

# *A rendezetlen TPPP/p25 szerkezeti sokfélesége és funkciói*

Doktori (Ph.D) értekezés

**Zotter Ágnes**

Okleveles vegyész

Témavezető: **Prof. Ovádi Judit**,  
az MTA doktora, tudományos tanácsadó

ELTE TTK Biológia Doktori Iskola  
Iskolavezető: **Prof. Erdei Anna**,  
az MTA rendes tagja, tanszékvezető egyetemi tanár  
Szerkezeti Biokémia Doktori Program  
Programvezető: **Prof. Nyitray László**,  
az MTA doktora, tanszékvezető egyetemi tanár

Készült: a Magyar Tudományos Akadémia  
Természettudományi Kutatóközpont  
Enzimológiai Intézetében



Budapest, 2012.





## Köszönetnyilvánítás

Mindenekelőtt köszönettel tartozom témavezetőmnek, **Prof. Ovádi Juditnak** a munkám során nyújtott önzetlen segítségéért, támogatásáért, útmutatásáért. Kezdetben tudományos diákköri, később szakdolgozati, végül doktori munkám során megismertetett a kutatói munka szépségével, nehézségeivel, de mindenekelőtt azzal a szemlélettel, hogy a lelkesedéssel, alázattal végzett munka mindig meghozza a várt eredményeket, sikereket.

Hálás vagyok az Intézet jelenlegi igazgatójának, Prof. Buday Lászlónak, hogy doktori kutatómunkámat a Magyar Tudományos Akadémia Enzimológiai Intézetében végezhettem.

Köszönettel tartozom Prof. Friedrich Péter és Prof. Závodszy Péter akadémikusoknak, az Enzimológiai Intézet egykori igazgatóinak, akiknek az igazgatósági munkája alatt kezdtem el, majd folytattam kutatómunkámat az Intézetben.

Nehéz lenne pár mondatban összefoglalni, hogy mennyi mindenért vagyok hálás az „**Ovádi csoport**” tagjainak, név szerint **Orosz Ferencnek, Oláh Juditnak, Hlavanda Emmának, Tőkési Natáliának, Lehotzky Attilának, Szunyogh Sándornak** és a csoport egykori tagjainak, **Horváth Istvánnak** és **Vincze Orsolyának**. Vitakészségükkel, kritikus szemléletükkel, éleslátásukkal sokat segítettek. Hozzájárultak ahhoz, hogy munkámat egy inspiráló, baráti közegben végezzem. Köszönöm nekik, hogy megtanítottak arra, hogy a kudarcot önróniával, a sikert alázattal, de inspirálóan fogadjam. A kísérletes munka alapjainak elsajátítását külön köszönöm Emmának, aki mindvégig türelmesen tanított és gyakorlati tanácsaival ellátott. Oláh Juditnak köszönöm, hogy az adatok elemzésében és a matematikai modellezéssel nyújtott segítségével dolgozatom színvonalasabb lett.

Szigeti Krisztiánnak, Tölgyesi Ferencnek és Prof. Fidy Juditnak köszönöm az együttműködést, aminek keretében ITC méréseket végeztem (SE ÁOK, Biofizikai és Sugárbiológiai Intézet).

Bodor Andreának és Prof. Perczel Andrának köszönöm, hogy a munkámhoz szükséges NMR spektroszkópia méréseket elvégezték (ELTE, Szerves Kémiai Tanszék).

A szegedi Proteomikai Kutatócsoport munkatársainak köszönöm a számtalan tömegspektroszkópiás mérés kivitelezését és elemzését (SzBK, Proteomikai Kutatócsoport).

Külön köszönettel tartozom **Édesanyámnak, Nővéremnek és Férjemnek**, akik a pályám során mindvégig bíztattak, hittek bennem és határtalan szeretetükkel támogattak.



# Tartalomjegyzék

<b>KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS</b> .....	<b>3</b>
<b>1. BEVEZETÉS</b> .....	<b>8</b>
<b>2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS</b> .....	<b>10</b>
2.1. A MIKROTUBULÁRIS RENDSZER.....	10
2.1.1. Eukarióta sejtek intracelluláris váza.....	10
2.1.2. A tubulin és a mikrotubuláris rendszer felépítése és jellemzői.....	10
2.1.3. A mikrotubulusok polimerizációját, dinamikáját befolyásoló anyagok.....	12
2.2. TPPP/p25.....	13
2.2.1. TPPP/p25, egy új tubulinpolimerizációt elősegítő fehérje.....	13
2.2.2. A TPPP/p25 funkciója.....	14
2.2.3. A TPPP/p25 kölcsönhatásai.....	16
2.2.4. A TPPP fehérjecsalád.....	17
2.2.5. TPPP/p25 a központi idegrendszeri betegségekben.....	18
2.3. RENDEZETLEN FEHÉRJÉK.....	19
2.3.1. Rendezetlen fehérjék.....	19
2.3.2. Elsődleges szerkezet, rendezetlen régiók szerepe.....	20
2.3.3. A fehérje kvartett modell.....	21
2.3.4. A szerkezeti rendezetlenség vizsgálata.....	22
2.3.5. Fehérje feltekeredés és szerkezeti rendeződés.....	24
2.3.6. A fehérje feltekeredését befolyásoló tényezők.....	25
2.4. NEURODEGENERATÍV BETEGSÉGEKRE JELLEMZŐ RENDEZETLEN FEHÉRJÉK.....	26
<b>3. CÉLKITŰZÉSEK</b> .....	<b>28</b>
<b>4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK</b> .....	<b>29</b>
4.1. KÍSÉRLETI MEGKÖZELÍTÉS.....	29
4.2. FEHÉRJÉK IZOLÁLÁSA ÉS TISZTÍTÁSA.....	29
4.2.1. MAP-mentes tubulin preparálása marhaagyból.....	29
4.2.2. Rekombináns fehérje expresszió és tisztítás.....	30
4.2.3. <sup>15</sup> N-, illetve <sup>13</sup> C-, <sup>15</sup> N-jelzett TPPP/p25 előállítása az NMR méréshez.....	32
4.3. FEHÉRJEMINTÁK JELLEMZÉSE.....	32
4.3.1. Spektrofotometriás módszer a fehérjekoncentráció meghatározására.....	32
4.3.2. SDS-PAGE.....	33
4.4. FEHÉRJESZERKEZET-ANALÍZIS IN SILICO MÓDSZEREKKEL.....	34
3. táblázat A rendezetlenség jóslására használt programok.....	34
4.4.1. Rendezetlen régiók jóslása a PONDR <sup>®</sup> (VL-XT) programmal.....	34
4.4.2. Az IUPred algoritmus.....	34
4.4.3. Töltés-hidrofóbitás összefüggés, az „Uversky-plot” (CH plot).....	35
4.4.4. FoldIndex <sup>®</sup> .....	35
4.5. TPPP FEHÉRJÉK SZERKEZETVIZSGÁLATA.....	36
4.5.1. CD spektroszkópia.....	36
4.5.2. Fluoreszcencia spektroszkópia.....	37
4.5.3. NMR spektroszkópia.....	38

4.5.4. Analitikai gélszűrés .....	38
4.5.5. Kereszkötés .....	39
4.6. ITC MÉRÉS .....	40
4.7. ENZIMHEZ KÖTÖTT ELLENANYAG-VIZSGÁLAT (ELISA).....	41
4.8. TURBIDITÁSMÉRÉS, A TUBULINPOLIMERIZÁCIÓ VIZSGÁLATA .....	41
4.9. IMMOBILIZÁLT $\Gamma$ -AMINOHEXIL-GTP-SZEFARÓZ AFFINITÁSOSZLOP .....	42
4.10. NUKLEOTIDKONCENTRÁCIÓ MEGHATÁROZÁSA .....	42
4.11. ENZIMAKTIVITÁS MÉRÉS .....	43
4.11.1. Aktivitásmérés <i>malachitzöld reagenssel</i> .....	43
4.11.2. Aktivitásmérés <sup>31</sup> P-NMR spektroszkópiával.....	43
4.12. A TPPP/p25-GTP TÖBBSZÖRÖS EGYENSÚLYI RENDSZER MODELLEZÉSE .....	44
4.13. KÖLCSÖNHATÓ PARTNEREK AZONOSÍTÁSA .....	44
4.13.1. <i>Citoszolikus marhaagy-extraktum előállítása</i> .....	44
4.13.2. <i>TPPP/p25 affinitáskromatográfia</i> .....	45
<b>5. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK .....</b>	<b>46</b>
5.1. SZERKEZETVIZSGÁLAT: IN SILICO ANALÍZIS ÉS KÍSÉRLETES VIZSGÁLATOK .....	46
5.1.1. <i>A rendezetlenség in silico predikciója</i> .....	46
5.1.2. <i>A fehérjeszerkezet kísérleti jellemzése</i> .....	49
5.2. FÉMIONOK KÖTÖDÉSE ÉS A FÉMKÖTÉS HATÁSA .....	53
5.2.1. <i>Fémionok hatása a TPPP fehérjék szerkezetére</i> .....	54
5.2.2. <i>A Zn<sup>2+</sup>-kötés termodinamikai paramétereinek meghatározása</i> .....	60
5.3. NUKLEOTIDOK KÖTÖDÉSE ÉS A NUKLEOTIDKÖTÉS HATÁSAI.....	61
5.3.1. <i>A GTP direkt kölcsönhatásának igazolása</i> .....	62
5.3.2. <i>Trp fluoreszcencia a nukleotid-kötés vizsgálatában</i> .....	63
5.3.3. <i>Nukleotid-kötés vizsgálata távoli-UV CD spektroszkópiával</i> .....	64
5.3.4. <i>GTP-kötés vizsgálata NMR spektroszkópiával</i> .....	65
5.3.5. <i>A TPPP/p25 enzimaktivitásának vizsgálata</i> .....	66
5.4. A TPPP/p25 HOMOLÓG ÉS HETEROLÓG ASSZOCIÁCIÓI ÉS FUNKCIONÁLIS SZEREPÜK .....	69
5.4.1. <i>A TPPP/p25 dimerizáció</i> .....	69
5.4.2. <i>Stabil dimer TPPP/p25 előállítása és izolálása</i> .....	72
5.4.3. <i>GTP-indukált dimerizáció</i> .....	74
5.4.4. <i>A TPPP fehérjék kölcsönhatása tubulinnal</i> .....	76
<b>6. MEGBESZÉLÉS .....</b>	<b>83</b>
<b>7. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE .....</b>	<b>89</b>
<b>8. ÁBRÁK ÉS TÁBLÁZATOK JEGYZÉKE.....</b>	<b>90</b>
<b>9. AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ PUBLIKÁCIÓK .....</b>	<b>92</b>
<b>10. FÜGGELÉK .....</b>	<b>93</b>
<b>11. IRODALOMJEGYZÉK.....</b>	<b>97</b>
<b>ÖSSZEFOGLALÁS.....</b>	<b>103</b>
<b>SUMMARY .....</b>	<b>104</b>



## 1. Bevezetés

Az eukarióta sejtek belső vázának egyik fő alkotóeleme a tubulin heterodimerekből felépülő mikrotubuláris rendszer, amely meghatározó szerepet játszik a sejt belső rendezettségének fenntartásában, a sejten belüli transzportfolyamatokban illetve a sejtosztódásban. A mikrotubulusok sejten belüli szerveződését és dinamikáját jelentősen befolyásolja számos ún. mikrotubulushoz asszociált fehérje (MAP), amelyek változatos funkció ellátására képesek. A struktúra-fenntartó és motorfehérjék mellett fontos szabályozó funkciót töltenek be a dinamikus kölcsönhatásokat létesítő citoplazmatikus fehérjék is, amelyek lazán, átmenetileg kötődnek a mikrotubulusokhoz.

A Sejtarchitektúra csoportban szarvasmarha agyszövetből izoláltak egy olyan fehérjét, amely képes tubulinpolimerizációt indukálni *in vitro* és a taxollal stabilizált mikrotubulusokat kötegekbe rendezi (Hlavanda et al., 2002). A fehérjét funkciója és móltömege alapján *Tubulin Polymerization Promoting Protein/p25*-nek (TPPP/p25) nevezték el (Tirián et al., 2003). A TPPP/p25-ről csoportunk megmutatta, hogy MAP-szerű fehérje, *in vivo* elsődleges kölcsönható partnere a tubulin/mikrotubuláris rendszer, amelynek stabilitását és dinamikáját szabályozza kötegelő aktivitása és foszforilációja révén (Hlavanda et al., 2007; Lehotzky et al., 2004; Tirián et al., 2003). A TPPP/p25 tulajdonságai arra utaltak, hogy a rendezetlen fehérjék közé sorolható (Hlavanda et al., 2002; Kovacs et al., 2004; Orosz et al., 2004).

A TPPP/p25 elsődleges szerkezetét tekintve minden korábban ismert fehérjétől különbözik, a TPPP fehérjecsalád első tagjának tekinthető. A humán genomban azonosították a TPPP/25-öt kódoló gén két paralógiát, amelyek a TPPP/p25-tel magas homológiát mutató fehérjéket kódolnak. Ezt a két fehérjét kutatócsoportunk klónoztta és izolálta, TPPP3/p20-nak, illetve TPPP2/p18-nak nevezte el (Vincze et al., 2006).

Humán *post mortem* agyszöveti minták immunhisztokémiai vizsgálata azt mutatta, hogy szinukleinopátiák (pl. Parkinson-kór, diffúz Lewy-testes betegség) esetében a TPPP/p25 felhalmozódik a Lewy-zárványtestekben illetve a multiszisztémás atrófia (MSA) esetén kialakuló gliális citoplazmatikus zárványtestekben (Kovacs et al., 2004). A TPPP/p25 kölcsönható partnerei közül azonosították az  $\alpha$ -szinukleint illetve a glicerinaldehid-3-foszfát dehidrogenázt, amelyek kizárólag a patológiás zárványtestekben mutatnak kolokalizációt a TPPP/p25-tel (Lindersson et al., 2005; Oláh et al., 2006). A fehérje patológiás kifejeződése arra utal, hogy szerepet játszhat bizonyos idegrendszeri betegségek kialakulásában.

Az idegrendszeri betegségek egy jelentős csoportját képezik az ún. konformációs betegségek (*conformational diseases*, *foldng diseases*), amelyek kialakulásában alapvető szerepet játszanak a rendezetlen – stabil térszerkezettel nem rendelkező – fehérjék. A



betegségekre jellemző, hogy az eredendően rendezetlen vagy hibásan feltekeredett, aggregációra hajlamos fehérjék intra- vagy extracelluláris zárványokat képeznek, ami végső soron szövetspecifikus neuronpusztulást eredményez (Jellinger, 2009; Uversky et al., 2009). A konformációs betegségek patomechanizmusának jobb megértése érdekében a kutatások fontos részét képezi új szereplők azonosítása, azok szerkezeti és funkcionális sajátosságainak valamint kölcsönhatásainak vizsgálata.

A TPPP/p25 rendezetlensége és az a tény, hogy szinukleïnopátiákban az  $\alpha$ -szinukleïnnel együtt halmozódik fel, arra utal, hogy a TPPP/p25 egy ilyen „új szereplő” lehet egyes központi idegrendszeri érintő betegségek kialakulásában. Az értekezésem alapjául szolgáló kutatómunka során arra törekedtem, hogy a TPPP/p25 szerkezetének, kölcsönható partnereinek felderítése által közelebb kerüljünk a fehérje fiziológiás és patológias folyamatokban betöltött szerepének molekuláris szintű megismeréséhez.

## 2. Irodalmi áttekintés

### 2.1. A mikrotubuláris rendszer

#### 2.1.1. Eukarióta sejtek intracelluláris váza

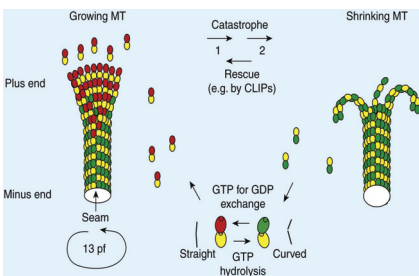
Az eukarióta sejtek jellegzetes szerkezeti eleme az intracelluláris váz, vagy citoskeleton. A molekuláris összetevők alapján megkülönböztetünk vékony filamentumokat, intermedier filamentumokat és mikrotubulusokat. Az aktinhálózat (vékony filamentumok) feladata a sejt alakjának fenntartása, alak- és helyváltoztató mozgásokért felelős, továbbá jelentős szerepe van az idegsejtek növekedésében. Az intermedier filamentumok a sejt mechanikai ellenállóképességét biztosítják, míg a mikrotubuláris rendszer meghatározó szerepet játszik a sejtalak fenntartásában, az intracelluláris transzportban, valamint a sejtosztódás folyamatában. A mikrotubulusok a fő alkotóelemei az osztódási orsónak és a sejt mozgásszerveinek, a csillóknak valamint az ostoroknak. Az intracelluláris rendszer elemeihez számos fehérje kapcsolódhat, ún. „asszociált fehérjék”, amelyek a filamentumok mentén speciális feladatokat látnak el, kölcsönhatásaik által befolyásolják a rendszer dinamikáját, továbbá kötőhelyet biztosítanak más sejtalkotók számára (LeDuc és Bellin, 2006). A kötődések, heteroasszociációk egy része statikus, szoros kölcsönhatásokon alapszik, más részük dinamikus, azaz a sejt metabolikus állapota által meghatározott körülményektől függ. Ezt a komplex, fehérjéket és vázelemeket tartalmazó citoskeletonális struktúrát nevezték el *microtrabecular lattice*-nek (Clegg, 2010).

#### 2.1.2. A tubulin és a mikrotubuláris rendszer felépítése és jellemzői

A tubulin szuperfamilia hét tagját különböztetjük meg, a mikrotubulusokat felépítő  $\alpha$ - és  $\beta$ -tubulinon kívül a  $\gamma$ -,  $\delta$ -,  $\epsilon$ -,  $\zeta$ - és  $\eta$ -tubulint. Az  $\alpha$ - és  $\beta$ -tubulin a mikrotubulusok fő építőelemei, a  $\gamma$ -tubulin az ún. mikrotubuláris-organizáló centrumokban található és a mikrotubulusok összeszerelésében játszik szerepet. A család többi tagjáról ismeretünk hiányos, valószínűsíthető, hogy funkciójuk az eukariótákban megtalálható mikrotubuláris struktúrákhoz, az alapi testhez illetve centriólumhoz köthető (McKean et al., 2001). A tubulin két, körülbelül 55 kDa molekulatömegű polipeptidből,  $\alpha$ - és  $\beta$ -tubulinból felépülő heterodimer fehérje, amely a polimerizáció során mikrotubulussá szerveződik. A tubulin mindkét alegysége képes egy-egy guanozin-trifoszfát (GTP) molekulát megkötni, azonban guanozin trifoszfát (GTPáz) aktivitással csak a  $\beta$ -tubulin rendelkezik. Nogales és csoportja elektron kristallográfia segítségével megmutatta, hogy az  $\alpha$ - és  $\beta$ -tubulin monomernek a térszerkezete közel azonos és három funkcionális doménre osztható. Az N-terminális domén

(1-206 as) öt  $\alpha$ -hélixből és hat parallel  $\beta$ -redőből áll, ún. *Rossmann fold*-ot alkot és a GTP-kötésben vesz részt (GTP-kötő domén). A középső domén szintén  $\alpha$ -hélixből és  $\beta$ -redőből áll és a  $\beta$ -tubulinban ez a régió alakítja ki a mikrotubulus-stabilizáló taxol kötőhelyét. Feltehetőleg a harmadik, C-terminális domén felelős az  $\alpha\beta$ -tubulin izoformák variabilitásáért, továbbá meghatározza az egyes izoformák funkcionális jellemzőit (Nogales, 2000).

A polimerizáció során a tubulin heterodimerek fej-farok elrendeződésben (beépülő dimer  $\alpha$ -alegysége az előző dimer  $\beta$ -alegységéhez kötődik) összekapcsolódnak és fonalszerű struktúrákba, ún. protofilamentumokba szerveződnek. Ezek speciális laterális illeszkedése biztosítja a mikrotubulusok jellegzetes hengeres formáját (1. ábra). A tubulin heterodimerek mikrotubulushoz történő asszociációjának ill. disszociációjának sebessége az oldat szabad dimerkoncentrációjától függ. Ha ez meghaladja a polimerizációhoz szükséges kritikus koncentrációt, akkor polimerizáció, ellenkező esetben depolimerizáció történik. A kritikus koncentráció a cső két végén nem azonos, megkülönböztethetünk egy gyors (plusz) és egy lassú (mínusz) csővéget. Létezik egy olyan dimerkoncentráció-tartomány, ahol a mikrotubulusok gyors végén asszociáció, miközben a lassú végén depolimerizáció történik, az összpóli-  
mer mennyisége azonban állandó. Ezt az állapotot „taposómalom”-nak (*treadmilling*)



**1. ábra A mikrotubulusok szeveződése és dinamikája (Galjart, 2010).** A mikrotubulusok építőköve a protofilamentumokba (pf) szerveződött  $\alpha$ - és  $\beta$ -tubulin heterodimer. A csővégekre beépülő GTP tartalmú dimerek (piros/sárga ellipszis)  $\beta$ -alegységén a GTP GDP-vé hidrolizál (zöld/sárga ellipszis), míg az  $\alpha$ -tubulinhoz kötött GTP állandó. GDP-t kötött tubulin egységek folyamatosan leválnak a cső mínusz végéről, míg a GTP-tartalmú alegységek a plusz végre kötődnek. Ha a mikrotubulusoknak hirtelen leáll a növekedése akkor összeesnek (*catastrophe*), míg a mikrotubulusok megmentését (*rescue*) segítik az ún. CLIPs fehérjék (*cytoplasmic linker proteins*).

nevezik (Rodionov és Borisy, 1997). A  $\beta$ -tubulin GTPáz aktivitása szintén befolyásolja a polimerizációt. A beépülés után a GTP hidrolízis csökkenti a dimer kötődésének erősségét, így az disszociációra hajlamosabbá válik. A guanozin-difoszfát (GDP) tartalmú mikrotubulusvég körül-belül 100-szor gyorsabban depolimerizálódik, mint a GTP tartalmú. Ennek következtében egy mikrotubulusszál egyszer növekszik, egyszer depolimerizálódik, de az is előfordul, hogy átmenetileg állandó hosszúságú. Ezt a jelenséget nevezik a mikrotubulusok dinamikus instabilitásának (Alberts, 2008).

### 2.1.3. A mikrotubulusok polimerizációját, dinamikáját befolyásoló anyagok

A mikrotubulusok ultrastruktúráját, stabilitását és funkcióját jelentősen befolyásolja számos MAP fehérje, amelyek lehetővé teszik változatos feladatainak ellátását és összehangolását. A mikrotubulushoz kötődő fehérjék tulajdonságai alapján megkülönböztetünk struktúra-fenntartó (szerkezeti) MAP-eket, erő-generáló motorfehérjéket illetve olyan citoplazmatikus fehérjéket, amelyek lazán kötődnek a mikrotubulushoz és dinamikus kölcsönhatásokat létesítenek. A strukturális MAP-ek a mikrotubulusok térbeli elrendeződésében és stabilitásának szabályozásában vesznek részt. Ilyen fehérje a MAP1a illetve a MAP1b, amelyek elsősorban a differenciálódott idegsejtekben találhatóak (Noiges et al., 2002). A tau, a MAP2 illetve a MAP4 fehérje a dinamikus instabilitást befolyásolja (a mikrotubulusokat stabilizálja), kötődésüket foszforiláció szabályozza. A rendezetlen tau az idegsejtek axonjaiban, a MAP2 dendritekben fordul elő, míg a MAP4 pedig egyéb (nem ideg) szövetekre jellemző (Dehmelt és Halpain, 2005). A motor MAP-ek olyan mechanokémiai enzimek, amelyek globuláris feji végeikkel a mikrotubulushoz kötődnek és ATP hidrolízise mellett azon végig tudnak lépkedni, a sejten belüli irányított anyagmozgatásért felelősek; a motorfehérjék egyik családját a kinezinek, másikat a dineinek alkotják (Amos, 2008). Ismeretesek olyan citoszolikus fehérjék, amelyek lazán, átmenetileg kötődnek a mikrotubulusokhoz. A mikrotubulussal dinamikus kölcsönhatásokat létesítenek, aminek következtében módosulhat a kölcsönható fehérje enzimatis, illetve regulációs tulajdonsága. Ilyenek például bizonyos glikolitikus enzimek, valamint egyes transzlációban résztvevő enzimek (Morejohn, 1994; Vértessy et al., 1997).

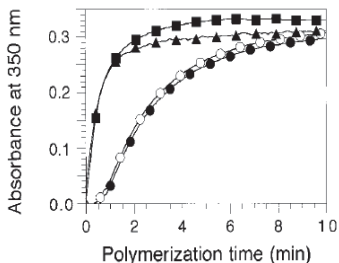
A tubulin polimerizációját több természetes eredetű kémiai anyag, így a kolhicin, vinca-vegyületek és a taxanok befolyásolja (Jordan és Wilson, 1998). Ezek közül a vinca-vegyületek (pl. vinblasztin) és különösen a taxan szarmazékok mutattak a klinikai onkológiában hasznosítható daganatnövekedést gátló hatást. A taxanok felgyorsítják a tubulinpolimerizációt és stabilizálják a mikrotubulusokat. Az így stabilizált szerkezeti állapot nem teszi lehetővé az osztódási folyamathoz szükséges dinamikus átépülést. A taxol a polimerizációhoz szükséges kritikus koncentrációt csökkenti, *in vitro* körülmények között az intakt mikrotubulusokkal azonos szerkezetű tubulusok állíthatók elő (Mekhail és Markman, 2002). A taxol a mikrotubulusok képződését alacsony hőmérsékleten, GTP és MAP-ek távollétében is lehetővé teszi (Kumar, 1981). A kolhicin a tubulin heterodimerekhez kapcsolódva megakadályozza azok polimerizációját és elősegíti a depolimerizáció folyamatát (Bhattacharyya et al., 2008).

## 2.2. TPPP/p25

### 2.2.1. TPPP/p25, egy új tubulinpolimerizációt elősegítő fehérje

A p25 fehérjét (p25 $\alpha$ ) egy tau protein kináz, a ciklin-dependens kináz 5 (Cdk5) tisztítása közben fedezték fel, mint egy új, agyspecifikus fehérjét (Takahashi et al., 1991). Megállapították, hogy szubsztrátja a Cdk5-nek, továbbá a tauhoz hasonlóan hőstabil fehérje. Izoelektromos fókuszálás során izoelektromos pontja 9,9-nek bizonyult, ami bázikus karakterre utal. Na-dodecilszulfát (SDS) gélen molekulatömege 25 kDa-nak adódott, géliszűrés alapján azonban 50 kDa-nak bizonyult, ami arra utalt, hogy a fehérje dimerként fordul elő (Takahashi et al., 1991). Takahashi csoportja kimutatta, hogy a p25 mennyisége születéskor viszonylag kevés, azonban az életkor előrehaladtával mennyisége folyamatosan nő. Immunhisztokémiai vizsgálatok megmutatták, hogy a fehérje elsősorban oligodendrocitákban és gliális elemek neuropil állományában fordul elő (Takahashi et al., 1993). A p25 DNS szekvenciáját marha cDNS könyvtár segítségével (Shiratsuchi et al., 1995) és humán neuroblasztóma sejtekből származó cDNS alapján (Seki et al., 1999) is meghatározták. A két gén által kódolt fehérje aminosav szinten 90%-os azonosságot mutat (Seki et al., 1999).

Ovádi Judit kutatócsoportja Takahashi-éktől függetlenül talált rá a fehérjére. Azt tapasztalták, hogy a MAP-mentes tubulin polimerizációját az agyi és neuroblasztóma extraktumok elősegítik, azonban az izomextraktum nem befolyásolta a polimerizációt (2. ábra) (Liliom et al., 1999). Hosszas kutatómunka eredményeként sikerült azonosítani a megfigyelt hatásért felelős fehérjét, amely tubulin polimerizációt elősegítő hatása és molekulatömege alapján a TPPP/p25 (*Tubulin Polymerization Promoting Protein/p25*) elnevezést kapta, megkülönböztetve a Cdk5 működését befolyásoló szabályozó alegységet, a p35 hasított formájától, a p25-től (Tirián et al., 2003). A Humán Gén Nomenklatura Bizottság elfogadta, hogy a korábban p25 $\alpha$ -nak nevezett fehérje az általunk javasolt módon TPPP/p25, a fehérjét kódoló gén elnevezése TPPP legyen ([http://www.genenames.org/data/hgnc\\_data.php?hgnc\\_id=24164](http://www.genenames.org/data/hgnc_data.php?hgnc_id=24164)).

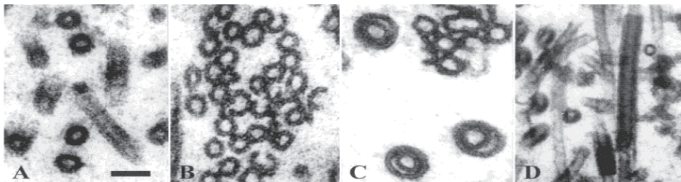


**2. ábra** Sejtmentes extraktumok hatása a tubulin polimerizációjára. A taxollal indukált MAP-mentes tubulin (10  $\mu$ M) polimerizációját 350 nm-en turbiditásméréssel követték 2 mg/ml agyextraktum jelenlétében (■), önmagában (○), 0,25 mg/ml neuroblasztóma-extraktum (▲) vagy 2 mg/ml izomextraktum (●) jelenlétében. A polimerizációt 20  $\mu$ M taxollal indukálták, a mérés 37°C-on történt. Ábra Liliom nyomán (Liliom et al., 1999).

Kutatócsoportunk megerősítette, hogy a marhaagyból izolált TPPP/p25 igen bázikus és hőstabil. Továbbá megmutatták, hogy nem rendelkezik jól definiált térszerkezettel. Cirkuláris dikroizmus (CD) spektroszkópiával a fehérje  $\alpha$ -hélix tartalma közelítőleg 4%-nak adódott, habár a globuláris fehérjékre alkalmazott másodlagos szerkezet jóslások szerint legalább 30% körüli  $\alpha$ -hélix tartalommal kellene rendelkeznie (Hlavanda et al., 2002; Orosz et al., 2004).

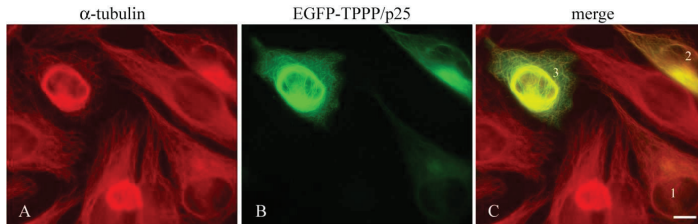
### 2.2.2. A TPPP/p25 funkciója

A TPPP/p25 a tubulin polimerizációját már szubsztöchiometrikus koncentrációban elősegíti. Elektronmikroszkópos vizsgálatokból kiderült, hogy a TPPP/p25 a tubulinból képes aberráns (kettős falú) mikrotubulusokat polimerizálni (3. ábra C, D), a taxollal stabilizált mikrotubulus szálakat pedig kötegekbe rendezi (3. ábra B). A TPPP/p25 mentes minta laza összeszerelődésű mikrotubulus szálakat mutat (3. ábra A) (Hlavanda et al., 2002).



**3. ábra Elektronmikroszkópos felvételek a TPPP/p25 hatására kialakult tubulin ultrastruktúrákról (Hlavanda et al., 2002).** (A) TPPP/p25-mentes, taxollal stabilizált laza összeszerelődésű mikrotubulusok. (B) Taxollal stabilizált és a TPPP/p25 által kötegelt ép mikrotubulusok. (C és D) TPPP/p25 által indukált tubulinpolimerizáció során kialakult aberráns (kettős falú) mikrotubulusok. A C és D ábra különböző irányú metszeteket mutat. Lépték: 50 nm (A-C) és 120 nm (D).

A TPPP/p25 sejten belüli kölcsönható partnereinek azonosítására és fiziológiás szerepének megismerésére Lehotzky és mtsai. az ektópikus fehérje kifejeződését pEGFP-TPPP/p25-tel tranziensen transzfektált humán méhnyakrák eredetű, HeLa sejtvonalon vizsgálták. A fluoreszcens mikroszkópiás vizsgálatok azt mutatták, hogy a TPPP/p25 alacsony expressziós szint esetén (fiziológiás) a mikrotubuláris váz mentén lokalizálódik (4. ábra C, 1-es sejt), míg magas expressziós szint esetén (patológiás) egyrészt intenzív felhalmozódást mutat a sejtközpontról (aggregátum) (4. ábra C, 2-es sejt), másrészt a mag körül kialakuló kötegelt mikrotubulus szálak mentén lokalizálódik (ketrec, „cage”) (4. ábra C, 3-mas sejt) (Lehotzky et al., 2004).



**4. ábra** Az EGFP-TPPP/p25-öt expresszáló HeLa sejtek mikrotubuláris váza (Lehotzky et al., 2004). (A)  $\alpha$ -tubulinra immunfestett sejtek. (B) pEGFP-TPPP/p25-tel tranziensen transzfektált sejtek, a TPPP/p25 expressziós szintjének függvényében három karakterisztikus csoportba sorolhatóak: alacsony expressziós szint esetén a TPPP/p25 a mikrotubuláris váz mentén lokalizálódik (C, 1-es sejt), míg magas expressziós szint esetén aggreszóma (C, 2-es sejt) vagy „kretrec” (C, 3-mas sejt) alakul ki. Lépték: 10  $\mu$ m.

A TPPP/p25 elsődleges citoszkéletális célpontja a mikrotubuláris rendszer, melyet kötegelő aktivitása révén stabilizál, ellenállóvá teszi depolimerizációs hatásokkal szemben, ugyanakkor nem gátolja meg a rendszer átrendeződését (Lehotzky et al., 2004). A TPPP/p25 és a mikrotubuláris rendszer kapcsolata dinamikus, mint azt fluoreszcencia-kioltásos kísérletekkel bizonyították ( $t_{1/2} = 5$  sec) (Lehotzky et al., 2004).

A sejtekiklus során a TPPP/p25 lokalizációja változik: interfázisban a mikrotubulusok mentén található, a mitózis nagy része alatt a mitotikus orsóhoz kötődik, azonban anafázisban, amikor a mitotikus orsó szétszerelődik, a TPPP/p25 a citoplazmában oldottan található és csak a citokinézis fázisában kötődik ismét a mikrotubuláris rendszerhez (Lehotzky et al., 2004). Migráló HeLa-sejtekben a TPPP/p25 szintje magasabb a mozdulatlan sejtekhez képest, ami arra utal, hogy a TPPP/p25 fontos szerepet játszik a mikrotubuláris rendszer vándorlás közbeni folyamatos átépülésében (Acevedo et al., 2007).

*Drosophila* embriókon mikroinjektálással végzett kísérletek azt mutatták, hogy a TPPP/p25 megakadályozza a mitotikus orsó kialakulását és a sejtmagmembrán lebomlását az osztódás során, azonban más, sejtosztódáskor lezajló eseményt (pl. a centroszómák megkettőződését és szétválását, a mikrotubulus szálak hozzákötődését a centroszómákhoz) nem befolyásolt (Tirián et al., 2003). A viselkedés okait kutatva Tiriánék megmutatták, hogy a TPPP/p25-tubulin kölcsönhatást a GTP *in vitro* (a polimerizációs) és *in vivo* (a *Drosophila* embrióon végzett kísérlet során) is befolyásolja, a GTP bizonyos körülmények között képes felfüggeszteni a TPPP/p25 mitózis gátló hatását (Tirián et al., 2003).

### 2.2.3. A TPPP/p25 kölcsönhatásai

MADKAKPAKA ANR**T**PPK**S**PG DPSKDRAAKR **L****S**LESEGAGE GAAASPELSA LEEAFRRFAV  
 HG DARATGRE MHGKNWSKLC KDCQVIDGRN VTVTVDIVF SKIKGKSCRT ITFEQFQEAL  
 EELAKRFRKD KSSEEAUREV HRLIEGKAPI ISGVTKAI**S** PTVSRLTDTT KFTGSHKERF  
DPSGK**G**K**G**K**A** GRVDLVDESG YVSGYKHAGT YDQKVQGGK

**5. ábra** A humán TPPP/p25 szekvenciája. A piros színnel kiemelt aminosavak a lehetséges foszforilációs helyeket jelölik, az aláhúzott szekvenciaszakasz az ún. tau tubulin-kötő motívummal homológ régió (Hlavanda et al., 2007). A kék szín az ún. *Rossmann-motívumot* (GxGxxG) jelöli (Tirián et al., 2003).

Kutatócsoportunk megmutatta, hogy több foszforilációs hely azonosítható a marhaagyból izolált fehérjén. Tömegspektrometria (MS) segítségével a marha TPPP/p25 N-terminális részén három helyet (Thr<sup>14</sup>, Ser<sup>18</sup>, Ser<sup>32</sup>) azonosítottak foszforilált formában (Hlavanda et al., 2007). A foszforiláció *in vitro* is elvégezhető, a humán rekombináns TPPP/p25 foszforilálható extracelluláris szignál-regulálta kináz 2-vel (ERK2), Cdk5-tel és fehérje kináz A-val (PKA), amelyek a fehérje N-terminális végén lévő szeril- és treonil oldalláncokat foszforilálják (5. ábra). ERK2-vel és Cdk5-tel a Thr<sup>14</sup> és Ser<sup>18</sup>, a PKA-val a Ser<sup>32</sup> oldallánc foszforilálható (Hlavanda et al., 2007). A LIM kináz 1 a szeril oldalláncokat képes foszforilálni a TPPP/p25-ön (Acevedo et al., 2007).

A foszforilációs helyek kiemelkedő szerepére utal, hogy filogenetikai vizsgálatok során az N-terminális szakaszon belül főként a foszforilációs helyek, illetve ezek felismerő szekvenciái mutatnak nagyfokú konzerváltságot (Hlavanda et al., 2007). A foszforilációnak funkcionális következményei vannak: megszűnik a TPPP/p25 tubulinpolimerizáló képessége, illetve a tubulin és a TPPP/p25 közötti kölcsönhatáskor bekövetkező szerkezeti változások módosulnak (Hlavanda et al., 2007).

A fehérje C-terminális részén található egy ún. *Rossmann-motívum*, amely egy jellegzetes adenosin-trifoszfát (ATP) kötő motívum, konszenzus szekvenciája a GxGxxG (5. ábra) (Tirián et al., 2003). A fehérjében megtalálható szekvenciaelem felveti annak a lehetőségét, hogy a TPPP/p25-nek szerepe lehet a nukleotidkötésben. A TPPP/p25 és más MAP fehérjék szekvenciaösszehasonlításával csoportunk valószínűsítette a TPPP/p25 mikrotubulus-kötő szakaszát. A TPPP/p25-ben kimutatható egy 25 aminosavas tau homológ szekvencia (163-187 as), ami a tau tubulin-kötő régiójával homológ (5. ábra) (Hlavanda et al., 2007). Martin és mtsai. megmutatták, hogy a TPPP/p25 gátolja a glikogén-szintáz-kináz 3-at (GSK3), amely képes foszforilálni a tau fehérjét. Ezek alapján lehetséges, hogy a TPPP/p25 részt vesz a tau foszforilálásának szabályozásában (Martin et al., 2002).



### 2.2.4. A TPPP fehérjecsalád

A TPPP/p25 szekvenciáját tekintve minden korábban ismert fehérjétől különbözik. A BLAST program segítségével (Lopez et al., 2003) az adatbázisban található génszekvenciák közül a *TPPP* gén két paralógiát sikerült azonosítani, a *CGI-38*-at és a *p25β*-át, amelyek különböző kromoszómákon találhatóak. A gének által kódolt fehérjék homológiát mutatnak egymással, a szekvencaazonosság mértéke kb. 60%-os (6. ábra). Az újonnan azonosított fehérjéket a csoportunk klónozte és izolálta, TPPP3/p20-nak, illetve TPPP2/p18-nak nevezte el. A három géntermék együtt egy új fehérjecsaládot (TPPP) alkot (Vincze et al., 2006). A homológ fehérjékből hiányzik a TPPP/p25 N-terminális része; a TPPP3/p20 43, a TPPP2/p18 49 aminosavval rövidebb. A TPPP3/p20-at kutatócsoportunk marhaagyból izolálva fehérje szinten is kimutatta (Vincze et al., 2006), míg a TPPP2/p18-at Zhang és mtsai. azonosították mRNS szinten, majd magzati agy cDNS könyvtárból klónozták (Zhang et al., 2002).

