékonyaságának következményeként a spin jelölés hatása, bár eltérő mértékben, de a szekvencia teljes hosszában érzékelhető. Tehát stabil, hosszútávú, molekulán belüli kölcsönhatások nem alakulnak ki a hCSD1-ben.

A rendezett fehérjék feltekeredése során a fémionok szerepéről gazdag irodalom áll rendelkezésre, viszont *IUP*-kra gyakorolt hatásáról keveset tudunk. Közismert a kalpain-aktivitási és szerkezet kalciumion függése {Goll, D., E. 2003}, viszont a kalpasztatinra gyakorolt hatásáról kevés ismeretünk van. *CD* mérésekkel kimutatták, hogy a C-szubdomént tartalmazó fragmens köthet Ca<sup>2+</sup>-ot {Mucsi, Z. és mts. 2003}.

Az egymást követő kalpasztatin minták spektrumainak összevetése során megfigyeltük, hogy igen kis pH ingadozások is okozhatnak eltéréseket a HSQC spektrumokban. A pH stabilizálása céljából a mintákat pufferben vizsgáltuk, azonban azonos pH ellenére rezonancia frekvenciák jelentősen eltértek a vizes mintákétól. A pufferes mintákhoz ezután 10 mM Ca<sup>2+</sup>-t adtunk (hCSD1\_Ca<sup>2+</sup>) és meglepetésre a vizes mintával megegyező spektrumokat kaptunk. A fentiek alapján feltételeztük, hogy a vizes és pufferes mintákhoz beoldott liofilizált fehérje preparátumok eltérő mértékben tartalmaztak kalciumot.

Ezután elvégeztük a hCSD1\_Ca<sup>2+</sup> minták jelhozzárendelését és kombinált másodlagos kémiaieltolódás-értékek alapján összehasonlítottuk a Ca<sup>2+</sup>-ion mentes mintákkal. Megállapítottuk, hogy a legintenzívebb eltérések az A- és C-szubdomének C-terminális felőli végén elhelyezkedő, COO<sup>-</sup> csoportokban gazdag régiókat érintik.(24. ábra) Feltételezhetően az oldalláncok karboxil csoportjai részt vesznek a Ca<sup>2+</sup> megkötésében és ezzel csökkentik a fehérjegerinc mozgékonyágát. A gerinckonformáció változására utal, hogy az eltérések érintenek olyan kalciumkötő funkcióval nem rendelkező csoportokat is mint Y<sup>54</sup>, Y<sup>69</sup> vagy K<sup>60</sup>. A fenti modell alapján azt állítjuk, hogy a kalpasztatin kalciumot köt, ez a kölcsönhatás befolyásolja a molekula konformációs viszonyait és így szerepet játszik a kalpain kötődés folyamatában.



24. ábra. A kalciumion hozzáadása az egyes aminosavak rezonanciafrekvenciáit eltérő mértékben érinti. A N<sup>NH</sup>-, H<sup>NH</sup>- és C $\alpha$ -kombinált kémiaieltolódás-értékkel mérve a legnagyobb eltérés a számos savas jellegű aminosavat tartalmazó régiókban mutatkozik. A mérés során a hCSD1 és hCSD1\_Ca<sup>2+</sup> oldataiból származó kémiaieltolódás-értékeit használtuk fel.

#### VI.4 hCSD1 szerkezeti tulajdonságainak vizsgálata kémiaieltolódás-értékek alapján

A hCSD1 molekula szerkezeti jellemzésére elvégeztük a <sup>13</sup>C', <sup>13</sup>C $\alpha$  és <sup>1</sup>H $\alpha$  magok másodlagos kémiaieltolódás-értékeinek analízisét. Helikális másodlagos szerkezet jellemző, hogy legalább négy a szekvenciában egymást követő aminosav H $\alpha$  másodlagos

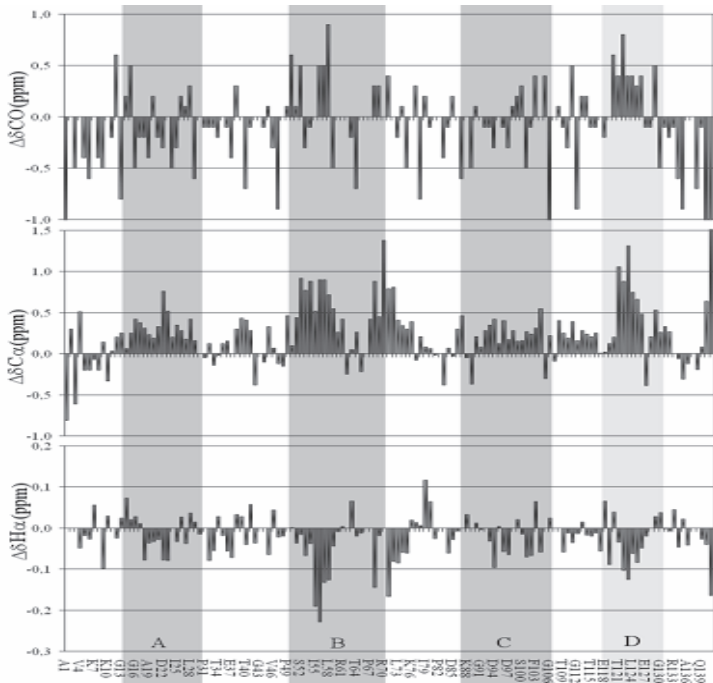
kémiaieltolódás-értéke ( $SCS_{H\alpha}$ ) negatív, még  $C\alpha$  és  $C'$   $SCS$  értékei pozitív értéket mutatnak. {Wishart, D., S. és mts. 1995}

Rendezetlen fehérjék szerkezete több konformáció dinamikus átlagaként adódik, ezért esetükben egyértelmű másodlagos szerkezeti motívumok helyett inkább szerkezeti preferenciákról beszélhetünk. A konformációs átmenetek az NMR időskálán általában elég gyorsak ahhoz, hogy a kémiaieltolódás-értékeik kiátlagolódjanak, így azok a  $RC$  értékekhez közelítenek. Amennyiben az  $IUP$  konformációs állapotai között bármilyen másodlagos szerkezeti elem előfordul, az tükröződik az  $SCS$  értékekben is {Dyson, J. és mts. 1988}. Rendezett fehérjékben a mért kémiaieltolódás-értékek átlagos eltérése a *random coil* ( $RC$ ) értékektől  $\alpha$  helikális másodlagos szezektet esetében:  $SCS_{H\alpha}$  ~ -0,3 ppm;  $SCS_{C\alpha}$  ~ 3 ppm;  $SCS_{CO}$  ~ 1,5 ppm-nek adódik. {Wishart, D., S. és mts. 1995}  $IUP$ -kban előforduló helikális preferenciák esetében ezen értékek abszolút értékben értelemszerűen kisebbek.

A hCSD1  $SCS$  értékeinek vizsgálatával rövid helikális jellegű szakaszok ismerhetők fel a  $D^{18}-I^{25}$ ,  $S^{51}-G^{59}$ ,  $R^{70}-K^{75}$  és  $T^{121}-R^{133}$  szekvenciák mentén (2. táblázat). Ezek a szakaszok többé-kevésbé megfeleltethetők a funkcionális szempontból fontos A- és B- és C-szubdoméneknek. A  $SCS_{C\alpha}$ -k alapján az A- és B- kötődésben és inhibícióban fontos funkcionális alegységek egyes aminosavai helikális karakterrel rendelkeznek hasonlóan C-szubdomén  $G^{91}-T^{104}$  régiójához.  $C'$  másodlagos kémiaieltolódás-értékek a  $H\alpha$  és  $C\alpha$   $SCS$ -kal összhangban a  $T^{121}-R^{133}$  régiókra, hasonlóan az A-, B- és C-funkcionális doménekhez, helikális tendenciát jósolnak ( $SCS_{C'}$ :  $0,21 \pm 0,09$ ). Ezek a folytonos szekvenciális egységek elég hosszúak ahhoz (7-10 as), hogy többmenetes hélixeiket képezzenek {Wishart, D., S. és mts. 1991}.

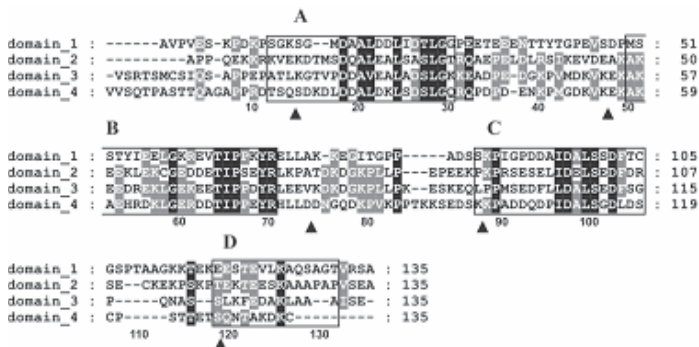
**2. táblázat. A hCSD1 kiemelkedő vagy átlagos  $SCS$ -értékekkel jellemezhető szakaszai megfeleltethetők a funkcionális alegységeknek.**

Megfelelő szubdomének	A	B	C	„D”	
Szekvencia	$D^{18}-I^{25}$	$S^{51}-G^{59}$	$R^{70}-K^{75}$	$G^{91}-T^{104}$	$T^{121}-R^{133}$
$SCS_{C\alpha}$	0,36±0,19	0,71±0,19	0,53±0,14	0,27±0,07	0,56±0,26
$SCS_{H\alpha}$	0,05±0,03	-0,10±0,09	-0,09±0,05	0,03±0,05	-0,03±0,02



25. ábra. A hCSD1 molekula CO (fent), C $\alpha$  (középen) és H $\alpha$  (lent) másodlagos kémiaieltolódás-értékei (pozitív C $\alpha$  negatív H $\alpha$ ) az egyes funkcionális alegységekben helikális konformáció jelenlétére utalnak. Az A-, B- és C-szubdomének szürke oszlopokkal, míg a feltételezett D-funkcionális alegységet világos szürke oszloppal jelöltem.

