

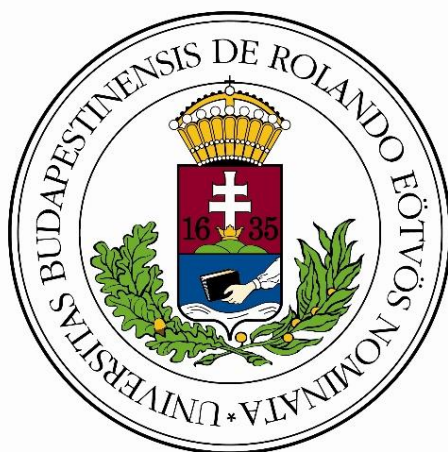
# **A tumormetasztázisban szerepet játszó néhány fehérje vizsgálata NMR spektroszkópiával**

Doktori (Ph.D.) értekezés

**Pálfy Gyula**

okleveles vegyész

**Témavezető:** Dr. Bodor Andrea, egyetemi docens



**Hevesy György Kémiai Doktori Iskola**

Vezetője: Dr. Császár Attila, egyetemi tanár

**Szintetikus kémia, biomolekuláris kémia program**

Programvezető: Dr. Perczel András, egyetemi tanár

Eötvös Loránd Tudományegyetem

Természettudományi Kar, Kémiai Intézet

Szerkezeti Kémia és Biológia Laboratórium

Budapest, 2019

# Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék .....	2
Köszönetnyilvánítás.....	3
Az értekezés alapjául szolgáló közlemények .....	5
Rövidítésjegyzék.....	6
1. Bevezetés .....	7
2. A vizsgált biológiai rendszerek bemutatása .....	8
2.1. Az S100A4 fehérje és kötőpartnerei.....	8
2.2 A nemizom-miozin fehérjék filamentumképződésének szabályozása .....	13
3. Célkitűzések.....	18
4. NMR spektroszkópia a biológiai kérdések szolgálatában .....	19
4.1. Elméleti háttér.....	19
4.2. Kísérletek .....	29
5. Kiegészítő módszerek.....	36
5.1. Tömegspektrometria .....	36
5.2. Elektronikus cirkuláris dikroizmus spektroszkópia.....	38
6. Az S100A4 és komplexeinek vizsgálata.....	41
6.1. Az S100A4 és a nemizom IIA komplexe .....	41
6.2. Az S100A4 ezrinnel alkotott komplexe.....	57
6.3. Az S100A4 és a p53TAD komplexe .....	63
7. A nemizom-miozin II fragmenseinek vizsgálata.....	77
7.1. A foszforiláció hatásai .....	77
7.2. A coiled coil szerkezet.....	90
8. Az eredmények értékelése .....	101
9. Kivonat .....	104
10. Abstract.....	105
11. Irodalomjegyzék .....	106

## Köszönetnyilvánítás

Mindenekelőtt a Mindenható Teremtő Istennek és Fiának, Jézus Krisztusnak szeretném megköszönni életemet, és hogy megtartott mindeddig (és meg fog ezután is!) egészségben és épségben. Köszönöm, hogy adott képességeket és erőt tanulmányozni az Általa alkotott Világmindenség elveit és felépítését, és emellett sok kézzel fogható segítségét is kaptam Tőle többször a doktori képzés éve alatt. Neki adok hálát a következőkben felsorolt személyekért is, hogy összehozott velük, hiszen nélkülük ez a doktori munka nem készült volna el.

Köszönöm témavezetőmnek, Dr. Bodor Andreának, hogy vele dolgozhattam több éven keresztül ezeken a kutatási projekteken. Hálámat szeretném kifejezni mindazért, amit Tőle tanultam szakmailag és emberileg mind az NMR spektroszkópia elmélete és gyakorlata, mind a tudományos lét és abban való forgolódás, kommunikáció területén. Különösen köszönöm, hogy kitartásra és türelemre ösztönzött a doktori évek alatt. Még az is lehet, hogy időnként a velem való foglalkozás az ő türelmét is megpróbálta, sőt megedzette. De köszönöm, hogy nem adta fel!

Köszönöm közvetlen munkatársaimnak, hogy együtt dolgozhattam velük az itt vázolt kutatásokban, különösen biológus kooperációs partnereinknek, Dr. Nyitray Lászlónak, az ELTE Biokémiai Tanszék vezetőjének, valamint kutatócsoportja több tagjának, Ecsédi Péternek, Dr. Kiss Bencének és Dr. Biri-Kovács Beátának. A közös publikációk nélkülük nem születhettek volna meg, nekik köszönhetem a biológiai háttérismereteket, szemléletmódot, a legtöbb fehérje termelését, amelyet a mérésekhez használtam, valamint Bencének és Petinek a fehérje expresszió és tisztítás módszertanába való bevezetést.

Hálás vagyok kutatócsoportunk, az ELTE Szerkezeti Kémia és Biológia Laboratórium több tagjával való együttműködésért és segítségükért. Hálámat szeretném kifejezni ezúton Földesné Dudás Erikának és dr. Sebák Fanninak a p53-projektben tőlük kapott asszignációkért, Dr. Karancsiné Dr. Menyhárd Dórának ugyanebben a kutatásban tőle kapott molekuladinamikai szimulációs sokaságokért. Köszönöm Dr. Farkas Viktornak az ECD spektroszkópia terén nyújtott elméleti és gyakorlati oktatását és javaslatait, valamint Taricska Nórának ugyanezen a téren adott gyakorlati segítségét. A csoport korábbi tagjaitól is sokat tanulhattam az NMR spektroszkópiái mérések és adatértékelések terén: köszönöm Dr. Rovó Petrának és Dr. Láng Andrásnak mindezt. Köszönöm a munkatársaknak, akikkel egy irodában dolgoztam a doktori évek alatt az együtt békében, sőt mondhatom, kellemes hangulatban eltöltött időt: Goldschmidtne Gőz Viktóriának, Nagy Adriennek, dr. Sebák Fanninak és Taricska Nórának. Köszönöm Dr. Jákli Imrének az informatikai téren nyújtott rendszeres segítségét és Dr. Harmat Veronikának a röntgenszerkezetek értelmezésében adott segítségét. Köszönöm Vida István emberi támogatását és Fazekas Zsolttal való közös elmélkedést a coild coil szerkezetről. Végül hálás vagyok a csoport vezetőjének, Dr. Perczel Andrásnak, hogy lehetővé tette, hogy kutatócsoportjában

dolgozzak, továbbá köszönöm a nem is kevés személyes és inspiráló beszélgetéseket is. Köszönöm a csoport többi, itt fel nem sorolt tagjainak is támogatásukat, segítségüket.

Köszönöm Vácziné Dr. Schlosser Gittának a tömegspektrometriai méréseket és kiértékeléseket, valamint azt, hogy a vele együtt végzett munka során beleláthattam ebbe a másik területbe is. Hálás vagyok Dr. Horváth Gergőnek a FAST-Modelfree szoftver bemutatásáért és használatának megtanításáért. Köszönöm Dr. Gáspári Zoltánnak és Kovács Bertalannak a molekuladinamikai szimulációk értelmezésében és kipróbálásában adott segítségüket, továbbá velük együtt Dudola Dánielnek a CoNSEnsX+ webszerver használatának megtanítását.

Köszönöm továbbá az ELTE Kémiai Intézet oktatóinak, különös tekintettel a Szerves és Analitikai Kémiai Tanszék kollektívájának, valamint az MTA NMR Munkabizottság tagjainak a munkatársi segítséget, időnként ötleteket, beszélgetéseket, tanácsokat. Köszönöm a Hevesy György Kémiai Doktori Iskola vezetőjének, Dr. Császár Attilának és a Doktori Tanács régi és jelenlegi tagjainak a doktori iskola fenntartását és fejlesztését.

Köszönöm az Állami ösztöndíj anyagi támogatását, továbbá mind konferencia részvételekben, mind pedig az utolsó év ösztöndíjának finanszírozásában a Richter Gedeon Nyrt. Centenárium Alapítványnak, az Alapítvány a Magyar Peptid- és Fehérjekutatásért Alapítványnak, valamint a Pázmány-Eötvös Természettudományi Információs Alapítványnak. Külön köszönöm ez utóbbi vezetőjének, Dr. Medzihradzky Kálmán professzor úrnak emberi támogatását is.

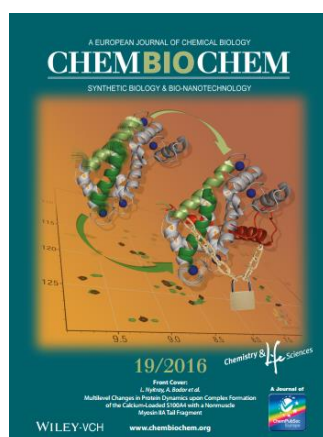
A doktori kutatás befejezése és a dolgozat megírása egyfajta korszak lezárása is, ezért hálámat szeretném kifejezni azok felé is, akiknek köszönhetően juthattam el idáig az életben. Elsőként Szüleimnek köszönöm, hogy felneveltek komoly alapot adva az élet oly sok területén, és most is mindig számíthatok rájuk. Ez egyáltalán nem természetes manapság! Köszönöm öcsémnek, Gergőnek és Jakabnak, hogy ők is mindig mellettem állnak. Nagyon hálás vagyok a barátaimért, sokat köszönhetek nekik is, különösen kiemelném Horváth Mátét, Dr. Vámos Lénárdot és Cserhádi Ádámot, akik az elmúlt éveken sokat segítettek emberileg és gyakorlati módon egyaránt. Köszönöm apai nagyszüleimnek személyes és anyagi támogatását. Végül pedig hadd emeljem ki, hogy hálás vagyok a gyülekezetemért, a Hit Gyülekezetéért, ahol felnőttem és ahova szellemi módon be lettem plántálva, köszönöm a testvéreimet az Úrban. Köszönöm a Gyülekezet alapítóinak és vezetőinek, Németh Sándornak és Juditnak a szellemi életben való példamutatásukat, kitartásukat és az inspirációt, amelyet akár szolgálatukból, akár a Velük való személyes beszélgetéseken keresztül kaptam. Ugyanígy hálás vagyok Dr. Ruff Tibor és Füzér Norbert lelkészek személyes tanácsaiért, a velük folytatott beszélgetésekért és inspirációt jelentő példájukért.

Budapest, 2019. február 19.

Pálfy Gyula

## Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

Pálfy Gyula, Kiss Bence, Nyitray László, Bodor Andrea (2016): Multilevel Changes in Protein Dynamics upon Complex Formation of the Calcium-Loaded S100A4 with a Nonmuscle Myosin IIA Tail Fragment, *Chembiochem*. **17(19)**, 1829-1838. (címlapra került)



Biri-Kovács Beáta, Kiss Bence, Vadászi Henrietta, Gógl Gergő, Pálfy Gyula, Török György, Homolya László, Bodor Andrea, Nyitray László (2017): Ezrin interacts with S100A4 via both its N- and C-terminal domains, *PLoS One* **12(5)**, e0177489.

Ecsédi Péter, Neil Billington, Pálfy Gyula, Gógl Gergő, Kiss Bence, Bulyáki Éva, Bodor Andrea, James R. Sellers, Nyitray László (2018): Multiple S100 protein isoforms and C-terminal phosphorylation contribute to the paralog-selective regulation of nonmuscle myosin 2 filaments, *J. Biol. Chem.* **293(38)**, 14850-14867.

## Rövidítésjegyzék

ACD	<i>assembly competence domain</i>
BEST	<i>Band-selective Excitation Short-Transient</i>
BMRB	<i>Biological Magnetic Resonance Data Bank</i>
CARA	<i>Computer Aided Resonance Assignment</i>
C-ERMAD	<i>C-terminal actin binding domain (ezrin)</i>
CK2	kazein kináz 2
DSS	2,2-dimetil-2-szilapentán-5-szulfonsav
ECD	elektronikus cirkuláris dikroizmus
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
IDP	<i>intrinsically disordered protein</i>
IPTG	izopropil- $\beta$ -D-1-tiogalaktopiranozid
ITC	izotermális titrációs kalorimetria
MD-szimuláció	molekuladinamikai szimuláció
MES	2-(N-morfolino)-etánszulfonsav
MS	tömegspektrometria
N-ERMAD	<i>N-terminal ERM domain (ezrin)</i>
NMIIA/B/C	nemizom-miozin IIA/B/C fehérje
NOE	<i>nuclear Overhauser effect</i>
NOESY	<i>Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy</i>
SCS	másodlagos kémiai eltolódás
SOFAST-HMQC	<i>Band-Selective Optimized Flip Angle Short Transient Heteronuclear Multiple Quatum Coherence</i>
TAD	transzaktivációs domén (p53)
TCEP	trisz-(2-karboxietil)-foszfin-hidroklorid
TOCSY	<i>T</i> <i>O</i> <i>t</i> <i>a</i> <i>l</i> <i>C</i> <i>o</i> <i>r</i> <i>r</i> <i>e</i> <i>l</i> <i>a</i> <i>t</i> <i>i</i> <i>o</i> <i>n</i> <i>S</i> <i>p</i> <i>e</i> <i>c</i> <i>t</i> <i>r</i> <i>o</i> <i>s</i> <i>c</i> <i>o</i> <i>p</i> <i>y</i>

# 1. Bevezetés

A rák korunk egyik vezető haláloka, különösen a világ nyugati felén. A tumoros elváltozás ugyan mindenképpen veszélyes, de különösen akkor, ha áttétet képez. A tumormetasztázis során ugyanis a rosszindulatú daganat sejtjei elvándorolnak keletkezési helyükről és a szervezet egészen más részeiben okozhatnak újabb tumoros elváltozásokat, így nagyon nehezen állítható meg ebben a stádiumban a betegség, sőt az esetek nagy részében halálos kimenetelűvé válik. Éppen emiatt nemcsak a rák kialakulását és működését fontos tanulmányozni, hanem a metasztázis mechanizmusát is, hogy az alap kutatás eredményei elősegíthessék a gyógyszerfejlesztést.

A tumormetasztázis kialakulásának egyik kezdő lépése a sejtek helyhez kötöttségéért felelős sejtvázas fellazulása, majd felbomlása. E folyamatban játszik fontos szerepet a közepes méretű,  $\text{Ca}^{2+}$ -kötő homodimer fehérje, az S100A4. Az utóbbi évtizedekben egyre nagyobb hangsúly került ennek kutatására, miután több módon is bizonyították, hogy nagyobb mennyisége a rákos sejtekben előidézi a tumormetasztázis kialakulását. A sejtvázas fehérjéi, többek között a nemizom-miozin II fehérjék viszont már régóta ismertek, ugyanakkor az áttét szempontjából a filamentumképző és annak szétesését szabályozó mechanizmusok megismerése is egyre fontosabbá válik az előbb említett okok miatt.

Doktori munkám során ezért az S100A4 és a nemizom-miozin II fehérjéket, illetve ezek néhány jelentős kölcsönhatását, szerkezeti-dinamikai tulajdonságait vizsgáltam a metasztázis kialakulása szempontjából. Ehhez elsősorban egy rendkívül sokoldalú módszert, az NMR spektroszkópiát használtam. Az elmúlt évtizedekben az NMR spektroszkópia az egyik alapvető atomi felbontású információt szolgáltató módszerré fejlődött a biokémiában, így doktori munkám ennek széleskörű felhasználását is jól bemutatja. Több korszerű módszer használata mellett különösen nagy hangsúlyt tettem a vizsgált kérdések során a dinamikai megközelítésekre, amelyben az NMR spektroszkópia egyedülállóan részletes kísérleti vizsgálatokat tesz lehetővé. Minden módszer használatának azonban megvan a maga korlátja, így sok esetben több metodika együttes alkalmazása vezet a kérdéseink megválaszolásához. Épp emiatt az általam vizsgált kérdések esetében az NMR spektroszkópia mellett az ECD spektroszkópiát és a tömegspektrometriát is alkalmaztam kiegészítő módszerként.

Témavezetőmmel és munkatársaimmal végzett kutatásaink során ezek segítségével olyan kérdéseket érintettünk, mint a fehérje-fehérje interakciónak, a rendezetlen fehérjék rendezett alakulásának, az erős és gyengébb komplexek összevetésének, a foszforilációnak, valamint a coiled coil szerkezeti elem speciális tulajdonságainak szerkezeti és dinamikai vonatkozásai.

## 2. A vizsgált biológiai rendszerek bemutatása

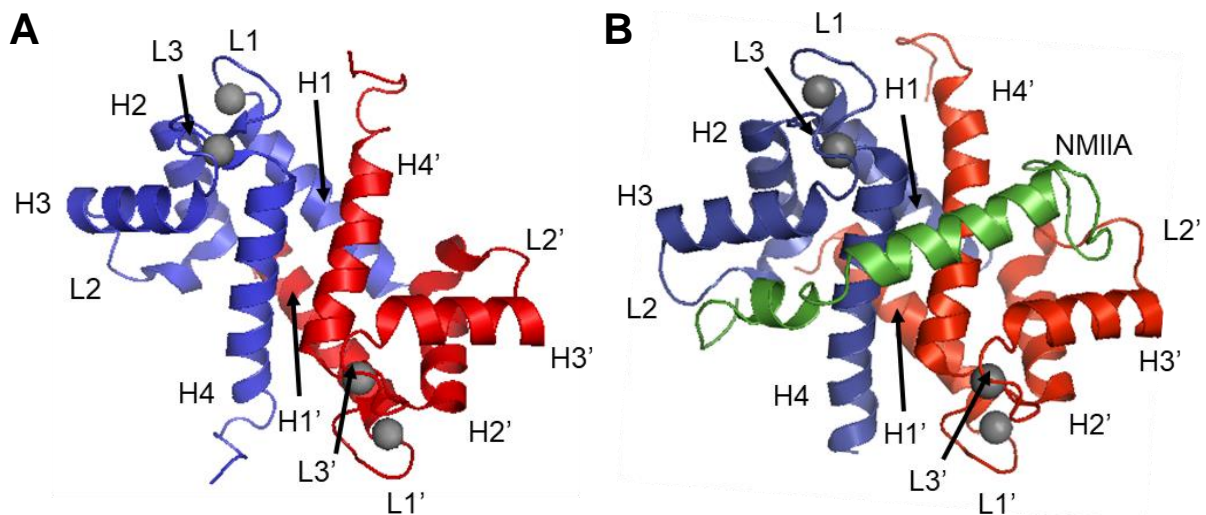
### 2.1. Az S100A4 fehérje és kötőpartnerei

Az S100 fehérjecsald tagjai csak gerincesekben előforduló  $\text{Ca}^{2+}$ -kötő kisméretű (10-12 kDa tömegű) fehérjék, amelyek szekvenciája egymáshoz igen hasonló. Nevüket onnan kapták, hogy oldhatók telített ammónium-szulfát-oldatban (Moore 1965). Szerepet játszanak olyan folyamatokban, mint a sejtciklus-szabályozás, fehérjefoszforiláció, sejtnövekedés, sejtmozgás, differenciálódás, a sejtvezetési dinamikus egyensúlyának szabályozása, gyulladás és a  $\text{Ca}^{2+}$ -homeosztázis (Donato 2001, Donato 2003). Biológiai szerepüket molekuláris szinten  $\text{Ca}^{2+}$ -függő fehérje-fehérje kölcsönhatásokon keresztül töltik be. A család több tagja különböző típusú és stádiumú tumoros megbetegedésben patológias jelentőségű: a tumormetasztázisban fontos szerepet betöltő S100A4 fehérjén kívül például az S100A6, S100A7 és S100B fehérjéknek is fokozott expressziós szintjét találták tumoros sejtekben (Emberley 2004). Emiatt az S100 fehérjék potenciális terápiás célpontokká váltak az utóbbi időben (Bresnick 2018). A legtöbb S100 fehérje homodimer formában fordul elő, amelyekben az alegységeket másodrendű kötések tartják össze. Egy-egy monomer két úgynevezett EF-kéz (hélix-hurok-hélix) motívumot tartalmaz, amelyek egy-egy  $\text{Ca}^{2+}$  iont tudnak megkötni. Ez azt jelenti, hogy egy homodimer összesen négy  $\text{Ca}^{2+}$  megkötésére képes (Marenholz 2004, Bresnick 2015).

E család egyik kiemelt jelentőségű tagja az S100A4 (más nevein Mts1, metasztazin, kalvaszkulin, p9Ka, 18A2, pEL98, Fsp-1 és CAPL), amely egyaránt megtalálható a citoplazmában, a sejtmagban és az extracelluláris térben. Az elmúlt évtizedekben azért került a figyelem középpontjába, mert számos humán betegséggel, tumoráttétellel, reumás artritisszel és különböző fibrotikus betegségekkel hozható kapcsolatba (Boye 2010). Sok tanulmányban vizsgálták és bizonyították, hogy az S100A4 expressziós szintje és bizonyos tumoros sejt vonalak metasztázisra való hajlama korrelációt mutat, továbbá állatmodellekben egyértelműen kimutatták, hogy az S100A4 a tumormetasztázis kialakulásában szerepet játszik. Klinikai tanulmányok pedig arra mutattak rá, hogy az S100A4 expressziója az agresszív tumor egyik jelentős markere, amely sajnálatos módon alacsony túlélési rátával párosul (Davies 1993, Jenkinson 2004, Boye 2010, Lukanidin 2012, Mishra 2012, Huang 2012). Mindezek tükrében kétségtelenül fontos atomi szinten is jellemezni az S100A4 kölcsönhatásait különböző kötőpartnerekkel, és doktori munkám során én is ezen kutatásokba kapcsolódtam be.

Az S100A4 emberben és egérben előforduló változatát vizsgálták eddig. Mindkettő 101 aminosavból álló fehérje, és teljes oldatfázisú NMR-asszignációjuk ismert. A humán apo-típus,





**1. ábra:** Az S100A4 dimer térszerkezete és másodlagos szerkezeti elemei: (A) a szabad állapotban a 3CGA (Pathuri 2008) és (B) a nemizom-miozin IIA (NMIIA) kötőrégiójával komplexben a 3ZWH (Kiss 2012) PBD-szerkezeten ábrázolva. Kék színnel az A-lánc, piros színnel a B-lánc látható, a  $\text{Ca}^{2+}$  ionok szürke gömbök, zöld színnel az NMIIA-ból származó peptid (MPT). H1-H4 az  $\alpha$ -hélixek, L1-L3 a  $\beta$ -hurkok.

valamint az egér apo-típus és  $\text{Ca}^{2+}$ -kötött forma asszignációját a hagyományos 2D és 3D heteronukleáris spektrumok segítségével készítették el (Rustandi 2001, Dutta 2002a, Cox 2002).

