

KOMPLEMENT KONTROLL MODULOK VIZSGÁLATA NMR-SPEKTROSKÓPIÁVAL

Doktori (Ph.D.) értekezés

Láng András

Biológia Doktori Iskola

Vezető: Dr. Erdei Anna

Szerkezeti biokémia doktori program

Programvezető: Dr. Gráf László

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



ELTE TTK, Kémiai Intézet

Budapest

2010

Köszönetnyilvánítás

Legelőször is köszönetemet fejezem ki témavezetőmnek, Dr. Perczel Andrásnak, akinek az NMR-spektroszkópia területén szakmai, mindennapos kapcsolatunkban pedig személyes hozzájárulása jelentősen elősegítette fejlődésemet. Nélkülözhetetlen támogatást nyújtott az NMR-spektrumok felvételében, és mindig éberen követte szakmai haladásomat.

Köszönet illeti András mellett az egykori Szerves Kémiai és a jelenlegi Biokémiai Tanszék vezetőit, név szerint Dr. Hollósi Miklóst, Dr. Hudecz Ferencet, Dr. Gráf Lászlót, Dr. Nyitray Lászlót továbbá Dr. Náray-Szabó Gábort, akik megteremtették azt az alapot, mellyel én kizárólag a tudományos fejlődésemre fektethetem a hangsúlyt.

Köszönettel tartozom az MTA, SzBK, Enzimológiai Intézet együttműködő munkatársainak, nevezetesen Dr. Závodszy Péternek, Dr. Gál Péternek, Dr. Szilágyi Katalinnak, Major Balázsnak, akik hosszabb idő óta jelentős szakmai hozzájárulással bírnak a tématerületen. Preparatív munkájuk és tapasztalatuk nélkülözhetetlen a vizsgált fehérjék méréséhez és értékeléséhez.

Hálás vagyok közvetlen labortársamnak Dr. Gáspári Zoltánnak, aki segített koncentrálsom fenntartásában és elkalandozó figyelmemet a helyes irányba terelni. Szellemi kapacitása példamutató számomra. Nem tudom hiánytalanul felsorolni azokat a munkatársi erényeket, amiket a 4.102, 427/A, 5.123, 301 és 308 laborban kaptam az évek során. Szeretném kiemelni Dr. Bodor Andrea, Dr. Jákli Imre jelenlegi és Dr. Beke Tamás, Kiss Róbert korábbi munkatársakat. Az értekezés átolvasásában nyújtott segítségéért különösen hálás vagyok Dr. Náray-Szabó Gábornak, Dr. Harmat Veronikának, Dr. Menyhárd Dórának, Dr. Bodor Andreának és Dr. Gáspári Zoltánnak.

A doktori munkát Állami Doktori Ösztöndíj, Peptidkémiai Kutatócsoport és az OTKA támogatásával végeztem.

Végül, de nem utolsó sorban szüleimnek és testvéremnek köszönöm azt a sok szeretet és türelmet, mellyel mindvégig hozzájárultak a kutatómunkám és az értekezés megszületéséhez.

Budapest, 2010. szeptember 15.

Tartalomjegyzék

Bevezetés.....	7
1. Irodalmi áttekintés	8
2. Célkitűzések.....	19
3. Elméleti áttekintés.....	20
4. Az elvégzett kísérletek	31
5. Jelhozárrendelések a magányos modulokra.....	38
6. A kovalensen kötött modulpár vizsgálata	43
7. A magányos CCP modulok nem-kovalens kölcsönhatása	47
8. A magányos modulok dinamikai viselkedése	52
9. Az eredmények értékelése.....	63
10. Tovább lépési lehetőségek.....	69

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

LÁNG A, SZILÁGYI K, MAJOR B, GÁL P, ZÁVODSZKY P, PERCZEL A (2010): Intermodule cooperativity in the structure and dynamics of consecutive complement control modules in human C1r. FEBS J nyomdában.

LÁNG A, SZILÁGYI K, MAJOR B, GÁL P, ZÁVODSZKY P, PERCZEL A (2010): Interaction between separated consecutive complement control modules of human C1r: implications for dimerization of the full-length protease. FEBS Lett¹

¹ A dolgozat első változatának megjegyzéseire és kérdésre adott válaszok bírálata az átdolgozott kézirattal együtt folyamatban van.

Egyéb saját közlemények

LÁNG A, GYÖRGY K, CSIZMADIA IG, PERCZEL A (2003): A conformational comparison of N- and C-protected methionine and N- and C-protected homocysteine. *Journal of Molecular Structure-Theochem* 666-667:219-241.

LÁNG A, FÜZÉRY AK, BEKE T, HUDÁKY P, PERCZEL A (2004): Potential energy curves, surfaces and hypersurfaces. A model to follow and understand the conformational transformations in amino acids. *Journal of Molecular Structure-Theochem* 675,1-3:163-175.

LÁNG A, CSIZMADIA IG, PERCZEL A (2005): Peptide models XLV: Conformational properties of N-formyl-L-methioninamide and its relevance to methionine in proteins. *Proteins-Structure Function and Bioinformatics* 58,3:571-588.

Rövidítések jegyzéke

Az értekezésben az aminosavak egybetűs rövidítését használom. A C1r CCP modulok aminosav-számozása a PDB (Protein Data Bank) adatbázisban található szerzetekkel összhangban szerepel. Igyekeztem alább a gyakran előforduló rövidítéseket megadni, a ritkán előfordulókat csak lábjegyzetként oldottam fel. Szekvenciák felírásánál előfordul, hogy a fehérje CCP modul sorszáma egy „tilde” után írt számmal utalok, így a C1r~2 a C1r második CCP modulját jelöli.

CCP	Komplement kontroll modul
COSY	Korrelált spektroszkópia
CMSD	CUB és sushi modulokat többszörösen tartalmazó fehérje
CUB	C1r/C1s, Urchin-típusú EGF és Bone morphogenic protein által alkotott mozaikszó. Ezekben a fehérjékben gyakran előforduló modul.
C4BP α	C4 kötő fehérje α alegysége
DSS	3-(trimetilszilil)-propán-1-szulfát nátriumsója
EGF	Epidermális növekedési faktorról elnevezett modul
HSQC	Heteronukleáris egyszeres kvantum korreláltatott spektroszkópia
HVL	Hipervariábilis hurok a CCP modulon. Megfelel a BC huroknak.
MASP-1/3	Az első és harmadik mannóz-kötő lektin-asszociált szerin proteáz. C1r és C1s homológ.
MASP-2	A második mannóz-kötő lektin-asszociált szerin proteáz. C1r és C1s homológ.
NMR	Mágneses magrezonancia
NOE	Atommagok között fellépő Overhauser hatás
NOESY	Atommagok között fellépő Overhauser hatáson alapuló NMR-spektroszkópiai módszer
RMSD	Az eltérések négyzetes közepe
SP	Szerin proteáz (domén)
TOCSY	Teljesen korrelált spektroszkópia
TPPI	Időarányos fázisnövelés

Bevezetés

Az NMR-spektroszkópia fizikai, majd kémiai alkalmazása után a '90-es évekre eljutott odáig, hogy biokémiai rendszereken (biopolimereken: fehérjéken, nukleinsavakon és poliszacharidokon) is alkalmazhatóvá vált. Ezalatt az idő alatt a technika jelentős változáson ment keresztül és, bár nem képes felvenni a versenyt a röntgenkristallográfia biológiai alkalmazásával, számos téren egyedülálló megközelítéssel járul hozzá a biomolekulák megértéséhez, mellyel a kristallográfiát kiegészítő módszerré lépett elő. A kis szerves molekulákhoz képest a biopolimerek nagyszámú atomja miatt más megközelítést igényel azok értelmezése, megértése. Számos esetben egyszerűsítésekre kell szorítkozni, különben használhatatlanná válik az atomoktól és kapcsolataiktól eredő nagyszámú információ.

Az értekezést rövid irodalmi áttekintés után a célkitűzéseknek megfelelően szándékoztam tagolni. A kísérletek értelmezéséhez szükséges legrövidebb elméleti bevezetésre törekedtem. A felépítés követi a célkitűzésekben szereplő kérdéseket: (1) a modulok alapvető jelazonosítását és azok szerkezeti információtartalmát, (2) a modulok gerincének dinamika-vizsgálatát, (3) végül a modulok közötti kölcsönhatást kovalens egységként illetve asszociátumként.

Az értekezés megírásakor figyelembe vettem, hogy a Biológia Doktori Iskola Szerkezeti Biokémia Programjának keretében történik a tanulmány elbírálása, emiatt igyekeztem a fizikai, kémiai és a biológiai nevezéktan között kompromisszumot kötni. Időnként fejtörést okozott az idegennyelvű kifejezések megadása különösen, ha magyarul nehezen leírható kifejezésbe futottam bele, emiatt az olvasó megértését kérem.

1. Irodalmi áttekintés

1.1. A komplementrendszer

Minden élőlény számára fontos az immunitás, vagyis a kórokozókkal szembeni ellenállás és védekezés. Gerincesekben az úgynevezett aspecifikus veleszületett immunitás fő eleme a komplementrendszer, azaz a vérplazmában található több mint harminc fehérje, melyek a véralvadási enzimkaskádhoz hasonlóan egymást aktiváló szerin proteázok és fontos járulékos molekulák szabályozott működésének rendszere (SIM 2000; SIM 2004). Ahogy a véralvadási rendszer, úgy a komplementrendszer működése során is a szervezet homeosztázisának fenntartása valósul meg. Előbbiben az endothelium sérülése elleni védekezés a szöveti faktorról (III-as faktor, 'extrinsic' útvonal) vagy például prekallikreinnel ('intrinsic' útvonal) való kontaktus, utóbbiban a kezdeti fertőzés elleni védekezés a kórokozók felismerése (klasszikus, lektin-aktivált, alternatív útvonalak) révén jön létre. A szerin proteázokkal történő kovalens kötések hasításával megvalósuló poszttranszlációs módosítás mellett a két enzimszisztéma további párhuzamaként említhető meg, hogy kovalens kötések létrehozása is történik a folyamatok során. Ezek a véralvadási kaskádban transzglutamináció (XIII-as faktor) során amidkötés, míg a komplementrendszerben tioészter kötés felbomlásához kapcsolódik (C3b és C4b)² észter- vagy amidkötés létrehozása, mely utóbbi mechanizmus szerepét Dipterákban³ kórokozók (BAXTER 2007; BLANDIN 2008) elleni védekezésben is felismerték.

A kórokozók felismerése a klasszikus útvonalon a C1 által, a lektin-aktivált útvonalon a kórokozók felszínén lévő terminális mannóz molekulák mannóz-kötő lektinek révén⁴, míg az alternatív útvonalon a C3 spontán hidrolízise által jön létre. Bár mindhárom különbözőképpen aktiválódik a végén mindhárom egy közös útvonalban egyesül. A komplementrendszer működésének eredményeként létrejön a membránt károsító komplex

² A komplement fehérjék elnevezése C1-C9-ig a felfedezésük sorrendjében történt. A proteolitikus hasítással keletkező termékeket kis betűvel írják a molekula után ('a' a kisebb, 'b' a nagyobb fragmens), így például a C4 hasításából származó termékek közül a C4a a kisebb és C4b a nagyobb. Ezek közül az egyetlen kivétel a C2, ahol a nagyobb terméket C2a-nak nevezték el.

³ Kétszárnyúak, pl. a legyek és a szúnyogok.

⁴ Az eukarióta sejtek felszínén a mannóz egységek tipikusan szialinsavval vannak elfedve, így a szervezet saját sejtjei nem képesek aktivációra.

(MAC), mely a kórokozók membránjába beépülve hasítja azokat. Ez a C5-6-7-8-9_n által létrehozott polimer révén megvalósuló sejtlízis különösen hatékony a *Neisseria meningitidis* és *gonorrhoeae* elleni védekezésben (ROSS 1984), vagy akár számos vírus ellen (BLUE 2004).

Az egész komplementrendszer funkcióját többféle módon képes ellátni, pl.: (1) C3b, C4b által opsonizálja⁵ a testidegen molekulák epitópjait, (2) membránkárosító komplex kialakulásával kórokozó sejteket hasít, (3) C3a, C4a, C5a az ún. anafilatoxinok révén gyulladás faktorokat választ ki hízósejtekben és heptahelikális transzmembrán receptorokhoz kötődve fagocitákat/makrofágok toboroz (kemotaxis), (4) vörösvértestek felszínén lévő C3b/C4b receptorhoz (CR1⁶, CD35⁷) kötődve tisztító szerepe van a molekuláris és sejtcsomók eltávolításában.

A komplementrendszer erősen szabályozott, nemcsak a szerin proteázok nagyfokú specificitása révén, hanem számos szabályozó molekula által is, mellyel elkerülhetők az autoaktivációs mechanizmusok. Ezek a szabályozó molekulák az RCA géncsalád⁸ termékei (DE CORDOBA 1999), melyek az MCP⁹ (CD46), a DAF¹⁰ (CD55), a CR1 (CD35) és CR2 (CD21)¹¹, a H-faktor, a C4-kötő fehérje α és β láncra, és tipikusan vagy a szerin proteáz komplexeket destabilizálják (C4bC2b, C3bBb) vagy ezek degradációjában részt vevő I-faktor szerin proteáz kofaktoraiként működnek. Szabályozás szempontjából fontos megjegyezni még a C1 inhibitor is, mely a C1 komplex enzimeit inaktíválja¹².

1.2. A C1 molekulakomplex

A C1 molekulakomplex a komplementrendszer klasszikus útvonalának legelső molekulakomplexe, mely a C1q szerkezeti fehérből illetve a 2-2 C1r és C1s homológ szerin proteázokból áll. A heteropentamer C1q alegység szerepe, hogy felismerje a tipikusan IgG és IgM ellenanyagok és antigének alkotta immunkomplexet és előidézze a C1r autoaktivációját. Ez feltételezhetően az immunkomplex kötése révén, a C1 komplex stabilizálásán keresztül

⁵ Az opsonizáció során az antigének reaktív epitóp felszíneinek elfedése a szervezet molekuláival, mely folyamat eredményeként megvalósul a fagociták hatékony antigén-endocitózisa valószínűleg.

⁶ CR (komplementreceptor).

⁷ A CD (differenciációs klaszter) nevezéktan egységesíti a sejtfelszíni molekulák neveit.

⁸ Az RCA (regulator of complement activation) elnevezés pontosan ezen fehérjék szabályozó szerepére utal, melyek génjei együtt fordulnak elő. Többnyire egyforma szerkezeti elemek építik fel ezeket a fehérjéket (az ún. CCP-k ld. később).

⁹ MCP, membrán kofaktor protein, a komplementrendszer szabályozásában résztvevő egyik fehérje.

¹⁰ DAF, a komplement reakció lecsengését elősegítő szabályozó fehérje, faktor.

¹¹ A komplementreceptorok alléljeinek függvényében, melyek vércsoportok megkülönböztetésére is szolgálnak.

¹² A C1 inhibitor a véralvadási kaskád regulációjában (XII-es faktor inhibitora) is részt vesz.

valósul meg (ZICCARDI 1984). Kimutatták, hogy ezt a hatást a fiziológiásnál kisebb ionerősség is képes kiváltani, amiből feltételezhető az ionos kölcsönhatás megszűnésének szerepe a C1r autoaktivációs mechanizmusában. A C1r autoaktivációja során a zimogén számottevő konformációs változáson megy át (VILLIERS 1983). Ezt követően az aktivált C1r hasítja a C1s zimogént, majd az további fehérjék szigorúan szabályozott proteolitikus aktivációját végzi el: hasítja a C4 heterotrimeret (ROSSI 1998; BALLY 2005) és a C2 szerin proteázt (ROSSI 2005).

A C1 szerkezeti-felismerő alegysége a C1q, mely három eltérő polipeptidlánc összesen hat példányban előforduló kovalens egysége (REID 1976A), és hat tulipánból álló csokorra emlékeztet. A C1q mind a hat ága trimer felépítésű szerkezetileg a C-típusú lektinek III-as csoportjába tartozik, melyeket kollektineknek neveztek el (DRICKAMER 1993) a kollagénhez hasonló felépítésű régiója (REID 1974, 1976A, 1976B, 1977) és a globuláris szénhidrátfelismerő doménje¹³ miatt. A korábban említett izotópusú ellenanyagok Fc részének¹⁴ recepciójában a globuláris trimer vesz részt, melynek szerkezetét β -szálak antiparalel β -redőzött rétegei alkotják (GABORIAUD 2003; PAÏDASSI 2008).

A C1 katalitikus alegységét a két C1r és a két C1s alkotja. Ca^{2+} jelenlétében a C1s N-terminálisa (az ún. C1s α) ellentétben a C1r N-terminálisával (az ún. C1r α) homodimeret, a két fragmens elegye heterodimeret alkot (THIELENS 1990). Ezek az eredmények a teljes molekulákra nézve is érvényesnek bizonyultak, azzal az érdekes megfigyeléssel, hogy a C1r Ca^{2+} jelenléte nélkül, pH függő módon dimert képez, míg a C1s erre nem képes (ARLAUD 1980; VILLIERS 1985). Mindezek végül is megerősítették azt a modellt, mely szerint a katalitikus alegység tetramere Ca^{2+} jelenlétében C1s-C1r-C1r-C1s szekvencia szerint antiparalel elrendeződésben kapcsolódik (VILLIERS 1985) a felszíneik jelentős mértékű eltemetődése mellett (AUDE 1988). A modell szerint mindegyik enzim két-két domén csoportra osztható az interakciós és a katalitikus doménekre, melyben a C1r:C1s heterodimerizációt az interakciós domének, a C1r:C1r homodimerizációt a katalitikus domének közvetítik. Összhangban a modellel az elektronmikroszkópos felvételek a tetramer nyújtott szerkezetét mutatták (TSCHOPP 1980), míg a teljes heteropentamer C1 komplexben a tetramer eltemetődik a C1q szárai között (STRANG 1982). Nemcsak a katalitikus alegység asszociációja, hanem a teljes C1 komplex asszociációja is Ca^{2+} jelenlétében megy végbe, melyben a C1s N-terminális doméneknek meghatározó szerepük van (BUSBY 1990).

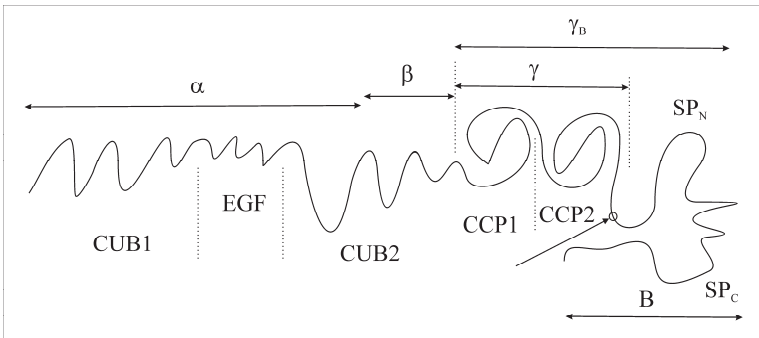
¹³ Lektin útvonal homológ fehérjéje (Mannóz-kötő lektin, MBL) is ebbe a csoportba tartozik.

¹⁴ Az ellenanyagok papainnal történő emésztése során keletkező egyik fragmentum, mely az immunrendszer képes aktiválni. Fc rész könnyen kristályosítható, innen a fragmentum rövidítése: kristályosítható fragmentum.

1.3. A C1r molekula

Mint általában az extracelluláris fehérjék (BORK 1991; BORK 1996) a C1r, C1s homológok is moduláris felépítésű glikoproteinek szerin proteáz aktivitással (VILLIERS 1985; LACROIX 1997). N-terminálistól a C-terminálisig hat-hat modul építi fel ezeket rendre: CUB1 (BORK 1993), EGF (CAMPBELL 1990), CUB2, CCP1 (REID 1989), CCP2 és SP (1. ábra).

A C1r enzim a kimotripszin típusú szerin proteázok családjába tartozik (RAWLINGS 1993). Az emberi májsejtek által termelt intakt C1r 705 aminosav hosszú és több domén alkotja. A zimogén autoaktivációja során egy R-I kötés hasad el az aktivációs szekvenciában, melynek eredményeképpen visszamarad a diszulfidhíddal összetartott nagyobb A és kisebb B lánc. A B lánc megfelel a szerin proteáz doménnek, míg az A lánc a többi, N-terminális doménből áll (CUB1-EGF-CUB2-CCP1-CCP2). Az A lánc további autolitikus hasításának eredményeképpen elkülöníthető egy α (210 aminosav), egy β (66 aminosav) és egy γ (176 aminosav) fragmentum (VILLIERS 1985), melyek hozzávetőlegesen megfelelnek rendre a CUB1-EGF, CUB2 és CCP1-CCP2 moduloknak.



1. ábra. A C1r molekula sematikus domén felépítése és autokatalitikus fragmentumai. A modulok és domének szaggatott függőleges vonallal vannak elválasztva, melyek az N-terminális felől CUB1, EGF, CUB2, CCP1, CCP2, SP. A redukált fragmentumok rendre α (CUB1-EGF és a CUB2 rövid N-terminális része), β (a CUB2 további része; az α - β közösen az A fragmentum), γ (CCP1-CCP2) illetve B (SP a két aldomejével, SP_N és SP_C), míg oxidált körülmények között a katalitikus fragmentum egyben marad, ez a γ_B . A nyíl és a bekarikázott rész az aktivációs hasítóhelyet emeli ki. A diszulfidhidakat nem jelöltem. (REID 1989; VILLIERS 1985)

Az interakciós doméneket hordozó α fragmentum a jelenleg ismert legkisebb egység, amely képes Ca^{2+} iont kötni, így se a CUB1, se az EGF erre önmagában nem képes. Ca^{2+} ion szerkezet-stabilizáló hatással bír, a kation nélküli fragmentum denaturációs hőmérséklete (ionerősségtől függően: 26-40°C) több mint 20°C-kal alacsonyabb, a Ca^{2+} ionnal telített fragmentuménál (BUSBY 1987).

A β fragmentum jelentős részben a CUB2 doménből áll, annak N-terminálisa kivételével. A teljes CUB2 domén szintén képes kis affinitással Ca^{2+} iont kötni (MAJOR 2010). A β és γ fragmentumok közötti szekvencia számos proteolitikus enzim hasítási helyét tartalmazza (V8 proteáz, elasztáz, plazmin, kimotripszin, termolizin és C1r) (ARLAUD 1986).

A C1r molekula teljes katalitikus funkcióját ellátja annak C-terminálisa a γ és B láncok diszulfidhídon keresztül összekapcsolt kovalens egysége, amit γ_B -nek neveznek (GAGNON 1985). A funkcionális katalitikus fragmentumot (γ_B) összesen 3 domén alkotja, nevezetesen CCP1, CCP2 (γ) és SP (B) domén. Hasonlóan a kimotripszin-típusú család többi tagjához a C1r B domén is két aldomérré osztható, mindkettő β -hordó szerkezetű.

A szerin proteáz doménje (PERKINS 1993) révén természetes szubsztráta a C1s, de leírják az MHC-I hasítását is (ERIKSSON 1990; ERIKSSON 1992; ERIKSSON 1996). C1s hasításához a C1r CCP2 modul nem szükséges, de jelenléte számottevően megnöveli az SP domén katalitikus aktivitását (KARDOS 2001) összevetve a teljes γ_B fragmentummal vagy pedig a B doménnel.

A C1r jelentős poszttranszlációs módosításokon esik át. Ezek közé tartoznak a CUB modulok és az SP domén N-glikozilációs helyein történő módosítások (LIU 2005), szám szerint rendre egy-egy illetve kettő. Továbbá a Ca^{2+} kötésében szerepet játszó aszparagin β -helyzetű hidroxilációja (ARLAUD 1987) az EGF modulban.

A molekulában előforduló modulok tipikus tagjainak térszerkezete ismert. Elérhető például az EGF modul oldatfázisú szerkezete (1apq BERSCH 1998), mely egy az EGF csoporton belül különlegesen hosszú flexibilis beépülést hordoz (WOUTERS 2005); a γ_B fragmentum, melyet egyben kristályosítottak ki és döntően meghatározza a jelenlegi C1r homodimerizációs modellt és a C1 heteropentamer komplexről alkotott képet, hiszen, ahogyan az várható volt a korábbi kísérletek alapján (ARLAUD 1986), röntgenszerkezete is homodimert mutat. A γ_B fragmentum szerkezetét mind zimogén (1gpz BUDAYOVA-SPANO 2002A), mind aktivált formában is meghatározták (2qy0 KARDOS 2008). Végül a C1r aktiváció szerkezeti hatása is tanulmányozhatóvá vált a CCP2-SP doménpár zimogén (1md7) és aktivált (1md8) kristályszerkezeteinek ismeretében (BUDAYOVA-SPANO 2002B).

Az egyetlen doméntípus, melynek szerkezete nem ismert a C1r-ből a CUB (CUB1 illetve CUB2). A C1r-homológ fehérjék CUB moduljait ugyanakkor kikristályosították és meghatározták a szerkezetüket. Így ismert szerkezetű a C1s molekula CUB1-EGF modulpárja (Inzi GREGORY 2003), a masp-2 gén hnRNS-ének alternatív hasítási terméke a MAP19 szintén CUB1-EGF párja (1szb GREGORY 2004), valamint a MASP-2 (1nt0 FEINBERG 2003) és MASP-1/3 (3dem TEILLET 2008) teljes CUB1-EGF-CUB2 (α és β) interakciós fragmentuma.

1.4. A tipikus CCP modul

A közvetlen vizsgálati objektumom a C1r két CCP modulja. A CCP modulok, más elnevezés szerint SCR¹⁵ vagy sushi modulok, extracelluláris fehérjék szerkezeti egységeként különösen gyakoriak az immunrendszerben (REID 1989). A korábban említett RCA géncsoport termékei szinte kizárólag a CCP modulok több kópiájából állnak, így az MCP négyet, a DAF szintén négyet, a CR1 alléltól függően 23, 30, 37 vagy 44 kópiát tartalmaz, ahogyan a CR2 is 15 vagy 16 darabot, a H-faktor 20 kópiát, az apolipoprotein H öt modul¹⁶, végül a C4-kötő fehérje α láncá tipikusan nyolcat, a β láncá pedig hármat tartalmaz. Három modul található továbbá a B-faktor és a C2 szerin proteázokban is. Általában nagy példányszámban található meg szelektinokban és CSMD¹⁷ molekulákban¹⁸ vagy esetenként két modullal, mint a komplementaktiváció kezdeti fehérjeiben (C1r, C1s és MASP molekulák) és transzmembrán receptorokban, mint az IL2R α ¹⁹ alegységében (RICKERT 2005) vagy a GABA_BR1a²⁰ (BLEIN 2004) fehérjében. Az RCA fehérjék hatását utánozva előfordulnak továbbá virális (*Herpesviridae* és *Poxviridae*) membránfehérjékben is (BLUE 2004; SPILLER 2006).