A T<sup>121</sup>–R<sup>133</sup> régiót funkcionális szerepe máig nem tisztázott, de a nem teljesen rendezetlen viselkedése alapján feltételezhető valamilyen szerepe a kalpain inhibícióban. Ezt a feltételezést támasztja alá, hogy a humán kalpasztatin molekula inhibitor doménjeinek (hCSD1, hCSD2, hCSD3 és hCSD4) aminosavszevencia illesztése alapján a fenti régió szekvenciális konzerváltságot mutat (26. ábra). {Thompson, J.D és mts. 1994}



26. ábra. A humán kalpasztatin négy inhibitor doménjének aminosav szekvencia illesztése alapján a hCSD1 T<sup>121</sup>-R<sup>133</sup> régiója szekvenciálisan konzervált aminosavakat tartalmaz. A szekvenciaillesztést a ClustalW {Thompson, J. D. és mts. 1994} programmal végeztük és az azonos aminosavak feket színnel, a hasonlóak szürkével vannak jelölve. A bekeretezett régiók az A, B, C valamint a szerkezeti alegységeket (D) jelölik.

A B-inhibitoralegység kémiaieltolódás-értékei hélixre jellemző módon térnek el a RC értékektől. (25. ábra). Egy 27 aminosavas a B-szubdomént tartalmazó peptid 2D <sup>1</sup>H-NMR méréseinek eredményeiből {Ishima, R. és mts. 1991} ismert hogy a P<sup>67</sup>-R<sup>70</sup> szakasz I típusú β-turn konformációval rendelkezik. Ez a régió a B-szubdoménon belül található erősen konzervált TIPPXYR motívum, és *Alanin Scanning* {Betts, R. és mts. 2003} kísérletekkel igazolták, hogy ez a régió felelős elsődlegesen kalpain gátlásáért. A SCS\_Hα és SCS\_Cα alapján nyilvánvaló, hogy a prolinokban gazdag szekvencia mintázat megtöri a B-szubdomén helikális tendenciáját az S<sup>51</sup>-G<sup>59</sup> és R<sup>70</sup>-K<sup>75</sup> szegmensek között.

Az SCS értékek vizsgálatából kitűnik, hogy a helikális jellegű szakaszokat másodlagos szerkezeti preferenciákkal nem rendelkező régiók kötik össze. Hogy pontosabb képet kapjunk a molekula konformációs viszonyairól, elvégeztük annak dinamikai jellemzését.

## VI.5 A szabad hCSD1 molekula dinamikai jellemzése

Egy fehérje NMR relaxációjára a molekula forgási diffúziója, valamint az amidsoport belső mozgásai vannak leginkább hatással. {Lefevre, J., F. és mts. 1996} A relaxációs paraméterek vizsgálatával módunk nyílik, a globuláris fehérjékhez hasonlóan betekinteni a molekula mozgási viszonyaiba. Ismert, hogy a rendezetlen fehérjék nyújtott konformációs állapotainak köszönhetően nagyobb hidrodinamikai sugárral és így lassabb forgási

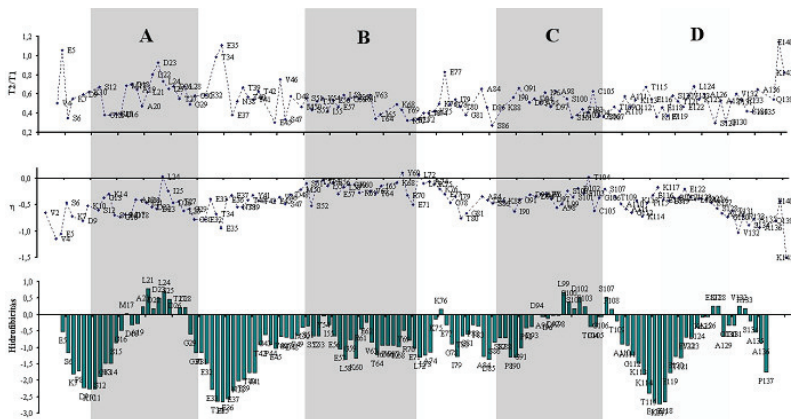
diffúzióval (magasabb korrelációs idővel) jellemezhetőek, mint egy hasonló aminosavszámú rendezett fehérje. Egy empirikus képlet felhasználásával egy 141 aminosavas globuláris (izotróp) fehérje forgási korrelációs ideje  $\tau_c = 10,2$  ns-nak adódik. {Daragan V., A. és mts. 1996} A mért  $T_2/T_1$  hányadosok alapján ( $\langle T_2/T_1 \rangle = 0,54$ ) a hCSD1 molekula korrelációs idejét  $\sim 3,2$  ns körülnek becsüljük, ami jóval rövidebb, mint a molekulaméret alapján várható érték. Az IUP-k esetében a másodlagos szerkezeti elemek hiányából következően az amidcsoportok mozgása szabadabb, mint a rendezett fehérjék esetében. A fenti szempontokat figyelembe véve megállapítható, hogy a hCSD1 atomjainak relaxációját leginkább az amidcsoportok gyors belső mozgásai dominálják, mint molekula a lassabb globális forgási diffúziója.

A hCSD1  $T_2/T_1$  hányadosai a szekvencia nagy részén az átlagértékhez ( $\langle T_2/T_1 \rangle = 0,54$ ) közelítenek, kiugró értékei a terminálisokhoz E<sup>5</sup>, E<sup>140</sup> valamint a szekvencián belül az T<sup>34</sup>, E<sup>35</sup> és T<sup>115</sup> aminosavakhoz tartoznak. Ezen aminosavak 1-hez közeli  $T_2/T_1$  értéke, párhuzamosan a kiugróan alacsony NOE értékekkel a fehérjelánc jelentős flexibilitására utal. Ezek az aminosavak jellemzően az N- és C-terminális régiók mellett, a funkcionális alegységeket összekötő flexibilis, hidrophil karakterű szakaszokon helyezkednek el, és ezek jellemezhetőek a leggyorsabb belső mozgásokkal.

A het-NOE értékek az IUP-kra jellemző módon többnyire negatív értékeket mutatnak a fehérjelánc mentén. {Dyson, J. és mts. 2002} Kiugró (pozitív) NOE értékeket figyelhetünk meg a L<sup>24</sup>, Y<sup>69</sup>, L<sup>72</sup> és T<sup>104</sup> aminosavak környezetében (27. ábra). A magasabb NOE értékek a csökkent belső mozgékonyág indikátorai. Ezek az aminosavak jellemzően az egyes funkcionális alegységek C-terminális felőli végén hidrofób környezetben találhatóak, ahol a másodlagos kémiaieltolódás-értékek helikális preferenciát mutatnak. A hidrofobicitás és a helikális preferencia együtt jól magyarázza a csökkent belső mozgékonyágot.

A relaxációs paraméterek ( $T_1$ ,  $T_2$ , het-NOE) vizsgálata alapján megállapíthatjuk, hogy a hCSD1 molekula NMR relaxációját jellemzően a rövid korrelációs idejű ( $\tau \sim ps$ ), gyors belső mozgások dominálják. Ugyanakkor a belső mozgékonyág a szekvencia mentén kisebb eltéréseket mutat, melyek az egyes szubdoménekhez rendelhetőek. A szubdoméneket összekötő hidrophil régiókban fokozottabb a mozgékonyág, még a funkcionális alegységek C-terminális felőli, hidrofób környezetben található aminosavai körül a mozgékonyág csökken.





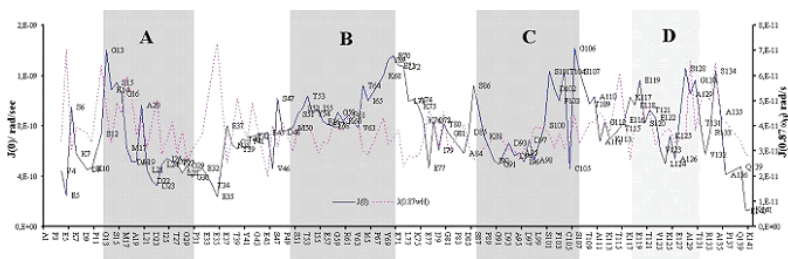
27. ábra. A hCSD1 amidcsoportok  $T_2/T_1$  hányadosai (fent) hetronukleáris NOE értékei (középen) és hidrofobicitás indexei (lent) a primer szekvencia függvényében. Az 1-hez közeli  $T_2/T_1$  értékek a gyors időskálájú mozgások indikátorai, még a lassabb korrelációs idővel jellemezhető mozgások kisebb hányodos értékekkel jellemezhetőek. A negatív NOE-értékek a gyors mozgások s így a rendezetlenség, míg a pozitív értékek a rendezettség indikátorai. A hidrofobicitást Kyte és Doolittle munkája alapján számítottuk ki {Kyte és mts. 1982} A funkcionális doméneket árnyékolással emeltem ki.

A  $J(\omega)$  spektrális sűrűségfüggvény meghatározásával képet kaphatunk a molekulát jellemző mozgások időskálájáról. Az *IUP*-k esetében nem tudunk egyértelmű mozgási modellt felállítani. A mérhető relaxációs paraméterek alacsony száma miatt, a *reduced spectral density function (RDF)* elmélet alkalmazásával {Lefevre, J., F. és mts. 1996}, csak a  $J(0)$ ,  $J(\omega_N)$  és  $J(0,87\omega_H)$  értékeket határozzuk meg.

A magasabb frekvenciájú mozgásokra jellemző  $J(\omega_N)$  és  $J(0,87\omega_H)$  néhány kiugró értéktől eltekintve, összhangban a molekula méretével, nem változik a primer szekvencia mentén ( $\langle J(\omega_N) \rangle = 0,33 \pm 0,07$  ns/rad). A gátolt, ezért alacsony frekvenciájú mozgások ( $\tau > 10$  ns), belső mozgások és a kémiai csere jelenlétét (ms- $\mu$ s) tükrözik a kiugró  $J(0)$  értékek {Dyson, J. és mts. 2002}. Kiemelkedő  $J(0)$  értékek jellemzőek  $G^{13}$ - $M^{17}$ ,  $K^{68}$ - $L^{72}$ ,  $S^{101}$ - $G^{106}$  és  $S^{128}$ - $V^{132}$  szakaszokra (28. ábra), ahol a másodlagos kémiaieltoldás-értékek mintázata és a hidrofobicitási adatok alapján helikális másodlagos szerkezeti elemek jelenléte feltételezhető. A magas  $J(0)$  értékek alapján ezeken a szakaszokon a fehérjegerinc flexibilitása kisebb mint a molekula egyéb részein.