Az apo- és a  $\text{Ca}^{2+}$ -kötött S100A4 térszerkezetét mind röntgendiffrakcióval, mind oldatfázisú NMR spektroszkópiával több ízben is meghatározták (Vallely 2002, Malashkevich 2008, Gingras 2008, Pathuri 2008, Cho 2015, Ramagopal 2013). Az S100 fehérjékre jellemző összes szerkezeti elem megtalálható benne: a pseudo-EF-kéz az N-terminális végén (ezt a H1 és H2  $\alpha$ -hélixek képezik, közöttük az L1  $\beta$ -hurokkal), majd az összekötő „csukló” régió (L2  $\beta$ -hurok), s végül a C-terminális végen a kanonikus EF-kéz motívum (H3 és H4  $\alpha$ -hélixek, amelyek között az L3  $\beta$ -hurok található). A másodlagos szerkezeti elemek az 1A. ábrán láthatók. A kanonikus EF-kéz motívum több  $\text{Ca}^{2+}$ -kötő fehérjében, például a jól ismert kalmodulinban is megtalálható (Babu 1988). A kanonikus és a pseudo-EF-kéz motívumok szerkezetükben jelentősen különböznek (Garrett 2006). A homodimer két alegységét az úgynevezett X-típusú négyláncú hélixköteg tartja össze (az X-típusú megnevezés a térbeli elrendezésre utal), amelyet mindkét monomerből a H1 és H4 hélixek alkotnak. Az apo forma zártabb szerkezetet alkot, míg a  $\text{Ca}^{2+}$  ionok bekötődése hatására nyitott konformáció jön létre (a H3 hélixek közel  $90^\circ$ -os elfordulása révén), amelyben az L2 hurok a H3 és H4 hélixek egyes részeivel egy hidrofób kötőzsebet alkot. A  $\text{Ca}^{2+}$ -kötés hatására bekövetkező térszerkezeti változást atomi szinten NMR spektroszkópiai úton, titrálós módszerrel követték (Dutta 2002b). A kötőpartnerek szinte kivétel nélkül a nyitott formához kötődnek és általában  $\alpha$ -hélix szerkezetet vesznek fel. A legismertebb kötőpartnerek: a sejtvezér fehérjék közül a nemizom-miozin IIA (Kriaievska 1994), szignálfehérjék közül

a liprin  $\beta 1$  (Kriajevska 2002), a p53 transzkripciós faktor (Grigorian 2001) és két sejtfelszínen található fehérje – a  $\text{Ca}^{2+}$ - és lipidkötő annexin A2 (Semov 2005, Ecsédi 2017), illetve a Tag7 (Dukhanina 2009).

Az S100A4 interakciója a nemizom-miozin IIA fehérje nehézláncával (továbbiakban NMIIA) feltehetőleg kulcsszerepet játszik a metasztatikus sejtek megnövekedett migrációs képességének kialakulásában (Bresnick 2015). Korábbi tanulmányok kimutatták, hogy az S100A4 gátolja a nemizom-miozin filamentumok képződését, és ezzel párhuzamosan elősegíti azok szétesését is (Li 2003, Garrett 2006). Az S100A4 az NMIIA filamentumokkal együtt a migráló sejtek vezető élén található és szabályozza az irányított mozgást az NMIIA-val való kölcsönhatás révén (Kim 2003, Li 2006). Az S100A4-NMIIA komplex röntgendiffrakcióval és NMR spektroszkópiával is meghatározott térszerkezete egyaránt rendelkezésre áll. A komplex jellegzetességei közé tartozik a nagy affinitás ( $K_d \approx 0,1$  nM) (Kiss 2012, Elliott 2012, Duelli 2014), illetve a 2:1 sztöchiometria, ami szokatlan aszimmetriára utal. Egyetlen NMIIA lánc kötődik be a két teljesen azonos hidrofób kötőzsebbe, ily módon a két monomer kémiai ekvivalenciája megszűnik (Ramagopal 2013, Kiss 2012, Elliott 2012, Duelli 2014). A komplex szerkezete az 1B. ábrán látható. Az NMIIA S100A4-et kötő peptidrégiója tartalmazza a coiled coil dimer C-terminális szakaszát és a rendezetlen, nemhelikális farokrégió egy részét (Kiss 2012, Elliott 2012) (erről részletesebben a 2.2. alfejezetben lesz szó).

Számos szerkezeti és dinamikai tanulmány foglalkozik az apo- és  $\text{Ca}^{2+}$ -kötött S100 fehérjékkel: gerincdinamikai adatok elérhetők az apo szerkezetű S100A1 (Zhukov 2008, Nowakowski 2011), S100A4 (Dutta 2008), S100A5 (Bertini 2009), S100A13 (Arnesano 2005), S100A14 (Bertini 2013), S100B (Inman 2001) és a  $\text{Ca}^{2+}$ -kötött S100A1 (Nowakowski 2013), S100A5 (Bertini 2009), S100B (Wright 2008a) fehérjék esetében. Ennek ellenére mindössze egy esetben vizsgálták részletesen a kölcsönható partner hatására bekövetkező dinamikai változásokat. Ez a kutatás a 12 aminosavas TRTK-peptid kötődését írja le az S100B fehérjéhez. Ebben az esetben nem „átkaroló komplex”, hanem 2:2 arányú komplex jön létre (Liriano 2012).

A kötőpartnerekkel való interakció és a  $\text{Ca}^{2+}$  ionok kötődése során bekövetkező szerkezeti és dinamikai változások értelmezése elengedhetetlen ahhoz, hogy megérthessük az S100 család szabályozó szerepét. A korábban felvetett „S100 dilemma” lényege ugyanis az, hogy a legtöbb S100 fehérje  $\text{Ca}^{2+}$ -kötés affinitása olyan kicsi szabad állapotban ( $K_d > 10$   $\mu\text{M}$ ), hogy nem tudnak elegendően telítődni ahhoz, hogy a  $\text{Ca}^{2+}$ -szignalizáció kapcsolójaként működjenek (Fanò 1995). Ezt a dilemmát az oldja fel, hogy az S100 fehérjék  $\text{Ca}^{2+}$ -affinitása jelentősen megnövekszik a kölcsönható partnerek jelenlétében, ahogyan ezt az S100A1, S100B és S100A4 esetében bizonyították (Dukhanina 1997, Markowitz 2005, Malashkevich 2008, Wright 2008b,

Zimmer 2010). Másrészt viszont a kis  $\text{Ca}^{2+}$ -affinitás miatt lehetséges az, hogy az S100 fehérjék nagyobb koncentrációban legyenek jelen a citoplazmában anélkül, hogy a szabad  $\text{Ca}^{2+}$  ionokat teljes mértékben megkötnék. Az NMIIA S100A4 fehérjéhez való szokatlanul erős kötődése a  $\text{Ca}^{2+}$ -affinitás nM-os nagyságrendűvé erősödését okozza a termodinamikai összefüggések értelmében. Ennek eredményeképpen a két fehérje képes interakcióba lépni még az alapvető intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  koncentráció mellett is, ami  $\mu\text{M}$ -os tartományba esik (Dukhanina 1997, Badyal 2011, Elliott 2012). Kérdéses maradt, hogy a  $\text{Ca}^{2+}$ -affinitás növekedését magyarázhatja-e szerkezeti vagy dinamikai, esetleg mindkét szintű változás az S100A4-NMIIA komplexben a szabad  $\text{Ca}^{2+}$ -kötött S100A4-hez képest – hasonlóan az S100B TRTK-val képzett komplexéhez. Emiatt az S100A4-NMIIA komplex képződésének hatására bekövetkező szerkezeti-dinamikai változások elemzésének és az okok megértésének nagy jelentősége van, mégsem vizsgálták ezt korábban.

Az S100A4 mellett a metasztázis egy másik fontos szereplője az ezrin. Kimutatták, hogy a tumoros sejtek inváziójában és a metasztázisban egyaránt szerepet játszik (Clucas 2014). Az ezrin a sejtadhézió, a sejt migráció és a sejt növekedés folyamataiban is részt vesz, feladata a sejt plazma és a sejt váz összekötése (Neisch 2011). Az ezrin az ERM nevű fehérjecsaládhoz tartozik (a radixin és moezin fehérjékkel együtt), és három nagyobb doménből áll: a közel 300 aminosav hosszú N-terminális ERM-doménből, az N-ERMAD-ból – ez három nagyobb leányt tartalmaz (nevük: F1, F2 és F3) –, az ezt követő  $\alpha$ -helikális linker régióból, mely közel 160 aminosavból áll, és végül a 200 aminosav hosszú C-terminális rendezetlen C-ERMAD szakaszból. Korábban kimutatták, hogy az ezrin kötődik az egyik S100 családdal tartozó fehérjéhez, az S100P-hez (Koltzcher 2003, Austermann 2008) – de hogy kötődhet-e az S100A4-hez is, azt eddig még nem vizsgálták.

Az S100A4 egy másik interakciós partnere a tumorszupresszor tulajdonságú p53 fehérje (Grigorian 2001), amelyet a „genom őrzőjének” is szoktak nevezni (Lane 1992). A DNS sérülése esetén fokozódik működése, és transzkripciós faktor lévén a DNS-javító fehérjék átíródását serkenti, emellett leállítja a sejt ciklust, és végszükségben apoptózist indít el. Ily módon képes akadályozni a tumoros elváltozás kialakulását (Böhlig 2011). Mivel a rosszindulatú daganatok több mint 50%-ában kimutatható e fehérje mutációja és ebből következő csökkent vagy hibás működése, a rákkutatás egyik fontos célpontja is (Soussi 2000). Az S100 család több tagja, így az S100A1, S100A2, S100A4, S100A6 és S100B kötődik a p53-hoz megakadályozva annak DNS-hez kötődését és így a védelmi funkcióját (van Dieck 2009). Az S100A4 interakciója a p53-mal tehát végeredményben a tumoros sejtek túlélését segítheti elő (Orre 2013).

A p53 393 aminosav hosszúságú, részben rendezetlen szerkezetű, tetramerizációra képes

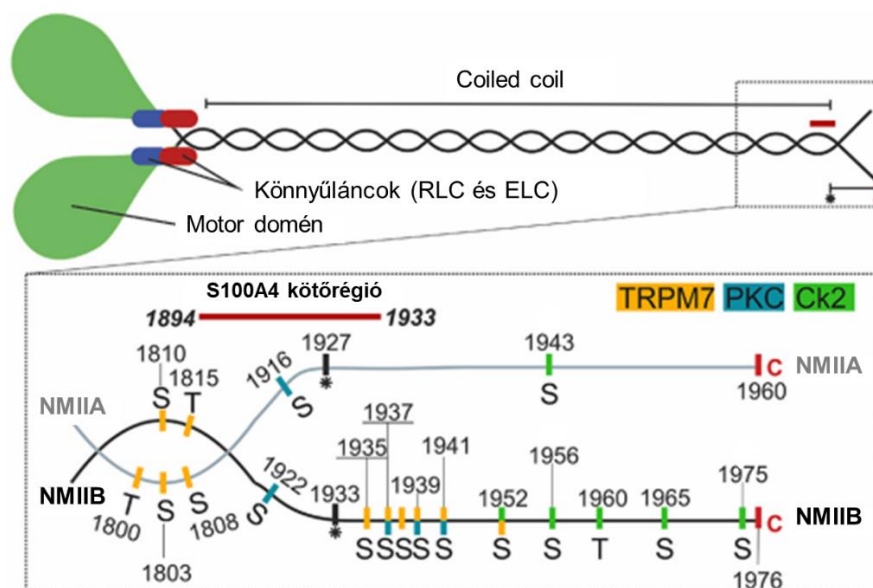
fehérje, s rendezetlen volta miatt a teljes molekula atomi szintű szerkezete nem ismert (Uversky 2016). Öt különálló doménre osztható fel, ezek: az N-terminális transzaktivációs domén (TAD, 1–61. aminosavak, ez a tumorszupresszió és az apoptózis indukálásért felelős), a prolin-gazdag régió (PRR, 64–92. aminosavak), a középső DNS-kötő domén (DBD, 94–292. aminosavak), majd a tetramerizációs domén (TET, 325–356. aminosavak) és végül a C-terminális regulációs domén (CTD, 356–393. aminosavak) (Joerger 2008). Az S100 fehérjék a TAD-hoz és a TET-hez is képesek kötődni, így befolyásolják a p53 biológiai funkcióit (Fernandez-Fernandez 2005, van Dieck 2009).

Régóta ismert, hogy a p53 TAD doménjéhez kötődik még sok más interakciós partner is, mint például a transzkripciós adapter CBP (CREB-binding protein) és az ehhez nagyon hasonló funkciójú p300 több doménje (Scolnick 1997), a DNS-replikációt szabályozó humán replikációs protein A, a hRPA70 (Leiter 1996), az ubikvitin ligáz MDM2 (Momand 1992), a transzkripciós faktor TFIID (Xiao 1994) és az adonevírus E1B fehérjéje (Lin 1994). A p53TAD régiót két további szakaszra, a TAD1 (1-40. aminosavak) és TAD2 (41-61. aminosavak) szubdoménekre szokták felosztani (Candau 1997, Raj 2017). A p53TAD domén önálló szerkezeti és dinamikai tulajdonságait NMR spektroszkópiával (Lee 2000) és fluoreszcens mérésekkel is vizsgálták (Lum 2012), és a különböző módszerek segítségével egybehangzóan megállapították, hogy bár rendezetlen szerkezetű (IDP fehérje), mégis tartalmaz naszcens helikális régiókat a T18–L26, M40–M44 és D48–W53 szakaszokon (Lee 2000). Ezek a régiók a p53TAD interakciós partnerekkel való komplexképződése esetében amfipatikus hélixszé alakulnak, ily módon rendezetlenből rendezetté válik a p53 szerkezete. A kötött állapotú p53TAD dinamikáját csak némely esetben vizsgálták: a CBP TAZ1- és TAZ2-doménjével és a hRPA70-nel képzett komplexek esetében (Vise 2005, Krois 2016). Megállapították, hogy a TAD1 és TAD2 szubdomének merevségének növekedése mellett is jelentős marad a p53TAD flexibilitása a komplexben. Az ilyen, kötött állapotban is megmaradó mozgékonyással rendelkező komplexek az ún. „bolyhos” („fuzzy”) komplexek (Tompá 2008). A p53TAD egy másik CBP-doménnel, az N-terminális NCBD-vel alkotott komplexéről megállapították, hogy fuzzy komplex, és szerepel is ezek gyűjteményében, a FuzDB adatbázisban (Sharma 2015, Miskei 2017). Az S100A4 és a p53TAD domén komplexének viszont még nem ismert sem a szerkezete, sem a dinamikai tulajdonságai, és így a komplexképződés hatására bekövetkező szerkezeti-dinamikai változások sem. Emiatt kérdéses maradt, hogy mennyiben hasonló és miben különbözik e komplex a többi S100A4-, illetve p53TAD-komplextől? Vajon itt is megfigyelhető a p53TAD rendeződése, illetve mennyire marad dinamikus a komplexben – és végeredményben ebben az esetben is fuzzy komplex keletkezik?

## 2.2 A nemizom-miozin fehérjék filamentumképződésének szabályozása

Ahogy az előzőekben láthattuk, a tumormetasztázis folyamatának egyik kulcslépése lehet a sejtek helyhez rögzítéséért és kimerevítéséért felelős, citoszolban található sejtvázz fellazítása az S100A4 hatására. Érdekes ugyanezt a folyamatot a sejtvázz szempontjából is megvizsgálni. A citoszkeleton egyik fő alkotója az aktin filamentumok mellett a korábban említett nemizom-miozin II (továbbiakban NMII) fehérjékből felépülő filamentumok, amelyek szétesése révén a sejtvázz fellazul, és ennek köszönhetően a tumoros sejtek képesek lesznek a migrációra, aminek hajtóereje a sejtek vezető élén bekövetkező aktin filamentumok polimerizációja (Ouderkirk 2014). Az NMII fehérjék az egészséges szervezetben is részt vesznek a sejtmozgások folyamatának elindításában (például az embrió fejlődése vagy a sebgyógyulás során, illetve a sejtes immunválasz kialakításában van ennek jelentősége), valamint szerepet játszanak a sejt-sejt adhézió és a sejt polaritásának kialakításában. A miozin fehérjék általában az izomműködésből ismertek, de ezzel szemben nekiknek megfelelően a nemizom-miozinok gyakorlatilag minden gerinces állat sejtjében jelen vannak. Szerkezetük hasonló az izomkötegeket alkotó miozin fehérjékhez, csak azokhoz képest kevesebb molekulából álló úgynevezett minifilamentumokat építenek fel (Vicente-Manzaneres 2009).

Az NMII fehérjéknek emlősökben három izoformája létezik: az S100A4 fehérje kölcsönhatásainál is ismertett NMIIA, és ezen kívül az NMIIIB és NMIIIC izoformák (Vicente-Manzaneres 2009). Mindhárom hat alegységből felépülő motorfehérje (2. ábra): a két nehézláncból (méretük 171–244 kDa) és az ezekből képződő homodimerhez kapcsolódó két regulációs (20 kDa) és két esszenciális könnyűláncból (22 kDa) állnak (Sellers 2000). A három izoforma nehézláncának szekvenciája 65-79%-ban azonos (Dulyaninova 2013). A nehézláncok N-terminális végükön egy motordomént tartalmaznak – amely az aktinnal való kölcsönhatást és a fehérjék egymáshoz képest történő elmozdulását teszik lehetővé ATP-hidrolízise révén –, ezt követi a nyak régió, majd a leghosszabb  $\alpha$ -helikális coiled coil képző fark régió, végül a rövid és rendezetlen szerkezetű C-terminális vég (Sellers 2000). A coiled coil szerkezet két vagy több egymás köré tekeredő  $\alpha$ -hélixből áll, amelyeket egy hidrofób jellegű „varrat” tart össze. Általánosságban a fehérjék világában viszonylag gyakran előforduló harmadlagos szintű szerkezeti elem, amely nemcsak a sejtvázz és izmok miozinjaiban, hanem a DNS-t kötő transzkripciós faktorok leucincipzár motívumában, valamint egyéb fehérjék dimerizációs doménjeiben is előfordul (Lupas 2017). A miozin filamentumokban a coiled coil molekularészek közötti elektrosztatikus kölcsönhatás felelős az aggregációért. A hosszú coiled coil szakasz végén található jellegzetes töltésmintázattal rendelkező régió kritikus szerepet tölt be a filamentumképződésben (neve ACD az angol assembly competence domain szóból), ugyanis



**2. ábra:** Az NMII hexamer sematikus ábrája (felül) és a C-terminális végén található foszforilációs helyek az NMIIA és NMIIB esetében, valamint az S100A4 kötő helye az NMIIA szekvenciáján jelölve (alul). A fekete csillag jelöli a coiled coil szakasz végét és a C-terminális rendezetlen farok kezdetét. A TRPM7, PKC és CK2 kinázok foszforilációs helyei rendre sárga, kék és zöld színnel jelölve a korábbi eredmények alapján (Vicente-Manzaneres 2009). (Az ábra forrása kisebb átalakításokkal: Ecsédi 2018.)

ezek ionos kölcsönhatásai révén indul el a filamentumok összeállása (Nakasawa 2005). E folyamat szabályozása kulcsfontosságú a sejtvíz összeállásának és szétesésének regulációjában, így a sejt migráció kialakulásában, ilyen módon a tumoros sejtek metasztatikussá válásában is.

A filamentumok összeállítását többféle módon szabályozza a sejt: az egyik út a rendezetlen C-terminális végén vagy annak közelében történő foszforiláció. Ezt különféle protein kináz enzimek katalizálják: a kazein kináz 2 (CK2), a protein kináz C (PKC) és a transzient receptor potenciális család M tagja (TRPM7) (Dulyaninova 2005, Clark 2008). A másik szabályozási lehetőség fehérje-fehérje kölcsönhatás létrejötté: a korábban ismertett S100A4, valamint az S100P és az *ecetmuslica* letális óriás lárva fehérje humán homológja (Lgl1) képes kötődni az NMII C-terminális végéhez (Murakami 2000, Dahan 2012, Du 2012). Mivel a három NMII izoforma főként a C-terminális végek szekvenciájában különbözik, és az említett filamentumképződést szabályozó folyamatok is éppen ezen a régióban keresztül hatnak, így az izoforma specifikus szabályozás csak a farokrégiók eltérésein alapulhat. Míg az NMIIA C-terminális rendezetlen farokrégióján mindössze egyetlen foszforilációs hely található (a CK2 által foszforilálható S1943), addig az NMIIB és NMIIC esetében számos CK2, PKC és TRPM7-foszforilációs helyet találhatunk (Vicente-Manzaneres 2009), ahogy azt a 2. ábrán láthatjuk. Korábban kimutatták, hogy a foszforiláció az NMIIB-filamentumok szétesését eredményezi – ellentétben az NMIIA-val (Murakami 1998). Ugyanakkor az S100A4, az S100P és az Lgl1

kötődése az NMIIA filamentumképződését akadályozza meg, miközben az NMIIB-re minimális hatással vannak (Li 2003, Kiss 2016). Az NMIIIC fehérjét sokkal kevesebbet vizsgálták, mivel feltételezhetően nem is játszik szerepet a sejtmigrációban (Ouderkirk 2014), így a továbbiakban csak az NMIIA-val és NMIIB-vel foglalkozunk.

Ezek alapján úgy tűnik, hogy a filamentumképzés elsődleges szabályozási mechanizmusa az NMIIB esetében elsősorban a C-terminális rendezetlen vég foszforilációja, míg az NMIIA esetében a kötőpartnerek, főként az S100A4 kötődése (Murakami 2000, Beach 2015). Ezekkel az adatokkal a foszforiláció hatását tekintve ellentmondásba kerültek más kutatások eredményei, amelyekben kimutatták, hogy az NMIIA filamentumképzését a CK2 által történő foszforiláció is gátolja. Ez egyszersmind az S100A4-kötődést is megakadályozza – holott a foszforilálódó S1943 nem része az S100A4 kötőhelynek –, így az S100A4 jelenlétében történő filamentumszétesést is gátolja (Dulyaninova 2005). Mindezt biokémiai kísérletekkel bizonyították: szedimentációs vizsgálatokkal a felülúszóban és a leülepedett fázisban lévő miozin mennyiségének arányát határozták meg, ugyanakkor a foszforiláció hatását atomi szinten nem vizsgálták. Ez utóbbi azért is fontos, mert ezen eredmények fényében azt feltételezték, hogy a S1943 foszforilációja következtében egy jelentős konformációs változás következhet be: az új negatív töltés miatt visszahajlik a C-terminális rendezetlen rész az ACD domén pozitív töltésű részére, így akadályozza meg a foszforiláció az S100A4 kötődését és a filamentumképződést egyaránt (Dulyaninova 2005, Dulyaninova 2013). Ezek alapján a foszforiláció és az S100A4 kötődése együttesen összetett és bonyolult szabályozó mechanizmust eredményezhet az NMIIA filamentumok képződése esetében.