CCP modulok gyakran fordulnak elő komplement szabályozó fehérjékben (KIRKITADZE 2001). A komplementrendszer membránfehérjéit kiaknázva vírusok (FINGEROTH 1984; DOERIG 1993; NANICHE 1993; BERGELSON 1994) és baktériumok (HASAN 2002) sejt-specifikus lehorgonyzásához és bejutásához járulnak hozzá, vagy egyszerűen hozzákötődnek az RCA

¹⁵ SCR, rövid konszenzus ismétlődés.

¹⁶ Egészen pontosan a C-terminális utolsó CCP-szerű modul.

¹⁷ CUB és sushi modulokat többszörösen tartalmazó fehérje.

¹⁸ P-szelektinban 9, E-szelektinban 6, L-szelektinban 2, CSMD1-ben és CSMD3-ban 28, CSMD2-ben 26 példány fordul elő.

¹⁹ Az IL2R α , interleukin 2-es receptor α alegység két CCP modulja ún. domén-kicserélődés révén alakul ki.

²⁰ GABA_BR1a, a B típusú γ -amino-vajsav receptor 1a alegysége.

fehérjékhez (ZIPFEL 2002; BLOM 2004), így kerülve el a komplementrendszer általi eliminálásukat. Tipikusan fehérje-fehérje (HOURCADE 2000; KRYCH-GOLDBERG 2001; KIRKITADZE_2001) vagy fehérje-cukor (PROTA 2002; MARK 2006; SCHMIDT 2008A; SCHMIDT 2008B) kölcsönhatásokban vesznek részt.

Amikor az ismert fehérjeszekvenciák száma lehetővé tette, számítógépes módszerrel aminosav mintázatkeresése révén jellegzetes hasonlóságokat észleltek (REID 1986), melyeknek megadták konszenzus szekvenciáját. Egy kisebb, de a fehérjecsaládon belül jól jellemzett szekvenciális adathalmaz („betanító halmaz”) révén létrehozott konszenzus mintázattal keresve távolabbi homológokra lehetett rámutatni („próba halmaz”), melyek révén újabb szekvenciákkal lehetett növelni a létező adathalmazt (PATTHY 1987). Az SCR esetében egy finomított konszenzus szekvencia a **2. ábrán** látható.

```
CxxPPgIXNGxxxxxxxxgxxYxxGDxVxYxCxxG-YxLx---GxxgggxxxIxCxgxGgWSxxxgxxxxPx21
CPQPKLTDEFTIIQNQL-PQYQFRDYFIATCKQG-YQLIE--GNQVLHSFTAVCQDDGTWHRA-----MPRC
CGQPRNLPNGDFRYTTTGMVNTYKARIYYCHEPYYKMQTRAGSRESEGGVYTCTAQQIWKNEQKGEKIPRC
CPKEDTPNSVWEPK---AKYVFRDVVQITCLDG-FEVVE--GRVGATSFYSTCQSNKGWSNS-----KLLC
CGIPESIENKVEDP---ESTLFGSVIRYTCPEPYYMENGGG-----GEYHCAGNGSWVNEVLGPGLPKC
CKSPPEISHGVVAHMS--DSYQYGEEVYTKCFEG-FGID---GP-----AIKACL-GEKWSH-----PPSC
```

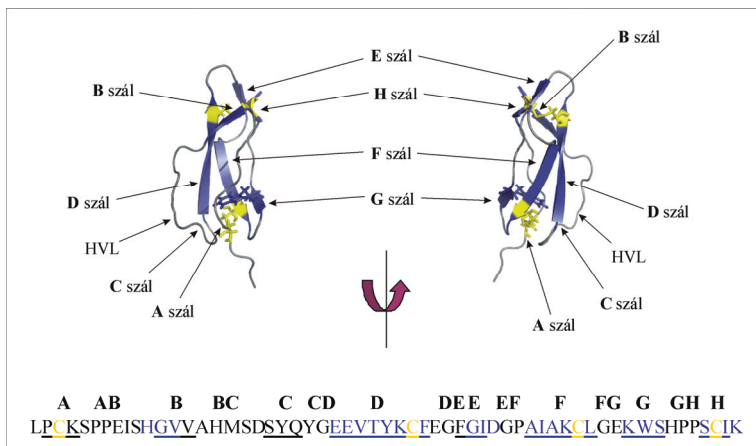
2. ábra. A CCP konszenzus szekvencia a konzervált aminosavakkal (PATTHY 1987) és alatta néhány CCP modul szekvencia-illesztése rendre a két C1r (CCP1 és CCP2), majd a két C1s (CCP1 és CCP2) és legalul a 2.ábrán látható CCP16 a H faktorból. Az N-kapcsolt szénhidrát helyzetét az aláhúzott aminosav jelöli. Minden modul szekvenciája emberi fehérjéből származik.

Egy tipikus CCP modult hozzávetőlegesen 60 aminosav alkot. Általában nehézséget okoz a modulhatárok definiálása, mely az extracelluláris CCP-k esetében mégis viszonylag egyértelmű. Egy ilyen jól definiálható mezsgye a konzervált diszulfidhidak cisztein maradékai, így az első cisztein a modul eleje és a negyedik cisztein a modul végét határozza meg. A ciszteinek 1-3 és 2-4 (vagy egy másik szokásos jelölés szerint: abab) mintázat szerint alkotják a két diszulfidhidat.

Nem meglepő, hogy a konzervált aminosavak szerkezetileg is konzervált régiókban találhatók. Az eddig meghatározott szerkezetekben a konzervált triptofán (tipikusan $G_{1,2}$, W_i) aminosav indol csoportja az 1-3 diszulfid híd térbeli szomszédságában helyezkedik el úgy, hogy a heteroatomos benzológot átellenes oldaláról a szekvenciális első, konzervált prolin zárja le. A következő aromás gyűrű (az első tirozin fenol csoportja) megközelítőleg merőlegesen határolja az indol gyűrűt („edge-to-face”). Megjegyzendő, hogy ilyen aromás-aromás kölcsönhatás adatbázis vizsgálat során is gyakorinak bizonyult (SAMANTA 1999;

²¹ g: eltérő hosszúságú beékelést jelöl („gap”).

SAMANTA 2000). Érdemes megfigyelni, hogy a rákövetkező GD szekvenciában a glicin az ún. G1G-típusú „ β -dudor”²² részét képezi, melyben a glicin preferált a többi aminosavval szemben (RICHARDSON 1978; CHAN 1993).



3. ábra. Az első oldatfázisú CCP szerkezet a H-faktor 16-os moduljának szalagmodellje két oldalról és szekvenciája (PDB²³; lhcc) (BARLOW 1991; NORMAN 1991). Az ideális β -szálas szerkezeti elemek az ábrán nyíllal, a szekvencián aláhúzással (A-H) és a közöttük elhelyezkedő β -kanyarok és hurok a szekvencia felett vannak jelölve (AB-GH). A kék a 16-os modul β -száljait, a sárga a ciszteineket mutatja. HVL: hipervariábilis hurok megegyezik a BC hurokkal.

Nagy vonalakban így jellemezhető egy tipikus CCP térszerkezet N-terminális fele. A szerkezet C-terminális felét, azaz a másik diszulfidhíd környezetét egy aromás és apoláros oldallánc (Y_i , L_{i+2}) képezi nyújtott gerinckonformációval. A következő említésre méltó konzervált szekvencia az NG, mely szerkezeti megkötöttség hiányában gyűrűzárásra képes (GEIGER 1987). Az aszparagin és a glicin reaktív amidjainak a távoltartása feltételezhetően a funkciócsoportok rögzítése révén történik egyrészt a β -kanyarban (glicin NH), másrészt az előbb említett aromás fenol (Y_i) oldallánccal való kölcsönhatás (aszparagin oldallánc amidja) révén.

²² Az angol nyelvű szakirodalom a β -bulge elnevezést használja, amire nem találtam magyar kifejezést. A továbbiakban a „ β -dudor” kifejezést használom idézőjelben.

²³ A térszerkezetek a Protein Data Bank (PDB) fehérje adatbázisból származtak, amikre az értekezésben a szokásos négykarakteres rövidítéssel hivatkozom.

Ezen kívül meglehetősen sok apoláris karakterű aminosav is található a szekvenciában, melyek hozzájárulnak a modul ún. β -szendvics szerkezetének a létrejöttéhez és stabilizálásához (BARLOW 1991; NORMAN 1991). Ezek a β -szálak antiparalel elrendezésben építik fel a két β -redőzött réteget (3. ábra). Beépülések és mutációk leggyakrabban az ún. hipervariábilis hurokban (BC-hurok) találhatóak, de előfordulnak másol is (pl. EF- és GH-hurok) és gyakran a β -kanyarok helyett azok hosszabb kiharcolódásaiként DE- (SMITH 2002) és FG-kanyarok (UHRINOVA 2003; JENKINS 2006) jelentkeznek. Ez utóbbiak révén a tandem elhelyezkedésű CCP modulok²⁴ kölcsönható felszínei jelentősen meghatározhatják a modulok egymáshoz viszonyított térbeli elhelyezkedését. Érdekes, hogy a modulok közötti ún. linker szekvencia hossza és a szomszédos modulok egymáshoz képest kialakuló flexibilitása nem feltétlenül függ össze egymással (SCHMIDT 2010). Cukorkötő CCP modulok esetében (a kötőpartner gyakran heparin, heparin-szulfát) a kötést a kölcsönható felszínen lévő aminosavak alakítják ki (BLOM 2002), és a kötésben feltételezhető a bázikus aminosavak megfelelő szekvenciális mintázata. Így a cukor kötésével befolyásolható a fehérje térbeli orientációja illetve a modulok kötésben mutatott kooperációja révén a kötés erőssége. Megjegyzendő végül, hogy a β -szálakon kívül a leginkább konzervált másodlagos szerkezeti elemek az AB-kanyar és a CD „ β -dudor” (CHAN 1993). A konzervált régiók a két diszulfid-híd körül csoportosulva teremtik meg az alapját annak, hogy a variábilis régiókba hosszabb-rövidebb szakaszok épüljenek be, ami által a modulok különféle funkciót tölthetnek be.

Egyik ilyen funkció például a heparin kötése (SMITH 2000). Modellezték korábban a heparin kötésében az XBBXBX vagy XBBBXXBX (CARDIN 1989) felismerő szekvenciák szerepét, ahol B bázikus, X pedig tetszőleges aminosavat jelöl. Előbbi szekvencia-mintázat megtalálható az MCP-1, a CR1~17, a VCP²⁵~1 modulokban illetve a CR1~15-16 és a C4BP α -1-2 modulok határán. Hogy a mintázatok ezekben a modulokban ténylegesen a heparin kötésért (is) felelősek azt kísérletes úton kell megvizsgálni. Mindenesetre a fenti válogatott példákban ezek a régiók a modulok esetében egytől-egyig térben közeli szekvenciárészetek és egyébként konzervált aminosavat érintő mutációkat érintenek. Ilyenek az első modulban az E és H β -szálak illetve az AB-kanyar, mely nem tartalmazza az egyébként gyakori N-G részletet. A második modulban az FG-kanyar beépülést hordoz illetve megjegyzendő még a C β -szál is, ahol hiányzik a tipikusan aromás oldalláncú

²⁴ A továbbiakban az ilyen elhelyezkedésű modulokat modulpárnak nevezem.

²⁵ VCP, virális komplement fehérje.

aminosavmaradék (kivéve az MCP~2). Nem véletlen, hogy CCP modulok egy csoportosításában ezen jellemzők alapján az említett modulok egy klaszterbe tartoztak (SOARES 2005) és denaturációs vizsgálatok szerint a CR1~15-16 modulok kooperativitása jelentősnek tűnik (KIRKITADZE 1999A; KIRKITADZE 1999B). Természetesen további vizsgálatokat igényel annak eldöntése, hogy ezek a mutációk a funkció szempontjából releváns információt hordoznak-e, netán közvetve a modulok lokális flexibilitásában, dinamikájában okoznak-e változást. Úgy tűnik azonban, hogy CR1 esetében a fenti részleteknek szerepük van C3b/C4b kötésében (KRYCH 1994; KRYCH 1998). Úgy tűnik mégis, hogy C4BP α -1-2 mutagenézis vizsgálatai alapján körvonalazódott, hogy a C4b kötésért pozitívan töltött aminosavak játszanak központi szerepet utalva a kölcsönhatás ionos jellegére (BLOM 1999; BLOM 2000A; BLOM 2000B). Ez a C4b kötőfelszín átfed a *Streptococcus* M4 kötőhelyével, melynek nem pusztán ionos jellegű kölcsönhatása kissé árnyalja a képet (BLOM 2000C). NMR-spektroszkópiai tanulmány kimutatta, hogy az M4 bakteriális fehérje kötődése a CCP modulpárokhoz jelentős mértékű változást eredményez flexibilis aminosavakon (UHRINOVA 2003; JENKINS 2006) hangsúlyozva a mozgékonyság szerepét is a fehérje-fehérje kölcsönhatásban.

A CCP modulok eddig ismert kb. négy tucatnyi röntgendiffrakciós és NMR szerkezeti alapján²⁶ a modul egy ellipszoidnak tekinthető felszín hoz létre. Ezek között akad olyan alakú is, mely többé-kevésbé egy gömbhöz hasonlít. Egy molekula belső és külső (globális) mozgása meghatározza a molekula amid kötéseinek relaxációs adatait. Ezek a fizikai paraméterek függenek a molekula alakjától, így az izotróp, a tengelyesen és a teljesen anizotróp fehérje relaxációs paraméterei eltérőek. Példaként említhető az izotróp esetre a CR1~16-os és a VCP~3, valamint az axiálisan szimmetrikusra az MCP~1 és a VCP~2 modulok. A molekulák globális rotációs korrelációs ideje mindezek miatt rendre: 3,65; 6,64; 4,50 és 7,90 ns (HENDERSON 2001; O'LEARY 2004).

1.5. A C1r γ_B fragmentum dimerizációja

Gélszűrés és elektronmikroszkópos vizsgálatok alapján ismert (KARDOS 2001; VILLIERS 1985), hogy míg a C1r katalitikus fragmentum pH függvényében dimerizálódik (ARLAUD 1980; KARDOS 2001), addig a C1s katalitikus fragmentuma erre nem képes. A C1r ilyen

²⁶ <http://pfam.sanger.ac.uk/family/PF00084#tabview=tab8> 2010.június 1-jei adatai alapján.

dimerképzésében a CCP1-es modul jelenléte nélkülözhetetlen. Érdeemes megvizsgálni a két molekula CCP1-es fragmentumaiban rejlő különbségeket (2. ábra).

Összességében a C1s és C1r CCP1 moduljaiból a C1r CCP1 két aminosavval hosszabb és a beépülés a 'HVL' régiójára tehető. Pontosán ez a rész a C1r γ_B kristályszerkezetében a CCP1 és a dimerpár SP doménjei közötti kölcsönhatás egyik régiója. A kölcsönható régió a SP szempontjából az ún. I-es külső helynek felel meg az intenzíven vizsgált homológ trombinban (BODE 2006). A C1r SP I-es külső hely tartalmazza a két N-glikozilációs hely közül az egyiket (ld. korábban). Az SP egy közeli cukorrészlete is kapcsolódik a 60-as huroknak megfelelő részen található N–A–S szekvencia által definiált N-glikozilációs hely.

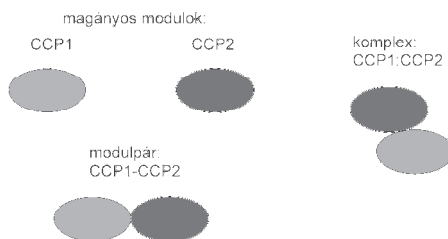
Tovább összetvetve a C1r és C1s CCP modulokat, szerkezeti szempontból jellegzetes különbség még, hogy a C1s CCP1-ben két jellemző prolin, nevezetesen az első cisztein utáni (CXXP) és az utolsó cisztein előtti (PXC) hiányzik. A tipikusan egyetlen triptofán helyett kettő található a foldban az első AB-kanyar után, mely elhelyezkedése alapján egyértelműen érinti az inter-moduláris nexust, bár a C1s CCP1-ről nincsen szerkezeti modell. További eltérés, ugyan a C1s CCP2-es moduljában, hogy található egy N–G–S által kódolt N-glikozilációs hely, mely helyzete alapján szintén a két CCP közti linker régiót érinti. Végül a két molekula közti eltérésként említendő, hogy a CCP modulok közötti négy aminosavas linkerben a merev konformációt felvevő prolin található. Mindezek arra utalhatnak, hogy az intermoduláris mozgékonyosság a C1r-ben nagyobb mértékű, mint a C1s-ben, ami talán magyarázattal lehet a dimerizációs viselkedésben rejlő eltérésre.

2. Célkitűzések

A CCP kis mérete miatt különösen alkalmas NMR-spektroszkópiai vizsgálatra. A C1r CCP modulok belső dinamikájának és kölcsönhatásának vizsgálata új szemszögből világhatja meg a teljes C1r molekulát és hozzájárulhat viselkedésének megértéséhez.

- A humán C1r molekula két CCP moduljának gerinc jelhozzárendelésének elvégzése, mind önmagukban, mind párban. A másodlagos kémiai eltolódások vizsgálatával a modulok oldatszerkezeti jellemzése.
- A modulok belső dinamikájának vizsgálata NMR relaxációs vizsgálatokkal és a molekulák mozgékony pontjainak meghatározása.
- A modulpár (CCP1-CCP2) vizsgálata, különös tekintettel a tandem modulok egymással való kölcsönhatására.
- A magányos CCP modulok esetleges komplexének (CCP1:CCP2) vizsgálata.

A dolgozatban vizsgált modulokat és azok kölcsönhatásait a **4. ábrán** foglaltam össze.



4. ábra. A tanulmány NMR-spektroszkópiai vizsgálatának objektumai és azok kölcsönhatásai.

3. Elméleti áttekintés

3.1. Az NMR spektroszkópia biológiai alkalmazása

A szerkezeti biológia (és ezen belül kiemelten a szerkezeti genomika) (STAUTON 2003) egyik fontos célja, hogy az egyre nagyobb mennyiségű genomiális és – ezzel párhuzamosan és összefüggően – fehérje szekvenciális adat ismeretében a fehérjéről térszerkezeti információt nyerjünk. Ez érthető, hiszen a szekvencia és a térszerkezet közötti reláció jelenlegi ismereteink szerint nem adható meg egyértelműen²⁷. A szerkezeti genomikában különböző fehérje szekvenciák összevetése és hasonlóságuk statisztikai értékelése evolúciós és funkcionális kérdésekre adhat választ. A nagymértékű szekvenciális hasonlóságok felismerése konszenzus szekvenciák létrehozását eredményezi, melyek legtöbbször egy-egy azonos térszerkezetre jellemzőek, így a bioinformatika módszereivel jósolhatóvá válnak további szekvenciákhoz tartozó szerkezetek. Hasonló szekvenciariészletek hátterében nemcsak a fehérjék közös eredete lehet (homológia), hanem a fehérjék valamilyen közös funkció ellátására vonatkozó képessége is (analógia). Az előbbit a divergens evolúció, az utóbbit pedig a konvergens evolúció eredményezi. A konvergens, tulajdonképpen funkció által irányított, evolúció általában rövid, néhány aminosavat érintő, szekvencia részletben jelentkezik és jellemzője, hogy ezek a motívumok gyakran eltérő szerkezetű fehérjéken találhatóak meg²⁸. A szerkezeti genomika eredményeként gyakran előbb ismert a fehérje vagy domén szerkezete, mint annak funkciója. A funkcionális jellemzéshez szintén bioinformatikai módszereket hívnak segítségül. A nagyon hasonló vagy teljesen megegyező szekvenciális motívumok egyidejű meglétéből szerencsés esetekben visszafejthető a vizsgált fehérje működése különösen akkor, ha mozgékony régiókról van szó (funkcionális genomika). A lineáris motívumok (PUNTERVOLL 2003) általában rövidek, könnyen kaphatunk hamis pozitív eredményt, ezáltal a statisztikai értékelés különösen fontos ezekben az elemzésekben (DOOLITTLE 1981). Nemcsak statisztikai elemzés, hanem sejtteni ismeretek is jelentősen hozzájárulhatnak a talált motívumok értékeléséhez (pl. a fehérjék azonos lokalizációja). Nagy

²⁷ Elméletileg megadható, de jelen tudásunk alapján pusztán predikciókra szorítkozhatunk, melyek gyakran eltekintenek a környezeti hatásoktól (pl. ionerő, oldószer, pH, hőmérséklet).

²⁸ Meg kell említeni ugyanakkor a kimotripszin- és szubtilizin-típusú enzimeket, melyekben az azonos funkció ellátó aktív centrum többféle feltekeredés mellett megvalósulhatott az idők során utalva a kémiai reakció képlékenységre.

előnye, hogy térszerkezeti információ nem szükséges az elemzéshez, viszont egyéb, funkciót érintő, kísérletek nélkülözhetetlenek hozzá. Természetesen a statisztikai értékelés nem váltja ki a szerkezet meghatározásból adódó bizonyító erejű tényeket.

Ezek szerint, mind a szerkezeti, mind a funkcionális genomikához elengedhetetlen a térbeli szerkezet ismerete. A fehérjék atomi szintű szerkezet meghatározásához hatékonyan jelenleg kétféle módon közelíthetünk: röntgenkristallográfia vagy mágneses magrezonancia (NMR) spektroszkópia alkalmazásával. A két módszer egymást gyakran kiegészíti. Röntgenkristallográfia esetén a fehérjék kristályosítása időigényes feladat, értelemszerűen a molekula mozgékonyasága megnehezítheti vagy teljesen meggátolhatja a kristályosítást. A fehérjék mérete önmagában nem befolyásolja a röntgenkristallográfiával történő szerkezet meghatározás eredményét. A viszonylag gyorsabb kiértékelés végül egy statikus szerkezetet eredményez. Ezzel ellentétben a mágneses magrezonancia spektroszkópia oldatbeli szerkezetekről szolgáltat információt, mely alkalmazásakor a mérés időigénye a kiértékeléshez képest rövidebb. Egyes kivételektől eltekintve a fehérje mérete erősen korlátozza a módszer alkalmazhatóságát, viszont nagy előny, hogy a kiértékelés dinamikus képet ad a molekuláról és a fehérje mozgékonyasága gyakran hozzájárul a mérések sikeréhez.

A mágneses magrezonancia spektroszkópia biológiai alkalmazásakor kihasználható mágnesesen aktív magok (tipikusan ^1H , ^{13}C , ^{15}N) erős mágneses térben azok spinállapotaikhoz tartozó átmenetek energiáját lehet rögzíteni. A fehérjékben lévő H-atomok és az említett heteroatomok a fehérje egyedi térszerkezete révén kialakított kémiai környezetre jellemző kémiai eltolódásokat adnak. Innen adódik, hogy a kémiai eltolódások a kémiai környezeten keresztül utalnak a fehérje térszerkezetére. Továbbá az atommagok közötti téren keresztül ható mágneses kapcsolat, az ún. nukleáris Overhauser effektus, távolságfüggése révén egyértelműen megadhatják a fehérje térszerkezetét. Ezen kívül egyéb, itt tovább nem részletezett paraméterek, mint pl. skaláris és dipoláris csatolások szintén felhasználhatók szerkezetmeghatározáshoz.

A további NMR-spektroszkópiai jelenségek, különösen annak összetettsége miatt, nem tekinthetők ezen értekezés részének. Ilyen témában számos idegen (ABRAGAM 1961, WÜTHRICH 1986, KEELER 2005, LEWITT 2008) és magyar nyelvű (SOHÁR 1976, HORE 2004, NÁRAY-SZABÓ 2006) szakirodalom található és kiemelném még Dr. Gáspári Zoltán doktori értekezését (GÁSPÁRI 2003) is.

Az alábbiakban az elvégzett munkámhoz szorosan kapcsolódó témaköröket tekintem át röviden.

3.2 Jelhozzárendelés

3.2.1. A jelhozzárendelés problémája és megoldása fehérjékben

Az ^1H gyakori előfordulása és mágneses érzékenysége miatt ideális atommag az NMR kísérletekben. Az NMR-jeleket szolgáltató ^1H spinek nagy száma miatt gyakran előfordul, a kapott spektrumok túlzásúfolttsága miatt a jelhozzárendelés komoly nehézségekbe ütközik. Megoldást jelent erre, ha magasabb dimenziójú spektrumokat használunk, vagy valamilyen módon csökkentjük a spektrumban megjelenő jelek számát. Mindkét esetben a minta megfelelő izotópjelölése szükséges. Természetesen ilyenkor a mérési technikának is ehhez kell igazodnia.

Az NMR spektrumok értékeléséhez nélkülözhetetlen a fehérjeminta szekvenciájának ismerete. A fehérjeláncban az egyes aminosavak vicinális és geminális helyzetű hidrogénatommagjai a kötésben lévő elektronokon keresztül (J-csatolás) egymással összefüggő jelrendszert alkotnak, a spinrendszert²⁹. Egyes aminosavak esetében több spinrendszert is el lehet különíteni. Minden aminosavtípushoz az atomok konstitúciója révén meghatározott spinrendszer, ezáltal a kötések általi csatolásokon alapuló spektrumokban megjelenő jellegzetes mintázat tartozik (ld. később). A nukleáris Overhauser hatást kihasználó spektrumok felhasználásával egy adott hidrogénhez térben közeli, egyéb hidrogénekről kapunk információt. A direkt vagy téren át ható spin-spin csatolás intenzitása az internukleáris távolság 6-ik hatványával fordítottan arányos. Fehérjék esetében tipikusan az *i*-edik aminosav hidrogénjeinek a jeleit lehet detektálni az *i*+1-edik aminosav amid hidrogénjén. A távolságfüggés miatt ezek a keresztcsúcsként jelentkező kapcsolatok általában erősebbek is, mint a többi nOe jel. A szekvenciában távolabbi aminosavak egymással adott jelei már a molekula specifikus háromdimenziós térszerkezetére jellemzőek. Az aminosavak jeleinek típusokba sorolása, illetve a köztük lévő nOe kapcsolatok erőssége és száma alapján a szekvencia ismeretében a csúcsok hozzárendelhetők az egyes atomokhoz.

²⁹ Bár egyes aminosavak több spinrendszerből állnak, a gerincatomok spinrendszereire ez a megállapítás helytálló.