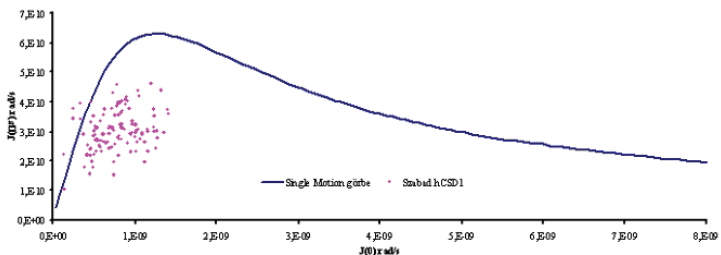
Lokálisan az átlagnál alacsonyabb  $J(0)$  értékek jellemzik a  $D^{26}$ - $G^{30}$ ,  $L^{58}$ - $E^{62}$ ,  $I^{90}$ - $D^{94}$  és  $T^{121}$ - $K^{125}$  aminosavakat. A  $D^{26}$ - $G^{30}$  és  $I^{90}$ - $D^{94}$  szakaszokra fokozott belső mozgékonyaság

jellemző és az A- illetve C-szubdomének „végein” helyezkednek el.



28. ábra. A spektrális sűrűségfüggvény értékei  $J(0)$  és  $J(0.87\omega_H)$  pontokban a hCSD1 szekvencia függvényében.

Az egyes aminosavakhoz számolt  $J(0)/J(\omega_N)$  párokat egy diagramon ábrázolva látható, hogy a pontok zömében az ún. *single motion* görbe alatt, az alacsony korrelációs idővel jellemezhető régióban helyezkednek el. (29. ábra) Ez egyrészt azt jelzi, hogy a relaxációt befolyásoló lassú időskálájú kémiai csere nem jellemző az amidsoportok környezetére, másrésztől a molekula relaxációját a  $\tau \sim 200$  ps korrelációs idejű mozgások dominálják, inkább mint a molekula globális forgási diffúziója.

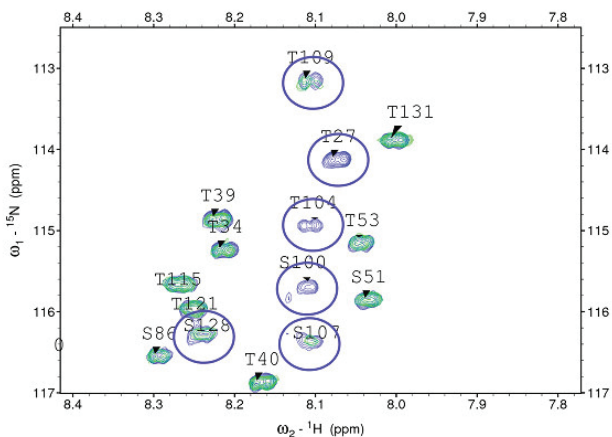


29. ábra. A hCSD1 molekula  $J(0)/J(\omega_N)$  értékei a *single motion* görbe alatt, a gyors ( $\sim 200$  ps) mozgásoknak megfelelő régióban helyezkednek el, összhangban a molekula rendezetlen jellegével.

A relaxációs paraméterek és a spektrális sűrűségfüggvény kiemelt pontjainak vizsgálata alapján elmondhatjuk, hogy a hCSD1 NMR relaxációját, az *IUP*-kra jellemző gyors belső mozgások dominálják, és a kémia csere nem jellemző. Ugyanakkor a relaxációs paraméterek lokális eltéréseket mutatnak, mely mintázatok a funkcionális alegységekkel átfedést mutatnak.

## VI.6 Kötődésvizsgálat

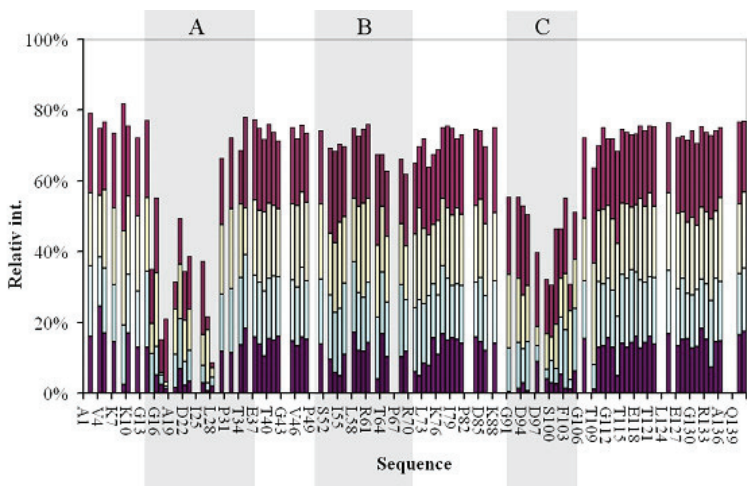
A titrálási lépések során  $^{15}\text{N}$  jelölt hCSD1 0,1 mM-os oldatához több lépésben nem izotóp jelölt inaktív kalpain mutánst ( $\text{C}^{105}\text{S}$ ) adtunk, 10  $\mu\text{M}$  kalciumion koncentráció mellett. Az egyes titrálási lépésekben  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spektrumokat vettünk fel és a csúcsok jelintenzitás változását követtük. A titrálási lépések során a kalpasztatin csúcsai eltérő mértékben szenvedtek jelszéledést (30. ábra), ugyanakkor a rezonanciafrekvenciájuk nem változott és újabb csúcsokat sem észleltünk a spektrumban.



30. ábra. A kalpasztatin molekula szabad és kalpainnal komplexált  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spektrumát összehasonlítva megfigyelhető, hogy a jelek változó mértékben kiszélesednek vagy eltűnnek. Az eltűnő jelek (bekarikázva) kizárólag a kalpainhoz való kötődésben közvetlenül résztvevő aminosavakhoz, (A- és C-szubdomén) tartoznak.

Bár minden aminosav jelen megfigyelhetőek jelintenzitás csökkenések, a legjelentősebb változás a  $\text{K}^{14}\text{-G}^{30}$  és  $\text{S}^{87}\text{-A}^{110}$  aminosavakon figyelhető meg. Ezek az aminosavak gyakorlatilag lefedik az A- és C- szekvenciálisan konzervált régiókat (31. ábra). A kalpain–kalpasztatin erős kötődése ( $K_D=4,5 \times 10^{-12}$ ) alapján feltételezzük, hogy az A és C szudomén a kalpainhoz koordinálódott, és elvesztette az *IUP*-kra jellemző fragmentális mozgását. Ezáltal a hCSD1 relaxációját ezekben a régiókban a gyors belső mozgások helyett a komplex (123 kDa) lassú forgási diffúziós mozgása dominálja, ami a jelentős  $T_2$  jelszéledést és a jelek eltűnését okozta. Azonban a C- illetve az N-terminális

aminosavak valamint az A- és C-szubdomének közötti régiók részben megőrizték IUP-szerű mozgékonyaságukat és így vonalszélességüket, ezért azok egyszerű  $^{15}\text{N}$ - $^1\text{H}$  HSQC módszerekkel továbbra is vizsgálhatóak.

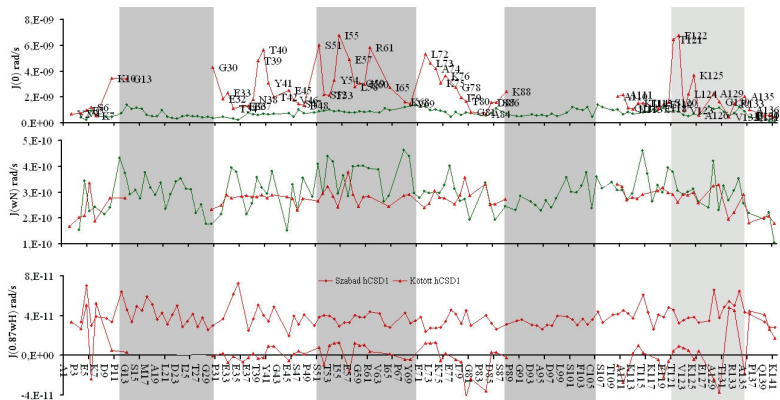


**31. ábra.** A kalpasztatin kalpainnal való titrálás során a legjelentősebb jelintenzitás veszteség az A- és C-szubdomén aminosavainál figyelhető meg. Az egyes lépésekben a hCSD1 : kalpain arányok a következők: 1 : 0,6; 1 : 1,2; 1 : 2,4; 1 : 3,6; 1 : 4,6.