Ezen irodalmi ismeretek tükrében a következő kérdések vetődnek fel:

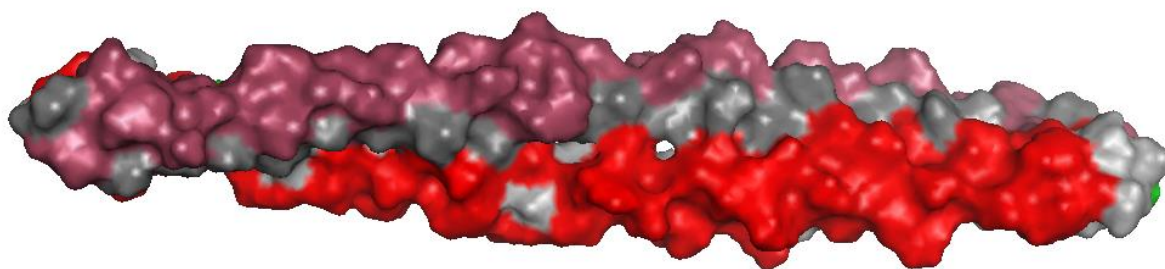
- (a) Vajon lehetséges-e, hogy egyetlen aminosavoldallanc foszforilációja olyan mértékű konformációs változást okoz, mint az említett visszahajlás?
- (b) Egyáltalán milyen hatása lehet a foszforilációnak az NMIIA farokrégiójának atomi szintű szerkezeti-dinamikai tulajdonságaira?
- (c) Hogyan jelenik meg a foszforiláció hatása az NMIIB esetében?
- (d) Valójában mi a filamentumok összeállásának és szétesésének szabályozó mechanizmusa?

Ezek a kérdések sok tanulmány eredményének összegzése után is megoldatlanok maradtak, ezért atomi szintű vizsgálatainkban ezekre próbálunk fényt deríteni.

Másfelől a filamentumok szétesésében a C-terminális farok foszforilációja mellett a coiled coil rendszer stabilitásának is fontos szerepe lehet. Az S100A4 dimer egy egyszálú miozint köt, ahogy láttuk korábban, és ez csak a dimer szerkezetű coiled coil részleges vagy teljes letekeredése után tud létrejönni. Emiatt az NMIIA coiled coil régiójának – legalábbis annak az

ACD doménhoz tartozó, illetve ahhoz közeli részének – szerkezeti és dinamikai tulajdonságainak ismerete is jelentős módon hozzájárul, hogy a filamentum szétesésének mechanizmusát megismerjük. Ugyan részletesen még nem vizsgálták ezt korábban, annyi azonban ismert volt az irodalomban, hogy az NMIIA 111 aminosav hosszú C-terminális fragmense részben coiled coil képez, s ez a coiled coil képező szakasza az NMR számára „láthatatlan”: a  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ -HSQC spektrumon kiszélesednek a jelei, így csak a rendezetlen N- és C-terminális szakaszok keresztcsúcsai detektálhatók (Badyal 2011). Ezt a jelkiszélesedést más coiled coil rendszerek NMR spektroszkópiával megvalósuló vizsgálata során is megfigyelték már több alkalommal (Renzoni 2001, Ishigaki 2007, Vavra 2016), sőt kutatókkal való személyes beszélgetések arra engednek következtetni, hogy a publikációkban leírt példánál többször is előfordul ez a jelenség. Az említett jelkiszélesedés nem minden esetben tapasztalható, így egyes kisebb méretű coiled coil rendszerek jól tanulmányozhatók NMR spektroszkópiával – például a legtöbbet vizsgált coiled coil, a leucincipzár GCN4 vagy más egyéb esetekben (Pascual 1996, Cukier 2016, Gill 2016, Kaplan 2017, Sharma 2017).

A coiled coil általánosságban többszörösen egymás köré tekeredett  $\alpha$ -hélixekből felépülő szuperhélix, amely kettő-öt hélixegységből állhat (Lupas 1996, Lupas 2017) – egy példa látható a 3. ábrán. Felhasználják mesterséges fehérjék építésében nagyobb szerkezeti elemek, mint például csatornák, hordók és nanocsövek létrehozására is (Burgess 2015). Leggyakrabban periodikusan ismétlődő héttagú aminosav-heptádokból épülnek fel, habár ritkábban 11 vagy 15 egységből álló periódusok is előfordulnak (Lupas 2017). A heptád szekvenciát  $a-b-c-d-e-f-g$  betűkkel szokták jelölni, amelyekben az  $a$  és  $d$  pozícióban leginkább apoláris aminosavak (legtöbbször valin, leucin és alanin), míg az  $e$  és  $f$  pozícióban poláris aminosavak találhatók (Cohen 1990), ami így lehetővé teszi a „gomb a lyukba” („*knob-into-hole*”) illeszkedést a hélixek egymáshoz kapcsolódása során. A jellegzetes szekvencia mintázat miatt már pusztán az aminosav sorrend ismeretében meghatározható adott régió coiled coil szerkezetté alakulásának valószínűsége (Lupas 1991). Erre a tényre alapulva több aminosav szekvencia alapú coiled coil



**3. ábra:** Egy coiled coil (egy miozinfrafragmens) térszerkezeti modellje, amely a CCBUILDER (Wood 2014) coiled coil rajzoló szoftverrel készült. A hidrofób aminosavak világos és szürke színnel, a hidrofil oldalláncok pedig piros és sötét piros aminosavak.



predikációs szoftver is ismert: ilyenek többek között a MARCOIL, a COILS, a Multicoil és a COILS/PCOILS (ez utóbbi megtalálható itt: <https://toolkit.tuebingen.mpg.de/#/tools/pcoils>, letöltés ideje: 2019. 02. 12.).

Az NMIIA coiled coil szakaszát az említett jelkiszélesedés miatt NMR spektroszkópiával részletesen még nem vizsgálták, ráadásul a jelkiszélesedés szerkezeti-dinamikai okaira sem adtak pontos magyarázatot – márpedig ennek megértése elősegíthetné azt, hogy az általános következtetéseket levonva világossá váljon a coiled coil szerkezeti elemek NMR spektroszkópiával történő vizsgálatának lehetőségei és határai.

### 3. Célkitűzések

Doktori munkám első részében az S100A4 fehérje NMIIA, ezrin és p53 fehérjékkel alkotott komplexének szerkezeti és dinamikai vizsgálatát tűztem ki célul.

Az NMIIA esetében a már korábban is használt 45 aminosavas kötőrégióval, az MPT peptiddel alkotott komplexet mindkét résztvevő partner oldaláról vizsgáltuk, különös tekintettel a komplex dinamikai viselkedésére. A kötődés során bekövetkező változások elemzése alapján a komplex erősségére, a kötődés mechanizmusára, valamint a  $\text{Ca}^{2+}$ -affinitás jelentős növekedésére kerestünk magyarázatot. A következő vizsgálat célkitűzése annak eldöntése volt, hogy az ezrin két fő doménje, az N-ERMAD és a C-ERMAD kötődik-e az S100A4-hez, és ha kialakul egyikkel vagy másikkal komplex, akkor a kötődés hogyan hat az S100A4 szerkezetére. Ha mindkét domén kötődik, akkor vajon külön-külön vagy egy harmadlagos komplex formájában egyszerre alakítanak ki kölcsönhatást az S100A4 fehérjével? A p53 esetében a rendezetlen TAD-domén és az S100A4 kölcsönhatását az S100A4 oldaláról szerkezeti, a p53TAD oldaláról nézve dinamikai szempontból vizsgáltam, különös tekintettel a kötött állapotban lévő p53TAD mozgásai szempontjából.

Doktori munkám második részében az NMIIA és NMIIB rendezetlen C-terminális végének foszforilációját követtük a megfelelő fragmenseken, a jelentős foszforilációs helyek meghatározása után ennek a szerkezetre és dinamikára gyakorolt hatását vizsgáltuk. A fő kérdés ebben, hogy a foszforiláció okozhat-e olyan jelentős intramolekuláris szerkezeti változást, amely magyarázza a foszforiláció filamentumszétérésre gyakorolt hatását? Végül a filamentumszétérés szempontjából érdekes az NMIIA coiled coil szakaszának szerkezeti-dinamikai vizsgálata. Mi okozhatja az NMR szempontjából „láthatatlan” coiled coil jelkiszélesedését és milyen következményei lehetnek a vizsgált szerkezeti-dinamikai hatásoknak a coiled coil és végeredményben a filamentumok stabilitására?

Mindezen kérdések megválaszolásában én elsősorban az NMR spektroszkópiai vizsgálatokat végeztem, s emellett kiegészítő módszerként ECD spektroszkópiát és tömegspektroszkópiát is alkalmaztam egyes esetekben.

## 4. NMR spektroszkópia a biológiai kérdések szolgálatában

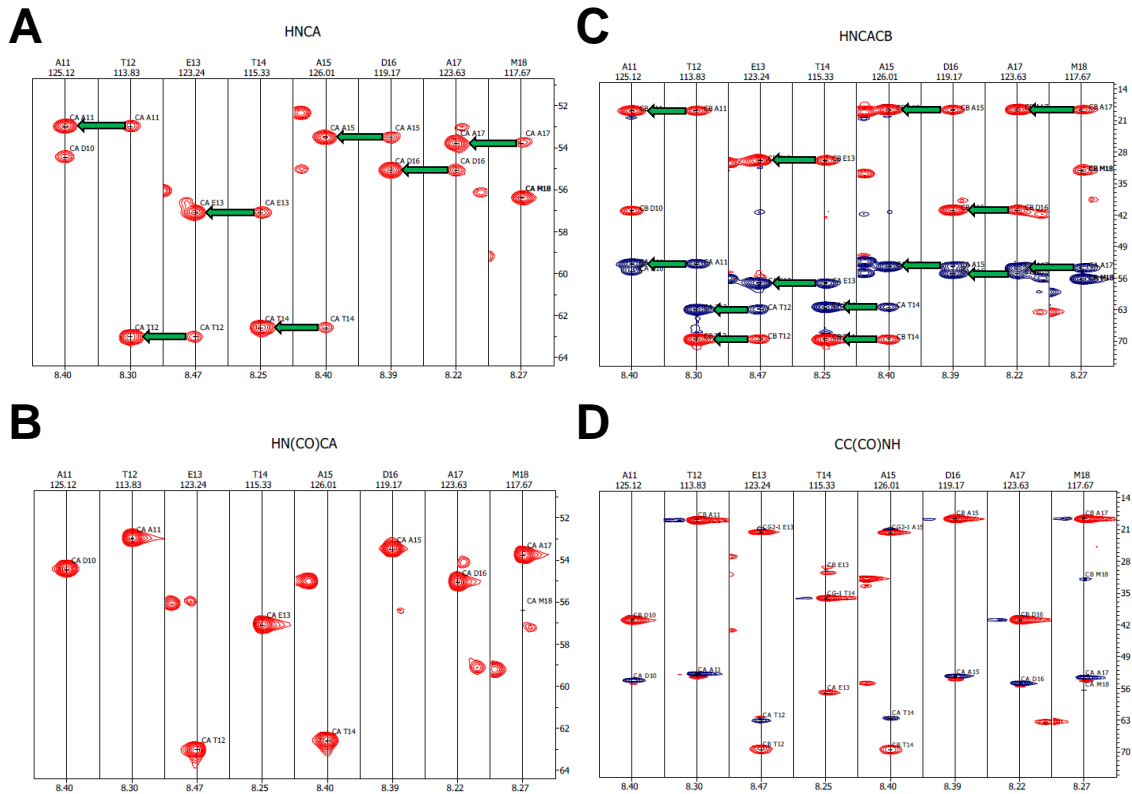
### 4.1. Elméleti háttér

#### 4.1.1. Az asszignáció menete

Az utóbbi néhány évtizedben az NMR spektroszkópia általános vizsgálati módszerré vált a szerkezeti biokémia területén, emiatt ma már több NMR módszert is rutinszerűen használnak. A spektrumok jelhozzárendelése, más szóval asszignációja is ezek közé tartozik, ami a legtöbb kiértékelés első lépése (Wütrich 1990). Jellemzően izotópjelölt mintákat szükséges használni ehhez: leggyakrabban  $^{15}\text{N}$ -jelölt vagy  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ -jelölt fehérjéket. Mivel a biopolimerek mérete miatt igen nagy a jelsűrűség a spektrumokon, ezért több 2D és 3D heteronukleáris spektrum felvétele és elemzése szükséges a megfelelő adatmennyiség kinyeréséhez. A kizárólag  $^1\text{H}$  eltolódások detektálásával mérhető homonukleáris 2D mérésekkel csak kisebb méretű fehérjék és peptidok kémiai eltolódásait lehet meghatározni (Batta 2018a).

Doktori munkám során én a klasszikus és BEST típusú 2D és 3D spektrumokra épülő asszignációt alkalmaztam. Ennek lényege, hogy az amid N- és H-atomok korrelációját tartalmazó 2D  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ -HSQC spektrum keresztcúcsait szeretnénk azonosítani különböző  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ -HSQC-alapú 3D spektrumok segítségével (Sattler 1999, Batta 2018b). Ennek menete a következő: először el kell végezni adott aminosav spinrendszerének azonosítását, majd az aminosav szekvencia ismeretében ezeket össze kell kötni egymással. Ha  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ -jelölt minta áll rendelkezésre, az általában  $^{13}\text{C}$ -korrelációt is tartalmazó komplementer spektrumpárok segítségével az azonosított spinrendszerek sorba rendezhetők. Erre a célra alkalmas spektrumok például a HNCA és HN(CO)CA, a HNCOC és HN(CA)CO, a HNCACB és HN(CO)CACB (a 4. ábrán példaként látható néhány sorba rendezett spektrum megfelelő részlete). A különböző 3D spektrumok alapján meghatározható az amid N- és H-atomok kémiai eltolódásain túl a  $\text{C}^\alpha$ ,  $\text{C}^\beta$   $\text{C}'$ , sőt a CC(CO)NH spektrum alapján a többi oldallánc  $^{13}\text{C}$ -eltolódásai is.

Ezek mellett egyéb kiegészítő spektrumokat is lehet mérni, például a 2D  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -HSQC és többféle  $^{13}\text{C}$ -detektált spektrum, mint a 2D CON és 2D CACO (a  $\text{C}'$  és a szomszédos amid N, illetve a szintén szomszédos  $\text{C}'$  és  $\text{C}^\alpha$  korrelációit tartalmazzák) (Bermel 2006), amelyek a 2D  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ -HSQC spektrumon nem detektálható aminosavak, például prolinok jeleinek meghatározását is lehetővé teszik. Az eltolódások abszolút értékeit is érdemes figyelembe venni a jelhozzárendelés során, hiszen ezek jellemzőek lehetnek az adott aminosavra. Ezek értékei megtalálhatók az interneten elérhető Biological Magnetic Resonance Data Bank, röviden BMRB adatbázisban (<http://www.bmrwisc.edu>, letöltés ideje: 2019. 02. 18.), ahova a legtöbb NMR



**4. ábra: Az asszignáció bemutatása: (A) 3D HNCA, (B) HN(CO)CA, (C) HNCACB és (D) CC(CO)NH spektrumok egy sorba rendezett részlete: egy fehérje <sup>11</sup>ATETADAM<sup>18</sup> szekvenciárészletén (forrás saját kutatás). Az <sup>1</sup>H és <sup>15</sup>N dimenzió mellett a harmadik dimenzió különböző <sup>13</sup>C-korrelációt tartalmaz (pozitív előjelűek piros színnel, negatív előjelűek kék színnel). Az *i*-edik és (*i*-1)-edik aminosavak azonos kémiai eltolódásai zöld nyilakkal vannak összekötve: ez az az információ, amely alapján sorba tudjuk rendezni a spinrendszereket.**

asszignáció végeredménye depozitálásra kerül. Az asszignálást különböző szoftverek használatával lehet elvégezni, ilyenek a CARA (Keller 2004), a SPARKY (Goddard 2000), és újabb változata, az NRMFAM-SPARKY (Lee 2015) és a CcpNmr Analysis (Skinner 2016).

A <sup>15</sup>N-jelölt minták esetében a megfelelő spektrumokból nyerhető információ nagyobb fehérjék asszignációjára nem elegendő, de ha már ismert egy adott fehérje <sup>1</sup>H,<sup>15</sup>N-HSQC spektrumának jelhozrendelése, akkor egy ehhez képest kissé különböző másik HSQC-spektrum asszignációja TOCSY-HSQC és NOESY-HSQC, esetleg HNHA-HSQC spektrumok alapján is megoldható lehet.

A mérési idő rövidítése céljából az utóbbi időben használatosakká váltak a gyors mérési technikák, mint a nemlináris mintavételezés („*non uniform sampling*”, NUS) (Motačková 2010) és az automatizált projekciós spektroszkópia (APSY) (Hiller 2005, Hiller 2007), amelyeket főleg a klasszikusnál nagyobb dimenziójú (4D–7D) mérések esetében szoktak használni. Ezek asszignációs stratégiája ugyanakkor különbözik az előbb ismertetett klasszikus megközelítéstől.

A hagyományos 2D és 3D spektrumok mérési idejét is lehet hatékonyan csökkenteni a NUS technika mellett az N-H régió szelektív besugárzásával: erre használható a „*Band-Selective Optimized Flip Angle Short Transient*” (SOFAST) HMQC spektrum a  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ -HSQC spektrum helyett (a mérési idő 1/10–1/20 részére csökkenhet) (Schanda 2005). Hasonló elvre alapulnak az ismertett  $^{13}\text{C}$  dimenziót tartalmazó spektrumok esetében a „*Band-selective Excitation Short-Transient*” (BEST) változatok (a mérési idő közel 1/4 részére csökkenthető) (Schanda 2006). A CC(CO)NH kivételével minden korábban felsorolt  $^{13}\text{C}$ -eltolódásokat tartalmazó spektrumnak létezik BEST típusú változata. Ezek végeredménye ugyanolyan spektrum, mint amelyet a hagyományos pulzusszekvenciával lehet felvenni, mindössze a mérési idő rövidül jelentősen.

#### 4.1.2. A kémiai eltolódásokból levonható következtetések

Ha az asszignáció elkészült, önmagában a kémiai eltolódások felhasználásával is sok információt szerezhetünk az általunk tanulmányozott fehérjéről.

**I.** A másodlagos szerkezetre utalnak a másodlagos kémiai eltolódások (SCS, „*secondary chemical shift*”), amelyek az ideálisan rendezetlennek tekintett, úgynevezett „*random coil*” eltolódás értékektől való eltérésként definiálhatók:

$$SCS = \delta_m - \delta_{rc},$$

ahol  $\delta_m$  a mért kémiai eltolódás,  $\delta_{rc}$  pedig a tökéletesen rendezetlennek tekintett eltolódás érték. A random coil értéket közvetlenül nem lehet mérni – ezt különböző módokon szokták kiszámolni. Ezek közül az egyik legismertebb a Wishart és munkatársai (Wishart 1995) által leírt módszer, amelyet szekvenciakorrekció figyelembe vételével érdemes használni (Braun 1994). Ezt minden atommagra külön-külön kell kiszámolni és értelmezni aminosav egységként. Az újabb módszerek egy adott aminosav összes mért kémiai eltolódását egyszerre képesek figyelembe venni és abból a másodlagos szerkezeti elemek valószínűségét meghatározni. Ezek korábbi mérésekből készült adatbázisokra épülnek, azokkal vetik össze az általunk mért eredményeket. Ilyen módszer az SSP („*secondary structure propensity*”, azaz másodlagos szerkezeti predikció), amely értéke +1 körüli helikális jellegű szerkezetben lévő aminosavra és -1 körüli  $\beta$ -redőben elhelyezkedő aminosavra, míg 0-hoz közeli a rendezetlen régióban (Marsh 2006, megtalálható itt: <http://abragam.med.utoronto.ca/software.html>, letöltés ideje: 2019. 02. 04.). Egyéb megközelítések is léteznek erre a célra, ilyen a TALOS-N (Shen 2013) és a  $\delta 2D$  (Camilloni 2012) módszerek. Mivel a gerinc amid N- és H-atomok eltolódásait nagyon sok egyéb tényező befolyásolja, nem csak a másodlagos szerkezet, ezért főleg a többi eltolódást érdemes figyelembe venni ezeknél a számításoknál ( $C^\alpha$ ,  $C^\beta$ , C' és  $H^\alpha$ ).

**II.** A kémiai eltolódásokból prediktálható a molekula mozgékonyága aminosav egységenként az RCI („*random coil index*”) kiszámításával (Berjanskii 2005, megtalálható itt: [http://randomcoilindex.com/cgi-bin/rci.cgi\\_current.py](http://randomcoilindex.com/cgi-bin/rci.cgi_current.py), letöltés ideje: 2019. 02. 04.). E módszer is az irodalomban megtalálható mérési eredményekből épített adatbázisra alapul. Használata esetében minden mért kémiai eltolódást érdemes figyelembe venni. Az RCI-ből két további adat nyerhető: a gerincmozgásokat jellemző rendparaméterek ( $S^2$ ), amelyeket dinamikai mérések eredményeivel lehet összevetni, és a RMSD értékek, amelyek NMR alapú szerkezetszámítás vagy molekuladinamikai szimulációk eredményével lehet összehasonlítani.

**III.** Fehérje-fehérje vagy fehérje-kismolekula kölcsönhatások tanulmányozása során a fehérje gerinc amid N- és H-atomjai kémiai eltolódásának megváltozása szerkezeti változásokról ad információt. Ezt a módszert hívják kémiai eltolódás térképezésnek vagy kémiai eltolódás perturbációnak („*chemical shift mapping*” vagy „*chemical shift perturbation*”) (Zuiderweg 2002). A kémiai eltolódások perturbációját, a kiindulási és a végállapot közötti eltérést a kombinált kémiai eltolódás-változás ( $\Delta\delta$ ) segítségével jellemezzük, amely a H- és N-atomok kémiai eltolódásainak megváltozását együttesen veszi figyelembe a következőképpen:

$$\Delta\delta = \sqrt{(\delta(^1\text{H})_1 - \delta(^1\text{H})_0)^2 + (c \cdot (\delta(^{15}\text{N})_1 - \delta(^{15}\text{N})_0))^2},$$

ahol a 0. indexek a kiindulási, az 1. indexek a végállapothoz tartozó kémiai eltolódások egy adott aminosav esetében. A  $c$  skálázási faktor a két atommag eltolódásainak nagyságrendje közötti eltérést korigálja. Erre különböző értékeket szoktak használni, nem egységes az irodalomban, de logikusnak tűnik az  $^{15}\text{N}$  és  $^1\text{H}$  atommagok giromágneses együtthatói arányának megfelelően 0,1 értéket használni. Ha a kapott  $\Delta\delta$  értékeket ábrázoljuk egy szerkezeti ábrán, meghatározhatjuk a kölcsönhatásban legfontosabb szerepet játszó régiókat.

**IV.** Ha az interakciós partnert lépésenként adjuk a vizsgált fehérjéhez, azaz titrálást végzünk, és minden köztes állapotban elkészítjük az asszignációt az előző állapot adatai alapján, a kombinált kémiai eltolódás-változásokból a kötődés disszociációs állandóját is kiszámíthatjuk, ha a következő egyenletet illesztjük a kapott adatokra (Willamson 2013):

$$\Delta\delta = \Delta\delta_{\max}(n[P] + [L] + K_d - \sqrt{(n[P] + [L] + K_d)^2 - 4n[P][L]}]/(2n[P]),$$

ahol  $\Delta\delta$  egy adott aminosavra meghatározott kombinált kémiai eltolódás az adott lépésben,  $\Delta\delta_{\max}$  ennek végső, maximális értéke a teljes telítettség állapotában,  $[P]$  a fehérje koncentrációja,  $[L]$  a hozzáadott ligandum koncentrációja,  $K_d$  a disszociációs konstans,  $n$  a sztöchiometriai szám, azaz az L/P arány a komplexben. Ezek közül globális módon illesztett paraméterek a  $K_d$  és az  $n$ , valamint az egyes aminosavakra külön-külön értendő  $\Delta\delta_{\max}$ . Ezt a számítást csak a gyors csere

tartományba eső jelekre lehet elvégezni (ezekről bővebben a 4.1.4. alfejezetben lesz szó).