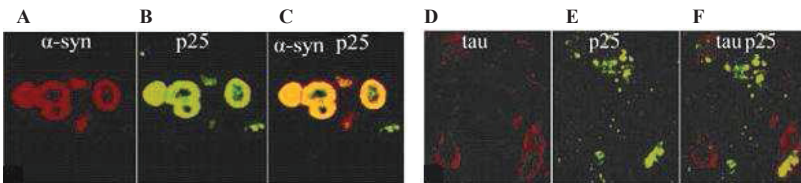
TPPP/p25	1	M	A	D	K	A	K	P	A	K	A	A	N	R	T	P	F	H	S	F	G	D	P	S	K	D	R	A	H	R	L	S	L	E	S	E	G	A	G	E	G	41	
TPPP/p25	42	A	A	S	P	E	L	S	A	L	E	E	A	F	R	R	F	A	V	H	G	D	A	R	A	G	E	M	S	G	K	N	W	S	K	L	C	K	D	82			
TPPP/p20	1	M	A	A	S	T	D	N	A	G	L	E	E	S	F	R	R	F	A	I	H	G	D	P	K	A	S	G	C	E	M	N	G	K	N	W	S	K	L	C	K	D	41
TPPP/p18	1	M	A	S	E	A	-	-	-	-	E	R	K	F	H	R	F	A	A	I	G	E	S	S	S	S	G	T	E	M	N	S	K	N	F	S	K	L	C	K	D	56	
TPPP/p25	83	C	Q	V	I	D	G	R	N	V	T	V	T	D	V	D	I	V	F	S	K	I	K	G	K	S	C	R	T	I	T	F	E	Q	F	Q	E	A	L	E	B	L	123
TPPP/p20	42	C	R	V	A	D	G	K	S	V	T	G	T	D	V	D	I	V	F	S	K	V	K	G	K	S	A	R	V	I	N	E	E	F	K	K	A	L	E	B	L	32	
TPPP/p18	37	C	G	I	M	D	G	K	I	V	T	S	T	D	V	D	I	V	F	S	K	V	K	K	N	A	R	T	I	T	F	Q	Q	F	K	E	A	V	H	B	77		
TPPP/p25	124	A	R	K	R	F	K	D	K	S	S	E	E	A	V	E	E	H	R	L	I	E	G	K	A	P	I	I	S	G	V	T	K	A	I	S	S	P	T	V	S	164	
TPPP/p20	82	A	T	K	R	F	Q	G	K	S	P	E	E	A	F	D	A	I	C	Q	L	N	A	G	K	E	P	A	N	V	G	V	T	K	A	R	T	G	G	A	V	123	
TPPP/p18	78	G	Q	K	R	F	K	G	K	S	P	E	E	N	L	E	N	I	Y	G	L	N	E	G	K	E	P	A	I	T	G	A	T	K	A	T	V	G	A	V	118		
TPPP/p25	165	R	L	T	D	T	K	K	T	G	S	H	K	E	R	F	D	E	S	G	K	G	K	G	A	G	R	V	D	L	N	D	E	S	G	Y	V	S	G	Y	205		
TPPP/p20	124	R	L	T	D	T	S	K	Y	T	G	S	H	K	E	R	F	D	E	S	G	K	G	K	G	I	A	G	R	C	D	L	D	S	G	Y	V	S	A	Y	164		
TPPP/p18	119	R	L	T	D	T	S	K	Y	T	G	S	H	K	E	R	F	D	E	S	G	K	G	K	G	I	A	G	R	E	N	S	D	S	G	Y	V	S	G	Y	159		
TPPP/p25	206	K	H	A	G	T	Y	D	C	K	V	C	G	G	K	219																											
TPPP/p20	163	K	N	A	G	T	Y	D	A	K	V	R	K	X	178																												
TPPP/p18	160	K	G	S	G	T	Y	D	K	K	X	170																															

6. ábra Többszörös szekvencaillesztés a ClustalW programmal. A humán TPPP/p25, TPPP3/p20 és TPPP2/p18 aminosav-szekvenciáinak összehasonlítása. A fekete háttér azonos, míg a szürke hasonló aminosavakat jelöl (Vincze et al., 2006).

A TPPP/p25 fehérjeszintű előfordulását többen vizsgálták. Az agyszövetben elsősorban az oligodendrogliaokban fejeződik ki (Kovacs et al., 2007; Skjoerringe et al., 2006; Takahashi et al., 1993), de előfordul a posztszinaptikus denzitásban is (Ovádi és Orosz, 2009). *In silico*, genomialis összehasonlító vizsgálatok alapján a TPPP család tagjai olyan egysejtű élőlényekben és szövetekben fordulnak elő, amelyek csillóval rendelkeznek (Orosz és Ovádi, 2008).

### 2.2.5. TPPP/p25 a központi idegrendszeri betegségekben

Számos vizsgálat bizonyítja, hogy a TPPP/p25 felhalmozódik a patológiás agyszövet neuronjaiban, gliális sejtjeiben és az  $\alpha$ -szinukleinnel együttes előfordulást mutat. A TPPP/p25 jelenlétét megvizsgálták különböző neurodegeneratív betegségek (Alzheimer-kór, Parkinson-kór, Huntington-kór, MSA, diffúz Lewy-testes betegség) esetén, amelyek markerei rendezetlen fehérjék, mint pl. az  $\alpha$ -szinuklein (Parkinson-kór) vagy a béta-amiloid/hiperfoszforilált tau (Alzheimer-kór). Szinukleinopátiák esetében a TPPP/p25 az  $\alpha$ -szinukleinnel együtt felhalmozódik a Parkinson-kórra jellemző Lewy-zárványtestekben (7. ábra A-C), illetve MSA esetén a kialakuló Papp-Lantos gliális citoplazmatikus zárványtestekben, amelyek az oligodendroglia sejtek degenerációját jelzik. Mindemellett a TPPP/p25 nincs jelen a tauopátiák családjába tartozó Alzheimer-kór esetén kialakuló neurofibrillaris kötegekben, melyek hiperfoszforilált tau fehérjéből állnak (7. ábra D-F) (Kovacs et al., 2004). Huntington-kór esetén az extracelluláris struktúrákban a huntingtin fehérjével együttesen jelenik meg a TPPP/p25 (Kovacs et al., 2007).



**7. ábra A TPPP/p25 lokalizációja patológiás agyszöveti mintákban (immunhisztokémia) (Kovacs et al., 2004).** (A-C) A TPPP/p25 teljes kolokalizációt mutat az  $\alpha$ -szinukleinnel a Parkinson-kór esetén kialakuló Lewy-zárványtestekben. (D-F) Alzheimer-kór esetén a TPPP/p25 a hiperfoszforilált tau alapú neurofibrillaris kötegek szomszédságában lokalizálódik.

A szklerózis multiplex (SM) a központi idegrendszer gyulladással járó megbetegedése, amelynek hátterében a mielinhüvely károsodása, a neuronok demielinizációja áll. A TPPP/p25 és az SM betegség lehetséges kapcsolatáról először Höftberger és csoportja írt tudományos közleményt. Úgy találták, hogy a betegek agyi lézióiban a TPPP/p25 pozitív oligodendrociták mennyisége jelentősen lecsökkent, ugyanakkor egyre több TPPP/p25 pozitív oligodendrocita jelent meg a betegség által nem érintett fehérállományban, ami remielinizációs folyamatra utalhat (Höftberger et al., 2010). Csoportunk egy közelmúltban megjelent publikációjában kimutatta, hogy az SM betegek gerincvelői folyadékában az endogén TPPP/p25 szintje jelentősen megemelkedik, feltehetően a mielinhüvelyt kialakító oligodendrociták degenerációja miatt. A TPPP/p25 kifejeződése fokozódik a betegség kései

fázisában. Az eredmények alapján a TPPP/p25 az SM diagnosztikai markerfehérjéje lehet mennyiségének monitorozása révén (Vincze et al., 2011).

### 2.3. Rendezetlen fehérjék

#### 2.3.1. Rendezetlen fehérjék

A klasszikus szekvencia→szerkezet→funkció paradigma szerint a fehérjék biológiai funkciójának betöltéséhez nélkülözhetetlen egy jól definiált háromdimenziós szerkezet. Azonban számos fehérje illetve fehérjedomén viselkedése nem felel meg a „hagyományos képnek”, natív, funkcionális állapotukban sem rendelkeznek stabil térszerkezettel (Daughdrill et al., 1997; Dyson és Wright, 2005). A rendezetlenségnek – amely a fehérje teljes hosszúságában megjelenhet, vagy csak egy adott régióra korlátozódik – a funkció betöltésében fontos szerepe lehet. A rendezetlen régiók a molekuláris felismerésben, más fehérjékkel (pl. kinázok, transzkripciós faktorok, translációs inhibitorok) illetve nukleinsavakkal (pl. DNS, mRNS, tRNS, rRNS) való heteroasszociációk kialakításában vesznek részt (Dunker et al., 2002; Tompa, 2002).

A rendezetlen fehérjék nem jellemezhetőek csupán egyetlen jól definiált szerkezettel, a polipeptidlánc rendkívüli flexibilitása révén olyan dinamikus konformersokaságnak tekinthetők, amelyekben a peptidgerinc nem egyensúlyi, hanem időben változó torziós szög értékekkel jellemezhető (Uversky és Dunker, 2010).

Az elmúlt években több elnevezés született a fehérjék szerkezeti rendezetlenségének jelölésére, mint például a *natively denatured*, *natively unfolded*, *naturally flexible*, stb. megnevezés (Orosz és Ovádi, 2011). A szakirodalom az általánosan használt és elfogadott terminológia alapján ezeket a fehérjéket eredendően szerkezet nélküli (*Intrinsically Unstructured Protein*, *IUP*) (Wright és Dyson, 1999) vagy eredendően rendezetlen fehérje (*Intrinsically Disordered Protein*, *IDP*) (Dunker et al., 2000) néven tartja számon. Elnevezésük utal arra a tulajdonságukra, hogy a rendezetlenség nem a környezeti hatások következménye, hanem saját, funkcionális szempontból fontos jellemzőjük. Az IUP fehérjék az IDP fehérjék csoportján belül egy olyan alosztályt képviselnek, amelyek nem rendelkeznek kompakt hidrofób maggal és jelentős másodlagos szerkezeti elemeket sem tartalmaznak (Dunker et al., 2008; Uversky et al., 2009).

Bioinformatikai vizsgálatok azt mutatják, hogy az IUP-k száma az egyes fajokon belül növekszik, ahogy egyre magasabb rendszertani egységeket tekintünk (Dunker et al., 2000; Tompa et al., 2006; Ward et al., 2004). Teljes proteomok predikciós algoritmusokkal végzett szűrése azt mutatja, hogy a prokariótákban a fehérjék 10-20%-a rendelkezik legalább egy, 30

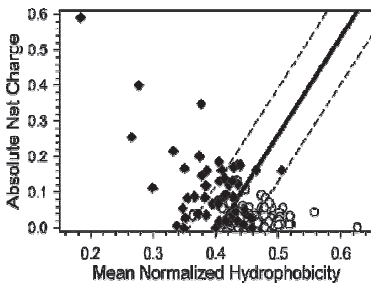
aminosavnál hosszabb rendezetlen régióval, míg eukariótákban ez a szám lényegesen nagyobb, 30-60% közötti. A humán proteomban a fehérjék kb. 12%-a teljesen rendezetlen, nincsen bennük egyetlen felismerhető szerkezeti domén sem, míg 50%-a tartalmaz legalább egy hosszú ( $\geq 30$  aminosav) rendezetlen régiót (Dunker et al., 2002; Dunker et al., 2000; Romero et al., 2004). A fehérjék rendezetlenségét több mint 500 fehérje esetében kísérletesen is bizonyították, elsősorban magmágneses rezonancia (NMR) és CD spektroszkópia segítségével (ld. DisProt, a fehérje rendezetlenség adatbázisa) (Sickmeier et al., 2007).

A rendezetlen fehérjék jelentőségére utal az a tény, hogy meghatározó szerepük van jelátviteli folyamatokban, a sejtciklus-szabályozásban, a génekifejeződésben és a dajkafehérje-funkcióban, így mutációik gyakran okoznak súlyos betegségeket (Tompa, 2005).

### 2.3.2. Elsődleges szerkezet, rendezetlen régiók szerepe

A rendezetlen fehérjék primer szerkezete és az azt felépítő valamennyi aminosav vizsgálata során megállapították, hogy szoros az összefüggés a felépítő aminosavak, az oldalláncok minősége és sorrendje, valamint a fehérje rendezetlensége között. A rendezetlen fehérjékben alacsony számban fordulnak elő, vagy csaknem teljesen hiányoznak a globuláris fehérjékben nagy számmal előforduló, ún. „rendezettséget” elősegítő aminosavak, mint például a Trp, Tyr, Phe, Cys, Ile, Leu, Val és Asn; ugyanakkor különösen gyakoriak a „rendezetlenséget” elősegítő aminosavak, mint például az Ala, Arg, Gly, Gln, Ser, Pro, Glu és Lys. A His, Met, Thr és az Asp gyakorisága nem mutat jelentősebb eltérést a rendezetlen és globuláris fehérjék esetén (Dunker et al., 2001; Tompa, 2002).

Uversky és munkatársai a rendezetlenség jellemzésére bevezette az ún. „töltés-hidrofóbicitás plot”-ot, amely a szakirodalomban „CH plot”, vagy „Uversky-plot” néven vált ismertté (8. ábra).

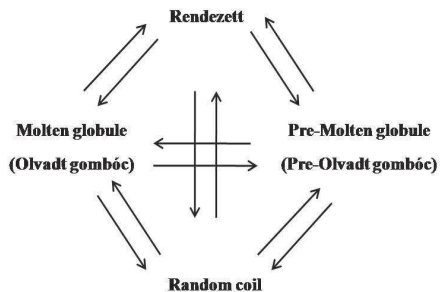


**8. ábra Töltés-hidrofóbicitás plot: a szerkezeti rendezetlenség predikciója (Oldfield et al., 2005a).** Globuláris (üres kör) és rendezetlen (fekete négyzet) fehérjék átlagos nettó töltésének ábrázolása a hidrofóbicitás függvényében. A fekete, empirikusan meghatározott egyenes  $\langle$ töltés,  $R \rangle = 2,743 \langle$ hidrofóbicitás,  $H \rangle - 1,109$ ; a rendezett és rendezetlen fehérjék közötti határvonalat jelöli. A szaggatott vonalak a predikció megbízhatóságát mutatják az adott zónán belül, amely 95% rendezetlen fehérjékre és 97% globuláris fehérjékre nézve.

Számos fehérjét az átlagos hidrofóbicitása illetve nettó töltése alapján vizsgálatnak vetettek alá és az így felállított fázisdiagram alapján következtetéseket vontak le a fehérje rendezetlenségéről. Megállapították, hogy a rendezetlenség elsődleges fizikai oka a nagy nettó töltés és alacsony hidrofóbicitás, ami megakadályozza, hogy a fehérje kompakt szerkezetet vegyen fel. Az alacsony hidrofóbicitás következtében nem tud kialakulni a hidrofób feltekeredési mag, a magas nettó töltés pedig az elektrosztatikus taszítóerők következtében egy oldószernek kitett, kitekeredett polipeptidláncnak kedvez. Az IDP-k proteolitikus érzékenységet, csakúgy, mint hőstabilitásukat, az aminosav-sorrendben rejlő rendezetlenségük magyarázza. Vagyis pusztán az aminosav-összetétel alapján következtethetünk egy adott fehérje magasabb szerkezeti szintjeire (Oldfield et al., 2005a; Uversky et al., 2000a).

### 2.3.3. A fehérje kvartett modell

Dunker és munkatársai a klasszikus szerkezet-funkció paradigmát kiterjesztették az eredendően rendezetlen fehérjékre és felállították a „fehérje szentháromság” modellt. A modell értelmében a fehérjék natív körülmények között három fő szerkezeti formát: rendezett vagy globuláris, molten globule („olvadt gombóc”) és random coil („véletlen elrendeződésű lánc”) szerkezetet vehetnek fel. Funkciójuk a három termodinamikai állapotból, illetve azok közötti átmenetből egyaránt eredhet és a fehérje natív állapota bármelyik lehet ezek közül (Dunker et al., 2001). Ennek a modellnek a továbbgondolása a „fehérje kvartett” modell, amely megkülönböztet egy negyedik, ún. premolten globule (pre-„olvadt gombóc”) állapotot is (Uversky, 2002a) (9. ábra).



9. ábra A „fehérje szentháromság” kiterjesztése: a „fehérje kvartett” modell. A fehérje funkciója a polipeptidlánc négy konformációs állapotából, illetve ezek közötti átmeneti állapotokból ered. Az ábra Uversky nyomán készült (Uversky, 2002a).

A rendezetlen fehérjék gyakran nem a teljes polipeptidlánc hosszúságában rendezetlenek, hanem reziduális szerkezettel rendelkeznek. Ez alapján random coil-szerű, premolten globule illetve molten globule konformációs állapotot vehetnek fel, amelyek kompaktságban és a másodlagos szerkezeti elemek arányában mutatnak különbséget. A random coil-szerű fehérjékből csaknem teljesen (vagy teljesen) hiányoznak a másodlagos szerkezeti elemek, leginkább coil konformációval jellemezhetőek. A molten globule állapotot natívyszerű másodlagos szerkezettel ( $\beta$ -redős lemezek) és fluktuáló harmadlagos szerkezettel lehet jellemezni, amely a hidrofób összerogyás miatt viszonylag kompakt. Ezek a fehérjék nagy érzékenységgel kötődnek hidrofób fluoreszcens próbákhoz, mint pl. a 8-anilino-1-naftalin-szulfonsav (ANS); hidrodinamikai sugaruk  $\sim$ 10-20%-kal nagyobb, mint a natív globuláris fehérjéé. A premolten globule állapot kevésbé kompakt, mint a molten globule, a másodlagos szerkezeti elemek aránya jóval kisebb és kevésbé érzékeny a fluoreszcens próbákra (Uversky, 2002a).

#### 2.3.4. A szerkezeti rendezetlenség vizsgálata

Számos biofizikai és fizikai-kémiai vizsgálati módszer teszi lehetővé, hogy a rendezetlen fehérjéket a szerkezeti különbözőségek alapján megkülönböztessük egymástól illetve a globuláris fehérjéktől. Az IDP-k karakterizálására használt módszerek között találjuk a hidrodinamikai módszereket, mint pl.: gélfiltrációs kromatográfia, dinamikus fényszórás mérés, analitikai ultracentrifugálás, kisszögű röntgenszórás. A spektroszkópai technikák közül a távoli/közele-UV CD, fluoreszcencia spektroszkópia, infravörös spektroszkópia, az elektron paramágneses rezonancia spektroszkópia és az NMR spektroszkópia a legáltalánosabban használt módszerek közé tartoznak (Dunker et al., 2001; Uversky, 2002a).

A rendezetlen fehérjék csak nagyon nehezen, vagy egyáltalán nem kristályosíthatóak, így ha nem sikerül jó minőségű kristályt növeszteni a megfelelő ligandum jelenlétében, teljesen hiányoznak a PDB adatbázisból (*Protein Data Bank*, [www.rcsb.org/pdb](http://www.rcsb.org/pdb)). A rendezetlen régiót tartalmazó fehérjék egyik gyakori jellemzője a röntgenszerkezetekből hiányzó elektronsűrűség, így a rendezetlenségre a PDB fájlból hiányzó röntgenkristallográfiás koordinátákból következtethetünk. Az interferogram alapján a rendezett fehérjék rövidebb/hosszabb rendezetlen szakaszai azonosíthatóak, mint a kristályszerkezet láthatatlan régiói (Bhaumik et al., 2007; Worbs et al., 2000).

Az NMR spektroszkópia oldatfázisban történő szerkezetvizsgálatot tesz lehetővé, amellyel atomi szintű információt nyerhetünk a rendezetlen fehérjék szerkezeti és dinamikai tulajdonságairól. Dyson és csoportja jelentős eredményeket ért el a rendezetlen fehérjék NMR

vizsgálatában. Megmutatták, hogy a hasonló méretű rendezett és rendezetlen fehérjék heteronukleáris egykvantum korrelációs (HSQC) spektruma jelentősen különbözik; rendezett fehérjékben az amid jelek sokkal szélesebb tartományt fednek le (6,5-9,5 ppm) szemben a rendezetlen fehérjékkel (8-8,5 ppm), így a fehérjék HSQC spektruma a szerkezeti rendezetlenség egyik fő indikátora (Dyson és Wright, 2005).

A közeli-UV CD felvilágosítást nyújt a harmadlagos szerkezetről. Globuláris fehérjékben az ún. „aromás régió” éles intenzitású és összetett sávokkal jellemezhető, szemben a rendezetlen fehérjékkel, ahol a CD spektrum alacsony komplexitású (Johnson et al., 2012). A távoli-UV CD, illetve a Fourier-transzformációs infravörös spektroszkópia mérések azt mutatják, hogy a rendezetlen fehérjékben az ismert másodlagos szerkezeti elemek ( $\alpha$ -hélix,  $\beta$ -redős lemez) kis arányban ugyan, de előfordulnak (10-20%), a prolinok magas előfordulása miatt megjelennek a poliprolin II-hélixek (PPII) és jóval nagyobb bennük a random coil konformáció aránya (Oldfield et al., 2005b; Uversky et al., 2000a).

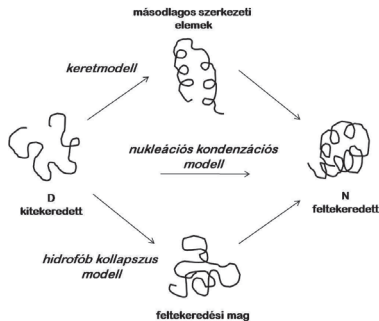
Tanford korai megfigyelése volt, hogy a hidrodinamikai viselkedés rávilágíthat arra, ha egy fehérje bizonyos körülmények között elveszíti a nemkovalens kölcsönhatások által stabilizált negyedleges illetve harmadlagos szerkezetét, pl. denaturálószer hatására kitekeredik (Tanford, 1968). A hidrodinamikai vizsgálati módszerek rámutatnak a rendezetlen fehérjék nagy látszólagos hidrodinamikai sugarára, illetve térfogatára. *In vitro*, fiziológiai körülmények között az azonos molekulatömegű globuláris fehérjéhez képest jóval nagyobb girációs sugárral ( $R_g$ ) illetve hidrodinamikai sugárral ( $R_H$ ) jellemezhetőek, így ezeknek a paramétereknek a segítségével a polipeptidlánc kompaktsága alapján különbséget tehetünk az egyes konformációs állapotok között (Uversky, 2002b).

A rendezetlen fehérjék további jellemzője a hőstabilitás és a nagyfokú proteolitikus érzékenység, ami a polipeptidlánc flexibilitásával és speciális aminosavösszetételével magyarázható. Ezen fehérjék tulajdonsága, hogy hőkezelés után is képesek megőrizni a biológiai aktivitásukat (Dunker et al., 2001; Tompa, 2002).

Az elmúlt években több olyan szerkezetjósoló program született, aminek segítségével az aminosav-szekvencia információtartalma alapján a rendezetlenség mértékére következtethetünk. A legtöbb módszer megbízható, szekvencia-specifikus jóslást ad a vizsgált fehérje(szegmens) rendezetlenségéről (Dosztányi et al., 2010; Orosz és Ovádi, 2011).

### 2.3.5. Fehérje feltekeredés és szerkezeti rendeződés

A fehérje feltekeredés vizsgálatában több térszerkezet-kialakulási modell született, amelyek figyelembe vették, hogy a polipeptidlánc feltekeredése nem egy véletlenszerű és végtelen hosszú folyamat, hanem különböző útvonalakon, feltekeredési köztitermékeken keresztül zajlik. Erre példa a „hidrofób kollapszus modell”, aminek értelmében a polipeptidlánc feltekeredésének fő hajtóereje a hidrofób effektus. A folyamat első, gyors lépése a hidrofób összerogyás, kialakul a kompakt hidrofób mag és ezt követően alakulnak ki a másodlagos szerkezeti elemek (Baldwin, 1989). A „keretmodell” szerint a feltekeredés szerkezeti hierarchia szerint történik, amelynek első lépése a meglehetősen stabil másodlagos szerkezeti elemek kialakulása, majd ezt követően jön létre a harmadlagos szerkezet (Kim és Baldwin, 1990). Ennek a két modellnek a kombinációja az ún. „nukleációs kondenzációs modell” (10. ábra), ami alapján a másodlagos és harmadlagos szerkezet kialakulása nem választható el egymástól, parallel történik. A feltekeredési köztitermék képződésén keresztül kialakul az energetikailag kedvező natív téralkat, amelyet nagyenergiájú diszulfid hidak és sókötések stabilizálnak (Daggett és Fersht, 2003; Fersht, 1995). A 10. ábrán szemléltetett elméletek közül a „nukleációs kondenzációs modell” nagyon jó leírást ad a térszerkezet kialakulására, amely független a fehérjemérettől illetve a feltekeredési reakcióút komplexitásától, attól hogy egydoménos vagy többdoménos fehérjéről van szó. Figyelembe veszi a feltekeredési intermedierek képződését és a feltekeredés szerkezeti hierarchiáját is (mag, másodlagos szerkezet, szupermásodlagos szerkezet, domén, monomer, oligomer).



**10. ábra A fehérje feltekeredés mechanizmusa.** A „keretmodell” szerint először a másodlagos szerkezeti elemek jelennek meg a kitekeredett fehérjeláncban, majd az előre megformált szerkezeti elemekre építkezve alakul ki a natív, harmadlagos szerkezet. A „hidrofób kollapszus modell” alapján a hidrofób összerogyás következtében kialakul egy kompakt feltekeredési mag és ezt követően formálódnak meg a másodlagos szerkezeti elemek. E két modell kombinációja a „nukleációs kondenzációs modell”, amely szerint a másodlagos és harmadlagos szerkezet kialakulása egyszerre történik, kooperatív módon. Az ábra Daggett és Fersht összefoglaló munkája nyomán készült (Daggett és Fersht, 2003).



### 2.3.6. A fehérje feltekeredését befolyásoló tényezők

Kisméretű, egydoménos fehérjék esetében *in vitro* a feltekeredés többnyire D (denaturált) ↔ N (natív) kétállapotú átmenettel jellemezhető és a folyamat reverzibilis. A két állapot között kooperativitás érvényesül, azaz a molekula vagy a natív, vagy a denaturált állapotban marad meg tartósan. *In vitro* kísérletekben általában híg oldatokkal dolgozunk (tisztított fehérje, kb. 1-10 mg/ml fehérjekoncentráció, termodinamikailag ideális állapot) alacsony hőmérsékleten, ahol a fehérjefeltekeredés nemkívánatos mellékreakciók nélkül és aggregációtól-mentes módon zajlik. Ezzel ellentétben a sejt belseje erősen zsúfolt (*crowded*), a fehérjéknek számos kölcsönható partnere van és az intracelluláris makromolekula koncentráció magas, közelítőleg 300-400 mg/ml (Zimmerman és Trach, 1991).

A molekuláris csoportosulás, szakirodalomban használt kifejezéssel élve a *molekuláris crowding* modellezésére *in vitro* kísérleteket végeztek rendezetlen fehérjékkel. Megvizsgálták, hogy a magas makromolekula koncentráció kedvez-e a fehérje feltekeredésének, ugyanis a sejten belül a környező fehérjékkel való heteroasszociáció segítheti a kompakt, rendezett szerkezet kialakulását. Szász és munkatársai a rendezetlen fehérjék (pl.  $\alpha$ -kazein, MAP2c, p21(Cip1) vizsgálatában nagy molekulásúlyú polimereket, dextránt és Ficoll 70-et használtak, ami jól közelíti az élő sejten belüli komplex rendszereket. Megállapították, hogy a molekuláris *crowding* elősegíti az IDP fehérjék lokális szerkezeti elemeinek a kialakulását és stabilizálódását, azonban a fehérjék a *crowding* által sem vesznek fel egy határozott kompakt szerkezetet. A kísérletek azt bizonyítják, hogy a szerkezeti rendezetlenség a fehérjék fiziológiás állapota (Szász et al., 2011).

A rendezetlen fehérjék szerkezete jelentősen módosulhat a biológiai partnermolekulák megkötésekor. A kölcsönhatás során fellépő szerkezeti rendeződést (rendezetlen→rendezett) indukált feltekeredésnek nevezzük (Dyson és Wright, 2002; Dyson és Wright, 2005). Az IDP-k ekkor sem vesznek fel szoros, globuláris struktúrát. A ligandum megkötése által a fizikai paraméterek (nagy nettó töltés, alacsony hidrofóbicitás) megváltoznak, ami kedvez a polipeptidlánc feltekeredésének. Az indukált feltekeredéshez nem szükséges nagy energiabefektetés, ami arral utal, hogy nincs nagy átrendeződés, az előre-megformált szerkezeti elemek stabilizálódnak (Dyson és Wright, 2002; Dyson és Wright, 2005; Tompa, 2005). A rendezetlen fehérjék a nyitott konformációt részben megőrzik, így nagy felület marad szabadon és több partnert tudnak megkötni. A kötőpartner nagyban meghatározza, hogy milyen konformációt vesz fel az IDP a kötődéskor, ami mutatja ezen fehérjék nagyfokú plasztikusságát és funkcionális sokféleségét, promiszkuis viselkedését (Tompa, 2002).

Az indukált feltekeredés *in vitro* vizsgálatában általában trifluoretanolt és trimetilamin-

N-oxidot használnak, melyek szerkezeti stabilizátorként viselkednek, ún. „kémiai chaperonok”, elősegítik az  $\alpha$ -hélix tartalom növekedését, mint azt a citoplazmatikus dinein és az  $\alpha$ -szinuklein vizsgálatá során is kimutatták (Nyarko et al., 2004; Uversky et al., 2001b).

Számos példát találunk az irodalomban, amikor kofaktorok, lipidek, nukleinsavak, fémionok hatására a rendezetlen fehérje konformációváltozást, feltekeredést mutat. Erre példa az  $\alpha$ -szinuklein DNS-indukált betekeredése (Hegde és Rao, 2007), a *Methanococcus jannaschii* (MjCM) átmeneti állapot analóg inhibitor biciklikus karboxilsav hatására bekövetkező szerkezeti rendeződése (Vamvaca et al., 2004), illetve a humán prothymosin- $\alpha$  Zn<sup>2+</sup>-indukált feltekeredése (Uversky et al., 2000b).

A Rho családba tartozó GTPáz, a Cdc42 az aktin citoskeleton szabályozását a WASP (*Wiskott-Aldrich syndrome protein*) családba tartozó fehérjék aktivációja által végzi. A WASP fehérje GTPáz-kötő doménje *in vitro*, fiziológias körülmények között rendezetlen, azonban a Cdc42 és más partnerek hatására szerkezeti rendeződést mutat. A rendezetlen domén plasztikussága révén a fehérje eltérő szerkezetekbe rendeződik, miközben a partner molekulához kötődik (Kim et al., 2000). Azt a jelenséget, amely során alternatív, rendezett szerkezetek formálódnak egy fehérje szegmens eltérő kölcsönhatásai által, *contingent folding*-nak nevezték el (Lei et al., 2000).

A sejten belül molekuláris chaperonok segítik a fehérjék hatékony feltekeredését. A rendezetlen, vagy hibásan feltekeredett fehérjékhez kötődve védik a fehérjét az aggregációtól, kivédik a polipeptidlánc inkorrekt kölcsönhatásait és jelentősen felgyorsítják a fehérjeszerkezet kialakításának a folyamatát (Ellis, 2006). A chaperonok jelentős hányada szintén rendezetlen, ami biológiai funkciójuk szempontjából fontos tulajdonságuk (Tomba és Csermely, 2004).

#### **2.4. Neurodegeneratív betegségekre jellemző rendezetlen fehérjék**

Számos neurodegeneratív betegség köthető eredendően rendezetlen, vagy hibásan feltekeredett fehérjékhez. A rendezetlen fehérje, vagy a mutáció/környezeti hatások következtében a fehérje megváltozott szerkezete kóros fehérje-fehérje kölcsönhatások kialakulásához és oldhatatlan aggregátumok képződéséhez vezet. Ilyen esetekben a fehérjezárvány megjelenhet az extracelluláris térben amiloid plakkok, illetve intracelluláris zárványok formájában. A betegségek molekuláris hátterében egy vagy több fehérje konformációváltozása áll (jellemzően „kereszt-béta” szerkezetű), ezért a neurodegeneratív betegségek ezen csoportját konformációs betegségnek nevezik (Chiti és Dobson, 2006).

A rendezetlen fehérje oldhatatlan lerakódása vezet a betegség kialakulásához például a fertőző szivacsos agyvelőbántalmak esetében (pl. Creutzfeldt-Jacob-szindróma, kuru, szarvasmarhák szivacsos agyvelőgyulladás). A betegségekben az idegszövet-specifikus sejtfelszínen található prion fehérje (PrP) egy rendezetlen régiója  $\beta$ -redős szerkezet vesz fel, hozzájárulva ezzel a toxikus amiloid-plakkok kialakulásához. Hasonló folyamat játszódik le a Parkinson-kór és a diffúz Lewy-testes betegség esetén is, ahol a különböző idegszöveti sejtípusokban, elsősorban a preszinaptikus végződésekben található  $\alpha$ -szinuklein szerkezetváltozása ( $\beta$ -redők feldúsulása) vezet az intracelluláris aggregátum képződéséhez (Chiti és Dobson, 2006). A béta-amiloid és a rendezetlen tau fehérje hiperfoszforiláció hatására (Cdk5 és/vagy GSK3 kináz által) bekövetkező szerkezetváltozása az Alzheimer-kór kialakulásával áll összefüggésben (Götz et al., 2011; Iqbal és Grundke-Iqbal, 2008).

A szakirodalom jelenlegi álláspontja szerint a neurodegeneratív betegségek kialakulásáért a fehérjék kisebb oldható oligomer formái felelősek, amelyek sokkal károsabbak a sejt számára, mint a hosszú fibrillumokból felépülő aggregátumok. A béta-amiloid peptid (Roberts et al., 2012), a tau (Patterson et al., 2011) és az  $\alpha$ -szinuklein (Winner et al., 2011) esetében megmutatták, hogy az oligomer fehérjeformák központi szerepet játszanak a betegség kialakulásában, míg a fibrillumok képződése a betegség késői szakaszára jellemző.

Számos tanulmány igazolja, hogy a neurodegeneratív betegségekben megjelenő fehérjeaggregátumok kialakulását egyes fémionok jelentősen meggyorsítják. A rendezetlen  $\alpha$ -szinuklein fibrillizációját elősegítik bizonyos fémionok ( $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ), amelyek a fehérjéhez kötődve konformációváltozást okoznak és végső soron toxikus aggregátumok jönnek létre (Uversky et al., 2001a). A szintén rendezetlen béta-amiloid peptid és amiloid prekursor fehérje esetében igazolták, hogy a  $\text{Cu}^{2+}$  megváltoztatja a fehérje funkcióját és a betegségre jellemző amiloid-plakkok kialakulását idézi elő (Lin et al., 2010).

### 3. Célkitűzések

Kutatócsoportunk célja kezdetektől a TPPP/p25 fiziológiás és patológias folyamatokban betöltött szerepének felderítése volt. Csoportunk eredményei arra utaltak, hogy a TPPP/p25 egyes, központi idegrendszert érintő betegségek kialakulásában egy „új szereplő” lehet. Doktori munkám során azt vizsgáltam, hogy a rendezetlen TPPP/p25 milyen kölcsönhatások révén hozza létre azokat a struktúrákat, amely specifikus funkciók ellátásához szükséges a patológias és/vagy a fiziológiás folyamatokban.

Konkrét céljaim a következők voltak:

- ❖ Célom volt i) hogy a TPPP/p25 szerkezetét különböző *in silico* és kísérletes szerkezetvizsgáló módszerekkel jellemezzem, ii) hogy összehasonlító vizsgálatokat végezzek a TPPP/p25-tel egy fehérjecsaldába tartozó homológ fehérjékkel, a TPPP3/p20-szal és a TPPP2/p18-cal, iii) hogy megvizsgáljam, a szerkezeti tulajdonságok miként nyilvánulnak meg a TPPP fehérjék tubulinnal való kölcsönhatásában.
  
- ❖ Célom volt i) olyan kismolekulák azonosítása, amelyek kölcsönhatnak a TPPP/p25-tel, ii) hogy a kölcsönhatás során bekövetkező szerkezetváltozást és azok funkcionális következményeit jellemezzem, különös tekintettel a TPPP/p25 tubulinpolimerizáló potenciáljának molekuláris szintű jellemzésére.
  
- ❖ Csoportunk korábbi kísérletei arra utaltak, hogy a TPPP/p25 többféle formában fordulhat elő (monomer, dimer, oligomer), így fontos kérdésnek tekintetem i) az egyes fehérjeformák szerkezeti illetve funkcionális sajátosságainak vizsgálatát, ii) a specifikus funkció(k) ellátásáért felelős speciesz(ek) azonosítását.

## 4. Anyagok és módszerek

### 4.1. Kísérleti megközelítés

A doktori értekezésem tárgyát képező TPPP/p25 tulajdonságainak minél pontosabb megértéséhez a biokémia, a bioinformatika illetve a biofizika területének módszereit használtam. A biokémiai módszerek közül különböző kromatográfiai és elektroforézis technikákat, enzimatiskus keresztkötő reagenst, az oldalláncok kémiai módosítását és enzimaktivitás méréseket alkalmaztam. A biofizikai módszerek közül CD és fluoreszcencia spektroszkópiát, Szigeti Krisztián útmutatásaival izotermális titrációs mikrokolorimetriát (ITC) és a Perczel csoporttal együttműködésben végzett NMR spektroszkópiát alkalmaztunk. A bioinformatikai módszerek közül különböző szerkezetjelző programok segítettek a munkámat. Affinitáskromatográfiai vizsgálatok tömegspektroszkópiával való kombinálása tette lehetővé a TPPP/p25 kölcsönható partnereinek azonosítását. A tömegspektroszkópiás mérések kivitelezését és a spektrumok analízisét a szegedi Proteomikai Kutatócsoport munkatársai végezték. A kísérletek során szarvasmarha agyból izolált tubulinnal, illetve rekombináns technikával előállított fehérjékkel (TPPP/p25, TPPP3/p20, TPPP2/p18) dolgoztam. Csoportunkban a fehérje működését az *in vitro* kísérletekkel párhuzamosan *in vivo* rendszerekben is vizsgálják, a kísérletekért egy eukarióta, elsődlegesen humán sejtvonalakkal foglalkozó csapat felelős. Ezért doktori értekezésemben többször is utalok az általam elvégzett kísérlet *in vivo* relevanciájára.

### Anyagok

A mérésekhez felhasznált anyagokat és vegyszereket a Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) és a Reanal Finomvegyszergyár RT-től vásároltuk, az ettől eltérő forrásokat a szövegben ismertetem. A fém-kötés vizsgálatoknál  $ZnCl_2$  és  $CaCl_2$  oldattal dolgoztam.