A vizsgálható rezonanciaferkvenciák jelintenzitás csökkenése a relaxációs folyamatok felgyorsulását jelezték a molekula egészén, ezért a titrálás utolsó lépésében 1:1 kalpain-kalpasztatin aránynál  $T_1$ ,  $T_2$  és heteronukleáris steady-state-NOE méréseket végeztünk és meghatároztuk a spektrális sűrűségfüggvény értékeit a  $J(0)$ ,  $J(\omega_N)$  és  $J(0,87\omega_H)$  pontokban. (32. ábra)

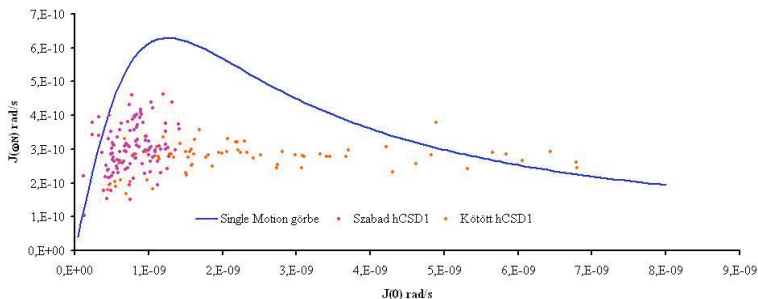
$J(\omega_N)$  értékek hasonlóan egyenletes mintázatot és abszolút értéket mutatnak a szekvencia mentén, mind a szabad, mind a kötött forma esetében. A kötött forma legtöbb aminosavára jellemző alacsonyabb  $J(0,87\omega_H)$  értékek alapján a gyorsabb időskálájú mozgások szerepe láthatóan csökkent az egész hCSD1 molekulán belül. A  $J(0)$  értékek alapján az N- illetve C-terminálison az A<sup>1</sup>-K<sup>7</sup> illetve R<sup>133</sup>-K<sup>141</sup> aminosavak megőrizték a szabad formára jellemző mozgékonyaságukat. Ugyanakkor a molekula zömére jellemző, hogy a  $J(0)$  értékek jelentősen eltérnek a szabad formáétól és jelentős eltéréseket mutatnak az átlagtól is. A kiemelkedő értékek a T<sup>39</sup>-T<sup>40</sup>, S<sup>51</sup>, I<sup>55</sup>, R<sup>61</sup>, L<sup>72</sup>-K<sup>76</sup> és T<sup>121</sup>-E<sup>122</sup> aminosavak esetében mozgékonyaság csökkenését és/vagy újabb relaxációs útvonalak

megjelenését tükrözik. Ezek az aminosavak feltehetően közelebb kerülnek a kalpain molekula felületéhez, ami a mozgékonyaságuk csökkenéséhez vezet.



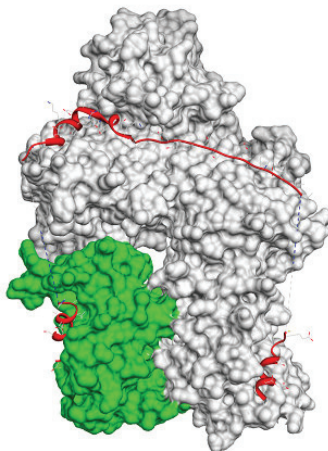
**32. ábra.** Összehasonlítva a szabad és a kalpainhoz kötött hCSD1 spektrális sűrűségfüggvény értékeit a  $J(0)$ (fent),  $J(\omega_N)$ (középen) és  $J(0,87\omega_H)$ (lent) pontokban látható, hogy a lassú mozgások szerepe megnő a kötődés során. A szekvencia mentén a legerősebben kötődő régiók az A- és C-szubdoménhez kapcsolhatók, ezek a jelek eltűnnek a spektrumból. A B-szubdoménen belül a kiemelkedő  $J(0)$  értékek alapján egyes aminosavak részben a kalpain molekula felszínéhez koordinálódtak.

A spektrális sűrűségfüggvény adott pontjainak vizsgálata alapján megállapítottuk, hogy a kalpainhoz való kötődés során a lassabb mozgások jelentősége megnőtt a rendezetlen formához viszonyítva. A  $J(0)$  és  $J(\omega_N)$  értékpárok *single motion* görbével való összevetéséből kiderül, hogy a kötődés néhány aminosavat érintetlenül hagyott és ezek relaxációját, a szabad formára is jellemző gyors mozgások ( $\tau \sim 200$  ps) határozzák meg. Az aminosavak jelentős részére jellemző a magasabb  $J(0)$  érték és a megnövekedett korrelációs idő ( $\tau \sim 5$  ns). Néhány aminosav a *single motion* görbe fölött található ( $T^{39}$ ,  $S^{51}$ ,  $I^{55}$ ,  $E^{57}$ ,  $R^{61}$  és  $T^{121}$ - $E^{122}$ ) ami esetükben a kémiai csere megjelenéséről árulkodik. (33. ábra)



33. ábra. A kötött és szabad forma  $J(0)/J(\omega_N)$  pontpárjait a *single motion* görbe megfelelő értékeivel összehasonlítva látható, hogy a kötött formában egyes aminosavakat megnövekedett korrelációs idő jellemezi. A komplexálódás során egyes aminosavak megtartják a szabad forma relaxációs tulajdonságait, ezek feltehetően a molekula felszínéhez nem kerülnek közel. Más aminosavak  $J(0)/J(\omega_N)$  pontpárjai azonban változó mértékben eltolódnak a lassabb mozgások irányába. A folytonos vonal a spektrális sűrűségfüggvény azon értékeit jelöli melyekre igaz, hogy a függvény egyetlen korrelációs idővel jellemezhető.

2009-ben *Moldveau és munkatársai* meghatározták {Moldoveau, T. és mts. 2009} a patkányból származó kalpasztatin/kalpain komplex röntgenszerkezetét, s így lehetőségünk nyílt hogy NMR eredményeinket összehasonlítsuk azokkal. A röntgenszerkezetből kiderült, hogy az erősen konzervált régiók, A- és C-szubdomének ( $A^{20}\text{-}G^{29}$ ) és ( $H^{94}\text{-}T^{104}$ ) valamint a B-alegység  $R^{61}\text{-}V^{63}$  és  $Y^{69}\text{-}R^{70}$  aminosavai *amfipatikus hélix* formában kötődnek a kalpainhoz. (34. ábra)



34. ábra. A kalpasztatin-kalpain komplex röntgenkristallográfiával (pdb: 3DFO) „láthatatlan” régiói NMR-spektroszkópiával hatékonyan vizsgálhatók. Az NMR eredmények alapján elmondható, hogy az N- és C-terminális régiók hasonló mozgékonyt mutatnak mind kötött, mind szabad formában (A<sup>1</sup>-G<sup>13</sup>; P<sup>137</sup>-K<sup>141</sup>). A szekvenciálisan konzervált régiók A(K<sup>14</sup>-G<sup>30</sup>)- és C(S<sup>87</sup>-C<sup>105</sup>)-szubdomének erősen kötődnek a kalpainhoz, és a B(M<sup>50</sup>-R<sup>70</sup>)-alegység néhány aminosava (pl. R<sup>61</sup>-V<sup>63</sup> és Y<sup>69</sup>-R<sup>70</sup>) is a kalpainhoz koordinálódott.

A röntgenszerkezetben leírt patkány kalpasztatinjának látható aminosavait (ezek kötődtek a kalpainhoz) az általunk vizsgált humán kalpasztatin szekvenciájára illetve kiderült, hogy az általunk felállított NMR model alapján az A- és C-szubdomén hosszabb szekvencia szakasza érintett a kötődésben (K<sup>14</sup>-G<sup>30</sup> vs A<sup>19</sup>-G<sup>29</sup> és S<sup>87</sup>-A<sup>110</sup> vs H<sup>94</sup>-T<sup>104</sup>). Ugyanakkor a B-alegység csak néhány aminosavján keresztül, és csak részlegesen kötődik. (35 ábra).

```

hCSD1.pdb      : AVPVESKPKDK PSGKSGMDAA LDDLIDTLGG PEETEENNT YTGPEVSDPM SSTYIEELGK
3DF0.pdb, chain C : .....A LDDLIDTLG.....ECV.....VLDFM DSTYLEALGI

hCSD1.pdb      : REVTIIPPKYR ELLAKKEGIT GPPADSSKPI GPDDAIDALS SDFTCGSPTA AGKKTKEES
3DF0.pdb, chain C : KEGTIIPPEYR KLEKNE.....HAIDALS SDFT.....

hCSD1.pdb      : TEVLKAQSAG TVRSAAPPQE K
3DF0.pdb, chain C : .....

```

35. ábra. A 3DFO röntgenszerkezet alapján az A- és C-szubdoménben kevesebb aminosav vesz részt a kötődésben, mint amennyit az NMR mérések alapján jósolhatunk. A szürkével kiemelt régiók a funkcionális alegységeket jelölik. A röntgenszerkezetben csak a kötődés során „rögzülő” aminosavak látszanak.

A fentebb vázolt okok miatt az NMR analízis, éppen azon a szakaszon lehetséges, ahol

az atomi koordináták a röntgenszerkezetből hiányoznak. Ezek a szakaszok többnyire rendezetlenek, bár a mozgások időskáláján megjelentek a komplexre jellemző lassabb „korrelációk” is. Az A(K<sup>14</sup>-G3<sup>20</sup>)- és C(S<sup>87</sup>-A<sup>110</sup>)-alegységek feltekeredettnek látszanak, viszont a B-szubdomén csak részlegesen és gyengébben kötődött a kalpainhoz. Az I<sup>55</sup>EELGK<sup>60</sup> REVTIPPK<sup>68</sup> szakaszok tartalmazzák a biológiailag fontos S3 S2 S1 S1'S2'S3' kötéshelyeket (E<sup>57</sup>-S1; L<sup>58</sup>-S2 G<sup>59</sup>-S3 és T<sup>64</sup>-S1'; I<sup>65</sup>-S2'; P<sup>66</sup>- S3'). A relaxációs vizsgálatok alapján a T<sup>39</sup>-T<sup>40</sup>, S<sup>51</sup>, I<sup>55</sup>, R<sup>61</sup>, L<sup>72</sup>-K<sup>76</sup> és T<sup>121</sup>-E<sup>122</sup> régiókban kölcsönhatást feltételezhetünk az enzim és inhibitor molekulák között, aminek szerepe lehet a B-szubdomén kötődési folyamatában is.



## VII Összefoglalás

A rendezetlen fehérjék vagy fehérje szakaszok jól definiált 3D-szerkezet nélkül léteznek és töltik be funkciójukat, ami ellentmond a klaszikus rendezett fehérjékre kimondott szerkezet-hatás összefüggésnek. {Wright, P.E. és mts. 1999}. A rendezetlen fehérjék oldatfázisú konformációinak és kötődési folyamatának vizsgálata a fenti tétel hiányosságaira mutat rá. Feltételezhető, hogy az *IUP*-kban lokális motívumok megelőlegezik a célmolekulához kötött forma szerkezetét, így korlátozva a lehetséges konformációk számát, lehetővé téve a specifikus, kinetikailag és termodinamikailag hatékony kölcsönhatást.