V. A kémiai eltolódások hőmérsékletfüggéséből is hasznos szerkezeti információkat nyerhetünk. Általában az amid H-atomok eltolódásainak hőmérsékletfüggésének görbéjét szokták vizsgálni: amennyiben ez lineáris összefüggés, úgy nem történik jelentős szerkezeti változás a melegítés hatására. Ha viszont nemlineáris a változás (a  $^1\text{H}, ^{15}\text{N}$ -HSQC spektrumon a különböző hőmérsékleten felvett spektrumokon egy adott N-H keresztcsúcs-sorozat görbe mentén helyezkedik el), akkor szerkezeti átrendeződés történik (Rovó 2013). A lineáris változás esetében is megállapították, hogy ha a meredekség  $-4,5$  ppb/K feletti, akkor az adott aminosav amid protonja intramolekuláris hidrogénhidban van (tehát merevebb), míg az ez alatti értékű meredekség az oldószer vízmolekulákkal való hidrogénkötések jelenlétére utal (vagyis mozgékonyabb) (Baxter 1997).

#### 4.1.3. Relaxációs mérések és a molekulák mozgékonyágának jellemzése

A fehérje molekulák mozgásait is kiválóan lehet tanulmányozni NMR spektroszkópia segítségével, sőt ez a módszer egyik egyedülálló területe: oldatfázisban ugyanis egyetlen más módszerrel sem lehet ilyen széles időskálán vizsgálni a fehérjemozgásokat (a ps–h tartományban közel 15 nagyságrendet átfogó jellemzést lehet erről készíteni különböző NMR technikákkal). A a fehérjegerinc és az oldalláncok gyors mozgásai a ps-ns időskálába esnek, a ns nagyságrendbe tartozik a fehérje globális „bukdácsoló” („*tumbling*”) mozgása, a  $\mu\text{s}$ -ms időskálán a lassabb doménmozgásokat, míg a ms-s időskálán a lassú konformációs mozgásokat találjuk, végül a s-h tartományban a fehérje fel- és letekeredése történik (Kay 1998, Jarymowycz 2006, Batta 2018b).

Az egész fehérje molekula bukdácsoló mozgását a globális rotációs korrelációs idővel ( $\tau_c$ ) jellemezzük, amely gyakorlatban az az átlagos idő, ami alatt a molekula véletlenszerű irányú forgómozgása során 1 rad szögelfordulást megtesz. A molekula belső mozgásait a rotációs korrelációs függvénnyel lehet leírni, amelyből Fourier-transzformációval kapjuk a spektrális sűrűségfüggvényt ( $J(\omega)$ ). Ez utóbbi függvény szemléletes jelentése az, hogy adott frekvenciával jellemezhető mozgások milyen valószínűséggel fordulnak elő a molekula mozgásai között, vagyis a különböző szögsebességgel leírható mozgásfajták teljes mozgáshoz való hozzájárulásainak eloszlását adja meg (Rule 2006). A következő összefüggés áll fenn a korrelációs idő és a  $J(\omega)$  között:

$$J(\omega) = \frac{2\tau_c}{1 + (\omega\tau_c)^2}.$$

Az NMR spektroszkópiával mérhető paraméterek közül közül a longitudinális ( $T_1$ ) és a transzverzális ( $T_2$ ) relaxációs idők (egész pontosan a belőlük számolt relaxációs állandók:

$R_1 = T_1^{-1}$  és  $R_2 = T_2^{-1}$ ), valamint a steady state heteronukleáris NOE értékek (HetNOE) hozhatók közvetlen összefüggésbe a gerinc N-H vektorok mozgásait jellemző spektrális sűrűségfüggvénnyel. Ennek oka az, hogy a relaxáció a vizsgált atommag lokális  $B_0$  mágneses terének véletlenszerű ingadozásából fakad – ami viszont a molekulák véletlenszerű rotációs mozgásainak következménye. Az említett három gyorsdinamikai paraméter meghatározását a fehérjék esetében a  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ -HSQC spektrumon alapuló pszeudo-3D mérésekkel szokás végezni, így ezekhez elengedhetetlen az asszignáció ismerete (Palmer 1997). Fontos, hogy kizárólag  $^{15}\text{N}$ -jelölt mintával szükséges dolgozni. Adott aminosav gerinc amidcsoportjának  $R_1$  és  $R_2$  értékei a keresztcsúcs intenzitásának változásából kapható meg a késleltetési idő-jelintenzitás függvényre illesztett exponenciális görbéből. A HetNOE értékek pedig az amid protonok telítése mellett és anélkül felvett spektrumok intenzitásának hányadosából számítható ki. A feldolgozáshoz használható többek között a Bruker Dynamics Center, a Sparky és a CCPNMR nevű szoftverek.

A globális rotációs korrelációs időt az  $R_1$  és  $R_2$  értékekből aminosav egységenként lehet becsülni a következő összefüggés alapján (Cavanagh 2007):

$$\tau_c \approx \frac{1}{4\pi\nu_N} \sqrt{6 \frac{R_2}{R_1} - 7},$$

amely egyenletben  $\nu_N$  a  $^{15}\text{N}$ -atommag Larmor-frekvenciája. A molekulát jellemző egyetlen  $\tau_c$  érték ezen aminosav egységekre számított adatok átlaga. Fontos megjegyezni, hogy ez a közelítés abból fakad, hogy a bukdácsoló, véletlenszerű rotációs mozgás sebességétől (is) függenek a longitudinális és transzverzális relaxációs idők nagysága. Így a  $\tau_c$  érték nagyobb értéke (lassabb mozgás) gyorsabb transzverzális relaxációt eredményez, ami viszont a jelszélesség növekedését eredményezi. Ez okozza a fehérje NMR mérettel összefüggésben álló korlátját: egy adott méretnél nagyobb fehérjék globális rotációs korrelációs ideje olyan nagy (olyan lassú a bukdácsolós mozgásuk), hogy egyáltalán nem tudunk NMR jeleket detektálni. Ugyanígy, ha a molekula egyéb tényezői, például alakja miatt kisebb mérete ellenére is nagyobb a  $\tau_c$  értéke, ez szintén a molekula bizonyos régiójának vagy akár az összes jelnek a kiszélesedését okozhatja, és így azok nem lesznek detektálhatók (Foster 2007).

Az  $R_1$ ,  $R_2$ , HetNOE mért paraméterek és a spektrális sűrűség-függvény egyes pontjai, a  $J(0)$ ,  $J(\omega_N)$ ,  $J(\omega_H - \omega_N)$ ,  $J(\omega_H)$ ,  $J(\omega_H + \omega_N)$  értékek között jól ismert összefüggések állnak fenn (Abragam 1961):

$$R_1 = \left( \frac{3d^2}{4} + c^2 \right) J(\omega_N) + \frac{d^2}{4} J(\omega_H - \omega_N) + \frac{3d^2}{2} J(\omega_H + \omega_N),$$



$$R_2 = \left(\frac{d^2}{2} + \frac{c^2}{6}\right)J(0) + \left(\frac{3d^2}{8} + c^2\right)J(\omega_N) + \frac{d^2}{8}J(\omega_H - \omega_N) \\ + \frac{3d^2}{4}J(\omega_H) + \frac{3d^2}{8}J(\omega_H + \omega_N), \\ NOE = 1 - \frac{\gamma_H d^2}{4\gamma_N R_1}J(\omega_H - \omega_N) + \frac{3\gamma_H d^2}{2\gamma_N R_1}J(\omega_H + \omega_N),$$

ahol

$$d = \frac{\mu_0 h \gamma_N \gamma_H}{8\pi^2 r_{NH}^3} \text{ és } c = \frac{\Delta\sigma_N \gamma_N B_0}{\sqrt{3}},$$

amelyben  $\mu_0$  a vákuum permabilitása,  $h$  a Planck-állandó,  $\gamma_N$  és  $\gamma_H$  a  $^{15}\text{N}$  és az  $^1\text{H}$  atommagok giromágneses együtthatója,  $r_{NH}$  a N-H atommagok távolsága,  $\Delta\sigma_N$  a  $^{15}\text{N}$  atommagok kémiai eltolódás anizotrópiája,  $B_0$  pedig a külső, statikus mágneses tér indukciója.

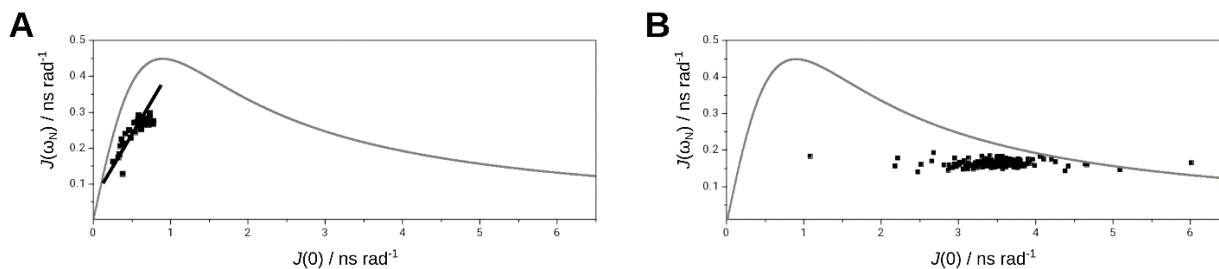
A mozgások leírására többféle megközelítés létezik, amelyek ezeken az összefüggéseken alapulnak különböző megfontolások alapján.

**I.** Az egyik legismertebb a redukált spektrális sűrűség módszere, amelynek lényege, hogy a  $J(\omega_H - \omega_N) \approx J(\omega_H) \approx J(\omega_H + \omega_N)$ , így ezt a három paramétert egyetlennel helyettesíthetjük: a  $J(0,87\omega_H)$  értékkel (jelölése  $J(\omega_h)$ ) (Farrow 1995). Így minden aminosav esetében a mért három gyorsdinamikai paraméterből három mozgási paramétert számíthatunk ki:  $J(0)$ ,  $J(\omega_N)$ ,  $J(\omega_h)$  az egyenletek átrendezésével kapott következő összefüggések szerint (Jarymowycz 2006):

$$J(0) = \frac{1}{3d^2 + 4c^2} \left( 6R_2 - R_1 \left( 3 + \frac{18\gamma_N}{5\gamma_H} (\text{NOE} - 1) \right) \right), \\ J(\omega_N) = \frac{4}{3d^2 + 4c^2} \left( R_1 \left( 1 - \frac{7\gamma_N}{5\gamma_H} (\text{NOE} - 1) \right) \right), \\ J(\omega_h) = \frac{4}{5d^2} \left( R_1 \frac{\gamma_N}{\gamma_H} (\text{NOE} - 1) \right).$$

A  $J(0)$  a lassú,  $J(\omega_N)$  a közepes és  $J(\omega_h)$  a gyorsmozgások arányát mutatja meg a teljes mozgásfajtákon belül. A redukált spektrális sűrűség térképezés a  $J(0)$ – $J(\omega_N)$  függvény ábrázolását jelenti (ún. Lefèvre-ábrázolás), ahol minden pont egyetlen aminosavat jelöl (Krizová 2004) (5. ábra). Ezeket a pontokat az ún. „egymozgás” („*single motion*”) görbéhez viszonyítva érdemes megvizsgálni. Ez a görbe azokat a pontokat tartalmazza, amelyek egy teljesen merev, egységes mozgással rendelkező, belső mozgások nélküli elméleti esetből lenne kiszámítható a következőképpen:

$$J(\omega) = \frac{J(0)}{1 + 6,25(\omega J(0))^2}.$$



**5. ábra:** A redukált spektrális sűrűség térképezés módszere (A) egy rendezetlen és (B) egy rendezett fehérje esetében (az adatok forrása saját kutatás). A fekete négyzetek egy-egy aminosavnak felelnek meg, a szürke vonal az „egymozgás” görbe. Az (A) grafikonon a Lefèvre-egyenletnek megfelelő illesztett egyenes látható.

Azok az aminosavak, amelyek a görbe növekedési szakaszához közel csoportosulnak (kis  $J(0)$  értékkel rendelkeznek), rendezetlen szerkezeti elemekben fordulnak elő (5A. ábra). Ideálisan rendezetlen esetben ezek egy pozitív meredekségű egyenes mentén helyezkednek el. A rájuk illesztett egyenesből kiszámíthatjuk a globális korrelációs időt ( $\tau_c$ ) és a gyorsabb belső mozgásokat hasonló módon jellemző belső korrelációs időt ( $\tau_e$ ) a Lefèvre és munkatársai által közölt egyenlet alapján (Lefèvre 1996). Azok az aminosavak, amelyek a görbe csökkenő oldalához közel vannak (nagy  $J(0)$  értékekkel), merev szakaszokban találhatóak, és amelyek a görbén kívülre esnek (5B. ábra), konformációs cserével jellemezhetők (erről bővebben lásd a 4.1.4. alfejezetet). A redukált spektrális sűrűség módszere mind a rendezetlen, mind a rendezett fehérjékre alkalmazható módszer, viszonylag egyszerű, de nem mondható nagyon pontosnak, mivel sok közelítést tartalmaz.

**II.** A másik ismert megközelítés, amellyel a fehérje gerincdinamikáját lehet jellemezni, a Lipari-Szabó modellfüggetlen analízis, illetve ennek kiterjesztett változata, amely több kvantitatív mozgási jellemző megismerésére ad lehetőséget (Lipari 1982a, Lipari 1982b, Clore 1990a, Clore 1990b). Ezt csak rendezett, globuláris fehérjékre lehet alkalmazni. A mozgásokat a globális és a belső mozgásokra bontjuk fel, és ez a felbontás jelenik meg a korrelációs függvényben és így a spektrális sűrűségfüggvényben is:

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

ahol  $(\tau')^{-1} = (\tau_c)^{-1} + (\tau_e)^{-1}$ , amelyben  $\tau_c$  a belső mozgásokat jellemző korrelációs idő,  $S^2$  pedig a rendparaméter. Ez utóbbi 0 és 1 közötti érték és az adott aminosav N-H kötésevektora mozgásának és a fehérje globális mozgásának korrelációját jellemzi: 0-hoz közel teljesen független a mozgás, tehát teljesen flexibilis az aminosav, míg az 1-hez közeli érték teljesen összefüggő mozgást jelent, tehát az aminosav teljesen merev. A teljes leírásban valójában ötféle mozgási modellt használunk, amelyek az alapegyenlet egyszerűsítéséből vagy bővítéséből származnak különböző megfontolások alapján, ezek közül a legjobb illeszkedést választjuk ki (legtöbbször a számítást

végző szoftver elvégzi a választást is). Az 1. modell a legegyszerűbb mozgást jelenti, itt a  $S^2$  és  $\tau_c$  paramétereken kívül nincs szükség több illesztett adatra. A 2. és 4. modellben a gyors belső mozgást is jellemző  $\tau_e$  értéket is illesztjük, a 3. és 4. modell esetében lassabb időskálán történő konformációs vagy kémiai cserét jellemző  $R_{ex}$  paramétert is használunk. Az 5. modellel a legkomplexebb mozgások írhatók le: a  $\tau_e$  és  $R_{ex}$  paramétereken túl a rendparamétereket is két további tagra osztjuk fel:  $S^2 = S_f^2 S_s^2$ , ahol  $S_f^2$  egy gyorsabb, míg ahol  $S_s^2$  egy lassabb mozgáshoz tartozó rendparaméter. Több megközelítés alkalmazható az egész illesztésre a molekula alakja alapján: izotróp, axiális anizotróp és teljesen anizotróp. Az első esetben gömbként közelítjük a molekulát, a második és harmadik esetben szükséges az atomi koordinátákkal leírható fehérje térszerkezetre is a számításhoz (a modellek részletes összefoglalása megtalálható itt: Jarymowycz 2006). A legpontosabb eredmény érdekében a dinamikai méréseket több mágneses térerősségen meg kell ismételni és együtt illeszteni az adatokat. Ugyanakkor egyetlen térerősségen mért értékekből is már egész pontos leírást lehet adni a rendezett molekula mozgásaira. Az analízishez többféle szoftvert fejlesztettek ki: a Bruker Dynamics Center, a Tensor2 (Dosset 2000), a FAST-Modelfree (Mandel 1995, Cole 2003) és a relax (Bieri 2011) is használható.

A kapott adatok további értelmezésére csak néhányat említünk itt. Az egyik alkalmazás az, hogy a rendparaméterekből ki lehet számolni a gerinckonformációs mozgások entrópia tagját, így egy fehérjekomplex képződése esetében a folyamat entrópiaváltozásának egyik fontos elemét kaphatjuk meg közvetlen módon, amely egy jó becslést jelent aminosav egységekre lebontva (Jarymowycz 2006). A szabad és kötött állapot közötti teljes láncra számolt összegek különbségéből kaphatjuk meg a következőképpen (Yang 1996):

$$\Delta S_{\text{konf,gerinc}} = \sum_i \Delta S_{i,\text{gerinc}} = \sum_i R \ln \frac{3 - \sqrt{1 + 8 S_{i,\text{komplex}}}}{3 - \sqrt{1 + 8 S_{i,\text{szabad}}}}$$

ahol  $\Delta S_{\text{konf,gerinc}}$  a gerinc konformációs mozgásaiból számolt összentrópiaváltozás a komplexképződés során, míg  $\Delta S_{i,\text{gerinc}}$  ugyanez egy adott aminosavra számolva,  $R$  az egyetememes gázállandó és  $S_{i,\text{szabad}}$  és  $S_{i,\text{komplex}}$  a szabad és a komplex adott aminosav egységeire számolt rendparaméter (az  $S^2$  érték négyzetgyöke). A másik alkalmazás pedig a rendparaméterek felhasználása a fehérjerendszer molekuladinamikai szimulációja során. E megközelítés az  $S^2$  értékeket megkötésként alkalmazza a szimuláció során (Richter 2007). Az így lefuttatott, egyszerre legalább nyolc molekulából álló „sokaságra” (replikákra) alkalmazott molekuladinamikai szimuláció pontosabb dinamikai modelljét eredményezi a tanulmányozott fehérjerendszernek. Hasonló módon a hagyományos molekuladinamikai szimulációk

megbízhatóságának ellenőrzésére is alkalmazhatók a rendparaméterek: ugyanis a kapott modell sokaságból ki lehet számítani a rendparamétereket, majd ezeket összevetni a mérésekből kapott értékkel (Best 2004).

#### 4.1.4. A cserefolyamatok

Ha egy fehérje molekulának egyszerre két – vagy több – formája is jelen van egy mért oldatban (és a két forma egymástól különböző kémiai környezetet jelent), amelyek egymással dinamikus egyensúlyban vannak, ez a tény többféle módon befolyásolhatja a mért spektrumon megjelenő jelek alakját. Ezt nevezzük cserejelenségeknek (Palmer 2014, Batta 2018c). Alapvetően két alapeset fordulhat elő: a két állapotnak két különböző jele jelenik meg a spektrumon (ez a lassú csere) vagy a két állapot jeleinek egy átlagjelét detektálhatjuk (ez a gyors csere). Hogy melyik eset valósul meg, az attól függ, hogy a csere sebessége ( $k_{ex}$ ) és a detektált atommag kétféle állapotához tartozó Larmor-frekvenciájának különbsége ( $\Delta\nu$ ) hogyan viszonyul egymáshoz. A lassú csere esetében  $k_{ex} \ll \Delta\nu$ , míg a gyors csere akkor valósul meg, ha  $k_{ex} \gg \Delta\nu$ . A kettő közötti állapot a közepes csere esete (ha  $k_{ex} \approx \Delta\nu$ ), ami átmenetet képez a kettő között, és azt eredményezi, hogy a jelek szélessége megnő, intenzitása csökken. Ez akár azt is okozhatja, hogy a jelek teljesen kiszélesednek és egyáltalán nem lesznek detektálhatók.

#### 4.1.5. Diffúziós mérések és a molekulák méretének összefüggése

A fehérje molekulák translációs diffúziójának mérésére is lehetőséget ad az NMR spektroszkópia, ráadásul ehhez izotópjelöletlen minta is elegendő. A megfelelő pulzusszekvencia pszeudo-2D spektrum felvételét teszi lehetővé: vagyis  $^1\text{H}$  spektrumok sorozatát mérjük, miközben gradienspulzust használunk (Price 1997, Price 1998). A mért spektrumok C-H régióit használjuk fel az elemzésre; a különböző régiók integráljának gradienstől függő görbéjére kell illeszteni a Stejskal-Tanner egyenletet:

$$I = I_0 e^{-\gamma_H^2 G^2 \delta^2 (\Delta - \delta/3) D},$$

ahol  $I$  a kijelölt régió integrálja,  $I_0$  ez az integrál a kiindulási állapotban a diffúzió előtt (a maximális érték), a  $\gamma_H$  a proton giromágneses együtthatója,  $G$  a gradienserősség,  $\delta$  a gradiens hossza időben,  $\Delta$  a diffúziós idő és  $D$  a translációs diffúziós együttható (az illesztett paraméter). A diffúziós mérések kiértékelését a spektrum felvételét követően a Bruker TopSpin szoftver beépített modulja lehetővé teszi.

A diffúziós együtthatóból gömbszimmetriát feltételezve a molekulák méretét, pontosabban a molekula hidrodinamikai sugarát lehet kiszámítani a Stokes-Einstein egyenlet segítségével:

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta r_H}$$

ahol  $k_B$  a Boltzmann-állandó,  $T$  a hőmérséklet,  $\eta$  az oldat viszkozitása (ez is függ a hőmérséklettől),  $r_H$  a hidrodinamikai sugár. A gömbtől eltérő alakú molekulák esetében látszólagos hidrodinamikai sugárnak nevezhetjük ezt az értéket (Batta 2018d).

A fehérjék molekulatömege és translációs diffúziós együtthatója összefügg egymással, mégpedig a rendezett és rendezetlen fehérjék esetében két különböző egyenlet alapján (F Dudás 2019). A megállapított empirikus összefüggések 287 K hőmérsékleten:

(a) rendezetlen fehérjék esetében:  $\lg D = -0,507 \lg M - 8,169$ ;

(b) rendezett fehérjék esetében:  $\lg D = -0,381 \lg M - 8,499$ .

Ezen összefüggések segítségével egy fehérje aggregációs tulajdonságait is jellemezhetjük, hiszen a diffúziós állandóból számolt a valódi moláris tömeg aránya utal az aggregáció mértékére.

## 4.2. Kísérletek

### 4.2.1. A mért fehérjék előállítása

A fehérjék NMR spektroszkópiával végzett vizsgálatához legtöbbször izotópjelölt mintákra van szükség, főként  $^{15}\text{N}$ - és  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ -jelölt fehérjékre. (Az izotópjelöletlen mintákat is lehet használni különböző speciális célokra, például a diffúziós mérésekre vagy homonukleáris spektrumok alapján végzett asszignációra kisebb méretű fehérjék esetében.) Ezeket legtöbbször valamilyen expressziós rendszerből, géntechnológiai úton állítjuk elő. Az izotópjelöletlen fehérje minták előállítása ezzel a módszerrel régóta ismert, nagyon elterjedt és mind laboratóriumi, mind ipari körülmények között rutinszerűen használják (erről bővebb információ található többek között itt: Alexa 2018), s az izotópjelölt minták előállítása ehhez képest egy kisebb módosítással végezhető. A következőkben a doktori munkám során használt bakteriális expressziós módszert ismertetem röviden.