3.2.2. Az aminosav oldalláncok spinrendszerei (kovalens kapcsolatok)

Az aminosavak amidkötések kialakításával kapcsolódnak össze hosszabb láncá. Az amidkötésben lévő karbonil funkciós csoport szénatomja nem tartalmaz H ligandumot, emiatt az egyes aminosavak az NMR TOCSY-típusú spektrumaiban diszkrét egységet, ún. spinrendszert képeznek. Míg a COSY spektrumokban a keresztsúcsok csak vicinális protonokról származnak, a TOCSY spektrumokban a teljes COSY kapcsolatrendszer fellelhető, sőt a vicinálisan összekapcsolt hidrogének mind jelentkeznek keresztsúcsként. A 20 természetes aminosav spinrendszere 10 csoportba sorolható: G, A, T, V, L, I, J típus (N stb.) és az U típus három alcsoportja (Q stb.) (WÜTHRICH 1986).

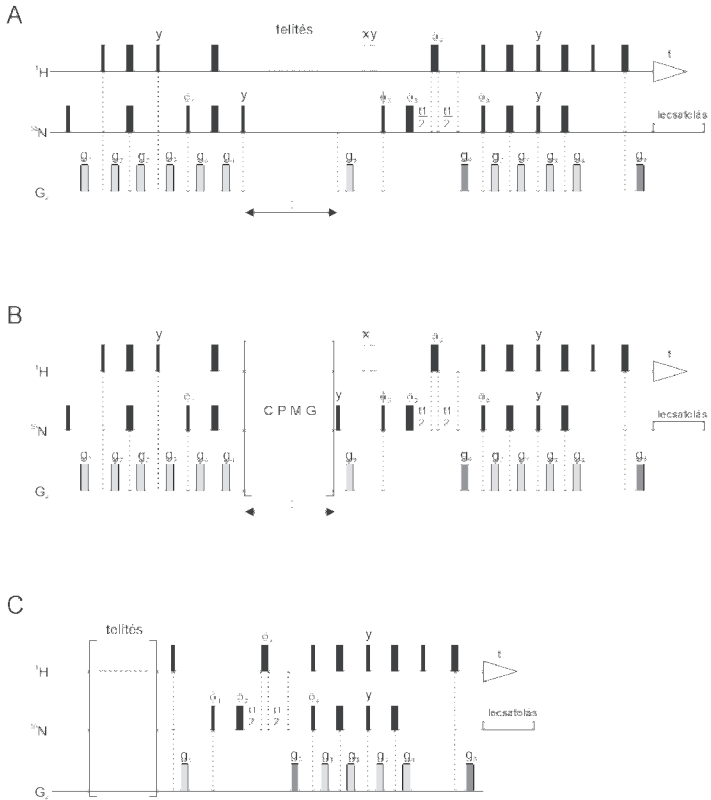
3.2.3. Spinrendszerek szekvenciális hozzárendelése (térbeli kapcsolatok)

Az NMR spektrumok értékeléséhez, a jelhozzárendeléshez a gyakorlatban szükséges a fehérje szekvenciájának ismerete. A fent leírt TOCSY-típusú gerinc spinrendszerek segítségével kémiaiilag tipizálható a szekvencia. Az ún. szekvenciális asszignáció során az egyes spinrendszerek közötti kapcsolatokat jelentő NOE-típusú jeleket azonosítjuk. Az egymással szomszédos aminosavak ugyanis elméletben mindig szolgáltatnak ilyen jellegű keresztsúcsokat. A fehérje szekvenciájának ismeretében, a talált kapcsolatokat a keresettekkel folyamatosan összevetve megtalálhatóak a valóban egymás melletti aminosavnak megfelelő jelrendszerek.

3.3. Relaxációs és dinamikai vizsgálatok

Bár közvetlenül nehéz betekintést nyerni a molekulák belső mozgásába, az NMR spektroszkópia kiválóan alkalmas molekulák, esetünkben fehérjék belső mozgékonyságának közvetett vizsgálatára. Ennek – nagyon leegyszerűsítve – az az alapja, hogy fehérjékben, mint általában a flexibilis molekulák esetében, a kötések állandó mozgása elősegíti a relaxációs mechanizmusokat, mellyel a gerjesztés során felvett energia leadható a tágabb értelemben vett környezetnek. A gerjesztés során a dinamikus egyensúly megszűnik, melynek helyreállítását a rendszer a relaxációval éri el. A relaxáció egyes jellemzőiből matematikai módszerekkel a fehérje mozgására lehet következtetni. A molekulák

mozgásának makroszkopikus értelmezése során a fehérjepopuláció tipikus mozgásait igyekszünk térbeli és időbeli paraméterekkel leírni.



5. ábra. A ^{15}N -dinamikai mérésekhez használt pulzusszekvenciák vázlatla (A) $^{15}\text{N-T}_1$, (B) $^{15}\text{N-T}_2$ és (C) $\{^1\text{H}\}$ - ^{15}N -NOE meghatározásához. A vékony téglalapok a 90° -os, a vastagok a 180° -os pulzusok jelölék. A sötétebb gradiens pulzusok a koherenciaútvonal kiválasztására használunk. Minden pulzus az x tengely mentén alkalmazzuk, ettől eltérő esetben jelöltem az irányt. A T_1 és T_2 kísérletekben a fáziscirkuláltatás módja: ϕ_1 : x, -x; ϕ_2 : y; ϕ_3 : $4(x)$, $4(y)$, $4(-x)$; $4(-y)$; ϕ_4 : $2(x)$, $2(-x)$; ϕ_5 : x; a vevő: x, -x, x, -x, x, -x, x; az NOE mérésnél: ϕ_1 : y; ϕ_2 : $2(x)$, $2(y)$, $2(-x)$, $2(-y)$; ϕ_3 : x, -x; ϕ_4 : x; a vevő: x, x, -x, -x. A pulzusszekvenciákról részletesebb leírás a (FARROW 1994) tanulmányban található. (CPMG, Carr-Purcell-Meiboom-Gill pulzusszekvencia.)

A fehérjék belső dinamikájának jellemzésére leggyakrabban az ún. T_1 , T_2 relaxációs idő, illetve kiegészítésként az ún. heteronukleáris (pl. ^{15}N - ^1H magok közötti) NOE méréséből indulnak ki (Gáspári 2010). Ezekből többféle mozgékonyági elemzés végezhető, a legnépszerűbb az ún. Lipari-Szabó-féle modellfüggetlen (model-free) elemzés, illetve egyes esetekben a megfelelő spektrális sűrűségfüggvények elemzése (reduced spectral density mapping, RSDM). A mérésekhez használt pulzusszekvenciák vázlata az **5. ábrán** látható.

A molekula egészének oldatbeli mozgását az ún. rotációs korrelációs idővel jellemezzük, amely annak az időtartamnak felel meg, amennyi alatt a molekula az oldatban 1 radiánt fordul. Mivel a globális rotációs korrelációs idő függvényében a T_2 relaxációs idő szigorúan monoton csökken, míg a T_1 relaxációs idő minimummal rendelkezik, a korrelációs idő ebből a két relaxációs paraméterből becsülhető (CLORE 1990).

3.4. Gerinc dinamika

A kötések mozgásának jellemzéséhez a mért relaxációs adatokból vissza kell fejtetni az ún. spektrális sűrűségfüggvény diszkrét értékeit, melyekből a dinamikai paraméterek származtathatók (JARYMOWYCZ 2006). Megkülönböztethető a teljes spektrális sűrűségfüggvény elemzés (PENG 1992; PENG 1994; PENG 1995; ALEXANDRESCU 1994) illetve annak redukált (LEFEVRE 1996; KRIZOVA 2004; ANDREC 1999; ANDREC 2000; ANDREC 2007; HENKELS 2007) elemzése. Előbbi esetben több térerőn elvégzett relaxációs mérések szükségesek, míg az utóbbi esetében elegendő egy térerő adatait használni. Mindkét esetben a spektrális sűrűségfüggvény diszkrét értékeinek lineáris kombinációjával adhatók meg a relaxációs értékek, így a paraméterek kísérletes meghatározásával kiszámíthatók a spektrális sűrűségfüggvény adott értékei. A redukált elemzés során a három relaxációs adatból csak három spektrális sűrűség érték meghatározására van mód³⁰. Ezeket az értékeket az alábbi egyenletek felhasználásával kaphatjuk meg (KRIZOVA 2004):

$$J(0) = \frac{-3}{4(3d^2 + c^2)} R_1 + \frac{3}{2(3d^2 + c^2)} R_2 + \frac{-9}{10(3d^2 + c^2)} \frac{\gamma_N}{\gamma_H} R_1 (NOE - 1),$$

³⁰ A nagyfrekvenciás mozgások $(\omega_H, \omega_H - \omega_N, \omega_H + \omega_N)$ spektrális sűrűségértéke lineáris a vizsgált tartományban

$$J(\omega_N) = \frac{1}{(3d^2 + c^2)} R_1 + \frac{-7}{5(3d^2 + c^2)} \frac{\gamma_N}{\gamma_H} R_1 (NOE - 1),$$

$$J(0,87\omega_H) = \frac{1}{5d^2} \frac{\gamma_N}{\gamma_H} R_1 (NOE - 1)$$

$c^2 = \omega_N^2 \Delta\sigma^2 / 3$, $d^2 = (\mu_0 h \gamma_N \gamma_H)^2 / (16\pi^4 r^6)$, r az NH kötés távolsága, $\Delta\sigma = -172 \text{ ppm}$, $\omega_N = {}^{15}\text{N}$ Larmor frekvenciája (11,7433 T = 500 MHz). A fenti képletekben szereplő $\gamma_N / \gamma_H R_1 (NOE - 1) = \sigma$, az ún. kereszt-relaxációs sebesség.

A redukción az teszi lehetővé, hogy az öt diszkrét értékből a három nagyfrekvenciás érték $J(\omega_I)$, $J(\omega_{S-I})$ és $J(\omega_{S+I})$ nagyon hasonló, így ezeket jó közelítéssel össze lehet vonni egyetlen értékke: $J(0,87\omega_I)$. [Megállapodás szerint a ${}^1\text{H}$ az I mag, míg a ${}^{15}\text{N}$ az S mag³¹.] Ha ezeket a közelítéseket alkalmazzuk, akkor könnyen kiszámítható a három spektrális sűrűségérték. Minden egyes S-I kötésnek (pl. N-H) egyértelműen definiálható spektrális sűrűségfüggvénye van, mely megadja a különböző frekvenciájú (szögsebességű) mozgások részesedését az S-I kötés teljes mozgásában. A sűrűségfüggvények a kötésvektorok adott frekvenciájú mozgásának a valószínűségét adják meg.

3.4.1. A Lipari-Szabó-féle dinamikai elemzés

A relaxációs adatok leggyakoribb értelmezése során a spektrális sűrűségfüggvény felhasználásával dinamikai paramétereket származtathatunk. Ennek egyik ma legelfogadottabb módját Lipari és Szabó javasolta 1982-ben (LIPARI 1982A,B). (Az eljárásra a szakirodalom modellfüggetlen módszerként hivatkozik, mert nem tételez fel a kötésvektorok térbeli mozgására fizikai modellt. Az elemzés ugyanakkor többféle paraméterkiszámlát eredményezhet, amelyekre általában modelleként hivatkoznak.) Az alapfeltevés a molekula globális és az egyes kötések lokális reorientációjának szétválasztása. Bevezetik az általános rendezettségi paraméter négyzetét (S^2), mely a spektrális sűrűségfüggvénnyel az alábbi kapcsolatban áll (izotróp esetben):

³¹ I az érzéketlen, míg az S az érzékeny magot jelöli az angol kifejezés rövidítéseként (Insensitive, Sensitive) Gyakorlatilag éppen fordítva szerepelnek a konvenció szerint: a giromágneses állapotok ${}^1\text{H}$ -ra: $267,522 \cdot 10^6 \text{ rad/sT}$, míg a ${}^{15}\text{N}$ -re: $-27,126 \cdot 10^6 \text{ rad/sT}$ (LEVITT 2008).

$$J(\omega) = \frac{2}{5} \left[S^2 \frac{\tau_m}{1 + \omega^2 \tau_m^2} + (1 - S^2) \frac{\tau}{1 + \omega^2 \tau^2} \right]$$

ahol S^2 [0,1] intervallumon belül értelmezett³², τ_m a molekula globális rotációs korrelációs ideje, τ_e a belső mozgás hatékony (effektív) korrelációs ideje, τ pedig e kettő között teremt kapcsolatot az alábbiak szerint:

$$\frac{1}{\tau} = \frac{1}{\tau_m} + \frac{1}{\tau_e}.$$

Az egyenletből látható, hogy S^2 szemléletesen a globális mozgás hozzájárulása a vizsgált N–H kötés reorientációjához:

- $S^2 = 1$ esetben csak a molekula teljesen korrelált, globális mozgása érvényesül, azaz a kötésvektor mintegy „rögzítve van” a molekulához.
- $S^2 = 0$ esetben csak a lokális mozgás érvényesül a kötés reorientációjában, a kötésvektor és a molekula mozgása teljesen függetlennek tekinthető.

1. táblázat. A modellfüggetlen modellek és paramétereik.

Modell	Paraméter	Megjegyzés
1	S^2	A lassú belső mozgás elhanyagolható ($\tau_e < 20$ ps).
2	S^2, τ_e	Az eredeti Lipari-Szabo modellfüggetlen leírás.
3	S^2, R_{ex}	A kémiai csere tag is figyelembe van véve.
4	$S^2, \tau_e, R_{\text{ex}}$	A Lipari-Szabo formalizmus kémiai csere taggal.
5	S^2, S_f^2, τ_e	A belső mozgás egy gyors és egy lassú összetevőre van bontva.

Amit így az egyes kötések mozgásáról kapunk az két időbeli - globális (τ_m) és belső (τ_e) rotációs korrelációs idő - és egy térbeli - általános rendezettség paraméter négyzete (S^2) - paraméter. Szemléletesen S^2 a vizsgált (N–H) kötés mozgásának térbeli megkötöttsége: S^2 fordított arányban van a kötés mozgása során a térből kimetszett kúpállást nyílásszögével. Ennek a mozgásnak a sebességét τ_e jellemzi, míg az egész molekula mozgását a τ_m adja meg. Későbbiekben ezt a leírást finomították további paraméterekkel. A jelenleg elterjedt

³² Az előző fejezetben leírt a_n felhasználásával: $n=2$ esetre, így $a_1=S^2$ és $a_2=(1-S^2)$

dinamikai paramétereket számoló programok (ModelFree MANDEL 1995, Tensor2 DOSSET 2001, Dasha OREKHOV 1995, Relax D'AUVERGNE 2008A,B) segítségével a fehérje atomok térbeli koordinátáinak és a relaxációs adatsornak ismeretében a dinamikai paraméterek viszonylag könnyen kiszámíthatóak. A programokkal először az összes kötés R_2/R_1 hányadosából a molekulára globális rotációs korrelációs időt határozzunk meg, melyet az egyes aminosavakra nézve tovább kell finomítani és statisztikailag értékelni (több program ezt el is végzi). A statisztikai értékelés azért fontos, mert csak a kevesebb paramétert tartalmazó leírások elégtelensége esetén szükséges a bővített modellek segítségül hívása. Az illeszthető paraméter-készletek az **1. táblázatban** találhatóak (GÁSPÁRI 2010).

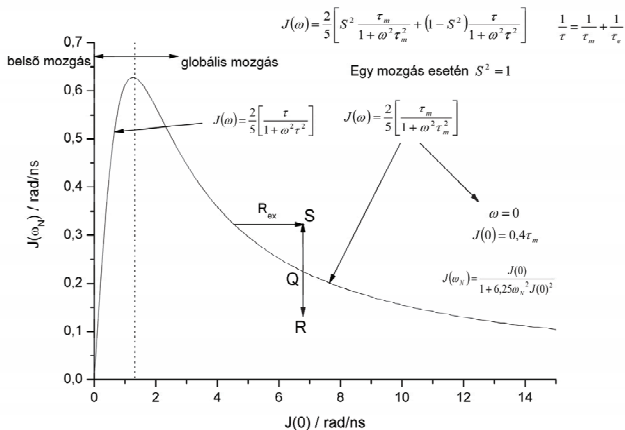
Látható, hogy az első modell a statisztikailag értékelhető legegyszerűbb modell. Ezért, ha az adott kötésvektor mozgását ez a modell kis χ^2 értékkel írja le, akkor általában ez a kellően egyszerű modell megfelelően jellemzi a kötés mozgását. További szempont a túlparametrizálás elkerülése: a lehető legkevesebb négyes vagy ötös modell megadása a dinamikai jellemzés során. Az illesztett globális rotációs korrelációs idő függvényében változnak a paraméterek, így a modellek is. Általában nehéz előre megmondani, mi a legoptimálisabb modell illetve a legmegfelelőbb τ_m , viszont fontos szempont lehet, a modellek egyszerűsége. Definiálható a τ_m függvényében az aminosavakra egy összmodellszám (az egyes aminosavakra illesztett paraméterkészletek sorszámának összege), amit a lehetőségekhez mérten minimalizálnunk szükséges. Szempont lehet az 1-3 modellek esetében a megfelelően alacsony χ^2 érték. A fenti leírás a molekula teljesen izotróp relaxációs esetére alkalmazható. Az anizotróp relaxációs viselkedés számottevően megnehezíti a dinamikai jellemzést (legalább három illetve öt tagra hízik a spektrális sűrűségfüggvény).

3.4.2. A spektrális sűrűségfüggvény redukált elemzése

Mivel a spektrális sűrűségfüggvény közvetlenül megkapható a relaxációs rátákból és az NOE növekményekből, adott helyeken felvett értékeinek kiszámítása információval szolgált az N–H kötések azon szögfrekvenciájú (szögsebességű) mozgásairól, melyek a relaxációban hatékony szerepet játszanak.

A redukált elemzés során az összetartozó $J(0)$, $J(\omega_N)$ és $J(0,87\omega_H)$ értékek egyetlen pontot jelölnek ki az általuk definiált bázis térben (FARROW 1995). A nagyfrekvenciás érték

annyira kis intenzitású, hogy gyakran a $J(0)$ függvényében ábrázolják a $J(\omega_N)$ -t (6. ábra). Az ideálisan egyetlen mozgásra egyszerűsített dinamika esetén (azaz amikor a globális és a lokális mozgások nem választhatók szét) az összetartozó értékpárok egyetlen görbét adnak. Ennek van egy hozzávetőleg lineáris felszálló és egy hiperbolikus leszálló ága. A két ág rendre megfeleltethető az $\omega\tau \ll 1$ és $\omega\tau \gg 1$ eseteknek.



6. ábra. A spektrális sűrűségfüggvény redukált elemzésének elve. A görbe az egy mozgással jellemezhető kötés összetartozó kis és közepes szögsebességű spektrális sűrűség-értékeit mutatja (pl. Q pontban). A felszálló ágon a gyors, belső, a leszálló ágon a lassabb globális mozgások ($S^2=1$) a meghatározóak. Utóbbi esetben a molekula reorientációs ideje (τ_m) közvetlenül származtatható a $J(0)$ értékből. Q pontnál összetettebb és gyorsabb mozgást végez az R ponthoz tartozó értékpárral jellemezhető kötés, míg az S pontban szintén összetettebb mozgás adható meg a kötés reorientációjára, amikor μ s-ms időskálájú R_{ex} cserével is számolni kell.

A görbe pontjai tehát kijelölik az egy mozgáshoz tartozó spektrális sűrűség-értékeket. A leszálló ágon ($S^2 = 1$) $1/\tau = 1/\tau_m$, mivel $1/\tau_e = 0$ és ekkor $J(0) = 0,4\tau_m$, azaz a globális rotációs korrelációs időt közvetlenül jellemzi a $J(0)$ érték. A görbe adott pontjához tartozó rögzített $J(0)$ érték mentén lefelé haladva csökken a $J(\omega_N)/J(0)$ hányados (R pont), ami arra utal, hogy a lokális mozgás előtérbe kerül (S^2 és τ_e csökken), így $1/\tau_m < 1/\tau_e$. Felfelé haladva (S) már nehezebben értelmezhető a jelenség: S^2 nem növekedhet a maximális 1 fölé és valahogyan teljesülnie kell a $1/\tau_m > 1/\tau_e$ relációnak. Ezt az ellentmondást úgy lehet

feloldani, hogy az R_{ex} -ből származó tagot is figyelembe vesszük $1/\tau_m + 1/\tau_{R_{ex}} = 1/\tau_e$. Az R_{ex} viszont növeli a $J(0)$ -át, tehát jobbra tolódik el a pont a grafikonon a rögzített $J(0)$ -áig.

3.5. Intermolekuláris kölcsönhatások

Az intermolekuláris kölcsönhatások során a molekulák dinamikája követi a kapcsolódással létrejövő energiaváltozást. Általában a kapcsolódó felszínnek mozgékonyságának csökkenését (entrópiikus tag) kompenzálja a kapcsolódó felszínnek közötti pozitív energiateg (entalpia) és/vagy a kapcsolódásból kimaradó részek flexibilitásának növekedése (kompenzáló entrópia), mely a molekulán belüli csatolt mozgások átrendeződésével magyarázható (JARYMOWYCZ 2006). Az egyre inkább felismert gyenge kapcsolatok előnye, hogy sokszor megtartják a partner molekulák funkcionális szerkezetét. Előfordulhat, hogy például a kristályosítás révén meghatározott komplex nem funkcionálisan aktív, hanem a kristályosítás során létrejövő erős komplex biológiailag irreleváns kapcsolatokat tükröz. Általában az erős fehérje-fehérje kölcsönhatásokat kimutató technikák érzéketlennek bizonyulnak a gyenge kölcsönhatások esetében ($k_D > 0,1-0,001$ mM) (VAYNBERG 2005, 2006). Ugyanakkor az NMR-spektroszkópia több szempontból is hatékony az ilyen jellegű kölcsönhatások kimutatásában (ZUIDERWEG 2002). Leggyakrabban a kémiai eltolódások változását követik a kölcsönhatás kialakulása (pl. titrálósos kísérlet) során. A kémiai környezet nemcsak az elsődleges kötőfelszínen változhat meg, hanem, különösen flexibilis molekulák esetében, attól távolabbi régiókban is (pl. GÁSPÁRI 2006). Kellő körültekintéssel azonban a detektált változások alapján következtetéseket tehetünk a kölcsönhatás geometriájára. Ehhez speciális, erre a célra tervezett, nagyon robusztus fehérje-fehérje dokkoló program is segítségül hívható (BONVIN 2005).

4. Az elvégzett kísérletek

4.1. A rekombináns C1r CCP modulok előállítás

A CCP1, CCP2 és CCP1-CCP2 modulokat az MTA, SzBK, Enzimológiai Intézetben Závodszy Péter csoportjában állította elő Szilágyi Katalin (CCP2, CCP1-CCP2) és Major Balázs (CCP1 és CCP1-CCP2).

A konstrukciók az N-terminális A–S–M tripeptidet követően a CCP2 esetében az I356–V433, a CCP1-CCP2 esetében pedig I289–V433 szekvenciát tartalmazták, illetve a CCP1 esetében (CUB2-CCP1) Q173–D358 és a CCP1-CCP2 esetében (CUB2-CCP1-CCP2) Q173–V433 a CUB2 fúziós partnereként lettek előállítva.

A PCR-hez használt primerek (oligonukleotidok) a következők voltak (aláhúzva az NheI (GICTAGC) és az EcoRI (GIAATTC) restrikciós endonukleázok hasítópelyeit):

CCP2: CGCGCTAGCATGATCAAGGACTGTGGGCAGCCC
CGCGAATTCTCACACTGGCAAGCACCGAGGAATCT

CCP1-CCP2: CGCGCTAGCATGATCATCAAGTGCCCCAGCCC
CGCGAATTCTCACACTGGCAAGCACCGAGGAATCT

CUB2-CCP1: CGCGCTAGCATGACTCAGGCTGAGTGCAGCAGC
CGCGAATTCTCAGTCCTTGATCTTGCATCTGGG

CUB2-CCP1-CCP2: CGCGCTAGCATGACTCAGGCTGAGTGCAGCAGC
CGCGAATTCTCACACTGGCAAGCACCGAGGAATCT

A fenti enzimekkel hasított PCR termék pET-17b vektorban került kifejeztetésre. A konstrukciókat DNS-szekvenálással ellenőrizték. Az IPTG indukcióval kifejezett polipeptidek inklúziós testből lettek feloldva és tisztítva. A sejtek növesztése 12 órán keresztül BioStat B (Braun, Sartorius) fermentorban történt.

A feloldott polipeptidek (20 mg/ml) renaturáló pufferben 400-szorosra (CCP2: 50 mM Tris/HCl pH 8,3, 5 mM EDTA, 145 mM NaCl; CCP1-CCP2: 2 M GuHCl) illetve 125-szörösre (CUB2-CCP1 és CUB2-CCP1-CCP2: pH 8,5, 750 mM Arg, 500 mM GuHCl és 5 mM CaCl₂) történő hígítása után következett a renaturálás (15°C-on egy éjszaka illetve 10°C-on 2 nap a CUB2-fúziós konstrukciók esetében). A puffer 3 mM redukált és 1 mM oxidált glutationt tartalmazott.

Az ionok eltávolítása dialízissel történt (egyszer: 50 mM Tris/HCl (pH 8,3), 145 mM NaCl üveg filteren átszűrve illetve kétszer a CUB2-es konstrukciók esetében: 20 mM Tris/HCl (pH 8,0), 5 mM NaCl, 5 mM CaCl₂ 0,22 µm-os membrán-filteren átszűrve). A renaturált fehérjék tisztítása 50 mM Tris/HCl (pH 8,3), 50 mM NaCl tartalmú pufferrel egyensúlyba hozott SP Sepharose XL oszlopon (Pharmacia Biotech, Uppsala, Svédország) történt és az elúció 50–1000 mM NaCl grádienssel ment végbe. A rekombináns fehérjék további tisztítása SP Sepharose HP oszlopon (GE Healthcare, Németország) történt. A CUB2-fúziós fehérjék Q Sepharose ion-cserélő kromatográfiával lettek tisztítva és Sephacryl S100 oszlopon lettek géliszűrve. A frakciók SDS/PAGE segítségével lettek azonosítva.

Termolizines hasítás (CUB2 modul lehasítása) 37°C-on ment végbe 1:40 enzim:szubsztrát arány mellett. A reakció EDTA hozzáadásával állt le. A termékek dialízise 50 mM Na-acetát, 10 mM NaCl, 5 mM EDTA (pH 4,0) jelenlétében ment végbe. A CCP1-fúziós fehérjék a fenti pufferben SP Sepharose HP kation-cserélő oszlopon lettek megtisztítva és az eluálás növekvő ionerősségű gradiens alkalmazásával történt. Mindkét fehérje ellenőrzése tömegspektrometriával ment végbe.