### 4.2. Fehérjék izolálása és tisztítása

#### 4.2.1. MAP-mentes tubulin preparálása marhaagyból

MAP-mentes tubulin preparálása marhaagyból történt, Na és Timasheff módszere alapján (Na és Timasheff, 1986). A megtisztított marhaagyat feltáró pufferben homogenizáltam, majd a minta centrifugálása (30 perc, 4°C, 11000 g) után a felülúszót  $(NH_4)_2SO_4$ -tal (187 g/L, 32 %) kicsaptam. Újabb centrifugálást követően (30 perc, 4°C, 15000 g) a felülúszón  $(NH_4)_2SO_4$ -tal (+ 71 g/L, 43%) újabb kicsapást végeztem. Ennél a lépésnél a tubulin a MAP-ekkel együtt kicsapódik. Újabb centrifugálást (30 perc, 4°C, 15000

g) követően a csapadékot felszuszpendáltam 1 mM fenilmetil-szulfonil-fluorid (PMSF) tartalmú mosó pufferrel. DEAE A 50 ioncserélő gyantát mosó pufferrel ekvilibráltam, majd a felszuszpendált csapadékot átengedtem rajta. Ezt mosási lépések követték 0,4 M KCl tartalmú mosó pufferrel, hogy a MAP-eket eltávolítsam. Az elúció 0,8 M KCl tartalmú mosó pufferrel történt. Az eluált oldatot  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -tal (24.8 g/L) kicsaptam és centrifugáltam (30 perc, 4°C, 33000 g). A csapadékot minimális térfogatú pufferben visszaoldottam, majd sómentesítés céljából G50-es oszlopra vittem. A tubulin koncentrációt 280 nm-en, 0,1 N NaOH-ban mértem. Az így preparált tubulint -70°C-on tároló pufferben tároltam.

feltáró puffer: 10 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0,24 M (D+)szacharóz, 0,1 mM GTP, 1 mM 1,4-ditioeritritol (DTE), 1 mM PMSF (pH 7,0)

mosó puffer: 10 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0,1 mM GTP, 1 mM DTE (pH 7,0)

tároló puffer: 10 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 1 M (D+)szacharóz, 0,5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0,1 mM GTP (pH 7,0)

#### 4.2.2. Rekombináns fehérje expresszió és tisztítás

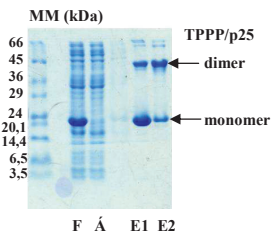
A humán TPPP3/p20 és TPPP2/p18 cDNS-ét az MRC Geneservice cég bocsátotta rendelkezésünkre. A humán TPPP3/p20 kódoló szekvenciáját az 5'-AGTTCTCGAGCTAGCATGGCATCAGAGGCAGAAA-3' és az 5'-TTATGAATTCCTTCTTACCTTGGA-3' primerek felhasználásával polimeráz láncreakció útján (PCR) felszaporítottuk, majd *NheI* és *EcoRI* restriktációs enzimek segítségével pTrcHis B vektorba (Stratagene) klónoztuk. A humán TPPP2/p18-at kódoló szekvenciát az 5'-AGTTCTCGAGCTAGCATGGCATCAGAGGCAGAAA-3' és az 5'-TTATGAATTCCTTCTTCTTATC-3' primereket felhasználva PCR-el szaporítottuk fel, majd szintén *NheI* és *EcoRI* restriktációs enzimek segítségével pTrcHis B vektorba klónoztuk. A humán TPPP/p25 cDNS-ét humán magzati agy RNS-éből (BD Clontech) sokszorozták fel RT-PCR technikával. A humán TPPP/p25-öt kódoló szekvenciát az 5'-AGATACACATATGGCTGACAAGGCTAAGC-3' és az 5'-GTGCTCGAGCTTGCCCCCTTGC-3' primereket felhasználva PCR-el felszaporítottuk, majd *XhoI* és *NdeI* restriktációs enzimek segítségével pET21c vektorba (Novagen) klónoztuk. A konstrukciókat DNS szekvenálással ellenőriztük. Valamennyi konstrukció fehérjeterméké az izolálást megkönnyítendő C-terminális His-címkét, *His<sub>6</sub>Tag*-et hordozott. A plazmidokat *E. coli* baktériumba transzfektáltuk, a rekombináns fehérjéket BL21 (DE3 törzs) sejtekben termeltettem. 25 µl glicerines baktériumot 5 ml 0,1 mg/ml ampicillint és 0,1 mg/ml klóramfenikolt tartalmazó steril LB Broth, 20 g/L (Lysogeny Broth: 10 g/L tripton, 5 g/L keményítő extraktum, 5 g/L NaCl) tápoldatban egész éjszakán át 220 rpm-mel ráztam és

37°C-on inkubáltam. Az átoltást követően 200 ml-es térfogatban újabb három órán keresztül növesztettem. 600 nm-en követtem az optikai denzitás értékét, majd 0,4-0,6 abszorpciós értéknél (a sejtek növekedése még az exponenciális szakaszban van) 1 mM izopropil- $\beta$ -D-tiogalaktopiranoziddal indukáltam a rekombináns fehérje termelését. További 3 óra 37°C-on történő inkubálás és 220 rpm-mel történő rázatás után a sejtenyészetet centrifugáltam (15 perc, 4°C, 2500 g), majd a felülúszót leöntöttem. A csapadékban lévő sejteket mosó pufferben proteázgátlók jelenlétében (1 mM benzamidin, 1 mg/ml leupeptin, 1 mg/ml pepsztatin, 1 mM PMSF) felszuszpendáltam. A sejteltárás szonikálással történt (6x15 mp, 30 mp-es szünetekkel) jégén. Centrifugálás (40 perc, 4°C, 100000 g) után a termelt fehérjét immobilizált fém affinitáskromatográfiával (Immobilized Metal Affinity Chromatography, IMAC) HisTrap™ HP (GE Healthcare) 1 ml-es oszlopon izoláltam. A Ni Sepharose™ gyantában található Ni<sup>2+</sup>-ionok szabad koordinációs helyeizhez a fehérjén található His<sub>6</sub>Tag szelektíven bekötődik. Az elúció során a fehérjét előbb NaAc-tal (pH 4,5) eluáltam, majd imidazzal (pH 7,0) leszorítottam (11. ábra). A különböző elúciós frakciókat YM 10 membránon Amicon cellában (Millipore) töményítettem. A fehérjét 50 mM NH<sub>4</sub>Ac oldatban egy éjszakán át dializáltam, majd liofilizáltam és -70 °C-on tároltam. 500 ml *E. coli* kultúrából 10-15 mg tiszta fehérjét tudunk előállítani. Egyes kísérletekben (ld. GTPáz aktivitásmérés) indokolt volt, hogy frissen preparált, nem liofilizált fehérjével dolgozzunk. A fehérje izolálás egyes lépéseit, valamint a fehérje tisztaságát nátrium-dodecil-szulfát-poliakrilamid gélelektroforézissel (SDS-PAGE) ellenőriztem.

mosó puffer: 50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl (pH 7,2)

elúciós puffer E1) 50 mM NaAc, 300 mM NaCl (pH 4,5)

elúciós puffer E2) 50 mM NaAc, 300 mM NaCl, 150 mM imidazol (pH 7,0)



**11. ábra** Reprezentatív gélkép: a humán rekombináns TPPP/p25 izolálása fém affinitáskromatográfiával.

13,5%-os SDS gél, F: oszlopra felvitt sejtextraktum, Á: átesett frakció, E1: TPPP/p25 elúciója NaAc pufferrel (pH 4,5), E2: TPPP/p25 elúciója 150 mM imidazol tartalmú NaAc pufferrel (pH 7,0).

A His<sub>6</sub>Tag-mentes és a His<sub>6</sub>Tag-et (C- vagy N-terminálison) tartalmazó fehérje összehasonlító szerkezeti és kölcsönhatás vizsgálatainál nem tapasztaltunk eltérést (Zotter et al., 2011a).

#### 4.2.3. $^{15}\text{N}$ -, illetve $^{13}\text{C}$ -, $^{15}\text{N}$ -jelzett TPPP/p25 előállítás az NMR méréshez

Izotópjelölt fehérjét szintén prokarióta rekombináns technikával állítottunk elő. A hagyományos táptalajok helyett M9 minimál táptalajt alkalmaztunk (1. táblázat), hogy a termeltetett fehérjébe a jelöltni kívánt elemből (nitrogén, szén) szinte kizárólag izotóp épüljön be. A transzfektált baktériumot 5 ml 0,1 mg/ml ampicillint tartalmazó steril LB Broth (20 g/L) tápoldatban egész éjszakán át növesztettem. A minimál táptalajba történő átoltást követően 200 ml-es térfogatban hat órán keresztül növesztettem folyamatos rázatás és 37°C-os termosztálás mellett. 600 nm-en követtem az elnyelést, és 0,4-0,6 abszorpciós értéknél 1 mM izopropil- $\beta$ -D-tiogalaktopiranoziddal indukáltam a rekombináns fehérje termelését. Újabb öt óra rázatás után a tenyészetet centrifugáltam (15 perc, 4°C, 2500 g). A preparálás további lépései megegyeznek a 4.2.2-ben leírtakkal.

##### 5x M9 törzs

64g	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
15g	$\text{K}_2\text{HPO}_4$
2,5g	$\text{NaCl}$
1000 ml	steril $\text{H}_2\text{O}$

##### SolQ

8 ml	5 M $\text{HCl}$
5g	$\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$
184 mg	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
64 mg	$\text{H}_3\text{BO}_3$
18 mg	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
4 mg	$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
340 mg	$\text{ZnCl}_2$
605 mg	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
40 mg	$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$
1000 ml	steril $\text{H}_2\text{O}$

##### 1. táblázat M9 minimál táptalaj összetétele

##### Vitamin mix

50 mg	tiamin
10 mg	d-biotin
10 mg	kolin-klorid
10 mg	folsav
10 mg	niacinamid
10 mg	pantoténsav
10 mg	piroxidál
1 mg	riboflavin
100 ml	steril $\text{H}_2\text{O}$

##### M9 minimál táptalaj (1000 ml)

780 ml	steril $\text{H}_2\text{O}$
200 ml	5x M9 törzssoldat
2 ml	1 M $\text{MgSO}_4$
2 ml	SolQ
10 ml	Vitamin mix
1 ml	100 mg/ml ampicillin
20 ml	20% glükózoldat ( $^{13}\text{C}$ jelölt lehet)
5ml	0,2 g/ml $\text{NH}_4\text{Cl}$ ( $^{15}\text{N}$ jelölt)

### 4.3. Fehérjeminták jellemzése

#### 4.3.1. Spektrofotometriás módszer a fehérjekoncentráció meghatározására

A fehérjeoldatok koncentrációját 280 nm-en mért elnyelésük alapján Varian Cary 100 UV/Vis spektrofotométeren határoztam meg, a Lambert-Beer-törvény alapján:

$$A = c \cdot \epsilon \cdot l$$

ahol A: az abszorbancia, c: a moláris koncentráció (mol/L),  $\epsilon$ : a moláris extinkciós együttható ( $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ), l: a kúvetta optikai úthossza (cm). A fehérje aminosav-összetétele alapján kiszámítható az ún. elméleti fajlagos extinkciós együttható ( $\epsilon^{0,1\%}$ , 1 cm, 280 nm), amely az 1 mg/ml-es fehérjeoldat elnyelését adja meg; meghatározására az ingyenesen hozzáférhető



ProtParam programot használtam ([www.expasy.org](http://www.expasy.org)) (2. táblázat). A fehérjekoncentráció meghatározását egyes esetekben a Bradford-módszer szerint is elvégeztem (Bradford, 1976), Bio-Rad ProteinAssay Kit-tel.

fehérje	$\epsilon^{0,1\%}_{1\text{cm}, 280\text{ nm}}$
tubulin	1,06
TPPP/p25	0,42
TPPP3/p20	0,64
TPPP2/p18	0,41

**2. táblázat Különböző fehérjék elméleti fajlagos extinkciós koefficiense.**

#### 4.3.2. SDS-PAGE

A gélelektroforézist Laemmli módszere alapján végeztem (Laemmli, 1970), ami a denaturált fehérjék molekulatömeg szerinti elválasztását teszi lehetővé. Az anionos SDS detergens hozzátapad a fehérjékhez, a több alegységes fehérjéket alegységeire bontja és denaturálja, miközben negatív töltést kölcsönöz nekik, így az összes fehérje a pozitív pólus felé fut a térhálós szerkezetű gélben. Mivel a kapcsolódó SDS mennyisége arányos a fehérje méretével, így a komplex futási sebessége, futási távolsága fordítottan arányos a fehérje molekulatömegével. A gél tömörítő és elválasztó gélből áll. A tömörítő gél a minták koncentrálsát teszi lehetővé a gélek határfelületén, míg a szeparáló gélben történik a fehérjék méret szerinti szétválogatása. Az általam használt vertikális gélintő és futtató rendszer BioRad (BioRad Mini-Protean II elektroforézis cella) gyártmányú volt. A módszer 0,1  $\mu\text{g}$  fehérje/sáv detektálását teszi lehetővé. Vizsgálataimat 13,5%-os szeparáló gélen végeztem, a mintákhoz ötödrész SDS mintafestéket tettem (1,2% SDS, 0,025% brómfenolkék, 40% glicerin, 10%  $\beta$ -merkatoetanol). Az elektroforetikus szétválasztás (100 V, 3 óra, szobahő) után a géleket Coomassie Brilliant Blue R-250 (BioRad) vagy PAGE Blue (Fermentas) festékkel festettem meg.

#### *Tricines SDS-PAGE*

A Tris-tricin SDS-PAGE kísérleteket Schägger és Jagow módszere alapján végeztem (Schaggar és von Jagow, 1987). A kismólsúlyú fehérjék (<50 kDa) jobb elválasztását teszi lehetővé a módszer, a szeparáló gél akrilamid és metilén-bisz-akrilamid százalékos arányának megfelelő megválasztásával. Vizsgálataim során 7%-os szeparáló gélt öntöttem.

#### 4.4. Fehérjeszerkezet-analízis *in silico* módszerekkel

A TPPP/p25 teljes aminosav-szekvenciáját megvizsgáltam a PONDR<sup>®</sup> (*Predictors of Natural Disordered Regions*) szerveren található VL-XT predikciós algoritlussal. A hozzáférési jogot a Molecular Kinetics (IUETC, Indianapolis, IN, USA) biztosította. Ezen kívül az ingyenesen hozzáférhető IUPred (*Prediction of Intrinsically Unstructured Proteins*) és a FoldIndex<sup>©</sup> grafikus jóslóprogramot használtam, valamint a töltés-hidrofóbicitás összefüggést (3. táblázat). Ezek a predikciós algoritmusok a rendezetlen fehérjék speciális aminosav-összetételén alapulnak.

<i>Prediktor</i>	<i>URL</i>	<i>Működés elve</i>	<i>Referencia</i>
<b>CH plot</b>	N/A	polipeptidlánc nettó töltésének és hidrofóbicitásának számítása	(Uversky et al., 2000a)
<b>FoldIndex</b>	<a href="http://bip.weizmann.ac.il/fldbin/findex">http://bip.weizmann.ac.il/fldbin/findex</a>	aminosav-összetétel fizikai-kémiai tulajdonságok	(Prilusky et al., 2005)
<b>IUPred</b>	<a href="http://iupred.enzim.hu">http://iupred.enzim.hu</a>	páros aminosav-aminosav kölcsönhatási energiák becslése	(Dosztányi et al., 2005)
<b>PONDR<sup>®</sup> (VL-XT)</b>	<a href="http://www.PONDR.com">http://www.PONDR.com</a>	tanított neurális hálózat elven működő prediktor, aminosav-összetétel	(Li et al., 1999) (Romero et al., 2001)

3. táblázat A rendezetlenség jóslására használt programok.

##### 4.4.1. Rendezetlen régiók jóslása a PONDR<sup>®</sup> (VL-XT) programmal

A PONDR tanított neurális hálózat elven működő program, amelyben a predikció egy rendezetlen és egy globuláris adathalmazra épül. A program az aminosav-szekvencia alapján a fehérje egy-egy adott régióján belül megjósolja a rendezetlen és rendezett szerkezet valószínűségét. Egy adott aminosav előtt illetve után 10-10 aminosavat vizsgál, azaz egy 21 aminosavból álló szekvenciát kiválasztva vizsgálja az aminosav-összetételt, hidrofíli, hidrofób jellegét. A központi aminosavhoz egy adott értéket rendel, amely ha a 0,5-ös küszöbérték felett van, akkor a központi aminosavat „rendezetlennek” tekint, ha ez az érték 0,5 alatti, akkor a kérdéses aminosav „rendezettnek” tekinthető. Rendezetlennek nevezzük az adott régiót, ha legalább egy 40 aminosavból álló folytonos szekvencia részlet a küszöbérték felett van.

##### 4.4.2. Az IUPred algoritmus

Az IUPred a rendezetlen fehérjék és fehérje szegmensek párkölcsönhatásokon alapuló rendezetlenségének becslésére szolgáló program. A szekvencia teljes hosszúságában egy-egy aminosavhoz rendelve aminosav párok közötti kölcsönhatási energiákat becsül meg. Mivel a rendezetlen szekvenciárészletek az intramolekuláris kölcsönhatások hiányában nem mutatnak

feltételezhető, hogy az adott aminosav rendezett vagy rendezetlen régióba esik-e. A program rendezetlenségi valószínűséget ad meg, ha ez az érték a küszöbérték 0,5 feletti, akkor az adott régió rendezetlen, ha 0,5 alatti, akkor rendezett.

#### 4.4.3. Töltés-hidrofóbicitás összefüggés, az „Uversky-plot” (CH plot)

A fehérjék aminosav-összetételének vizsgálatára Uversky és munkatársai a SWISS-PROT valamint a TrEMBL, az ExPASy-nál együttesen kereshető két adatbázisban (<http://www.ebi.ac.uk/uniprot/>) található fehérjék szekvenciáit használták fel. A vizsgált fehérjéket két csoportba sorolták. A natív fehérjék csoportját olyan kismólsúlyú, körülbelül 50-200 aminosav hosszúságú monomer globuláris fehérjék alkották, amelyek nem tartalmaztak diszulfid hidat. Közel 90 olyan fehérjét is megvizsgáltak, amelyek az NMR- és CD-spektroszkópia, infravörös spektroszkópia vizsgálatok, illetve hidrodinamikai viselkedésük alapján rendezetlennek bizonyultak (Uversky et al., 2000a). Az összehasonlítás eredménye azt mutatta, hogy a kismólsúlyú globuláris fehérjék átlagos nettó töltésük ( $0,04 \pm 0,04$ ) és átlagos hidrofóbicitásuk ( $0,48 \pm 0,03$ ) alapján jól elkülöníthetők a rendezetlen fehérjéktől (átlagos nettó töltés:  $0,12 \pm 0,09$ ; átlagos hidrofóbicitás:  $0,39 \pm 0,05$ ). A szerkezeti rendezetlenség általában nagy nettó töltéssel és alacsony hidrofóbicitással jellemezhető. Az „Uversky-plot” vagy „töltés-hidrofóbicitás plot” ezen a megfigyelésen alapul (3. táblázat). Így ha a nettó töltések abszolút értékeit a hidrofóbicitás függvényében ábrázoljuk, úgy a vizsgált fehérjéket az értékpár pozíciója alapján a rendezetlen vagy a globuláris fehérjék közé sorolhatjuk. A rendezetlen és globuláris fehérjék csoportját elválasztó „határvonal” képlete:

$$\langle R \rangle = 2,743 \langle H \rangle - 1,109$$

ahol  $H$  az átlagos hidrofóbicitást,  $R$  a nettó töltést jelöli.

#### 4.4.4. FoldIndex<sup>®</sup>

A Foldindex egy grafikus web szerver, amely az Uversky és mtsai. által kifejlesztett „töltés-hidrofóbicitás plot” továbbfejlesztett változata. A „töltés-hidrofóbicitás plot” az egész polipeptidláncra vonatkozó rendezetlenséget illetve rendezettséget jósol, de nem alkalmas szekvencia-specifikus, adott régiókra vonatkozó jóslásokra. A FoldIndex a töltés-hidrofóbicitás értékeket egy 51 aminosavból álló szegmensre számítva adja meg és alkalmas annak a jóslására, hogy a szekvencia mely régiója mutat feltételezhető hajlamot. Az Uversky-féle összefüggés optimalizált formája:

$$I_F = 2,785 \langle H \rangle - |\langle R \rangle| - 1,151$$

A Fold Index,  $I_F$  negatív értéke azt jelzi, hogy a fehérje(domén) nagy valószínűséggel rendezetlen, míg pozitív értéke azt, hogy a fehérje betekeredett.

#### 4.5. TPPP fehérjék szerkezetvizsgálata

##### 4.5.1. CD spektroszkópia

Királis molekulák oldatfázisú szerkezetvizsgálatának egyik igen hatékony módszere a CD spektroszkópia. A fehérjék ismétlődő kromoforja az amidsoport (CO-NH), aminek a távoli UV tartományban jellemző elnyelése van. A távoli UV tartományban felvett CD spektrum alapján a másodlagos szerkezeti elemek ( $\alpha$ -hélix,  $\beta$ -redőzött réteg,  $\beta$ - és  $\gamma$ -kanyar (turn), random coil) meglétére következtethetünk. A közeli UV tartományban (250-350 nm) az aromás oldalláncoknak és a diszulfid hidak hozzájárulásának jellegzetes elnyelése van, ebben a tartományban a harmadlagos szerkezetéről nyerhetünk információt. A CD spektroszkópia továbbá alkalmas a kölcsönható partnerek hatására bekövetkező konformációváltozás jellemzésére is. A CD spektrumokat JASCO J-720 (Tokyo, Japan) spektropolariméterrel vettem fel. A puffer spektrumát minden esetben levontam a minták átlagolt spektrumából. Az  $\alpha$ -hélix tartalmat a 222 nm-en mért ellipticitás alapján ( $\Theta_{222}$ ) az alábbi egyenlet segítségével számítottam (Chen et al., 1972):

$$\% \alpha\text{-hélix} = (|\Theta_{222}/(10nc)| - 2340)/303$$

ahol  $\Theta_{222}$ : a 222 nm-en mért ellipticitás (deg),  $n$ : a fehérjében található aminosavak száma,  $c$ : a koncentráció (mol/dm<sup>3</sup>) és  $l$ : a kűvetta úthossza (cm). A spektrumok analizésére felhasznált program: JASCO Spectra Manager Spectra Analysis v 1.53. Az ellipticitás értékeket moláris reziduális ellipticitássá alakítottam a következő összefüggés alapján:

$$[\theta] = \theta_{\text{obs}}/(10*n*l*c)$$

ahol  $[\theta]$ : a moláris reziduális ellipticitás (deg\*cm<sup>2</sup>\*dmol<sup>-1</sup>),  $\theta_{\text{obs}}$ : a mért ellipticitás (deg),  $n$ : a fehérjében található aminosavak száma,  $l$ : a fényút hossza (cm) és  $c$ : a koncentráció (mol/dm<sup>3</sup>).

A CD méréseket 190-260 nm (távoli UV) illetve 250-330 nm (közele UV) hullámhossz tartományban, 1 mm-es (távoli UV) illetve 1 cm-es (közele UV) úthosszú termosztálható kvarcküvetttában 25°C-on végeztem, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH 7,0), valamint 20 mM trisz-(hidroximetil)-amino-metán (Tris) (pH 7,2) pufferben. A TPPP/p25, TPPP3/p20, TPPP2/p18 koncentrációja 4-20  $\mu$ M koncentráció tartományon belül változott, a tubulin 1  $\mu$ M, a fémionok koncentrációja 50-400  $\mu$ M és a (Mg)GTP 50-1000  $\mu$ M volt.

#### 4.5.2. Fluoreszcencia spektroszkópia

A fluoreszcencia spektroszkópia vizsgálatok FluoroMax-3 spektrofluoriméteren (Jobin Yvon Horiba, Longjumeau, France) 1 cm-es optikai úthosszú termosztálható küvettában, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH 7,0), illetve 10 mM Tris (pH 7,2) pufferben 25°C-on történtek. A vizsgált minta fluoreszcencia jelét minden esetben korrigáltam a puffer jelével. Az adatok kiértékeléséhez a DataMax szoftvert használtam.

##### 4.5.2.1. Trp fluoreszcencia

A triptofán (Trp) fehérjékben való előfordulása alacsony, oldallánca viszonylag nagy kiterjedésű delokalizált elektronrendszert tartalmaz, 280 nm körül szelektíven gerjeszhető, ezáltal alkalmas a fehérjeoldatok spektroszkópiás vizsgálatára. A TPPP/p25-ben (2,4-8 μM) egy Trp található, a gerjesztés 290 nm-en történt, 10 nm széles rés alkalmazásával. Az emittált fény intenzitását 300 nm-től 400 nm-ig detektáltam 2 nm széles rés alkalmazásával. A frissen feloldott Zn<sup>2+</sup> koncentráció 0,5-40 μM volt. A fehérjével megegyező koncentrációjú N-acetil-L-triptofán-amiddel (NATA) kontroll méréseket végeztem.

##### 4.5.2.2. ANS fluoreszcencia

Az ANS hidrofób fluoreszcens festék, amelyet fehérjék felszíni tulajdonságainak jellemzésére illetve a fehérje feltekeredés köztitermékeinek kimutatására használnak. Az ANS-oldat koncentrációját spektrofotométeren, 350 nm-en az abszorbancia alapján határoztam meg ( $\epsilon_{350}$ : 4954 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>), 10 mM-os ANS törzsolddal dolgoztam. A fluorofórt 380 nm-en gerjesztettem, a fluoreszcencia emissziót 400-600 nm között detektáltam. A gerjesztési és emissziós résszélesség 2 nm volt. A mérés során az ANS koncentrációja 50 μM, a vizsgált fehérje koncentrációja 5 μM volt. A frissen feloldott fémionok (Zn<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Al<sup>3+</sup>) koncentrációja 20 μM illetve 200 μM volt annak megfelelően, hogy mekkora fémion koncentrációnál detektáltam a maximális spektrális változást.

##### 4.5.2.3. Fluoreszcencia rezonancia energia transzfer (FRET)

Az ANS fluorofór emisszióját a fehérje egyetlen Trp-ján keresztül ( $\lambda_{exc}$ : 290 nm) energiatranszfer segítségével a szerkezetvizsgálatban használtam. A mérést 50 μM ANS jelen- és távollétében végeztem. A TPPP/p25 koncentrációja 2 μM volt. Az emissziós spektrumot 300 nm és 560 nm között detektáltam. A gerjesztési és emissziós résszélesség 2 nm volt.

### 4.5.3. NMR spektroszkópia

Az NMR méréseket és a spektrumok asszignációját Bodor Andrea végezte az ELTE TTK Kémia Intézet NMR laboratóriumában. Az NMR mérésekhez  $^{15}\text{N}$ -, illetve  $^{13}\text{C}$ - $^{15}\text{N}$ - jelölt TPPP/p25 mintákat használtunk. Az izotópjelöléshez a TPPP/p25-öt expresszálo *E.coli* BL21 (DE3) sejteket M9 minimál táptalajon növesztettük (ld. 4.2.3.), majd az izolált fehérjét egy éjszakán át 50 mM Tris (pH 7,2) pufferben dializáltuk. A fehérje koncentrációja 400-440  $\mu\text{M}$  volt,  $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$  9:1 oldószer elegyben 1 mM  $\text{NaN}_3$  és pH 6,8 mellett. A GTP-kötés tanulmányozásánál a GTP koncentrációja 1500  $\mu\text{M}$ , a  $\text{Zn}^{2+}$ -kötés vizsgálatánál a  $\text{Zn}^{2+}$  440  $\mu\text{M}$  és 880  $\mu\text{M}$  volt.  $^{13}\text{C}$ - $^{15}\text{N}$ - jelölt minták esetében a gerinc atomok asszignációját triplarezonancia módszerekkel, HNCA és (H)CC(CO)NH kísérletekből nyertük, kiegészítve a  $^{15}\text{N}$ - jelölt mintákon mért 3D HSQC-TOCSY és HSQC-NOESY mérésekkel. A GTP-kötődés vizsgálatához a HSQC méréseket Bruker DRX500-MHz készüléken vettük fel, az asszignációs mérések 750 és 950 MHz NMR spektrométerrel történtek 300 K-en. A spektrumok feldolgozása az NMRPipe/nmrDraw programcsomaggal, a jelhozzárendelés a Sparky és a CARA programokkal történt.

### 4.5.4. Analitikai gélszűrés

A gélszűrés a molekulák méret és alak szerinti szeparálására alkalmas módszer. Az analitikai gélszűrést Superose 12 10/300 GL oszlopon (Tricorn<sup>TM</sup>, GE Healthcare) ÄKTA FPLC rendszerrel (GE Healthcare) végeztem. A TPPP/p25 látszólagos molekulatömegének meghatározásához kalibrációs egyenest vettem fel. Az oszlopkalibrációhoz a következő, gyártó által javasolt globuláris fehérjéket alkalmaztam (Stokes-sugár ( $R_s$ , Å) / molekulatömeg ( $M_w$ , kDa): citokróm c (17,4 Å/12,5 kDa), kimotripszinogén A (20,9 Å/25,0 kDa), szénsav-anhidráz (24,4 Å/29 kDa), ovalbumin (30,5 Å/43 kDa), albumin (35,5 Å/66 kDa) és aldoláz (48,1 Å/158,0 kDa). Az oszlopot szobahőmérsékleten a mérési pufferrel egyensúlyba hoztam (a puffert előzetesen 0,45  $\mu\text{m}$ -es membránon (Millipore) átszűrtem, majd légtelenítettem). Injektálás előtt a mintákat egy órán át szobahőmérsékleten inkubáltam. A gélszűrés 0,5 ml/perc áramlási sebességgel, az eluálódott anyag abszorbanciájának detektálása 280 és 254 nm-en történt. A gélszűrés eredménye a vizsgált molekula elúciós térfogatát ( $V_e$ , ml) adta meg. Az oszlop saját paraméterei között szerepel a kizárási térfogat ( $V_0$ , ml) illetve a teljes oszloptérfogat ( $V_t$ , ml). A  $K_{av}$  térfogati megoszlási együtthatót (adott gél típus esetén a gél térfogat azon hányadát jelenti, amely a molekula számára hozzáférhető) a következő képlet alapján számítottam:

$$K_{av} = (V_e - V_0) / (V_t - V_0)$$

A kalibráló fehérjék  $K_{av}$  értékeit ábrázoltam a molekulatömegük tizes alapú logaritmusának függvényében, majd erre egyenest illeszttem. Az egyenes egyenletéből a monomer és a dimer TPPP/p25 látszólagos molekulatömegét meghatároztam. A Stokes-sugar meghatározásához a kalibráló fehérjék  $(-\log(K_{av}))^{1/2}$  értékeit ábrázoltam a Stokes-sugaruk ( $R_s$ ) függvényében. A monomer és a dimer TPPP/p25  $R_s$  értékét az egyenes egyenlete alapján az előzetesen meghatározott  $K_{av}$  értékből számítottam. Az elúciós diagram kiértékelését Microcal Origin 7.0 szoftverrel végeztem.

mérési puffer 1) 20 mM Tris, 150 mM NaCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, +/- 500 μM GTP (pH 7,2)

mérési puffer 2) keresztkötés PDM-del: 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 150 mM NaCl, (pH 7,4)

mérési puffer 3) keresztkötés bTGázsal: 50 mM 2-(N-morfolino)-etánszulfonsav (MES), 50 mM KCl, 100 mM NaCl, 1 mM etilén-diamin-tetraecetsav (EDTA), 1 mM DTE, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM β-merkaptoetanol

A monomer és a dimer TPPP/p25 elméleti molekulatömegét felhasználva (24,8 kDa és 49,6 kDa) az adott molekulatömegű globuláris fehérje elméleti Stokes-sugarát az alábbi egyenlet alapján határoztam meg (Uversky, 2002b):

$$\log(R_s^N) = - (0,204 \pm 0,023) + (0,357 \pm 0,005) * \log(Mw)$$

a képletben szereplő  $R_s^N$  az azonos molekulatömegű globuláris fehérje Stokes-sugarát mutatja meg natív (N) konformáció esetén.

#### 4.5.5. Keresztkötés

##### 4.5.5.1. Kémiai keresztkötés

Az N,N-(1,3-fenilén)dimalimid (PDM) homobifunkciós reagens a fehérje szulfhidril (-SH) csoportjaival reagál, a cisztein oldalláncokat kovalens kötéssel összekapcsolja. A keresztkötés PDM reagenssel történt 60 percig, 30 °C-on 10 mM EDTA tartalmú PBS pufferben. A minta összeállításánál a TPPP/p25 koncentrációja 200 μM, a PDM koncentrációja 400 μM volt. A reakció leállításához 50 mM DTE-t használtunk. A kontroll és a keresztkötött TPPP/p25 mintát redukáló (2 mM β-merkaptoetanol, 1 mM DTE) és nem redukáló körülmények között SDS-PAGE gélen analizáltuk, a gélét Coomassie Brilliant Blue R-250-el festettük meg.

PBS puffer: 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 120 mM NaCl, (pH 7,4)

#### 4.5.5.2. Keresztkötés bakteriális transzglutaminázzal (bTGáz)

A  $\text{Ca}^{2+}$ -független bTGáz Prof. Hegyi György (ELTE Biokémiai Tanszék) nagylelkű ajándéka volt; az enzim eredetileg az Ajimoto terméke (Ajimoto Co., Inc. Japan). A transzglutaminázok természetes reakciókban glutamil- és lizil oldalláncokat kovalensen kötnek össze és ún.  $\epsilon$ -( $\gamma$ -glutamil)lizin izopeptidkötést (inter- vagy intramolekuláris) alakítanak ki a célfehérjé(k)ben, ami ellenálló a proteolitikus hasításokkal szemben. Stabil, keresztkötött TPPP/p25 méretkizárásos kromatográfiás és tubulinpolimerizációs vizsgálatához a keresztkötést tömény, 400  $\mu\text{M}$ -os TPPP/p25-tel és 14  $\mu\text{M}$ -os bTGáz-zal végeztem. A reakciót 20 mM Tris, 150 mM NaCl (pH 7,4) pufferben végeztem, a mintát 37°C-on, 60 percig inkubáltam. A bTGáz enzimet 2mM  $\beta$ -merkaptotetanollal blokkoltam.

#### 4.6. ITC mérés

A VP-ITC (MicroCal Piscataway, NJ) méréseket Szigeti Krisztián útmutatásaival a Semmelweis Egyetem Biofizikai Intézetében végeztem. A kísérletek során a TPPP/p25 és a ligandumok kölcsönhatásokor keletkező hőváltozást detektáltuk. A kötődési izoterma alapján az adott kölcsönhatásra jellemző paramétereket egy kiértékelő szoftver segítségével határoztuk meg (a GTP-kötés vizsgálatánál saját modellt állítottunk fel). Az ITC mérést megelőzően a mintát egy éjszakán át dializáltam a mérési pufferben, majd 1 órán át 25°C-on termosztáltam és légtelenítettem. A felhasznált oldatok pH-ját a mérés előtt ellenőriztem és a mérési puffer pH értékére állítottam, a méréseket 25°C-on végeztem. Kötődésvizsgálatoknál a mintacellába (1,42 ml) a fehérjeoldat, a referenciacellába a ligandum tömény oldata került (direkt titrálási mód). A TPPP/p25 és a GTP kölcsönhatás vizsgálatánál a TPPP/p25 32  $\mu\text{M}$ -os, a MgGTP 3,7 mM-os volt. A fém-kötés ( $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ) vizsgálatánál a TPPP/p25 15  $\mu\text{M}$ -os, a  $\text{Zn}^{2+}$  és a  $\text{Ca}^{2+}$  2 mM-os volt. A hőmérséklet kiegyenlítődése után a TPPP/p25-öt változó térfogatú (3  $\mu\text{l}$ -15  $\mu\text{l}$ ) ligandummal titráltam, az injektlások 180 másodpercenként követték egymást. A kontroll mérés során i) a referenciacella csak puffer oldatot tartalmazott ii) a mérőcella csak puffer oldatot tartalmazott iii) a mérőcella és a referenciacella puffert tartalmazott, hogy a keveredés és a hígulás által leadott hőt is figyelembe vegyük. A dimer TPPP/p25 disszociációjának vizsgálatakor a mintacella tartalmazta az 1-es mérési puffert és lépésenként 10  $\mu\text{l}$  500  $\mu\text{M}$ -os TPPP/p25-öt injektáltunk hozzá a referenciacellából. Az adatokat a MicroCal Origin 7.0 programmal értékeltük ki.

mérési puffer 1) kölcsönhatás MgGTP-vel; dimer disszociáció vizsgálata: 20 mM Tris (pH 7,4)

mérési puffer 2) kölcsönhatás  $\text{Zn}^{2+}$ -kel,  $\text{Ca}^{2+}$ -mal: 40 mM Tris (pH 7.6)



#### 4.7. Enzimhez kötött ellenanyag-vizsgálat (ELISA)

Az ELISA módszer lehetővé teszi fehérje-fehérje kölcsönhatások kvantitatív jellemzését. Szelektivitása és érzékenysége egy specifikus immunológiai kölcsönhatáson alapul. A kísérletben a 96 lyukú ELISA lemezt (Greiner Bio-one) PBS pufferben hígított tubulin oldattal (5 µg/ml) borítottuk (100 µl/lyuk). Egy éjszakán át, 4°C-on történő inkubáció után a lemezt háromszor átmostuk 0,05% Tween-20 tartalmú PBS pufferrel, ezt követően blokkoltuk 1 mg/ml szarvasmarha szérum albumin (BSA) tartalmú PBS pufferrel, majd mosás után TPPP/p25 felező hígítási sort mértünk rá. Egyes mintáknál jelen volt 100 µM Zn<sup>2+</sup> 500 µM EDTA mellett, vagy anélkül. A mintát egy órán keresztül inkubáltuk szobahőmérsékleten, majd a nem kötődött fehérjéket PBS pufferrel lemostuk. Az immunizálás TPPP/p25 ellen termeltetett anti-TPPP/p25 IgG-vel (1:5000 hígítás, 1 óra inkubáció, T<sub>szoba</sub>, 1 mg/ml BSA tartalmú PBS puffer, 100 µl/lyuk) (Kovacs et al., 2004) történt, majd a mosást követően peroxidázzal jelzett anti-patkány IgG (Sigma A9037, 1:5000 hígítás, 1 óra inkubáció, T<sub>szoba</sub>, 1 mg/ml BSA tartalmú PBS puffer) oldatot vittünk a lemezre. Mosás után az előhíváshoz 3,7 mM orto-fenilén-diamint és 0,03% hidrogén-peroxidot tartalmazó oldatot használtunk (20 perc inkubáció). A reakciót 10 perc után 1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-el leállítottuk. Az abszorbancia értéket 490 nm-en spektrofotométerrel olvastuk le (Perkin Elmer Wallac Victor 2, 1420 Microplate Reader). Az adatokat Origin 6.0 program segítségével értékeltük ki. A látszólagos K<sub>d</sub> érték meghatározásához a kísérleti pontokra hiperbolát illesztettünk, a hiperbola egyenlete:

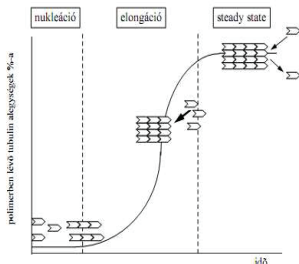
$$y = p_1 x / (p_2 + x)$$

ahol y: a jelintenzitás (A<sub>490</sub>); p<sub>1</sub>: a maximális jelintenzitás, p<sub>2</sub>: a látszólagos disszociációs állandó; x: a TPPP/p25 koncentráció.

#### 4.8. Turbiditásmérés, a tubulinpolimerizáció vizsgálata

A tubulin polimerizációját 350 nm-en turbiditásméréssel követtem. A módszer fényszóródás mérésen alapul. Az oldatban lévő anyagok abszorpciója 350 nm-en elhanyagolható, viszont a mikrotubulusokon és a polimereken szóródik a fény, így az abszorpcióváltozás arányos a keletkezett mikrotubulusok mennyiségével. A mérés 37°C-on, polimerizáló pufferben, 20 µM taxol jelen- és távollétében történt, Cary 100 UV/Vis (Varian) spektrofotométeren. A TPPP/p25 koncentrációja 1,75-6 µM, a TPPP3/p20 6 µM, tubulin koncentrációja 7-10 µM volt. A frissen feloldott fémionok (Zn<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>) koncentrációja 100 µM volt. Bizonyos esetekben a TPPP/p25-öt először 500 µM GTP-vel illetve GDP-vel inkubáltam, majd ezt követően adtam hozzá a tubulint. A polimerizációt 6 percen keresztül követtem.

*polimerizáló puffer: 50 mM MES, 100 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM etilén glikol-bisz(β-aminoetil éter)-N,N,N',N'-tetraecetsav (EGTA), 1 mM DTE (pH 6,6)*



**12. ábra A tubulinpolimerizáció sematikus ábrája.** A tisztított tubulin oldat 37°C-on GTP és Mg<sup>2+</sup> jelenlétében mikrotubulussá polimerizálható. A polimerizáció folyamata három szakasszal jellemezhető: kezdeti lag-fázis, gyors polimerizáció és stacionárius szakasz. A tubulin alegységekből létrejövő mikrotubulusok képződése (**nukleáció**) nagyon lassú folyamat, a meghosszabbodáshoz (**elongáció**) képest, amikor a meglévő mikrotubulusra újabb tubulin alegységek épülnek be. A tubulin koncentráció csökkenésével a folyamat lelassul, majd a polimerizáció egyensúlyba kerül a depolimerizációval (**steady state**).

#### 4.9. Immobilizált γ-aminohexil-GTP-szefaróz affinitásoszlop

Az affinitásoszlop agaróz gyantaszemcséihez egy összekötő szakaszon (6-aminohexil) keresztül kapcsolódik a GTP. Ez a módszer a gyantához immobilizált GTP segítségével lehetővé teszi GTP-kötő fehérjék azonosítását. A humán TPPP/p25-öt egy éjszakán át dializáltam mosó pufferben, majd centrifugálás (20 perc, 4°C, 100000 g) után a 200 µl-es affinitásoszlopra (Jena Bioscience, JBS-AC-117SC-R200) vittem, melyet mosó pufferrel hoztam egyensúlyba. A kísérletet hidegszobában, 4°C-on végeztem. Az oszlopra 100 µg TPPP/p25-öt vittem fel, az átesett frakciót gyűjtöttem, a mosást három lépésben mosó pufferrel végeztem. Az elúció 17,4 mM-os GTP oldattal történt. A felvitt, átesett, mosott, eluált frakciókat gyűjtöttem és redukáló mintafestékkel (2 mM β-merkaptotanol, 1 mM DTE) 13,5 %-os SDS géltre vittem, a gélt Coomassie Brilliant Blue R-250-el festettem meg.