Ennek lényege, hogy a hatékony expresszió céljából *Escherichia coli* baktériumokat genetikailag úgy módosítunk, hogy azok nagy mennyiségben állítsák elő a számunkra fontos fehérjéket. A megfelelő fehérjét kódoló DNS-szekvenciát egy kisméretű cirkuláris DNS egységbe, az úgynevezett plazmidba szerkesztjük endonukleázok és DNS-ligáz enzimek segítségével, majd ezt a sejtekbe juttatjuk a transzformálás folyamata során. A transzformált sejteket Luria-Bertani (LB) tápoldatban növesztjük. A növesztést követően indítjuk el az expressziót IPTG hozzáadásával. A  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ -jelölt minták előállítása esetében a felnövesztett sejteket egy másik, úgynevezett minimál tápoldatba helyezük, amelyben már csak izotópjelölt nitrogén- ( $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ ), illetve szénforrás ( $^{13}\text{C}$ -glükóz) van jelen. Ha  $^{15}\text{N}$ -jelölt mintát állítunk elő,

akkor a glükózt izotópjelöletlen formában adjuk ugyanebbe a minimál tápoldatba. Ezt követően indítjuk be az expressziót. A baktériumok így a megfelelő izotópokat fogják beépíteni saját és a termelni kívánt fehérjékbe. A plazmidban egy *lac*-operon alapú szabályozórendszer működik, ami az IPTG (laktóz analóg) hatására képes a transzkripciót aktiválni, így szabályozható általa, hogy mikor hagyjuk a sejteket szaporodni (ekkor saját fehérjéiket termelik elsősorban), és mikor indítjuk el a termelni kívánt fehérje expresszióját a bejuttatott plazmidokról (ekkor viszont már alig osztódnak tovább a sejtek). Ezután a szakasz után következik a sejtek feltárása – gyakran fagyasztás és ultrahangos szonikálás segítségével. Ezt követően a sejtartalomtól el kell választanunk a célfehérjét, hogy tiszta oldatot kapjunk az *in vitro* vizsgálatokhoz – ez a fehérjetisztítás szakasza. Erre is több módszer létezik – ebben már nem különbözik az izotópjelölt és a jelöletlen fehérjék előállítása. Általában többféle tisztítást szokás egymás után sorban végezni – ez lehet affinitás kromatográfia, méretkizárásos kromatográfia (SEC, gélszűrés), nagynyomású kromatográfia (HPLC, főként fordított fázisú), ioncsere kromatográfia, néha még a dialízis és kisebb ellenálló peptidek esetében a forralással történő kicsapás is használható. Az előállított tiszta fehérjét vagy azonnal mérjük, vagy fagyasztva tároljuk a megfelelő pufferben (elsősorban -80 °C a kívánatos hosszú távon), vagy liofilizáljuk és utána fagyasztva tároljuk. A fehérje tisztaságát a tisztítás során felvett kromatogramokkal, tömegspektrometriával vagy NMR spektroszkópiával vizsgálhatjuk. Mennyiségét a tömegmérésen túl UV-látható spektrofotometria módszerével mérhetjük, bár ez is inkább közelítésnek tekinthető, mintsem nagyon pontos koncentrációmérésnek. Az ilyen módon előállított, az expresszió során 1 liter médium felhasználásával készült izotópjelölt fehérjék átlagos mennyisége 1-10 mg szokott lenni.

A doktori munkám során a mérésekhez felhasznált fehérjék előállításának pontos leírása a munka alapját képező közleményekben megtalálható (Pálfy 2016, Biri-Kovács 2017, Ecsédi 2018). Noha egyes minták előállításában én is segédkeztem (mint például <sup>13</sup>C,<sup>15</sup>N-jelölt S100A4Δ13, valamint az összes miozinfragmens esetében), sőt valamelyiket teljesen egyedül is én készítettem (a <sup>13</sup>C,<sup>15</sup>N-jelölt M78A), munkám fő részét nem ez képezte, mivel javarészt a kooperációs partnereinktől kaptuk a fehérjéket a mérésekhez. A következőkben ezért inkább az előállított és felhasznált minták pontos szekvenciáját és az előállítás jellegzetességeit foglalom össze a jobb átláthatóság érdekében.

A humán S100A4 (Uniprot azonosítója: P26447) esetében háromféle változattal dolgoztunk, a vadtypusúval (S100A4<sup>1-101</sup>, jelölése: S100A4), a C-terminális végén 9 és 13 aminosavval rövidített változatokról (előbbi tehát S100A4<sup>1-92</sup>, jelölése: S100A4Δ9, utóbbi pedig S100A4<sup>1-88</sup>, jelölése: S100A4Δ13). Mindegyiket ugyanolyan módszerrel állítottuk elő, Ni<sup>2+</sup>-affinitás kromatográfias tisztítás miatt His<sub>6</sub>-taggal fuzionáltatva, így a His<sub>6</sub>-tag enzimatis lehasítása

után az N-terminális végen egy GSHM szakasz maradt (expressziós maradék). Az S100A4-et izotópjelületlen és  $^{15}\text{N}$ -jelölt, az S100A4 $\Delta$ 9-et  $^{15}\text{N}$ -jelölt és a S100A4 $\Delta$ 13-at  $^{15}\text{N}$ - és  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ -jelölt formában is előállítottuk.

A humán ezrin (Uniprot azonosítója: P15311) esetében a két fő doménjét külön-külön előállítottuk: az N-ERMAD az ezrin<sup>1-296</sup> és a C-ERMAD az ezrin<sup>516-560</sup> szakasza. Az N-ERMAD-ot is  $\text{Ni}^{2+}$ -affinitás kromatográfiával tisztítottuk, így tartalmazza a GSHM expressziós maradékot, míg a C-ERMAD-ot glutation-S-transzferáz (GST) fúziós fehérjével állítottuk elő, hogy glutation affinitás kromatográfiával tisztíthassuk és beépítettünk még egy ciszteint is a fluoreszcenciával történő jelöléshez, így GSC maradt az enzimatis hasítás után expressziós maradék formájában az N-terminális végén. Mindkét fehérjét csak izotópjelületlen formában használtuk.

A humán p53 (Uniprot azonosítója: P04637) esetében az N-terminális TAD domént használtuk, azaz a p53<sup>1-60</sup> szakaszt (jelölése p53TAD). Ezt is GST fúziós módszerrel állítottuk elő, így GS expressziós maradék van az N-terminális végén. Ezt mind izotópjelületlen, mind  $^{15}\text{N}$ -, mind  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ -jelölt formában elkészítettük és használtuk.

A nemizom-miozinokból sokféle fragmenst állítottunk elő. A humán NMIIA (Uniprot azonosítója: P35579) fehérjéből készült az R1893Y-NMIIA<sup>1893-1937</sup> (jelölése: MPT), ahol az első tirozin a koncentrációmérés céljából lett beépítve, ez az NMIIA S100A4-et kötő régiója, amelyet már korábban is tanulmányoztak (Kiss 2012), ezért használtuk mi is ezt. Az NMIIA<sup>1850-1960</sup> (jelölése: M111A) fragmenst is vizsgálták korábban (Badyal 2011), ez tartalmazza a C-terminális rendezetlen régiót és a coiled coil szakasz végét. Ennek három helyen módosított mutáns változatát a coiled coil stabilitásának növelése céljából állítottuk elő (*a* és *d* pozíciókban cseréltük az alanint leucinra): az A1882L, A1886L, A1889L-NMIIA<sup>1850-1960</sup> (jelölése: M111A-L). Emellett előállítottuk a teljes rendezetlen C-terminális farokrégiót önállóan, ez a R1893Y-NMIIA<sup>1893-1960</sup> (jelölése: M67A), az MPT meghosszabítása a C-terminális vég irányában. A coiled coil nélküli M67A ugyanis a kontroll a foszforiláció és a coiled coil szakasz kölcsönhatásának vizsgálata során. A coiled coil szerkezetének tanulmányozásához három olyan fragmenst válaszottunk ki, amelyek az NMIIA coiled coil szakaszának C-terminális végén találhatóak és a heptádok mentén fokozatosan rövidítettük a korábbról ismert M111A szerkezetéből kiindulva: 11 heptádot tartalmaz az NMIIA<sup>1850-1927</sup> (jelölése: M78A), 8 heptádot tartalmaz az NMIIA<sup>1850-1906</sup> (jelölése: M57A), és 5 heptádot tartalmaz a NMIIA<sup>1850-1885</sup> (jelölése: M36A). A humán NMIIB (Uniprot azonosítója: P35580) esetében az M111A-val analóg az NMIIB<sup>1856-1960</sup>-t (jelölése M121B) állítottuk elő, továbbá egy, a két fehérjéből készült kiméra fragmenst is, amely az NMIIA coiled coil régióját és az NMIIB C-terminális farok régióját

tartalmazza: NMIIA<sup>1850-1923</sup>–NMIIB<sup>1931-1960</sup> (jelölése: M121AB). Ez utóbbira kifejezetten az NMR mérések miatt volt szükség, mert az ehhez szükséges körülmények között (pH 6-7 puffer oldatban) az M121B kicsapódott, és a két fehérje coiled coil régiója nem különbözik jelentősen funkciójukban, ezért az NMIIB foszforilációját a kiméra fehérjén keresztül is lehet tanulmányozni. Mindegyik fragmenst Ni<sup>2+</sup>-affinitás kromatográfiás tisztítással állítottuk elő, ezért GSHM expressziós maradékot tartalmaznak az N-terminális szakaszukon, kivéve az MPT-t és az M67A-t, mert azokat ubikvitin fúziós fehérjével termeltük, ami expressziós maradék nélkül eltávolítható.

A foszforilációkat minden esetben a saját laboratóriumunkban expresszált CK2 $\alpha$  kinázzal végeztünk, 4-5 mM ATP (ötszörös koncentráció a fehérjéhez képest), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 150 mM NaCl, 1 mM TCEP, 20 mM MES puffer összetételű oldatban, ami 20% CK2 $\alpha$  enzim-törzsoldatot (pontos koncentrációja ismeretlen, de az MS és NMR eredmények alapján a foszforiláció teljesen végbement) és a foszforilálandó tartalmazta. A mintákat mérés előtt szobahőmérsékleten 4-6 óráig inkubáltuk. Ilyen módon előállítottuk az M67A, M111A, M111A-L, M121B, M121AB fragmensek foszforilált változatait (jelölésük: M67A-P, M111A-P, M111A-L-P, M121B-P, M121AB-P). Az eddig felsorolt miozinfragmensek közül izotópjelületlen formában előállítottuk és használtuk az összeset, <sup>15</sup>N-jelölt formában is elkészítettük mindet, kivéve M121B-t, M121B-P-t és az MPT-t, viszont <sup>13</sup>C,<sup>15</sup>N-jelölt formában csak az MPT-t és az M78A-t.

A <sup>15</sup>N-M121AB foszforilációjának kinetikáját is vizsgáltam úgy, hogy az NMR-csőben történő reakciót követtem 25 percenként egy <sup>1</sup>H,<sup>15</sup>N-HSQC spektrum felvételével a kiindulástól kezdve a 405. percig.

#### 4.2.2. NMR minták

Az S100A4 mintákat 0,2-1 mM koncentrációban (dimerre nézve) mértük 20 mM MES pufferben (pH 5,4 és 6,2 között), ami még tartalmazott 20-150 mM NaCl-ot, 10 mM CaCl<sub>2</sub>-ot, 5-10 mM TCEP-et, 3 mM NaN<sub>3</sub>-ot. Az MPT fragmenst, az N-ERMAD és C-ERMAD, a p53TAD fehérjéket ugyanilyen oldatban mértük, kivéve, hogy ezek nem tartalmaztak CaCl<sub>2</sub>-ot. A komplexek esetében a minták legalább 1:1 arányban tartalmazzák az S100A4 dimert és a kötőpartnert (a nem detektált kölcsönható partnert általában feleslegben adtuk a rendszerhez). Az ezrin és S100A4 kölcsönhatásának vizsgálata esetében N-ERMAD és S100A4 $\Delta$ 9 dimer 1:1 arányú komplexének mérését követően először 1 ekvivalens, majd még ugyanennyi, így összesen végül 2 ekvivalens C-ERMAD-ot adtunk hozzá a rendszerhez. A kötődés vizsgálatára és az asszignáció megkönnyítése érdekében a <sup>15</sup>N-S100A4 $\Delta$ 9-et titráltuk jelületlen C-ERMAD-dal a következő C-ERMAD : <sup>15</sup>N-S100A4 $\Delta$ 9 dimer molarányokban: 0,00; 0,28; 0,56; 0,83; 1,11; 1,67.



Hasonlóképpen a  $^{15}\text{N}$ -S100A4-et jelöletlen p53TAD-dal titráltuk: 0,00; 0,32; 0,42; 0,53; 0,64; 0,74; 0,85; 1,17 p53TAD :  $^{15}\text{N}$ -S100A4 dimer mólarányokban.

A miozinfrafragmensek vizsgálata esetében 0,5–1 mM töménységű fehérjéket használtam (monomerre nézve a coiled coilok esetében is) 20 mM MES pufferben (pH 6,0 és 6,7 között), ami még tartalmazott 20-150 mM NaCl-ot és 3 mM  $\text{NaN}_3$ -ot. Minden NMR-mintához 10%  $\text{D}_2\text{O}$ -ot adtunk, és belső standardként 1% DSS-t használtunk. Ennek jele az  $^1\text{H}$  jelek referenciája, a  $^{13}\text{C}$  és  $^{15}\text{N}$  kémiai eltolódásokat viszont indirekt úton, a IUPAC által ajánlott módon referenciáltam a giromágneses együtthatók arányai alapján (megtalálható itt: [http://www.bmrb.wisc.edu/ref\\_info/cshift.shtml](http://www.bmrb.wisc.edu/ref_info/cshift.shtml), letöltés ideje: 2019. 02. 07.). A hőmérsékletet standard glikol és metanol oldat alapján kalibráltuk.

#### 4.2.3. NMR mérések

A méréseket javarészt az ELTE Bruker Avance III 700 MHz spektrométerén végeztem z-gradienssel rendelkező 5 mm-es szobahőmérsékletű mérőfejjel (spektrométer referenciák:  $^1\text{H}$ : 700,13 MHz,  $^{15}\text{N}$ : 70,94 MHz,  $^{13}\text{C}$ : 176,06 MHz). Az MPT- $^{13}\text{C}$ , $^{15}\text{N}$ -S100A4 $\Delta$ 13 komplexet asszignáció céljából ezen túl a Firenzei Egyetem is mértük Bruker Avance III 900 MHz-es, krio mérőfejjel felszerelt készüléken (spektrométer referenciák:  $^1\text{H}$ : 898,56 MHz,  $^{15}\text{N}$ : 91,05 MHz,  $^{13}\text{C}$ : 225,94 MHz) és ugyanitt egy Bruker Avance 700 MHz TXO szobahőmérsékletű mérőfejjel  $^{13}\text{C}$ -detektált mérés esetén (spektrométer referenciák:  $^1\text{H}$ : 700,06 MHz,  $^{15}\text{N}$ : 70,93 MHz,  $^{13}\text{C}$ : 176,03 MHz).

A jelazonosítás céljából 300 K hőmérsékleten a  $^{13}\text{C}$ , $^{15}\text{N}$ -S100A4 $\Delta$ 13 és az MPT- $^{13}\text{C}$ , $^{15}\text{N}$ -S100A4 $\Delta$ 13 komplexet (MPT izotópjelöletlen), 283 K hőmérsékleten a szabad állapotú  $^{13}\text{C}$ , $^{15}\text{N}$ -MPT esetében készültek  $^1\text{H}$ , $^{15}\text{N}$ -HSQC, HNCA, HN(CO)CA, HNCACB, CC(CO)NH, HNCO mérések, a komplexről ezen kívül készült BEST-HNCACB (900 MHz), CON, CACO (700 MHz TXO) mérések. A szabad állapotú  $^{13}\text{C}$ , $^{15}\text{N}$ -p53TAD-ot és S100A4- $^{13}\text{C}$ , $^{15}\text{N}$ -p53TAD komplexet (S100A4 izotópjelöletlen) 313 K hőmérsékleten, a  $^{13}\text{C}$ , $^{15}\text{N}$ -M78A-t 298 K hőmérsékleten mértük, és az asszignáció a következő spektrumok alapján történt:  $^1\text{H}$ , $^{15}\text{N}$ -HSQC,  $^1\text{H}$ , $^{15}\text{N}$ -SOFAST-HMQC, BEST-HNCACB, BEST-HN(CO)CACB, BEST-HNCO, BEST-HNCA, BEST-HN(CO)CA,  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ -HSQC, MUSIC-GLY, MUSIC-SER. A jelazonosítás korábbi asszignációk és  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC, TOCSY-HSQC (keverési idő: 70 ms), NOESY-HSQC (keverési idő: 150 ms) alapján történt a  $^{15}\text{N}$ -S100A4 $\Delta$ 9, a C-ERMAD- $^{15}\text{N}$ -S100A4 $\Delta$ 9 komplex (C-ERMAD izotópjelöletlen)  $^{15}\text{N}$ -S100A4, a p53TAD- $^{15}\text{N}$ -S100A4 komplex (p53TAD izotópjelöletlen),  $^{15}\text{N}$ -M111A és  $^{15}\text{N}$ -M111A-P,  $^{15}\text{N}$ -M67A,  $^{15}\text{N}$ -M67A-P,  $^{15}\text{N}$ -M121AB,  $^{15}\text{N}$ -M121AB-P,  $^{15}\text{N}$ -M57A,  $^{15}\text{N}$ -M36A esetében.

A hőmérsékletfüggés vizsgálata céljából  $^1\text{H}, ^{15}\text{N}$ -HSQC spektrumokat mértünk a  $^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}$ -MPT esetében 283–310 K tartományban (283, 288, 293, 298, 303 és 310 K hőmérsékleteken), a  $^{15}\text{N}$ -S100A4 $\Delta$ 9, a C-ERMAD- $^{15}\text{N}$ -S100A4 $\Delta$ 9 komplex, a  $^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}$ -M78A, a  $^{15}\text{N}$ -M57A és a  $^{15}\text{N}$ -M36A esetében 278–323 K között 5 K egységenként, valamint a  $^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}$ -M78A esetében  $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -HSQC spektrumokat ugyanezekben a hőmérsékleteken. A titrálási kísérleteket az asszignáció hőmérsékletén (300 K) végeztük és minden lépésnél  $^1\text{H}, ^{15}\text{N}$ -HSQC spektrumokat vettünk fel ugyanolyan paraméterekkel. Az N-ERMAD és a C-ERMAD  $^{15}\text{N}$ -S100A4 $\Delta$ 9-hez való kötődési vizsgálataiban is  $^1\text{H}, ^{15}\text{N}$ -HSQC spektrumokat mértünk azonos paraméterekkel.

A dinamikai vizsgálatokat a hagyományos  $T_1$ ,  $T_2$ , steady-state heteronukleáris  $^1\text{H}, ^{15}\text{N}$ -NOE (HetNOE) mérések alapján végeztük a 700 MHz-es saját készülékünkön minden esetben  $^{15}\text{N}$ -jelölt minták ( $^{15}\text{N}$ -S100A4 $\Delta$ 13, MPT- $^{15}\text{N}$ -S100A4 $\Delta$ 13 komplex,  $^{15}\text{N}$ -p53TAD, S100A4- $^{15}\text{N}$ -p53TAD komplex,  $^{15}\text{N}$ -M111A és  $^{15}\text{N}$ -M111A-P,  $^{15}\text{N}$ -M78A,  $^{15}\text{N}$ -M57A és  $^{15}\text{N}$ -M36A) esetében az asszignáció hőmérsékletén. A  $T_1$  és  $T_2$  méréseket 10-12 különböző késleltetési idő használatával mértük, tipikusan 0,005-10,00 s között a  $T_1$  és 0,0170-1,3568 s között a  $T_2$  esetében, amely mérési pontokra exponenciális görbét illesztve kaptuk meg az  $R_1$  és  $R_2$  paramétereket. A mért dinamikai a redukált spektrális sűrűség elemzés módszerével dolgoztam fel a  $^{15}\text{N}$ -p53TAD és S100A4- $^{15}\text{N}$ -p53TAD komplex és az NMII fragmensek esetében, Lipari-Szabó modellfüggetlen analízissel pedig  $^{15}\text{N}$ -S100A4 $\Delta$ 13, MPT- $^{15}\text{N}$ -S100A4 $\Delta$ 13 komplex és S100A4- $^{15}\text{N}$ -p53TAD komplex esetében. Az ezekhez használt paraméterek az ismert fizikai állandókon kívül a következők voltak:  $r_{\text{NH}} = 1,02 \text{ \AA}$ ,  $\Delta\sigma_{\text{N}} = -172 \text{ ppm}$ , hiszen ez jó közelítésnek tekinthető korábbi adatok alapján (Korzhnev 2001) és  $B_0 = 16,44 \text{ T}$ . A Lipari-Szabó analízist axiális anizotrópia megközelítéssel végeztem, az ehhez használt szerkezetek:  $^{15}\text{N}$ -S100A4 $\Delta$ 13 esetében a 2MRD (Cho 2015), a MPT- $^{15}\text{N}$ -S100A4 $\Delta$ 13 komplex esetében a 2LNK (Elliott 2012). Mindkét esetben a 89–101. aminosavakat töröltem a PDB-fájlból, mivel a C-terminális farok régiót nem tartalmazza az általunk mért S100A4 $\Delta$ 13 fehérje, illetve az első NMR-szerkezetet használtam fel a sokaságból. Az S100A4- $^{15}\text{N}$ -p53TAD komplex esetében az általunk végzett molekuladinamikai szimulációk átlagszerkezetei.

A translációs diffúziós méréseket jelöletlen és  $^{15}\text{N}$ -jelölt mintákon végeztük: S100A4 $\Delta$ 9, C-ERMAD-S100A4 $\Delta$ 9 komplex, N-ERMAD-S100A4 $\Delta$ 9 komplex és a C-ERMAD-S100A4 $\Delta$ 9-N-ERMAD 1:1:1 arányú (S100A4 $\Delta$ 9 dimerre nézve) keveréke esetében 300 K hőmérsékleten, az M67A, M67A-P, M111A, M111A-P, M111A-L, M111A-L-P, M78A, M57A és M36A esetében pedig 278–323 K tartományban 5 K egységenként minden hőmérsékleten. Minden esetben a diffúziós gradienst 32 lépésben változtattuk, a maximális érték, 45,4 G/cm 6-98%-a

között, és kétszer vagy háromszor ismételtük a méréseket (ezek esetében ugyanazokat az integrálási régiókat használtuk), amelyekből származó eredmények átlaga lett a végleges mért diffúziós együttható.