Izotópjelölt fehérje termeléséhez a sejtek tiamin, nyomelem, ampicillin és kloramfenikol tartalmú M9 minimál tápoldatban lettek növesztve. A 4-5 órán keresztül növesztett kezdő kultúrák összegyűjtve 1 liter minimál tápoldatba lettek átválva, mely 1 g ¹⁵NH₄Cl (National Institute of Research and Development for Isotopic and Molecular Technologies, Kolozsvár, Románia) és 2 g ¹³C-glükózt (Cambridge Isotope Laboratories, Inc.) tartalmazott.

A fehérjék termelés, tisztítás és a szekvencia ellenőrzése után szintén Szilágyi Katalin és Major Balázs biztosították számunkra. A heteronukleáris NMR mérésekhez a ¹⁵N és ¹³C jelölt fehérjék szintén az MTA, SzBK, Enzimológiai Intézetben készültek a leírt módon.

4.2. NMR titrálási kísérletek

A ~280 µl ¹⁵N-CCP1 (~10 mg/ml 1,168 mM) ~300 µl CCP2-vel (~10,669 mg/ml 1,140 mM) illetve a ~300 µl ¹⁵N-CCP2 (~13,333 mg/ml 1,425 mM) ~300 µl CCP1-gyel (~12,479 mg/ml 1,457 mM) való titrálását 10-10 lépésben végeztem el.

4.3. NMR mérések

Minden NMR mérést az ELTE TTK épületében található Bruker DRX500 NMR spektrométer segítségével végeztünk 300, 305, 310, 315 és 320 K-en. A fehérje tipikusan ~1,5 mM koncentrációjú volt. A 10 mM Na-acetát, 10 mM NaCl pufferben feloldott fehérjeoldat további 2 mM NaN₃-ot és 9:1 H₂O:D₂O-t tartalmazott. Az oldatok pH-ja 4; 4,5 és 7 volt. A spektrumok 2 dimenzióban tipikusan 4K x 64 pontban lettek felvéve, 3 dimenzióban 2K x 256 x 64 adatpontban.

A detektálás HSQC, NOESY-HSQC spektrumok esetében komplex, TOCSY-HSQC esetében TPPI séma szerint történt. A T₁, T₂ és NOE mérések Echo-AntiEcho detektálással történtek. A kémiai eltolódások pontos megállapításához referenciaanyagként DSS-t használtunk.

4.4. Adatfeldolgozás

A nyers mérési adatok (FID³³) feldolgozását NMRPipe (DELGLIO 1995) programmal végeztem. Az adatokat zéró-feltöltés után a direkt dimenzióban tipikusan sin² ablakfüggvényt használtam, indirekt dimenzióban (¹H, ¹⁵N akár ¹³C) pedig sin függvényt. A rezonanciafrekvenciák atomhozzárendelését az Xeasy programmal (BARTELS 1995) végeztem. Amíg a CCP1 és CCP2 modulokhoz 3D ¹⁵N-TOCSY-HSQC és ¹⁵N-NOESY-HSQC spektrumokat használtam, addig a CCP1-CCP2 molekulák jelhozzárendelését 3D tripla rezonancia kísérletpárok – HNCA és HN(CO)CA (YAMAZAKI 1994) illetve CBCACONH és HNCACB (GRZESIEK 1992; MUHANDIRAM 1994) – segítségével végeztem, ezekre különösen a CCP2 modul esetében támaszkodtam. A modulpárban lévő CCP1 jeleinek azonosítása csak a magányos CCP1 modul jelhozzárendelése után volt lehetséges az azonos aminosavaktól származó NH keresztcsúcsok összetetésével.

A kémiai eltolódásokon alapuló másodlagos szerkezeti elemek kimutatásához a referenciálását Wishart és munkatársai (WISHART 1991, 1992), míg a szekvencia-korrigálást Schwarzsinger és munkatársai (SCHWARZINGER 2001) által leírt módszer szerint végeztem. A kémiai eltolódások különbségét a Mulder és munkatársai által leírt módszer szerint számoltam (MULDER 1999).

³³ FID, interferogram.

4.5. Referenciálás

A spektrumok proton dimenziójának referenciálását a víz jeléhez állítottam figyelembevéve a fehérjeoldat legjellemzőbb fizikai paramétereit: $f(T;pH)$. A két paraméter ismeretében a következő összefüggés szerint számoltam ki a víz jeléhez tartozó eltolódás számolt értékét. $\nu=7.83-T/96.9+(pH-5.5)\cdot 0.02$. Heteromag esetén a referenciárfrekvenciát a magok giromágneses állandói hányadosának ($^{15}\text{N}:^1\text{H} = 0.10132905$) figyelembevételével számoltam.

4.6. Relaxációs mérések

A relaxációs mérések HSQC típusú spektrumsorozatokról álltak, melyekben az adott mechanizmus szerinti relaxációs folyamatokat adott késleltetési ideig hagyjuk végbemenni (FARROW 1994). Az alkalmazott késleltetési időket a **2. táblázat** tartalmazza.

2. táblázat. Az R_1 és R_2 mérések során használt késleltetési idők másodpercben.

R_1 (300 K)

<i>CCP1 (pH4,0)</i>	0,0112	0,1012	0,2012	0,4012	0,7012	1,1012	1,5012		
<i>CCP1 (pH7,0)</i>	0,0112	0,0212	0,0512	0,1012	0,2012	0,4012	0,7012	1,1012	1,8012
<i>CCP2 (pH4,5)</i>	0,0112	0,0512	0,1012	0,2012	0,5012	1,0012	1,8012		
<i>CCP2 (pH7,0)</i>	0,0112	0,0512	0,1012	0,2012	0,4012	0,7012	1,1012	1,8012	
<i>CCP1-CCP2[#] (pH7,0)</i>	0,0112	0,0512	0,1012	0,2012	0,4012	0,7012	1,1012	1,8012	2,7012

R_2 (300 K)

<i>CCP1 (pH4,0)</i>	0	0,0319	0,0639	0,0958	0,128	0,192	0,255	0,287	
<i>CCP1 (pH7,0)</i>	0	0,01552	0,04656	0,0776	0,12416	0,18624	0,26384	0,388	
<i>CCP2 (pH4,5)</i>	0	0,01552	0,04656	0,0776	0,13968	0,21728	0,3104	0,388	
<i>CCP2 (pH7,0)</i>	0	0,01552	0,04656	0,0776	0,12416	0,18624	0,26384	0,388	
<i>CCP1CCP2[#] (pH7,0)</i>	0	0,01552	0,04656	0,0776	0,12416	0,18624	0,26384	0,388	

(pH7,0)

[#] 315 K-en mérve

A relaxációs adatok meghatározása a Sparky nevű programmal (GODDARD 2009) történt adott spektrumsorozaton belül azonosan feldolgozott spektrumokból. Az R_1 és R_2 esetében a relaxációs paraméterek illesztése a Levenberg-Marquardt algoritmus felhasználásával történt. A heteronukleáris NOE mérésekhez HSQC-típusú spektrumpárt vettünk fel: egyik esetben az NH protonok rádiófrekvenciás hullámmal voltak besugározva, másik esetben besugárzás nélküli spektrumot vettünk fel. A két spektrumot azonosan dolgoztam fel és a het-NOE

értékét a két spektrum összetartozó rezonancia-frekvenciájú keresztcsúcsai intenzitásainak hányadosából származtattam:

$$het - NOE = \frac{I_{besugárzott}}{I_{referencia}}.$$

4.7. Hidrodinamikai számolások

A fehérjémolekulák oldatbeli diffúziós mozgására az NMR-elemzés mellett hidrodinamikai számításokkal is következtetni lehet. A kétféle megközelítés összevetése fontos megerősítést jelent a további dinamikai paraméterek jóságának megítéléséhez.

A hidrodinamikai számolásokat a 2qy0 szerkezetekre végeztem el (KARDOS 2008) minden modulkombinációra (i.e. CCP1, CCP2, CCP1-CCP2). A számolásokat a HydroPro (DE LA TORRE 2000) programmal végeztem, melynek eredményei többek között a globális rotációs diffúziós korrelációs időt adták.

4.8. A belső dinamika elemzése

A fehérjék gerinc dinamikájának vizsgálatát két megközelítéssel végeztem el: a spektrális sűrűségek redukált térképezésével (reduced spectral density mapping, RSDM; KRIZOVA 2004) és az ún. modellfüggetlen megközelítéssel (LIPARI 1982A,B). Előbbihez egy, a csoportunkban megírt programot, utóbbihoz a Tensor2 programot (DOSSET 2000), valamint a nyilvánosan elérhető 1gpz (BUDAYOVA-SPAN0 2002A) és 2qy0 (KARDOS 2008) kristályszerkezeteket használtam fel. A modellfüggetlen megközelítés során a kiugró $R_2/R_1 (= T_1/T_2)$ hányadossal jellemezhető aminosavakat nem vettem figyelembe a globális korrelációs idő becslése során, ezek ugyanis tipikusan az érintett aminosavaknak a globálistól jelentősen eltérő dinamikai viselkedésére utalnak (CLORE 1990).

4.9. Adatalapú fehérje-fehérje dokkolás

4.9.1. Oldószer által hozzáférhető felület meghatározása

Ahhoz, hogy a két modul relatív orientációjáról vizuális benyomásunk lehessen, modellezni kell a két modul kölcsönhatását. A jelentős aminosavspecifikus eltéréseket és az irodalomban fellelhető PDB szerkezeteket (2qy0: KARDOS 2008) illetve 1gpz: BUDAYOVA-SPANO 2002A) felhasználva fehérje-fehérje dokkolást (ld. később) végeztem. A dokkoláshoz szükséges volt egy ún. passzív és egy aktív aminosav csoportot definiálni, melyeket a dokkolás során közvetett illetve közvetlen aminosavakként vesz figyelembe a program. Ezeknek a meghatározásához a PDB szerkezetből (2qy0) kiindulva minden aminosavra meg kell határozni az oldószer által hozzáférhető felületet. Tekintetbe véve, hogy a jelenleg elérhető γ_B fragmentum két szerkezetében a dimerek CCP moduljai (zímogén: 1gpz A és B láncra illetve aktív: 2qy0 A és C láncra) nagyon jó illeszkedést mutatnak (CCP1 gerinc: $RMSD_{292-358}=0,47 \pm 0,16$ és CCP2 gerinc: $RMSD_{356-398,408-433}=0,37 \pm 0,12$), viszont az aktív szerkezet A láncából származó CCP2 aminosavai (356-399,403-433) teljesebb képet nyújtanak a modul szerkezetéről, az aktív szerkezet szolgált az oldószer-kitettségek vizsgálatára. A molekula térszerkezeti modelljéből (pdb: 2qy0) meghatároztam az atomi szintű oldószer hozzáférhetőséget a NACCESS nevű program felhasználásával (NACCESS is (c) S. HUBBARD AND J. THORNTON 1992-6). Az oldószer hozzáférhetőséget aminosavmaradékra lebontva százalékosan értékeltem és így használtam a dokkolás bemeneti adataikat.

4.9.2. Fehérje-fehérje dokkolás

A fehérje-fehérje dokkoláshoz a HadDock (DOMINGUEZ 2003; DE VRIES 2007) elnevezésű programot használtam fel³⁴, mely három lépésben végzi el a molekulák dokkolását a megjelölt, kölcsönhatásban közvetlenül részt vevő (aktív) és közvetve részt vevő (passzív), aminosavak alapján a korábbi ARIA programra (LINGE 2003) épülve. Az aktív és passzív aminosavak megadása esetében – az irodalomban javasoltak megfelelően – a NACCESS és az NMR-titrálási kísérletek eredményein alapultak.

³⁴ <http://www.nmr.chem.uu.nl/haddock>

Aktív aminosavnak vettem azt, melynek gerinc NH keresztcsúcsa jelentősen eltért a titrálás során ($\Delta\delta > \text{átlag} + 1/2 \text{ SD}$) és nagymértékben oldószernek kitett volt. Passzív aminosavnak vettem azt, amelynek relatív oldószer-kitettsége nem párosult jelentős kombinált kémiai eltolódás változással ($\Delta\delta < \text{átlag} + 1/2 \text{ SD}$). Figyelembe véve, hogy a passzív és aktív aminosavak csoportja erősen függ az aminosavakra definiált relatív oldószer-kitettség határától, ezért számos futtatást is elvégeztem változtatva a relatív érték alsó határát és annak minőségét (összes atomra, teljes oldalláncra illetve gerincre), melyek esetében a kritériumok így hol szigorúbbak, hol megengedőbbek voltak.

4.10. Számítógépes modellezés, PDB validálás

A fehérje-szerkezetek feldolgozásához, vizuális vizsgálatához, elemzéséhez MolMol (KORADI 1996) (RSDM számolás) és PyMol³⁵ (DELANO 2002) (szerkezeti illesztés) programokat használtam. A molekulákról készült ábrákat a PyMol programmal készítettem.

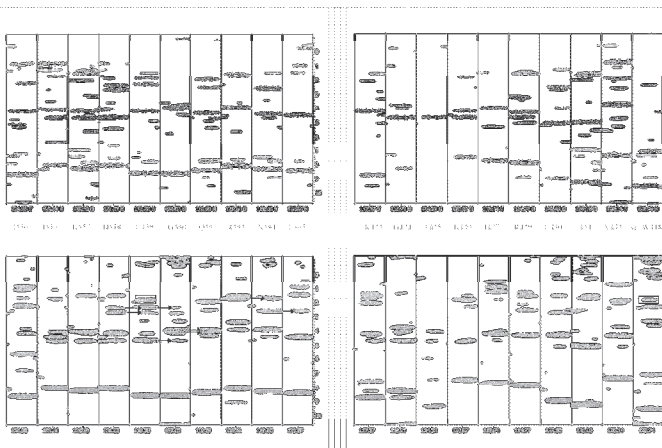
Az adataalapú fehérje-fehérje dokkolással kapott komplex szerkezetekre illesztett γ_B katalitikus fragmentum szerkezeti validálását a PDB oldalán található ún. „PDB validation server”³⁶ felhasználásával ellenőriztem.

³⁵ <http://www.pymol.org>

³⁶ <http://deposit.pdb.org/validate>

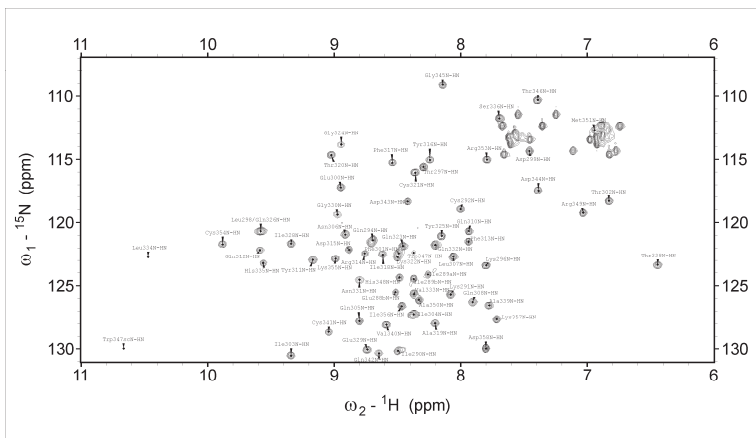
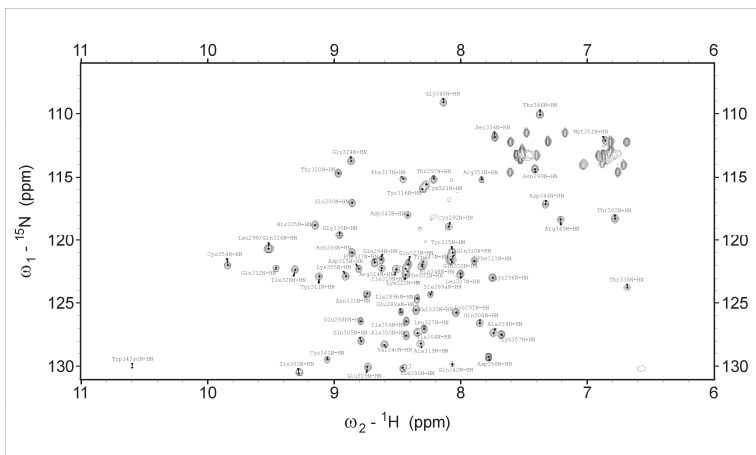
5. Jelhozzárendelések a magányos modulokra

A rendelkezésre álló heteronukleáris spektrumok alapján a magányos modulok N és ^NH atomjainak hozzárendelése egyértelműen elvégezhető volt a prolinokon kívül az aminosavak túlnyomó többségére (7-9. ábra), kivétel az N-terminális szakaszok (CCP1: T286, T287, E288, I289 illetve CCP2: A353, S354, M355³⁷, I356) és a CCP2-ből mindkét kémhatáson a G377 illetve semleges kémhatáson az R399, A400, G401, E404. A CCP1 L334 amid semleges pH-n gyenge keresztcsúcsként jelentkezett, míg savas körülmények között nem volt látható, csak a NOESY keresztcsúcsa utalt rá a H335 NH-ján. A savas körülmények között felvett HSQC-n a W347 és H348 NH jeleinek jelentős átfedése megszűnt a H348 semleges pH-n tapasztalt eltolódás-változása miatt. Jelentős amid átfedést mutató aminosavak továbbá a CCP1-ben a L298/Q326, míg CCP2-ben a S402/R429. A kapott kémiai eltolódások részletes adatai megtalálhatóak a CD-mellékletben.

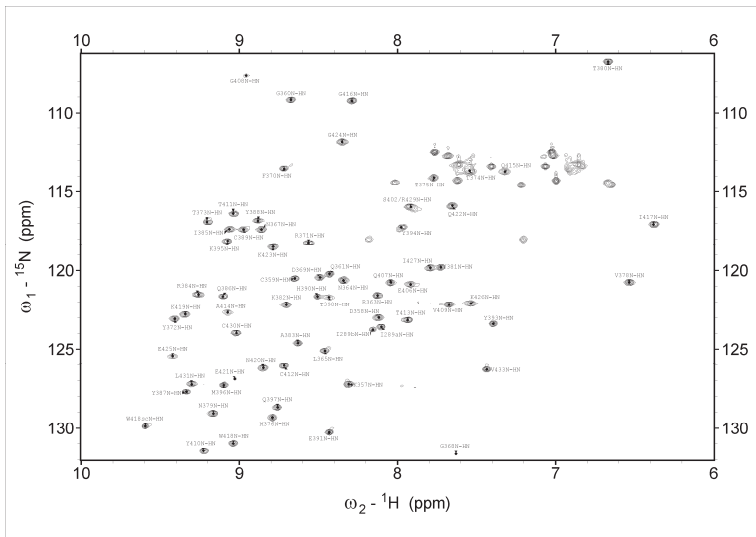
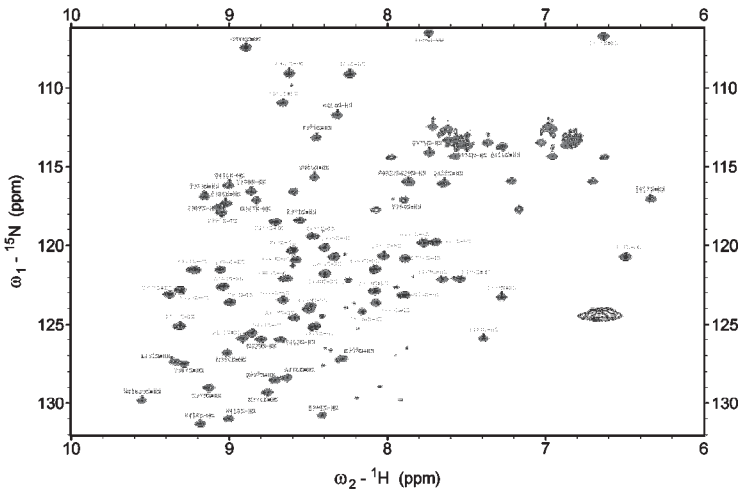


7. ábra. A CCP2 300 K, pH7-es TOCSY-HSQC (fent) és NOESY-HSQC (lent) spektrumok kiválasztott két amid-szalagsorozatára. Az egyes szalagokban az adott aminosav gerincamidjával kötésen (fent) és téren (lent) át korrelált H-atomok keresztcsúcsai láthatóak. Nyilakkal illusztrálom az NOE kapcsolatot, két szomszédos aminosav között (az ábrán $^{\alpha}\text{H};^N\text{H}$ vagy $^{\beta}\text{H};^N\text{H}$ térben közeli atomok révén), míg a téglalap a jellegzetes első cisztein $^{\beta}\text{H}$ -tól származó keresztcsúcs, detektálva a cisztein ^NH -n illetve a triptofán $^{\epsilon}\text{NH}$ atomon.

³⁷ Az A353, S355, M356 a konstrukcióból származó maradékok számozása pusztán a szekvenciális helyzetükre utal, az emberi C1r-ben így nem találhatók meg.



8. ábra. CCP1 300K-en és savas (fent: pH4) illetve semleges (lent: pH7) kémhatáson rögzített HSQC spektrumai azonosított gerinc ^3H keresztcsúcsokkal.



9. ábra. CCP2 300K-en és savas (fent: pH4,5) illetve semleges (lent: pH7) kémhatáson rögzített HSQC spektruma azonosított gerinc ^{15}N keresztűcsokkal.

5.1. A modulok β -szálas szerkezetének kimutatása és a kémhatás szerepe

A jeldisziperzió mindkét magányos modul esetében az összes vizsgált kísérleti körülmény között megfelelő volt, összhangban a várt jól meghatározott háromdimenziós térszerkezettel.

Szekvencia-korrigálás után (lásd módszerek) elvégeztem a modulok $^{\alpha}\text{H}$ analízisét. A magányos modulok oldatszerkezetének gerinckonformációra érzékeny szekvencia-korrigált másodlagos kémiai eltolódásai jó egyezést mutatnak a kristályszerkezetben tapasztalt másodlagos szerkezeti elemekkel. Az elvárásnak megfelelően többnyire β -szálas szerkezet adódik a legtöbb helyen, így legalább három aminosavnyi összefüggő pozitív eltolódást tapasztaltam CCP1 esetében a D-, E-, F- és H-szálakon illetve CCP2 esetében a B-, D-, E-, F- és G-szálakon. A CCP-kben kevésbé tipikus A- és C-szálak egyik modulnál sem mutatták az összefüggő pozitív eltolódások sorozatát. A két modul közül a CCP1-ben kevésbé kifejezettek a β -szálra jellemző eltolódások. Negatív másodlagos eltolódásokkal jellemezhetők többnyire a β -kanyarok szintén az ismert háromdimenziós szerkezetnek megfelelően: CCP1-ben az AB-, BC-, DE-, FG- és GH-kanyar illetve CCP2-ben az FG-kanyar. CCP1-ben az N- és különösen a C-terminális aminosavak negatív eltolódása helikális preferenciára utal. A rendezetlen szerkezethez nagyon közeli eltolódásokkal szerepel CCP2-ben az EF- és a GH-hurok. A leírtakon kívül a röntgenszerkezettel összhangban lévő, jól definiált harmadlagos szerkezetre utal a modulok első cisztein egyik β protonjának kis eltolódása (7. ábra), valószínűleg a triptofán indol anizotróp hatása miatt ($^{\beta}\text{H}$ NOE keresztcsúcs az indolgyűrűn $^{\text{N}}\text{H}$ -n).

Az oldószer kémhatásának változása mindkét modulban leginkább az oldószernek kitett hisztidinek $^{\text{N}}\text{H}$ eltolódásában jelentkezik. Így CCP1-ben a H335 és H348, míg CCP2-ben a H390 semleges körülményre áttérve jellegzetes pozitív irányú ^{15}N eltolódást ad.

A modulokat különböző kémhatásokon vizsgálva elmondható, hogy összességében nagymértékű a kémiai eltolódás-változás. A kémhatás változására történő $^{\text{N}}\text{H}$ perturbáció vizsgálata során CCP1 esetében a H348 és térben közeli aminosavak amid csoportjai jelentős változást mutatnak, ugyanakkor a H335 eltolódás-változása kiugróan a legnagyobb. Ez utóbbi perturbációja kevésbé befolyásolja a többi aminosav $^{\text{N}}\text{H}$ csoportját, összhangban a kristályszerkezet alapján megállapított felszíni elhelyezkedéssel.

A CCP2-ben sokkal kisebb mértékűek a kémhatásfüggő eltolódás-változások és nemcsak térben, hanem szekvenciálisan is jól körvonalazható a perturbáció. Legnagyobb változást a H390 és az F370 szomszédságában látni.

6. A kovalensen kötött modulpár vizsgálata

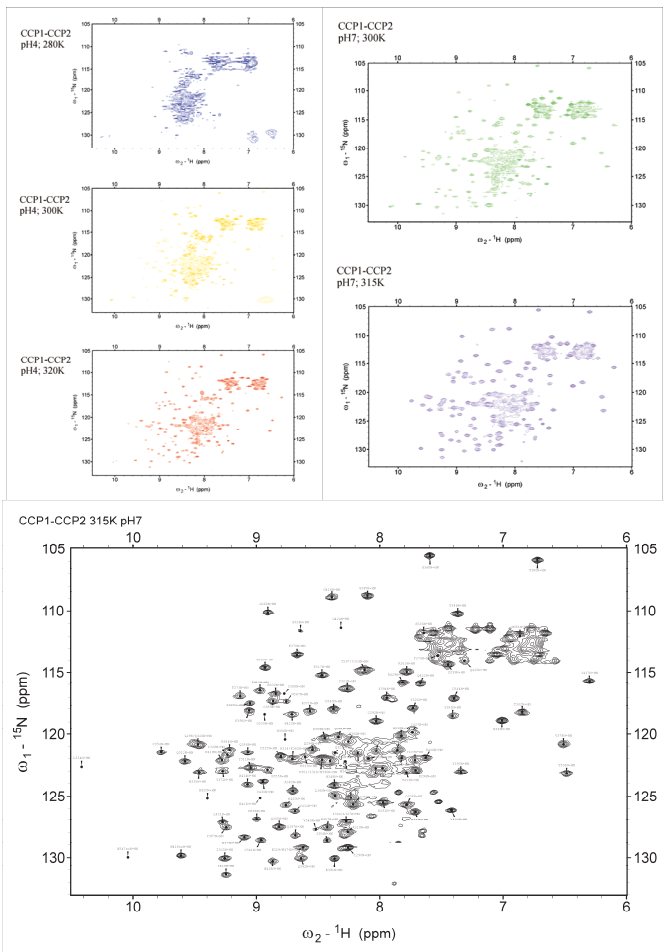
Moduláris fehérjék esetében a modulok önmagukban és szomszédai kontextusában is megvizsgálhatóak, így az eltérések, legyenek azok akár szerkezeti, akár dinamikai jellegűek, utalnak a modulok egymásra hatására. Esetemben a CCP1 és CCP2, mint szomszédos modulok kölcsönhatását vizsgáltam meg, a gerinc ^NH jeleinek kémiai eltolódás változásának felhasználásával. Amennyiben nincs a két modul között jelentős kölcsönhatás, a keresztrelaxációk jó közelítéssel megfeleltethetők a magányos modulok eltolódásainak. Ellenkező esetben jelentős mértékű, jellegzetes eltéréseket várunk.