*mosó puffer: 20 mM Tris, 25 mM NaCl (pH 7,0)*

#### 4.10. Nukleotidkoncentráció meghatározása

A nukleotidkoncentráció meghatározása Varian Cary 100 UV/Vis spektrofotométeren történt. A koncentráció számításhoz felhasznált moláris extinkciós koefficiens értékek:

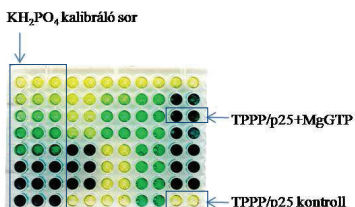
$$GTP, GDP: \epsilon_{253} = 13700 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

$$ATP: \epsilon_{259} = 15400 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

#### 4.11. Enzimaktivitás mérés

##### 4.11.1. Aktivitásmérés malachitzöld reagenssel

Az inorganikus foszfát (Pi) tartalom meghatározására egy kvantitatív analitikai színreakción alapuló módszert alkalmaztunk. A módszer elve, hogy a fehérje által enzimatikusan felszabadított Pi komplexet képez az ammónium-molibdát-tetrahidrát reagenssel, illetve a jelen lévő malachitzölddel. A színreakció detektálása 660 nm-en történt (Perkin Elmer Wallac Victor 2, 1420 Microplate Reader). A kísérlethez 96 lyukú ELISA lemezt (Greiner Bio-one) használtunk. A módszer nagyon érzékeny, nanomol mennyiségben felszabadított Pi meghatározására nyílik lehetőség. A reakció szobahőmérsékleten történt 120 percig. A felszabadított Pi mennyiségét mintavételezéssel követtük, a reakciót az egyes időpillanatokban malachitzöld reagenssel állítottuk le (25 µl minta plusz 100 µl reagens) (13. ábra). A reakcióelegy frissen izolált 80 µM TPPP/p25-öt, 1500 µM nukleotidot (GTP, GDP vagy ATP) tartalmazott a mérési pufferben. A  $Zn^{2+}$  hatásának tanulmányozásánál a fémion koncentráció 150 µM-os volt. A kontroll minták csak szabad fehérjét, illetve szabad nukleotidot tartalmaztak. A reagens összetétele Chan nyomán: 5,72 m/v % ammónium-molibdát-tetrahidrát 6 N HCl-ben oldva, 2,32 m/v % polivinil-alkohol, 0,0812 m/v %



13. ábra Enzimaktivitás mérés malachitzöld reagenssel.

malachitzöld és kétszer desztillált víz, 1:1:2:2 térfogatarányban (Chan et al., 1986). A párhuzamos minták átlagolt abszorbanciaértékéből (kontroll mintákat korrekcióba véve) a Pi kalibráló sor segítségével meghatároztuk a fehérje által felszabadított Pi mennyiséget. KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-et használtunk a standard kalibrációs sor meghatározásához.

*mérési puffer: 20 mM Tris, 5 mM MgCl<sub>2</sub> (pH 7,4)*

*A mérési puffer egyes kísérletekben 100 mM NaCl-ot is tartalmazott, illetve a MgCl<sub>2</sub>-ot azonos koncentrációjú MnCl<sub>2</sub>-dal helyettesítettük.*

##### 4.11.2. Aktivitásmérés <sup>31</sup>P-NMR spektroszkópiával

A <sup>31</sup>P NMR aktív atommag, természetes előfordulása közel 100%. A kémiai eltolódás értéke (δ (ppm)) igen érzékeny a környezetében történő változásokra (pl. pH, koordináció). <sup>31</sup>P-NMR méréssel lehetőségünk nyílt a nukleotid hidrolízis vizsgálatára és a Pi képződésének

nyomon követésére (Spoerner et al., 2004). A méréseket Bodor Andrea végezte az ELTE NMR laboratóriumában. A GTP három foszfor atomjának karakterisztikus kémiai eltolódás értéke:  $\alpha$  (-9,52 ppm dublet),  $\beta$  (-18,04 ppm triplet) és  $\gamma$  (-4,4 ppm dublet), ami a MgGTP-re szintén jellemző érték. A frissen izolált TPPP/p25 (200  $\mu$ M) és GTP (1000-1360  $\mu$ M) reakcióját 101,25 MHz-en, Bruker Avance 250 MHz készüléken követtük 300 K-en, 3-4 mM MgCl<sub>2</sub> tartalmú 50 mM Tris (pH 7,0) pufferben. A nukleotid hidrolízist a MgGTP-t tartalmazó pufferhez hozzáadott TPPP/p25 indította el. A Zn<sup>2+</sup> hatásának tanulmányozásánál a fémion koncentráció 400  $\mu$ M-os volt. A kontroll méréseknél a minta csak MgGTP-t tartalmazott. A Pi jel (3,08 ppm szinglet) intenzitásának növekedését négy órán keresztül követtük. Az időben változó foszfát jelek csúcs alatti területeinek integrálásával meghatároztuk a keletkezett foszfát koncentrációját. Az NMR spektrum analízise a TopSpin programmal történt.

#### 4.12. A TPPP/p25-GTP többszörös egyensúlyi rendszer modellezése

A számítások kivitelezéséhez a Mathematica for Students (4.1.1.0 verzió) szoftver csomagot használtuk (Wolfram Research, <http://www.wolfram.com>).

#### 4.13. Kölcsönható partnerek azonosítása

##### 4.13.1. Citoszolikus marhaagy-extraktum előállítása

A szarvasmarha agyszövetet kísérlettől függő feltáró pufferben homogenizáltam. A feltáró puffer-marhaagy arány 2:1 volt. A homogenizátumot (20 perc, 4°C, 30000g) centrifugáltam, majd az így kapott felülúszót ismét centrifugáltam (30 perc, 4°C, 100000g). Közéltőleg 3-4 ml 25 mg/ml koncentrációjú fehérjeoldatot használtam, mint citoszolikus sejtextraktumot. Bizonyos esetekben ebből eltávolítottam a mikrotubulusokat a következő módon: az 1-es feltáró pufferrel feltárt extraktumhoz 1 mM GTP-t és 20  $\mu$ M taxolt adtam, az elegyet 30 percig inkubáltam 37°C-on, majd a mintát centrifugáltam (30 perc, 37°C, 100000g). A mikrotubulusok és a hozzá szorosan kötődő fehérjék egy része a csapadékba került, a felülúszóval dolgoztam tovább. Az oszlopra felvitt citoszolikus sejtextraktum 2 mM GTP-t, illetve 2 mM GDP-t tartalmazott azoknál a kísérleteknél, ahol a GTP illetve GDP hatását tanulmányoztam.

feltáró puffer 1) 50 mM PEM puffer: 50 mM PIPES, 1 mM EGTA, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mg/ml leupeptin, 1 mg/ml pepsztatin, 1 mM benzamidin (pH 6,6)

feltáró puffer 2) 50 mM NaAc, 5 mM EDTA, 150 mM NaCl, 1 mg/ml leupeptin, 1 mg/ml pepsztatin, 1 mM benzamidin (pH 7,4)

#### 4.13.2. TPPP/p25 affinitáskromatográfia

A TPPP/p25-öt brómcíánnal (CNBr) aktivált szefaróz 4B gyantához kötöttem, a gyártó cég (Amersham) előírásai szerint. Az oszlop kötési kapacitása kb. 3 mg fehérje volt 1 ml szefaróz gyantára számolva. A gyantát 1 mM-os HCl-ban duzzasztottam, ezt követően előbb HCl-dal, majd kötő pufferrel mostam. Az így aktivált gyantához kötő pufferben oldott TPPP/p25-öt adtam, majd 4°C-on éjszakán át rázattam. Koncentrációméréssel ellenőriztem, hogy a fehérje, több mint 90%-a kötődött a gyantához. Az üresen maradt aktív helyeket 0,1 M-os Tris pufferrel (pH 8), 4°C-on 2 órán át blokkoltam. A TPPP/p25 affinitásoszlopot ekvilibráló pufferrel egyensúlyba hoztam. Minden esetben 2-3 ml, közelítőleg 25 mg/ml koncentrációjú agyextraktumot vittem az oszlopra, mely kb. 1 ml gyantát tartalmazott. Citoszolikus sejtextraktumot (a mikrotubuláris fehérjékkel együtt, vagy azok nélkül) vittem az oszlopra, majd a nem kötődött fehérjék eltávolítása érdekében az oszlopot ekvilibráló pufferrel mostam. A TPPP/p25-höz kötött fehérjéket először 500 mM NaCl-ot tartalmazó elúciós pufferrel eluáltam (E1), ezt követően a második elúciós lépéshez (E2) 100 mM, pH 3,0-as glicin oldatot használtam. Az eluált fehérjék összmenyisége kísérletenként 500-800 µg volt. Az oszlopról eluált fehérjéket YM-10 membránnal Amicon (Millipore) cellában töményítettem, 50 mM NH<sub>4</sub>Ac-ban dializáltam, majd liofilizáltam. Az oszlopot pedig mosó pufferrel mostam (1-es, 2-es puffer: 3-szor 5 ml). Az egyes frakciókat 13,5 %-os SDS géltre vittem, ezt követően a gélcsíkok analízise MS-sel történt. Az ún. „vak” próba során TPPP/p25-mentes oszlopot készítettem. Ebben a kísérletben a citoszolikus agyextraktum teljes mértékben átesett az oszlopon, gyantához kötődött fehérjét ilyen körülmények között nem detektáltam.

*kötő puffer: 100 mM NaAc, 500 mM NaCl (pH 6,0)*

*mosó puffer 1) 100 mM NaAc, 500 mM NaCl (pH 4,0)*

*mosó puffer 2) 100 mM Tris, 500 mM NaCl (pH 8,0)*

*ekvilibráló puffer: 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 10 mM NaCl (pH 7,4)*

*elúciós puffer 1) 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 500 mM NaCl (pH 7,4)*

*elúciós puffer 2) 100 mM glicin (pH 3,0)*

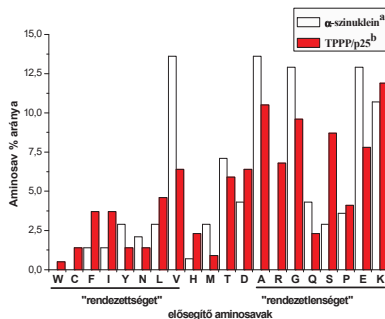
## 5. Eredmények és értékelésük

### 5.1. Szerkezetvizsgálat: *in silico* analízis és kísérletes vizsgálatok

#### 5.1.1. A rendezetlenség *in silico* predikciója

A szarvasmarha agyból izolált TPPP/p25-tel kapcsolatos első publikációbán csoportunk megmutatta, hogy a fehérje CD spektrumából számított  $\alpha$ -hélix tartalom 4% körüli, szemben az aminosav-sorrend alapján jóslt adatokkal, ami átlagosan 35%-nak bizonyult (Hlavanda et al., 2002). Azóta számos, kifejezetten a rendezetlen fehérjék szerkezetjölására szolgáló módszert dolgoztak ki, melyek a másodlagos szerkezeti elemeket jósló programok megbízhatósági szintjén mozognak.

Vizsgálataim első lépéseként a fehérje aminosav-összetételét tanulmányoztam a ProtParam program segítségével (<http://www.expasy.org/tools/protparam.html>). A TPPP/p25 ismert kölcsönható partnerét, a szintén rendezetlen  $\alpha$ -szinukleint választottam, hogy a fehérjék aminosav-szekvenciájából származtatható adatokat összehasonlítsam (14. ábra).



**14. ábra** Az aminosav-összetétel vizsgálata. Az ábrán az  $\alpha$ -szinukleint és a TPPP/p25-öt felépítő aminosavak %-os aránya van feltüntetve, az adatokat a ProtParam program segítségével számítottam. Az adatok forrása: <http://us.expasy.org/sprot>, Swiss-Prot szekvenciaadatbázis.

<sup>a</sup> $\alpha$ -szinuklein szekvenciához rendelt azonosító kód: P37840 (SYUA\_HUMAN)

<sup>b</sup>TPPP/p25 szekvenciához rendelt azonosító kód: O94811 (TPPP\_HUMAN)

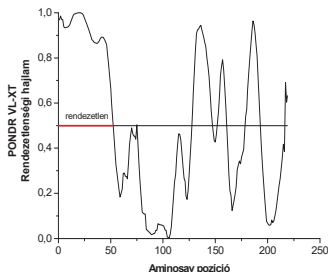
Az  $\alpha$ -szinuklein gazdag negatívan töltött aminosavakban (Murray et al., 2003), ellentétben a TPPP/p25-tel, ami erősen bázikus fehérje (pI 9,9). Az  $\alpha$ -szinukleinben egyáltalán nem található Trp és Cys, továbbá magas százalékban van jelen Glu (12,9%). A 14. ábra mutatja, hogy a TPPP/p25 az  $\alpha$ -szinukleinhez hasonlóan gazdag a „rendezetlenséget” elősegítő aminosavakban, míg a „rendezettséget” elősegítő aminosavaknak alacsony az előfordulási aránya. A TPPP/p25 szekvenciájában a töltött aminosavak (pl. Lys, Arg, Glu)

gyakoriságából illetve az apoláros aminosavak (pl. Ile, Leu, Trp) alacsony előfordulásából következtethetünk a fehérje rendezetlenségére.

Számos, a szerkezeti rendezetlenség jóslására szolgáló program ismeretes, amelyek részben, vagy teljes mértékben az aminosav-összetétel, az aminosavakhoz köthető tulajdonságokon alapulnak (pl.: töltés, hidrofóbicitás, az oldószer általi hozzáférhetőség). A TPPP/p25 teljes aminosav-szekvenciáját felhasználva rendezetlen régió-jóslást végeztem a PONDR, az IUPred és a FoldIndex predikciós algoritmussal.

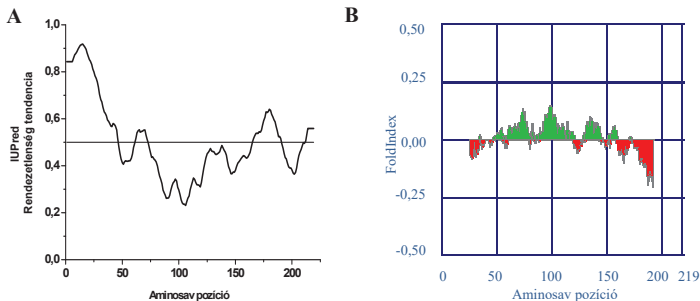
A PONDR<sup>®</sup> VL-XT programmal kapott eredményt mutatja be a 15. ábra. A módszer értelmében egy fehérjerégió akkor tekinthető rendezetlennek, ha legalább 40 aminosav hosszúságú folytonos szekvenciárszletet tartalmaz, melyet a 0,5 küszöbérték feletti PONDR érték határoz meg (Romero et al., 2001).

**15. ábra A PONDR<sup>®</sup> VL-XT programmal jóslott rendezetlenség a TPPP/p25 esetén.** Az algoritmus az N-terminális részen rendezetlenséget (1-52 as > 0,5) jósl, a középső régió rendezettebb, míg a C-terminális részen a jóslás bizonytalan.



A grafikon a program alapján rendezettnek illetve rendezetlennek jóslott szekvenciaszakaszokat szemlélteti. Az ordinátán feltüntetett érték 0 és 1 között változhat annak megfelelően, hogy mekkora annak a valószínűsége, hogy az adott (központi) aminosav egy rendezetlen aminosav-szakasz része. A TPPP/p25 N-terminális végén egy 52 aminosavból álló összefüggő, rendezetlen régiót találunk (PONDR érték ~1). A fehérje középső részét a predikciós algoritmus rendezettebbnek mutatja, közelítőleg 40 aminosavból álló szekvenciárszlet határozottan a küszöbérték alatt van (PONDR érték ~0). A C-terminális részen a rendezett/redezetlen szerkezetről nem vonhatunk le egyértelmű következtetést a rövidebb szakaszok váltakozása miatt. A program által a TPPP/p25-re jóslott összes rendezetlenség magas, 45,7%.

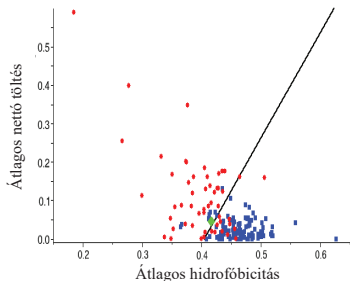
A szerkezetjólást az IUPred és a FoldIndex algoritmusokkal is elvégezve a 16. ábrán bemutatott eredményeket kaptam. Az IUPred párkölcsönhatásokon alapuló rendezetlenség jóslására szolgál, míg a FoldIndex az Uversky-plot továbbfejlesztett változata, ami egy adott szegmens töltés-hidrofóbicitás értéke alapján az IUPred-hez hasonlóan szekvenca-specifikus jólást ad. A két program alapján a TPPP/p25 első 40 aminosavas N-terminális része egyértelműen rendezetlennek bizonyult. A jólás a fehérje középső részét többnyire rendezettnak mutatta, míg a C-terminális rész C-terminális rész az IUPred alapján kisebb valószínűséggel tekinthető rendezetlennek, a FoldIndex alapján viszont egyértelműen.



**16. ábra A TPPP/p25 rendezetlenségének jólása az IUPred és a FoldIndex algoritmussal.** Az IUPred érték meghatározása egy 100 aminosavból álló ablak segítségével történik, a FoldIndex esetében az ablak 51 aminosavat tartalmaz. **(A)** IUPred rendezetlenségi tendencia. A 0,5 küszöbérték feletti értékek a rendezetlenségre utalnak. **(B)** FoldIndex érték. A program alapján jóslott rendezetlen (piros) illetve rendezett (zöld) régiók szemléltetése.

A TPPP/p25 aminosav-összetételéből származtatható paraméterek ábrázolását látjuk a 17. ábrán. A PONDR<sup>®</sup> szerveren végzett kiértékelés alapján a fehérje átlagos nettó töltése (R) és átlagos hidrofóbicitása (H) (0,0457; 0,416) alapján elhelyezhető az adatbázisban tárolt referencia fehérjék között, amit globuláris és rendezetlen fehérjék alkotnak. Mivel a rendezetlen fehérjék magas nettó töltésük és alacsony hidrofóbicitásuk (piros kör) alapján jól elkülöníthetők a globuláris fehérjéktől (kék négyzet), ezáltal a paraméterek grafikus megjelenítése információt nyújt a TPPP/p25 rendezetlenségéről. A módszer azt jósolja, hogy a TPPP/p25 a rendezetlen fehérjék közé sorolható (zöld rombusz).





**17. ábra** Nettó töltés ábrázolása a hidrofóbitás függvényében. Az ábra a PONDNR<sup>®</sup> predikációs programmal végzett kiértékelés eredménye a TPPP/p25 fehérjére ([www.pondr.com](http://www.pondr.com)). A PONDNR<sup>®</sup> a TPPP/p25 (zöld rombusz) paramétereit az adatbázisban található rendezetlen (piros kör) és globuláris (kék négyzet) fehérjékhez viszonyítja.

Az elsődleges szerkezetből nyerhető *in silico* információk alapján megállapítható, hogy a TPPP/p25 N-terminális szegmense rendezetlen, a fehérje középső része többnyire rendezettnak mutatkozott, azonban a C-terminális szegmensre vonatkozólag nem kapható egyértelmű válasz a jóslások alapján.

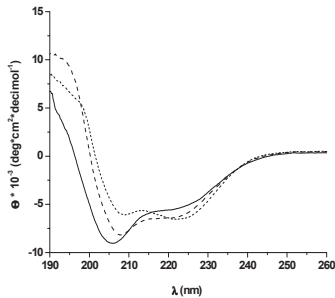
### 5.1.2. A fehérjeszerkezet kísérleti jellemzése

#### *A másodlagos szerkezet távoli-UV CD spektroszkópiás vizsgálata*

Csoportunk korai, kísérletes munkái valószínűsítették, hogy a TPPP/p25 nem rendelkezik jól meghatározott szerkezettel. A globuláris fehérjétől nagymértékben különbözik, így például nagyfokú proteolitikus érzékenységet mutat, hőstabil és a hőkezelés után is megőrzi tubulinpolimerizáló aktivitását (Orosz et al., 2004). Az IDP fehérjékre jellemző hőstabilitás speciális aminosav-összetételükkel magyarázható, szokatlanul magas hőmérsékleten sem aggregálódnak és számos IDP fehérje hőkezelés után biológiai aktivitást mutat (Uversky et al., 2000a). Ezek a jellemzők a TPPP/p25-re is igaznak bizonyultak.

A rekombináns technikával előállított humán TPPP/p25, TPPP3/p20 és TPPP2/p18 másodlagos szerkezetének jellemzésére a távoli UV tartományban megvizsgáltam az egyedi CD spektrumokat (18. ábra). A TPPP/p25 spektrumán 206-208 nm környékén a rendezetlen komponensre utaló intenzív negatív sáv figyelhető meg, amit 220 nm körül egy negatív váll kísér, reziduális másodlagos szerkezetet ( $\alpha$ -hélix,  $\beta$ -redő) jelezve. Vassilenko és Uversky a CD spektrumok alapján számos fehérjét megvizsgált és megállapították, hogy a moláris ellipticitás minimum értékei alapján ( $[\theta_{200}]$  vagy  $[\theta_{208}]$  és  $[\theta_{222}]$ ) a fehérje rendezettségére, rendezettségére következtethetünk (Uversky, 2002a; Vassilenko és Uversky, 2002). Megvizsgálva a TPPP/p25 CD spektrumát a negatív csúcs-pár a fehérje szerkezeti rendezettségére utal ( $[\theta_{208}] / [\theta_{222}] \sim 1,6$ ). A spektrumok intenzitása és jellege alapján megfigyelhető, hogy a TPPP3/p20 hasonló lefutású görbét mutat, de a TPPP/p25-höz képest

kevésbé rendezetlen ( $[\theta_{208}] / [\theta_{222}] \sim 1,3$ ), míg a TPPP2/p18 a rendezett szerkezetre jellemző spektrumot mutat ( $[\theta_{210}] / [\theta_{222}] \sim 0,9$ ). A CD-vel megfigyelt szerkezet jó egyezést mutat a PONDR jóslással, miszerint a TPPP3/p20-ra (26,7%) és a TPPP2/p18-ra (18,2%) jóslt összes rendezetlenség kisebb (ábra nélkül), mint a TPPP/p25 esetében (45,7%) (Vincze et al., 2006). Mivel a két rövidebb homológ szerkezete egymástól is különbözik, így az eltérő szerkezetet nem lehet csupán a TPPP/p25-ben meglévő N-terminális szegmens hiányával magyarázni. Figyelembe kell venni, hogy a TPPP fehérjék „közös” régiójában (ún. Pfam05517 domén, a TPPP/p25 55-219 as régiója) is vannak különbségek az aminosav-összetételben (Vincze et al., 2006).



18. ábra A homológ fehérjék normált távoli-UV CD spektruma. A TPPP/p25 (vastag), TPPP3/p20 (szaggatott) és a TPPP2/p18 (pontozott) CD spektruma.

#### *A TPPP fehérjék másodlagos szerkezetének analízise*

A homológ fehérjék másodlagos szerkezetének analízisét a DichroWeb szerveren található görbefelbontó programokkal végeztem el (<http://www.cryst.bbk.ac.uk/cdweb> (Whitmore és Wallace, 2004)). A mért spektrumok dekonvolúciójához a CONTINLL és a CDSSTR programokat használtam, amelyek ismert szerkezetű fehérjéket tartalmazó adatbázisok segítségével következtetnek az analizálni kívánt fehérje másodlagos szerkezeti elemeire. A távoli-UV CD spektrumok analízise során a másodlagos szerkezeti típusok százalékos megoszlására kapott értékeket mutatja a 4. táblázat.

Fehérje/program	$\alpha$ -hélix	$\beta$ -redő	$\beta$ -kanyar	rendezetlen
<b>TPPP/p25</b>				
Chen alapján	<b>10,3</b>			
CONTINLL	17,2	22,1	16,9	43,8
CDSSTR	17,0	23,0	17,0	42,0
<b>TPPP3/p20</b>				
Chen alapján	<b>13,2</b>			
CONTINLL	21,7	24,7	17,4	36,1
CDSSTR	21,0	26,0	18,0	34,0
<b>TPPP2/p18</b>				
Chen alapján	<b>13,9</b>			
CONTINLL	20,0	26,6	17,3	36,0
CDSSTR	18,0	25,0	17,0	40,0

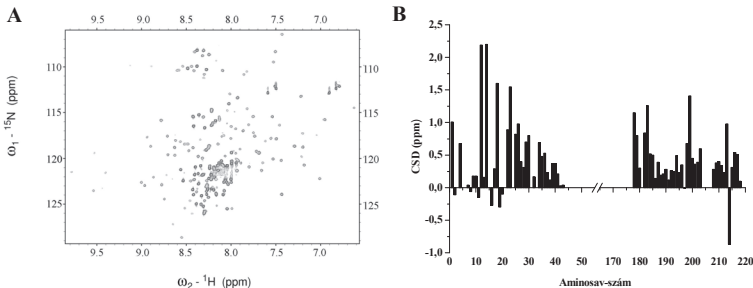
**4. táblázat A másodlagos szerkezeti elemek aránya a CONTINLL és a CDSSTR programok alapján** (<http://www.cryst.bbk.ac.uk/cdweb>). A referencia adatbázis (set 7) 43 ismert szerkezetű és 5 denaturált fehérjét tartalmazott. A pirossal jelölt számok a 222 nm-nél mért ellipticitás értékekből ( $\theta_{222}$ ) számított  $\alpha$ -hélix tartalmat mutatják a humán TPPP fehérjékre, a számítás Chen képlete alapján történt (Chen et al., 1972).

A spektrumok felbontása során megfigyelhető volt, hogy a fehérjékben magas a rendezetlen szerkezet aránya, ugyanakkor jelentős mennyiségű  $\beta$ -redőt és  $\alpha$ -hélixet jósol a program. A legnagyobb százalékban a TPPP/p25 tartalmazza a rendezetlen/random coil (átlagosan 43%) és a legkisebb százalékban az  $\alpha$ -hélix elemet (átlagosan 17,1%). Az  $\alpha$ -hélix tartalmat Chen képlete alapján is meghatároztam (Chen et al., 1972), amelyet a 222 nm-en mért ellipticitás értékből ( $\theta_{222}$ ) számítottam (ld. 4.5.1). A képlet alapján a TPPP/p25-nek a legalacsonyabb, 10%-körüli a számított  $\alpha$ -hélix tartalma. A dekonvolúció alapján nincs szembetűnő különbség a fehérjék szerkezeti összetételében, annak ellenére, hogy a mért egyedi CD spektrumok jelentősen különböznek, mint azt a moláris ellipticitás minimum értékeinek pozíciója illetve a minimumnál és a 222 nm-nél mért érték aránya is jelzi. A jósolt és a mért adatokban mutatkozó különbség magyarázata lehet, hogy az adatbázisban tárolt referencia fehérjék túlnyomórészt globuláris fehérjék, amelyek jól definiált harmadlagos szerkezettel rendelkeznek. Így az analízis során kapott adatok csupán durva közelítést adnak olyan fehérjékre, amelyek részben vagy egészben rendezetlenek.

### Multinuklárís NMR spektroszkópiás vizsgálatok

Mivel a rendezetlen fehérjék nem kristályosíthatóak, így a röntgenkrisztallográfia nem alkalmazható ezen fehérjék atomi szintű szerkezetvizsgálatában. Oldatfázisban történő NMR méréseket alkalmaztunk, hogy azonosítani tudjuk a TPPP/p25 rendezetlen régióit.

A Perczel csoporttal együttműködésben NMR méréseket végeztünk, melyhez egyszeresen ( $^{15}\text{N}$ ) és kétszeresen ( $^{13}\text{C}$ - $^{15}\text{N}$ ) jelölt TPPP/p25-öt állítottunk elő (ld. 4.2.3.). A 19. A ábra mutatja be a  $^{15}\text{N}$ -jelölt mintával kapott 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spektrumot. A HSQC spektrumon minden egyes jel a fehérje egy-egy amidcsoportjához rendelhető. A középső ún. „ujjlenyomat” régióban a jelek éles intenzitásúak és zsúfoltak. Gyenge amidjel diszperzió figyelhető meg, a jelek nagy része egy szűk tartományra koncentrálódik (7,9-8,5 ppm), amely tulajdonság a rendezetlen és mozgékony molekulatípusok jellemzője (Dyson és Wright, 2005; Sillen et al., 2007). A TPPP/p25 219 aminosavból épül fel; a 210 nem Pro aminosavból 185 aminosav jele detektálható csupán a spektrumban. Valószínű, hogy a fehérjeegerinc hiányzó amidcsoport jeleit a molekula mozgékonyasága és gyorsan változó szerkezete miatt nem lehetett megfigyelni. Az atomi szintű szerkezeti információhoz szükségünk volt az NMR jelek azonosítására, azaz *assignációra*. Kettős-jelzett,  $^{13}\text{C}$ - $^{15}\text{N}$ - mintával a 3D komplementer mérések (HNCA, (H)CC(CO)NH) segítségével a rendezetlen régió (éles jelek a 7,9-8,5 ppm tartományon belül) jelhozzárendelését sikerült megoldani. Azonban a fehérje középső flexibilis régióját (8,5-9,5 ppm illetve 6,5-7,9 ppm) a kis intenzitású csúcsok miatt nem lehetett azonosítani.



**19. ábra** A TPPP/p25 szerkezetének NMR spektroszkópiás jellemzése (950 MHz). (A)  $^{15}\text{N}$ -TPPPP/p25 (400  $\mu\text{M}$ )  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spektruma 300 K-en. A HSQC 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 kémiai eltolódás értékek olvashatóak le. (B)  $^{13}\text{C}$ - $^{15}\text{N}$ -TPPPP/p25 NMR vizsgálata: a mért és az irodalomban található random coil-ra vonatkozó  $\text{C}^\alpha$  kémiai eltolódás értékek különbsége (CSD) ppm-ben az assignált N- (1-43) és C-terminális (178-219) részen. A nem assignált középső régió a könnyebb átláthatóság miatt nincs feltüntetve az ábrán.

Az egyszerűen jelölt minta esetében a fehérje NMR jellegzetességeit vizsgáltuk, míg a duplán jelölt minta lehetővé tette a terminális régiók jelhozzárendelését. A fehérjegerinc kémiai eltolódás értékeinek meghatározásával lehetőségünk volt a másodlagos szerkezet vizsgálatára. Ezért az asszignált csúcsok ( $C^{\alpha}$ ) mért kémiai eltolódás értékeit az irodalomban leírt *random coil* eltolódás értékekkel vetettük össze, szekvenciális korrekciók figyelembe vételével. Ennek során azt tapasztaltuk, hogy a kémiai eltolódás értékek különbsége (*CSD*) átlagosan 0,5 ppm körüli érték (19. B ábra), amely a *random coil* értékhez közelít (Dyson és Wright, 2005). Az NMR mérés megerősíti, hogy a TPPP/p25 nem rendelkezik stabil térszerkezettel, a polipeptidlánc mozgékonyága miatt szerkezete dinamikusan változik. Ugyanakkor egyértelművé teszi, hogy a középső flexibilis régiót a 45 és 44 aminosavból álló rendezetlen N- és C-terminális szakasz határolja, melyek asszignációját sikerrel végeztük el.

## 5.2. Fémionok kötődése és a fémkötés hatása

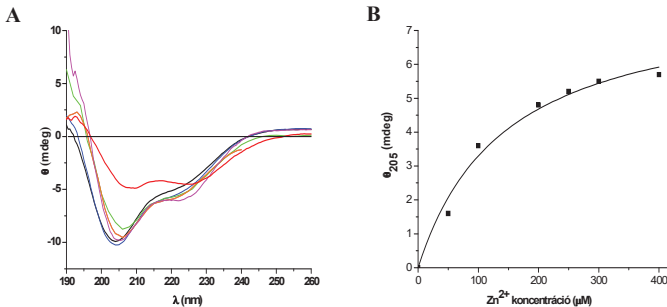
A TPPP/p25 szekvenciavizsgálata azt mutatta, hogy a fehérje középső flexibilis régiójában egy His<sub>2</sub>Cys<sub>2</sub>-típusú cink-ujj motívum található: His<sup>61</sup>(X)<sub>10</sub>His<sup>72</sup>(X)<sub>7</sub>Cys<sup>80</sup>(X)<sub>2</sub>Cys<sup>83</sup>. A cink-kötő motívum funkcionális jelentőségére utal, hogy a különböző fajokban kifejeződő TPPP/p25 fehérjék többszörös szekvenciaillesztése alapján a His<sub>2</sub>Cys<sub>2</sub> motívum aminosav-összetétele magas fokú konzerváltságot mutatott (ld. Függelék, 9. táblázat). A humán TPPP/p25-tel homológ fehérjékben a teljes His<sub>2</sub>Cys<sub>2</sub> motívum nem található meg, a TPPP3/p20 és TPPP2/p18 fehérjék szekvenciájából a konzervált His-ek és Cys-ek közül egy illetve két His hiányzik (20. ábra).



20. ábra A His<sub>2</sub>Cys<sub>2</sub> (61-83 as, kék régió) Zn<sup>2+</sup>-kötő motívum a TPPP/p25 fehérjében. Sötétszürke színnel a középső flexibilis régió, világosszürke színnel az N- és C-terminális rendezetlen régió látható. A TPPP3/p20 szekvenciáján belül His<sub>1</sub>Cys<sub>2</sub>, a TPPP2/p18-ban csak a Cys<sub>2</sub> elem található meg.

### 5.2.1. Fémionok hatása a TPPP fehérjék szerkezetére

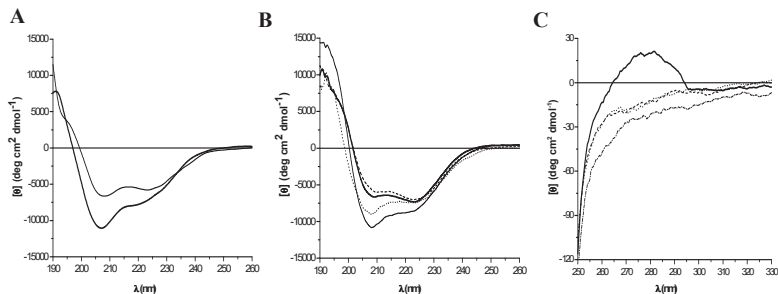
Vizsgálataimhoz alapul szolgált néhány ELISA kísérleti adat, amelyek azt mutatták, hogy a tubulin és a TPPP/p25 kölcsönhatását egyes bivalens fémionok ( $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ) befolyásolják, amely hatás a kelátképző EDTA jelenlétében megszűnt (ábra nélkül). A kétértékű fémionok közül a  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  és a  $\text{Zn}^{2+}$  (200  $\mu\text{M}$ ) hatását távoli-UV CD spektroszkópiával vizsgálva azt tapasztaltam, hogy egyedül a  $\text{Zn}^{2+}$  bizonyult hatásosnak; a bivalens kation a rendezetlen fehérje szerkezetében konformációváltozást indukált (21. A ábra). A rendezetlen régióra jellemző negatív csúcs lecsökkent ( $\sim 205$  nm), a negatív csúcs-pár arány a másodlagos szerkezeti elemek megjelenésére jellemző módon megváltozott ( $\theta_{205}/\theta_{222} \sim 1,1$ ).



**21. ábra** Kétértékű fémionok hatása a TPPP/p25 konformációjára. **(A)** A TPPP/p25 (4  $\mu\text{M}$ ) egyedi spektruma (fekete). Komplex spektrumok 200  $\mu\text{M}$  fémion koncentráció mellett:  $\text{Cu}^{2+}$  (kék),  $\text{Ni}^{2+}$  (lila),  $\text{Mn}^{2+}$  (sárga),  $\text{Mg}^{2+}$  (zöld) és  $\text{Zn}^{2+}$  (piros) jelenlétében. **(B)** A TPPP/p25- $\text{Zn}^{2+}$  komplex spektrum 205 nm-en detektált koncentrációfüggő változása a TPPP/p25 egyedi spektrumához képest. Hiperbola illesztés a  $\text{Zn}^{2+}$  hatására bekövetkező spektrális változások alapján. A hiperbola egyenlete:  $y = p_1x / (p_2 + x)$ , ahol  $y$ = spektrális változás;  $x$ = ligandum koncentráció [ $\text{Zn}^{2+}$ ];  $P_1$ = maximális spektrális változás;  $P_2$ =  $\text{EC}_{50}$ .

A 205 nm-nél megfigyelhető koncentrációfüggő spektrális változást - amelyet a differenciaspektrumok alapján számítottam - mutatja be a 21. B ábra. A görbe hiperbola illesztésével megbecsültük az  $\text{EC}_{50}$  értéket ( $\sim 144 \pm 32$   $\mu\text{M}$ ). A  $\text{Zn}^{2+}$  szerkezetalkító hatását tanulmányozva csoportunk kísérletei azt mutatták, hogy magas  $\text{Mg}^{2+}$  koncentráció mellett (800  $\mu\text{M}$ ) a  $\text{Zn}^{2+}$ -indukált szerkezetváltozás nem tud bekövetkezni (ábra nélkül). Valószínű, hogy a nagy feleslegben alkalmazott  $\text{Mg}^{2+}$  kiszorítja a TPPP/p25-höz koordinálódott  $\text{Zn}^{2+}$ -et, míg a  $\text{Mg}^{2+}$  kötődése önmagában nem okoz spektrális változást.

A  $\text{Zn}^{2+}$  kötődésének hatását a TPPP/p25-tel homológ fehérjék esetében is megvizsgáltam CD spektroszkópiával (22. ábra). Míg a távoli-UV spektrum a másodlagos szerkezetéről, a közeli-UV spektrum a harmadlagos szerkezetéről nyújt felvilágosítást. A közeli-UV tartományban az aromás aminosavrészek különböző hullámhossz-profillal jellemezhetőek: a Phe 250-270 nm-en, a Tyr 270-290 nm-en, míg a Trp 280-300 nm-en jelzi az aromás aminosav környezetében bekövetkező változásokat. Az intenzív és összetett (számos pozitív csúc) közeli-UV CD spektrum a stabil térszerkezet indikátora az aromás aminosavak aszimmetriás környezetének és a szerkezetstabilizáló diszulfid hidak hozzájárulásának következtében.



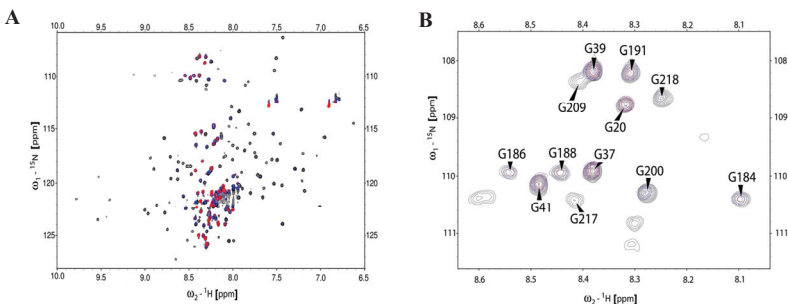
**22. ábra** A  $\text{Zn}^{2+}$  hatásának tanulmányozása távoli- és közeli-UV CD spektroszkópiával. **(A)** TPPP/p25 normált távoli-UV CD spektruma (vastag)  $200 \mu\text{M}$   $\text{Zn}^{2+}$  jelenlétében (vékony). **(B)** Normált távoli-UV CD spektrumok: TPPP2/p18 (vastag)  $200 \mu\text{M}$   $\text{Zn}^{2+}$  jelenlétében (szaggatott) és TPPP3/p20 (vékony)  $200 \mu\text{M}$   $\text{Zn}^{2+}$  mellett (pontozott). **(C)** Közeli-UV CD spektrumok. TPPP/p25 (vastag) különböző  $\text{Zn}^{2+}$  koncentrációk mellett:  $50 \mu\text{M}$   $\text{Zn}^{2+}$  (szaggatott),  $100 \mu\text{M}$   $\text{Zn}^{2+}$  (pontozott) és  $200 \mu\text{M}$   $\text{Zn}^{2+}$  (szaggatott-pontozott). A fehérje koncentráció  $4 \mu\text{M}$  (távoli-UV) és  $20 \mu\text{M}$  (közeli-UV) volt.

Arra a kérdésre kerestem a választ, hogy mennyire specifikus a  $\text{Zn}^{2+}$  kötődése a TPPP/p25-höz, illetve a  $\text{Zn}^{2+}$  indukált szerkezetváltozás. A vizsgálathoz a két homológ fehérjét is titráltam  $\text{Zn}^{2+}$ -kel és azt tapasztaltam, hogy a TPPP3/p20 és TPPP2/p18 esetében a komplex spektrumok csak gyengén módosulnak az egyedi spektrumokhoz képest. Szemben a TPPP/p25-tel a negatív csúcsok aránya változatlan marad  $\text{Zn}^{2+}$  jelenlétében (TPPP3/p20 +/-  $\text{Zn}^{2+}$ :  $[\theta]_{208}/[\theta]_{222} \sim 1,3$ ; TPPP2/p18 +/-  $\text{Zn}^{2+}$ :  $[\theta]_{208}/[\theta]_{222} \sim 0,9$ ) (22. A, B ábra). A fehérjék eltérő viselkedésének magyarázata lehet, hogy a két rövidebb homológ fehérjében a teljes  $\text{His}_2\text{Cys}_2$  motívum nem található meg, illetve eleve nem, vagy kevésbé tekinthetők rendezetlen fehérjéknek.

A TPPP/p25 harmadlagos szerkezetét a közeli-UV tartományban is vizsgáltam (22. C ábra). A TPPP/p25 a 270-290 nm régióiban belül egy kis intenzitású pozitív CD sávot mutat. A CD jel arra utal, hogy az aromás aminosavak, nagy valószínűséggel a Tyr és/vagy Trp aszimmetriás környezetben található, ami a fehérje szerkezetében reziduális szerkezetet jelez, ugyanakkor a fehérje nem rendelkezik stabil tertszerkezettel. Növekvő  $Zn^{2+}$  koncentráció hatására a CD jel „eltűnik”, negatív tartományba kerül, ami arra utal, hogy a  $Zn^{2+}$  kötődése a TPPP/p25-höz nem jár együtt kompakt harmadlagos szerkezet kialakulásával. Ez összhangban van azzal, hogyha egy fehérje molten globule állapotba kerül, akkor a közeli-UV CD spektrum nulla körüli ellipticitás értéket mutat (Leal és Gomes, 2007), mint ahogy azt a TPPP/p25- $Zn^{2+}$  komplex esetén megmutattam.