Munkánkban  $^{15}\text{N}$  és  $^{15}\text{N}$ - $^{13}\text{C}$  jelölt fehérjék felhasználásával elvégeztük a hCSD1<sup>67-141</sup> valamint a hCSD1 molekula teljes NMR jelhozzárendelését különböző  $\text{Ca}^{2+}$  ion koncentrációk mellett. Méréseink során  $^{15}\text{N}$  valamint  $^{13}\text{C}$  és  $^{15}\text{N}$  tripla rezonancia spektrumokat rögzítettünk és így lehetőségünk nyílt a módszerek összehasonlítására is. Megállapítottuk, hogy a rendezetlen fehérjék jelhozzárendelése során a karbonil-szén kémiaieltolódás-értékek jelfelbontása a leghasznosabb.

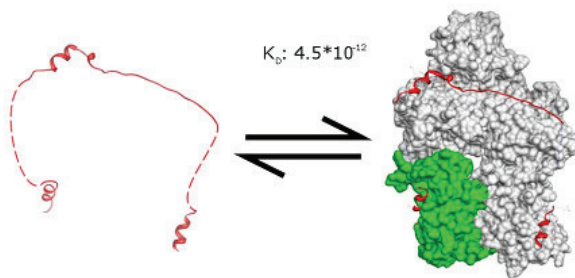
Az rezonanciafrekvenciák ismeretében másodlagos kémiaieltolódás-értékek felhasználásával magasabb rendű szerkezeti elemeket kerestünk a fehérjékben. A hasítással létrehozott hCSD1<sup>67-141</sup> és a hCSD1 kémiaieltolódás-értékeinek összevetésével megállapítottuk, hogy a B-szubdomén bizonyos szerkezeti elemekkel rendelkezik, és ezeket elvesztette a hasítás következtében.

Spin jelölés módszerrel bemutattuk a hCSD1 rendkívüli mozgékonyágát, és hogy a molekulában tartós, hosszútávú kapcsolatok nem alakulnak ki.

A vizsgálataink jelentős felismerése volt a  $\text{Ca}^{2+}$  ion hatása a kalpasztatin molekulára. Megfigyeltük hogy a hCSD1 A- és C-funkcionális alegységei savas karakterű aminosavakkal határoltak ( $\text{E}^{32}\text{ETEEE}^{37}$  és  $\text{E}^{116}\text{KEESTE}^{122}$ ), és ezek a szakaszok a másodlagos kémiaieltolódás-értékek vizsgálata alapján direkt módon  $\text{Ca}^{2+}$ -t kötnék. A  $\text{Ca}^{2+}$ -ion e régiók glutaminsav oldalláncainak jelentős negatív töltését kompenzálja és az elektrosztatikus taszítást kiküszöbölve, helikális szerkezeti elemek kialakulását segítheti a környezetükben. Hasonló hatást figyelhető meg a hélix formációt megelőző foszforilációs módosítások esetében is {Waygood, E., B. 1988}. A hCSD1 szabad forma NMR dinamikai vizsgálata során alátámasztottuk, hogy az A- és C-alegységek szabad formában tranziens

hélixet formálnak {Mucsi Z és mts. 2003}, és amfipatikus hélixet kalpainhoz kötött állapotban {Todd, B. és mts. 2003}. Ezek alapján szerkezetek  $\text{Ca}^{2+}$  általi stabilizálása fontos lépése lehet a regulációs folyamatnak.

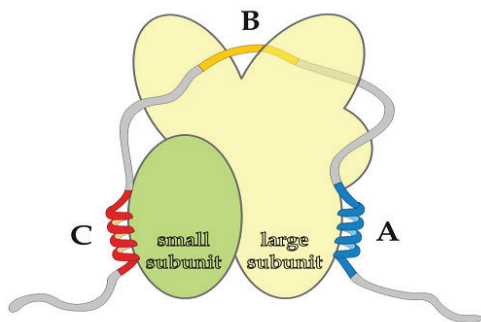
A másodlagos kémiaieltolódás-értékek és a dinamikai paraméterek vizsgálata bizonyos szintű szerkezeti preferenciákat mutatott a szekvenciálisan konzervált régiókban. Szabad formában a hélixekre jellemző másodlagos kémiaieltolódás-értékeket mértünk az  $\text{D}^{18}\text{-I}^{25}$  szakaszon az  $\text{A}(\text{S}^{12}\text{-G}^{30})$ -, az egymást követő  $\text{S}^{51}\text{-G}^{59}$  és  $\text{K}^{68}\text{-K}^{75}$  szekvencia szakaszokon a  $\text{B}(\text{M}^{50}\text{-M}^{70})$ -, és a  $\text{G}^{91}\text{-T}^{104}$  aminosavakon a  $\text{C}(\text{S}^{87}\text{-C}^{105})$ -funkcionális alegységben. Irodalmi adatok és méréseink alapján a  $\text{T}^{64}\text{-R}^{70}$  régió feltehetően  $\beta$ -turn szerkezetű {Ishima, R. és mts. 1991}. A hCSD1 molekula NMR dinamikai vizsgálata alátámasztja a szerkezeti elemek létezését a molekula szabad formájában. (36. ábra)



**36. ábra.** A hCSD1 molekula egyes szakaszain szabad formában jelentős helicitást mutat, amely régiók megelőlegezik a kötött forma konformációját, így segítve a kötődést.

Kötődési vizsgálataink során kalpain-kalpasztatin kölcsönhatást vizsgáltuk. Az eredményeink egyértelműen rámutatnak arra, hogy a  $\text{S}^{15}\text{-G}^{29}$  and  $\text{I}^{90}\text{-T}^{109}$  szakaszok kötődnek előbb a kalpainhoz és rögzítik a molekulát a komplexben. A B-szubdoménhez köthető  $\text{R}^{61}\text{-L}^{72}$  régió is közel kerül a molekulához, közvetlen kapcsolatban van az enzimmal, bár a kötődés nem olyan erős, mint az előbbieket esetében. Ebben az állapotban a funkcionális alegységeket összekötő linker régiók,  $\text{G}^{30}\text{-K}^{60}$  és  $\text{L}^{73}\text{-P}^{89}$ , a szabad formára jellemző mozgékonyással rendelkeznek. A láncvégi  $\text{A}^1\text{-K}^{14}$  and  $\text{A}^{110}\text{-K}^{141}$  szakaszok is rendezetlenek maradnak és a kalpainhoz nem kötődnek. Az ilyen „három ponton történő” kötődés még az *IUP*-k körében is szokatlan. Leggyakrabban egyetlen felismerő szakaszon keresztül kötnek és a mozgékony régiók szabadon maradnak. {Fuxreiter, M. és mts. 2004}. Néhány esetben két kötőhely egy flexibilis régióval szétválasztva köt, mint a *Ste5*, *Oct1*

{vanLeeuwen H.C. és mts. 1997}, vagy *bacterial cellulose* {von Ossowsky, I. és mts. 2005} esetében. A hárompontos kötődést csak az *I2* molekula PP1-hez való kötődése {Hurley, T.D. és mts. 2007} esetében ismert, és előfordulását behatárolja a specificitást segítő konformációs entrópia jelentős csökkenése.



**37. ábra.** A mért adatokból a fenti sematikus képet állítottuk fel kalpain-kalpasztatin kötődés folyamatára. Az A- és C-szubdomén erősen kötődik a molekulához, még a a B-funkcionális alegység „lazábban”. A szubdoméneket összekötő szakaszok és a terminális régiók megőrzik a szabad formára jellemző mozgékonyágukat.

Modellünk alapján a kalpasztatin körülöleli a kalpait és három, térben és szekvenciában távoli ponton történik a kötődés. A kötési pontok mozgékonyágát és irányítását az őket összekötő flexibilis régiók segítik. A hCSD1 kötődési módja kombinálja a specificitást, a gyors kötődés és a reverzibilitás előnyeit a kalpain regulációja során. Kiderülhet, hogy a funkcionális haszon miatt más *IUP*-k is követik a fenti kötődési stratégiát.

A röntgenszerkezet ismeretében kötődési vizsgálataink fontos felismerése volt, hogy az *IUP*-k esetében az NMR fontos komplementere lehet ezen vizsgálatoknak. Megállapítottuk, hogy azon régiók melyek a röntgen számára „láthatatlanok”, NMR-rel igen jól vizsgálhatók. Ugyanakkor a kötődéssel a kalpainhoz koordinálódott régiók az NMR számára láthatatlanná válnak.

## VIII Irodalomjegyzék

1. Betts, R., Weinsheimer, S., Blouse, G. E., and Anagli, J. (2003) Structural determinants of the calpain inhibitory activity of calpastatin peptide B27-WT, *J. Biol. Chem.* 278, 7800-7809.
2. Branca, D. (2004) Calpain-related diseases, *Biochem. Bioph. Res. Co.* 322, 1098-1104.
3. Bundi, A. and Wüthrich, K., (1979) <sup>1</sup>H-NMR Parameters of the Common Amino Acid Residues Measured in Aqueous Solutions of the Linear Tetrapeptides H-Gly-Gly-X-L-Ala-OH. *Biopolymers* 18, 285-297.
4. Cheng, Y. et al. (2006) Rational drug design via intrinsically unstructured protein. *Trends in Biotech.* 24, 435-441
5. Crawford, C., Brown, N.R. and Willis, A.C. (1993) Studies of the active-site of m-calpain and the interaction with calpastatin. *Biochem. J.* 296, 135-142.
6. Croall, D.E. and McGrody, K.S. (1994) Domain-structure of calpain – mapping the binding-site for calpastatin. *Biochemistry-USA* 33, 13223-13230.
7. Cszimok, V., Bokor, M., Banki, P., Klement, T., Medzihradsky, K. F., Friedrich, P., Tompa, K. A., and Tompa, P. (2005) Primary contact sites in intrinsically unstructured proteins: The case of calpastatin and microtubule-associated protein 2, *Biochemistry-USA* 44, 3955-3964.
8. Daragan, V.A.; Mayo, K.H. (1998) A Simple Approach to Analyzing Protein Side-Chain Dynamics from <sup>13</sup>C Relaxation Data, *J.Magnetic Resonance*, 130, 329-334.
9. Gary W. Daughdrill, Gary J. Pielak, Vladimir N. Uversky, Marc S. Cortese, A. Keith Dunker (2008) Chapter 8. Natively Disordered Proteins *Protein Folding Handbook* 2005 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA
10. Delaglio, F., Grzesiek, S., Vuister, G. W., Zhu, G., Pfeifer, J., and Bax, A. (1995) NMRPIPE–A multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes, *J. Biomol. Nmr* 6, 277-293.
11. Dunker, A.K., Brown, C.J., Lawson, J.D., Iakoucheva, L.M. and Obradovic, Z. (2002) Intrinsic disorder and protein function, *Biochemistry-USA* 41, 6573-6582.
12. Dyson, H. J., Rance, M., Houghten, R. A., Lerner, R. A., and Wright, P. E. (1988) Folding of immunogenic peptide-fragments of proteins in water solutions. 1. sequence requirements for the formations of a reverse turn, *J. Mol. Biol.* 201, 161-200.
13. Dyson, H. J., and Wright, P. E. (2002) Coupling of folding and binding for unstructured proteins, *Curr. Opin. Struct. Biol* 12, 54-60.