6.1. A modulpár térszerkezetének hőmérsékletfüggése

A CCP modulpárról 300K-en és pH4-en rögzített HSQC spektrum vizsgálata során a keresztcsúcsok alakja és intenzitása (10. ábra) arra utalt, hogy a molekula vagy nem egy jól meghatározható szerkezettel rendelkezik, vagy valamilyen aggregációs jelenség áll a rossz spektrális minőség háttérében. Megjegyzendő, hogy a magányos modulok, amint a renaturálás teljesen végbement, ideális keresztcsúcsokat eredményeztek a rögzített spektrumokban, aggregációs viselkedésre utaló jelet nem észleltem. Az aggregáció jelenségét a vizsgált hőmérséklet-tartományon belül dinamikus fényszóráson alapuló mérésekkel az MTA Enzimológiai Intézetében kizárták.

A spektrális minőség javítása céljából először csökkentettük a savas CCP1-CCP2 hőmérsékletét 280 K-re (10. ábra). Ezen a hőmérsékleten tovább romlott a spektrum minősége, ami feltételezhetően a köztes csere jelentősebbé válásával magyarázható. További hőmérséklet-csökkentés a lassú csere dominánsá válásával járhat: több, gyengébb intenzitású jel megjelenését eredményezve.

A mintát 320 K-re melegítve lényegesen tisztább és élesebb amid keresztcsúcsokat kaptunk (10. ábra), ami arra utalt, hogy közelítettünk a gyors csere állapotához. Nemcsak savas (pH4), hanem semleges (pH7) körülmények között felvett spektrumok esetében is ezt a jelenséget tapasztaltuk: 300 K-ről 315 K-re emelve a hőmérsékletet javult a HSQC spektrum minősége (10. ábra). A modulpár gerinc amidjainak jelhozrendelését jelentősen megkönnyítette a mért fehérjeoldat hőmérsékletének emelése.



10. ábra. A CCP1-CCP2 modulpárról rögzített HSQC spektrumok minőségének hőmérsékletfüggése savas (balra fent) és semleges (jobbra fent) kémhatáson. A modulpár 315K-en és pH7-en felvett HSQC spektruma az azonosított gerinc ${}^1\text{H}$ keresztcsúcsokkal (lent).

6.2. A modulpár és a magányos modulok szerkezetének összevetése

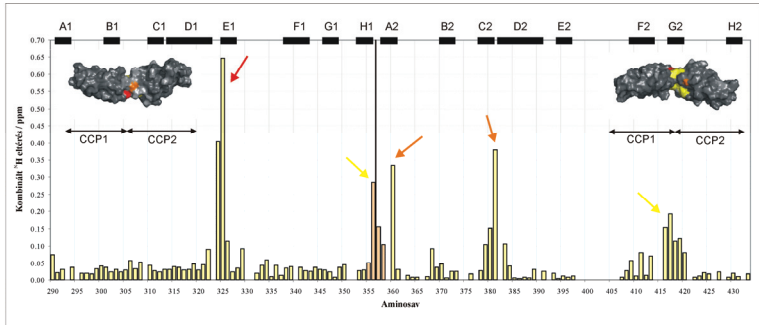
A modulpár kémiai eltolódásait kizárólag a HSQC spektrumok alapján tudtam értelmezni, mivel a CCP1-CCP2 esetében a HSQC-TOCSY mérések nem nyújtottak értékelhető eredményeket, feltételezhetően a molekula nagy mérete miatt. Ugyanakkor jelentős segítséget szolgáltattak még a HSQC-NOESY spektrumok is, melyek révén a magányos modulokból származtatott hipotetikus gerinc amidok jelhozzárendelését tudtam a szomszédság alapján megerősíteni. Növelte a jelhozzárendelések bizonytalanságát, hogy a spektrális minőség alacsonyabb hőmérsékleten romlott, így nehezítette a spektrumok összevetését. Mégis 300 K-en és pH7-en jelentős volt az azonosított keresztrezonanciák száma. Nem találtam meg az ^NH keresztcsúcsait ugyanakkor az N331, C359, T375, G377, R399, A400, G401, S402, R403, E404, S405 aminosavaknak. Bizonytalan jelhozzárendeléssel rendelkeznek továbbá a Q323, G330, V340, M351, T374, K382, H390, T398, E406, A414, Q415, E421, K426 amidok és átfedő jeleket adtak a F301/H390, I304/L327, R314/K382, K322/T398 gerinc amidok.

A modulpárban azonosított amid N és H kémiai eltolódások számottevő eltérés nélkül ($\Delta\delta < 0,15$ ppm) megegyeznek a magányos modulokban hozzárendelt értékekkel, kivéve CCP1-ben a G324, Y325, a linker régióban az I356, K357, a CCP2-ben pedig a G360, T380, Y381, G416, I417. Mindezek alapján kijelenthetem, hogy a CCP modulpár másodlagos és harmadlagos szerkezeti elemeiben nem különbözik számottevően az azt felépítő magányos CCP moduloktól.

6.3. A modulpár kölcsönható felszínének meghatározása

A magányos modulok HSQC eltolódásai savas (pH~4) illetve semleges (pH7) kémhatáson összevethetőek voltak a modulpár azonos hőmérsékleten észlelt megfelelő keresztcsúcaival, így a kölcsönhatásból fakadó perturbáció mértékét számszerűsítettem (**11. ábra**). Jelentős amid perturbációt ad CCP1-ben a G324, Y325, a linkerben az I356, K357 illetve CCP2-ben a G360, T380, Y381, G416, I417 aminosavmaradékok ($\Delta\delta > 0,15$ ppm). Ezek az aminosavak szekvenciálisan közel helyezkednek el egymáshoz és a kristályszerkezetet megvizsgálva (PDB: 1gpz) elmondható, hogy a két modul határán találhatók, mégpedig a linker térbeli

közelségében található két tirozin maradék köré csoportosulva: Tyr325 (CCP1), Tyr381 (CCP2). A gerinc ^NH eltolódás-változások alapján elmondható, hogy számottevő kölcsönhatás az érintkező felszíneken jelentkezik.



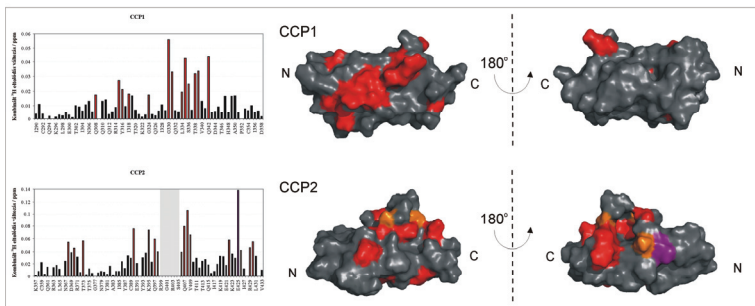
11. ábra. A CCP1-CCP2 moduljainak kölcsönhatása a kovalens egységben. A 300K-en és pH7-en rögzített HSQC ^NH keresztcsúcsok perturbációjának mértéke (MULDER 1999) a szekvencia függvényében és modulpár térkitöltős ábrázolásán (PDB: 1gpz) színkódolva (piros: $\Delta\delta > 0,50$; narancs: $\Delta\delta > 0,30$; sárga: $\Delta\delta > 0,15$). A színkódolást követő nyilak a nagy perturbációt mutatják. A grafikon világosbarnával jelölt aminosavai a linkert, felül a téglalapok pedig az ideális β -szálakat jelölik.

7. A magányos CCP modulok nem-kovalens kölcsönhatása

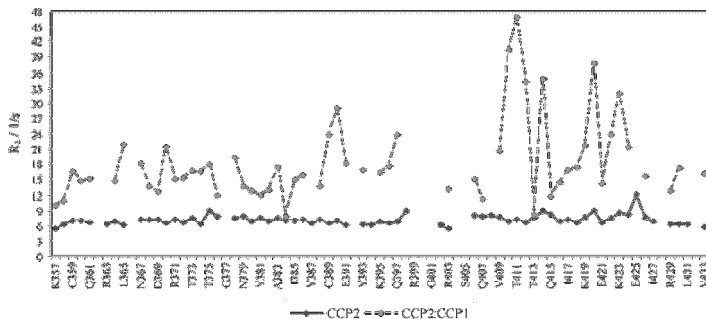
A magányos és a tandem elhelyezkedésű, kovalensen kötött CCP modulok vizsgálata után titrálásokat végeztem a modulokkal annak vizsgálatára, hogy vajon a két magányos modul kölcsönhatásba lép egymással oldatfázisban.

7.1. A nem-kovalens modulok kapcsolódásának jellemzése

A kapcsolódás-vizsgálathoz egyik esetben a ^{15}N -jelölt CCP1-hez jelöletlen CCP2 modult adtam egészen ~1:1 sztöchiometriai arányig, majd hasonlóan jártam el a ^{15}N -jelölt CCP2-vel is, melyhez ezúttal jelöletlen CCP1-et adtam. Az így végzett titrálás hatását a kémiai eltolódások változásával követtem. Összevetve a kezdeti (szabad) és végső (1:1) állapotokat, részletesen elemeztem a kölcsönhatást (**12. ábra**).



12. ábra. A magányos CCP modulok titrálásának hatása $^{\text{N}}\text{H}$ perturbációval grafikonon és a modulok kétoldali térkitöltős modelljén (PDB: 2qy0; CCP1: fent; CCP2: lent) ábrázolva. A titrálás 1:1 sztöchiometriáig történt. 300K-en és pH7-en a CCP2 EF hurok aminosavainak nagymértékű mozgékonyasága miatt hiányoznak (R399-S405; szürke színezés a grafikonon). A színek megfelelnek a perturbáció ($\Delta\delta$) (MULDER 1999) mértékének: piros – $\Delta\delta >$ átlag + $\frac{1}{2}$ SD; lila – $\Delta\delta >$ átlag + 4 SD (E425); narancs – egyéb $\Delta\delta >$ átlag + $\frac{1}{2}$ SD értékkel szereplő aminosavak (T398, E406, K426), amikor az E425 nem szerepel a számolásban.



13. ábra. A magányos (folytonos fekete görbe) és a CCP1 titrált (szaggatott szürke görbe) CCP2 R_2 értékei a szekvenca függvényében. (A magányos CCP2 R_2 adatait később tárgyalom.)

Elmondható, hogy a titrálás hatására jelentős eltérést mutató aminosavak jól meghatározható mintázatot mutatnak: mindkét modulon körvonalazható a kölcsönható felszín. Ismerve az R_2 spin-spin relaxációs sebesség méretfüggését, a kölcsönhatás eredményeként elvárható, hogy a modulok transzverzális relaxációs sebessége jelentős mértékben növekedni fog a magányos modul értékeihez képest.

Meghatároztuk a CCP1-gyel titrált (~1:1 sztöchiometriánál) CCP2 R_2 sebességeit (13. ábra). Jelentős növekedést tapasztaltunk az átlagos értékekben, ami összehasonlítható volt a CCP1-CCP2 modulpár esetében mért értékekkel. Így további megerősítést nyert a két modul által képzett komplex létrejötte, mely a perturbáció mértéke és jellege alapján gyenge kölcsönhatásnak feleltethető meg: (K_D várhatóan jelentősen nagyobb, mint 0,1 mM). A komplex kötőfelszíne jellegzetesen eltér a modulpárban meghatározott kölcsönható felszíntől.

7.1.2. A komplex fehérje-fehérje dokkolása

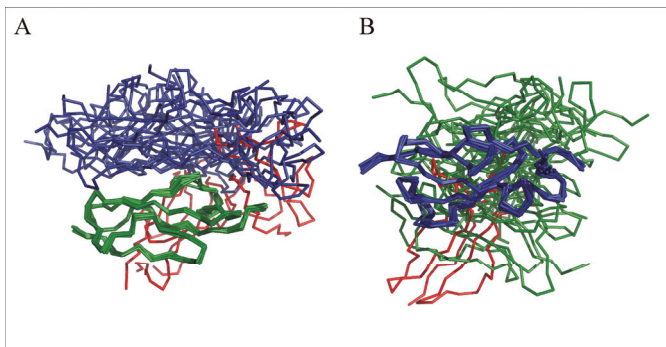
A komplex 1H perturbációval körvonalazott kötőfelszínei még nem adnak vizuális képet a modulok relatív orientációjáról. A rendelkezésre álló kísérletes adatok alapján ehhez fehérje-fehérje dokkolás volt szükséges.

Mind a kristályszerkezetes, mind az oldatfázisú kísérleti adatokat felhasználva merev testes dokkolást végeztem. Az irodalomban is leirtakat figyelembe véve a dokkolást úgy paramétereztem, hogy az aktív aminosavak esetében a kémiai eltolódások perturbációja az

átlagosnál jelentősen nagyobb legyen ($\Delta\delta > \text{átlag} + \frac{1}{2} \text{szórás}$) és az oldószer általi hozzáférhetőségük definíciószerűen az összes atomra nagyobb legyen, mint 55%. A passzív aminosavak aminosavak esetében az oldószer általi hozzáférhetőség a teljes oldalláncra vagy gerincire szintén nagyobb legyen, mint 55%. Az aktív aminosavak közé soroltam a CCP2-ből jelentős oldallánc perturbációval rendelkező Q361-es és N367-es aminosavakat is.

3. táblázat. A CCP1:CCP2 dokkolás 10 legjobb eredményének értékelése. A szürke háttérű komplex a C1r γ_B fragmentum dimerképzésének modellezéséhez használt klaszter. A HadDock érték az intermolekuláris energiagok (kcal/mol) és az eltemetett felszín súlyozott átlaga (JENSEN 2006).

Klaszter	Érték	Klaszter méret	RMSD	Van der Waals	Elektrosztatikus	Deszolvatáció	Hibás megkötöttség	Eltemetett felszín	Relatív orientáció
3	-70,9	18	14,9	-50,9	-150,2	-2,9	129	1319,9	antiparalel
2	-68,7	18	3,2	-42,1	-167	-3,3	101,4	1262,9	paralel
8	-65,7	8	2,3	-45	-129,2	1,1	41,2	1279,8	paralel
1	-63,5	19	13,2	-32,5	-259,5	14,5	64,2	1054,2	kereszt
4	-60,8	16	13,4	-37,4	-168,6	-3,2	135,4	1104,5	antiparalel
5	-56,2	10	12,5	-38,8	-208,3	14,3	98,9	1289,1	kereszt
12	-54,8	4	14,4	-45,5	-136,3	5,9	120,9	1299,1	antiparalel
6	-52,1	9	11,4	-33,8	-185,5	5,2	135,7	976	kereszt
9	-50,6	7	7,2	-39,9	-116,9	2,8	98,5	1091,3	paralel
7	-48,8	8	11,2	-26,4	-210,8	11,2	84,9	956,4	kereszt



14. ábra. A dokkolt klaszterek a modulokon jól definiált felszínt jelölnek ki. A 10 dokkolt klaszter CCP1-re (A) és CCP2-re (B) történt illesztés után. Színkódolás: zöld – CCP1; kék – CCP2; piros – az illesztéstől leginkább eltérő klaszterek (bal: 1-es és 5-ös; jobb: 7-es klaszter).

Az így definiált passzív és aktív aminosav listával elvégzett dokkolás eredményeként kaptam tíz legjobbnak értékelt (3. táblázat) szerkezetcsaládot ezek után vizuálisan is átvizsgáltam, abból a célból, hogy vajon ez a tíz család illetve ezekből egy-egy reprezentáns a partner modulon egy jól meghatározható kötőfelületet jelöl-e ki. A tíz szerkezetet a CCP1-

re illesztve három család mutatott eltérést, míg a többi hét jól körvonalazott egy kötőfelszín (14. ábra). Ugyanígy eljárva a CCP2-re illesztett szerkezetek közül mindössze egy mutatott jelentősen eltérő kötőfelszín és kilenc család nagyon jól körvonalazott egy kötőfelszín. Az adatalapú fehérje-fehérje dokkolás eredményeként megállapítható, hogy a szerkezetek többsége egyetlen, jól körvonalazott kötőfelszínnel jellemezhető, csupán a modulok relatív helyzete mutat eltéréseket.

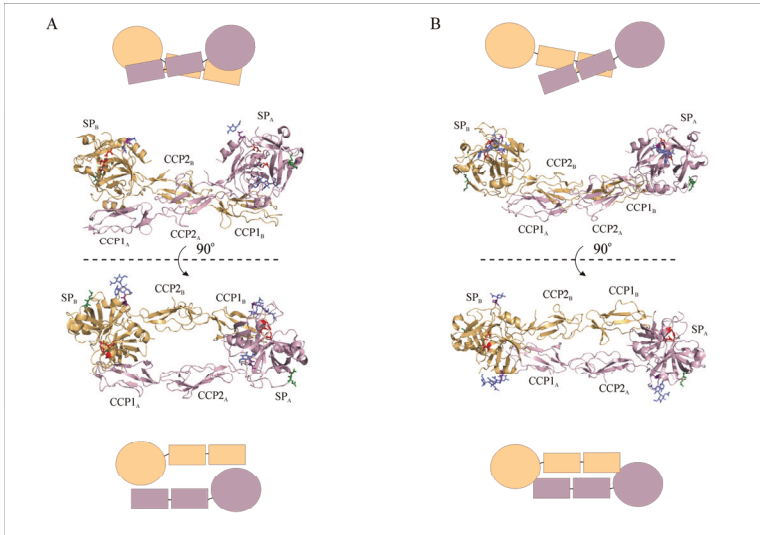
7.1.3. A komplexekre illesztett γ_B dimerek elemzése

A továbbiakban annak eldöntésére, hogy ezek a modul-modul kapcsolatok megállják-e helyüket a teljes katalitikus fragmentumban, felépítettem egy ilyen hipotetikus dimer modelljét. Két zimogén γ_B szerkezetet (PDB: 1gpz) CCP1 és CCP2 modulokon keresztül illesztettem a dokkolással kapott CCP1:CCP2 komplex alapján. A tíz család vizuális áttekintése után hat szerkezetet (4-es, 5-ös, 6-os, 7-es, 9-es és 12-es klaszter) kizártam az alapján, hogy az így kapcsolódó két katalitikus fragmens moduljai térben jelentősen átfednek egymással. Így hol a szerin proteáz doménnel volt átfedés, hol a CUB2 modullal, ami természetesen nem volt a katalitikus fragmentumban, de a CCP1 N-terminális folytatásaként egyértelműen kizárható szerkezeteket adtak.

A fennmaradó szintén négy dimercsalád (1-es, 2-es, 3-as és 8-as klaszter) három csoportot képezett. A γ_B dimerek paralel, antiparalel illetve a kettő közötti keresztirányú kapcsolat alapján. A két paralel dimer hasonlóknak tűnik, viszonylag kis eltérés van a két nagyszámú klaszterban (2-es: 18db, 8-as: 8db). Az egyetlen antiparalel dimercsalád szintén nagyszámú képviselővel (3-as: 18db) a legjobb dokkolási eredményt nyújtotta. A keresztirányú kapcsolatot mutató egy dimercsaládban szintén sok komplex található (1-es: 19db) viszont az elképzelhető kapcsolódások közül rossz eredményeket mutatnak.

A négy komplexcsaládra elvégeztem a közeli kapcsolatokra szűrő PDB validálást, hogy értékeljük a dimereket a katalitikus fragmentumban. Ezek alapján a két paralel illeszkedés adta a legkevesebb atom-atom ütközést, majd az antiparalel, végül a két keresztirányú kölcsönhatás. Egyik dimerben sem lehet az N atomhoz kapcsolt szénhidrátokkal ütközést megfigyelni. Amennyiben a jelenlegi kristályszerkezetet összevetjük a fennmaradó négy modellezett γ_B szerkezettel, megállapítható, hogy a lehető legkevesebb eltérést feltételezve az antiparalel elrendezésű modell a legvalószínűbb egy megfelelő CCP1_A/CCP2_B gyenge kölcsönhatás által meghatározott dimerképzéshez (15. ábra). A gyenge kölcsönhatás

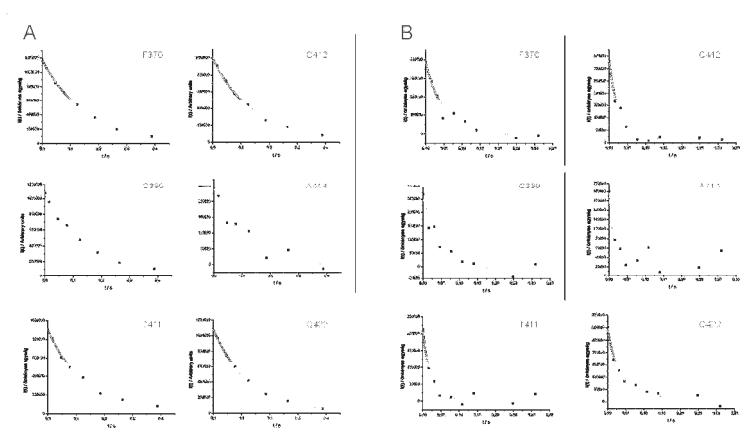
számottevő lehet, ha a $CCP1_A/CCP2_B$ mellett a $CCP1_B/CCP2_A$ lehetséges kapcsolódást is figyelembe vesszük.



15. ábra. Antiparalel γ_B dimerek (narancs és lila) a kristály- (A; PDB: 1gpz) és a dokkolással modellezett (B; 3-as klaszter) szerkezetnek megfelelően. Fent: dimer oldalról; lent: dimer fentről. Színkódolás: piros: katalitikus triád (H485, D540, S637); sötétzöld: az elhasított kötés (Q446-I447); sötétlila: N-kapcsolt szénhidrát kötőhelye (N497 és N564); világoskék: szénhidrát. A jobb áttekinthetőség miatt a modul orientációk fent és lent szematikusan is ábrázoltak.

8. A magányos modulok dinamikai viselkedése

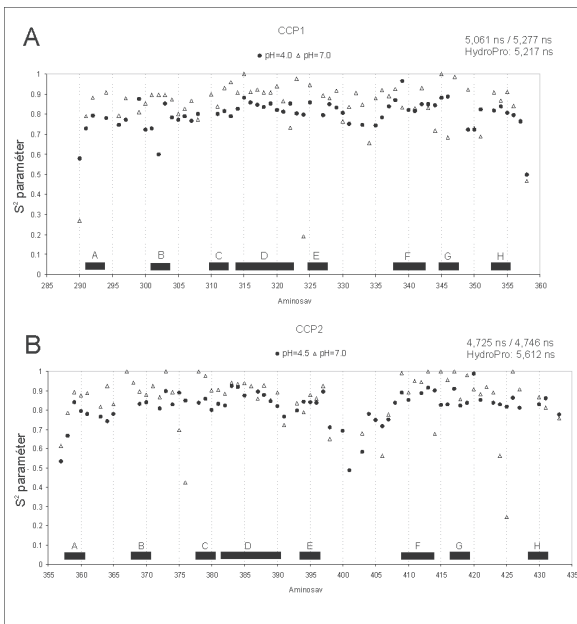
A meglévő CCP kristályszerkezetek összhangban vannak az oldatszerkezetekkel, viszont a magányos modulok belső mozgékonyaságáról nem árulnak el semmit. A modulok karakterisztikus időskálán mozgó aminosavai tipikus kölcsönható részek lehetnek: mozgékonyaság szempontjából „forró pontok” keresése a dinamikai és kölcsönhatási vizsgálatok célpontjai.



16. ábra. Jelintenzitás változása az R_2 késleltetési idő függvényében az illetett exponenciális függvényekkel a kiválasztott aminosavakra (A) CCP2 magányos állapotában és (B) CCP1-gyel alkotott 1:1 komplexében.

A longitudinális és transzverzális relaxációs időállandók megállapításához használt spektrumsorozatokban levő jelek intenzitására exponenciális lecsengéseket illesztettem. Az illesztések tipikusan jól illeszkedő görbéket adtak (**16. ábra**). A heteronukleáris NOE felhasználásával összesen három adatsor állt rendelkezésemre a dinamikai paraméterek megadásához. A molekulák gömb alakját feltételezve az alábbiakban az izotróp tenzor mellett végzett dinamikai elemzéseket tárgyalom. (A bonyolultabb anizotróp diffúziós tenzor bevezetése a modellfüggetlen módszerrel nem vezetett számottevően jobb eredményre, így ennek részletes elemzését nem tartom szükségesnek.) A három konstrukcióra mindkét

kémhatáson, 300 K-en rögzített és megállapított relaxációs adatsorokat illetve azokból származtatott dinamikai paramétereket a CD-melléklet tartalmazza.



17. ábra. A számolt általános rendezettségi paraméter négyzete és hibája CCP1 illetve CCP2 aminosavainak esetében savas és semleges (300 K) kémhatáson.

8.1. CCP1 savas pH4,0

A CCP1 molekula globális rotációs korrelációs idejének meghatározásához az aminosavak átlagos R_2/R_1 hányadosa $2,96 \pm 0,36$ volt, amikor az átfedő aminosavakat (L298, Q326, W347 és H348) nem vettem figyelembe. Az átlagnál nagyobb értékkel szereplő aminosavak esetében várhatóan a lassabb mozgások jellemzőek (R_{ex} kémiai csere tag figyelembe vétele szükséges a relaxációs adatok értelmezéséhez. Ide ($R_2/R_1 > 3,30$)

tartoznak az E300, N331³⁸, C341, R349 és A350 aminosavak. A szokásos protokollnak megfelelően a globális rotációs korrelációs idő becslésekor ezeket figyelmen kívül hagytam, ami így 5,06 ns-nak adódott. Ez jó összhangban van a térszerkezet hidrodinamikai elemzésével kapott 5,22 ns-mal (17. ábra). Az öt lassú mozgású aminosav 4-es modellel, így R_{ex} taggal ($R_{ex} > 1$ Hz) volt jellemezhető. Ezen aminosavak mozgásának leírásához használt komplex modell miatt statisztikai elemzést nem kaptam (három relaxációs adatból, R_1 , R_2 és heteronukleáris NOE, négy dinamikai paraméter származtatása, τ_m , S^2 , τ_e és R_{ex}). Az összes többi értelmezhető aminosav esetében egyszerű modellekkel lehetett jellemezni az aminosavak mozgását (1-es és 2-es modell). Az 1-es modellek közül legfeljebb 6,0-os (M351), míg a 2-es modellek közül 2,3-as (T297) χ^2 -tesztet kaptam. Kevésbé jó modellillesztést adódott az I328, A339 és V340 aminosavakra ($5 < \chi^2$). Az S^2 értékek átlaga $0,80 \pm 0,07$, mely jól jellemzi a molekula merevségét és viszonylag korlátozott belső mozgékonyosságát (17. ábra). A vizsgált aminosavak közül a ps-ns időskálán a legmerevebb (legnagyobb az S^2) az A339, míg a legmozgékonyabb (legkisebb az S^2) a D358. Számottevően mozgékony aminosavak továbbá az I290 és T302.