### A $Zn^{2+}$ -indukált szerkezetváltozás vizsgálata NMR spektroszkópiával

Az NMR vizsgálat során a  $^{15}N$ -jelölt TPPP/p25 (440  $\mu M$ ) oldatához két lépésben  $Zn^{2+}$ -et adtunk, először 1:1, ezt követően 1:2 koncentráció arányban. A mérés során  $^1H$ - $^{15}N$  HSQC spektrumot vettünk fel a mintáról és a csúcsok jelintenzitás-változását követtük (23. A ábra).  $Zn^{2+}$  hatására az amidcsúcsok eltérő mértékben változtak meg. Ekvimoláris koncentrációban  $Zn^{2+}$ -kel komplexált TPPP/p25 HSQC spektrumában jól megfigyelhető a változás a szabad fehérjéhez képest. A 8,5-9,5 ppm illetve a 6,5-7,9 ppm tartományon belül - ami a fehérje középső flexibilis régiójára jellemző - bizonyos aminosavaknak megfelelő csúcsok eltűntek. Ez arra utal, hogy a fémkötésben érintett amidsoportoknak  $Zn^{2+}$  hatására megváltozott a kémiai környezete. A 7,9-8,5 ppm tartományon belül, ami a fehérje rendezetlen N- és C-terminális részének feleltethető meg, az intenzív csúcsok rezonanciafrekvenciája nem változott, azonban a kisebb intenzitású csúcsok eltűntek a spektrumból.



**23. ábra** A  $Zn^{2+}$ -kötés tanulmányozása NMR spektroszkópiával (750 MHz). (A) Átfedő  $^1H$ - $^{15}N$  HSQC spektrumok: 440  $\mu M$  szabad  $^{15}N$ -TPPP/p25 (szürke) és  $Zn^{2+}$ -kel komplexált 1:1 (kék) és 1:2 (piros) spektrumok. (B) TPPP/p25  $^1H$ - $^{15}N$  HSQC spektrumának egy kiemelt részlete, a glicin régióra fókuszálva.

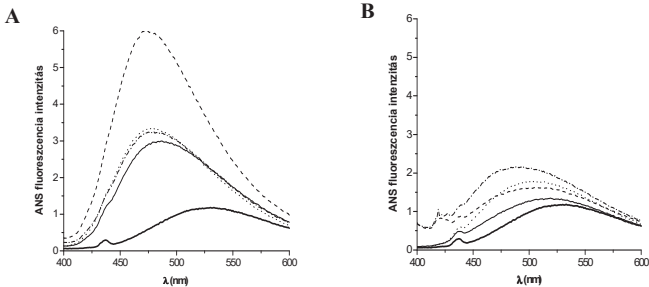


A  $Zn^{2+}$  hatására bekövetkező szerkezeti változások nehezen értelmezhetőek a fehérje rendkívüli flexibilitása miatt. Az ún. glicin régió viszont jól tanulmányozható a HSQC spektrumban, ugyanis megfelelő jeldiszperziót és jel-zaj viszonyt kapunk. Ebből a megfontolásból a  $Zn^{2+}$  hatására bekövetkező változásokat a glicin gazdag régión keresztül tanulmányoztuk (23. B ábra). Ilyen glicin-régiót találunk az N- és C-terminális (asszignált) szakaszokon, valamint a fehérje középső (nem asszignált) régiójában. Az N-terminálison négy glicint ( $Gly^{20}$ ,  $Gly^{37}$ ,  $Gly^{39}$ ,  $Gly^{41}$ ), a C-terminálison nyolcat ( $Gly^{184}$ ,  $Gly^{186}$ ,  $Gly^{188}$ ,  $Gly^{191}$ ,  $Gly^{200}$ ,  $Gly^{209}$ ,  $Gly^{217}$ ,  $Gly^{218}$ ) sikerült asszignálni. A középső régióban található glicinek jelhozzárendelését azonban nem lehetett elvégezni a csúcsok kis intenzitása miatt. Ekvimoláris  $Zn^{2+}$  koncentrációnál az asszignált glicin csúcsok intenzitása nem változott meg, leszámítva három glicint ( $Gly^{209}$ ,  $Gly^{217}$ ,  $Gly^{218}$ ), amelyek intenzitása gyengén csökkent. Kétszeres  $Zn^{2+}$  koncentráció mellett nem tapasztaltunk jelentős különbséget, csupán a  $Gly^{41}$ ,  $Gly^{186}$  és  $Gly^{188}$  csúcsokban mutatkozott gyenge változás. Az eredmények arra utalnak, hogy a  $Zn^{2+}$  kötődése során a középső flexibilis régióban történnek szerkezeti változások.

#### ***A molten globule szerkezet azonosítása fluoreszcencia spektroszkópiával***

A TPPP/p25 szerkezeti tulajdonságainak vizsgálatában a hidrofób ANS festéket használtam, amely nem kovalens kölcsönhatásokon keresztül a fehérje felszíni hidrofób felületeihez kötődik. Poláros közegben az ANS gyenge fluorofór, azonban apoláros környezetben fluoreszcenciája megnő. Ezt a tulajdonságát használtam fel a fluoreszcencia mérések során, a  $Zn^{2+}$  hatására bekövetkező szerkezetváltozás kimutatására. A molten globule állapothoz hidrofób felülete miatt nagy affinitással kötődik az ANS - szemben a globuláris, illetve a random coil-szerű fehérjékkel - ezáltal a fluoreszcencia intenzitás alapján különbséget tehetünk az egyes szerkezeti állapotok között (Semisotnov et al., 1991).

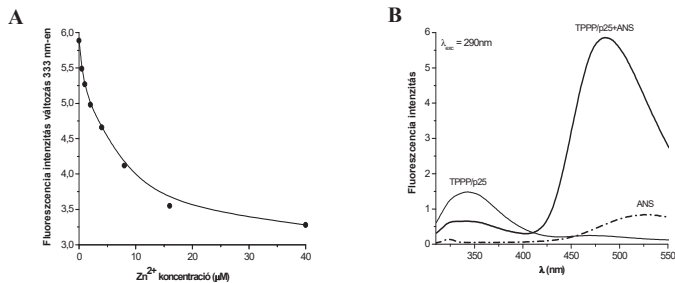
A 24. A ábra mutatja, hogy TPPP/p25 mellett az ANS emissziós intenzitása megnőtt és emissziós maximuma ( $\lambda_{max,ANS} = 525$  nm) kék irányba tolódott ( $\lambda_{487}$ ), ami arra utal, hogy a rendezetlen fehérje felszíni régióiban az ANS számára elérhető hidrofób felületek találhatóak. Mivel a merev harmadlagos szerkezetű és a teljesen kitekeredett polipeptidlánc nem mutat ANS-kötést, joggal feltételezhetjük, hogy a fehérje egy köztes szerkezettel jellemezhető.  $Zn^{2+}$  jelenlétében további intenzitásnövekedést és az emissziós maximum eltolódását ( $\lambda_{473}$ ) tapasztaltam. Az adatok azt mutatják, hogy a bivalens kation kötődése során szerkezetváltozás történik, molten globule-szerű állapot alakul ki, ezáltal az ANS számára kiterjedtebb hidrofób felület érhető el. A hatás specifikus  $Zn^{2+}$ -re nézve, ugyanis azonos  $Ca^{2+}$  és  $Al^{3+}$  koncentrációk mellett csak minimális intenzitásnövekedés figyelhető meg.



**24. ábra** A TPPP fehérjék és az ANS kölcsönhatásának vizsgálata  $Zn^{2+}$  jelenlétében. (A) Fluoreszcencia emissziós spektrum: szabad ANS (vastag), TPPP/p25-ANS komplex (vékony)  $20 \mu M Zn^{2+}$  mellett (szaggatott),  $20 \mu M Ca^{2+}$  mellett (pontozott) és  $20 \mu M Al^{3+}$  mellett (szaggatott-pontozott). (B) Emissziós spektrumok: szabad ANS (vastag), TPPP2/p18-ANS (vékony)  $200 \mu M Zn^{2+}$  mellett (szaggatott); TPPP3/p20-ANS (pontozott)  $200 \mu M Zn^{2+}$  mellett (szaggatott-pontozott). A mérés során az ANS koncentrációja  $50 \mu M$ , a fehérjekoncentráció  $5 \mu M$  volt, az adott fémion koncentráció a maximális spektrális változáshoz tartozó érték volt. A gerjesztés  $380 \text{ nm}$ -en történt, az emissziós rések  $2\text{-}2 \text{ nm}$ -esek voltak.

Összehasonlító ANS fluoreszcencia mérést végeztem a TPPP3/p20 és a TPPP2/p18 homológ fehérjékkel (24. B ábra). A homológ fehérjék mellett az ANS fluoreszcencia intenzitása gyengén növekedett, különösen a rendezett TPPP2/p18 esetében.  $Zn^{2+}$  jelenlétében kismértékű intenzitásnövekedést tapasztaltam, ami azt mutatja, hogy nem történt a TPPP/p25-höz hasonló szerkezetváltozás. Az eredmények alátámasztják a távoli-UV CD megfigyeléseinket, miszerint a homológ fehérjék a TPPP/p25-höz képest rendezettebb szerkezettel rendelkeznek és a  $Zn^{2+}$  nem okoz jelentős konformációváltozást.

A TPPP/p25 szekvenciájában egy triptofán található ( $Trp^{76}$ ), amelynek a fluoreszcenciája specifikusan detektálható, ezért a fluoreszcencia változásból a fluorofór környezetében bekövetkező változásra következtethetünk. Mivel a TPPP/p25 szekvenciájában a Trp a feltételezett cink-kötő motívumon (61-83 as) belül található, ezért a  $Zn^{2+}$ -kötést Trp fluoreszcencia méréssel tanulmányoztam. Az adott kísérletben a TPPP/p25 fluoreszcencia spektrumát vizsgáltam növekvő  $Zn^{2+}$  koncentráció mellett, ami a fluoreszcencia intenzitás szignifikáns csökkenését eredményezte (25. A ábra). A maximális spektrális változást  $40 \mu M Zn^{2+}$  mellett detektáltam, ennek hatására  $34\%$  intenzitáscsökkenést és a maximum vörös eltolódását tapasztaltam, ami a környezet polaritásváltozásaira vezethető vissza. Az ún. egy-triptofános NATA (az oldószernek teljesen kitett Trp modell vegyülete)  $Zn^{2+}$  hatására nem mutatott szignifikáns fluoreszcencia változást (ábra nélkül). A TPPP/p25-nél észlelt változások azt jelzik, hogy a  $Zn^{2+}$  a  $Trp^{76}$  környezetében, nagy valószínűséggel a cink-kötő motívumhoz (61-83 peptidszakasz) kötődik.



**25. ábra** Trp fluoreszcencia mérés  $Zn^{2+}$  valamint ANS jelenlétében. **(A)** 8  $\mu M$  TPPP/p25 fluoreszcencia emissziójának változása növekvő  $Zn^{2+}$  koncentráció mellett. **(B)** Fluoreszcencia rezonancia energia transzfer a Trp<sup>76</sup> és az ANS között. Fluoreszcencia emissziós spektrumok: TPPP/p25 (vékony vonal), szabad ANS (szaggatott vonal), ANS-sel komplexált TPPP/p25 (vastag vonal). A gerjesztés 290 nm-en történt.

A TPPP/p25 illetve a külső fluorofór ANS között FRET segítségével a TPPP/p25 szerkezetét tanulmányoztam. Ha a Trp donor és az ANS akceptor megfelelő orientációban és közelségben van és a gerjesztett Trp dipól-dipól kölcsönhatás révén gerjeszti a TPPP/p25-höz kötött fluoreszcens ANS molekulát, akkor energia transzfer jön létre, mint azt a 25. B ábra mutatja. A Trp-t 290 nm-en gerjesztve fluoreszcencia emissziójának maximuma 340 nm körül detektálható. A szabad ANS azonos gerjesztési hullámhossz mellett kis intenzitású fluoreszcencia jelet ad 525 nm-en. Azonban az ANS kötődése következtében a Trp fluoreszcencia intenzitása lecsökkent, míg az ANS fluoreszcencia emissziója jelentősen megnőtt az energiatranszfer által. Mindez azt jelzi, hogy az ANS molekula a fehérje középső régióján belül hidrofób környezetben a Trp<sup>76</sup> közelében kötődik meg.

Összességében az eredmények azt mutatják, hogy  $Zn^{2+}$  hatására a Trp<sup>76</sup> közeli régióban szerkezetváltozás történik, molten globule alakul ki, melyhez az ANS nagy affinitással kötődik, FRET alapján a Trp oldallánc közelében.

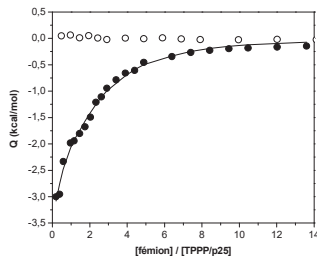
### 5.2.2. A $Zn^{2+}$ -kötés termodinamikai paramétereinek meghatározása

A TPPP/p25 és a  $Zn^{2+}$  kölcsönhatását hőváltozás kísérli, ezáltal az ITC módszer alkalmas volt a fémkötés kvantitatív paraméterekkel való leírására. A kísérlet során a  $Zn^{2+}$ -kötés sztöchiometriáját és erősségét, valamint a kölcsönhatás termodinamikai paramétereit határoztuk meg. A TPPP/p25-öt a készülék mintacellájába töltöttük és egymást követő lépésekben  $Zn^{2+}$ -kel titráltuk. Az injektlási lépések során  $Zn^{2+}$ -hozzáadás hatására hőfelszabadulást detektáltunk. A titrálást kísérő hőváltozást a fehérjéhez hozzáadott  $Zn^{2+}$  moláris arányának függvényében ábrázolva, megkaptuk a kölcsönhatásra jellemző kötődési izotermát (26. ábra). A titrálási görbe értékeléséhez az illeszkedő egykötőhelyes (*one-site binding model*) modellt használtuk fel, a TPPP/p25-ön egy  $Zn^{2+}$  kötőhelyet feltételezve (kötődési sztöchiometria,  $n = 1,04 \pm 0,29$ ). A titrálási görbéből meghatározott paramétereket az 5. táblázat foglalja össze.

	sztöchiometria (n)	$K_a \times 10^4 M^{-1}$	$\Delta H$ (kcal mol <sup>-1</sup> )	$\Delta S$ (cal (mol K) <sup>-1</sup> )
$Zn^{2+}$	$1,04 \pm 0,29$	$3,29 \pm 0,64$	$-9,42 \pm 3,06$	-10,9

5. táblázat A  $Zn^{2+}$ -kötés termodinamikai paramétere (T= 298 K).

A szabadentalpia változást,  $\Delta G$ -t és a  $T\Delta S$  entrópia tagot a kalorimetriásan meghatározott  $\Delta H$  értékből számítottuk a  $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$  összefüggés alapján ( $\Delta G = -6,17$  kcal mol<sup>-1</sup> és  $T\Delta S = -3,25$  kcal mol<sup>-1</sup>). A disszociációs állandó,  $K_d = 30 \pm 6$   $\mu M$ -nak bizonyult. A komplexképződés 1:1-es sztöchiometriával jellemezhető és a termodinamikai paraméterek azt jelzik, hogy a fémkötés entalpia-vezérelt folyamat. Azonos kísérleti elrendezésben  $Zn^{2+}$  mellett a  $Ca^{2+}$  hatását is vizsgáltuk, azonban  $Ca^{2+}$  jelenlétében nem detektáltunk hőváltozást (26. ábra). Az eredmények bizonyítják, hogy a  $Ca^{2+}$  nem, míg a  $Zn^{2+}$  specifikusan kötődik a TPPP/p25-höz.



26. ábra A  $Zn^{2+}$ -kötés jellemzése ITC-vel. A kísérleti elrendezés során a mintacellába a fehérje (15  $\mu M$ ), a referencia-cellába a femion tömény oldata került (2 mM) 40 mM Tris (pH 7,6) pufferben. ITC titrációs görbe  $Zn^{2+}$  mellett (●) és a TPPP/p25 titrálása  $Ca^{2+}$ -kel (○).  $Zn^{2+}$  esetében a titrálási görbét egy kötőhely feltételezésével a legjobban illeszkedő *one-site binding model*-lel illesztettük (MicroCal Origin 7.0). A mérést állandó hőmérsékleten, 25°C-on végeztük.

### 5.3. Nukleotidok kötődése és a nukleotidkötés hatásai

A TPPP/p25 *in vivo* funkciójának tanulmányozása során a *Drosophila* embriókon végzett kísérletek azt mutatták, hogy a TPPP/p25 megakadályozza a mitotikus orsó kialakulását, ezáltal sejtosztódást gátló hatása van, amit a GTP képes felfüggeszteni (Tirián et al., 2003). Ez arra utal, hogy a GTP képes a tubulin és a TPPP/p25 kölcsönhatását befolyásolni. Jól ismert, hogy a mikrotubulusok dinamikus szerveződéséhez nélkülözhetetlen a GTP hidrolízis. Így a megfigyelt hatást kezdetben a tubulin GTP-kötő tulajdonságára vezettük vissza, azonban érdemes figyelembe venni azt a tényt, hogy a TPPP/p25 konzervált GTP-kötő szekvencia elemeket tartalmaz.

Kis G-fehérjék kristályszerkezetének elemzése során olyan konzervált mintázatokat azonosítottak, amelyek a GTP- és GDP-kötésben, illetve a GTP hidrolízisben játszanak fontos szerepet (Paduch et al., 2001; Sprang, 1997). Ezek a funkcionális hurok-régiók (G1-G5 mintázat) kölcsönhatásokat alakítanak ki a guanin bázissal, a Mg<sup>2+</sup>-mal, továbbá a  $\gamma$ - ,  $\beta$ -foszfát csoporttal. A TPPP/p25 szekvenciavizsgálata során az [N/T][K/Q]XD vagy G4 mintázat kivételével azonosítottam az ismert GTP-kötő motívumokat (6. táblázat).

MADKAKPAKA<sup>10</sup>ANRTPPKSPG<sup>20</sup>DPSKDRAAKR<sup>30</sup>LSLESEGAGE<sup>40</sup>GAAASPELSA<sup>50</sup>LEEAFRRFAV<sup>60</sup>  
 HGDARATGRE<sup>70</sup>MHGKNWSKLC<sup>80</sup>KDCQVIDGRN<sup>90</sup>VTVTDVDIVF<sup>100</sup>SKIRGKSCRT<sup>110</sup>ITFEQFQAL<sup>120</sup>  
 EELAKKRFKD<sup>130</sup>KSSEEAUVREV<sup>140</sup>HRLIEGKAPI<sup>150</sup>ISGVTKAISS<sup>160</sup>PTVSRLLDTT<sup>170</sup>KFTGSHKERF<sup>180</sup>  
 DPSGKGGKGA<sup>190</sup>GRVLDVDESG<sup>200</sup>YVSGYKHAGT<sup>210</sup>YDQKVQGGK<sup>219</sup>

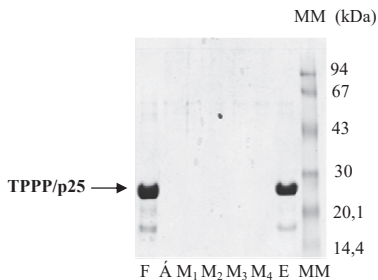
Motívum	konzensus szekvencia elem	TPPP/p25-ben	aminosav régió
<b>GTP-kötő motívum</b>			
<b>G1 (P loop):</b> $\alpha$ -, $\beta$ -foszfátkötés	GXXXXGK[S/T]	GREMHGK	68-74
<b>G2 (switch I):</b> Mg <sup>2+</sup> -kötésben játszik szerepet	XTX	T	92,94
<b>G3 (switch II):</b> D és G a Mg <sup>2+</sup> - és $\gamma$ -foszfát kötésben játszik szerepet	DXXG	DPSG DESG	181-184 197-200
<b>G4:</b> kölcsönhat a guanin bázissal	[N/T][K/Q]XD	hiányzik	
<b>G5:</b> kölcsönhat a guanin bázissal	[C/S]A[K/L/T]	SAL	49-51
<b>ATP-kötő motívum:</b> Rossmann-motívum	GXGXXG	GKGKAG	186-191

**6. táblázat Konzervált nukleotid-kötő szekvencia elemek a TPPP/p25-ben.** Az aláhúzott TPPP/p25 szekvencia részletek a kis G fehérjékben a GTP-kötésben és hidrolízisben szerepet játszó konzervált szekvencia elemeket jelölik (Paduch et al., 2001). A táblázatban X meg nem nevezett variábilis aminosavat jelöl.

A kis GTPáz hGBP1 fehérjében az [N/T][K/Q]XD elemet a TVRD elem helyettesíti a guanin bázis kötésben (Praefcke et al., 1999), így lehetséges, hogy a TPPP/p25 szekvenciájában megtalálható T<sup>91</sup>VTD<sup>95</sup> szekvencia elem a GTP-kötésben hasonló szerepet töltsön be. Mindemellett a fehérje szekvenciájában megtalálható az ún. Rossmann-motívum is, ami egy glicin gazdag régió és az ATP-kötő fehérjékben fordul elő (Tirián et al., 2003). TPPP/p25 fehérjeszekvenciák többszörös szekvenciaillesztése a nukleotid-kötő motívumok erősen konzervált jellegére mutatott rá, ami a szekvencia elemek funkcionális jelentőségére utal (Függelék 9. táblázat). A konszenzus szekvencia elemek egy része a rendezetlen C-terminális régióban, más részük a középső flexibilis régióban található (45-175 as). Ezek ismeretében érdekes volt megvizsgálni, hogy a TPPP/p25 képes-e nukleotidot kötni és/vagy hidrolizálni, mivel egy kivételével az ismert GTP-kötő motívumokat tartalmazza a fehérje.

### 5.3.1. A GTP direkt kölcsönhatásának igazolása

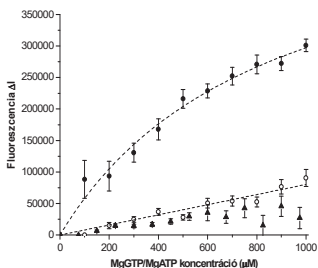
A TPPP/p25 GTP-kötését  $\gamma$ -foszfát kapcsolt GTP-szefaróz affinitáskromatográfiával igazoltam. A GTP affinitásoszlopon megkötődött TPPP/p25-öt tömény GTP-oldattal eluáltam a szefaróz gyantáról és a megkötött fehérjefrakciót SDS gélen detektáltam (27. ábra), ami egyértelműen bizonyította, hogy a TPPP/p25 GTP-kötő fehérje.



**27. ábra** A GTP-kötés tanulmányozása  $\gamma$ -foszfát kapcsolt GTP-szefaróz affinitáskromatográfiával. **F:** az oszlopra felvitt TPPP/p25 (100  $\mu$ g/100  $\mu$ l). **Á:** átesett frakció, **M<sub>1</sub>-M<sub>4</sub>:** a gyantamosás során szedett frakciók, **E:** a gyantához kötődött TPPP/p25 elúciója 17,4 mM-os GTP-vel. **MM:** molekulatömeg marker. 200  $\mu$ l-es frakciókat gyűjtöttem és a mintákat 2 mM  $\beta$ -merkaptóetanol tartalmú mintafestékkel 13,5%-os SDS géltre vittem.

### 5.3.2. Trp fluoreszcencia a nukleotid-kötés vizsgálatában

A TPPP/p25 egyetlen Trp<sup>76</sup> oldallánca a középső flexibilis régió belül az egyik GTP-kötő motívum, a <sup>68</sup>GREMHGK<sup>74</sup> (P-loop) közelében található. Mivel a Trp fluoreszcenciája specifikusan detektálható, ezért hasonlóan a Zn<sup>2+</sup>-es mérésekhez, a nukleotid-kötést a Trp fluoreszcencia változásán keresztül tanulmányoztam. GTP és ATP hatására a Trp-ra jellemző fluoreszcencia emisszió csökkent és az emissziós maximum kismértékű vörösetolódást mutatott. Az intenzitáscsökkenés mértéke a nukleotidkoncentráció növelésével együtt nőtt, azonban a két nukleotid közül GTP jelenlétében detektáltam nagyobb jelváltozást (28. ábra).

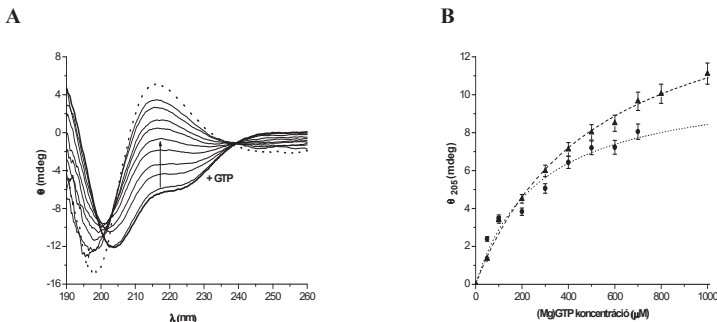


**28. ábra Trp fluoreszcencia változás MgGTP és MgATP mellett.** Az ábra a fluoreszcencia intenzitás különbséget szemlélteti a nukleotidkoncentráció függvényében. 2,4 µM TPPP/p25 plusz MgGTP (○); 8 µM TPPP/p25 plusz MgGTP (●), 2,4 µM TPPP/p25 plusz MgATP (▲). Gerjesztési hullámhossz 290 nm.

Azért, hogy a TPPP/p25 saját, *intrinsic* Trp fluoreszcenciájában bekövetkező változást detektáljam, a kísérletet NATA-val is elvégeztem és a fehérje jelváltozását a nukleotid fényabszorpciójából származó belső szűrő hatással (*inner filter effect*) korrigáltam, ami azt mutatta, hogy a TPPP/p25 triptofán fluoreszcencia csökkenése a GTP kioltó hatásának tulajdonítható. A GTP Trp közelében történő kötődését FRET mérésekkel is megerősítettük, a Trp és a fluoreszcens GTP analóg mant-GTP között. A 290 nm-en gerjesztett Trp emissziós csúcsa koncentrációfüggő módon csökkent mant-GTP jelenlétében, miközben a mant-GTP fluoreszcencia emissziója jelentősen megnőtt az energiáttranszfer által (ábra nélkül). Mindez arra utal, hogy a két fluorofór szterikusan egymás közelében és megfelelő orientációban helyezkedik el, azaz a GTP a Trp oldallánc környezetében kötődik.

### 5.3.3. Nukleotid-kötés vizsgálata távoli-UV CD spektroszkópiával

A kölcsönhatás karakterizálása céljából a nukleotid-kötés hatására bekövetkező változásokat távoli-UV CD-spektroszkópiával vizsgáltam. Kíváncsi voltam, hogy a nukleotid miként módosítja a TPPP/p25 másodlagos szerkezetét. Ennek tanulmányozására a TPPP/p25-öt növekvő GTP illetve ATP koncentráció mellett titáltam és az így kialakuló komplex spektrumokat detektáltam. Mindkét esetben spektrális változást tapasztaltam, azonban az ATP jelenlétében mért CD jel egységesen csökkent, az egész spektrumra jellemző ellipticitás-csökkenést tapasztaltam. A fehérje egyedi spektrumához képest a negatív csúcsok helyzete nem változott meg, csak a detektált jelintenzitás lett kisebb (ábra nélkül). Valószínű, hogy az ATP jelenlétében megfigyelt jelváltozás az oldat inhomogenitására vezethető vissza. Amikor a TPPP/p25-öt GTP-vel titáltam, a komplex spektrumok lefutása jelentős eltérést mutatott a szabad fehérjéhez képest (29. A ábra).



**29. ábra** A GTP-kötés tanulmányozása távoli-UV CD spektroszkópiával. (A) 7,5  $\mu\text{M}$  TPPP/p25 (vastag) növekvő GTP koncentráció mellett: 50-800  $\mu\text{M}$  (vékony) és 1000  $\mu\text{M}$  (szaggatott). A nyíl a GTP koncentráció növelésének irányába mutat. A pontos koncentráció értékeket a B ábra mutatja. (B) Telítési görbe. Differencia ellipticitás ( $\theta_{\text{max}} = 205$  nm) a (Mg)GTP koncentráció függvényében ábrázolva, GTP ( $\blacktriangle$ ) és MgGTP ( $\bullet$ ).

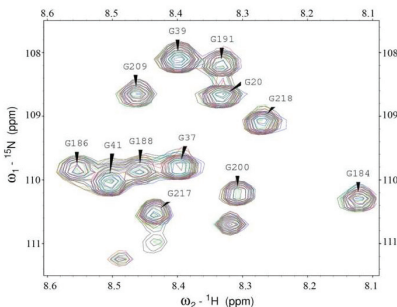
A fehérje egyedi spektrumára jellemző  $\sim 205$  nm körüli negatív csúcs alacsonyabb hullámhossz felé tolódott, illetve a 220 nm-es tartományban megfigyelhető negatív váll kisebb lett. Fontos megjegyezni, hogy a GTP optikailag aktív, a távoli UV tartományban 200-230 nm körül intenzív CD jelet ad. Így a komplex szerkezetében bekövetkező változáshoz nagymértékben hozzájárul a GTP kiroptikai aktivitása. A differenciaspektrumok maximum értékének ( $\theta_{\text{max}} = 205$  nm) koncentrációfüggéséből telítési görbét kapunk, ami alapján megbecsülhető a GTP-kötésre jellemző  $\text{EC}_{50}$  érték ( $\sim 500$   $\mu\text{M}$ ) (29. B ábra). Amikor a nukleotid-kötést a GTP-vel ekvimoláris mennyiségű  $\text{Mg}^{2+}$  jelenlétében vizsgáltam, a



TPPP/p25 nagyobb affinitással kötődött a GTP-hez ( $EC_{50}$  MgGTP  $\sim 270 \mu\text{M}$ ), valószínűleg a  $\text{Mg}^{2+}$  komplexet stabilizáló hatásának köszönhetően (29. B ábra), ami funkcionális szempontból fontos tényező lehet (ld. később GTPáz aktivitás).

### 5.3.4. GTP-kötés vizsgálata NMR spektroszkópiával

A fehérjegerinc amidcsoportjainak kémiai eltolódás értéke igen érzékenyen reagál a fehérje környezetét érintő változásokra, ezért a  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spektrumok felhasználhatóak kölcsönhatási kísérletekben. Mivel a TPPP/p25 amidcsoportjainak jelhozzárendelését a polipeptidlánc rendkívüli mozgékonyasága miatt a középső régióban nem lehetett elvégezni, ezért a GTP hatására bekövetkező változásokat a  $^{15}\text{N}$ - jelölt fehérje asszignált régióin belül (N- és C-terminális), az ún. glicin-régióon keresztül tanulmányoztuk (30. ábra). A GTP-kötő motívumok közül a D $^{181}\text{PSG}^{184}$  illetve a D $^{197}\text{ESG}^{200}$  elem a C-terminálison található, továbbá az S $^{49}\text{AL}^{51}$  elem az N-terminális glicinjeinek közelében helyezkedik el (ld. 6. táblázat), így ha a glicinjelek GTP hatására megváltoznak, az a kémiai környezetükben bekövetkező változásokra utal. Ismert szerkezetű GTP-kötő fehérjék DXXG konszenzus szekvenciájának glicinje hidrogénkötést létesít a GTP  $\gamma$ -foszfátjával, a [C/S]A[K/L/T] elem pedig a guanin csoporttal létesít kapcsolatot (Paduch et al., 2001). A kísérlet során azt tapasztaltuk, hogy GTP jelenlétében a glicin csúcsok helyzete és rezonanciafrekvenciája nem változott meg és újabb csúcsokat sem észleltünk a glicin-régióban. Mivel a TPPP/p25 HSQC spektrumában a konzervált glicincsúcsok illetve más, terminális régióban található glicin jelek nem változtak, ez alapján valószínűsítjük, hogy a GTP-kötésben nem a C-terminális régióban található GTP kötőhelyek, hanem a fehérje középső szegmensében a Trp körüli régió érintett, mint azt a Trp fluoreszcencia mérések is mutatták (ld. 28. ábra).

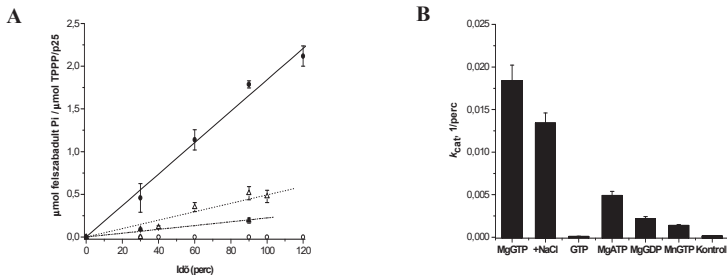


**30. ábra** GTP hatásának vizsgálata NMR spektroszkópiával (500 MHz). A TPPP/p25 HSQC spektrumának egy kiemelt részlete GTP jelenlétében. Átfedő spektrumok: 400  $\mu\text{M}$  TPPP/p25 (piros) 1500  $\mu\text{M}$  GTP mellett (zöld).

### 5.3.5. A TPPP/p25 enzimaktivitásának vizsgálata

Az a megfigyelésünk, hogy a fehérje Trp oldallánca érzékenyen reagál a környezetét érintő változásokra, mint a GTP-vel való kölcsönhatásra, melyet a  $Mg^{2+}$  jelenléte előnyösen befolyásol, késztettem arra, hogy teszteljem a nukleotid hidrolízis lehetőségét a TPPP/p25 esetében. Két független módszerrel vizsgáltuk a TPPP/p25 GTPáz aktivitását.

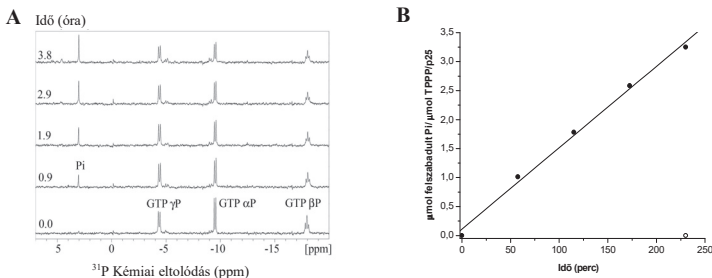
Egyik esetben egy kolorimetriás módszert alkalmaztunk a malachitöld reagenssel. Ismert, hogy a kis G-fehérjék szubsztrát kötését a  $Mg^{2+}$ -ion elősegíti, továbbá maximalizálja a katalízis sebességét (Guymet et al., 2010), így a kísérletet a GTP és valamennyi nukleotid esetében  $Mg^{2+}$  jelenlétében végeztem. Az enzimatikusan felszabadított foszfát mennyiségét a malachitöld reagens hozzáadását követően 660 nm-en fotometriásan határoztam meg. Az eredmények, melyet a 31. ábra foglal össze, azt mutatják, hogy a rendezetlen TPPP/p25 meglepő módon rendelkezik GTPáz aktivitással ( $k_{cat} = 0,018 \pm 0,001 \text{ min}^{-1}$ ) és a nukleotid hidrolízishez a  $Mg^{2+}$ -ionok jelenléte szükséges (31. A, B ábra). A MgGTP-vel azonos koncentrációban alkalmazott MgATP illetve MgGDP esetében a hidrolízis sebessége jelentősen kisebbnek bizonyult (MgATP: 28%; MgGDP: 12%), ami azt jelzi, hogy a GTP specifikus szubsztrátja a TPPP/p25-nek. Ismert, hogy a kis G-fehérjék optimális aktivitásához szükséges  $Mg^{2+}$ -ion általában helyettesíthető  $Mn^{2+}$ -nal (Hillebrand et al., 2005), ezért az aktivitásmérést  $Mn^{2+}$  jelenlétében is elvégeztem. Ebben az esetben az aktivitás tízedére csökkent, ami a  $Mg^{2+}$ -ionok kiemelkedő szerepét jelzi a GTP-kötésben és/vagy hidrolízisben.



**31. ábra** A TPPP/p25 GTPáz aktivitásának vizsgálata malachitöld reagenssel. Aktivitásmérés 5 mM  $MgCl_2$ - vagy  $MnCl_2$ -tartalmú 20 mM Tris (pH 7,4) pufferben. A nukleotidkoncentráció minden esetben 1,5 mM, a TPPP/p25 koncentráció 80  $\mu\text{M}$  volt. (A) TPPP/p25 plusz MgGTP (●), TPPP/p25 plusz GTP (○), TPPP/p25 plusz MgATP (Δ), TPPP/p25 plusz MgGDP (▲). Az időgörbe lineáris szakaszának illesztéséből meghatároztam a  $k_{cat}$  értéket. (B) Malachitöld reagenssel meghatározott  $k_{cat}$  értékek grafikus ábrázolása. A kontroll mérés a TPPP/p25 elhagyásával 1,5 mM MgGTP jelenlétében történt (Kontroll). A kísérletet 100 mM NaCl tartalmú pufferrel is elvégeztem MgGTP mellett (+NaCl).

A TPPP/p25 GTPáz aktivitásának ( $k_{\text{cat}}$ ) meghatározásához azt az időintervallumot választottam ki, amikor a szubsztrát átalakulása arányos az idővel, így az enzimreakció sebességét az illesztett egyenes iránytangense adta meg (31. A ábra).

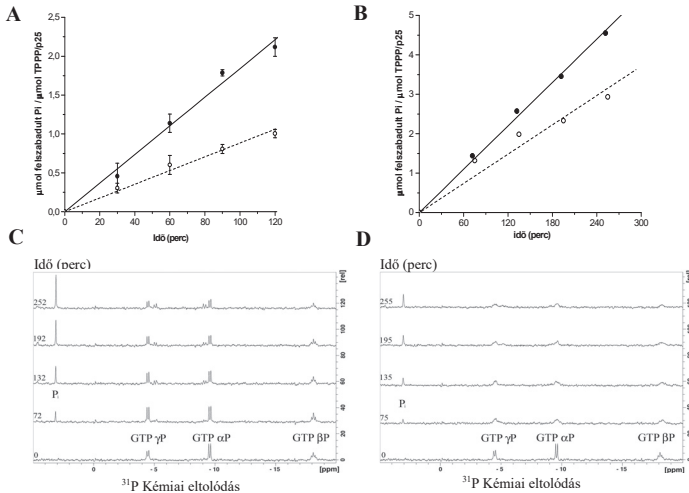
A TPPP/p25 GTPáz aktivitását egy független módszerrel is vizsgáltuk,  $^{31}\text{P}$ -NMR spektroszkópiával, Bodor Andreával együttműködve. A  $^{31}\text{P}$ -NMR-rel a GTP  $\alpha$ -,  $\beta$ - és  $\gamma$ -foszfát jeleinek változását és az inorganikus foszfát képződését tudtuk nyomon követni. Mint azt a 32. A ábra mutatja, TPPP/p25 jelenlétében az inorganikus foszfátjel (Pi, 3,08 ppm) intenzitása a reakció időtartama alatt lineárisan nőtt, miközben a GTP  $\alpha$ -,  $\beta$ - és  $\gamma$ -foszfát jelei csökkentek. Az időben növekvő Pi jelek csúcs alatti területeinek integrálásával meghatározott inorganikus foszfát koncentrációt az idő függvényében ábrázolja a GTPáz aktivitás  $k_{\text{cat}}=0,014 \text{ min}^{-1}$ -nak adódott (32. B ábra), jó egyezést mutatva a malachitos mérés eredményével,  $k_{\text{cat}}=0,018 \text{ min}^{-1}$ . Miután kontroll mérésekkel kizártuk a spontán hidrolízis lehetőségét, a fenti eredmények alapján megállapítható, hogy a TPPP/p25 saját, *intrinsic* GTPáz aktivitással rendelkezik. Ez az érték általában jellemző számos kis G-fehérjére ( $10^{-1} - 3 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ ), ugyanakkor a kis G-fehérjék GTPáz aktivitását specifikus aktiváló fehérjék több nagyságrenddel képesek meggyorsítani (Scheffzek és Ahmadian, 2005), melynek lehetősége a TPPP/p25 esetén is fennáll (ld. Függelék: Kölcsönható partnerek azonosítása GTP és GDP jelen- és távollétében).



**32. ábra** A TPPP/p25 GTPáz aktivitásának vizsgálata  $^{31}\text{P}$ -NMR spektroszkópiával (250 MHz). **(A)**  $^{31}\text{P}$ -NMR spektrum. A reakcióelegy 200  $\mu\text{M}$  TPPP/p25-öt, 1,36 mM GTP-t és 5 mM  $\text{MgCl}_2$ -ot tartalmazott 50 mM Tris (pH 7,0) pufferben. A kísérletet 300 K-en végeztük. A GTP  $\alpha$ -,  $\beta$ - és  $\gamma$ -foszfor atomjának karakterisztikus kémiai eltolódás értéke:  $\alpha$  (-9,52 ppm dublet),  $\beta$  (-18,04 ppm triplet) és  $\gamma$  (-4,4 ppm dublet). A Pi jel (3,08 ppm szinglet) intenzitásának növekedését négy órán keresztül követtük. **(B)** A foszfátképződés időfüggése. A keletkezett inorganikus foszfát koncentrációját (●) a Pi jelek csúcs alatti területeinek integrálásával határoztuk meg. A  $k_{\text{cat}}$  (0,014  $\text{min}^{-1}$ ) értéket a foszfátképződés sebességének meredekségéből határoztuk meg. A kontroll mérés során elhagytuk a fehérjét a reakcióelegyből, ami csak  $\text{MgGTP}$ -t tartalmazott (○).