14. Dyson, H. J., and Wright, P. E. (2005) Intrinsically unstructured proteins and their functions, *Nat. Rev. Mol. Cell Bio.* 6, 197-208.
15. Eliezer, D., Kutluay, E., Bussell, R., and Browne, G. (2001) Conformational properties of alpha-synuclein in its free and lipid-associated states, *J. Mol. Biol.* 307, 1061-1073.
16. Emori, Y., Kawasaki, H., Imajoh, S., Minami, Y., and Suzuki, K. (1988) All 4 repeating domains of the endogenous inhibitor for calcium-dependent protease independently retain inhibitory activity – Expression of the CDNA fragments in Escherichia-Coli, *J. Biol. Chem.* 263, 2364-2370.
17. Farkas, A., Tompa, P., and Friedrich, P. (2003) Revisiting ubiquity and tissue specificity of human calpains. *Biol. Chem.* 384, 945–949.
18. Fasman G., D., (1996) Circular Dicroism and the Conformational Analysis of Biomolecules. *Plenum Press*, New York.
19. Fuxreiter, M., Simon, I., Friedrich, P., and Tompa, P. (2004) Preformed structural elements feature in partner recognition by intrinsically unstructured proteins, *J. Mol. Biol.* 338, 1015-1026.
20. Goll, D.E., Thompson, V.F., Li, H.Q., Wei, W. and Cong, J.Y. (2003) The calpain system, *Physiol. Rev.* 83, 731-801.
21. Hurley, T.D., Yang, J., Zhang, L.L., Goodwin, K.D., Zou, Q., Cortese, M., Dunker, A.K. and DePaoli-Roach, A.A. (2007) Structural basis for regulation of protein phosphatase 1 by inhibitor-2. *J. Biol. Chem.* 282, 28874-28883.
22. Iakoucheva, L.M., Brown, C.J., Lawson, J.D., Obradovic, Z. and Dunker, A.K. (2002) Intrinsic disorder in cell-signaling and cancer-associated proteins. *J. Mol. Biol.* 323, 573-584.
23. Ishima, R., Tamura, A., Akasaka, K., Hamaguchi, K., Makino, K., Murachi, T., Hatanaka, M., and Maki, M. (1991) Structure of the active 27-residue fragment of human calpastatin., *Febs Lett.* 294, 64-66.
24. Ishiama 1995
25. Kneller, D. G., and Kuntz, I. D. (1993) UCSF SPARKY-An NMR display annotation and assignment tool, *J.Cell. Biochem.*, 254-254.
26. Konno, T., Tanaka, N., Kataoka, M., Takano, E., and Maki, M. (1997) A circular dichroism study of preferential hydration and alcohol effects on a denatured protein, pig calpastatin domain I, *BBA-Protein Struct. H.* 1342, 73-82.
27. Křížová, H., Židek, L., Stone, M., Novotny, M.V., and Sklenář, V., (2004) Temperature Dependent Backbone Dynamics of Major Urinary Protein-I Complexed with the Pheromone 2-sec-butyl-4,5-dihydrothiazole. *J. Biomol. NMR* 28, 369-384:

28. Kyte, J., and Doolittle, R. F. (1982) A simple method for displaying the hydrophatic character of a protein. *J. Mol. Biol.* 157, 105-132.
29. Lacy, E. R., Filippov, I., Lewis, W. S., Otieno, S., Xiao, L. M., Weiss, S., Hengst, L., and Kriwacki, R. W. (2004) p27 binds cyclin-CDK complexes through a sequential mechanism involving binding-induced protein folding. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 11, 358-364.
30. Lefevre, J. F., Dayie, K. T., Peng, J. W., and Wagner, G. (1996) Internal mobility in the partially folded DNA binding and dimerization domains of GAL4: NMR analysis of the N-H spectral density functions. *Biochemistry-USA* 35, 2674-2686.
31. Lietzow MA, Jamin M, Jane Dyson HJ, Wright PE. (2002) Mapping long-range contacts in a highly unfolded protein. *J Mol Biol.* 322(4):655-62.
32. Lipari, G. and Szabo, A. (1982) Model-free approach to the interpretation of nuclear magnetic resonance relaxation in macromolecules. 1. Theory and range of validity *J. Am. Chem. Soc.* 104 (17), 4546-4559.
33. Ma, H., Yang, H. Q., Takano, E., Hatanaka, M., and Maki, M. (1994) Amino-terminal conserved region in proteinase inhibitor domain of calpastatin potentiates its calpain inhibitory activity by interacting with calmodulin-like domain of the proteinase. *J. Biol. Chem.* 269, 24430-24436.
34. Maki, M., Bagci, H., Hamaguchi, K., Ueda, M., Murachi, T. and Hatanaka, M. (1989) Inhibition of calpain by a synthetic oligopeptide corresponding to an exon of the calpastatin gene. *J. Biol. Chem.* 264, 18866-18869.
35. Merutka, G., Dyson, H.J., Wright, P.E., (1995) Peptide proton random coil chemical shifts obtained as a function of temperature and trifluoroethanol concentration. *J. Biomol. NMR* 5, 14-24.
36. Moldoveanu T., Gehring K., Green D.R., (2008) Concerted multi-pronged attack by calpastatin to occlude the catalytic cleft of heterodimeric calpains *NATURE* 456 (7220) 404-408
37. Mori S, Abeygunawardana C, Johnson MO, van Zijl PC. (1995) Improved sensitivity of HSQC spectra of exchanging protons at short interscan delays using a new fast HSQC (FHSQC) detection scheme that avoids water saturation. *J Magn Reson B.* 108 (1), 94-98.
38. Mucsi, Z., Hudecz, F., Hollosi, M., Tompa, P., and Friedrich, P. (2003) Binding-induced folding transitions in calpastatin subdomains A and C. *Protein Sci.* 12, 2327-2336.
39. Oldfield, C. J., Cheng, Y., Cortese, M. S., Brown, C. J., Uversky, V. N., and Dunker, A. K. (2005) Comparing and combining predictors of mostly disordered proteins. *Biochemistry-USA* 44, 1989-2000.
40. Palmer, A., G., III, Cavanagh, J., Wright, P.E., Rance M. (1991) *J. Magn. Reson.* 93, 151-170

41. Peng, J.W. & Wagner, G. (1995) Frequency spectrum of NH bonds eglin c from spectral density mapping at multiple fields. *Biochemistry* 34, 16733–16752
42. Piotto, M., Saudek, V. and Sklenář, V.: (1992): Gradient-tailored Excitation for Single-quantum NMR Spectroscopy of Aqueous Solutions. *J. Biomol. NMR* 2, 661
43. Richarz, R. and Wuthrich, K., (1978): Carbon-13 NMR Chemical Shifts of the Common Amino Acid Residues Measured in Aqueous Solutions of the Linear Tetrapeptides H-Gly-Gly-X-L-Ala-OH. *Biopolymers* 17, 2133-2141
44. Schwarzingler, S., Kroon, G. J. A., Foss, T. R., Wright, P. E., Dyson, H. J. (2000) Random coil chemical shifts in acidic 8 M urea: implementation of random coil shift data in NMRView, *J. Biomol. NMR* 18, 43-48
45. Strobl, S., Fernandez-Catalan, C., Braun, M., Huber, R., Masumoto, H., Nakagawa, K., Irie, A., Sorimachi, H., Bourenkow, G., Bartunik, H., Suzuki, K., and Bode, W. (2000) The crystal structure of calcium-free human m-calpain suggests an electrostatic switch mechanism for activation by calcium, *P. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 588-592.
46. Talluri, S., Wagner, G. (1996) An optimized NOESY-HSQC *Journal of Magnetic Resonance*, 112, 200
47. Thompson, J. D., Higgins, D. G., and Gibson, T. J. (1994) CLUSTAL-W – Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice, *Nucleic Acids Res.* 22, 4673-4680.
48. Todd, B., Moore, D., Deivanayagam, C.C.S., Lin, G.D., Chattopadhyay, D., Maki, M., Wang, K.K.W. and Narayana, S.V.L. (2003) A structural model for the inhibition of calpain by calpastatin: Crystal structures of the native domain VI of calpain and its complexes with calpastatin peptide and a small molecule inhibitor. *J. Mol. Biol.* 328, 131-146.
49. Tompa, P., Mucsi, Z., Orosz, G., and Friedrich, P. (2002) Calpastatin subdomains A and C are activators of calpain, *J. Biol. Chem.* 277, 9022-9026.
50. Tompa, P. (2002) Intrinsically unstructured proteins, *Trends Biochem. Sci.* 27, 527-533.
51. Uversky, V., N. (2002) Natively unfolded proteins: A point where biology waits for physics. *Protein Sci.* 11,739-756
52. vanLeeuwen, H.C., Strating, M.J., Rensen, M., deLaat, W. and vanderVliet, P.C. (1997) Linker length and composition influence the flexibility of Oct-1 DNA binding. *Embo J.* 16, 2043-2053.
53. Vise, P. D., Baral, B., Latos, A. J., and Daughdrill, G. W. (2005) NMR chemical shift and relaxation measurements provide evidence for the coupled folding and binding of the p53 transactivation domain, *Nucleic Acids Res.* 33, 2061-2077.