8.2. CCP1 neutrális pH7,0

A savas CCP1 dinamikához képest a neutrális valamelyest nehezebben volt értelmezhető. Érdekes módon a savas körülmények nem kedveztek az L334 amid proton megjelenésének, viszont neutrális körülmények mellett nagy ^1H eltolódással jelentkezett, mellyel értelmezhetővé vált ezen aminosav dinamikai viselkedése is.

Az azonosított aminosavak átlagos R_2/R_1 hányadosa $3,08 \pm 0,42$. A hányados vizsgálatából és a kezdeti modellfüggetlen számolások után megállapítható volt, hogy azok az aminosavak illetve NH kötések, melyekre $3,50 < R_2/R_1$ teljesül, jellemzően lassú mozgást végeznek (μs -ms időskálán). Ezek az aminosavak: H335, D344 és H348. Az alacsony $2,66 > R_2/R_1$ hányadost adó I290-et, S336-ot, W347-et, M351-et és D358-at sem vettem figyelembe a globális rotációs korrelációs idő meghatározásához, mely így végül is 5,28 ns-nak adódott, ami kicsivel lassabb rotációt mutat a savas körülményekhez képest.

³⁸ A HSQC-n laposabb jelalakja a nagyobb félértékességet mutatja, ami az R_2 értékkel áll összefüggésben.

Az aminosavak NH kötéseinek mozgását leíró illesztések neutrális körülmények között viszonylag sok 4-es és néhány 3-as modellt eredményezett, nevezetesen: D299, E300, N306, Q308, G324, G330, N331(3), L334, H335(3), A339, C341, D344(3), T346(3) és A350. Ezeknél az aminosavknál így lassú mozgásokat (μs -ms időskála) is feltételezhetünk. Érdeemes ugyanakkor megjegyezni, hogy a lassú mozgások frekvenciája sokszor elhanyagolhatóan kicsi. Ilyen eseteket találni, ha az $R_{\text{ex}} < 1$ Hz vagy ehhez közeli érték (pl. 1,5 Hz). Ezek fordulnak elő az D299, E300, Q308, A339 és C341 gerinc amidoknál. Mindezek miatt a lassú μs -ms időskálájú mozgások az N306, G324, G330, N331, L334, H335, D344, T346 és A350 gerinc amidoknál jelentkeznek neutrális körülmények között, különösen a G324, N331 és H335 esetében (rendre 4,6; 3,1; 7,2 Hz)³⁹. A többi aminosav gerinc NH mozgásának leírásához elegendő volt az 1-es és 2-es modell alkalmazása⁴⁰. Az 1-es, 2-es és 3-as modell esetében (három relaxációs adatból legfeljebb három dinamikai paraméter megadása) a χ^2 -tesztek felhasználhatóak az illesztés jóságának értelmezéséhez. Leggyengébb értékelést az M351 ($\chi^2 = 6,08$) aminosavnál kaptam, mely feltehetőleg a ps-ns mozgás relaxációs hozzájárulása miatt van. Számottevő χ^2 -értéket ad a Q305, F337, D343 1-es modell-illesztés mellett.

Az általános rendezettségi paraméter (S^2) átlagértéke és hibája $0,84 \pm 0,12$ (17. ábra) eltekintve a D315, G345 (mindkettőnél $S^2 = 1$), G324 (irreálisan kicsi izolált S^2 , mely feltehetőleg hibás), W347 és H348 (a korábban említett okok miatt) aminosavaktól. Az N- és C-terminálisok kivételével a legalacsonyabb S^2 értékkel az L334 (0,66).

CCP1 pH hatás

Elmondható, hogy a két hisztidin savanyítás ($\text{pH}7,0 \rightarrow \text{pH}4,0$) hatására történő imidazol gyűrű protonálódása destabilizálólag hat az F β -szálban lévő V340 NH---H348 imidazol H-hídra ugyanakkor a H335 oldószernek kitett aminosav számottevően nem befolyásolja a szerkezet stabilitását. Hasonlóan destabilizáló hatású a D299 oldalláncának ($O\delta^2$) protonálódása, mely a C354 NH gerinccel van H-hídban semleges körülmények között. Ez nagyon jól kivehető az AB-kanyar általános rendezettségi paraméterének pH függvényében történő növekedésében.

³⁹ A G324 feltehetőleg hibás illesztéssel bír (lásd később).

⁴⁰ Egyedül a H348-at nem lehetett értelmezhető módon leírni.

8.3. CCP2 savas pH4,5

A második CCP modul dinamikai vizsgálatát is először savas körülmények között végeztem el. Az exponenciális illesztéseket illetve a heteronukleáris NOE hányadosát kielégítő szórással kaptam meg a spektrumsorozatokból. Ez esetben is kizártam a kiugróan magas vagy alacsony R_2/R_1 hányadossal jellemezhető aminosavakat. Az izotróp globális rotációs korrelációs idő meghatározásakor ezek: N379, T398, G408, K419, E421, K423, E425. Szintén eltekintettem a τ_m számolásához az átfedő és bizonytalan aminosavak adataitól, így az S402, R429 illetve az R399 is kimaradt a molekula reorientációs idejének számolásából. (Az E391 ugyancsak nagy R_2/R_1 hányadossal szerepelt, ám amennyiben a globális rotációs korrelációs idő számolásához nem vettem figyelembe, összességében a molekulára rosszabb eredményt kaptam az illesztésben.) A globális rotációs korrelációs idő ($\tau_m = 4,72$ ns) kisebb, mint a CCP1-nél kapott érték, feltételezhetően a második modulban található hosszabb és mozgékonyabb hurok régiók miatt. Ez az érték messze elmarad a hidrodinamikai elemzéssel számolt 5,61 ns-hoz képest (17. ábra). Az illesztésben 3-as és 4-es modellel kizárólag a nagy R_2/R_1 hányadossal szereplő aminosavakat kaptam.

A illesztés jóságát mérő χ^2 -értékek enyhén (N367, R371, E391, M396, A414, N420, K426) vagy túlzottan (G368, Q386, Y387, G408, T411, Q422, K423, E425) nagyok, melyek közül rossz az illesztés az N367, G368, R371, Q386, T411, Q422 aminosavak esetében. Ezek döntően β -szálakat összekötő kanyarokon és hurkokon találhatóak. Az illeszthető, de nagy χ^2 -értéket adó aminosavak pedig a következők: az Y387, E391, M396, G408, A414, N420, K423, E425, K426.

Lokálisan jelentős gyors mozgást mutatnak a modell szerint a T380, K382, G401 (5-ös modell: $S_f^2 = 0,8911$), Y410, G416, E421, G424, C430 aminosavak. Lassú időskálájú konformációs cserében lévő aminosavak a T398, G408 (EF-hurok), K419, E421, K423 és a E425 (GH-hurok).

8.4. CCP2 neutrális pH7,0

A CCP2 neutrális körülmények között jól értelmezhető relaxációs adatokat adott. Az átlagos R_2/R_1 hányados alapján a globális rotációs korrelációs idő számolásához kizártam a jelentősen ($\mu \pm 1 \sigma$) eltérő illetve kis het-NOE értéket mutató aminosavakat. Hasonlóan a korábbiakhoz kizártam a spektrumban átfedő jeleket adó aminosavakat is. Mindezek miatt a T375, M376, T398, E406-G408, A414, N420, K423-K426 aminosavakat nem vettem figyelembe a tenzor számításához (ezek többsége a későbbiekben valótlánul nagy S_f^2 értéket adott, kivéve a T398, N420, K423, E425, K426). A 4,75 ns-os korrelációs idő gyakorlatilag megegyezik a savas pH-n tapasztalt értékkel. Az illesztésben hibás kimenetet adó M376, T408, A414, E425 aminosavakon kívül nagy χ^2 értéket eredményezett a D369 és a A383 aminosavak statisztikai elemzése (7,21 és 5,28), melyek a legegyszerűbb 1-es modelljük mellett még így is elfogadhatónak tekinthetők. Maximális S^2 értéket vett fel az N367, T373, V378, T413, Q415, I417 és K426 (17. ábra), melyeknél a modellek túlzottan merevnek tekintik az adott amidsoportokat (kiugróan flexibilisnek mutatkozik ugyanakkor a G408-as aminosav: $S^2 = 0,0057$). Megjegyzendő, hogy ez utóbbi felsorolásban szereplő aminosavak is 1-es modellel szerepelnek az illesztésben, melyek esetében a globális rotációs korrelációs idő növekedése ($\tau_m > 5,0$ ns, de esetenként akár 5,3 ns felett) csökkentette az S^2 értéket, akár 1-es (Q415), akár 2-es (N367, V378, T413, I417) vagy rossz (T373, K426) illesztés történt.

Gyors, lokális mozgások dominálnak az N-terminálison (K357, D358), a hurkokon (R403, N420, Q422) és az egyik β -szálon (Y410) lévő aminosavaknál, ugyanakkor μ s-ms időskálájú mozgások jelentkeznek a T398, N420, K423 aminosavaknál.

CCP2 pH hatás

Összességében elmondható, hogy a CCP2 esetében a neutrális körülmények egyszerűbb modellelírásat eredményeztek, mint a savas pH-n felvett értékek és kevesebb esetben volt rossz a modellillesztés.

Elmondható, hogy az egyetlen hisztidin savanyítás eredményeként protonálódó imidazol oldallánca gyengíti a B és D-szálak közötti kapcsolatot, feltételezhetően a gyengülő D369 és H390 oldallancok közötti kapcsolat miatt. A stabilizálódás tükröződik az S^2 értékek

növekedésében (D369, F370, H390) és az értelmezhetőbb dinamikai leírásban (N367, G368, R371).

8.5. A kovalensen kötött modulpár dinamikája

A relaxációs adatokból származtatott dinamikai paraméterek meghatározása sikertelen és bizonytalan volt a modulpár esetében, ezért ennek relaxációs-dinamikai értékelését a spektrális sűrűségfüggvény segítségével végeztem el. Az összevetetőség igénye miatt⁴¹ a magányos CCP modulok spektrális sűrűségértékeit is itt adom meg.

8.5.1. Relaxációs adatok és a spektrális sűrűségfüggvény redukált elemzése

A magányos CCP-kből és a modulpár megfelelő aminosavaitól származó relaxációs adatok összevetésekor látványos eltéréseket lehet észrevenni (18. ábra). A modulpár CCP2 R₁ adatai kisebbek, mint a CCP1-é, viszont R₂ esetében ez pontosan fordítva van. Mindezek miatt az R₂/R₁ hányados nagyobb a CCP2 felében. Ez jelentős eltérés a magányos modulok R₂/R₁ hányadosához képest, amikor a CCP1-nél volt nagyobb a hányados következőképpen nagyobb globális rotációs korrelációs idő. Az R₂ növekedése (13,32 ± 2,14) összhangban van a modulpár méretnövekedésével (4. táblázat).

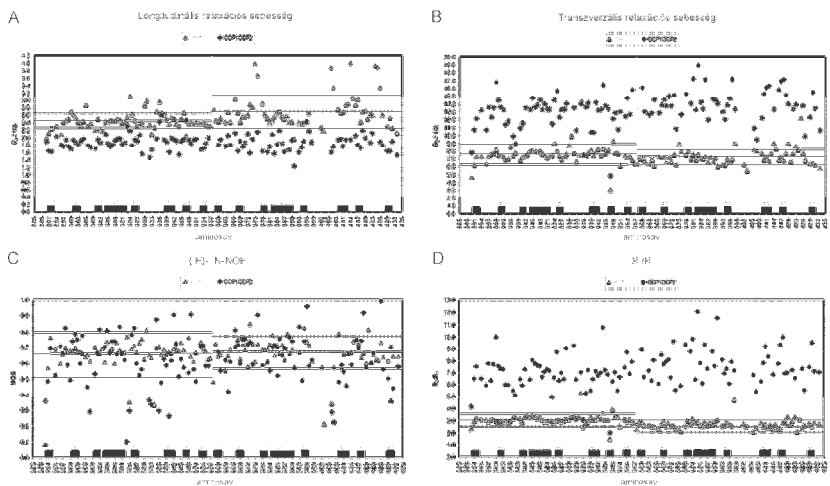
4. táblázat. A modulok átlagos relaxációs értékei 300 K-en.

	pH4,0/pH4,5 ⁵		pH7,0	
	CCP1	CCP2	CCP1	CCP2
T ₁ / ms	446 +/- 44	426 +/- 51	417 +/- 44	375 +/- 62
R ₁ / 1/s	2,26 +/- 0,21	2,37 +/- 0,21	2,42 +/- 0,24	2,76 +/- 0,65
T ₂ / ms	152 +/- 17	163 +/- 45	139 +/- 33	142 +/- 18
R ₂ / 1/s	6,65 +/- 0,68	6,38 +/- 1,05	7,47 +/- 1,35	7,16 +/- 1,02
{ ¹ H}- ¹⁵ N NOE	0,624 +/- 0,103	0,620 +/- 0,239	0,639 +/- 0,154	0,644 +/- 0,126
R ₂ /R ₁	2,957 +/- 0,359	2,681 +/- 0,356	3,077 +/- 0,423	2,654 +/- 0,412

⁵ CCP2

Az {¹H}-¹⁵N NOE tekintetében a CCP1 a modulpárban sokkal nagyobb szórással jellemezhető, mint szabad állapotban, feltételezhetően a nagyobb mértékű gyors időskálájú

⁴¹ A jobb spektrális minőség miatt a modulpár 315 K-es adatait használom.

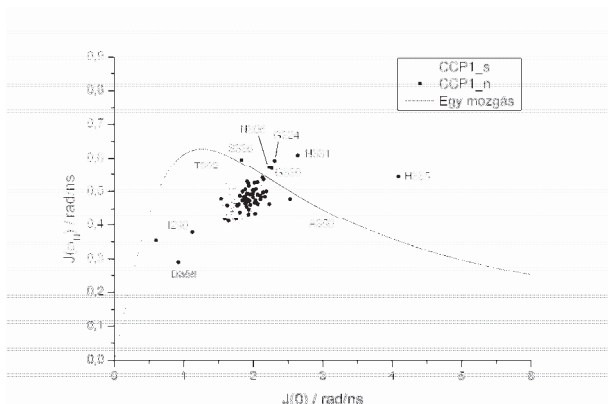


18. ábra. A CCP modulok relaxációs adatai pH7-en. A CCP1-CCP2 modulpár 315 K-en (teli kör) és a magányos CCP-k 300 K-en (üres háromszög) felvett (A) R_1 (-543.0 ± 56.2 ms), (B) R_2 relaxációs sebesség (-75.6 ± 12.3 ms), (C) $[^1\text{H}]-^{15}\text{N}$ NOE (0.608 ± 0.163), és (D) R_2/R_1 értékei. Az ideális β -szálakat a grafikonok alján fekete téglalapként ábrázoltam. A vízszintes egybefüggő és szaggatott vonalak az átlagot és a ± 1 SD értéket jelölik rendre a magányos modulokra és a modulpárra.

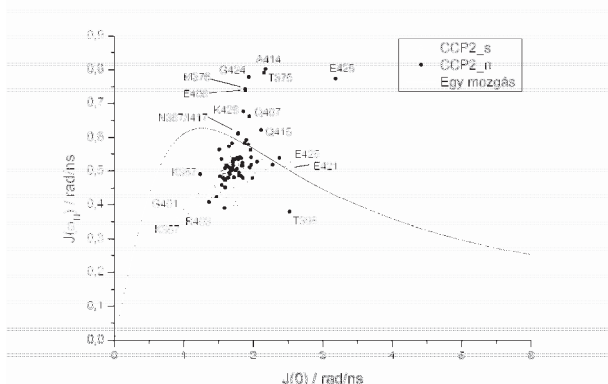
mozgások miatt különösen a BC-hurkon. Az EF-hurokban észlelt mozgékonyághoz járul még kifejezett R_1 csökkenés is. A CCP2 EF-hurok régiójának dinamikája jellegében változatlan marad a modulpáron belül: a ps-ns időskálájú lokális mozgások dominálnak. Különösen a modulpár kölcsönható felszínének formálásában résztvevő másodlagos szerkezeti elemek (CCP1: AB-, DE-kanyarok illetve CCP2: CD-, FG-kanyarok) kiugróan magas R_2 értékkel szerepelnek, melyek érzékenyek a μ s-ms időskálájú mozgásokra.

A modulpár R_2/R_1 hányadosából származtatott globális rotációs korrelációs idő (CCP1-re $\tau_m=9,32$ illetve CCP2-re $\tau_m=9,87$ ns) kisebb, mint a szerkezetből számolt 12,64 ns érték. A modulpár dinamikai paramétereinek a modellfüggetlen módszerrel történő származtatásának sikertelensége miatt a spektrális sűrűségértékek redukált elemzését végeztem el. A modulpár jelentős $J(0)$ növekménye mindkét modul összevetésénél összhangban van a megnövekedett R_2/R_1 hányadossal. Mindkét modulban jelentős növekménnyel rendelkező aminosavak egészen jól körvonalazzák a két modul szerkezet alapján várt kapcsolódási felszínét vagy annak közvetlen szomszédságát: E300, Y325, I356 illetve N379, Y381, A383, I417, W418. Ezek alapján az érintkező felszínhez közeli aminosavak egy része hatékonyan relaxál a globális rotációs időnél lassabb μ s-ms-os időskálán.

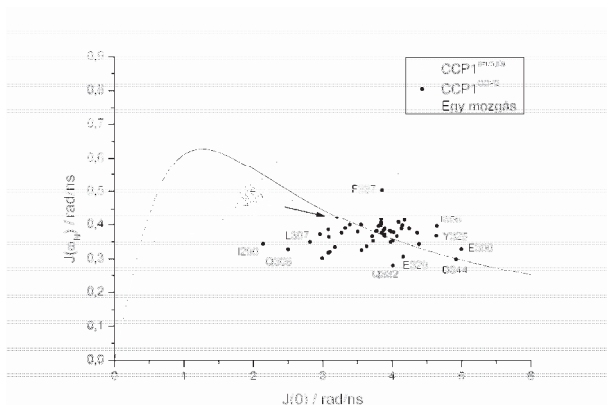
A magányos modulokhoz képest a CCP1-CCP2 spektrális sűrűség értékei elszórtabbak, ami a modulpár nagyobb mértékű anizotrópiájára utalhat (**19-22. ábra**). A CCP2 hurok régiójának gyors mozgása mellett a CCP1 ún. hipervariábilis régiója jelentős lokális mozgékonyásra tett szert a CCP2 kapcsolódásával. A magányos CCP2-ben szembetűnő a $J(\omega_N)$ növekmény (**20. ábra**): számos aminosavat reprezentáló gerinc NH jele kívül esik a globális mozgást jellemző határon kívül. Ilyen mozgással rendelkező aminosavak a β -kanyarokon vagy rendezetlen hurkokon helyezkednek el nevezetesen a T375, M376, E406, Q407, A414, Q415, G424, E425, K426. Az E300 lassabb mozgása is a CCP2 jelenléte miatt lehetséges (**21. ábra**), hiszen önálló modulként, legalábbis pH4-en, ez a régió jelentős lokális flexibilitással rendelkezik. Valószínűleg a két közeli szerkezeti elem (β -kanyar és hipervariábilis hurok) kapcsolt dinamikája figyelhető meg a köztes β -szálon keresztül: CCP2 jelenlétének hatására a kanyar lokális flexibilitásának megszűnésével egyidejűleg a hurok belső mozgékonyága jelenik meg, mellyel potenciális kölcsönható régió alakul ki. Ezt támasztja alá, hogy a kristályszerkezetben megfigyelhető dimerképzés erre a régióra esik (BUDAYOVA-SPANO 2002A).



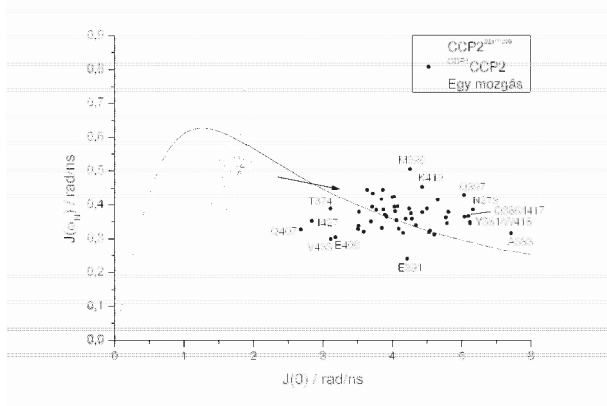
19. ábra. A magányos CCP1 gerinc ^{15}N kötések spektrális sűrűségfüggvény köztes szögsebességű értékeinek ($J(\theta_{\text{NH}})$) megfeleltetése a lassú mozgásokkal ($J(0)$) 300 K-en és savas (üres háromszög) illetve semleges (teli kör) kémhatáson. A folytonos vonal az NH kötés egyetlen mozgására leegyszerűsített modell mellett meghatározott sűrűségfüggvény összetartozó értékeit mutatja. Néhány jellegzetes NH relaxációs viselkedéssel rendelkező aminosavat kiemeltem.



20. ábra. A magányos CCP2 gerinc ^{15}N kötések spektrális sűrűségfüggvény köztes szögsebességű értékeinek ($J(\theta_{\text{NH}})$) megfeleltetése a lassú mozgásokkal ($J(0)$) 300 K-en és savas (üres háromszög) illetve semleges (teli kör) kémhatáson. A folytonos vonal az NH kötés egyetlen mozgására leegyszerűsített modell mellett meghatározott sűrűségfüggvény összetartozó értékeit mutatja. Néhány jellegzetes NH relaxációs viselkedéssel rendelkező aminosavat kiemeltem.



21. ábra. A magányos (üres háromszög, 315 K-en) és a modulpár (teli kör, 300 K-en) CCP1 gerinc $^{\text{NH}}$ kötések spektrális sűrűségfüggvény köztes szögsebességű értékeinek ($J(\omega_{\text{N}})$) megfeleltetése a lassú mozgásúakkal ($J(0)$) pH7-en. A folytonos vonal az NH kötés egyetlen mozgására leegyszerűsített modell mellett meghatározott sűrűségfüggvény összetartozó értékeit mutatja. A nyíl a globális rotációs korrelációs idő növekedését hangsúlyozza. Néhány jellegzetes NH relaxációs viselkedéssel rendelkező aminosavat kiemelt.



22. ábra. A magányos (üres háromszög, 315 K-en) és a modulpár (teli kör, 300 K-en) CCP2 gerinc $^{\text{NH}}$ kötések spektrális sűrűségfüggvény köztes szögsebességű értékeinek ($J(\omega_{\text{N}})$) megfeleltetése a lassú mozgásúakkal ($J(0)$) pH7-en. A folytonos vonal az NH kötés egyetlen mozgására leegyszerűsített modell mellett meghatározott sűrűségfüggvény összetartozó értékeit mutatja. A nyíl a globális rotációs korrelációs idő növekedését hangsúlyozza. Néhány jellegzetes NH relaxációs viselkedéssel rendelkező aminosavat kiemelt.

9. Az eredmények értékelése

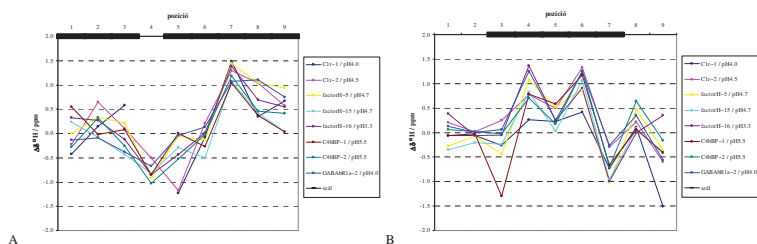
A C1 α CCP molekulák szerkezete, bár a teljes katalitikus fragmentum részeként, már ismert volt a munka elkezdésekor. Ehhez kapcsolódóan a CCP2-SP kristályszerkezete is elérhető volt, mind a zimogén, mind az aktív formában. Az SP domén katalitikus állapotai nem voltak jelentős hatással a CCP2 modulra. Ugyanakkor a fenti kristályszerkezetek, a B-faktor közvetett adatain kívül, nem nyújtanak semmilyen adatot a CCP modulok belső dinamikájáról. Ezeknek feltételezett a nagymértékű konformáció-változása a katalízis során. Az elvégzett relaxációs-dinamikai vizsgálatok ebből a szempontból újnak tekinthetők, bár CCP modulok NMR-spektroszkópiával meghatározott dinamikája nem előzmények nélküli.

9.1. A kémiai eltolódások és a térszerkezet kapcsolata a magányos modulokban

9.1.1. Összevetés a kristályszerkezettel

Az aminosav gerinc-konformációja elvileg tükröződik a gerinc atomok kémiai eltolódásában (PARDI 1984; WISHART 1991; WILLIAMSON 1990; OSAPAY 1994). Legegyszerűbben a H-atommagok eltolódásait lehet vizsgálni, melyek ugyanakkor H-hidakban vehetnek részt (WISHART 1991), különösen a ^NH atomok (PARDI 1983; WISHART 1991; WILLIAMSON 1990). Az $^{\alpha}\text{H}$ atomok eltolódásainak vizsgálatával a másodlagos szerkezeti elemek értékelhetőek. A magányos modulok (CCP1 és CCP2) szekvenciális szomszédok kémiai eltolódás hatásával korrigált és a rendezetlen szerkezetű aminosavak eltolódásaival összevetett $^{\alpha}\text{H}$ értékei a tipikus CCP-re jellemző β -szálak szerkezetet mutatják, a másodlagos szerkezeti elemek a kristályszerkezetekkel összhangban vannak (BUDAYOVA-SPANO 2002A; KARDOS 2008). Mindkét modulban előforduló egy-egy aminosavat érintő eltérések megszakítják a szálak folyamatosságát. Ezek jelenléte konzervált helyen értékes szerkezetre utaló eltolódásokat eredményezhetnek. Az aromás gyűrűk közelében lévő $^{\alpha}\text{H}$ atomok kémiai eltolódásukban érzékenyen mutatják nemcsak a gyűrűk térbeli közelségét, hanem a csoportok relatív orientációját is (JOHNSON 1958).