**A  $Zn^{2+}$  és a GTP kompetitív kötődése a TPPP/p25-höz**

A fentiekben ismertetett eredmények alapján mind a  $Zn^{2+}$ , mind a GTP a TPPP/p25 középső flexibilis régióján belül, a Trp<sup>76</sup> által azonosítható régióban kötődik, ahol a  $Zn^{2+}$  hatására molten globule szerkezet alakul ki (a cink-kötő motívum (61-83 as) és egy potenciális GTP-kötő motívum (P-loop, 68-74 as) egymással átfedő szekvenciaszakaszok). Mindezek alapján feltételeztük, hogy a TPPP/p25  $Mg^{2+}$ -függő GTPáz aktivitását a  $Zn^{2+}$  gátolja. Ezt támasztja alá a malachitzölddel és a <sup>31</sup>P-NMR-rel végzett enzimaktivitásmérés. A  $Zn^{2+}$  gátolja a GTPáz aktivitást (malachitzöld reagens:  $k_{cat} = 0,018 \pm 0,001 \text{ min}^{-1}$ ;  $Zn^{2+}$  mellett  $k_{cat} = 0,0088 \pm 0,0009 \text{ min}^{-1}$ ) és ez a hatás specifikus  $Zn^{2+}$ -re nézve, ugyanis más kétértékű fémion ( $Ca^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ) nem mutatott gátló hatást (ábra nélkül) (33. A ábra). A <sup>31</sup>P-NMR spektroszkópia mérések hasonló eredményhez vezettek ( $k_{cat} = 0,0183 \text{ min}^{-1}$ ;  $Zn^{2+}$  mellett  $k_{cat} = 0,0122 \text{ min}^{-1}$ ) (33. B ábra). A <sup>31</sup>P-NMR mérés során a MgGTP-t tartalmazó pufferhez viszonylag nagy koncentrációban TPPP/p25-öt adtunk (33. C ábra)  $Zn^{2+}$  mellett (33. D ábra), majd az időben változó GTP hidrolízist, a foszfát jelek változását követtük.



**33. ábra  $Zn^{2+}$  hatása a GTPáz aktivitásra.** (A) Aktivitásmérés malachitzöld reagenssel 5 mM  $MgCl_2$  tartalmú Tris pufferben, 150  $\mu M$   $Zn^{2+}$  jelenlétében (●) és nélkül (○). A TPPP/p25 koncentráció 80  $\mu M$ , a GTP koncentráció 1500  $\mu M$  volt. A kezdeti sebesség lineáris szakaszának illesztéséből meghatároztuk a  $k_{cat}$  értéket. (B) <sup>31</sup>P-NMR mérés alapján a foszfátképződés időfüggése 400  $\mu M$   $Zn^{2+}$  jelenlétében (○) és nélkül (●). A Pi koncentrációt az egyes Pi jelek csúcs alatti területének integrálásával határoztuk meg. (C) TPPP/p25 aktivitásmérése <sup>31</sup>P-NMR spektroszkópiával (D) 400  $\mu M$   $Zn^{2+}$  jelenlétében. A reakcióelegy 200  $\mu M$  TPPP/p25-öt és 1 mM GTP-t tartalmazott 3 mM  $MgCl_2$  tartalmú Tris pufferben.

A 33. D ábrán megfigyelhető, hogy  $Zn^{2+}$  mellett jelszélesedés történik a GTP  $\alpha$ -,  $\beta$ - és  $\gamma$ -foszfát jeleiben, ugyanakkor a szabad Pi jelnél ezt nem figyeltük meg. Valószínű, hogy az észlelt változás a GTP foszfor csoportjainak környezetét érintő  $Zn^{2+}$ -kötés következtében a kémiai csere jelenségből származik (Bodor et al., 2000).

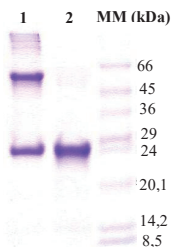
Az eredmények valóban azt mutatják, hogy a ligandumok versengenek egymással a kötőhelyekért, de nem zárható ki annak a lehetősége sem, hogy a  $Zn^{2+}$ -indukált szerkezetváltozás miatt módosul a fehérje aktivitása.

### 5.4. A TPPP/p25 homológ és heterológ asszociációi és funkcionális szerepük

#### 5.4.1. A TPPP/p25 dimerizáció

A TPPP/p25-tel kapcsolatos korai kísérletek azt mutatták, hogy a marhaagyból izolált TPPP/p25 monomer (25 kDa), dimer és magasabb molekulatömegű oligomer formában jelent meg az SDS gélen; a fehérje elméleti molekulatömege az aminosav-szekvencia alapján becsülhető meg, 24,8 kDa. Mindezek alapján feltételeztük, hogy a fehérje oligomerizációra hajlamos és szerkezete intermolekuláris kölcsönhatásokon keresztül stabilizálódik, azonban redukálószer jelenlétében, egyetlen, a monomernek megfelelő formát mutat.

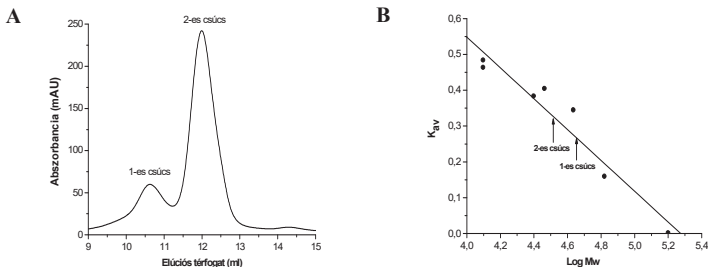
A humán rekombináns TPPP/p25 SDS gélen redukálószer távollétében dominánsan 25 kDa illetve 50 kDa magasságában jelenik meg, a monomer és a dimer formának megfelelően (34. ábra). Tíol redukáló ágens,  $\beta$ -merkaptóetanol hatására az oligomer formák eltűntek, monomerré estek szét. Mindezek alapján világos volt, hogy a fehérje diszulfid hidakon keresztül stabilizálódik dimer/oligomer formában.



**34. ábra TPPP/p25 SDS gélképe.** Redukálószer nélkül (1. oszlop) illetve 2 mM  $\beta$ -merkaptóetanol jelenlétében (2. oszlop), molekulatömeg marker (3. oszlop). A géltre felvitt TPPP/p25 mennyisége 5  $\mu$ g volt.

A TPPP/p25 szerkezetének és hidrodinamikai tulajdonságainak tanulmányozására Superose 12 oszlopon analitikai gélszűrést végeztem. A módszer lehetővé teszi a fehérje nemkovalens kölcsönhatásokkal stabilizált különböző molekulatömegű formáinak azonosítását, valamint az egyes formák konformációs állapotainak tanulmányozását, ugyanis a gélszűrés a molekulaméret és alak szerinti elválasztáson alapul. Mindehhez természetesen az alkalmazott gélszűrő oszlopot az adott körülmények között ismert molekulatömegű és konformációs állapotú (globuláris) fehérjékkel szükséges kalibrálni (az elúciós térfogat lineáris összefüggésben áll a molekulatömeg logaritmusával) és a vizsgált fehérje látszólagos molekulatömegét valamint hidrodinamikai paramétereit ( $R_s$ ,  $R_H$ ) az elúciós térfogat alapján meghatározhatjuk (Permyakov et al., 2003).

A 35. A ábra a TPPP/p25 esetén egy tipikus elúciós diagramot mutat. Nem redukáló közegben két fehérjecsúc jelenik meg, egy kisebb (1-es csúc:  $V_e = 10,6 \pm 0,2$  ml), illetve nagyobb (2-es csúc:  $V_e = 12,1 \pm 0,1$  ml) elúciós térfogat értéknel. A diagram alapján megállapítható, hogy két speciesz jelenlétéről van szó és az adott körülmények között a nagyobb  $V_e$ -vel jellemezhető, azaz a kisebb molekulatömegű a domináns forma.



**35. ábra** A TPPP/p25 vizsgálata analitikai gélszűréssel. (A) TPPP/p25 (560  $\mu$ M) elúciós diagramja. (B) Superose 12 oszlop kalibrációja globuláris fehérjék  $K_{av}$  értékei és molekulatömegük alapján (ld. 4.5.4.). Az oszlopot a mintafelvétel előtt 20 mM Tris (pH 7,2) pufferrel hoztam egyensúlyba, amely 150 mM NaCl-ot tartalmazott. Az UV jelet 280 nm-en detektáltam.

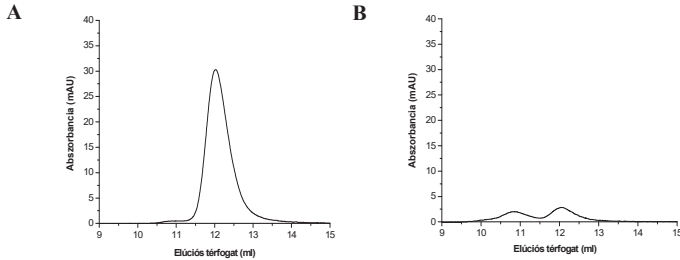
Az adott rendszerben meghatározott kalibrációs görbe (35. B ábra) alapján azt tapasztaltam, hogy a két különböző elúciós térfogatnál megjelenő fehérjeforma látszólagos molekulatömege nem felel meg egy 25 illetve 50 kDa-os globuláris fehérjének. A diagramon megjelenő 2-es (monomer) forma Stokes-sugara 26,5 Å-nek, látszólagos molekulatömege 32,4 kDa-nak, az 1-es (dimer) formáé 30,7 Å-nek, illetve 45,2 kDa-nak bizonyult (7. táblázat). A két forma látszólagos molekulatömegének aránya 1:1,4; ami arra mutat, hogy a két forma eltérő viselkedése alapvetően konformációs különbségekből ered. Miatán globuláris

fehérjék Stokes-sugara arányos a molekulatömeggel, így az a tény, hogy a gélszűrés során az azonos molekulatömegű globuláris fehérjéhez képest mindkét forma, de különösen a monomer (2-es csúcs) nagyobb  $R_s$  értéket mutatott, arra utal, hogy a monomer kiterjedtebb szerkezettel rendelkezik, mint a dimerizált forma. A monomer és dimer formát SDS gélen azonosítottam: a gélkép két sávot eredményezett 25 illetve 50 kDa magasságában (ábra nélkül). A konformációs tulajdonságok vizsgálatára felhasználtam az „Uversky-féle összefüggést” (ld. 4.5.4.) és az elméleti valamint a kísérletesen meghatározott  $R_s$  értékeket összehasonlítottam (Uversky, 2002b). A kísérleti Stokes-sugarak alapján a két fehérjeforma eltérő konformációval rendelkezik (7. táblázat). A monomer kiterjedt, rendezetlenebb szerkezettel, míg a dimer natív-szerű, a monomernél kompaktabb konformációval jellemezhető (a dimer jól közelíti az azonos molekulatömegű globuláris fehérje natív állapotára jellemző Stokes-sugarat).

	Elméleti értékek		Kísérleti értékek	
	monomer	dimer	monomer	dimer
Molekulatömeg, kDa	24,8	49,6	32,4	45,2
Stokes-sugár ( $R_s$ ), Å				
$R_s^N$	23,2	29,7	26,5	30,7

**7. táblázat** Elméleti és kísérletesen meghatározott értékek ( $R_s$ , Mw) a különböző TPPP/p25 specieszek esetében.  $R_s^N$  az azonos molekulatömegű globuláris fehérje Stokes-sugarát mutatja meg (natív, N). A kísérleti  $R_s$  értéket, valamint a látszólagos molekulatömeget a gélszűrés alapján határoztam meg. Az elméleti  $R_s$  kiszámítása az „Uversky-féle összefüggés” alapján történt (ld. 4.5.4.).

A fehérjecsúcsok ismételt kromatografálásával vizsgáltam a monomer és a dimer forma koncentrációfüggő reverzibilis egyensúlyát. A TPPP/p25 (560  $\mu$ M) gélszűrése során a csúcsmaximumnál eluálódott dimer és monomer frakciót ismét oszlopra vittem (36. A, B ábra). A monomer frakció esetén egy, a monomer formára jellemző csúcs (36. A ábra) jelent meg, míg a dimer frakciónál, melyet DTE-vel redukáltam, két speciesz jelent meg, a monomer és a dimer formának megfelelő helyeken (36. B ábra). A redukció és az ismételt kromatográfia miatti jelentős hígulás a disszociáció felé tolta el az egyensúlyt, ami tükröződik az elúciós profilban.



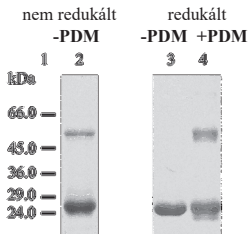
**36. ábra** A TPPP/p25 monomer és dimer frakcióinak kromatográfiás vizsgálata. **(A)** A monomer frakció (55  $\mu$ M) elúciós diagramja. **(B)** A dimer frakció (20  $\mu$ M) elúciós diagramja 0,5 mM-os DTE-s kezelés után. Az UV jelet 280 nm-en detektáltam.

A TPPP/p25 fehérjében három cisztein oldallánc található (Cys<sup>80</sup>, Cys<sup>83</sup> és Cys<sup>108</sup>), melyek a fehérjeláncon belül intramolekuláris illetve egy másik polipeptidlánc Cys oldalláncával intermolekuláris diszulfid-kötést alakíthatnak ki. Csoportunkban megmutatták, hogy a redukálószerrel kezelt fehérje esetén gyakorlatilag mindhárom ciszteinil oldallánc ( $2,7 \pm 0,2$ ) reakcióba lép az Ellmann reagenssel, viszont nem redukáló közegben a reagáló tiol-csoportok száma kevesebb ( $1,1 \pm 0,2$ ). Mindez bizonyítja, hogy diszulfid hidak képesek kialakulni a TPPP/p25-ben, melyet a fehérjekoncentráció és az oxidációs körülmények (pl. inkubációs idő) nagyban befolyásolnak (Oláh et al., 2012).

#### 5.4.2. Stabil dimer TPPP/p25 előállítás és izolálása

Annak érdekében, hogy különböző koncentráció és kísérleti körülmények között tanulmányozhassuk a dimer és a monomer TPPP/p25 funkcionális potenciálját, kémiai és enzimatisz keresztkötéssel stabilizáltuk és izoláltuk a dimer formát. A kémiai keresztkötéshez az ismert PDM reagenst választottuk, mely a fehérje szulfhidril (-SH) csoportjaival reagál és a Cys oldalláncokat redukáló ágensekkel szemben ellenálló kovalens kötéssel összekapcsolja. Mivel a TPPP/p25 diszulfid hidak kialakítására hajlamos, így a kémiai keresztkötést a fehérje redukálása után hajtottuk végre. Mint azt a 37. ábra mutatja, abban az esetben, amikor a rendszer nem tartalmazott keresztkötő reagenst, a monomer és dimer formában előforduló TPPP/p25 redukáló közegben csak monomerként jelent meg, míg a PDM-del kezelt fehérje esetén stabil dimer formát azonosítottunk. A fehérjében három szulfhidril csoport található, így fennáll a lehetőség mind az intra-, mind az intermolekuláris keresztkötés kialakulására.





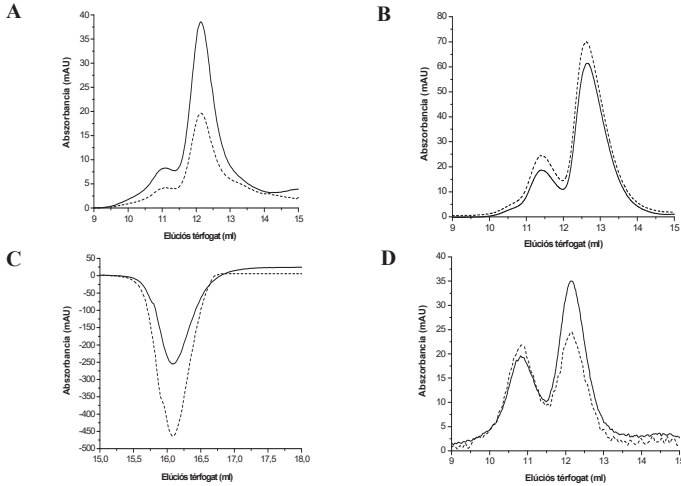
**37. ábra A TPPP/p25 kémiai keresztkötése PDM reagenssel.** SDS gékép redukáló és nem redukáló körülmények között. **1:** molekulásúly marker, **2:** nem redukált TPPP/p25, **3:** TPPP/p25 redukálószer mellett, **4:** PDM-del kezelt TPPP/p25 redukálószer mellett. A TPPP/p25 200  $\mu\text{M}$ , a PDM 400  $\mu\text{M}$ , a redukálószer 2 mM  $\beta$ -merkaptóetanol és 1 mM DTE volt. Reakcióidő 60 perc. Minden esetben 10  $\mu\text{g}$  fehérjét vittünk a géltre. A gélcsávok kvantitatív kiértékelése alapján a keresztkötött mintában 71% a monomer és 29% a dimer.

A 38. B ábra mutatja a kémiai keresztkötéssel stabilizált dimer forma elúciós profilját a fentiekben bemutatott kromatográfias rendszerben (ld. 35. B ábra). A keresztkötött minta esetében a monomer és a dimer forma nagyobb elúciós térfogattal ( $\Delta V_e \sim 0,4$  ml) jellemezhető, mint a kontroll fehérje. Az eltérő viselkedést az SDS géképben is megfigyelhettük, a keresztkötött minta a nem kezelt mintától eltérő migrációs mintázatot mutat, ami a monomereken belül intramolekuláris, míg a dimerek esetében intra- és/vagy intermolekuláris keresztkötésre utal (ld. 37. ábra). Az eluált minták abszorpcióját 280 és 254 nm-en detektáltam, ami lehetőséget adott arra, hogy a keresztkötés mértékéről információt szerezzünk (38. B ábra), ismerve a fehérje és a PDM moláris extinkciós koefficiensét és eltérő abszorpcióját a két hullámhosszon.

$$A_{280} = [\text{TPPP/p25}] \cdot A_{\text{TPPP/p25-280}} + [\text{PDM}] \cdot A_{\text{PDM-280}} \quad (1)$$

$$A_{254} = [\text{TPPP/p25}] \cdot A_{\text{TPPP/p25-254}} + [\text{PDM}] \cdot A_{\text{PDM-254}} \quad (2)$$

ahol  $A_{280}$  és  $A_{254}$  a csúcsintenzitás PDM jelenlétében, míg  $A_{\text{TPPP/p25}}$  és  $A_{\text{PDM}}$  specifikus intenzitás, 1  $\mu\text{M}$  TPPP/p25-re illetve 1  $\mu\text{M}$  PDM-re jellemző abszorpció az adott hullámhosszon.



**38. ábra** A keresztkötés és a GTP-kötés tanulmányozása analitikai gélzúréssel. (A) 120  $\mu\text{M}$  TPPP/p25. (B) PDM-del kezelt 200  $\mu\text{M}$  TPPP/p25. (C) Az 500  $\mu\text{M}$  GTP-t és 3 mM  $\text{MgCl}_2$ -ot tartalmazó pufferrel egyensúlyba hozott oszlopra injektált GTP-mentes puffer. (D) Az oszlopra injektált 120  $\mu\text{M}$  TPPP/p25 minta, amit 500  $\mu\text{M}$  MgGTP-vel inkubáltam. Az abszorbanciát két hullámhosszon detektáltam: 280 nm (vékony), 254 nm (szaggatott).

Az egyenletek (1-2) segítségével a TPPP/p25 és a PDM koncentrációarányát meghatároztuk a monomer (TPPP/p25:PDM 1:0,7) és a dimer csúcs esetében (TPPP/p25:PDM 1:1,8), ami azt mutatja, hogy a dimer formához kötött PDM mennyisége nagyobb. Keresztkötés hatására a monomerek egy része intermolekuláris diszulfid hidakon keresztül stabil dimert képez, azonban a monomer forma esetén a PDM intramolekuláris keresztkötést hozhat létre, illetve az is lehetséges, hogy csak az egyik reaktív szulfhidril csoporthoz kötődik.

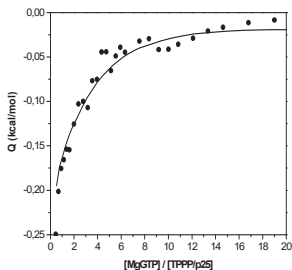
### 5.4.3. GTP-indukált dimerizáció

Mint azt a fentiekben megmutattam, a TPPP/p25 GTP-kötő fehérje és GTPáz aktivitással rendelkezik. Analitikai gélzúréssel tanulmányoztam a GTP-nek a TPPP/p25 dimerizációjára gyakorolt hatását (38. A és D ábra). A kísérletben a kontrollhoz képest a gélzúró oszlopot GTP-t tartalmazó pufferrel hoztam egyensúlyba, melynek a koncentrációja megegyezett az oszlopra felvitt TPPP/p25 oldat GTP tartalmával. Az eluált fehérjefrakciók detektálása ebben az esetben is 280 illetve 254 nm-en történt, hogy a fehérje által megkötött GTP mennyiségét meg tudjam határozni. Mint az a 38. D ábrán látható i) GTP hatására a

kontrollhoz képest a monomer/dimer arány megváltozott (amit a specieszek csúcsintenzitás aránya jelez), GTP hatására a kisebb elúciós térfogattal jellemezhető dimer forma relatív aránya megnőtt a monomerhez képest, ii) a dimer forma esetében a 254 nm-en detektált abszorpció jelentősen megnőtt a 280 nm-en mérthoz képest. A moláris extinkciós koeficiens értékeket felhasználva az elméletileg meghatározott  $A_{280}/A_{254}$  arány a TPPP/p25 esetében 1,7 és GTP-re 0,5; ami jó egyezést mutat a kísérlet során meghatározott értékekkel (38. A, C ábra). GTP mellett az  $A_{280}/A_{254}$  arány 1,4 és 0,9 volt a monomer és a dimer csúcsok esetében. Mindez azt mutatja, hogy a GTP, bár mindkét specieszhez kötődik, de preferenciálisan a dimer formához; ezáltal a monomer-dimer egyensúly a dimerizáció irányába tolódik el. Megállapítottuk, hogy a dimer forma egy nagyságrenddel szorosabban köti a nukleotidot, mint a monomer forma,  $K_{m-GTP}$ : 2000  $\mu$ M,  $K_{d1-GTP} = K_{d2-GTP} = 200$   $\mu$ M, két azonos és független kötőhelyet feltételezve a dimer TPPP/p25-ön. Továbbá a monomer-dimer egyensúlyra jellemző disszociációs állandó,  $K_{m-d} = 400 \pm 45$   $\mu$ M -nak bizonyult (ld. Függelék (3)-(7) egyenlet).

#### ***A GTP-kötés termodinamikai paramétereinek meghatározása***

A  $Zn^{2+}$ -titrálásnál bemutatott ITC méréshez hasonlóan a GTP TPPP/p25-höz való kötődése során fellépő hőváltozást detektáltuk, mint azt a 39. ábra mutatja. A TPPP/p25 és a MgGTP kölcsönhatásának vizsgálatához a MgGTP tömény oldatát a referenciacellába, a fehérjéjét pedig a mintacellába töltöttük és a fehérjéhez kis lépésekben MgGTP-t injektáltunk. Az egyes injektálási lépéseket hőfelszabadulás kísérte, ami jelezte, hogy a nukleotid kötődése exoterm folyamat. Egy fehérje és egy ligandum asszociációja során a titrálási görbe inflexiós pontját felhasználhatjuk a kötési sztöchiometria (n) meghatározására. Azonban a TPPP/p25 esetében erre nincs lehetőségünk, mivel a GTP kötődése komplex folyamat, a nukleotid mind a monomer, mind a dimer specieszhez kötődik és elősegíti a dimerizációt.

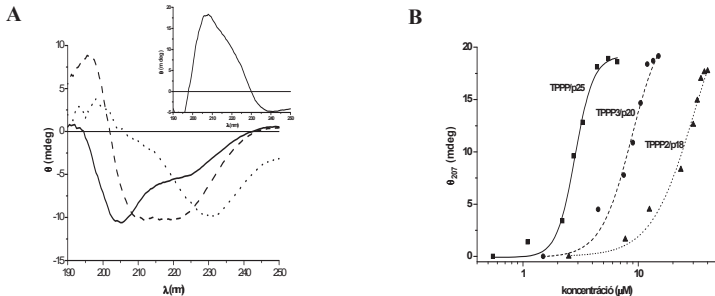


**39. ábra** A TPPP/p25 GTP-kötésének vizsgálata ITC-vel. Direkt titrálási mód: a referenciacellába 3,7 mM MgGTP-t, a mintacellába 32  $\mu$ M TPPP/p25-öt töltöttünk. A görbét a többszörös egyensúlyi rendszer leírására kidolgozott modell segítségével illesztettük (ld. Függelék 11. táblázat).

Mivel ennek a komplex rendszernek a titrálási görbéjét nem tudtuk a szoftver beépített modelljeivel illeszteni, ezért a többszörös egyensúlyi rendszer leírására csoportunkból Oláh Judit egy matematikai modellt állított fel, hogy a monomer és a dimer TPPP/p25 GTP-kötését és a GTP-kötés többszörös egyensúlyi rendszerre gyakorolt hatását értelmezzük és meghatározzuk a termodinamikai paramétereket (ld. Függelék 11. táblázat). A modellezés alapjául szolgáló paramétereket a gélszűrés alapján határoztuk meg, továbbá ITC segítségével megmértük a dimer TPPP/p25 disszociációját kísérő entalpiaváltozást (ld. Függelék 48. ábra). Ezen adatokat felhasználva a modell segítségével le tudtuk írni a GTP hatását a többszörös egyensúlyi rendszerre (ld. Függelék 46. ábra).

#### **5.4.4. A TPPP fehérjék kölcsönhatása tubulinnal**

A TPPP/p25 elsődleges intracelluláris kölcsönható partnere a mikrotubuláris rendszer, melynek dinamikáját és stabilitását szabályozza kötegelő aktivitása révén (Lehotzky et al., 2004). *In vitro* rendszerekben a tubulin és a TPPP/p25 kölcsönhatását csoportunk különböző biofizikai és biokémiai módszerekkel jellemezte és a funkcionális vizsgálatokhoz *in vitro* tubulinpolimerizációs mérést, a turbidimetriás módszert alkalmazták/alkalmazzuk (Hlavanda et al., 2007; Hlavanda et al., 2002; Tirián et al., 2003). A módszer a TPPP/p25 hatására keletkezett tubulin polimerek okozta zavarosság mérésén alapul. A TPPP/p25-höz kötődő ligandumok hatásának jellemzésére ezt a jól bevált módszert alkalmaztam. A TPPP/p25 kötődése a tubulinhoz másodlagos szerkezetváltozással jár, mely távoli-UV CD spektroszkópiás módszerrel detektálható és a differencia ellipticitás alkalmas a két fehérje kölcsönhatásának jellemzésére (Hlavanda et al., 2002), következésképpen a TPPP fehérjék tubulin-kötő képességének összevetésére.



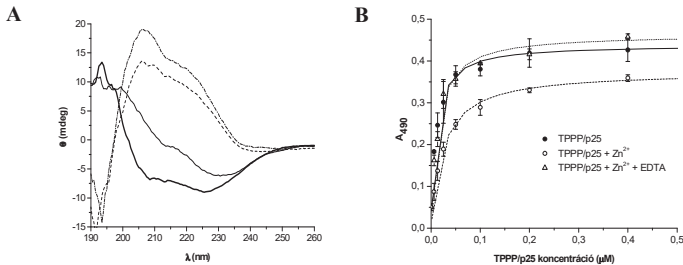
**40. ábra** A TPPP fehérjék és a tubulin kölcsönhatásának vizsgálata távoli-UV CD spektroszkópiával. **(A)** A TPPP/p25 és a tubulin kölcsönhatása. A mért egyedi spektrumok: 4  $\mu\text{M}$  TPPP/p25 (vékony), 1  $\mu\text{M}$  tubulin (szaggatott), a mért komplex spektrum (pontozott). **(Inszert)** Differenciaspektrum 4  $\mu\text{M}$  TPPP/p25 és 1  $\mu\text{M}$  tubulin kölcsönhatásakor. **(B)** A TPPP fehérjék differenciaspektrumának maximum értéke a fehérjekoncentráció függvényében, 1  $\mu\text{M}$  tubulin mellett.

A 40. A ábrán bemutatott eredmények alapján megállapítható, hogy a TPPP/p25-tubulin komplex kialakulása másodlagos szerkezetváltozással jár, jelentős változás a rendezetlen régióban (a random coil 200-205 nm környékén ad intenzív jelet) történt. Tekintve, hogy a tubulin határozott másodlagos és harmadlagos szerkezettel rendelkezik, valószínű, hogy a rendezetlen TPPP/p25 szerkezetében következik be konformációváltozás, ami egy ismert jelenség a rendezetlen fehérjék partnerükhöz való kötődése során. A TPPP fehérjék differenciaspektrum maximum értékeinek koncentrációfüggéséből kapott telítési görbék alapján a homológ fehérjék jelentős affinitásbeli különbséget mutatnak a tubulinhoz való kötődésükben ( $\text{EC}_{50}$  érték): TPPP/p25:  $2,5 \pm 0,1 \mu\text{M}$ ; TPPP/p20:  $8,0 \pm 0,6 \mu\text{M}$ ; TPPP/p18:  $25,0 \pm 5,4 \mu\text{M}$  (40. B ábra).

Az eredményeket csoportunk felületi plazmon rezonancia mérései is alátámasztották, miszerint a tubulinnal való kölcsönhatás erősségében egy nagyságrendnyi különbség mutatkozik a TPPP/p25 és a TPPP/p18 között (Vincze et al., 2006). A két rövidebb homológ, a TPPP/p20 és a TPPP/p18, melyekből hiányzik a TPPP/p25 rendezetlen N-terminális része (ld. 6. ábra), eltérő affinitással kötődnek a tubulinhoz. Ez a megfigyelés *in vivo* kísérletekben is igazolódott, ellentétben a két másik fehérjével a TPPP/p18 homogénen oszlik el a citoszolban és nem asszociál a mikrotubuláris vázhoz (Vincze et al., 2006).

### A fémkötés funkcionális vonatkozásai

A TPPP/p25 és a tubulin kölcsönhatásának vizsgálatában alkalmazott CD spektroszkópiás méréseket végeztem a  $Zn^{2+}$  hatásának tanulmányozására. A 41. A ábra mutatja, hogy  $Zn^{2+}$  jelenlétében a 200-230 nm körüli régióban jelentős spektrális változás következik be, ami a TPPP/p25-tubulin komplex  $\alpha/\beta$  szerkezetében bekövetkező változásnak tehető be.



**41. ábra  $Zn^{2+}$  hatása a TPPP/p25-tubulin kölcsönhatásra (1).** (A) Távoli-UV CD spektrumok: 4  $\mu M$  TPPP/p25 és 1  $\mu M$  tubulin komplex spektruma (vastag), TPPP/p25-tubulin komplex 200  $\mu M$   $Zn^{2+}$  mellett (vékony). A TPPP/p25-tubulin komplex differenciaspektruma (szaggatott) és a termer komplexé (szaggatott-pontozott). A differenciaspektrumok számításánál a mért komplex spektrumból levontam a fehérjék egyedi spektrumának az összegét. (B) ELISA kísérlet. A lemezhez tubulint (5  $\mu g/ml$ ) immobilizáltunk és különböző koncentrációjú TPPP/p25 oldattal inkubáltuk (●), 100  $\mu M$   $Zn^{2+}$  jelenlétében (○), illetve 100  $\mu M$   $Zn^{2+}$  és 500  $\mu M$  EDTA mellett (△).

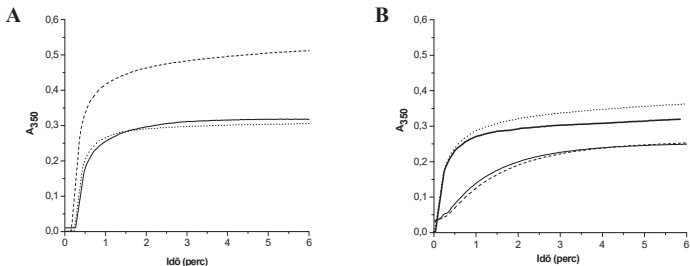
Ha a termer és a biner komplexből származtatható differenciaspektrumok maximum értékeit összehasonlítjuk,  $\theta_{207, \text{termer}} = 19$  mdeg és  $\theta_{207, \text{biner}} = 13$  mdeg, láthatjuk, hogy a fémion növeli az ellipticitás-különbséget, tehát nem gátolja meg a TPPP/p25-tubulin komplexképződést. A jelnövekedés a másodlagos szerkezeti elemek arányában bekövetkező változásra vezethető vissza, ami a komplex szerkezetén keresztül nyilvánul meg.

ELISA kísérlettel azt vizsgáltuk, hogy a két fehérje közötti kölcsönhatást miként befolyásolja a  $Zn^{2+}$ . A kísérlet során a szilárd fázishoz tubulint immobilizáltunk és ehhez  $Zn^{2+}$  jelenlétében különböző koncentrációjú TPPP/p25 oldatot adtunk. A jelintenzitást (amely arányos a megkötött TPPP/p25 mennyiségével) a TPPP/p25 koncentrációjának függvényében a 41. B ábra mutatja be. A  $Zn^{2+}$  hatását EDTA mellett is vizsgáltuk, amelyről köztudott, hogy nagy stabilitású komplexet képez a kétértékű fémionnal. A látszólagos disszociációs állandó meghatározásához a telítési görbe pontjaira hiperbolát illesztettünk. A látszólagos  $K_d$  értékek alapján a TPPP/p25 és a tubulin kölcsönhatása szoros ( $K_d = 10,0 \pm 1,6$  nM),  $Zn^{2+}$  jelenlétében a kölcsönhatás gyengébb ( $K_d = 24,2 \pm 3,9$  nM), azonban a kétszeres  $K_d$  érték nem utal nagy különbségre. Továbbá az EDTA, a várákozásnak megfelelően felfüggesztette a  $Zn^{2+}$  hatását

( $K_d = 13,3 \pm 2,2$  nM). Mivel a CD mérésnél a fémkötés hatására nem gyengült a két fehérje közötti kölcsönhatás, ezért valószínű, hogy az ELISA-nál tapasztalt jelcsökkenés az immunkomplex szerkezetének megváltozására vezethető vissza (a  $Zn^{2+}$ -indukált szerkezetváltozás miatt az ellenanyag (anti-TPPP/p25) kevésbé fér hozzá a TPPP/p25 epitóp régiójához). Ennek igazolására  $Zn^{2+}$  mellett TPPP/p25-öt immobilizáltunk a lemezhez, ehhez adtuk a tubulint, majd elsődleges ellenanyaggal inkubáltuk (monoklonális anti-TPPP/p25). Az így meghatározott látszólagos  $K_d$  szintén gyengébb kölcsönhatásra utalt (ábra nélkül). Fontos megjegyezni, hogy az ELISA kísérletben nem a TPPP/p25-tubulin kölcsönhatást látjuk közvetlenül, hanem a kialakuló komplexet detektáljuk az ellenanyagok segítségével.

A fentiek alapján megállapítható, hogy a  $Zn^{2+}$  kötődése a TPPP/p25-höz nem befolyásolja jelentősen a TPPP/p25 és a tubulin kölcsönhatását.

Ezzel összhangban a 42. A ábra mutatja, hogy a  $Zn^{2+}$  mellett a TPPP/p25 megtartja tubulinpolimerizáló aktivitását, sőt a kontrollhoz képest a gyors abszorpciós-növekedés (elongációs fázis) követően az egyensúlyi fázis magasabb abszorbancia értékéknél áll be (kb. 60%-os növekedés).  $Ca^{2+}$  jelenlétében a kontrollal szinte azonos lefutású polimerizációs görbét kaptunk, ami a  $Zn^{2+}$  specifikus hatására utal.

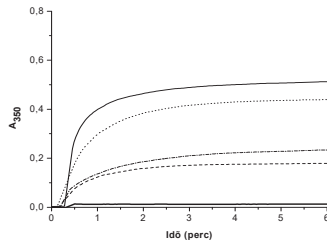


**42. ábra  $Zn^{2+}$  hatása a TPPP/p25-tubulin kölcsönhatásra (2).** (A)  $Zn^{2+}$  hatása a tubulin polimerizációjára. TPPP/p25-indukált tubulinpolimerizáció (vékony), 100  $\mu$ M  $Zn^{2+}$  jelenlétében (szaggatott) vagy 100  $\mu$ M  $Ca^{2+}$  jelenlétében (pontosított). (B) TPPP3/p20-indukált tubulinpolimerizáció (vastag) 100  $\mu$ M  $Zn^{2+}$  jelenlétében (pontosított). Taxollal-indukált tubulinpolimerizáció (vékony) 100  $\mu$ M  $Zn^{2+}$  jelenlétében (szaggatott). A turbiditásmérésnél alkalmazott végkoncentrációk: tubulin 8  $\mu$ M; TPPP/p25 1,75  $\mu$ M; TPPP3/p20 6  $\mu$ M; taxol 20  $\mu$ M; a mérést 37°C-on végeztük.

Annak eldöntésére, hogy a fokozott tubulinpolimerizáló aktivitás a TPPP/p25 szerkezetében bekövetkezett változásokból ered, vagy fennáll a lehetősége annak, hogy a  $Zn^{2+}$  a tubulinon keresztül fejti ki a hatását, a következő kísérleteket végeztük: TPPP/p25-mentes kísérleti elrendezésben, taxollal illetve TPPP3/p20-szal segítettük elő a tubulin heterodimerek

polimerizációját (42. B ábra). Csoportunk eredményei korábban már igazolták, hogy a TPPP/p25 mellett a TPPP3/p20 is rendelkezik tubulinpolimerizáló aktivitással (Vincez et al., 2006). Másik jelöltünk a taxol volt, amelyről ismert, hogy felgyorsítja a tubulin polimerizációját és stabilizálja a mikrotubulusokat. A 42. B ábra mutatja, hogy  $Zn^{2+}$  hatására egyik esetben sem tapasztaltunk változást a tubulinpolimerizáció sebességében illetve mértékében. Az eredmények alapján megállapítható, hogy a változás specifikus a TPPP/p25-re nézve, a  $Zn^{2+}$  a TPPP/p25-höz való kötődése révén fejti ki a hatását.

A  $Zn^{2+}$ -kel ellentétben a GTP-kötés nem lokális konformációváltozást idéz elő, hanem elősegíti a TPPP/p25 dimerizációját. Annak a kérdésnek a megválaszolására, hogy az oligomerizációnak milyen hatása van a TPPP/p25 tubulinpolimerizáló képességére a következő kísérletet terveztük. Ismert, hogy az *in vitro* polimerizációs teszt viszonylag alacsony tubulin illetve TPPP/p25 koncentrációk mellett (3-7  $\mu M$ ) követhető spektrofotometriás módszerrel. Azonos fehérje végkoncentrációkat érhetünk el, ha tömény (400  $\mu M$ ) TPPP/p25 törzsoldatból adva indítjuk el a tubulinpolimerizációt, illetve a küvettában eleve meghígult (3  $\mu M$ ) TPPP/p25-höz adjuk a tubulint. A két típusú kísérlet eredményét mutatja be a 43. ábra. Abban az esetben, ha a reakciót a tubulin hozzáadásával indítottam, a meghígult (disszociált) TPPP/p25 polimerizációt indukáló potenciálja kisebb, ellentétben a tubulinhoz adott tömény TPPP/p25-tel (nem disszociált). Látható a két polimerizációs görbe közötti differencia, amit a TPPP/p25 különböző dimerizációs állapotával lehet magyarázni, azaz a töményebb, még nem (teljesen) disszociált forma lényegesen aktívabb, mint az azonos koncentrációjú disszociált fehérje.