#### *4.2.4. Felhasznált szoftverek*

A mérésekhez Bruker TopSpin 3.2 és 3.6pl változatait használtuk, az asszignációhoz a CARA, a SPARKY és NMRFAM-SPARKY szoftvereket, a hőmérsékleti koefficiensok kiszámolásához lineáris illesztést a Microcal Origin 6.0 és a Pro 8.0, valamint a Microsoft Excel 2010 segítségével végeztem. A titrálásokhoz a globális illesztést a Microsoft Excel 2010 Solver funkciójával készítettem (ennek hátránya, hogy hibaszámításra nem adott lehetőséget). A dinamikai mérések kiértékeléséhez a SPARKY és NMRFAM-SPARKY szoftvereket, a redukált spektrális sűrűség analízist a Microsoft Excel 2010 segítségével, a Lipari-Szabó modellfüggetlen analízist pedig a FAST-Modelfree programokkal készítettem. A rotációs diffúziós tenzor becslését a HYDROPRO (García 2000) nevű szoftverrel végeztem. A translációs diffúziós mérések kiértékelését a Bruker TopSpin beépített  $T_1/T_2$  moduljával készíttem. A p53TAD-S100A4 komplex vizsgálata esetében az molekuladinamikai szimulációkból kapott szerkezeti sokaságokat és az NMR spektroszkópiai mérésekből nyert adatot a CoNSEnsX+ webszerver (Neal 2003, Dudola 2017) segítségével vettem össze, amely mind a kémiai eltolódásokat, mind a rendparamétereket képes kiszámolni az MD-sokaságokból és ezt a mért paraméterekkel összehasonlítja (korrelációt számol).

## 5. Kiegészítő módszerek

### 5.1. Tömegspektrometria

#### 5.1.1. A mérések elvi háttere

A fehérjék pontos tömege jellemző a molekulákra, ezért a tömegspektrometriát (MS) rutinszerűen alkalmazzák a termelt fehérje minta molekulatömegének ellenőrzésére, így a várttól eltérő szekvencia (véletlen hibák a fehérje bomlása vagy egyéb okok miatt) gyorsan felderíthető, valamint az izotópbeépülés is ellenőrizhető NMR minták készítése esetén. Mindemellett az MS számos egyéb szerkezeti kérdésre is választ adhat, ilyen például a fehérjék poszttranszlációs módosításainak jelenléte, sőt mintázatának felderítése.

Doktori munkám során ez utóbbi módon is használtuk az MS módszert, ugyanis a vizsgált miozinfrafragmensek foszforilációját ezzel a módszerrel is kimutattuk és ellenőriztük. Tömegspektrometria segítségével nem csak a foszforiláció jelenléte és a foszforilált aminosavak száma mutatható ki (hiszen ezek egyértelmű tömegnövekedést okoznak a fehérjén), hanem a foszforilációs helyek is meghatározhatók (Drahos 2018). Ennek a módszernek az a lényege, hogy a vizsgálat előtt a mintákat valamilyen proteáz enzim (többnyire tripszin vagy kimotripszin) segítségével kisebb peptid egységekre bontjuk. A szekvencia és az enzim hasítóhelyeinek ismeretében e peptid egységek várható tömege könnyen kiszámítható, és a tömegspektrometriás módszerrel detektált peptidek mért molekulatömegei alapján kimutatható, hogy melyik foszforilálódott (az összes várható peptid tömegét erre a célra készített szoftverekkel gyorsan ki lehet számítani). Mivel ismert, hogy a foszforiláció csak szerinen, treoninon vagy tirozinon történhet, a foszforilációs helyek jól azonosíthatók. A vizsgálatához gyakran HPLC segítségével elválasztják a peptideket egymástól és közvetlenül mérik a különböző frakciókban eluálódó peptidek tömegét (HPLC-MS módszer). Ha tudunk alkalmazni tandem MS/MS módszert is, akkor egy adott peptiden belül a fragmentációt figyelembe véve egyértelműen meghatározható a foszfátcsoport helye.

Hozzá kell tennünk, hogy nem minden esetben egyszerű viszont a foszforilált peptid detektálása tömegspektrometriával. A tömegspektrometriás vizsgálatra kerülő molekulák ionizációs készsége ugyanis nagyban befolyásolja a módszer érzékenységét, és a foszforilált peptidek kevésbé hajlamosak pozitív töltéseket hordozó ionokat létrehozni a többi peptidhez képest nagy negatív töltésük miatt, így nehezebben is lehet detektálni őket. Ennek a problémának áthidalására dúsítós eljárást szoktak alkalmazni az enzimátikus hasítás és HPLC-MS mérés között, amelynek lényege, hogy bizonyos fém-oxidok, így a  $\text{TiO}_2$  vagy  $\text{ZrO}_2$  mikrorészecskék

felületén a foszforilált peptidek erősebben kötődnek, mint a foszfát-csoport nélküli fragmensek. Így az adszorpciót, inkubálást és elúciót többször ismételve a foszforilált peptidfragmensek feldúsulnak a mért mintában, így már megfelelő érzékenységgel lehet ezeket detektálni a tömegspektrometriás mérés során (Cuccurullo 2007, Pocsfalvi 2007).

### 5.1.2. Az elvégzett vizsgálatok

A HPLC-MS vizsgálatokat az ELTE Bruker Daltonics Esquire 3000plus ioncsapdával rendelkező ESI-MS készülékén végeztük (az MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoportban). A mérések során az MS-hez *online* kapcsoltuk a HPLC berendezést. A foszforilációt izotópjelöletlen mintákon vizsgáltuk az M67A, M111A, az M121B és az M121AB esetében minden esetben közel 200 µg kiindulási mennyiségű fehérje felhasználásával, kontrollként pedig a natív mintákat használtuk. Az enzimátikus hasítást tripszinnel végeztük, amelyet 1:100 arányban adtunk a fehérjékhez 50 mM CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub> pufferben, majd egész éjszakán keresztül 37 °C-on inkubáltuk a reakcióelegyet. A foszfopeptidek dúsítását Eppendorf-csőben végeztük, 6 mg TiO<sub>2</sub> felhasználásával. Az emésztményt 100 µl-es egységekben adagoltuk a TiO<sub>2</sub>-részecskékhez, majd 30 perc szobahőmérsékletű inkubálást követően savas közegben távolítottuk el a nem kötődő peptideket, és ezt többször is elvégeztük, a kiindulási fehérjeoldat teljes felhasználásáig. A kötődő foszforilált peptideket ezután lúgos pufferrel eluáltuk, majd HPLC-be injektáltuk. A HPLC-s elválasztáshoz C18 analitikai oszlopot használtunk. Az elválasztás gradiens elúcióval történt 0-80%-ig folytonosan változtatott acetonitril tartalmú vizes oldatot (végig 0,1% HCOOH mellett). Az MS-spektrumok alapján meghatároztuk az egyes peptidek molekulatömegét. A foszforilációs helyek igazolásához tandem tömegspektrometriás méréseket is végeztünk, így azonosítani tudtuk a foszforiláció pontos helyét. Az adatfeldolgozást Bruker Data Analysis 5.1 szoftverrel végeztük.

## 5.2. Elektronikus cirkuláris dikroizmus spektroszkópia

### 5.2.1. A módszer bemutatása

A fehérjék másodlagos szerkezeteinek vizsgálatára gyors és hatékony megoldást nyújt az elektronikus cirkuláris dikroizmus (ECD) spektroszkópia (Farkas 2018). Ez egy olyan kiroptikai spektroszkópiai módszer, amely azon a jelenségen alapszik, hogy az optikailag aktív molekulák (ilyen minden fehérje) eltérő módon nyelik el a jobbra és a balra cirkulárisan polarizált fényt. Mivel a másodlagos szerkezeti elemeket főként a peptidkötések közötti másodrendű kötések stabilizálják, így a különböző másodlagos szerkezetekben ezen kötések relatív térállása jelentősen különbözik. Emiatt a peptidkötések elektronátmeneteihez tartozó ECD-spektrumok nagyon érzékenyen mutatják ki a másodlagos szerkezeti elemek jelenlétét: egészen más az  $\alpha$ -hélix, a  $\beta$ -redő, a  $\beta$ -kanyar és a rendezetlen szerkezetű szakaszok spektruma. Ezek vizsgálata a távoli UV-tartományban történik (190–250 nm között), ugyanis e tartományban található a peptidkötés oxigénjének nemkötő elektronpárja és a peptidkötés  $\pi^*$  lazítópályája (röviden  $n-\pi^*$ ), valamint a peptidkötés legnagyobb energiájú  $\pi$  pályája és a  $\pi^*$  lazítópályája (röviden  $\pi-\pi^*$ ) közötti átmenet elnyelési sávja.

Bizonyos mértékben a másodlagos szerkezeti elemek egymáshoz való viszonya is tükröződik a spektrumokban, ilyen módon a harmadlagos szerkezetre vonatkozóan is nyerhetünk információkat (bár korlátozottabb módon). Például az  $\alpha$ -hélix szerkezeti elemre jellemző, hogy az  $n-\pi^*$  átmenet 222 nm környékén negatív elnyelési sávként jelenik meg, míg a  $\pi-\pi^*$  elnyelési sáv úgynevezett exciton felhasadást szenved, és ezért 192 nm körül egy pozitív, 208 nm körül pedig egy negatív sávpárt eredményez (ezt C-típusú spektrumnak hívják). Az egyszerű, amfipatikus hélix és az egymás köré feltekeredő coiled coil hélixek ECD-spektruma egyaránt C-típusú spektrum, viszont az  $n-\pi^*$  és  $\pi-\pi^*$  elnyelési sávok minimumok intenzitásának aránya eltér egymástól: a 222 nm és 208 nm környékén mért intenzitások aránya a coiled coil szerkezetben általában 1,0-nél nagyobb, míg az egyszerű hélix esetében kisebb (Cooper 1990, Zhou 1992). A rendezetlen szerkezeti elemek spektrumára viszont az jellemző, hogy 200 nm környékén egy intenzív negatív sávot tartalmaz, amelyre 220 nm körül egy gyenge negatív váll vagy pozitív sáv épül.

Egy globuláris fehérjében legtöbbször többféle másodlagos szerkezeti elem fordul elő, így ezek ECD-spektruma az említett görbealakok összegeként jelenik meg. Ezek dekonvolúciójából megkapható a teljes szerkezeten belül az egyes másodlagos szerkezeti elemek százalékos aránya. Erre a célra többféle szoftvert is alkalmazható, amelyek általában egy külső bázisspektrumkészlet alapján bontják fel a mért spektrumot. Az egyik ilyen leghatékonyabb szoftver

a BeStSel (Micsonai 2015), amely különösen a  $\beta$ -jellegű szerkezetek felbontásában hatékony.

A hőmérsékletfüggő ECD-spektrumok felvételével tanulmányozható a fehérjék fel-le tekeredése széles hőmérsékleti tartományban, hiszen az említett rendezett állapotoknak jelentősen különbözik a spektruma a letekeredett, rendezetlen állapotétól. Ha egy szerkezet főként  $\alpha$ -hélixre épül, akkor még egyszerűbb módon tanulmányozható a fel-le tekeredés: elegendő a teljes spektrum helyett csak 222 nm-en mérni az ECD értékének hőmérsékletfüggését, hiszen ahogy a helikális szerkezet letekeredik, az  $\alpha$ -hélix  $n-\pi^*$  átmenetének minimuma fokozatosan tűnik el: az ECD jelentős negatív értéke növekszik, 0-hoz közeledik, mert a rendezetlen szerkezetben ezen a helyen nincsen jelentős elnyelés. Így a 222 nm-en mért ECD értékek hőmérsékletfüggéséből mérhető a fehérjék letekeredésére jellemző olvadási görbe, amely a legegyszerűbb esetben egy két állapotú rendszernek (a rendezett és rendezetlen állapotoknak) megfelelő szigmoid görbe, s ennek inflexiós pontja az olvadási hőmérséklet ( $T_m$ ). Ugyanakkor természetesen ennél pontosabb képet kaphatunk a fel-le tekeredésről, ha minden hőmérsékleten a teljes spektrumot felvesszük. Ezeket az adatok az összes mért spektrumot együttes dekonvolúciójával elemezhető. Erre alkalmas a CCA+ (Perczel 1991) szoftver, amely a felhasználó által definiált módon kettő-öt különböző bázisspektrumokra bontja fel az összes spektrumot tisztán matematikai alapon. A szoftver kiválasztja a főkomponenseket, és ezek lineáris kombinációjaként bontja fel az összes spektrumot.

Az ECD spektroszkópia előnye, hogy kevés (és izotópjelöletlen) mintára van szükség a méréshez, gyors és könnyen kivitelezhető a mérés és a kiértékelés egyaránt. Igaz, nem kapunk atomi szintű szerkezetet, viszont a másodlagos szerkezeti elemek jelenlétére, arányának megállapítására, a feltekeredettségre, illetve rendezetlenség fokára, a fehérje termodinamikai paramétereinek meghatározására kiválóan alkalmas. Mivel a mért ECD értékek függenek a koncentrációtól, a kivetta vastagságától, sőt a fehérjében található peptidkromofórok mennyiségétől, azaz az aminosavtagszámtól is, ezért a mért spektrumot a hullámhossztól függő, mindezekre normált moláris ellipticitás (jele:  $[\theta]_{MR}$ ) görbe formájában szokták megadni, amelynek mértékegysége hagyományosan  $\text{deg cm}^2 \text{dmol}^{-1}$ .

### 5.2.2. Az elvégzett mérések

Az ECD-mérések az ELTE JASCO J-810 spektrométerén készültek. A hőmérséklet pontos beállítását a Peltier-típusú fűtőrendszerrel végeztük. Izotópjelöletlen fehérje mintákat használtunk 10  $\mu\text{M}$  töménységben az M111A, M111A-P, M111A-L és M111A-L-P esetében, ezekhez 20 mM pH 7,5 foszfát puffert adtunk, mivel ez a kémhatás a fiziológiához elég közeli. 222 nm-en mért ECD értéket követtük 10 mm úthosszú kvarc kivetttában mérve (ebben az oldat

össztérfogata 1 ml körüli) 278–328 K között az M111A és az M111A-P, 303–358 K között pedig az M111A-L és az M111A-L-P esetében. A fűtést 1 K / perc sebességgel és az adatok felvétele 0,4 K egységenként történt. Teljes ECD spektrumokat is mértünk a felfűtés kezdő és végállapotában a távoli UV-tartományban 1-5 scan számmal: 278 K és 328 K hőmérsékleten az M111A és az M111A-P, valamint 278 K és 358 K hőmérsékleten az M111A-L és az M111A-L-P esetében 0,4 nm felbontással. Ezeket a méréseket munkatársakkal együtt végeztük. Az M78A, M57A és M36A fragmenseket én mértem 1 mm úthosszú kvarc küvettában 30-40  $\mu\text{M}$  töménységben (az oldat össztérfogata 200  $\mu\text{l}$ ) először az NMR mintáknak megfelelő oldatban (20 mM MES, 150 mM NaCl, pH 6,0), de a nagy ionerősség miatt a spektrumok kisebb hullámhosszak esetében már nem voltak megfelelően detektálhatók, ezért megmértem ugyanezeket a mintákat 5,0 pH-jú vizes oldatban is. A felfűtést 1 K / perc sebességgel 278–358 K között végeztem, az M78A és M57A esetében 5 K egységenként, az M36A esetében csak 278, 288, 298, 308, 318 és 358 K hőmérsékleteken 3-4 perc várakozási idővel a mérés előtt. Minden hőmérsékleten egy ECD spektrumot vettem fel a távoli UV-tartományban 3-5 scan számmal 0,2 nm felbontással. A felfűtés után visszahűtöttem a rendszert a kiindulási hőmérsékletre és ott is mértem egy spektrumot ezzel ellenőrizve a denaturáció reverzibilis voltát. Minden mérés esetében a fehérje nélküli oldószert használtam a háttérérték korrigálására: ennek elnyelési értékét kivontam a mért értékekből.

A mért adatokat a JASCO Spectra Manager szoftverrel dolgoztam fel, a 222 nm-en mért ECD értékek alapján mért olvadási görbék inflexiós pontját is ezzel határoztam meg. A hőmérsékletfüggő ECD görbéket a CCA+ szoftverrel analizáltam.



## 6. Az S100A4 és komplexeinek vizsgálata

### 6.1. Az S100A4 és a nemizom IIA komplexe

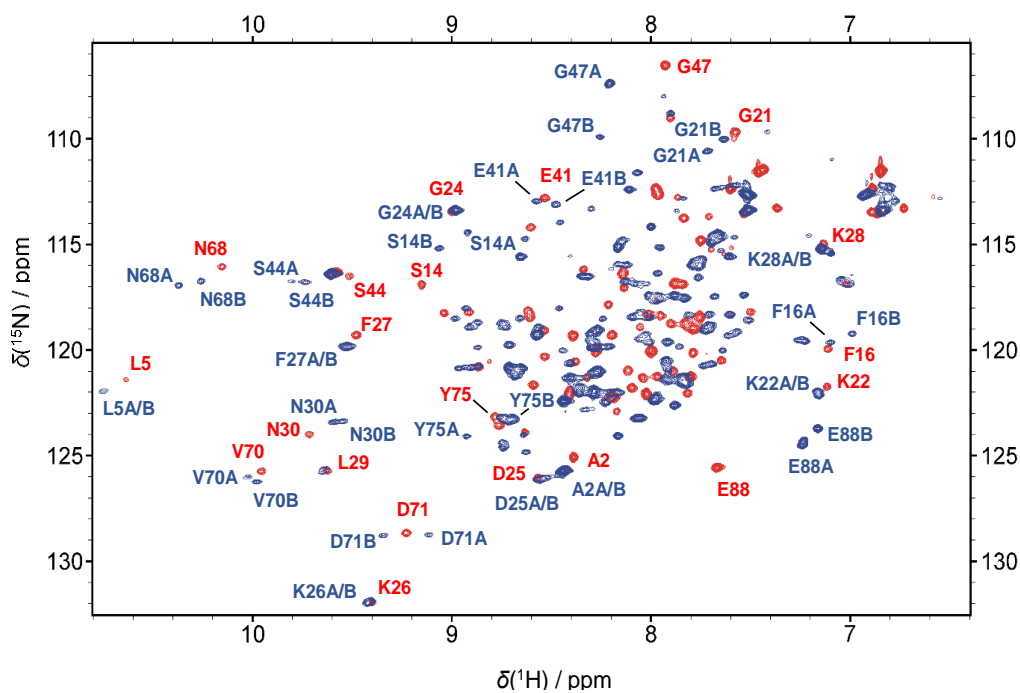
Ebben a kutatási projektben az S100A4 és NMIIA komplexét vizsgáltuk az interakció hatására létrejövő szerkezeti és főként dinamikai változások szemponjából. Az NMR dinamikai mérések és ezek diszkussziója alapján a  $\text{Ca}^{2+}$ -affinitás változására kerestük a magyarázatot, továbbá a részletes elemzés alapján egyéb tulajdonságokat is vizsgáltunk. Az S100A4 mellett az NMIIA modellezésére használt MPT szempontjából is vizsgáltuk a komplexképződés hatásait. A projekt elsődleges módszere NMR spektroszkópia, amelyben a megfelelő mérések kiértékelése, adatok elemzése és a részletes következtetések megállapítása volt az én feladatomban.

#### 6.1.1. Az S100A4-NMIIA komplex képződésének szerkezeti vonatkozásai

Az S100A4 oldaláról végzett S100A4 $\Delta$ 13-at használtunk az aggregáció elkerülése végett. A C-terminális farok hiánya korábbi eredmények alapján nem befolyásolja az MPT-kötődését (Badyal 2011, Ramagopal 2013, Duelli 2014). A szabad és a komplexben kötött S100A4 $\Delta$ 13  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ -HSQC spektrumán a keresztcsúcsok jeldiszperzitása széles, ahogyan várható is egy rendezett szerkezetű fehérje esetében (6. ábra piros jelei). A gerinc rezonanciafrekvenciáit sikeresen asszignáltam (csak a P4 és P43 jelei nem jelennek meg a HSQC spektrumon). A jelhozzárendelés a BMRB adatbázis 25136 (szabad S100A4 $\Delta$ 13) és 25208 (komplex) sorszámai alatt érhető el.

A kapott adatok alapján a meghatározott  $\text{C}^\alpha$ ,  $\text{C}^\beta$ ,  $\text{C}'$  kémiai eltolódásokból másodlagos szerkezeti predikciót készítettem az SSP-analízis módszerével (Marsh 2006) – az eredmény az 7A. ábrán és az 6. ábra szekvenciája felett látható. Az  $\alpha$ -helikális szerkezetet az SSP > 0,5 érték alapján definiáltam, ami azt jelenti, hogy a konformációs sokaság 50%-a helikális szerkezetű (Marsh 2006). Így a várható négy hélix a következő szakaszokban található: P4-S20 (H1), K31-L46 (H2), D51-S64 (H3) és F72-M85 (H4). Ez az eredmény jó összhangot mutat a korábban röntgendiffrakcióval meghatározott szerkezetekkel (ezek PDB-kódjai: 2Q91 (Malashkevich 2008), 3C1V (Gingras 2008), 3CGA (Pathuri 2008) és 4HSZ (Ramagopal 2013)). A pseudo-EF-kézben található L1 hurok és a kanonikus EF-kézben található L3 hurok  $\beta$ -kanyar jellegű (negatív értékű SSP-k), míg az L2 „csukló” régió rendezetlen szerkezetű (kis értékű SSP-k).

A komplex  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ -HSQC spektrumán közel kétszeres mennyiségű keresztcsúcs jelenik meg a szabad S100A4 $\Delta$ 13 spektrumához viszonyítva (6. ábra kék jelei). A jelkettőződés oka a komplexképződés folytán megjelenő aszimmetria az S100A4 A- és B-láncára vonatkozóan.