Ezekből az eltolódás összevetésekből látható, hogy az alábbi konszenzus szekvencián YG-vel jelölt szomszédos aromás és tipikusan glicin aminosavak a CCP-k „CD-dudorban” régiójában konzerváltak, és bár se a C1r CCP1, se a CCP2 nem glicint tartalmaz, a foldra jellemző indol gyűrű anizotróp köráram hatása miatt az $^{\alpha}\text{H}$ eltolódások mégis jellegzetesek maradnak (25, 26. ábra). A szerkezetileg kedvezményezett glicin aminosav jellegzetes $^{\alpha}\text{H}$ kémiai eltolódását megőrzi a nem kedvezményezett arginin illetve lizin.



26. ábra. Két kitüntetett régió aminosavainak és szekvenciális szomszédainak jellegzetes $^{\alpha}\text{H}$ szekvencia-korrigált másodlagos kémiai eltolódásai. A β -szálak a grafikonok tetején fekete téglalappal jelöltem. A – C és D szálak (C1r CCP1: QYQ és RDYFI); B – F szál (C1r CCP2: FTAVC). A rövidítések megegyeznek a 25. ábrán használtakkal.

A C- és D-szálak közötti CD „ β -dudorban” három esetben nulla körüli szekvencia-korrigált másodlagos kémiai eltolódással szerepel a konzervált glicin $^{\alpha}\text{H}$ (RICHARDSON 1978; CHAN 1993), mely pozíció (5. pozíció a 26. ábrán) a többi modulban negatív eltolódást mutat. Az eltérés összefüggésben állhat a megelőző pozíció nem aromás karakterű aminosavának jelenlétével (treonin és aszparaginsav), és így a körgyűrű hatással. Az 5. pozíció negatív szekvencia-korrigált $^{\alpha}\text{H}$ másodlagos kémiai eltolódása markánsan jelentkezik a C1r CCP-k esetében (nem glicin: G1G-típusú „ β -dudor”⁴², hanem arginin illetve lizin: GIA-típus), ahol a megelőző aminosav szintén aromás karakterű. Úgy tűnik, hogy a jellegzetes $^{\alpha}\text{H}$ eltolódás a 4. pozíció oldalláncának körgyűrű hatása miatt van és nem kizárólag a konzervált szerkezeti elem miatt.

⁴² <http://www.ebi.ac.uk/pdbsum/1hfh> és <http://www.ebi.ac.uk/pdbsum/1hfi>, ugyanakkor a H-faktor 5-ös moduljáról nincsen hasonló jellemzés.

9.2. A magányos modulok közötti kovalens kölcsönhatás

Az irodalomban számosan található példa oldatfázisú és kristályszerkezetes CCP modulpárok relatív orientációjára (LEHTINEN 2004) előbbieknél esetleg dinamikára. A C1r-ben igen rövid, csupán négy aminosavas linker önmagában intenzív kölcsönhatást feltételez. Ugyanakkor egyes CCP modulokban előforduló kölcsönható felszín érintő beépülések (pl. CR1~17 DE- és CR1~16 és 17 FG-hurok (SMITH 2002) hiányoznak a C1r CCP-kben, így várhatóan lecsökkentve az interdomén felületet és ezáltal a kölcsönhatások mértékét. A C1r modulpárban formálódó felszín számottevő perturbációt eredményez két tirozin aminosavban. Egyéb perturbált gerinc amidok CCP1-ben a DE-kanyarban lévő G324-Y325, melyek kémiai eltolódása viszonylag jelentős változást mutat. A CCP2-ben a perturbált aminosavak: Y381, A414-W418. Ezek nagyon jól egyeznek a CCP2-nek a CCP1 felé tekintő részével (linker, C-szál, „CD-dudor” és FG-kanyar). A CCP1 Y325 helye egyéb CCP modulokban is aromás, de a CCP2 Y381 (vagy F) már ritkábban fordul elő és érdekes módon a komplement kezdeti fehérréjében a rákövetkező lizinnel alkot párt (kivételel a C1s CCP2, ahol FG).

A sikertelen magányos CCP1 illetve a sikertelen modulpár kifejeztetés (CCP1-CCP2) után a két- és hárommodulos termelést (CUB2-CCP1, CUB2-CCP1-CCP2) követő enzimatikussal hasítással létrehozott magányos modul és modulpár (CCP1, CCP1-CCP2) NMR-vizsgálataival körvonalazódott egy érzékeny modul-modul kölcsönható felszín, mely utóbbit a CUB2 jelenléte stabilizálja. A di- és trimoduláris fragmentumok közötti szerkezeti-dinamikai kommunikáció meghatározó különösen a CCP1 szerkezetének szempontjából. A CUB2 eltávolításával a modulpár natív szerkezete megmarad, így indokolt annak feltételezése, hogy a CUB2-jelenlét szükséges feltétel a CCP1-CCP2 modulpár (illetve a CCP1) helyes feltekeredéséhez. A körvonalazott relaxációs-dinamikai viselkedések alapján (CCP1 és CCP1-CCP2) a CCP2 jelentős szerepet játszik a CCP1 belső dinamikájának átrendezésében az intermoduláris kölcsönható felszínen keresztül.

9.3. Magányos modulok nem-kovalens kölcsönhatása

Bár szokatlan modul-modul kovalens kapcsolat előfordul CCP modulok között (RICKERT 2005), két magányos CCP asszociátumára nem találtam példát az irodalomban. A modulok közötti gyenge kölcsönhatásnak, jellege folytán, fontos funkcionális hatása képzelhető el akár

a γ_B -ben akár a teljes C1r molekulában. Mind a kristály-, mind a modellezett szerkezetben a CCP1 modul jelenléte nélkülözhetetlen a teljes katalitikus fragmentum dimerizációjában a jelenleg feltételezett antiparalel kölcsönhatás reálisnak tűnik. A meghatározott kölcsönhatási felszín és relatív orientáció alapján feltételezett dimer kölcsönhatás a legkevesebb elmozdulást mutatja a kristályszerkezet dimerjéhez képest. A modellezett katalitikus fragmentum moduljainak megváltozott kölcsönhatása miatt az új dimer eltérő funkcionális állapotot feltételez. Ráadásul a javasolt modell igen kis módosítása lehetővé teszi, hogy a γ_B fragmentum összes CCP modulja kölcsönhatásba lépjen egymással (CCP1:A-CCP2:B és CCP1:B-CCP2:A, ahol A és B a dimer két láncát jelöli). A CCP1 és CCP2 közötti kölcsönhatás összhangban van azzal a megfigyeléssel, hogy a C1r CCP2 modul jelenléte (CCP2-SP fragmentum) jelentősen hozzájárul a C1s molekula enzimatis aktiválásához, míg a CCP1-et is tartalmazó C1r katalitikus fragmentum katalitikus aktivitása visszaesik az önálló SP domén C1s hasítási értékére. Ez az enzimatis funkció magyarázható azzal, hogy a CCP2 C1s szubsztrátkötését a C1r CCP1 modulja kötődés révén maszkfrozza. A kristályosítás után megfigyelt γ_B röntgenszerkezet viszont erősebb kölcsönhatást feltételez a CCP1:CCP2 kölcsönhatásnál, ami magyarázatul szolgálhat a modellezett dimer sikertelen kristályosítására. Emellett fontos megemlíteni, hogy a kristályosítás során fellépő egyéb tényezők és esetlegesen kialakuló nem natív kölcsönhatások az oldatfázisban megjelenő preferenciákat is módosíthatják (ZUIDERWEG 2002).

9.5. Mozgékonyság

Az NMR-spektroszkópia fejlődésével és térnyerésével egyre inkább előtérbe kerül a fehérjék belső dinamikájának részletes vizsgálata. Számos esetben felismerték, hogy a különböző időskálákra jellemző konformációs mozgások szoros összefüggésben vannak az adott fehérje funkciójával. A mozgékony felszíni hurokrégiók sokszor vesznek részt fehérje-fehérje kölcsönhatásban. A más fehérjékkel való kapcsolat ugyanakkor befolyásolhatja a mozgékonytságot akár az interakciós felszíntől távol eső helyeken is, ezáltal modulálva a partner további molekulákkal történő kölcsönhatásra való képességét.

A CCP modulok a komplementrendszer fontos szabályozó komponensei, számos fehérje-fehérje kölcsönhatásban vesznek részt. Ezért fontosnak tartottam mind az önálló modulok, mind a tandem modulpár dinamikai vizsgálatát, különös tekintettel arra, hogy a kovalens

kapcsolat befolyásolja-e az egyes modulok mozgékonyágát, ezáltal esetlegesen kölcsönhatásokra való képességét.

A CCP modulok és modulpár dinamikai vizsgálatával megállapítható volt, hogy a magányos CCP1 jól korrelálható aminosavakkal jellemezhető, míg a CCP2-re ez kevésbé jellemző különösen az EF hurok gyors, peptidszerű mozgékonyága miatt. Ezzel magyarázható a CCP2 nagyobb mérete ellenére gyorsabb reorientációja. Meghatározható volt CCP1-ben a GH hurok μ s-ms időskálájú mozgása is. A modulpár mozgékonyágát kizárólag a relaxációs viselkedése és így a spektrális sűrűség redukált elemzése által lehetett jellemezni. Ezek alapján feltételezhető annak nagyobb anizotrópiája és az intermoduláris kölcsönhatás megmutatkozott a kölcsönható felszíneken. Jelentős változás a magányos CCP1-hez képest a BC hurok gyors időskálájú flexibilitás-növekedése. Változatlan marad ugyanakkor a CCP2 EF hurok μ s-ms időskálájú lokális mozgása. Mindkét régió potenciális kölcsönható felszínként szerepelhet más molekulákkal való kölcsönhatásban. Erre példát is találni a CCP1 BC huroknál, mely révén a C1r γ_B fragmentum dimerizálódik (BUDAYOVA SPANO 2002A).

10. Továbblépési lehetőségek

Rövidtávú célként szerepelhet a C1r molekula további moduljainak például a CUB2-CCP1, vagy az EGF-tartalmú modulpárok, mint a CUB1-EGF vagy EGF-CUB2 NMR-dinamikai vizsgálata. Érdekes lehet a katalízisben fontos SP domén NMR-es vizsgálata is, de ennek mérete jelentősen megnehezíti az NMR-méréseket. Távlabbi célként lehet megemlíteni a C1 molekulakomplex flexibilitás-vizsgálatát, így a C1s illetve a C1q moduljainak, doménjeinek dinamikai feltérképezését. Akár a dinamikai adatok értelmezésével a C1 komplex fehérjéinek kölcsönhatás-vizsgálata jelentősen hozzájárulhat működésének megértéséhez.

Irodalomjegyzék

ABELSON JN, SIMON MI, JAMES TL, OPPENHEIMER NJ (1994): Nuclear Magnetic Resonance, Part C, Volume 239 (Methods in Enzymology). Academic Press, San Diego.

ABRAGAM A (1961): The principles of nuclear magnetism. Clarendon Press, Oxford.

ALEXANDRESCU AT, SHORTLE D (1994): Backbone dynamics of a highly disordered 131 residue fragment of staphylococcal nuclease. *J Mol Biol* 242(4):527-546.

ANDREC M, MONTELIONE GT, LEVY RM (1999): Estimation of dynamic parameters from NMR relaxation data using the Lipari-Szabo model-free approach and Bayesian statistical methods. *J Magn Reson* 139(2):408-421.

ANDREC M, MONTELIONE GT, LEVY RM (2000): Lipari-Szabo mapping: A graphical approach to Lipari-Szabo analysis of NMR relaxation data using reduced spectral density mapping. *J Biomol NMR* 18(2):83-100.

ANDREC M, SNYDER DA, ZHOU Z, YOUNG J, MONTELIONE GT, LEVY RM (2007): A large data set comparison of protein structures determined by crystallography and NMR: statistical test for structural differences and the effect of crystal packing. *Proteins* 69(3):449-465.

ARLAUD GJ, CHESNE S, VILLIERS CL, COLOMB MG (1980): A study on the structure and interactions of the C1 sub-components C1r and C1s in the fluid phase. *Biochim Biophys Acta* 616(1):105-115.

ARLAUD GJ, GAGNON J, VILLIERS CL, COLOMB MG (1986): Molecular characterization of the catalytic domains of human complement serine protease C1r. *Biochemistry* 25(18):5177-5182.

ARLAUD GJ, VAN DORSSELAER A, BELL A, MANCINI M, AUDE C, GAGNON J (1987): Identification of erythro-beta-hydroxyasparagine in the EGF-like domain of human C1r. *FEBS Lett* 222(1):129-134.

AUDE CA, LACROIX MB, ARLAUD GJ, GAGNON J, COLOMB MG (1988): Differential accessibility of the carbohydrate moieties of C1s-C1r-C1r-C1s, the catalytic subunit of human C1. *Biochemistry* 27(23):8641-8648.

BALLY I, ROSSI V, THIELENS NM, GABORIAUD C, ARLAUD GJ (2005): Functional role of the linker between the complement control protein modules of complement protease C1s. *J Immunol* 175(7):4536-4542.

BARLOW PN, BARON M, NORMAN DG, DAY AJ, WILLIS AC, SIM RB, CAMPBELL ID (1991): Secondary structure of a complement control protein module by two-dimensional ¹H NMR. *Biochemistry* 30(4):997-1004.

BARLOW PN, NORMAN DG, STEINKASSERER A, HORNE TJ, PEARCE J, DRISCOLL PC, SIM RB, CAMPBELL ID (1992): Solution structure of the fifth repeat of factor H: a second example of the complement control protein module. *Biochemistry* 31(14):3626-3634.

BARLOW PN, STEINKASSERER A, NORMAN DG, KIEFFER B, WILES AP, SIM RB, CAMPBELL ID (1993): Solution structure of a pair of complement modules by nuclear magnetic resonance. *J Mol Biol* 232(1):268-284.

BARTELS C, XIA T-H, BILLETER M, GÜNTERT P, WÜTHRICH K (1995): The program XEASY for computer-supported NMR spectral analysis of biological macromolecules. *J Biomol NMR* 6(1):1-10.

- BAXTER RH, CHANG CI, CHELLIAH Y, BLANDIN S, LEVASHINA EA, DEISENHOFER J (2007): Structural basis for conserved complement factor-like function in the antimalarial protein TEPI. *Proc Natl Acad Sci USA* 104(28):11615-11620.
- BERGELSON JM, CHAN M, SOLOMON KR, ST JOHN NF, LIN H, FINBERG RW (1994): Decay-accelerating factor (CD55), a glycosylphosphatidylinositol-anchored complement regulatory protein, is a receptor for several echoviruses. *Proc Natl Acad Sci USA* 91(13):6245-6248.
- BERSCH B, HERNANDEZ JF, MARION D, ARLAUD GJ (1998): Solution structure of the epidermal growth factor (EGF)-like module of human complement protease C1r, an atypical member of the EGF family. *Biochemistry* 37(5):1204-1214.
- BLANDIN SA, MAROIS E, LEVASHINA EA (2008): Antimalarial responses in *Anopheles gambiae*: from a complement-like protein to a complement-like pathway. *Cell Host Microbe* 12;3(6):364-374.
- BLEIN S, GINHAM R, UHRIN D, SMITH BO, SOARES DC, VELTEL S, MCLHINNEY RA, WHITE JH, BARLOW PN (2004): Structural analysis of the complement control protein (CCP) modules of GABA(B) receptor 1a: only one of the two CCP modules is compactly folded. *J Biol Chem* 279(46):48292-48306.
- BLOM AM, WEBB J, VILLOUTREIX BO, DAHLBÄCK B (1999): A cluster of positively charged amino acids in the C4BP α -chain is crucial for C4b binding and factor I cofactor function. *J Biol Chem* 274(27):19237-19245.
- BLOM AM (2000A): A cluster of positively charged amino acids in the α -chain of C4b-binding protein (C4BP) is pivotal for the regulation of the complement system and the interaction with bacteria. *Scand J Clin Lab Invest Suppl* 233:37-49.
- BLOM AM, ZADURA AF, VILLOUTREIX BO, DAHLBÄCK B (2000B): Positively charged amino acids at the interface between α -chain CCP1 and CCP2 of C4BP are required for regulation of the classical C3-convertase. *Mol Immunol* 37(8):445-453.
- BLOM AM, BERGGÅRD K, WEBB JH, LINDAHL G, VILLOUTREIX BO, DAHLBÄCK B (2000C): Human C4b-binding protein has overlapping, but not identical, binding sites for C4b and streptococcal M proteins. *J Immunol* 164(10):5328-5336.
- BLOM AM (2002): Structural and functional studies of complement inhibitor C4b-binding protein. *Biochem Soc Trans* 30(Pt 6):978-982.
- BLOM AM (2004): Strategies developed by bacteria and virus for protection from the human complement system. *Scand J Clin Lab Invest* 64(5):479-496.
- BLUE CE, SPILLER OB, BLACKBOURN DJ (2004): The relevance of complement to virus biology. *Virology* 319(2):176-184.
- BODE W (2006): Structure and interaction modes of thrombin. *Blood Cells Mol Dis* 36(2):122-130.
- BONVIN AMJJ, BOELENS R, KAPTEIN R (2005): NMR analysis of protein interactions. *Curr Opin Chem Biol* 9(5):501-508.
- BORK P (1991): Shuffled domains in extracellular proteins. *FEBS Lett* 286(1-2):47-54.
- BORK P, BECKMANN G (1993): The CUB domain. A widespread module in developmentally regulated proteins. *J Mol Biol* 231(2):539-545.
- BORK P, DOWNING AK, KIEFFER B, CAMPBELL ID (1996): Structure and distribution of modules in extracellular proteins. *Q Rev Biophys* 29(2):119-167.

BUDAYOVA-SPANO M, LACROIX M, THIELENS NM, ARLAUD GJ, FONTECILLA-CAMPS JC, GABORIAUD C (2002A): The crystal structure of the zymogen catalytic domain of complement protease C1r reveals that a disruptive mechanical stress is required to trigger activation of the C1 complex. *EMBO J* 21(3):231-239.

BUDAYOVA-SPANO M, GRABARSE W, THIELENS NM, HILLEN H, LACROIX M, SCHMIDT M, FONTECILLA-CAMPS JC, ARLAUD GJ, GABORIAUD C (2002B): Monomeric structures of the zymogen and active catalytic domain of complement protease C1r: further insights into the C1 activation mechanism. *Structure* 10(11):1509-1519.

BUSBY TF, INGHAM KC (1987): Calcium-sensitive thermal transitions and domain structure of human complement subcomponent C1r. *Biochemistry* 26(17):5564-5571.

BUSBY TF, INGHAM KC (1990): NH₂-terminal calcium-binding domain of human complement C1s- mediates the interaction of C1r- with C1q. *Biochemistry* 29(19):4613-4618.

CAMPBELL ID, BARON M, COOKE RM, DUDGEON TJ, FALLON A, HARVEY TS, TAPPIN MJ (1990): Structure-function relationships in epidermal growth factor (EGF) and transforming growth factor- α (TGF- α). *Biochem Pharmacol* 40(1):35-40.

CARDIN AD, WEINTRAUB HJ (1989): Molecular modeling of protein-glycosaminoglycan interactions. *Arteriosclerosis* 9(1):21-32.

CHAN AW, HUTCHINSON EG, HARRIS D, THORNTON JM (1993): Identification, classification, and analysis of β -bulges in proteins. *J Biol Chem* 268(10):1574-1590.

CLORE MG, SZABO A, BAX A, KAY LE, DRISCOLL PC, GRONENBORN AM (1990): Deviations from the simple two-parameter model-free approach to the interpretation of nitrogen-15 nuclear magnetic relaxation of proteins. *J Am Chem Soc* 112(12):4989-4991

D'AUVERGNE EJ, GOOLEY PR (2008A): Optimisation of NMR dynamic models I. Minimisation algorithms and their performance within the model-free and Brownian rotational diffusion spaces. *J Biomol NMR* 40(2):107-119.

D'AUVERGNE EJ, GOOLEY PR (2008B): Optimisation of NMR dynamic models II. A new methodology for the dual optimisation of the model-free parameters and the Brownian rotational diffusion tensor. *J Biomol NMR* 40(2):121-133.

DELAGLIO F, GRZESIEK S, VUISTER GW, ZHU G, PFEIFER J, BAX A (1995): NMRPipe: a multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes. *J Biomol NMR* 6(3):277-293.

DELANO WL (2002): The PyMOL molecular graphics system. San Carlos, CA, USA, DeLano Scientific.

DE LA TORRE GJ, HUERTAS ML, CARRASCO B (2000): HYDRONMR: prediction of NMR relaxation of globular proteins from atomic-level structures and hydrodynamic calculations. *J Magn Reson* 147(1):138-146.

DE VRIES SJ, VAN DIJK ADJ, KRZEMINSKI M, VAN DIJK M, THUREAU A, HSU V, WASSENAAR T, BONVIN AMJJ (2007): HADDOCK versus HADDOCK: New features and performance of HADDOCK2.0 on the CAPRI targets. *Proteins: Struct Funct & Bioinformatics* 69(4):726-733.

DOMINGUEZ C, BOELENS R, BONVIN AMJJ (2003): HADDOCK: a protein-protein docking approach based on biochemical and/or biophysical information. *J Am Chem Soc* 125(7):1731-1737.

DOOLITTLE RF (1981): Similar amino acid sequences: chance or common ancestry? *Science* 214(4517):149-159.

DOSSET P, HUS JC, BLACKLEDGE M, MARION D (2000): Efficient analysis of macromolecular rotational diffusion from heteronuclear relaxation data. *J Biomol NMR* 16(1):23-28.

DOSSET P, HUS JC, MARION D, BLACKLEDGE M (2001): A novel interactive tool for rigid-body modeling of multi-domain macromolecules using residual dipolar couplings. *J Biomol NMR* 20(3):223-231.

DÖRIG RE, MARCIL A, CHOPRA A, RICHARDSON CD (1993): The human CD46 molecule is a receptor for measles virus (Edmonston strain). *Cell* 75(2):295-305.

DRICKAMER K (1993): Ca^{2+} -dependent carbohydrate-recognition domains in animal proteins. *Curr Opin Struct Biol* 3(3):393-400.

ERIKSSON H, NISSEN MH (1990): Proteolysis of the heavy chain of major histocompatibility complex class I antigens by complement component C1s. *Biochim Biophys Acta* 1037(2):209-215.

ERIKSSON H, NISSEN MH (1992): Complement component C1r mediated cleavage of the heavy chain of the major histocompatibility class I antigens. *Biochem Biophys Res Commun* 187(2):832-838.

ERIKSSON H (1996): Proteolytic cleavage of MHC class I by complement C1-esterases-an overlooked mechanism? *Immunotechnology* 2(3):163-168.

FARROW NA, MUHANDIRAM R, SINGER AU, PASCAL SM, KAY CM, GISH G, SHOELSON SE, PAWSON T, FORMAN-KAY JD, KAY LE (1994): Backbone dynamics of a free and phosphopeptide-complexed Src homology 2 domain studied by ^{15}N NMR relaxation. *Biochemistry* 33(19):5984-6003.

FARROW NA, ZHANG O, SZABO A, TORCHIA DA, KAY LE (1995): Spectral density function mapping using ^{15}N relaxation data exclusively. *J Biomol NMR* 6(2):153-162.

FEINBERG H, UITDEHAAG JC, DAVIES JM, WALLIS R, DRICKAMER K, WEIS WI (2003): Crystal structure of the CUB1-EGF-CUB2 region of mannose-binding protein associated serine protease-2. *J Biol Chem* 278(10):2348-2359.

FINGEROTH JD, WEIS JJ, TEDDER TF, STROMINGER JL, BIRO PA, FEARON DT (1984): Epstein-Barr virus receptor of human B lymphocytes is the C3d receptor CR2. *Proc Natl Acad Sci USA* 81(14):4510-4514.

GREGORY LA, THIELENS NM, MATSUSHITA M, SORENSEN R, ARLAUD GJ, FONTECILLA-CAMPS JC, GABORIAUD C (2004): The X-ray structure of human mannan-binding lectin-associated protein 19 (MAP19) and its interaction site with mannan-binding lectin and L-ficolin. *J Biol Chem* 279(28):29391-29397.

GABORIAUD C, ROSSI V, FONTECILLA-CAMPS JC, ARLAUD GJ (1998): Evolutionary conserved rigid module-domain interactions can be detected at the sequence level: the examples of complement and blood coagulation proteases. *J Mol Biol* 282(2):459-470.

GABORIAUD C, JUANHUIX J, GRUEZ A, LACROIX M, DARNAULT C, PIGNOL D, VERGER D, FONTECILLA-CAMPS JC, ARLAUD GJ (2003): The crystal structure of the globular head of complement protein C1q provides a basis for its versatile recognition properties. *J Biol Chem* 278(47):46974-46982.

GAGNON J, ARLAUD GJ (1985): Primary structure of the A chain of human complement-classical-pathway enzyme C1r. N-terminal sequences and alignment of autolytic fragments and CNBr-cleavage peptides. *Biochem J* 225(1):135-142.

GÁSPÁRI Z (2003): Kisméretű szerinproteáz-inhibitorok vizsgálata NMR-spektroszkópiai és bioinformatikai módszerekkel. Doktori értekezés, ELTE.

GÁSPÁRI Z, SZENTHE B, PATTHY A, WESTLER WM, GRÁF L, PERCZEL A (2006): Local binding with globally distributed changes in a small protease inhibitor upon enzyme binding. *FEBS J* 273(8):1831-1842.

GÁSPÁRI Z, PERCZEL A (2010): Protein dynamics as reported by NMR. *Annu Rep NMR* 71, nyomdában.

GEIGER T, CLARKE S (1987): Deamidation, isomerization, and racemization at asparaginyl and aspartyl residues in peptides. Succinimide-linked reactions that contribute to protein degradation. *J Biol Chem* 262(2):785-794.

GODDARD TD, KNELLER DG (2009): SPARKY 3. University of California, San Francisco.

GREGORY LA, THIELENS NM, ARLAUD GJ, FONTECILLA-CAMPS JC, GABORIAUD C (2003): X-ray structure of the Ca²⁺-binding interaction domain of C1s. Insights into the assembly of the C1 complex of complement. *J Biol Chem* 278(34):32157-32164.

GRZESIEK S, BAX A (1992): Correlating backbone amide and side chain resonances in larger proteins by multiple relayed triple resonance NMR. *J Am Chem Soc* 114(16):6291-6293.

HASAN RJ, PAWELCZYK E, URVIL PT, VENKATARAJAN MS, GOLUSZKO P, KUR J, SELVARANGAN R, NOWICKI S, BRAUN WA, NOWICKI BJ (2002): Structure-function analysis of decay-accelerating factor: identification of residues important for binding of the Escherichia coli Dr adhesin and complement regulation. *Infect Immun* 70(8):4485-4493.