54. von Ossowski, I. et al. (2005) Protein disorder: Conformational distribution of the flexible linker in a chimeric double cellulase. *Biophys. J.* 88, 2823-2832.
55. Ward, J. J., Sodhi, J. S., McGuffin, L. J., Buxton, B. F., and Jones, D. T. (2004) Prediction and functional analysis of native disorder in proteins from the three kingdoms of life. *J. Mol. Biol.* 337, 635-645.
56. Waygood, E.B. (1998) The structure and function of HPr. *Biochem. Cell Biol.* 76, 359-367.
57. Weisemann, R., Ruterjans, H., Schwalbe, H., Schleucher, J., Bermel, W., and Griesinger, C. (1994) Determination of H(N),H-alpha and H(N), C' coupling constants in C<sup>13</sup>, N<sup>15</sup> labeled proteins, *J. Biomol. Nmr* 4, 231-240.
58. Wendt, A., Thompson, V. F., and Goll, D. E. (2004) Interaction of calpastatin with calpain: a review, *Biol. Chem.* 385, 465-472.
59. Williams R., J., (1978) The conformational mobility of proteins and its functional significance. *Biochem. Soc. Trans.* 6, 1123-1126
60. Wishart, D. S., Bigam, C. G., Holm, A., Hodges, R. S., and Sykes, B. D. (1995) H-1, C-13 and N-15 random coil NMR chemical-shifts of the common amino-acids. 1. Investigation of nearest-neighbor effects, *J. Biomol. Nmr* 5, 67-81.
61. Wishart, D. S., Sykes, B. D., and Richards, F. M. (1991) Relationship between nuclear-magnetic-resonance chemical-shift and protein secondary structure, *J. Mol. Biol.* 222, 311-333.
62. Wishart, D. S., and Sykes, B. D. (1994) Chemical-shift as a tool for structure determination, in *Nuclear Magnetic Resonance, Pt C*, pp 363-392.
63. Wright, P. E., and Dyson, H. J. (1999) Intrinsically unstructured proteins: Re-assessing the protein structure-function paradigm, *J. Mol. Biol.* 293, 321-331.
64. Wüthrich, K. (1975) *NMR in Biological Research: Peptides and Proteins*, North Holland, Amsterdam.
65. Yu, H. (1999) Extending the size limit of protein nuclear magnetic resonance *PNAS* 96 332-334
66. Zatz, M. and Starling, A. (2005) Mechanisms of disease: Calpains and disease, *New Engl. J. Med.* 352, 2413-2423.
67. Yamazaki, T., Weontae Lee, Cheryl H. Arrowsmith, D. R. Muhandiram, Lewis E. Kay (1994) A Suite of Triple Resonance NMR Experiments for the Backbone Assignment of 15N, 13C, 2H Labeled Proteins with High Sensitivity *J. Am. Chem. Soc.*, 116 (26), pp 11655-11666
68. Yang, H.Q., H. Ma, E. Takano, M. Hatanaka, and M. Maki, (1994) Analysis of calcium-dependent interaction between amino-terminal conserved region of calpastatin functional domain and calmodulin-like domain of mu-calpain large subunit. *J Biol Chem*, 269 (29), 18977-18984.



## VIII.1 Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

69. Kiss R., Kovacs D., Tompa P., Perczel A., (2008) Local structural preferences of calpastatin, the intrinsically unstructured protein inhibitor of calpain *Biochemistry* 47 (26) 6936–6945
70. Kiss R., Bozoky Z., Rona G., Friedrich P., Dvortsak P., Weisemann R., Tompa P., Perczel A., (2008) Calcium-induced tripartite binding of intrinsically disordered calpastatin to its cognate enzyme, calpain *FEBS Lett.* 582 2149–2154

## VIII.2 Egyéb közlemények

71. Bagyi, I., Balogh, B., Czajlik, A., Elias, O., Gaspari, Z., Gergely, V., Hudaky, I., Hudaky, P., Kalaszi, A., Karolyhazy, L., Keseru, K., Kiss, R., Krajsovszky, G., Lang, B., Nagy, T., Racz, A., Szentesi, A., Tabi, T., Tapolcsanyi, P., Vaik, J., Koo, J. C. P., Chass, G. A., Farkas, O., Perczel, A., and Matyus, P. (2003) Generation and analysis of the conformational potential energy surfaces of N-acetyl-N-methyl-L-alanine-N<sup>1</sup>-methylamide. An exploratory ab initio study, *J. Mol. Struct. - Theochem* 625, 121-136.
72. Schlosser, G., Mezo, G., Kiss, R., Vass, E., Majer, Z., Fejlbrieff, M., Perczel, A., Bosze, S., Welling-Wester, S., and Hudecz, F. (2003) Synthesis, solution structure analysis and antibody binding of cyclic epitope peptides from glycoprotein D of Herpes simplex virus type I, *Biophysical Chemistry* 106, 155-171.
73. Hudaky, I., Kiss, R., and Perczel, A. (2004) A nomenclature of peptide conformers, *Journal of Molecular Structure-Theochem* 675, 177-183.
74. Mihala, N., Csampai, A., Ilas, J., Kikelj, D., Kiss, R., and Suli-Vargha, H. (2006) The synthesis of alternative diketopiperazines as potential RGD mimetics, *J. Pept. Sci.* 12, 663-669.

## IX Függelék

1. táblázat. A hCSD1 molekula NMR kémiaieltolódás-érték táblázata (kalcium mentes forma).

AS.	H <sup>HN</sup> (ppm)	N <sup>HN</sup> (ppm)	C'(ppm)	C $\alpha$ (ppm)	C $\beta$ (ppm)	H $\alpha$ (ppm)	H $\beta$ (ppm)
A1	-	-	-	51,73	19,42	-	-
V2	8,43	120,23	173,65	60,10	32,17	4,57	2,20
P3	-	-	-	-	-	-	-
V4	8,24	120,72	174,15	62,51	32,81	4,16	2,14
E5	8,47	124,41	176,25	55,80	29,55	4,50	2,06
S6	8,38	117,88	175,95	58,20	63,87	4,53	3,91
K7	8,35	123,99	173,95	54,15	32,65	4,74	1,82
P8	-	-	-	63,20	31,93	-	-
D9	8,47	120,11	176,65	53,73	40,14	4,69	2,81
K10	8,14	121,84	175,45	53,85	32,74	4,73	1,79
P11	-	-	-	62,93	32,07	-	-
S12	8,48	116,23	177,05	58,42	64,18	4,54	3,99
G13	8,42	110,51	175,25	45,36	-	4,08	-
K14	8,24	120,72	176,75	56,26	33,17	-	-
S15	8,42	116,80	176,75	58,57	63,99	4,56	3,99
G16	8,47	110,49	175,15	45,52	-	4,07	-
M17	8,22	119,61	174,45	55,88	32,83	4,55	2,09
D18	8,38	120,33	176,25	53,96	39,75	4,70	2,84
A19	8,19	124,45	175,75	53,09	18,65	4,31	1,45
A20	8,13	121,65	177,85	53,05	18,93	4,37	1,51
L21	7,98	119,70	-	55,73	42,08	-	-
D22	8,19	118,61	-	53,91	39,04	-	-
D23	8,20	118,76	175,65	53,82	39,05	4,72	2,92
L24	8,03	121,49	175,65	55,89	42,15	4,41	1,74
I25	-	-	-	61,83	38,54	-	-
D26	8,33	121,81	-	53,82	39,17	-	-
T27	8,03	113,91	175,95	62,41	69,78	4,43	4,29
L28	8,16	123,37	174,85	55,61	42,21	4,45	1,77
G29	8,27	108,84	177,85	45,26	-	4,07	-
G30	8,06	108,49	174,35	44,78	-	4,21	-
P31	-	-	-	63,53	32,02	-	-
E32	8,48	119,53	177,35	56,40	28,83	4,41	2,08
E33	8,29	120,85	-	56,29	28,97	4,49	2,10
T34	8,11	114,28	176,45	62,35	69,69	-	4,38
E35	8,31	121,80	174,85	56,39	28,87	4,45	2,21
E36	8,20	120,11	177,15	57,04	28,90	4,34	2,13
E37	8,30	120,46	-	56,13	29,03	-	-
N38	8,42	119,22	175,85	53,46	38,90	4,88	2,93
T39	8,14	114,07	175,45	62,21	69,70	4,49	-
T40	8,12	116,18	174,65	62,28	69,75	4,40	4,26
Y41	8,28	123,50	174,05	58,19	38,97	4,74	3,09
T42	8,08	116,70	175,85	61,29	69,76	4,43	-
G43	7,32	110,304	-	44,58	-	-	-