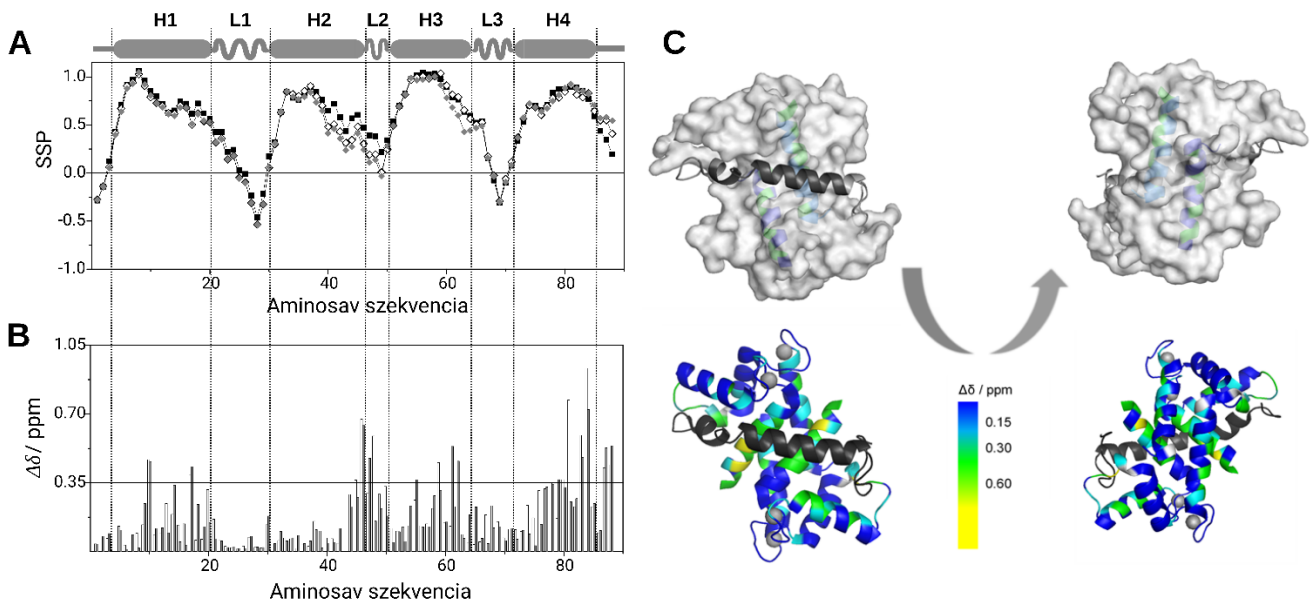
*H1*
*L1*
*H2*
*L2*
*H3*
*L3*
*H4*

<sup>1</sup>MACPLEKALDVMVSTFHKYSGKEGDKFKLNKSELKELLTRELPSFLGKRTDEAAAFQKLMSNLDSNRDNEVDFQEYCVFLSCIAMMCNE<sup>88</sup>

**6. ábra:** Az S100A4Δ13 (piros) és a S100A4Δ13-MPT komplex (kék) asszignált <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N-HSQC spektruma egymásra helyezve. Az ábrán csak a jelek egy részének asszignációja van feltüntetve a jelsűrűség miatt, a teljes adatkészlet megtalálható a BMRB 25136. és 25208. sorszámú adatlapjában. A spektrum alatt az S100A4Δ13 szekvenciája és a másodlagos szerkezeti elemek vannak feltüntetve.

Megjegyzendő, hogy az egyes sikeresen meghatározott szakaszok összekötésében maradt egy kis bizonytalanság, nevezetesen, hogy melyik lánchoz tartoznak a M1–L5, E23–K28, illetve a P43 oldalláncainak eltolódás értékei. Ugyanakkor ezeket az eredményeket megerősíti Elliott és munkatársainak asszignációja (Elliott 2012). A komplex kémiai eltolódásából készített SSP-analízis kimutatta (7A. ábra), hogy továbbra is jelen van a négy hélix: a H1 a P4–S20 szakaszon mindkét láncban, a H2 a K31–T59 régióban mindkét láncban, a H3 a D51–D63 szakaszon az A-láncban, illetve D51–L62 szakaszon a B-láncban és a H4 az F72–E88 régióban mindkét láncban. Ebből látható, hogy az S100A4 térszerkezete ugyan nem változik meg jelentősen az MPT kötődése hatására, viszont a H2 hélixben mindkét láncban csökkennek az SSP értékek (R40–L56 szakaszban 0,2-0,5 közötti értékű lesz), ez a hélix szerkezet fellazulására utal. Ezzel szemben a H4 hélixben pedig növekednek az SSP értékek a C-terminális M85–E88 szakaszban.

A komplexképződés hatására bekövetkező szerkezeti változásokat a kombinált kémiai eltolódás-változás ( $\Delta\delta$ ) értékek alapján jellemeztem, s az aminosavszekvencia mentén ábrázoltam a mindkét láncra számolt  $\Delta\delta$  értékeket a 7B. ábrán. A legnagyobb kémiai eltolódás-



**7. ábra:** (A) A szabad S100A4Δ13 (fekete négyzet) és az S100A4Δ13-MPT komplex A- és B-láncának (üres és szürke rombusz) SSP értékei az aminosav szekvencia mentén. (B) A  $\Delta\delta$  értékek mindkét láncra számolva (A-lánc: üres, B-lánc: szürke oszlopok). A grafikonok fölött a másodlagos szerkezetek határai vannak bejelölve. (C) Az MPT kötődése által leginkább érintett aminosavak ábrázolása a térszerkezeten kétféle nézetből a 3ZWH szerkezeten ábrázolva. A felső ábrán csak a H1, H1' és az MPT van kiemelve a komplex 3D-felületi rajzán. A hélixek a kötődő peptiddel ellentétes oldalon helyezkednek el. Az alsó ábrán a  $\Delta\delta$  értékek színekkel jelezve (kéktől zöldön át sárga felé növekedik).

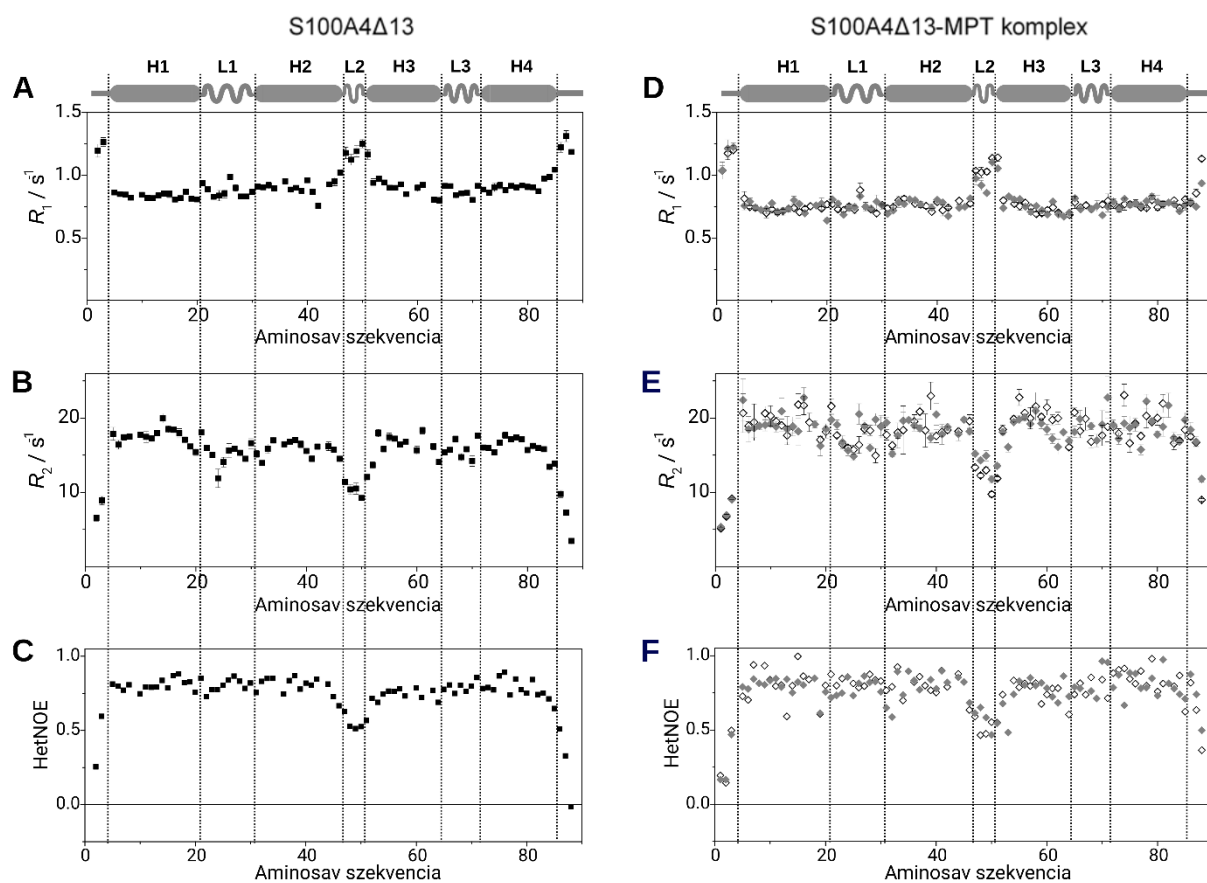
változást szenvedő aminosavak (a  $\Delta\delta > 0,35$  önkényes értéknél nagyobb változás történik) főként a kanonikus EF-kéz régióban fordulnak elő várható módon, hiszen itt található az S100 fehérjékre jellemző kötőzseb. Az érintett aminosavak a következők: L42, F45, L46, K48, M59, F78, S80, C81, A83, M84, N87, E88 az A-láncban és L46, G47, F55, N61, L62, L79, A83, M84, N87, E88 a B-láncban. Feltűnő váratlan jelenség mindemellett az, hogy a komplexképződés jelentősen érinti a H1 hélix egyes aminosavait is (D10 és H17 az A-láncban, D10, S14, H17 a B-láncban) annak ellenére, hogy ez a dimer összetartásáért felelős szerkezeti elem és a kötőzsebtől távol helyezkedik el (7C. ábra).

### 6.1.2. A komplex képződésének hatása az S100A4 molekula dinamikájára

A gerincdinamikai mérések során a legtöbb aminosavra kaptam megfelelő relaxációs adatot. Jelátfedés miatt csak a következő aminosavakra vonatkozó értékek nem értékelhetők: M1, L9, K35, M59 és L62 (S100A4Δ13), A8, K18, K35, F45, A53, D63, E69 és I82 (S100A4Δ13-MPT komplex A-lánca), H17, L38 és D67 (S100A4Δ13-MPT komplex B-lánca). A meghatározott paraméterek ( $R_1$ ,  $R_2$  és HetNOE) mind a szabad, mind a komplex formára a 8. ábrán láthatók, míg átlag- és szélsőértékei az 1. táblázatban találhatóak. Ezek az adatok mutatják, hogy a

komplekképződés hatására nem történik nagyon jelentős szerkezeti-dinamikai változás: mindkét esetben az N- és C-terminálison kívül csak az L2 huroknak, a „csukló” régióknak nagyobb a mozgékonyasága az átlagosnál, a molekula többi részén viszont közel hasonlóak az értékek. Ez a tapasztalat jól korrelál más S100 fehérjék relaxációs NMR méréseinek adataival (például a  $\text{Ca}^{2+}$ -S100A5 esetében hasonló mintázatot mértek (Bertini (2009))). Egy kisebb eltérést mutat az S100A4 ehhez képest: a H1 hélix  $R_1$  paraméterei átlagosan kisebbek, az  $R_2$  értékei pedig átlagosan nagyobbak a másik három hélixhez képest (míg a HetNOE értékek mind a négy hélixben közel azonos). A komplekképződés hatására az átlagos  $R_1$  értékek csökkennek, míg az átlagos  $R_2$  értékek nőnek, miközben az átlagos HetNOE értékekben nincs jelentős változás (1. táblázat). A két lánc közötti aszimmetria ezekben a paraméterekben is tükröződik: főként az  $R_2$  és a HetNOE értékekben (8. ábra).

Ezekből a mért relaxációs paraméterekből kiindulva kiterjesztett Lipari-Szabó modellfüggőten analízist végeztem. A megfelelő alakhoz tartozó közelítés eldöntésére



8. ábra: A 300 K-en mért  $^{15}\text{N}$ -relaxációs mérések eredménye a szabad (A-C) S100A4 $\Delta$ 13 (fekete négyzet, bal oldali grafikonok) és az (D-F) S100A4 $\Delta$ 13-MPT komplex (üres és szürke rombusz az A- és B-láncrea, jobb oldali grafikonok):  $R_1$ ,  $R_2$  és HetNOE értékek az aminosav szekvencia mentén. A függőleges vonalak a grafikonok felett található másodlagos szerkezeti elemek határvonalait jelölik.

Mért és számolt paraméterek		S100A4Δ13	S100A4Δ13-MPT	
			A-lánc	B-lánc
$R_1 / s^{-1}$	átlag	0,93	0,80	0,79
	min. → max.	0,76 → 1,31	0,69 → 1,20	0,64 → 1,22
$R_2 / s^{-1}$	átlag	15,3	17,9	17,9
	min. → max.	3,43 → 20,0	5,15 → 23,1	5,34 → 22,8
HetNOE	átlag	0,75	0,76	0,75
	min. → max.	-0,02 → 0,89	0,14 → 1,00	0,17 → 0,97
$\tau_c / ns$	becsült	11,44	13,35	
	illesztett	11,31 ± 0,01*	13,42 ± 0,03*	
$D_{\parallel}/D_{\perp}$	illesztett	0,91 ± 0,01*	0,93 ± 0,01*	
$S^2$	átlag	0,80	0,81	0,82
	min. → max	0,12 → 0,97	0,19 → 0,96	0,21 → 0,96

**1. táblázat:** A mért gerincdinamikai paraméterek ( $R_1$ ,  $R_2$  és HetNOE értékek) átlag- és minimális-maximális értékei, valamint az ezekből a Lipari-Szabó modellfüggetlen analízis alapján számolt gerincmozgásokat jellemző paraméterek a szabad S100A4Δ13 és a S100A4Δ13-MPT komplex A- és B-láncára számítva. (\*Az illesztés során a szoftver által számított hiba.)

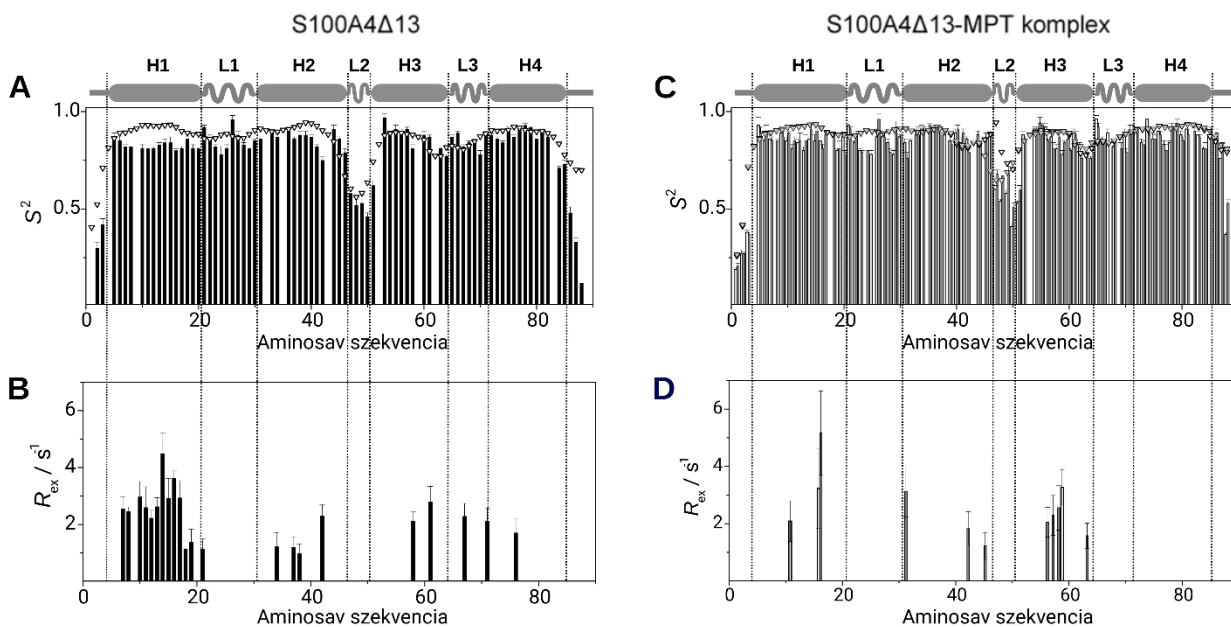
a HYDROPRO (García 2000) nevű programmal meghatároztam a rotációs diffúziós tenzor közelítő értékét. Ehhez a röntgendiffrakcióval kapott szerkezetek közül kettőt használtam fel: a szabad állapotra a 2Q91 (Malashkevich 2008), míg a komplex esetében a 3ZWH szerkezetet (Kiss 2012). Előbbi esetben a tenzor három sajátértékének aránya 1,30 : 1,15 : 1,00, míg az utóbbi esetben 1,25 : 1,11 : 1,00 lett. Ez arra enged következtetni, hogy a Lipari-Szabó analízisben az axiálisan anizotróp megközelítés pontosabb eredményt fog adni, ezért ezt alkalmaztam mindkét esetre.

Az így lefuttatott illesztés eredményeként minden aminosavra meghatároztam a Lipari-Szabó modell paramétereit, kivéve néhányra, amelyekre nem lett sikeres az illesztés, amelyek: S32, E52, és I82 (S100A4Δ13), G24 (S100A4Δ13-MPT A-lánc), D25, S32 és A53 (S100A4Δ13-MPT, B-lánc). Az illesztett eredmények összefoglalását az 1. táblázat tartalmazza. Ahogy itt látjuk, a molekula globális rotációs korrelációs ideje ( $\tau_c$ ) több, mint 2 ns-mal növekszik, ami a komplexképződés hatására bekövetkező méretnövekedés miatt lassabb bukdácsolós mozgásra utal. Ez az érték jó egyezést mutat az  $R_2/R_1$  értékek alapján becsült értékek átlagával (1. táblázat).

A kapott adatok jó összhangban vannak az S100 család több tagjára végzett hasonló elemzésből kapott eredményekkel: ha 300 K-re átszámítjuk (Daragan 1997), 9,12–13,52 ns

közötti értéket kapunk (Inman 2001, Dutta 2008, Zhukov 2008, Nowakowski 2011, Nowakowski 2013). A rotációs diffúziós tenzor sajátértékeinek arányát jellemző  $D_{\parallel}/D_{\perp}$  paraméterek értékei (1. táblázat) kisebbek a HYDROPRO programmal előzetesen számolt értékeknél, de nem térnek el jelentősen (a kapott értékek reciprokából kapunk hasonló arányokat, amelyek így 1,10 : 1,10 : 1,00 a szabad és 1,08 : 1,08 : 1,00 a komplex esetében), ami azt mutatja, hogy az axiális anizotróp modell használata megfelelő volt.

A mozgékonyt jellemző rendparaméterek értékeit a szekvencia mentén a 9A. és 9C. ábrán látható, az átlagértékek és minimális-maximális értékek pedig az 1. táblázatban mind a szabad S100A4 $\Delta$ 13, mind a S100A4 $\Delta$ 13-MPT esetében. Ezek alapján megállapíthatjuk, hogy az N- és C-terminálist, valamint a mozgékony L2 hurkot kivéve az S100A4 molekula nagyrészt merev szerkezetű végig (az  $S^2$  értékek 0,8–0,9 körüliek). A molekula globális mozgásánál gyorsabb mozgásokat jellemző  $\tau_e$  paraméterek ennek megfelelően leginkább az N- és C terminális mellett az L2 csukló régióban jelentkeznek, ezek tehát a flexibilis régiók mind a szabad, mind a kötött formában. A mért  $S^2$  értékek jó összhangban vannak a kémiai eltolódásokból számolt random coil index (RCI) értékek (Berjanskii 2005) alapján prediktált  $S^2$  értékekkel (9A. és 9C. ábra). A rendparaméterek főként a ps-ns időskálájú gyorsmozgásokat jellemzik – ezen az időskálán tehát nincs jelentős változás a komplexképződés hatására.

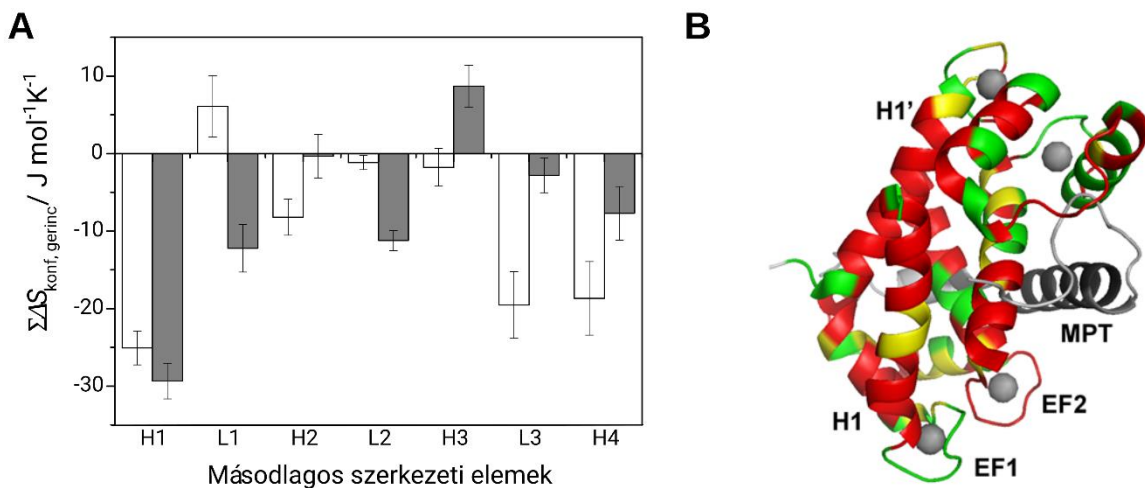


9. ábra: A Lipari-Szabó modellfüggetlen analízis eredményeként kapott  $S^2$  és  $R_{ex}$  értékek az aminosavszekvencia mentén az (A)-(B) szabad S100A4 $\Delta$ 13, (C)-(D) S100A4 $\Delta$ 13-MPT komplex esetében (üres oszlop: A-lánc, szürke oszlop: B-lánc). Az RCI értékekből számolt prediktált  $S^2$  értékek az (A) és (C) grafikonon háromszögek formájában láthatók. A szaggatott vonalakkal az S100A4 másodlagos szerkezeti elemei vannak elválasztva és a grafikonok tetején feltüntetve.

Figyelemreméltó változás jelentkezik viszont a lassabb időskálát vizsgálva: a  $\mu$ s-ms időskálájú konformációs mozgásokat jellemző  $R_{ex}$  csereparaméterek megjelenésében a szabad S100A4 $\Delta$ 13 molekulában, elsősorban a H1 hélixben, amely mozgások megszűnnek a komplexképződés hatására (9B. és 9D. ábra). A szabad állapotban megjelenő lassú időskálájú mozgások a H1 hélixben váratlanok, mivel ez a régió fontos része a dimer összetartásáért felelős X-típusú négyláncú hélixkötegnek (H1–H4–H1'–H4' hélixek), amely a szerkezet stabil vázát alkotják. (A lassú időskálájú mozgások kimérésére CPMG-méréseket is végeztünk: ott a H1 hélix mellett a H2, L2, H3 és H4 találtunk  $R_{ex}$  paraméter jelenlétét. Az eltérés oka, hogy e mérésben nem pontosan ugyanazt az időskálát tudjuk vizsgálni, mint a modellfüggetlen analízis illesztésével. Ugyanakkor szembetűnő, hogy a mérések sem tudnak kimutatni lassú mozgásokat a komplex esetében – hasonlóképpen az analízis eredményéhez.) E mozgások jelenléte magyarázza szabad állapotban a teljes átlagtól eltérő  $R_1$  és  $R_2$  átlagértékeit a H1 hélixben (8. ábra), illetve az RCI segítségével prediktált  $S^2$  értékek is itt térnek el Lipari-Szabó illesztésből kapott adatoktól. A komplex esetében nincs ilyen eltérés. Mindez azt mutatja, hogy az MPT kötődésének S100A4 dinamikájára gyakorolt egyik hatása a H1 hélix lassú időskálájú mozgásainak korlátozásában jelentkezik.