HENDERSON CE, BROMEK K, MULLIN NP, SMITH BO, UHRÍN D, BARLOW PN (2001): Solution structure and dynamics of the central CCP module pair of a poxvirus complement control protein. *J Mol Biol* 307(1):323-339.

HENKELS CH, CHANG YC, CHAMBERLIN SI, OAS TG (2007): Dynamics of backbone conformational heterogeneity in Bacillus subtilis ribonuclease P protein. *Biochemistry* 46(51):15062-15075.

HÖRE PJ (2004): Mágneses magrezonancia. Nemzeti Tankönyvkiadó, Debrecen-Budapest.

HOUCADE D, LISZEWSKI MK, KRYCH-GOLDBERG M, ATKINSON JP (2000): Functional domains, structural variations and pathogen interactions of MCP, DAF and CR1. *Immunopharmacology* 49(1-2):103-116.

JARYMOWYCZ VA, STONE MJ (2006): Fast time scale dynamics of protein backbones: NMR relaxation methods, applications, and functional consequences. *Chem Rev* 106(5):1624-1671.

JENKINS HT, MARK L, BALL G, PERSSON J, LINDAHL G, UHRIN D, BLOM AM, BARLOW PN (2006): Human C4b-binding protein, structural basis for interaction with streptococcal M protein, a major bacterial virulence factor. *J Biol Chem* 281(6):3690-3697.

JENSEN GA, ANDERSEN OM, BONVIN AM, BJERRUM-BOHR I, ETZERODT M, THØGERSEN HC, O'SHEA C, POULSEN FM, KRAGELUND BB (2006): Binding site structure of one LRP-RAP complex: implications for a common ligand-receptor binding motif. *J Mol Biol* 362(4):700-716.

JOHNSON CE JR, BOVEY FA (1958): Calculation of nuclear magnetic resonance spectra of aromatic hydrocarbons. *J Chem Phys* 29(5):1012-1014.

KARDOS J, GÁL P, SZILÁGYI L, THIELENS NM, SZILÁGYI K, LÖRINCZ Z, KULCSÁR P, GRÁF L, ARLAUD GJ, ZÁVODSZKY P (2001): The role of the individual domains in the structure and

function of the catalytic region of a modular serine protease, C1r. *J Immunol* 167(9):5202-5208.

KARDOS J, HARMAT V, PALLÓ A, BARABÁS O, SZILÁGYI K, GRÁF L, NÁRAY-SZABÓ G, GOTO Y, ZÁVODSZKY P, GÁL P (2008): Revisiting the mechanism of the autoactivation of the complement protease C1r in the C1 complex: structure of the active catalytic region of C1r. *Mol Immunol* 45(6):1752-1760.

KEELER J (2005): *Understanding NMR spectroscopy*. Wiley, New York.

KIRKITADZE MD, DRYDEN DT, KELLY SM, PRICE NC, WANG X, KRYCH M, ATKINSON JP, BARLOW PN (1999A): Co-operativity between modules within a C3b-binding site of complement receptor type 1. *FEBS Lett* 459(1):133-138.

KIRKITADZE MD, KRYCH M, UHRIN D, DRYDEN DT, SMITH BO, COOPER A, WANG X, HAUHART R, ATKINSON JP, BARLOW PN (1999B): Independently melting modules and highly structured intermodular junctions within complement receptor type 1. *Biochemistry* 38(22):7019-7031.

KIRKITADZE MD, BARLOW PN (2001): Structure and flexibility of the multiple domain proteins that regulate complement activation. *Immunol Rev* 180:146-161.

KORADI R, BILLETER M, WÜTHRICH K (1996): MOLMOL: a program for display and analysis of macromolecular structures. *J Mol Graph* 14(1):51-55.

KRÍZOVÁ H, ZÍDEK L, STONE MJ, NOVOTNY MV, SKLENÁR V (2004): Temperature-dependent spectral density analysis applied to monitoring backbone dynamics of major urinary protein-I complexed with the pheromone 2-sec-butyl-4,5-dihydrothiazole. *J Biomol NMR* 28(4):369-384.

KRYCH M, CLEMENZA L, HOWDESHELL D, HAUHART R, HOURCADE D, ATKINSON JP (1994): Analysis of the functional domains of complement receptor type 1 (C3b/C4b receptor; CD35) by substitution mutagenesis. *J Biol Chem* 269(18):13273-13278.

KRYCH M, HAUHART R, ATKINSON JP (1998): Structure-function analysis of the active sites of complement receptor type 1. *J Biol Chem* 273(15):8623-8629.

KRYCH-GOLDBERG M, ATKINSON JP (2001): Structure-function relationships of complement receptor type 1. *Immunol Rev* 180:112-122.

LACROIX M, ROSSI V, GABORIAUD C, CHEVALLIER S, JAQUINOD M, THIELENS NM, GAGNON J, ARLAUD GJ (1997): Structure and assembly of the catalytic region of human complement protease C1r: a three-dimensional model based on chemical cross-linking and homology modeling. *Biochemistry* 36(21):6270-6282.

LEFEVRE JF, DAYIE KT, PENG JW, WAGNER G (1996): Internal mobility in the partially folded DNA binding and dimerization domains of GAL4: NMR analysis of the N-H spectral density functions. *Biochemistry* 35(8):2674-2686.

LEHTINEN MJ, MERI S, JOKIRANTA TS (2004): Interdomain contact regions and angles between adjacent short consensus repeat domains. *J Mol Biol* 344(5):1385-1396.

LEVITT MH (2008): *Spin Dynamics: Basics of nuclear magnetic resonance*. 2nd Ed. Wiley, New York.

LINGE JP, HABECK M, RIEPING W, NILGES M (2003): ARIA: automated NOE assignment and NMR structure calculation. *Bioinformatics* 19(2):315-316.

LIPARI G, SZABO A (1982A): Model-free approach to the interpretation of nuclear magnetic resonance relaxation in macromolecules. 1. Theory and range of validity. *J Am Chem Soc* 104(17):4546-4559.

LIPARI G, SZABO A (1982B): Model-free approach to the interpretation of nuclear magnetic resonance relaxation in macromolecules. 2. Analysis of experimental results, *J Am Chem Soc* 104(17):4559-4570.

LIU T, QIAN WJ, GRITSENKO MA, CAMP DG 2ND, MONROE ME, MOORE RJ, SMITH RD (2005): Human plasma N-glycoproteome analysis by immunoaffinity subtraction, hydrazide chemistry, and mass spectrometry. *J Proteome Res* 4(6):2070-2080.

MAJOR B, KARDOS J, KÉKESI KA, LORINCZ Z, ZÁVODSZKY P, GÁL P (2010): Calcium-dependent conformational flexibility of a CUB domain controls activation of the complement serine protease C1r. *J Biol Chem* 285(16):11863-11869.

MANDEL AM, AKKE M, PALMER AG 3RD (1995): Backbone dynamics of Escherichia coli ribonuclease HI: correlations with structure and function in an active enzyme. *J Mol Biol* 246(1):144-163.

MARK L, LEE WH, SPILLER OB, VILLOUTREIX BO, BLOM AM (2006): The Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus complement control protein (KCP) binds to heparin and cell surfaces via positively charged amino acids in CCP1-2. *Mol Immunol* 43(10):1665-1675.

MUHANDIRAM DR, KAY LE (1994): Gradient-enhanced triple-resonance three-dimensional NMR experiments with improved sensitivity. *J Mag Reson B* 103(3):203-216.

MULDER FA, SCHIPPER D, BOTT R, BOELENS R (1999): Altered flexibility in the substrate-binding site of related native and engineered high-alkaline *Bacillus subtilis*ins. *J Mol Biol* 292(1):111-123.

NACCESS is (c) S. Hubbard and J. Thornton 1992-6

NANICHE D, VARIOR-KRISHNAN G, CERVONI F, WILD TF, ROSSI B, RABOURDIN-COMBE C, GERLIER D (1993): Human membrane cofactor protein (CD46) acts as a cellular receptor for measles virus. *J Virol* 67(10):6025-6032.

NÁRAY-SZABÓ G (FŐSZERK.) (2006): Kémia. Akadémiai Kiadó, Budapest.

NORMAN DG, BARLOW PN, BARON M, DAY AJ, SIM RB, CAMPBELL ID (1991): Three-dimensional structure of a complement control protein module in solution. *J Mol Biol* 219(4):717-725.

O'LEARY JM, BROMEK K, BLACK GM, UHRINOVA S, SCHMITZ C, WANG X, KRYCH M, ATKINSON JP, UHRIN D, BARLOW PN (2004): Backbone dynamics of complement control protein (CCP) modules reveals mobility in binding surfaces. *Protein Sci* 13(5):1238-1250.

OREKHOV VY, NOLDE DE, GOLOVANOV AP, KORZHNEV DM, ARSENIYEV AS (1995): Processing of heteronuclear NMR relaxation data with the new software DASHA. *Appl Magn Reson* 9(4):581-588.

ÖSAPAY K, CASE DA (1994): Analysis of proton chemical shifts in regular secondary structure of proteins. *J Biomol NMR* 4(2):215-230.

PAIDASSI H, TACNET-DELORME P, GARLATTI V, DARNAULT C, GHEBREHIWET B, GABORIAUD C, ARLAUD GJ, FRACHET P (2008): C1q binds phosphatidylserine and likely acts as a multiligand-bridging molecule in apoptotic cell recognition. *J Immunol* 180(4):2329-2338.

- PARDI A, WAGNER G, WÜTHRICH K (1983): Protein conformation and proton nuclear-magnetic-resonance chemical shifts. *Eur J Biochem* 137(3):445-454.
- PARDI A, BILLETER M, WÜTHRICH K (1984): Calibration of the angular dependence of the amide proton- C^{α} proton coupling constants, ${}^3J_{\text{HN}^{\alpha}}$, in a globular protein. Use of ${}^3J_{\text{HN}^{\alpha}}$ for identification of helical secondary structure. *J Mol Biol* 180(3):741-751.
- PATTHY L (1987): Detecting homology of distantly related proteins with consensus sequences. *J Mol Biol* 198(4):567-577.
- PENG JW, WAGNER G (1992): Mapping of the spectral densities of N-H bond motions in eglin C using heteronuclear relaxation experiments. *Biochemistry* 31(36):8571-8586.
- PENG JW, WAGNER G (1994): Investigation of protein motions via relaxation measurements. *Methods Enzymol* 239:563-596.
- PENG JW, WAGNER G (1995): Frequency spectrum of NH bonds in eglin C from spectral density mapping at multiple fields. *Biochemistry* 34(51):16733-16752.
- PERKINS SJ, SMITH KF (1993): Identity of the putative serine-proteinase fold in proteins of the complement system with nine relevant crystal structures. *Biochem J* 295 (Pt 1):109-114.
- PROTA AE, SAGE DR, STEHLE T, FINGEROTH JD (2002): The crystal structure of human CD21: Implications for Epstein-Barr virus and C3d binding. *Proc Natl Acad Sci USA* 99(16):10641-10646.
- PUNTERVOLL P, LINDING R, GEMÜND C, CHABANIS-DAVIDSON S, MATTINGSDAL M, CAMERON S, MARTIN DM, AUSIELLO G, BRANNETTI B, COSTANTINI A, FERRÈ F, MASELLI V, VIA A, CESARENI G, DIELLA F, SUPERTI-FURGA G, WYRWICZ L, RAMU C, MCGUIGAN C, GUDAVALLI R, LETUNIC I, BORK P, RYCHLEWSKI L, KÜSTER B, HELMER-CITTERICH M, HUNTER WN, AASLAND R, GIBSON TJ (2003): ELM server: A new resource for investigating short functional sites in modular eukaryotic proteins. *Nucleic Acids Res* 31(13):3625-3630.
- RAWLINGS ND, BARRETT AJ (1993): Evolutionary families of peptidases. *Biochem J* 290 (Pt1):205-218.
- REID KB, PORTER RR (1976A): Subunit composition and structure of subcomponent C1q of the first component of human complement. *Biochem J* 155(1):19-23.
- REID KB (1974): A collagen-like amino acid sequence in a polypeptide chain of human C1q (a subcomponent of the first component of complement). *Biochem J* 141(1):189-203.
- REID KB (1976B): Isolation, by partial pepsin digestion, of the three collagen-like regions present in subcomponent C1q of the first component of human complement. *Biochem J* 155(1):5-17.
- REID KB (1977): Amino acid sequence of the N-terminal forty-two amino acid residues of the C chain of subcomponent C1q of the first component of human complement. *Biochem J* 161(2): 247-251.
- REID KBM, BENTLEY DR, CAMPBELL RD, CHUNG LP, SIM RB, KRISTENSEN T, TACK BF (1986): Complement system proteins which interact with C3b or C4b. A superfamily of structurally related proteins. *Immunology Today* 7(7-8):230-234.
- REID KB, DAY AJ (1989): Structure-function relationships of the complement components. *Immunology Today* 10(6):177-180.
- RICHARDSON JS, GETZOFF ED, RICHARDSON DC (1978): The β bulge: a common small unit of nonrepetitive protein structure. *Proc Natl Acad Sci USA* 75(6):2574-2578.

RICKERT M, WANG X, BOULANGER MJ, GORIATCHEVA N, GARCIA KC (2005): The structure of interleukin-2 complexed with its α receptor. *Science* 308(5727):1477-1480.

RODRÍGUEZ DE CÓRDOBA S, DÍAZ-GUILLÉN MA, HEINE-SUÑER D (1999): An integrated map of the human regulator of complement activation (RCA) gene cluster on 1q32. *Mol Immunol* 36(13-14):803-808.

ROSS SC, DENSEN P (1984): Complement deficiency states and infection: epidemiology, pathogenesis and consequences of neisserial and other infections in an immune deficiency. *Medicine (Baltimore)* 63(5):243-273.

ROSSI V, BALLY I, THIELENS NM, ESSER AF, ARLAUD GJ (1998): Baculovirus-mediated expression of truncated modular fragments from the catalytic region of human complement serine protease C1s. Evidence for the involvement of both complement control protein modules in the recognition of the C4 protein substrate. *J Biol Chem* 273(2):1232-1239.

ROSSI V, TEILLET F, THIELENS NM, BALLY I, ARLAUD GJ (2005): Functional characterization of complement proteases C1s/mannan-binding lectin-associated serine protease-2 (MASP-2) chimeras reveals the higher C4 recognition efficacy of the MASP-2 complement control protein modules. *J Biol Chem* 280(51):41811-41818.

SAMANTA U, PAL D, CHAKRABARTI P (1999): Packing of aromatic rings against tryptophan residues in proteins. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 55(Pt 8):1421-1427.

SAMANTA U, PAL D, CHAKRABARTI P (2000): Environment of tryptophan side chains in proteins. *Proteins* 38(3):288-300.

SCHMIDT CQ, HERBERT AP, HOCKING HG, UHRÍN D, BARLOW PN (2008A): Translational mini-review series on complement factor H: structural and functional correlations for factor H. *Clin Exp Immunol* 151(1):14-24.

SCHMIDT CQ, HERBERT AP, KAVANAGH D, GANDY C, FENTON CJ, BLAUM BS, LYON M, UHRÍN D, BARLOW PN (2008B): A new map of glycosaminoglycan and C3b binding sites on factor H. *J Immunol* 181(4):2610-2619.

SCHMIDT CQ, HERBERT AP, MERTENS HD, GUARIENTO M, SOARES DC, UHRIN D, ROWE AJ, SVERGUN DI, BARLOW PN (2010): The central portion of factor H (modules 10-15) is compact and contains a structurally deviant CCP module. *J Mol Biol* 395(1):105-122.

SCHWARZINGER S, KROON GJ, FOSS TR, CHUNG J, WRIGHT PE, DYSON HJ (2001): Sequence-dependent correction of random coil NMR chemical shifts. *J Am Chem Soc* 123(13):2970-2978.

SIM RB, LAICH A (2000): Serine proteases of the complement system. *Biochem Soc Trans* 28(5):545-550.

SIM RB, TSIFTSOGLU SA (2004): Proteases of the complement system. *Biochem Soc Trans Biochem Soc Trans*. 32(Pt 1):21-27.

SMITH BO, MALLIN RL, KRYCH-GOLDBERG M, WANG X, HAUHART RE, BROMEK K, UHRIN D, ATKINSON JP, BARLOW PN (2002): Structure of the C3b binding site of CR1 (CD35), the immune adherence receptor. *Cell* 108(6):769-780.

SMITH SA, MULLIN NP, PARKINSON J, SHCHELKUNOV SN, TOTMENIN AV, LOPAREV VN, SRISATJALUK R, REYNOLDS DN, KEELING KL, JUSTUS DE, BARLOW PN, KOTWAL GJ (2000): Conserved surface-exposed K/R-X-K/R motifs and net positive charge on poxvirus complement control proteins serve as putative heparin binding sites and contribute to

inhibition of molecular interactions with human endothelial cells: a novel mechanism for evasion of host defense. *J Virol* 74(12):5659-5666.

SOARES DC, GERLOFF DL, SYME NR, COULSON AF, PARKINSON J, BARLOW PN (2005): Large-scale modelling as a route to multiple surface comparisons of the CCP module family. *Protein Eng Des Sel* 18(8):379-388.

SOHÁR P (1976): *Mágneses magrezonancia-spektroszkópia*. Akadémiai Kiadó, Budapest.

SPILLER OB, MARK L, BLUE CE, PROCTOR DG, AITKEN JA, BLOM AM, BLACKBOURN DJ (2006): Dissecting the regions of virion-associated Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus complement control protein required for complement regulation and cell binding. *J Virol* 80(8):4068-4078.

STAUNTON D, OWEN J, CAMPBELL ID (2003): NMR and structural genomics. *Acc Chem Res* 36(3):207-214.

STRANG CJ, SIEGEL RC, PHILLIPS ML, POON PH, SCHUMAKER VN (1982): Ultrastructure of the first component of human complement: electron microscopy of the crosslinked complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 79(2):586-590.

TEILLET F, GABORIAUD C, LACROIX M, MARTIN L, ARLAUD GJ, THIELENS NM (2008): Crystal structure of the CUB1-EGF-CUB2 domain of human MASP-1/3 and identification of its interaction sites with mannan-binding lectin and ficolins. *J Biol Chem* 283(37):25715-25724.

THIELENS NM, AUDE CA, LACROIX MB, GAGNON J, ARLAUD GJ (1990): Ca^{2+} binding properties and Ca^{2+} -dependent interactions of the isolated NH_2 -terminal α fragments of human complement proteases C1-r and C1-s. *J Biol Chem* 265(24):14469-14475.

TSCHOPP J, VILLIGER W, FUCHS H, KILCHHERR E, ENGEL J (1980): Assembly of subcomponents C1r and C1s of first component of complement: electron microscopic and ultracentrifugal studies. *Proc Natl Acad Sci USA* 77(12):7014-7018.

UHRINOVA S, LIN F, BALL G, BROMEK K, UHRIN D, MEDOF ME, BARLOW PN (2003): Solution structure of a functionally active fragment of decay-accelerating factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 100(8):4718-4723.

YAMAZAKI T, LEE W, REVINGTON M, MATTIELLO DL, DAHLQUIST FW, ARROWSMITH CH, KAY LE (1994): An HNCA pulse scheme for the backbone assignment of ^{15}N , ^{13}C , ^2H -labeled proteins: application to a 37-kDa Trp repressor-DNA complex. *J Am Chem Soc* 116(14):6464-6465.

VAYNBERG J, FUKUDA T, CHEN K, VINOGRADOVA O, VELYVIS A, TU Y, NG L, WU C, QIN J (2005): Structure of an ultraweak protein-protein complex and its crucial role in regulation of cell morphology and motility. *Mol Cell* 17(4):513-523.

VAYNBERG J, QIN J (2006): Weak protein-protein interactions as probed by NMR spectroscopy. *Trends Biotechnol* 24(1):22-27.

VILLIERS CL, ARLAUD GJ, COLOMB MG (1983): Autoactivation of human complement subcomponent C1r involves structural changes reflected in modifications of intrinsic fluorescence, circular dichroism and reactivity with monoclonal antibodies. *Biochem J* 215(2):369-375.

VILLIERS CL, ARLAUD GJ, COLOMB MG (1985): Domain structure and associated functions of subcomponents C1r and C1s of the first component of human complement. *Proc Natl Acad Sci USA* 82(13):4477-4481.

- WISHART DS, SYKES BD, RICHARDS FM (1991): Relationship between nuclear magnetic resonance chemical shift and protein secondary structure. *J Mol Biol* 222(2):311-333.
- WISHART DS, SYKES BD, RICHARDS FM (1992): The chemical shift index: a fast and simple method for the assignment of protein secondary structure through NMR spectroscopy. *Biochemistry* 31(6):1647-1651.
- WILLIAMSON MP (1990): Secondary-structure dependent chemical shifts in proteins. *Biopolymers* 29(10-11):1423-1431.
- WOUTERS MA, RIGOUTSOS I, CHU CK, FENG LL, SPARROW DB, DUNWOODIE SL (2005): Evolution of distinct EGF domains with specific functions. *Protein Sci* 14(4):1091-1103.
- WÜTHRICH K (1986): *NMR of proteins and nucleic acids*. Wiley, New York.
- ZICCARDI RJ (1984): The role of immune complexes in the activation of the first component of human complement. *J Immunol* 132(1):283-288.
- ZIPFEL PF, SKERKA C, HELLWAGE J, JOKIRANTA ST, MERI S, BRADE V, KRAICZY P, NORIS M, REMUZZI G (2002): Factor H family proteins: on complement, microbes and human diseases. *Biochem Soc Trans* 30(Pt 6):971-978.
- ZUIDERWEG ER (2002): Mapping protein-protein interactions in solution by NMR spectroscopy. *Biochemistry* 41(1):1-7.

A CD melléklet tartalma

- A modulok NMR-eltolódás adatai.
- A modulok relaxációs, dinamikai és spektrális sűrűség-függvény adatai.
- NACCESS futtatások eredményei.
- HadDock bemeneti paraméterek és a kimeneti adatai.
- A HadDock komplex és az illesztett γ_B dimer szerkezetek.
- HydroPro kimeneti adatok.

Kivonat

A komplementrendszer szabályozott aktivációja fontos szerepet játszik a kórokozókkal szembeni védekezésben. A három útvonal közül a klasszikus aktivációja a C1r moduláris felépítésű proteáz révén valósul meg. A proteolitikus aktiváció a heteropentamer C1 komplexben megy végbe, valószínűleg alegységek közötti nagymértékű átrendeződés révén, mely a komplex intra- és intermolekuláris kapcsolatrendszeren belül erősen szabályozott.

A két emberi C1r komplement kontroll modul (CCP1 és CCP2) sikeres előállítását magányos és tandem elrendezésben lehetőséget teremtett azok oldatfázisú szerkezeti, konformációs dinamikai és kooperációs viselkedésének vizsgálatára. A másodlagos és harmadlagos szerkezetek elemzése NMR jelszórás és másodlagos ^2H kémiai eltolódás vizsgálatokkal jó egyezést mutatott a meglévő kristályszerkezetekkel (1gpz and 2qy0). A CCP2-vel ellentétben a CCP1 és a CCP1-CCP2 sikeres kifejezése heterológ rendszerben a megelőző CUB2 modul kovalens jelenlétét igényelte, ami utal, hogy a CCP1 a CCP2-nél kevésbé stabil, és a CUB2-CCP1 kölcsönható felszín szerkezeti fontosságát mutatja. A két konstrukció stabil formában maradt a CUB2 eltávolítása után is. A modulok, különösen a CCP1 a C-terminális CCP2 jelenlétében, belső mozgékonyasága és a kölcsönható felszín kémiai eltolódás-változása jellegzetes eltérést mutatott és fontos dinamikai kapcsolatra utalt a két CCP modul között. Ezek az NMR adatok azt mutatják, hogy a CCP1 feltekeredése, stabilitása és dinamikája erősen függ a szomszédos modulok jelenlététől a teljes C1r-ben. Mindezek miatt a CCP1 központi kölcsönható pont lehet, mely a szomszédos modulok felé információ-átadásra képes.

A magányos CCP1 és CCP2 titrálásának NMR-eredményei a két modul közötti kölcsönható felszín mutatták, ami eltér a modulpárban meghatározott intermoduláris felszíntől. Fehérje-fehérje dokkolással modellezett komplexek szerkezeti illesztését elvégezve a teljes katalitikus fragmentumra néhány új dimer orientációt mutattam ki. Ezek közül a legvalószínűbb elrendeződésnek az antiparalel dimer adódott, mely kis konformációs átalakulás mellett létrejöhet a zimogén kristályszerkezetből (1gpz). A monomerek közötti gyenge, de kölcsönös CCP1:CCP2 kapcsolódási felszín miatt az új dimerszerkezet még elfogadhatóbb. A modellezett szerkezet a C1r egyik funkcionális állapotát mutathatja.

Abstract

The regulated activation of complement system plays an important role in defense against pathogens. Of its three pathways, classical complement is activated at the first protease, the modular C1r protein. The proteolytic activation is realized in the heteropentameric C1 complex, possibly accompanied by major inter-subunit re-arrangements requires targeted regulation of flexibility within the context of the intramolecular and inter-molecular interaction networks of the complex.

Preparation of the two complement control protein (CCP) modules, CCP1 and CCP2, from human C1r in their free form, as well as their tandem-linked construct, CCP1-CCP2 was successfully achieved and their solution structure, conformational dynamics and cooperativity were studied. The secondary and tertiary structures of the modules were in good agreement with the available crystal structures (1gpz and 2qy0) derived from NMR signal dispersion and secondary ^1H chemical shifts analysis. Unlike free CCP2, successful heterologous expression of both the single CCP1 module and the CCP1-CCP2 constructs required the attachment of the preceding N-terminal module, CUB2, indicated that CCP1 is less stable than CCP2 and highlights the structural importance of a CUB2-CCP1 interface. These two constructs found to be stable after removing CUB2. Internal mobility of the modules, especially that of CCP1, exhibited considerable changes accompanied by interfacial chemical shift alterations upon the attachment of the C-terminal CCP2 domain and indicated important dynamic communication between the two CCP modules. These NMR data suggest that in terms of folding, stability and dynamics, CCP1 is heavily dependent on the presence of its neighboring modules in intact C1r. Therefore, CCP1 could be a focal interaction point, capable of transmitting information towards its neighboring modules.

Free CCP1 and CCP2 NMR-titration experiments indicated a contact surface between the two modules, which is clearly distinct from that of identified in CCP1-CCP2. Complexes modeled by module-module docking were aligned to the full catalytic fragment and a few novel dimer orientations were invoked. The most plausible orientation of these, is the antiparallel one, where little conformational rearrangement is required from the zymogen crystal structure (1gpz). By the weak but mutual contact between CCP1:CCP2 interface of each monomer, the novel dimer structure is more plausible. The modeled structure may represent a functional state of C1r.