AS.	H <sup>HN</sup> (ppm)	N <sup>HN</sup> (ppm)	C'(ppm)	C $\alpha$ (ppm)	C $\beta$ (ppm)	Ha (ppm)	H $\beta$ (ppm)
P44	-	-	-	63,22	32,12	-	-
E45	8,52	120,56	177,25	56,22	28,98	4,45	2,08
V46	8,14	120,55	176,65	62,28	32,80	4,42	-
S47	8,26	118,39	175,95	58,05	63,90	4,53	3,90
D48	8,26	122,04	173,75	51,59	40,14	5,00	2,74
P49	-	-	-	-	-	-	-
M50	8,28	117,67	-	55,56	32,08	-	-
S51	8,05	115,77	176,75	58,69	63,97	4,53	4,04
S52	8,42	117,65	175,15	59,53	63,58	-	-
T53	8,03	115,38	175,35	63,07	69,41	-	4,30
Y54	7,95	122,26	174,75	59,28	38,67	4,56	3,11
I55	7,93	120,86	-	62,19	38,48	4,01	-
E56	8,17	122,36	176,95	57,16	28,90	4,28	-
E57	8,30	120,52	176,75	56,57	28,97	4,42	2,09
L58	8,11	121,82	176,95	56,29	42,06	4,26	-
G59	8,24	107,87	178,45	45,75	45,74	4,01	-
K60	7,90	119,91	174,55	56,45	33,02	4,41	1,87
R61	8,15	120,59	175,95	56,21	30,72	-	-
E62	8,33	120,96	-	56,16	29,09	4,49	2,08
V63	8,13	120,55	176,25	62,28	32,90	4,25	2,18
T64	8,21	118,29	176,05	62,00	69,79	4,45	4,21
I65	8,24	125,45	173,95	58,36	38,76	4,56	-
P66	-	-	-	-	-	-	-
P67	-	-	-	64,10	-	-	-
K68	8,37	118,55	-	57,50	32,33	4,57	-
Y69	7,87	118,87	-	58,30	38,61	4,64	-
R70	8,02	120,99	176,25	57,60	30,40	4,16	-
E71	8,33	120,74	-	56,27	29,08	4,31	-
L72	7,99	121,93	-	56,27	42,12	4,34	-
L73	8,00	121,14	177,55	55,84	42,16	4,69	-
A74	7,98	123,12	177,55	53,16	18,95	4,34	1,49
K75	8,02	119,44	178,25	56,81	32,88	4,37	1,98
K76	-	-	-	-	-	-	-
E77	-	-	-	56,12	29,48	-	-
G78	8,31	109,34	176,55	45,39	-	4,06	-
I79	8,00	119,45	174,05	61,27	38,75	-	-
T80	8,24	117,52	176,65	61,77	69,89	4,51	-
G81	8,18	111,21	174,55	44,51	-	4,18	-
P82	-	-	-	-	-	-	-
P83	-	-	-	62,99	31,96	-	-
A84	8,43	123,97	176,95	52,69	19,20	4,36	-
D85	8,35	118,58	-	53,67	40,07	4,76	2,87
S86	8,27	116,35	176,05	58,50	63,86	4,53	-
S87	8,34	117,57	174,65	58,56	63,87	4,54	-
K88	8,09	123,78	174,05	54,14	32,68	4,72	-
P89	-	-	-	62,95	32,00	-	-
I90	8,28	121,15	176,75	61,21	38,90	-	3,12
G91	8,32	113,05	-	44,56	-	4,20	-
P92	-	-	-	63,55	32,11	-	-
D93	8,52	118,63	177,15	53,75	39,40	4,75	2,85

AS.	H <sup>HN</sup> (ppm)	N <sup>HN</sup> (ppm)	C' (ppm)	C $\alpha$ (ppm)	C $\beta$ (ppm)	Ha (ppm)	H $\beta$ (ppm)
D94	8,17	119,68	175,55	53,81	39,52	4,72	-
A95	8,11	123,54	175,45	52,98	19,12	4,39	1,48
I96	7,96	118,59	177,95	61,71	38,62	4,18	1,96
D97	8,30	122,18	176,35	53,79	39,38	4,73	-
A98	8,12	123,93	175,55	53,12	19,13	4,34	-
L99	8,07	119,78	177,85	55,45	42,21	4,44	-
S100	8,12	115,51	177,75	58,62	63,82	4,53	4,01
S101	8,25	117,17	174,95	58,61	63,76	4,52	-
D102	8,24	120,72	174,25	53,78	39,49	4,49	2,78
F103	8,09	120,14	175,45	57,98	39,48	4,77	-
T104	8,07	114,98	176,05	62,10	69,86	4,41	-
C105	8,39	120,78	174,55	55,86	41,00	4,76	3,23
G106	8,44	110,56	-	45,24	-	4,08	-
S107	8,11	116,33	173,55	56,27	63,57	4,41	-
P108	-	-	-	63,71	32,04	-	-
T109	8,11	113,19	177,35	62,01	69,69	-	4,39
A110	8,19	126,04	174,55	52,79	19,18	4,58	1,50
A111	8,21	122,86	177,55	52,90	19,13	4,39	1,48
G112	8,28	107,57	178,35	45,31	45,32	4,02	-
K113	8,06	120,55	174,15	56,23	33,14	4,41	1,85
K114	8,39	122,73	-	56,44	33,06	-	-
T115	8,19	115,28	176,85	61,95	69,85	4,41	-
E116	8,42	122,85	174,95	56,41	29,53	4,38	-
K117	8,36	122,07	-	56,58	32,95	4,37	1,87
E118	8,37	121,62	176,65	56,24	29,40	4,42	2,11
E119	8,44	121,55	176,35	56,24	29,39	4,45	2,11
S120	8,38	116,53	176,45	58,64	63,77	4,58	4,02
T121	8,20	115,56	175,15	62,55	69,81	4,38	-
E122	8,27	122,35	174,55	56,79	29,22	4,45	2,08
V123	8,04	121,30	176,55	63,12	32,43	4,10	-
L124	8,19	124,84	176,45	55,62	42,18	4,40	1,70
K125	8,21	121,86	177,75	56,62	32,90	4,34	1,90
A126	8,19	124,45	176,65	52,90	19,02	4,38	-
E127	8,32	119,16	178,05	56,07	29,40	4,41	2,14
S128	8,27	116,48	176,35	58,40	63,91	4,53	3,98
A129	8,35	125,81	174,45	52,94	19,23	4,45	-
G130	8,34	107,52	178,25	45,34	-	4,09	-
T131	8,02	113,90	174,35	62,26	69,86	4,43	-
V132	8,19	123,06	174,65	62,39	32,68	4,21	2,15
R133	8,47	125,37	176,05	55,95	30,90	4,48	1,86
S134	8,32	117,40	176,15	58,19	63,90	4,52	3,94
A135	8,34	126,04	173,95	52,32	19,36	4,44	1,48
A136	8,22	124,69	176,95	50,40	18,24	4,67	1,44
P137	-	-	-	-	-	-	-
P138	-	-	-	62,99	-	-	-
Q139	8,44	120,16	176,85	55,81	29,63	4,40	2,06
E140	8,41	122,44	175,95	56,01	29,37	4,45	2,06
K141	8,09	126,60	175,25	57,34	33,50	4,29	1,80

2. táblázat. A hCSD1<sup>67-141</sup> molekula NMR kémiaieltolódás-érték táblázata.

AS.	H <sup>NH</sup> (ppm)	N <sup>HN</sup> (ppm)	C $\alpha$ (ppm)	H $\alpha$ (ppm)
P67	-	-	-	-
K68	-	-	-	-
Y69	8,29	121,8	56,5	4,51
R70	-	-	-	-
E71	8,30	122,0	56,7	4,71
L72	8,25	119,1	56,4	4,28
L73	8,29	123,1	54,5	4,28
A74	8,07	124,5	52,6	4,23
K75	8,12	120,6	55,3	4,24
K76	8,41	122,3	56,6	4,36
E77	8,38	122,5	56,7	4,26
G78	8,38	109,9	45,4	3,93
I79	7,97	119,8	61,3	4,27
T80	8,24	118,0	61,7	4,39
G81	8,16	111,6	44,6	4,11
P82	-	-	-	-
P83	-	-	-	4,39
A84	8,40	124,3	52,6	4,24
D85	8,27	119,4	54,3	4,59
S86	8,25	116,7	58,8	4,43
S87	8,35	117,9	58,7	4,40
K88	8,01	124,0	54,2	4,60
P89	-	-	-	-
I90	8,26	121,5	61,3	4,16
G91	8,41	113,8	44,7	4,24
P92	-	-	-	4,36
D93	8,42	119,4	54,6	4,59
D94	8,01	120,3	54,7	4,51
A95	8,06	123,7	52,6	4,32
I96	7,97	119,5	61,5	4,08
D97	8,29	123,6	54,5	4,55
A98	8,11	123,8	52,9	4,24
L99	8,11	120,1	55,3	4,32
S100	8,21	-	-	-
S101	-	117,2	58,5	4,40
D102	8,19	121,7	54,6	4,55
F103	8,10	120,6	58,1	4,63
T104	8,07	115,2	62,4	4,23
C105	8,35	120,9	56,0	4,63
G106	8,39	110,8	45,4	3,95
S107	8,07	116,6	56,3	4,75
P108	-	-	-	4,47
T109	8,07	113,4	62,0	4,25
A110	8,15	126,3	52,7	4,28
A111	8,18	123,2	52,8	4,27
G112	8,24	107,9	45,3	3,89
K113	8,03	120,9	56,2	4,30
K114	8,23	122,1	56,7	4,28

AS.	H <sup>NH</sup> (ppm)	N <sup>HN</sup> (ppm)	Ca (ppm)	Ha (ppm)
T115	8,23	115,8	61,9	4,31
E116	8,46	123,4	56,8	4,28
K117	8,29	121,8	56,7	4,24
E118	8,40	123,2	56,5	4,16
E119	8,46	122,4	56,7	4,31
S120	8,40	116,9	58,6	4,47
T121	8,21	116,1	62,8	4,39
E122	8,31	122,9	57,4	4,22
V123	7,97	121,3	63,5	3,96
L124	8,10	124,3	55,8	4,24
K125	8,14	121,9	56,9	4,20
A126	8,20	123,5	53,0	4,28
E127	8,06	119,5	55,3	4,28
S128	8,08	116,2	58,4	4,43
A129	8,29	125,9	53,0	4,32
G130	8,30	107,7	45,4	3,96
T131	7,97	114,1	62,1	4,31
V132	8,15	123,3	62,5	4,08
R133	8,44	125,6	56,0	4,36
S134	8,26	117,7	58,6	4,40
A135	8,30	126,2	52,2	4,32
A136	8,17	124,9	50,5	4,55
P137	-	-	-	-
P138	-	-	-	4,36
Q139	8,40	120,5	55,8	4,28
E140	8,43	123,3	56,7	4,28
K141	7,93	127,2	57,7	4,12