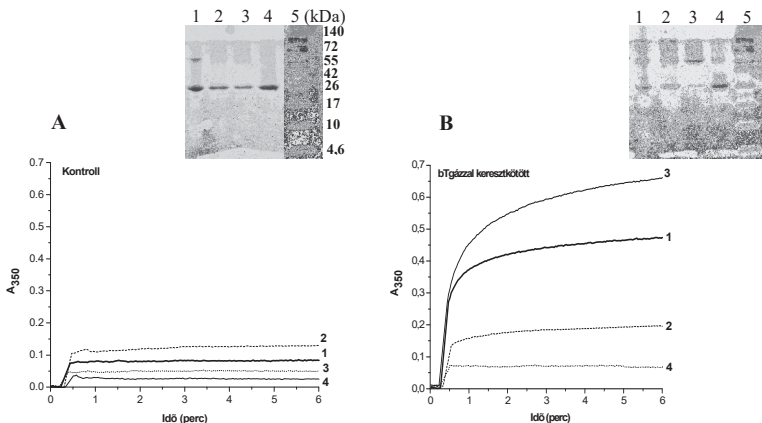
**43. ábra TPPP/p25 indukált tubulinpolimerizáció monomer-dimer egyensúlytól való függése.** A TPPP/p25 oldat disszociációjának és a GTP hatása a tubulinpolimerizációra. Tömény TPPP/p25-tel (400  $\mu M$ ) indított polimerizáció (vékony), a küvettában előzetesen inkubált (meghígított) TPPP/p25-höz tubulint adtunk (szagattott) 500  $\mu M$  GTP (pontozott) vagy 500  $\mu M$  GDP (pontozott-szagattott) jelenlétében. TPPP/p25-mentes tubulinpolimerizáció 500  $\mu M$  GTP mellett (vastag vonal). A TPPP/p25 és a tubulin végkoncentrációja a küvettában minden esetben 3  $\mu M$  és 7  $\mu M$  volt.



A GTP dimerizációt elősegítő hatását és ennek funkcionális következményeit mutatja a 43. ábra. Abban az esetben, amikor a kontrollhoz képest magasabb GTP-tartalmú rendszerben vizsgáltam a meghígult TPPP/p25 polimerizációs potenciálját, azt tapasztaltam, hogy a fehérje disszociációja miatt csökkent polimerizációt a GTP részlegesen kivédi (43. ábra), ami összhangban van a gélszűrés eredményével, miszerint a GTP a monomer-dimer egyensúlyt a dimerképződés irányába tolja el (ld. 38. D ábra). GDP esetében nem tapasztaltam ilyen hatást, továbbá TPPP/p25 távollétében a GTP nem volt hatással a MAP-mentes tubulinpolimerizációra.

#### A funkcionálisan aktív fehérjeforma azonosítása

Annak bizonyítására, hogy a dimer formának meghatározó szerepe van a mikrotubulusképződés folyamatában, a fentiekhez hasonló kísérletet végeztem enzimatikusan keresztkötött TPPP/p25-tel. A kísérlet során a kontroll és a keresztkötött TPPP/p25 specieszeket analitikai gélszűréssel elválasztottam és az így izolált fehérjeformák (monomer, dimer, oligomer) tubulinpolimerizáló képességét vizsgáltam (44. ábra).



**44. ábra A különböző fehérjeformák hatása a tubulinpolimerizációra.** Kontroll, nem keresztkötött (A) és bakteriális TGázzal (14  $\mu$ M) keresztkötött TPPP/p25 (400  $\mu$ M) (B) vizsgálata 7%-os Tricines SDS gélen és tubulinpolimerizációval. 1. oszlopra felvitt TPPP/p25 (nem szeparált), 2. oligomer frakció, 3. dimer frakció, 4. monomer frakció, 5. molekulaszúlya marker. A TPPP/p25 és a tubulin végkoncentrációja a kuvettában minden esetben 6  $\mu$ M és 7  $\mu$ M volt. A ábra esetén az 1-es minta redukálószer-mentes. Minden esetben a kuvettában lévő mintához tubulint adtunk.

A gélszűrés során felhasznált oldat magas koncentrációban redukálószerrel tartalmazott, így a gélen monomer formában azonosítottam a nem keresztkötött izolált fehérjefrakciókat (44. A ábra). A nem szeparált és nem keresztkötött TPPP/p25 jellemzően monomer és dimer formában van jelen, ugyanis ezt a mintát nem redukáltam. Az egyes minták tubulinpolimerizáló képességének vizsgálata során tubulint ( $7 \mu\text{M}$ ) adtam a küvettában lévő oszlopra felvitt, oligomer, dimer vagy monomer ( $6 \mu\text{M}$ ) formához. A kontroll, nem keresztkötött frakciók a disszociáció miatt minimális polimerizációs aktivitást mutattak (44. A ábra). A bTGázzal keresztkötött és izolált minták vizsgálata során a keresztkötés után stabil, SDS-rezisztens dimer és magasabb molekulatömegű oligomer formákat azonosítottam (44. B ábra). A keresztkötéssel stabilizált formák közül a dimer a legaktívabb, míg a monomer nem mutatott aktivitást (44. B ábra). Az oligomer forma alacsony aktivitását magyarázhatja, hogy ez a frakció részben dimert is tartalmaz (ld. gélkép). Ezzel a kísérlettel egyértelműen bizonyítottam, hogy *in vitro* a dimer TPPP/p25 a funkcionálisan aktív, tubulin polimerizációt indukálni képes forma.

## 6. Megbeszélés

Kutatásaim fókuszában a TPPP/p25 áll, amelyről a munkám kezdetén ismert volt, hogy nem rendelkezik jól meghatározott térszerkezettel, fiziológiás célpontja a mikrotubuláris rendszer, míg patológiásan az  $\alpha$ -szinukleinnel együtt felhalmozódik a szinukleinpátiákra jellemző zárványtestekben (Hlavanda et al., 2002; Kovacs et al., 2004; Tirián et al., 2003). A TPPP/p25 normál agyszövetben elsősorban az érett, differenciálódott oligodendroglia sejtekben fordul elő (Kovacs et al., 2007; Takahashi et al., 1993), amelyek az axonok körüli velőshüvely kialakításában játszanak szerepet és nélkülözhetetlenek a normál ingerületátvitelhez. Kutatócsoportunk célja a TPPP/p25 fiziológiás és patológiás folyamatokban betöltött szerepének molekuláris szintű megismerése. Csoportunk célja annak megértése, hogy a rendezetlen TPPP/p25 milyen szerepet játszik a mikrotubuláris rendszer dinamikájának szabályozásában illetve bizonyos neurodegeneratív betegségek esetén a zárványtestképződésben. Doktori munkám során számos alapvetően fontos kérdésre sikerült választ kapnom.

A TPPP/p25 rendezetlenségét az aminosav-szekvencia információtartalmán alapuló *in silico* programokkal és kísérletesen egyaránt vizsgáltam. A PONDR<sup>®</sup> VL-XT, az IUPred és a FoldIndex predikciós algoritmusok nagyon hasonló eredményt mutattak miszerint, a fehérje N-terminális régiója rendezetlennek tekinthető. A töltés-hidrofóbicitás plot megmutatta, hogy a fehérje szerkezeti rendezetlensége speciális aminosav-összetételével magyarázható. Különböző szerkezetvizsgáló módszerekkel kísérletesen mutattam rá a TPPP/p25 rendezetlenségére. A távoli-UV CD jel a TPPP/p25 szerkezeti rendezetlenségére utal, ezzel összhangban az alacsony komplexitású közeli-UV jel a stabil térszerkezet hiányát jelzi. Csoportunk azonosított két, TPPP/p25-tel homológ fehérjét, a TPPP2/p18-at és a TPPP3/p20-at, melyekből hiányzik a TPPP/p25 rendezetlen N-terminális régiója (Vincze et al., 2006). A TPPP fehérjék *in silico* és kísérletes összehasonlító vizsgálatainak eredményei megmutatták, hogy az elsődleges szerkezetben mutatkozó hasonlóság nem igazán tükröződik sem a konformációs jegyekben, sem a tubulinnal szemben mutatott affinitásban: a legrendezetlenebb TPPP/p25 kötődik a legszorosabban a tubulinhoz és jelentős tubulinpolimerizációs potenciállal rendelkezik. A multinukleáris NMR spektroszkópia eredmények megmutatták, hogy a fehérje N- és C-terminális szegmense (45 és 44 as) rendezetlen, amelyek közrefognak egy rendkívül flexibilis régiót (130 as) (Zotter et al., 2011a).

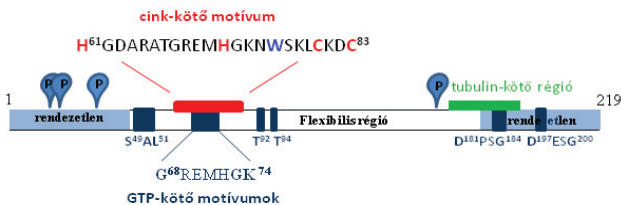
Az ANS fluoreszcencia mérés alkalmas a fehérjék szerkezeti jellegzetességeinek azonosítására (Uversky, 2002a), így a hidrofób festék alkalmazásával a rendezetlen TPPP/p25

esetén a (pre)molten globule állapotot lehetett kimutatni. A TPPP/p25 rendezetlenségére utal az is, hogy a Trp emissziós maximum pozíciója ( $\lambda_{\max}$ : ~340 nm) a rendezetlen fehérjékre jellemzően magas hullámhossznál jelenik meg (Neyroz és Ciurli, 2012). Megfigyelésemet, miszerint a TPPP fehérjék közül a TPPP/p25 a legkevésbé rendezett, kutatócsoportunk differenciál pásztázó kalorimetria méréssel is bizonyította. Az olvadási hőmérséklet és az olvadást kísérő entalpiaváltozás a TPPP/p25-nél volt a legalacsonyabb, ami a térszerkezetet stabilizáló elemek alacsony előfordulási arányára utal (Vincze et al., 2006). Ezzel összhangban, míg Aramini és csoportja megmutatta, hogy a TPPP3/p20 szerkezete NMR spektroszkópia alapján egy rendezett belső régiót tartalmaz (6-101 as) (<http://www.pdb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=2JRF>) (Aramini et al., 2007), addig az NMR mérés a TPPP/p25 szerkezeti rendezetlenségét bizonyította.

Megállapítottam, hogy a TPPP fehérjék szerkezeti sajátságukból eredően funkcionális tulajdonságaikban is eltérnek. Valamennyi TPPP fehérje kötődik a tubulinhoz, azonban a kölcsönhatás erőssége eltérő, továbbá különböznek tubulinpolimerizáló képességükben. A TPPP/p25 és a TPPP3/p20 tubulinpolimerizáló aktivitással rendelkezik, szemben a TPPP2/p18-cal (ábra nélkül). *In vitro* megfigyeléseimet alátámasztotta az Ovádi csoport humán sejtvonalakkal foglalkozó részlege, miszerint *in vivo* a TPPP fehérjék valóban eltérnek tubulin-kötő és polimerizáló képességükben. A TPPP3/p20 és TPPP/p25 stabilizálja a mikrotubuláris hálózatot, kivédik az antimitotikus szerek hatását, azonban a TPPP2/p18 nem mutatott ilyen aktivitást, homogéne oszlik el a citoszolban és nem asszociál a mikrotubuláris vázhoz (Vincze et al., 2006). A megfigyelés arra enged következtetni, hogy a rendezetlen N-terminális régió - ami a két rövidebb TPPP fehérjéből hiányzik - nem játszik közvetlen szerepet a tubulin-kötésben, ami nem meglepő, hiszen a tau fehérje tubulin-kötő régiójával homológ szekvencia elem a TPPP/p25 C-terminálisának közelében található (163-187 as) (Hlavanda et al., 2007). Összhangban az *in vivo* eredményekkel, a TPPP fehérjék szerkezeti különbözősége megnyilvánul a tubulin-kötésben és az ehhez kapcsolódó funkcionális tulajdonságaikban.

Csoportunk TPPP/p25-tel kapcsolatos korai kísérletei azt mutatták, hogy a marhaagyból izolált fehérje nem redukáló körülmények között monomer, dimer és magasabb molsúlyú oligomer formában jelent meg az SDS gélen. Mindezek alapján feltételeztük, hogy a fehérje oligomerizációra hajlamos és szerkezete intermolekuláris kölcsönhatásokon (kovalens/nem kovalens dimerizáció) keresztül stabilizálódik. SDS valamint analitikai gélzúréssel megmutattam, hogy a humán rekombináns TPPP/p25 jellemzően monomer és dimer formában van jelen, amelyek eltérő szerkezettel jellemezhetőek.

A monomer és a dimer forma látszólagos molekulatömegének aránya nem felel meg egy globuláris fehérje dimerizációjakor várható értéknek (1:2), ahol a monomer és a dimer azonos konformációjú (Tranier et al., 2002). A látszólagos Stokes-sugarak alapján megmutattam, hogy a monomer kiterjedt konformációval, míg a dimer egy kompaktabb, rendezettebb konformációval jellemezhető. Mindez arra utal, hogy a dimerizációt szerkezeti rendeződés kíséri. A TPPP/p25 dimerizációja koncentrációtól függő folyamat, amit keresztkötéssel stabilizálhatunk.



45. ábra Ligandum-kötő motívumok.  
(P) a foszforilációs helyeket jelöli.

A TPPP/p25 szekvenciavizsgálata során egy His<sub>2</sub>Cys<sub>2</sub>-típusú cink-ujj motívumot (His<sup>61</sup>(X)<sub>10</sub>His<sup>72</sup>(X)<sub>2</sub>Cys<sup>80</sup>(X)<sub>2</sub>Cys<sup>83</sup>), továbbá konzervált GTP-kötő szekvencia elemeket azonosítottam (45. ábra). A motívumok funkcionális jelentőségére utal, hogy a különböző fajokban kifejeződő TPPP/p25 fehérjék többszörös szekvenciaillesztése alapján erős konzerváltságot mutattak (ld. Függelék 9. táblázat). Ennek ismeretében a szekvencia alapján jóslott Zn<sup>2+</sup>- valamint GTP-kötődést kísérletesen igazoltam. CD és fluoreszcencia spektroszkópia, valamint ITC mérésekkel bizonyítottam a fehérje és a Zn<sup>2+</sup> kölcsönhatását, továbbá azt, hogy a Zn<sup>2+</sup>-kötés szerkezetváltozással jár, ami Zn<sup>2+</sup>-re nézve specifikus, ugyanis más kétértékű fémion esetében nem tapasztaltam hasonló változást. A Zn<sup>2+</sup>-kötés során szerkezeti átrendeződés történik a TPPP/p25 egyetlen Trp<sup>76</sup>-ját tartalmazó középső régióban, molten globule szerkezet alakul ki, mint azt az ANS-sel kimutattam (Zotter et al., 2011b). A Zn<sup>2+</sup> szerkezet-alakító hatása a TPPP3/p20 és TPPP2/p18 fehérjék esetében nem volt megfigyelhető. Ennek magyarázata lehet, hogy a két fehérje szekvenciájában a teljes His<sub>2</sub>Cys<sub>2</sub> motívum nem található meg (HisCys<sub>2</sub> illetve Cys<sub>2</sub>). A spektroszkópiás mérések arra utalnak, hogy a TPPP/p25 középső flexibilis régiója, ezen belül a His<sub>2</sub>Cys<sub>2</sub> motívum fontos szerepet játszik a Zn<sup>2+</sup>-kötésben.

Csoportunk megfigyelései alapján, a TPPP/p25 szerkezetében jóslott „stabilizációs

központok” főleg a fehérje középső régiójában helyezkednek el, jelezve, hogy ez a régió az erős hosszútávú kölcsönhatások kialakításában, ezáltal a fehérjeszerkezet stabilizálásában fontos szerepet játszik (Orosz et al., 2004). A fenti eredmények arra engednek következtetni, hogy a TPPP/p25 középső régiójában egy laza összeszerelődésű hidrofób mag található, ami a fémkötés során stabilizálódik és kialakul a molten globule állapot. A tubulin kötődése során jelentős konformációváltozás detektálható, ami nagy valószínűséggel a TPPP/p25 flexibilis régiójában bekövetkező szerkezetváltozásnak tudható be.

Csoportunk megfigyelése volt, hogy a TPPP/p25-nek sejtosztódást gátló hatása van, amit a GTP képes felfüggeszteni, mint azt a GFP-tubulint expresszáló *Drosophila* embriókon végzett kísérletek mutatták (Tirián et al., 2003). Mindezek alapján különösen érdekes volt annak a tanulmányozása, hogy a GTP milyen kapcsolatban áll a mikrotubulushoz asszociált TPPP/p25-tel. Igazoltam, hogy a TPPP/p25 valóban egy GTP-kötő fehérje, GTP-szefaróz affinitáskromatográfiával megmutattam a TPPP/p25 és a GTP direkt kölcsönhatását. Az NMR mérés közvetett bizonyítékot szolgáltatott, miszerint a fehérje középső szegmense érintett a GTP-kötésben. Ezt az indirekt következtetést Trp fluoreszcencia méréssel támasztottuk alá, a Trp<sup>76</sup> környezetét a GTP jelentősen perturbálta. Ez nem meglepő annak ismeretében, hogy a Trp<sup>76</sup> egy feltételezett GTP-kötő motívum (<sup>68</sup>GREMHGK<sup>74</sup>, P-loop) közelében található és valószínű, hogy a Trp fluoreszcencia kioltása a GTP-nek tulajdonítható.

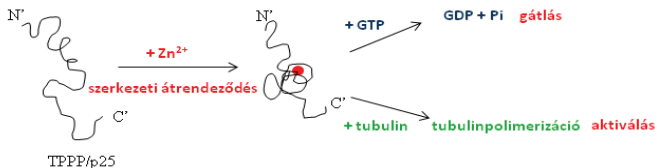
Meglepő módon a rendezetlen TPPP/p25 GTPáz aktivitást is mutat. Két független módszerrel (malachitöld reagens, <sup>31</sup>P-NMR) bizonyítottuk a fehérje Mg<sup>2+</sup>-függő GTPáz aktivitását, ami a kis G-fehérjékre jellemző érték (8. táblázat) (Zotter et al., 2011a). A kis G-fehérjék általános tulajdonsága, hogy a megfelelő aktiváló partnermolekulák nélkül csak gyenge *intrinsic* aktivitást mutatnak (Scheffzek és Ahmadian, 2005).

Fehérje	GTPáz aktivitás, $k_{cat}$ (1/perc)
Rac1	0,11 (Fiegen et al., 2004)
H-Ras	0,028 (Schweins et al., 1995)
Rap1A	0,0031 (Hart és Marshall, 1990)
Ran	0,0032 (Schweins et al., 1997)
<b>TPPP/p25</b>	0,018 (malachite assay)
	0,016 ( <sup>31</sup> P NMR)

**8. táblázat** Kis G-fehérjék *intrinsic* GTPáz aktivitása ( $k_{cat}$ , 1/perc) és a TPPP/p25-re jellemző aktivitás malachitöld reagens és <sup>31</sup>P-NMR mérés alapján.

*In vivo* körülményeket modellezve citoszolikus marhaagy extraktumból több olyan TPPP/p25 kölcsönható partnert sikerült azonosítani, amelyek GTP illetve GDP jelenlétében voltak kimutathatóak (ld. Függelék 10. ábra). Ez arra utal, hogy a nukleotid-kötésnek a fehérje-fehérje kölcsönhatások kialakításában fontos szerepe lehet. A kölcsönható partnerek lehetséges szabályozó funkciójának vizsgálata folyamatban van, célunk a megfelelő partner(ek) azonosítása (GTPáz aktiváló fehérjék, guanin nukleotid kicserélő faktorok), melyeknek ismeretében remélhetőleg sikerül majd a TPPP/p25-öt a kis G fehérje családban elhelyezni.

Megmutattam, hogy a  $Zn^{2+}$ -kötés funkcionális következményekkel jár, aktiválja a TPPP/p25-indukált tubulinpolimerizációt. Ennek szerepe lehet oligodendroglákban a sejtvázas és a velőshüvely stabilizációjában, mivel ezekben a sejtekben a  $Zn^{2+}$  fontos strukturális szerepet játszik (Kursula, 2008). Továbbá megmutattam, hogy a  $Zn^{2+}$  gátolja a TPPP/p25 GTPáz aktivitását (46. ábra).



46. ábra A  $Zn^{2+}$ -kötéshez köthető eltérő funkciók szemléltetése.

A fehérje középső flexibilis régiójában átfedő motívumok találhatóak, a cink-kötő motívum (His<sub>2</sub>Cys<sub>2</sub> 61-83 as) és egy potenciális GTP-kötő motívum (P-loop 68-74 as), így a gátló hatás lehetséges magyarázata, hogy a ligandumok között versengés alakul ki a kötőhelyekért és/vagy az aktív konformációért, ami az aktivitás csökkenését eredményezi. Ezt bizonyítják a spektroszkópiás mérések, miszerint a fehérje középső régiója érintett mind a  $Zn^{2+}$ , mind a GTP megkötésében.

Gélszűrőssel igazoltam, hogy mind a monomer, mind a dimer TPPP/p25 GTP-t köt, azonban a dimerhez nagyobb affinitással kötődik GTP. A TPPP/p25 GTP-titrálási görbét (CD és fluoreszcencia spektroszkópia illetve ITC) felhasználva, sikerült modellezni a GTP TPPP/p25-höz való kötődését. Csoportunkból Oláh Judit egy matematikai modellt állított fel, ami alkalmas volt a monomer-dimer egyensúlyt befolyásoló GTP-kötés kvantitatív jellemzésére. A modell általános érvényű olyan rendszerekre, ahol többféle fehérje speciesz vesz részt hoválozást generáló folyamatokban (Oláh et al., 2012).

Megmutattam, hogy a GTP elősegíti a fehérje dimerizációját, ami szerkezeti átrendeződéssel jár. Ez a szerkezetváltozás alapvető szerepet játszhat a TPPP/p25 enzimikus funkciójának betöltésében. A rendezetlen TPPP/p25 GTPáz aktivitásának igazolása több szempontból jelentős eredmény. Egyrészt egy „új szereplőt” azonosítottam a GTP-kötő fehérjék csoportjában, amelyek a GTP-kötésen kívül GTPáz aktivitással is rendelkezik. Másrészt kísérleti bizonyítékot szolgáltattam, hogy egy rendezetlen fehérje homológ asszociációja és az ezt kísérő szerkezetváltozások által enzimikusan aktívvá válhat. Néhány esetben az már igazolást nyert, hogy a molten globule illetve a random coil típusú szerkezet alkalmas lehet enzimikus funkció betöltésére, a partnerrel történő kölcsönhatás során fellépő szerkezeti rendeződés következtében (Vamvaca et al., 2004; Zambelli et al., 2005).

A TPPP/p25 fiziológiai funkciója a mikrotubuláris hálózat dinamikájának és stabilitásának a szabályozása. *In vitro* funkcióját tanulmányozva megmutattam, hogy a TPPP/p25 tubulinpolimerizáló képessége dimerizációtól függő folyamat, amit a fehérje koncentrációja és a GTP jelenléte nagymértékben befolyásol. A dimer formának kiemelt szerepe van a tubulinpolimerizáló aktivitásban, amelyről igazoltam, hogy a funkcionálisan aktív forma. Az a megfigyelés, hogy a rendezetlen monomerek dimerizációra hajlamosak, továbbá az egyes specieszek eltérő funkcionális tulajdonságokkal rendelkeznek, különösen fontos eredmény a fehérje funkciójának megismerése szempontjából. A dimerizációnak *in vivo* fiziológiai vonatkozásai lehetnek a mikrotubuláris rendszer szabályozásában.

A TPPP/p25 ún. *neomorphic moonlighting* tulajdonsága annak tudható be, hogy hasonlóan néhány más, patológiai folyamatokban szerepet játszó rendezetlen fehérjéhez, fiziológiai és patológiai körülmények között eltérő funkció lát el (Ovádi, 2011). Ismert, hogy a TPPP/p25 kölcsönhat az  $\alpha$ -szinukleinnel és a  $\beta$ -amiloiddal, ami aggregátumképződéshez illetve zárványtestképződéshez vezet (Kovacs et al., 2004; Lindersson et al., 2005; Oláh et al., 2011; Orosz et al., 2004; Ovádi, 2011). Egyelőre még nem bizonyított, hogy e patológiai folyamatokban milyen TPPP/p25 forma játszik szerepet. Valószínűsítjük, hogy a két rendezetlen fehérje, az  $\alpha$ -szinuklein és a TPPP/p25 monomer formáinak kölcsönhatása vezet a patológiai aggregátumok kialakulásához.



## 7. Rövidítések jegyzéke

ANS: 8-anilino-1-naftalin-szulfonsav  
ATP: adenozin-trifoszfát  
BSA: szarvasmarha szérum albumin  
bTGáz: bakteriális transzglutamináz  
CD: cirkuláris dikroizmus  
Cdk5: ciklin-dependens kináz 5  
DTE: 1,4-ditioeritritol  
EDTA: etilén-diamin-tetraecetsav  
EGTA: etilén glikol-bisz( $\beta$ -aminoetil éter)-N,N,N',N'-tetraecetsav  
ELISA: enzimhez kötött ellenanyag-vizsgálat (*Enzyme-Linked Immunosorbent assay*)  
ERK2: extracelluláris szignál-regulálta kináz 2  
FRET: fluoreszcencia rezonancia energia transzfer  
GTP: guanozin-trifoszfát  
GTPáz: guanozin trifoszfátáz  
GDP: guanozin-difoszfát  
GSK3: glikogén-szintáz-kináz 3  
HSQC: heteronukleáris egykvantumos korreláció (*Heteronuclear Single Quantum Correlation*)  
ITC: izotermális titrációs mikrokalorimetria  
IDP: eredendően rendezetlen fehérje (*Intrinsically Disordered Protein*)  
IUP: eredendően szerkezet nélküli fehérje (*Intrinsically Unstructured Protein*)  
MAP: mikrotubulushoz asszociált fehérje  
MES: 2-(N-morfolino)-etánszulfonsav  
MS: tömegspektrometria (*mass spectrometry*)  
MSA: multiszisztémás atrófia (*multiple system atrophy*)  
NATA: N-acetil-L-triptofánamid  
NMR: magmágneses rezonancia  
P<sub>i</sub>: inorganikus foszfát  
PCR: polimeráz láncreakció  
PDM: N,N-(1,3-fenilén)dimalimid  
PKA: fehérje kináz A  
PMSF: fenilmetilszulfonil-fluorid  
SDS: Na-dodecil-szulfát  
SDS-PAGE: Na-dodecil-szulfát-poliakrilamid gélelektroforézis  
SM: szklerózis multiplex  
TPPP: tubulin polimerizációt elősegítő fehérje (*Tubulin Polymerization Promoting Protein*)  
TRIS: trisz-(hidroximetil)-amino-metán  
X: a szövegben nem megnevezett aminosav

## 8. Ábrák és táblázatok jegyzéke

### Ábrák:

1. ábra A mikrotubulusok szeveződése és dinamikája .....	11
2. ábra Sejmentes extraktumok hatása a tubulin polimerizációjára .....	13
3. ábra Elektronmikroszkópos felvételek a TPPP/p25 hatására kialakult tubulin ultrastrukturákról .....	14
4. ábra Az EGFP-TPPP/p25-öt expresszáló HeLa sejtek mikrotubuláris váza .....	15
5. ábra A humán TPPP/p25 szekvenciája .....	16
6. ábra Többszörös szekvenciaillesztés a ClustalW programmal .....	17
7. ábra A TPPP/p25 lokalizációja patológiás agyszöveti mintákban .....	18
8. ábra Töltés-hidrofóbitás plot: a szerkezeti rendezetlenség predikciója .....	20
9. ábra A „fehérje szentháromság” kiterjesztése: a „fehérje kvartett” modell .....	21
10. ábra A fehérje feltekeredés mechanizmusa .....	24
11. ábra Reprezentatív gélkép: a humán rekombináns TPPP/p25 izolálása fém affinitáskromatográfiával .....	31
12. ábra A tubulinpolimerizáció sematikus ábrája .....	42
13. ábra Enzimaktivitás mérés malachitöld reagenssel .....	43
14. ábra Az aminosav-összetétel vizsgálata .....	46
15. ábra A PONDR® VL-XT programmal jósolt rendezetlenség a TPPP/p25 esetén .....	47
16. ábra A TPPP/p25 rendezetlenségének jóslása az IUPred és a FoldIndex algoritmussal .....	48
17. ábra Nettó töltés ábrázolása a hidrofóbitás függvényében .....	49
18. ábra A homológ fehérjék normált távoli-UV CD spektruma .....	50
19. ábra A TPPP/p25 szerkezetének NMR spektroszkópiás jellemzése (950 MHz) .....	52
20. ábra A His <sub>2</sub> Cys <sub>2</sub> (61-83 as, kék régió) Zn <sup>2+</sup> -kötő motívum a TPPP/p25 fehérjében .....	53
21. ábra Kétértékű fémionok hatása a TPPP/p25 konformációjára .....	54
22. ábra A Zn <sup>2+</sup> hatásának tanulmányozása távoli- és közeli-UV CD spektroszkópiával .....	55
23. ábra A Zn <sup>2+</sup> -kötés tanulmányozása NMR spektroszkópiával (750 MHz) .....	56
24. ábra A TPPP fehérjék és az ANS kölcsönhatásának vizsgálata Zn <sup>2+</sup> jelenlétében .....	58
25. ábra Trp fluoreszcencia mérés Zn <sup>2+</sup> valamint ANS jelenlétében .....	59
26. ábra A Zn <sup>2+</sup> -kötés jellemzése ITC-vel .....	60
27. ábra A GTP-kötés tanulmányozása γ-foszfát kapcsolt GTP-szefaróz affinitás- kromatográfiával .....	62
28. ábra Trp fluoreszcencia változás MgGTP és MgATP mellett .....	63
29. ábra A GTP-kötés tanulmányozása távoli-UV CD spektroszkópiával .....	64
30. ábra GTP hatásának vizsgálata NMR spektroszkópiával (500 MHz) .....	65
31. ábra A TPPP/p25 GTPáz aktivitásának vizsgálata malachitöld reagenssel .....	66
32. ábra A TPPP/p25 GTPáz aktivitásának vizsgálata <sup>31</sup> P-NMR spektroszkópiával (250 MHz) .....	67
33. ábra Zn <sup>2+</sup> hatása a GTPáz aktivitásra .....	68
34. ábra TPPP/p25 SDS gélképe .....	69
35. ábra A TPPP/p25 vizsgálata analitikai gélzűrőssel .....	70
36. ábra A TPPP/p25 monomer és dimer frakcióinak kromatográfias vizsgálata .....	72

37. ábra A TPPP/p25 kémiai keresztkötése PDM reagenssel .....	73
38. ábra A keresztkötés és a GTP-kötés tanulmányozása analitikai gélzűrőssel .....	74
39. ábra A TPPP/p25 GTP-kötésének vizsgálata ITC-vel.....	75
40. ábra A TPPP fehérjék és a tubulin kölcsönhatásának vizsgálata távoli-UV CD spektroszkópiával .....	77
42. ábra $Zn^{2+}$ hatása a TPPP/p25-tubulin kölcsönhatásra (2).....	79
43. ábra TPPP/p25 indukált tubulinpolimerizáció monomer-dimer egyensúlytól való függése .....	80
44. ábra A különböző fehérjeformák hatása a tubulinpolimerizációra .....	81
45. ábra Ligandum-kötő motívumok.....	85
46. ábra A $Zn^{2+}$ -kötéshez köthető eltérő funkciók szemléltetése.....	87
47. ábra Többszörös egyensúly a TPPP/p25-GTP rendszeren belül.....	95
48. ábra A dimer TPPP/p25 disszociációjának vizsgálata ITC-vel.....	95
49. ábra A TPPP/p25-GTP többszörös egyensúlyi rendszer titrálási görbéinek szimulációja a CD és fluoreszcencia spektroszkópia mérések alapján .....	96

**Táblázatok:**

1. táblázat M9 minimál táptalaj összetétele .....	32
2. táblázat Különböző fehérjék elméleti fajlagos extinkciós koefficiense .....	33
3. táblázat A rendezetlenség jóslására használt programok.....	34
4. táblázat A másodlagos szerkezeti elemek aránya a CONTINLL és a CDSSTR programok alapján .....	51
5. táblázat A $Zn^{2+}$ -kötés termodinamikai paraméterei ( $T= 298 K$ ) .....	60
6. táblázat Konzervált nukleotid-kötő szekvencia elemek a TPPP/p25-ben .....	61
7. táblázat Elméleti és kísérletesen meghatározott értékek ( $R_s$ , $M_w$ ) a különböző TPPP/p25 specieszek esetében .....	71
8. táblázat Kis G-fehérjék intrinszc GTPáz aktivitása ( $k_{cat}$ 1/perc) és a TPPP/p25-re jellemző aktivitás malachitöld reagens és $^{31}P$ -NMR mérés alapján .....	86
9. táblázat TPPP/p25 fehérjeszekvenciák többszörös szekvenciaillesztése a ClustalW programmal.....	93
10. táblázat A TPPP/p25 affinitásoszloppal és LC-MS/MS-sel azonosított kölcsönható partnerek .....	94
11. táblázat A TPPP/p25-GTP kölcsönhatás modellezéséhez felhasznált paraméterek.....	96

## 9. Az értekezés alapjául szolgáló publikációk

Vincze, O., Tökési, N., Oláh, J., Hlavanda, E., **Zotter, Á.**, Horváth, I., Lehotzky, A., Tirián, L., Medzihradzky, F. K., Kovács, J., Orosz, F., Ovádi, J. (2006): TPPP proteins: members of a new family with distinct structures and functions. *Biochemistry* 45(46): 13818-26.

**Zotter, Á.**, Bodor, A., Oláh, J., Hlavanda, E., Orosz, F., Perczel, A., Ovádi, J. (2011): Disordered TPPP/p25 binds GTP and displays Mg<sup>2+</sup>-dependent GTPase activity. *FEBS Lett.* 585(5): 803-08.

**Zotter, Á.**, Oláh, J., Hlavanda, E., Bodor, A., Perczel, A., Szigeti, K., Fidy, J., Ovádi, J. (2011): Zn<sup>2+</sup>-induced rearrangement of the disordered TPPP/p25 affects its microtubule assembly and GTPase activity. *Biochemistry* 50(44): 9568-78.

Oláh, J., **Zotter, Á.**, Hlavanda, E., Szunyogh, S., Orosz, F., Szigeti, K., Fidy, J., Ovádi, J. (2012): Microtubule assembly-derived by dimerization of TPPP/p25. Evaluation of thermodynamic parameters for multiple equilibrium system from ITC data. *Biochim. Biophys. Acta* 1820(7):785-94.

## 10. Függelék

	45	61	83	95
humán	SPELSALEEAFRRFAVHGDARATGREMHGKNWSKLCCKDCQVIDGRNVTVT			
szarvasmarha	GAELSALAEAFRKFVAVHGDARASGREMHGKNWSKLCRDCQVIDGRSVTVT			
egér	APELSALEEAFRRFAVHGDTRATGKEMHGKNWSKLCCKDCHVIDGKNVTVT			
oposzum	APELSALEEAFRKFATHGDTTRATGKEMHGKNWSKLCCKDCQVIDGKNVTVT			
tyúk	AGEISALEEAFRKFATHGDTTRATGKEMHGKNWSKLCCKDCQVIDGKNVTVT			
zebrapinty	AGEISALEEAFRKFVAVHGDTRATGKEMHGKNWSKLCCKDCNIIDGKNVTVT			
gömbhal	PVELTALAEAFRRFATHGDTTRATGKEMHGKNWSKLCCKDCSVIDGKSVLTL			
amerikai sügér	PVEVTALAEESFRRFATHGDTTRATGKEMHGKNWSKLCCKDCQVIDGKNITLTL			
szellemcápa	PELSALEEAFRKFVAVHGDTRATGKEMHGKXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX			
	171			219
humán	KFTGSHKERFDPSGKGKGKAGRVDLVDESGYVSGYKHAAGTYDQKVQGGK			
szarvasmarha	KFTGSHKERFDPSGRGKGRAGRVDLVDESGYVPGYKHAAGTYDQKVQGGK			
egér	KFTGSHKERFDQSGKGKGKAGRVDLVDESGYVPGYKHAAGTYDQKVQGGK			
oposzum	KFTGSHKERFDPSGKGKGKAGRVDLVDESGYVPGYKHAAGTYDQKVQGGK			
tyúk	KFTGSHKERFDPSGKGKGRAGREDLVDSGYVSGYKHAAGTYDQKVQGGK			
zebrapinty	KFTGSHKERFDASGKGKGRAGREDLVDSGYVSGYKHAAGTYDQKVQGGK			
gömbhal	KFTGSHKERFDSTGRGKGKAGREDIVDTSGYVSGYKHAAGTYDQKVQGGK			
amerikai sügér	KFTGSHKERFDDTGRGKGKAGRVDMDTSGYVSGYKHAAGTYDQKVQGGK			
szellemcápa	KFTGSHKERFDQSGRKGKAGREYLVDTGTVAGYKHAAGTYDQKVQGGKTHE			

**9. táblázat TPPP/p25 fehérjeszekvenciák többszörös szekvenciaillesztése a ClustalW programmal** (Pearson, 1990). A szürke háttér a GTP-kötő motívumokat, az egyesek aláhúzás az ún. Rossmann motívumot, a szaggatott aláhúzás a cink-kötő motívumot mutatja. A vastagított betűk a MgGTP kötésben szerepet játszó, konzervált aminosavakat jelölik (Bourne et al., 1991; Dever et al., 1987; Paduch et al., 2001; Sprang, 1997). Az X nem azonosított aminosavakat jelöl. Humán: *Homo sapiens*, NP\_008961; szarvasmarha: *Bos taurus*, NP\_776401; egér: *Mus musculus*, NP\_878259; oposzum: *Monodelphis domestica*, XP\_001363210; tyúk: *Gallus gallus*, XP\_001231864; zebrapinty: *Taeniopygia guttata*, XP\_002186811; gömbhal: *Fugu rubripes*, SINFRUP00000072951; amerikai sügér: *Perca flavescens*, GO572248, cápa: *Callorhynchus milii*, AAVX01211814, AAVX01014290.

### A TPPP/p25 kölcsönható partnereinek feltérképezése

A TPPP/p25 GTPáz aktivitását szabályozó lehetséges kölcsönható partnerek azonosítása céljából humán rekombináns TPPP/p25 oszlopra citoszolikus marhaagy extraktumot vittem fel 2 mM GTP illetve 2 mM GDP jelenlétében. Az oszlopról eluált fehérjefrakciókat SDS gélen elválasztottam, majd a minták fehérjetartalmát a Szegedi Proteomikai Kutatócsoport munkatársai azonosították LC-MS/MS módszerrel. Az analízis eredményeinek adatbázis-lekeresése (NCBI adatbázis) a 10. táblázatban feltüntetett fehérjéket határozta meg (a táblázat reprezentatív összefoglalás). A kísérlet során számos fehérjét sikerült azonosítani, közöttük több olyat, amelyek csak GTP illetve GDP jelenlétében voltak kimutathatóak (10. táblázat plusz jellel jelölt partnerek).

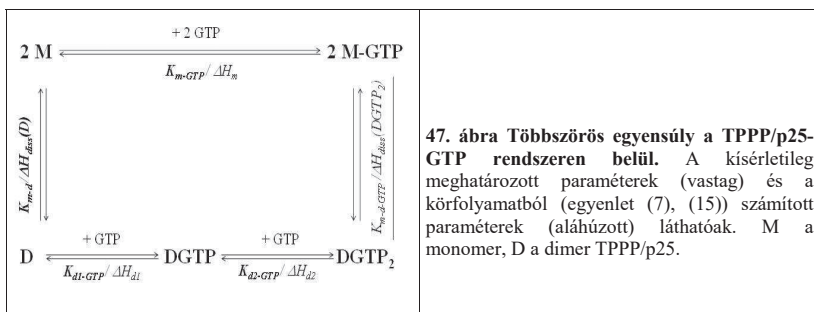
Függelék

Kölcsönható partner	Funkció	TPPP/p25		
		GTP	GDP	
<b>II] Jelátviteli fehérjék</b>				
<b>Protein kinázok</b>				
ERK2/ MAPK1	TPPP/p25 foszforilálása, gátolja a MT-képződést	+		
LIM Kináz	TPPP/p25 foszforilálása, gátolja a MT-képződést	+		
Glikogén szintáz kináz 3, Gsk3	TPPP/p25 gátolja az aktivitását	+		
Ciklin-dependes kináz 5, Cdk5	foszforiláció, a MT-képződést gátolja	+		
Protein kináz A, PKA	foszforiláció	+		
Protein kináz C, PKC	foszforiláció	+		
<b>Foszfátáz/foszfátáz inhibitorok</b>				
SET protein (PHAP I)		+		
Foszfátáz 2A inhibitor (PHAP II)		+		
Serine/threonine protein foszfátáz		+	+	
<b>Szabályozó fehérjék</b>				
Kalmodulin	Ca <sup>2+</sup> -függő kölcsönhatások	+	+	
NCK-asszociált protein (NAP1)		+		
14-3-3 protein $\gamma$ , $\zeta$		+	+	+
Dihydropyrimidinase-related protein 2		+	+	
<b>III] Szerkezeti fehérjék</b>				
Tubulin $\beta$	tubulin polimerizáció, MT kötegelés	+	+	
Tubulin $\alpha$				
Actin related protein			+	
Actin $\beta$ , $\gamma$		+	+	
Dynactin 2 (p50)			+	
Capping protein (actin filament) muscle Z-line, alpha 1			+	
T-complex protein 1 subunit epsilon, TCP1			+	
<b>III] Sejtmetabolizmus fehérjei</b>				
<b>Enzimek</b>				
Glicerinaldehid-3-foszfát dehidrogenáz, GAPDH	patológiás zárványokban együtt fordul elő a TPPP/p25-tel	+	+	+
Glutamát dehidrogenáz		+		
ATP citrate lyase		+		
<b>Endoplazmatikus retikulum és vezikuláris fehérjék</b>				
HSP 90 kDa		+		
HSP 70 kDa protein 5			+	
HSP 70 kDa protein 8		+	+	
HSP 60 kDa		+	+	
TER ATPase		+		
<b>IV] (Pre)szinaptikus fehérjék</b>				
Szinapszin I a és b		+	+	
$\alpha$ -szinuklein	patológiás zárványokban együtt fordul elő a TPPP/p25-tel	+		
Complexin		+		
<b>V] Gliális fehérjék</b>				
Mielin bázikus protein	differenciálódott oligodendrocitákban fejeződik ki, myelin hüvely kialakítása	+		
<b>VI] Transzlációs/riboszomális fehérjék</b>				
Elongációs faktor $\alpha$		+	+	
Karioferin $\beta 3$ és $\beta 1$ (importin)		+		
Nukleolin		+		
SERPINE1 mRNA binding protein 1			+	
Eukaryotic translation initiation factor 2, subunit 1 $\alpha$			+	
D-tyrosyl-tRNA deacylase 1			+	
<b>VII] Egyebek</b>				
p53 indukálható protein isoforma 3		+		
LanC lantibiotic synthetase component C-like 1		+		
Protein arginine methyltransferase 5			+	
Apolipoprotein E		+	+	
Casein beta				+
Casein S1 alpha		+		+

10. táblázat A TPPP/p25 affinitásoszloppal és LC-MS/MS-sel azonosított kölcsönható partnerek.  
MT: mikrotubulus.

### A többszörös egyensúlyi rendszer matematikai modellezése

Csoportunk egy matematikai modellt állított fel, hogy értelmezzük a monomer és a dimer TPPP/p25 GTP-kötését és a GTP-kötés többszörös egyensúlyi rendszerre gyakorolt hatását (46. ábra). Figyelembe vettük a TPPP/p25 monomer-dimer egyensúlyát és a GTP monomer, illetve dimer formához való kötődését, valamint az anyagmegmaradást ((3)-(9) egyenletek). A monomer esetében egy, a dimer esetében két azonos és független kötőhelyet feltételeztünk. A modellezés alapjául szolgáló paramétereket a géliszűrés ( $K_{m-d}$ ,  $K_{m-GTP}$ ,  $K_{d-GTP}$ ) és az ITC ( $\Delta H_{diss}(D)$ ) alapján határoztuk meg (11. táblázat).



$$M + M \leftrightarrow D \quad K_{m-d} = [M]*[M]/[D] \quad (3)$$

$$M + GTP \leftrightarrow MGTP \quad K_{m-GTP} = [M]*[GTP]_{szabad}/[MGTP]; \quad (4)$$

$$D + GTP \leftrightarrow DGTP \quad K_{d1-GTP} = [D]*[GTP]_{szabad}/[DGTP]; \quad (5)$$

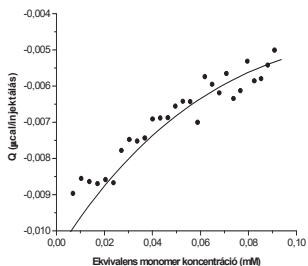
$$DGTP + GTP \leftrightarrow DGTP_2 \quad K_{d2-GTP} = [DGTP]*[GTP]_{szabad}/[DGTP_2]; \quad (6)$$

$$MGTP + MGTP \leftrightarrow DGTP_2 \quad K_{m-d-GTP} = K_{m-d} * K_{d1-GTP} * K_{d2-GTP} / (K_{m-GTP})^2 \quad (7)$$

$$[TPPP/p25]_{total} = [M] + [MGTP] + 2*([D] + [DGTP] + [DGTP_2]) \quad (8)$$

$$[GTP]_{total} = [GTP]_{szabad} + [MGTP] + [DGTP] + 2* [DGTP_2] \quad (9)$$

### A TPPP/p25 disszociációjának vizsgálata ITC-vel

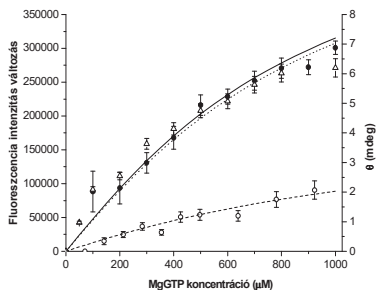


**48. ábra** A dimer TPPP/p25 disszociációjának vizsgálata ITC-vel. A referenciacellába 500  $\mu$ M TPPP/p25-öt, a mintacellába puffert töltöttünk. Lépésenként 10  $\mu$ l TPPP/p25-öt injektáltunk a mintacellába. A kísérleti pontokra a dimer disszociációs modell illesztettük (MicroCal Origin 7.0), ami alapján a  $\Delta H_{diss}(D) = -11,31 \pm 0,57$  kcal/mol.

	Disszociációs állandó, $\mu\text{M}$	$\Delta I_{\text{CD}}$ , mdeg/mol	$\Delta I_{\text{fluoreszcencia}}$ önkéntes egység	ITC, kcal/mol
MGTP	$K_{m\text{-GTP}}$ , 2000	2,7	105000	$\Delta H_m$ , -1,0
DGTP	$K_{d1\text{-GTP}}$ , 200	2,7	105000	$\Delta H_{d1}$ , -4,5
DGTP <sub>2</sub>	$K_{d2\text{-GTP}}$ , 200	2,7	105000	$\Delta H_{d1}$ , -4,5
M – D	$K_{m\text{-d}}$ , 400	-	-	$\Delta H_{\text{diss}}(\text{D})$ , -11
MGTP – DGTP <sub>2</sub>	$K_{m\text{-d-GTP}}$ , 4	-	-	$\Delta H_{\text{diss}}(\text{DGTP}_2)$ , -18

11. táblázat A TPPP/p25-GTP kölcsönhatás modellezéséhez felhasznált paraméterek.  $K_{m\text{-d-GTP}}$  és  $\Delta H_{\text{diss}}(\text{DGTP}_2)$  nem független paraméter, a körfolyamatból számítható (ld. 46. ábra).

A 11. táblázat paramétereit felhasználva modellezni tudtuk a TPPP/p25 GTP-titrálási görbéit a CD és a fluoreszcencia spektroszkópia, valamint az ITC esetén (ld. 39., 48. ábra).



49. ábra A TPPP/p25-GTP többszörös egyensúlyi rendszer titrálási görbéinek szimulációja a CD és fluoreszcencia spektroszkópia mérések alapján. A CD titrációs görbéből származtatható differencia ellipticitás (222 nm-en) a GTP koncentráció függvényében, mért ( $\Delta$ ) és szimulált görbe (pontosított vonal). A TPPP/p25 fluoreszcencia intenzitáscsökkenése növekvő MgGTP koncentráció mellett, 2,4  $\mu\text{M}$  TPPP/p25+MgGTP ( $\circ$ ); 8  $\mu\text{M}$  TPPP/p25+MgGTP ( $\bullet$ ), 2,4  $\mu\text{M}$  TPPP/p25+MgGTP modell (szaggatott vonal), 8  $\mu\text{M}$  TPPP/p25+MgGTP modell (vékony vonal).



## 11. Irodalomjegyzék

- Acevedo K., Li R., Soo P., Suryadinata R., Sarcevic B., Valova V. A., Graham M. E., Robinson P. J. and Bernard O. (2007) The phosphorylation of p25/TAPP by LIM kinase 1 inhibits its ability to assemble microtubules. *Exp Cell Res* **313**, 4091-106.
- Alberts B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Walter, P. (2008) *Molecular Biology of the Cell*.
- Amos L. A. (2008) Molecular motors: not quite like clockwork. *Cell Mol Life Sci* **65**, 509-15.
- Aramini J. M., Rossi P., Shastry R., Nwosui C., Cunningham K., Xiao R., Liu J., Baran M. C., Rajan P. K., Acton T. B., Rost B. and Montelione G. T. (2007) <http://www.pdb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=2JRF>
- Baldwin R. L. (1989) How does protein folding get started? *Trends Biochem Sci* **14**, 291-4.
- Bhattacharyya B., Panda D., Gupta S. and Banerjee M. (2008) Anti-mitotic activity of colchicine and the structural basis for its interaction with tubulin. *Med Res Rev* **28**, 155-83.
- Bhaumik S. R., Smith E. and Shilatifard A. (2007) Covalent modifications of histones during development and disease pathogenesis. *Nat Struct Mol Biol* **14**, 1008-16.
- Bodor A., Tóth I., Bányai I., Szabó Z. and Hefter G. T. (2000) 19F NMR study of the equilibria and dynamics of the Al<sup>3+</sup>/F<sup>-</sup> system. *Inorg Chem* **39**, 2530-7.
- Bourne H. R., Sanders D. A. and McCormick F. (1991) The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature* **349**, 117-27.
- Bradford M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-54.
- Chan K. M., Delfert D. and Junger K. D. (1986) A direct colorimetric assay for Ca<sup>2+</sup>-stimulated ATPase activity. *Anal Biochem* **157**, 375-80.
- Chen Y. H., Yang J. T. and Martinez H. M. (1972) Determination of the secondary structures of proteins by circular dichroism and optical rotatory dispersion. *Biochemistry* **11**, 4120-31.
- Chiti F. and Dobson C. M. (2006) Protein misfolding, functional amyloid, and human disease. *Annu Rev Biochem* **75**, 333-66.
- Clegg J. S. (2010) Revisiting the microtrabecular lattice. *Cell Biol Int* **34**, 1105-7.
- Daggett V. and Fersht A. R. (2003) Is there a unifying mechanism for protein folding? *Trends Biochem Sci* **28**, 18-25.
- Daughdrill G. W., Chadsey M. S., Karlinsey J. E., Hughes K. T. and Dahlquist F. W. (1997) The C-terminal half of the anti-sigma factor, FlgM, becomes structured when bound to its target, sigma 28. *Nat Struct Biol* **4**, 285-91.
- Dehmelt L. and Halpain S. (2005) The MAP2/Tau family of microtubule-associated proteins. *Genome Biol* **6**, 204.
- Dever T. E., Glynias M. J. and Merrick W. C. (1987) GTP-binding domain: three consensus sequence elements with distinct spacing. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**, 1814-8.
- Dosztányi Z., Csizsók V., Tompa P. and Simon I. (2005) IUPred: web server for the prediction of intrinsically unstructured regions of proteins based on estimated energy content. *Bioinformatics* **21**, 3433-4.
- Dosztányi Z., Mészáros B. and Simon I. (2010) Bioinformatical approaches to characterize intrinsically disordered/unstructured proteins. *Brief Bioinform* **11**, 225-43.
- Dunker A. K., Brown C. J., Lawson J. D., Iakoucheva L. M. and Obradovic Z. (2002) Intrinsic disorder and protein function. *Biochemistry* **41**, 6573-82.
- Dunker A. K., Lawson J. D., Brown C. J., Williams R. M., Romero P., Oh J. S., Oldfield C. J., Campen A. M., Ratliff C. M., Hipps K. W., Ausio J., Nissen M. S., Reeves R., Kang C., Kissinger C. R., Bailey R. W., Griswold M. D., Chiu W., Garner E. C. and Obradovic Z. (2001) Intrinsically disordered protein. *J Mol Graph Model* **19**, 26-59.
- Dunker A. K., Obradovic Z., Romero P., Garner E. C. and Brown C. J. (2000) Intrinsic protein disorder in complete genomes. *Genome Inform Ser Workshop Genome Inform* **11**, 161-71.
- Dunker A. K., Oldfield C. J., Meng J., Romero P., Yang J. Y., Chen J. W., Vacic V., Obradovic Z. and Uversky V. N. (2008) The unfoldomics decade: an update on intrinsically disordered proteins.

*BMC Genomics* **9 Suppl 2**, S1.

- Dyson H. J. and Wright P. E. (2002) Coupling of folding and binding for unstructured proteins. *Curr Opin Struct Biol* **12**, 54-60.
- Dyson H. J. and Wright P. E. (2005) Intrinsically unstructured proteins and their functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**, 197-208.
- Ellis R. J. (2006) Molecular chaperones: assisting assembly in addition to folding. *Trends Biochem Sci* **31**, 395-401.
- Fersht A. R. (1995) Optimization of rates of protein folding: the nucleation-condensation mechanism and its implications. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 10869-73.
- Fiegen D., Hacuser L. C., Blumenstein L., Herbrand U., Dvorsky R., Vetter I. R. and Ahmadian M. R. (2004) Alternative splicing of Rac1 generates Rac1b, a self-activating GTPase. *J Biol Chem* **279**, 4743-9.
- Galjart N. (2010) Plus-end-tracking proteins and their interactions at microtubule ends. *Curr Biol* **20**, R528-37.
- Götz J., Eckert A., Matamalas M., Ittner L. M. and Liu X. (2011) Modes of Abeta toxicity in Alzheimer's disease. *Cell Mol Life Sci* **68**, 3359-75.
- Guymer D., Maillard J., Agacan M. F., Brearley C. A. and Sargent F. (2010) Intrinsic GTPase activity of a bacterial twin-arginine translocation proofreading chaperone induced by domain swapping. *FEBS J* **277**, 511-25.
- Hart P. A. and Marshall C. J. (1990) Amino acid 61 is a determinant of sensitivity of rap proteins to the ras GTPase activating protein. *Oncogene* **5**, 1099-101.
- Hegde M. L. and Rao K. S. (2007) DNA induces folding in alpha-synuclein: understanding the mechanism using chaperone property of osmolytes. *Arch Biochem Biophys* **464**, 57-69.
- Hillebrand S., Garcia W., Delmar Cantu M., de Araujo A. P., Tanaka M., Tanaka T., Garratt R. C. and Carrilho E. (2005) In vitro monitoring of GTPase activity and enzyme kinetics studies using capillary electrophoresis. *Anal Bioanal Chem* **383**, 92-7.
- Hlavanda E., Klement E., Kókai E., Kovács J., Vincze O., Tőkési N., Orosz F., Medzihradszky K. F., Dombrádi V. and Ovádi J. (2007) Phosphorylation blocks the activity of tubulin polymerization-promoting protein (TPPP): identification of sites targeted by different kinases. *J Biol Chem* **282**, 29531-9.
- Hlavanda E., Kovács J., Oláh J., Orosz F., Medzihradszky K. F. and Ovádi J. (2002) Brain-specific p25 protein binds to tubulin and microtubules and induces aberrant microtubule assemblies at substoichiometric concentrations. *Biochemistry* **41**, 8657-64.
- Höftberger R., Fink S., Aboul-Enein F., Botond G., Oláh J., Berki T., Ovádi J., Lassmann H., Budka H. and Kovacs G. G. (2010) Tubulin polymerization promoting protein (TPPP/p25) as a marker for oligodendroglial changes in multiple sclerosis. *Glia* **58**, 1847-57.
- Iqbal K. and Grundke-Iqbal I. (2008) Alzheimer neurofibrillary degeneration: significance, etiopathogenesis, therapeutics and prevention. *J Cell Mol Med* **12**, 38-55.
- Jellinger K. A. (2009) Recent advances in our understanding of neurodegeneration. *J Neural Transm* **116**, 1111-62.
- Johnson D. E., Xue B., Sickmeier M. D., Meng J., Cortese M. S., Oldfield C. J., Le Gall T., Dunker A. K. and Uversky V. N. (2012) High-throughput characterization of intrinsic disorder in proteins from the Protein Structure Initiative. *J Struct Biol* **180**, 201-15.
- Jordan M. A. and Wilson L. (1998) Use of drugs to study role of microtubule assembly dynamics in living cells. *Methods Enzymol* **298**, 252-76.
- Kim A. S., Kakalis L. T., Abdul-Manan N., Liu G. A. and Rosen M. K. (2000) Autoinhibition and activation mechanisms of the Wiskott-Aldrich syndrome protein. *Nature* **404**, 151-8.
- Kim P. S. and Baldwin R. L. (1990) Intermediates in the folding reactions of small proteins. *Annu Rev Biochem* **59**, 631-60.
- Kovacs G. G., Gelpi E., Lehotzky A., Höftberger R., Erdei A., Budka H. and Ovádi J. (2007) The brain-specific protein TPPP/p25 in pathological protein deposits of neurodegenerative diseases. *Acta Neuropathol* **113**, 153-61.
- Kovacs G. G., László L., Kovács J., Jensen P. H., Lindersson E., Botond G., Molnar T., Perczel A., Hudecz F., Mező G., Erdei A., Tirián L., Lehotzky A., Gelpi E., Budka H. and Ovádi J. (2004) Natively unfolded tubulin polymerization promoting protein TPPP/p25 is a common marker of alpha-synucleinopathies. *Neurobiol Dis* **17**, 155-62.

- Kumar N. (1981) Taxol-induced polymerization of purified tubulin. Mechanism of action. *J Biol Chem* **256**, 10435-41.
- Kursula P. (2008) Structural properties of proteins specific to the myelin sheath. *Amino Acids* **34**, 175-85.
- Laemmli U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-5.
- Leal S. S. and Gomes C. M. (2007) Studies of the molten globule state of ferredoxin: structural characterization and implications on protein folding and iron-sulfur center assembly. *Proteins* **68**, 606-16.
- LeDuc P. P. and Bellin R. R. (2006) Nanoscale intracellular organization and functional architecture mediating cellular behavior. *Ann Biomed Eng* **34**, 102-13.
- Lehotzky A., Tirián L., Tókési N., Lénart P., Szabó B., Kovács J. and Ovádi J. (2004) Dynamic targeting of microtubules by TPPP/p25 affects cell survival. *J Cell Sci* **117**, 6249-59.
- Lei M., Lu W., Meng W., Parrini M. C., Eck M. J., Mayer B. J. and Harrison S. C. (2000) Structure of PAK1 in an autoinhibited conformation reveals a multistage activation switch. *Cell* **102**, 387-97.
- Li X., Romero P., Rani M., Dunker A. K. and Obradovic Z. (1999) Predicting Protein Disorder for N-, C-, and Internal Regions. *Genome Inform Ser Workshop Genome Inform* **10**, 30-40.
- Liliom K., Wagner G., Kovács J., Comin B., Cascante M., Orosz F. and Ovádi J. (1999) Combined enhancement of microtubule assembly and glucose metabolism in neuronal systems in vitro: decreased sensitivity to copper toxicity. *Biochem Biophys Res Commun* **264**, 605-10.
- Lin C. J., Huang H. C. and Jiang Z. F. (2010) Cu(II) interaction with amyloid-beta peptide: a review of neuroactive mechanisms in AD brains. *Brain Res Bull* **82**, 235-42.
- Linderson E., Lundvig D., Petersen C., Madsen P., Nyengaard J. R., Hojrup P., Moos T., Otzen D., Gai W. P., Blumbergs P. C. and Jensen P. H. (2005) p25alpha Stimulates alpha-synuclein aggregation and is co-localized with aggregated alpha-synuclein in alpha-synucleinopathies. *J Biol Chem* **280**, 5703-15.
- Lopez R., Silventoinen V., Robinson S., Kibria A. and Gish W. (2003) WU-Blast2 server at the European Bioinformatics Institute. *Nucleic Acids Res* **31**, 3795-8.
- Martin C. P., Vazquez J., Avila J. and Moreno F. J. (2002) P24, a glycogen synthase kinase 3 (GSK 3) inhibitor. *Biochim Biophys Acta* **1586**, 113-22.
- McKean P. G., Vaughan S. and Gull K. (2001) The extended tubulin superfamily. *J Cell Sci* **114**, 2723-33.
- Mekhail T. M. and Markman M. (2002) Paclitaxel in cancer therapy. *Expert Opin Pharmacother* **3**, 755-66.
- Morejohn L. C. (1994) Microtubule Binding Proteins Are Not Necessarily Microtubule-Associated Proteins. *Plant Cell* **6**, 1696-1699.
- Murray I. V., Giasson B. I., Quinn S. M., Koppaka V., Axelsen P. H., Ischiropoulos H., Trojanowski J. Q. and Lee V. M. (2003) Role of alpha-synuclein carboxy-terminus on fibril formation in vitro. *Biochemistry* **42**, 8530-40.
- Na G. C. and Timasheff S. N. (1986) Interaction of vinblastine with calf brain tubulin: multiple equilibria. *Biochemistry* **25**, 6214-22.
- Neyroz P. and Ciurli S. (2012) Intrinsic fluorescence of intrinsically disordered proteins. *Methods Mol Biol* **895**, 435-40.
- Nogales E. (2000) Structural insights into microtubule function. *Annu Rev Biochem* **69**, 277-302.
- Noiges R., Eichinger R., Kutschera W., Fischer I., Nemeth Z., Wiche G. and Propst F. (2002) Microtubule-associated protein 1A (MAP1A) and MAP1B: light chains determine distinct functional properties. *J Neurosci* **22**, 2106-14.
- Nyarko A., Hare M., Hays T. S. and Barbar E. (2004) The intermediate chain of cytoplasmic dynein is partially disordered and gains structure upon binding to light-chain LC8. *Biochemistry* **43**, 15595-603.
- Oláh J., Tókési N., Vincze O., Horváth I., Lehotzky A., Erdei A., Szajli E., Medzihradzky K. F., Orosz F., Kovacs G. G. and Ovádi J. (2006) Interaction of TPPP/p25 protein with glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and their co-localization in Lewy bodies. *FEBS Lett* **580**, 5807-14.
- Oláh J., Vincze O., Virok D., Simon D., Bozso Z., Tokesi N., Horvath I., Hlavanda E., Kovacs J.,

- Magyar A., Szucs M., Orosz F., Penke B. and Ovádi J. (2011) Interactions of pathological hallmark proteins: tubulin polymerization promoting protein/p25, beta-amyloid, and alpha-synuclein. *J Biol Chem* **286**, 34088-100.
- Oláh J., Zotter A., Hlavanda E., Szunyogh S., Orosz F., Szigeti K., Fidy J. and Ovádi J. (2012) Microtubule assembly-derived by dimerization of TPPP/p25. Evaluation of thermodynamic parameters for multiple equilibrium system from ITC data. *Biochim Biophys Acta* **1820**, 785-94.
- Oldfield C. J., Cheng Y., Cortese M. S., Brown C. J., Uversky V. N. and Dunker A. K. (2005a) Comparing and combining predictors of mostly disordered proteins. *Biochemistry* **44**, 1989-2000.
- Oldfield C. J., Cheng Y., Cortese M. S., Romero P., Uversky V. N. and Dunker A. K. (2005b) Coupled folding and binding with alpha-helix-forming molecular recognition elements. *Biochemistry* **44**, 12454-70.
- Orosz F., Kovacs G. G., Lehotzky A., Oláh J., Vincze O. and Ovádi J. (2004) TPPP/p25: from unfolded protein to misfolding disease: prediction and experiments. *Biol Cell* **96**, 701-11.
- Orosz F. and Ovádi J. (2008) TPPP orthologs are ciliary proteins. *FEBS Lett* **582**, 3757-64.
- Orosz F. and Ovádi J. (2011) Proteins without 3D structure: definition, detection and beyond. *Bioinformatics* **27**, 1449-54.
- Ovádi J. (2011) Moonlighting proteins in neurological disorders. *IUBMB Life* **63**, 453-6.
- Ovádi J. and Orosz F. (2009) Protein folding and misfolding: neurodegenerative diseases. In *Focus on Structural Biology*, Vol. 7, p. 278. Springer.
- Paduch M., Jelen F. and Otlewski J. (2001) Structure of small G proteins and their regulators. *Acta Biochim Pol* **48**, 829-50.
- Patterson K. R., Remmers C., Fu Y., Brooker S., Kanaan N. M., Vana L., Ward S., Reyes J. F., Philibert K., Glucksman M. J. and Binder L. I. (2011) Characterization of prefibrillar Tau oligomers in vitro and in Alzheimer disease. *J Biol Chem* **286**, 23063-76.
- Pearson W. R. (1990) Rapid and sensitive sequence comparison with FASTP and FASTA. *Methods Enzymol* **183**, 63-98.
- Permyakov S. E., Millett I. S., Doniach S., Permyakov E. A. and Uversky V. N. (2003) Natively unfolded C-terminal domain of caldesmon remains substantially unstructured after the effective binding to calmodulin. *Proteins* **53**, 855-62.
- Praefcke G. J., Geyer M., Schwemmler M., Robert Kalbitzer H. and Herrmann C. (1999) Nucleotide-binding characteristics of human guanylate-binding protein 1 (hGBP1) and identification of the third GTP-binding motif. *J Mol Biol* **292**, 321-32.
- Prilusky J., Felder C. E., Zeev-Ben-Mordehai T., Rydberg E. H., Man O., Beckmann J. S., Silman I. and Sussman J. L. (2005) FoldIndex: a simple tool to predict whether a given protein sequence is intrinsically unfolded. *Bioinformatics* **21**, 3435-8.
- Roberts B. R., Ryan T. M., Bush A. I., Masters C. L. and Duce J. A. (2012) The role of metallobiology and amyloid-beta peptides in Alzheimer's disease. *J Neurochem* **120 Suppl 1**, 149-66.
- Rodionov V. I. and Borisy G. G. (1997) Microtubule treadmilling in vivo. *Science* **275**, 215-8.
- Romero P., Obradovic Z. and Dunker A. K. (2004) Natively disordered proteins: functions and predictions. *Appl Bioinformatics* **3**, 105-13.
- Romero P., Obradovic Z., Li X., Garner E. C., Brown C. J. and Dunker A. K. (2001) Sequence complexity of disordered protein. *Proteins* **42**, 38-48.
- Schagger H. and von Jagow G. (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem* **166**, 368-79.
- Scheffzek K. and Ahmadian M. R. (2005) GTPase activating proteins: structural and functional insights 18 years after discovery. *Cell Mol Life Sci* **62**, 3014-38.
- Schweins T., Geyer M., Scheffzek K., Warshel A., Kalbitzer H. R. and Wittinghofer A. (1995) Substrate-assisted catalysis as a mechanism for GTP hydrolysis of p21ras and other GTP-binding proteins. *Nat Struct Biol* **2**, 36-44.
- Schweins T., Scheffzek K., Assheuer R. and Wittinghofer A. (1997) The role of the metal ion in the p21ras catalysed GTP-hydrolysis: Mn<sup>2+</sup> versus Mg<sup>2+</sup>. *J Mol Biol* **266**, 847-56.
- Seki N., Hattori A., Sugano S., Suzuki Y., Nakagawara A., Muramatsu M., Hori T. and Saito T. (1999) A novel human gene whose product shares significant homology with the bovine

- brain-specific protein p25 on chromosome 5p15.3. *J Hum Genet* **44**, 121-2.
- Semisotnov G. V., Rodionova N. A., Razgulyaev O. I., Uversky V. N., Gripas A. F. and Gilmanshin R. I. (1991) Study of the "molten globule" intermediate state in protein folding by a hydrophobic fluorescent probe. *Bio polymers* **31**, 119-28.
- Shiratsuchi A., Sato S., Oomori A., Ishiguro K., Uchida T. and Imahori K. (1995) cDNA cloning of a novel brain-specific protein p25. *Biochim Biophys Acta* **1251**, 66-8.
- Sickmeier M., Hamilton J. A., LeGall T., Vacic V., Cortese M. S., Tantos A., Szabo B., Tompa P., Chen J., Uversky V. N., Obradovic Z. and Dunker A. K. (2007) DisProt: the Database of Disordered Proteins. *Nucleic Acids Res* **35**, D786-93.
- Sillen A., Barbier P., Landrieu I., Lefebvre S., Wieruszeski J. M., Leroy A., Peyrot V. and Lippens G. (2007) NMR investigation of the interaction between the neuronal protein tau and the microtubules. *Biochemistry* **46**, 3055-64.
- Skjoerringe T., Lundvig D. M., Jensen P. H. and Moos T. (2006) P25alpha/Tubulin polymerization promoting protein expression by myelinating oligodendrocytes of the developing rat brain. *J Neurochem* **99**, 333-42.
- Spoerner M., Wittinghofer A. and Kalbitzer H. R. (2004) Perturbation of the conformational equilibria in Ras by selective mutations as studied by 31P NMR spectroscopy. *FEBS Lett* **578**, 305-10.
- Sprang S. R. (1997) G protein mechanisms: insights from structural analysis. *Annu Rev Biochem* **66**, 639-78.
- Szász C. S., Alexa A., Tóth K., Rakács M., Langowski J. and Tompa P. (2011) Protein disorder prevails under crowded conditions. *Biochemistry* **50**, 5834-44.
- Takahashi M., Tomizawa K., Fujita S. C., Sato K., Uchida T. and Imahori K. (1993) A brain-specific protein p25 is localized and associated with oligodendrocytes, neuropil, and fiber-like structures of the CA3 hippocampal region in the rat brain. *J Neurochem* **60**, 228-35.
- Takahashi M., Tomizawa K., Ishiguro K., Sato K., Omori A., Sato S., Shiratsuchi A., Uchida T. and Imahori K. (1991) A novel brain-specific 25 kDa protein (p25) is phosphorylated by a Ser/Thr-Pro kinase (TPK II) from tau protein kinase fractions. *FEBS Lett* **289**, 37-43.
- Tanford C. (1968) Protein denaturation. *Adv Protein Chem* **23**, 121-282.
- Tirián L., Hlavanda E., Oláh J., Horváth I., Orosz F., Szabó B., Kovács J., Szabó J. and Ovádi J. (2003) TPPP/p25 promotes tubulin assemblies and blocks mitotic spindle formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 13976-81.
- Tompa P. (2002) Intrinsically unstructured proteins. *Trends Biochem Sci* **27**, 527-33.
- Tompa P. (2005) The interplay between structure and function in intrinsically unstructured proteins. *FEBS Lett* **579**, 3346-54.
- Tompa P. and Csermely P. (2004) The role of structural disorder in the function of RNA and protein chaperones. *FASEB J* **18**, 1169-75.
- Tompa P., Dosztányi Z. and Simon I. (2006) Prevalent structural disorder in E. coli and S. cerevisiae proteomes. *J Proteome Res* **5**, 1996-2000.
- Tranier S., Mortier-Barriere I., Ilbert M., Birck C., Iobbi-Nivol C., Mejean V. and Samama J. P. (2002) Characterization and multiple molecular forms of TorD from *Shewanella massilia*, the putative chaperone of the molybdoenzyme TorA. *Protein Sci* **11**, 2148-57.
- Uversky V. N. (2002a) Natively unfolded proteins: a point where biology waits for physics. *Protein Sci* **11**, 739-56.
- Uversky V. N. (2002b) What does it mean to be natively unfolded? *Eur J Biochem* **269**, 2-12.
- Uversky V. N. and Dunker A. K. (2010) Understanding protein non-folding. *Biochim Biophys Acta* **1804**, 1231-64.
- Uversky V. N., Gillespie J. R. and Fink A. L. (2000a) Why are "natively unfolded" proteins unstructured under physiologic conditions? *Proteins* **41**, 415-27.
- Uversky V. N., Gillespie J. R., Millett I. S., Khodyakova A. V., Vasilenko R. N., Vasiliev A. M., Rodionov I. L., Kozlovskaya G. D., Dolgikh D. A., Fink A. L., Doniach S., Permyakov E. A. and Abramov V. M. (2000b) Zn(2+)-mediated structure formation and compaction of the "natively unfolded" human prothymosin alpha. *Biochem Biophys Res Commun* **267**, 663-8.
- Uversky V. N., Li J. and Fink A. L. (2001a) Metal-triggered structural transformations, aggregation, and fibrillation of human alpha-synuclein. A possible molecular NK between Parkinson's disease and heavy metal exposure. *J Biol Chem* **276**, 44284-96.
- Uversky V. N., Li J. and Fink A. L. (2001b) Trimethylamine-N-oxide-induced folding of alpha-

- synuclein. *FEBS Lett* **509**, 31-5.
- Uversky V. N., Oldfield C. J., Midic U., Xie H., Xue B., Vucetic S., Iakoucheva L. M., Obradovic Z. and Dunker A. K. (2009) Unfoldomics of human diseases: linking protein intrinsic disorder with diseases. *BMC Genomics* **10 Suppl 1**, S7.
- Vamvaca K., Vogeli B., Kast P., Pervushin K. and Hilvert D. (2004) An enzymatic molten globule: efficient coupling of folding and catalysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 12860-4.
- Vassilenko K. S. and Uversky V. N. (2002) Native-like secondary structure of molten globules. *Biochim Biophys Acta* **1594**, 168-77.
- Vértessy B. G., Orosz F., Kovács J. and Ovádi J. (1997) Alternative binding of two sequential glycolytic enzymes to microtubules. Molecular studies in the phosphofructokinase/aldolase/microtubule system. *J Biol Chem* **272**, 25542-6.
- Vincze O., Oláh J., Zádori D., Klivényi P., Vécsei L. and Ovádi J. (2011) A new myelin protein, TPPP/p25, reduced in demyelinated lesions is enriched in cerebrospinal fluid of multiple sclerosis. *Biochem Biophys Res Commun* **409**, 137-41.
- Vincze O., Tökési N., Oláh J., Hlavanda E., Zotter Á., Horváth I., Lehotzky A., Tirián L., Medzihradzsky K. F., Kovács J., Orosz F. and Ovádi J. (2006) Tubulin polymerization promoting proteins (TPPPs): members of a new family with distinct structures and functions. *Biochemistry* **45**, 13818-26.
- 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**, 635-45.
- Whitmore L. and Wallace B. A. (2004) DICHROWEB, an online server for protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopic data. *Nucleic Acids Res* **32**, W668-73.
- Winner B., Jappelli R., Maji S. K., Desplats P. A., Boyer L., Aigner S., Hetzer C., Loher T., Vilar M., Campioni S., Tzitzilonis C., Soragni A., Jessberger S., Mira H., Consiglio A., Pham E., Masliah E., Gage F. H. and Riek R. (2011) In vivo demonstration that alpha-synuclein oligomers are toxic. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 4194-9.
- Worbs M., Huber R. and Wahl M. C. (2000) Crystal structure of ribosomal protein L4 shows RNA-binding sites for ribosome incorporation and feedback control of the S10 operon. *EMBO J* **19**, 807-18.
- Wright P. E. and Dyson H. J. (1999) Intrinsically unstructured proteins: re-assessing the protein structure-function paradigm. *J Mol Biol* **293**, 321-31.
- Zambelli B., Stola M., Musiani F., De Vriendt K., Samyn B., Devreese B., Van Beeumen J., Turano P., Dikiy A., Bryant D. A. and Ciurli S. (2005) UreG, a chaperone in the urease assembly process, is an intrinsically unstructured GTPase that specifically binds Zn<sup>2+</sup>. *J Biol Chem* **280**, 4684-95.
- Zhang Z., Wu C., Huang W., Wang S., Zhao E., Huang Q., Xie Y. and Mao Y. (2002) A novel human gene whose product shares homology with bovine brain-specific protein p25 is expressed in fetal brain but not in adult brain. *J Hum Genet* **47**, 266-8.
- Zimmerman S. B. and Trach S. O. (1991) Estimation of macromolecule concentrations and excluded volume effects for the cytoplasm of *Escherichia coli*. *J Mol Biol* **222**, 599-620.
- Zotter Á., Bodor A., Oláh J., Hlavanda E., Orosz F., Perczel A. and Ovádi J. (2011a) Disordered TPPP/p25 binds GTP and displays Mg<sup>2+</sup>-dependent GTPase activity. *FEBS Lett* **585**, 803-8.
- Zotter Á., Oláh J., Hlavanda E., Bodor A., Perczel A., Szigeti K., Fidy J. and Ovádi J. (2011b) Zn(2)+-induced rearrangement of the disordered TPPP/p25 affects its microtubule assembly and GTPase activity. *Biochemistry* **50**, 9568-78.

## Összefoglalás

A neurodegeneratív betegségek kialakulásában meghatározó szerepet játszanak az ún. *eredendően rendezetlen* fehérjék (mint pl.  $\alpha$ -szinuklein, tau). A betegségek patomechanizmusa máig nem tisztázott, következésképpen a kialakulásukban szerepet játszó „új szereplők” azonosítása alapvető jelentőséggel bír.

Kutatócsoportunk izolált egy agy-specifikus fehérjét, a *Tubulin Polymerization Promoting Protein/p25-öt* (TPPP/p25), mely a Parkinson-kór és más szinukleinpátiák esetén az agyszöveti zárványtestekben halmozódik fel. Doktori munkám során azt vizsgáltam, hogy a stabil térszerkezettel nem rendelkező TPPP/p25 milyen kölcsönhatások révén hozza létre azokat a struktúrákat, amelyek specifikus funkciók ellátásához szükségesek. E kérdés megválaszolásához *in silico* predikciót, illetve biofizikai és biokémiai módszereket alkalmaztam. Az eredmények azt mutatják, hogy a TPPP/p25 mintegy 45 és 44 aminosavból álló N- és C-terminális szegmense rendezetlen, melyek egy rendkívül flexibilis, 130 aminosavat tartalmazó régiót fognak közre. A fehérjének e szakasza tartalmazza a tubulin-,  $Zn^{2+}$ - és GTP-kötő szakaszokat, melyek a fehérje funkcióit meghatározzák. Ezt támasztják alá a két homológ fehérjével - TPPP2/p18 és TPPP3/p20 - végzett összehasonlító vizsgálataim.

Kimutattam, hogy a  $Zn^{2+}$  kötődésének hatására, ellentétben más bivalens kationokkal, szerkezetváltozás történik a TPPP/p25 egyetlen triptofán oldalláncának ( $Trp^{76}$ ) környezetében, ún. *molten globule* szerkezet alakul ki. Szintén ez a régió érintett a GTP-kötésben, melynek funkcionális következménye a GTP  $Mg^{2+}$ -függő hidrolízise, melyet a  $Zn^{2+}$  gátol. A gátlás elsődleges oka a kompetíció, a TPPP/p25 flexibilis régióján belül a  $Zn^{2+}$ - és GTP-kötő motívumok átfednek egymással.

Vizsgálataim bizonyították, hogy a fehérje szerkezeti és funkcionális sajátosságait a TPPP/p25 oligomerizációja nagymértékben meghatározza. A monomer TPPP/p25 képes dimer, illetve kisebb mértékben oligomer formákat képezni, melyeket nem redukáló körülmények között diszulfid hidak kapcsolnak össze, illetve a dimerek kémiai vagy enzimatisz keresztkötéssel stabilizálhatóak. A dimer forma kompaktabb, mint a monomer; a dimerizációt a fehérje koncentrációja és a GTP jelenléte nagymértékben meghatározza. A dimerizáció során bekövetkező szerkezetváltozás alapvető szerepet játszik a TPPP/p25 tubulinpolimerizációt indukáló, valamint a GTPáz aktivitásában.

Eredményeim arra mutatnak, hogy a „rendezettebb” dimer a fiziológiásan aktív forma. Ugyanakkor feltételezhető, hogy a rendezetlen monomer forma az, mely a szintén rendezetlen  $\alpha$ -szinukleinnel kölcsönhatva a patológiás zárványok kialakulását indukálja.

## Summary

*Intrinsically disordered proteins* (IDPs, eg.  $\alpha$ -synuclein and tau) play a crucial role in the etiology of neurodegenerative disorders. The pathomechanism of these diseases is still not well understood therefore identification of “new protein players” playing role in the development of these diseases is of utmost importance.

Our research group has identified a brain-specific protein, the *Tubulin Polymerization Promoting Protein/p25* (TPPP/p25), which accumulates in inclusion bodies characteristic for Parkinson’s disease and other synucleinopathies. During my work I have studied which interactions of the disordered TPPP/p25 induce structural alterations and the formation of different protein species, which are necessary to fulfill its specific functions. I used *in silico* predictions as well as biochemical and biophysical methods. The results show that the N- and C- terminal segments of TPPP/p25 are disordered (consisting of 44 and 45 amino acids, respectively), straddling a 130 amino acid length flexible region. This region of the protein contains tubulin,  $Zn^{2+}$  and GTP binding motifs which determine the functions of TPPP/p25. Comparative studies performed with the two homologues proteins, TPPP2/p18 and TPPP3/p20, has also confirmed the above mentioned results.

I have showed that the binding of  $Zn^{2+}$  (unlike in the case of other bivalent cations) to TPPP/p25 within the proximity of the tryptophan residue (Trp<sup>76</sup>) induces the formation of a *molten globule* structure. This region is also involved in the binding of GTP, which results in  $Mg^{2+}$  dependent GTP hydrolysis, which is inhibited by  $Zn^{2+}$  binding. The reason of the inhibition is the competition between  $Zn^{2+}$  and GTP since the ligand binding motifs are overlapping within the middle, flexible region. I have also proved that the structural and functional properties of TPPP/p25 are highly dependent on its oligomerization. The monomeric TPPP/p25 is able to form dimers and to a lower extent oligomers, which are stabilized by disulfide bridges in non-reducing conditions. Dimers can also be stabilized by chemical or enzymatic cross-linking. I have found that the dimer is more compact than the monomer species. The dimerization depends on the concentration of the protein as well as on the presence of GTP. The structural rearrangements during dimerization play a crucial role in the tubulin polymerization potency and in the GTPase activity of TPPP/p25.

My results indicate that the more compact dimer is the physiologically active form. However, it can be assumed that the disordered monomeric form of TPPP/p25 may be responsible for the interaction with the also disordered  $\alpha$ -synuclein resulting in the formation of the pathological inclusion bodies.