### 6.1.3. A dinamikai változások következményei

A Lipari-Szabó analízisből kapott rendparaméterek kiszámoltam a komplexképződés entrópiaváltozásának fehérjegerinc konformációs mozgásaihoz rendelhető részét. Az összegzés során a hiányzó aminosavakra az RCI-ből meghatározott prediktált értéket használtam. Ha a másodlagos szerkezeti elemekre külön-külön kiszámoljuk – összesítve – ezt az értéket, akkor jól látható, hogy a H1 hélixekben történik a legnagyobb konformációs entrópiacsökkenés, vagyis ezek mozgásai redukálódnak leginkább a komplexképződés hatására (10A. ábra). A teljes molekulára számolt gerinckonformációs entrópiaváltozás értéke -168,3 kJ/mol, amely negatív értéke szintén mutatja a komplex merevebbé válását (csökken a rendezetlenség, tehát rendezettebbé válik fehérjegerinc). 300 K hőmérsékleten ez a komplexképződés szabadentalpia-változásához  $-T\Delta S_{konf,gerinc} = +50,49$  kJ/mol értékű hozzájárulást jelent. ITC mérésekből korábban meghatározták e komplex képződésének szabadentalpia-változásához való teljes entropikus hozzájárulását, ami +17,2 kJ/mol értéknek adódott (Duelli 2014). Ez tehát azt jelenti, hogy a folyamat teljes entrópiaváltozásához egyéb járulékok hozzátevének: ilyenek az oldalláncok konformációs entrópiaváltozása, valamint a hidratáció megváltozásának entrópiaváltozása, s végül a rotációs-transzlációs mozgások entrópiaváltozása. Ez azért sem meglepő, mert a különböző eredetű entrópiatagok nagyon eltérő nagyságúak lehetnek egymáshoz



**10. ábra:** (A) A másodlagos szerkezeti elemekre külön-külön összegzett gerinckonformációs entrópiaváltozások (üres: A-lánc, szürke: B-lánc). (B) Az S100A4 $\Delta$ 13 molekula MPT kötése során bekövetkező változások az átlagos  $S^2$  értékekben a 3ZWH szerkezeten ábrázolva (az adott aminosavhoz tartozó „simított” átlagérték kiszámítása az áttekinthetőbb ábrázolás érdekében: az  $S^2$  érték átlagolva az előtte és utána következő aminosavak értékeivel); piros: merevebb ( $S^2$  növekszik), sárga: változatlan ( $S^2$  közel változatlan), zöld: mozgékonyabb (az  $S^2$  csökken). Az A-lánchoz tartozó EF1- és EF2-kéz régiók, az MPT, valamint a két H1 hélix a dimer két láncában külön kiemelve.

képeket a különböző rendszerekben (Grünberg 2006).

Ha megvizsgáljuk a komplex képződése hatására bekövetkező változásokat az  $S^2$  értékekben, kiderül, hogy a merevebbé váló hélixeken kívül a két  $Ca^{2+}$ -kötő EF-kéz hurokrégiói dinamikájának változása is érdekes, ahogy láthatjuk a 10B. ábrán (ahol az aminosavak megelőző és következő szomszédainak értékével átlagolt változásait ábrázoltam a szerkezeten a jobb áttekinthetőség érdekében). Így érdemes részletesebben elemezni az adatokat. Ennek érdekében az egyes másodlagos szerkezeti elemekre, valamint külön-külön a két EF-kéz  $Ca^{2+}$ -kötő aminosavai rendparamétereinek értékeit feltüntettem átlagolva a 2. táblázatban a szabad S100A4 $\Delta$ 13 és az S100A4 $\Delta$ 13-MPT komplex két láncára. Hogy a saját eredményeket összehasonlíthassuk az irodalomban már megtalálható más S100 fehérjék Lipari-Szabó elemzésből kapott adataival, ezek közül néhány esetben a hasonló átlagok kiszámítását elkészítettem ugyanebben a táblázatban. Az apo-S100A4 esetében csak egér eredetű fehérjére van adat (Dutta 2008), az S100B esetében humán apo formára (Inman 2001), míg a humán S100A1 esetében mind apo- (Nowakowski 2011), mind  $Ca^{2+}$ -kötött formára (Nowakowski 2013). A táblázatban nem tüntettem fel, de készült hasonló tanulmány a szarvasmarha apo-S100A1 és  $\beta$ -merkaptóetanollal kötött formájára (Zhukov 2008), valamint a humán  $Ca^{2+}$ -S100A1 homociszteinnel kötött formájára (Nowakowski 2013) is. Ha összevetjük az S100A1 és S100A4 esetében az L1 és L3 hurok mozgékonyságának változását, megállapíthatjuk, hogy



fehérje	S100A4	S100A4-MPT		S100A4	S100B	S100A1	S100A1
		A-lánc	B-lánc				
fémion	Ca <sup>2+</sup>	Ca <sup>2+</sup>		apo	apo	apo	Ca <sup>2+</sup>
faj	humán	humán		egér	humán	humán	humán
H1 hélix	0,83	0,85	0,86	0,89	0,87	0,92	0,90
L1 hurok	0,85	0,84	0,87	0,61	0,82	0,76	0,95
H2 hélix	0,86	0,87	0,87	0,84	0,86	0,91	0,91
L2 hurok	0,52	0,53	0,63	0,63	0,84	0,87	0,82
H3 hélix	0,85	0,84	0,82	0,77	0,84	0,87	0,88
L3 hurok	0,85	0,87	0,84	0,57	0,78	0,75	0,82
H4 hélix	0,86	0,88	0,87	0,91	0,87	0,92	0,95
EF1-kéz	0,83	0,83	0,81	0,66	0,83	0,79	0,92
EF2-kéz	0,84	0,94	0,85	0,60	0,78	0,81	0,95

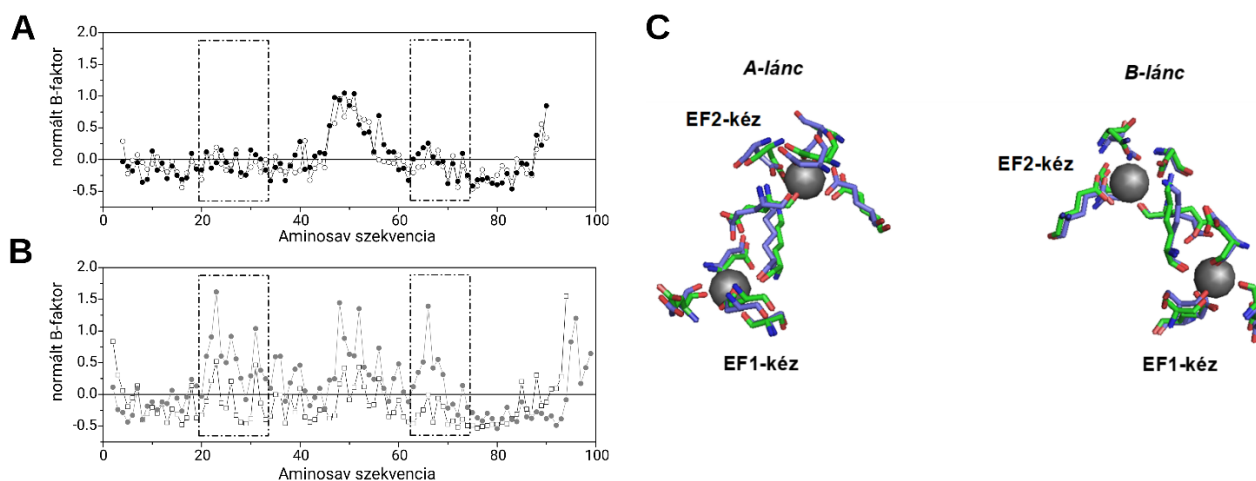
2. táblázat: Néhány S100 fehérje mért  $S^2$  értékeinek átlaga az egyes másodlagos szerkezeti elemekre átlagolva, illetve külön a Ca<sup>2+</sup>-kötő aminosavakra (EF1-kéz: S20, E23, D25, K28, E33; EF2-kéz: D63, N65, D67, E69 és E74). Az adatok forrásai a szövegben található hivatkozások alapján visszakereshető.

a Ca<sup>2+</sup> megkötése jelentősen növeli az EF-kéz régiók merevségét ( $\Delta S^2_{\text{átlag}}$  értéke +0,2–0,3 körüli) – ahogy várható is, hiszen koordinatív kötések jönnek létre a fémion és a fehérje egyes atomjai között. Ugyanez még inkább látszik, ha csak a Ca<sup>2+</sup>-kötő aminosavak átlagait vizsgáljuk. Ugyanakkor érdekesség, hogy az apo-S100B esetében a fémion nélkül is közel olyan merevségűek ezek a régiók, mint a másik két fehérje Ca<sup>2+</sup>-kötött állapotában. Ez egy szerkezeti eltéréssel magyarázható: az S100B esetében antiparallel elrendeződésű rövid  $\beta$ -redők is találhatóak az L1 és L3 hurkokban, amelyek kimerevítik az apo-szerkezetű fehérje EF-kéz régióit (Liriano 2012) – ellentétben az S100A1 és S100A4 fehérjékkel. Egy másik feltűnő jellegzetesség az L2 „csukló” régió mobilitása, amely csak az S100A4 esetében flexibilis, a többi esetben a molekula egészéhez hasonló merevségű. Ezek tehát mutatják, hogy az S100A4 a családon belül a nagyobb flexibilitású fehérjék közé tartozik. A lassú időskálájú mozgásokat jellemző  $R_{\text{ex}}$  paraméter mérhető értékét más S100 fehérjéknél is detektálták: az eddig ismertetett rendszereken túl – amelyek esetében a Lipari-Szabó analízis eredményeként illesztésből kapható meg ez a paraméter – a Ca<sup>2+</sup>-kötött S100B esetében CPMG-mérésekkel vizsgálták ezt (Liriano 2012). A leginkább változatos ebből a szempontból az S100A4 fehérje viselkedése: az apo szerkezetben ugyanis főként az EF1-kéz, az L2 „csukló” régió és az EF2-kéz egyes aminosavai, sőt a C-terminális farok – amely az általam vizsgált rendszerből hiányzik – mozgásainak leírásában is

megjelenik az  $R_{ex}$  paraméter (Dutta 2008). A jelen munkában vizsgált  $Ca^{2+}$ -kötött S100A4-ben főként a H1 hélixben található ez a fajta mozgás, míg az MPT-kötés hatására szinte teljesen megszűnik. Az S100B esetében mind az apo-, mind a  $Ca^{2+}$ -kötött formában a H1 hélix mozgásainak leírása során találkozunk az  $R_{ex}$  paraméterek jelenlétével (Inman 2001, Liriano 2012). Ebben az esetben egy kisebb peptiddel, a 12 aminosavból álló TRTK-val képzett komplexben viszont szintén megszűnik ez a lassú időskálájú mozgás (Liriano 2012), ami az általam tapasztalathoz nagyon hasonló jelenség – noha a TRTK-val képzett komplex nem aszimmetrikus 1:2, hanem szimmetrikus 2:2 arányú komplex.

Ezután az EF-kéz régiók dinamikai változását is érdemes megvizsgálunk, hiszen ez fontos szerepet játszhat az S100A4-nek MPT-kötés hatására bekövetkező közel 10000-szeres  $Ca^{2+}$ -affinitás növekedésében (Elliott 2012). Ahogy a 2. táblázatban láthatjuk, az A-lánc esetében az EF2-kéz aminosavainak mozgékonyasága csökken ( $\Delta S^2_{\text{átlag}} = +0,1$ ), tehát merevebbé válik, míg a B-lánc EF1-kéz aminosavainak mozgékonyasága enyhén növekszik ( $\Delta S^2_{\text{átlag}} = -0,02$ ) a komplexképződés hatására. A másik két EF-kéz régió átlagos mozgékonyasága közel állandó marad ( $\Delta S^2_{\text{átlag}} \leq \pm 0,01$ ), ami a többirányú változások kiegyenlítéséből is fakad. Érdemes összevetnünk ezt a megfigyelést az irodalomban fellelhető röntgenszerkezetekkel, hogy egy független módszerrel is hasonló eredményt kapunk-e. A molekula atomjainak mozgékonyaságát egy kristályszerkezetben az atomi mozgástényezővel, az úgynevezett B-faktorral lehet jellemezni, amely az atomi koordináták meghatározásának hibájából ered. Azonban fontos megjegyezni, hogy a B-faktor értékét nemcsak a mozgékonyaság növeli, hanem más tényezők is, mint például a kristálykontaktusok is szerepet játszanak értékének alakulásában. Így ez is lehet az oka annak, ha nem találunk teljes összhangot a kristályosított fehérje B-faktorai és az oldatfázisú fehérje  $S^2$  értékei között – viszont ha mégis van párhuzam a két mennyiségben, az megerősíti a tapasztalatok megbízhatóságát a dinamika terén. Ezen túl fontos megjegyezni, hogy a B-faktor növekedése a mozgékonyaság növekedését, míg az  $S^2$  értékek növekedése épp ellentétes módon a mozgékonyaság csökkenését jelenti, így a két mennyiségben ellentétes irányú változás jelenti a hasonló hatást. Ráadásul a változás számértéke, léptéke sem hozható könnyen párhuzamba, inkább a változások irányát érdemes vizsgálni.

A két független módszer összehangolására már korábban is tettek kísérletet (Fenwick 2014), de jelen munkában az S100B TRTK-peptiddel való komplexképződésének vizsgálata során Liriano és munkatársai által használt, normált B-faktorokat kiszámító eljárás szerint vettem össze az NMR és a röntgendiffrakció dinamikai vonatkozásait (Liriano 2012). Ennek lényege a következő: egy adott aminosav minden atomjának B-faktorát átlagoljuk (ez az aminosav specifikus átlag), majd ezeket az átlagokat a molekula összes aminosavára ismét átlagoljuk (ez a



**11. ábra:** Normált B-faktorok (az aminosav specifikus és a globális B-faktorok eltérése) ábrázolva az aminosav szekvencia mentén (A) a szabad S100A4 (3CGA szerkezet alapján, üres kör: A-lánc, fekete kör: B-lánc) és (B) az S100A4-MPT komplex (3ZWH szerkezet alapján, üres kör: A-lánc, szürke kör: B-lánc) esetében. A két EF-kéz régiót a szaggatott vonalak jelölik ki. (C) A két PDB-szerkezetből kiemelve a  $\text{Ca}^{2+}$ -kötő aminosavak az EF1- és EF2-kéz régiókban egymásra illesztve (kék: szabad S100A4, zöld: komplex, szürke:  $\text{Ca}^{2+}$  ionok).

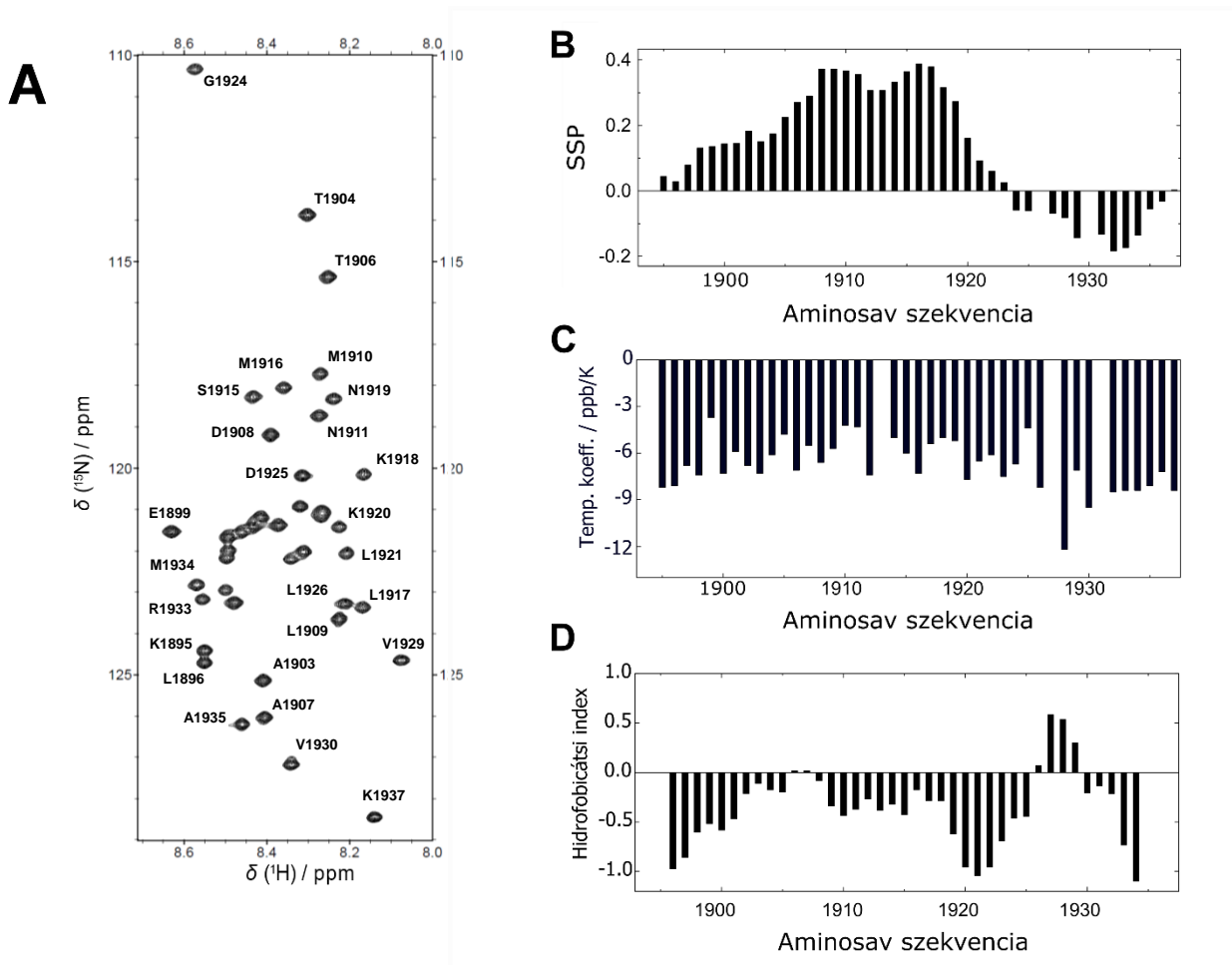
globális átlag a teljes molekulára), ezután az adott aminosavakra kiszámoljuk az aminosav specifikus átlag globális átlagtól való eltérését, így kapunk képet arról, hogy a molekula teljes mozgékonyaságához képest merevebb vagy flexibilisebb a vizsgált aminosav. A szabad S100A4 esetében a 3CGA PDB-szerkezetet (Pathuri 2008), míg a komplex esetében a 3ZWH PDB-szerkezetet (Kiss 2012) használtam fel ehhez, és a kapott eredményeket a 11A-B. ábrán tüntettem fel. Ezt tanulmányozva megállapítható, hogy az A-lánc esetében a szabad állapothoz képest a komplexben az EF1-kéz átlagos mozgékonyasága nem változik, míg az EF2-kéz esetében jelentős csökkenést látunk (a szabad állapotban a specifikus normált B-faktorok 0 körüliek, míg a komplexben, ugyan nagyobb szórással, ugyanilyenek maradnak, illetve a másik esetben nagyrészt negatív értékűek). A B-lánc esetében az EF1-kéz mozgékonyasága teljes mértékben és az EF2-kéz mozgékonyasága részlegesen növekszik (a szabad állapotban itt is 0 körüli, míg a komplexben a normált B-faktorok végig pozitív értékűek az egyik, illetve részlegesen a másik esetben). Ezek a megfigyelések jó összhangban vannak az  $S^2$ -értékek átlagolásából kapott eredményekkel, habár a mozgékonyaság csökkenése relatíve más mértékű: láthattuk az NMR adatok elemzése során az EF2-kéz mozgékonyaságának csökkenését az A-láncban, és az EF1-kéz mozgékonyaságának növekedését a B-láncban. (Egyedül a B-lánc EF2-kéz aminosavainak mozgékonyaságának növekedését nem tapasztaltuk az NMR adatokban.) Mindez azért jelentős, mert ez két teljesen különböző módszer: még a halmazállapot, sőt a mérés hőmérséklete is különbözik, ráadásul a normált B-faktorokat a teljes aminosavra számoltuk, míg az általunk mért

NMR dinamikai adatok elsősorban a gerinc mozgásait jellemzik. E tényezők figyelembe vételével a két módszer eredményei jó párhuzamot mutatnak. Mindemellett, ha összevetjük a két szerkezetben a  $\text{Ca}^{2+}$ -kötő aminosavak térbeli helyét (ahogy láthatjuk a 11C. ábrán), egyértelmű, hogy a komplexképződés során nincs térszerkezeti változás. Így egyedül a dinamikai változások lehetnek felelősek a  $\text{Ca}^{2+}$ -kötés affinitásának megnövekedéséért.

#### 6.1.4. Az MPT miozinfrafragmens szerkezeti tulajdonságai

Az NMIIA molekulát a 45 aminosav hosszú MPT-peptiddel modelleztük. Ennek szabad állapotát vizsgáltuk. Kötött állapotban a jelek kiszélesedése miatt érdemi NMR vizsgálat nem végezhető az adott körülmények között. Sikeresen asszignáltam a  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ -HSQC spektrumot: a 45 aminosavból az első kettőn (Y1893, R1894) és a két prolinon (P1927, P1931) kívül minden aminosav keresztcsúcsát sikeresen meghatároztam (12A. ábra, ahol a szekvencia is látható), valamint az oldalláncok  $^{13}\text{C}$ - és  $^1\text{H}$ -eltolódásait. Az eredményeket a BMRB adatbázisba a 25992. sorszám alatt publikáltam. Az  $^1\text{H}$  dimenzióban a jeldiszperzió 0,6 ppm, amiből egyértelműen következik, hogy az MPT rendezetlen szerkezetű. Emellett érdekesség, hogy számos minor jel is megfigyelhető a HSQC-spektrumon, amelyek főként a prolinokat megelőző szakaszon találhatók (ezek: G1924, L1926, F1928, V1929, V1930) intenzitásuk közel 10%-a az átlagos jelintenzitásnak. A  $\text{CC}(\text{CO})\text{NH}$  spektrum alapján meghatározott  $\text{C}^\beta$ - $\text{C}^\gamma$  kémiai eltolódás-különbségekből megállapítható, hogy a prolinok transz konfigurációban vannak a major jelek esetében (4,6 ppm a P1927 és 4,7 ppm a P1931 esetében), a minor jelek esetében ez nem állapítható meg egyértelműen, de feltételezhetően cisz konfigurációjú prolinok is lehetnek a minor komponensekben, ahogy ezt már más rendszerekben is megfigyelték (Schubert 2002). A HSQC-NOESY spektrum alapján összesen néhány távoli – a szomszédokos aminosavakon túl távolabbiak közötti – NOE-t lehetett asszignálni, ami szintén a fragmens rendezetlen szerkezetét mutatja.

A meghatározott  $\text{C}^\alpha$ ,  $\text{C}^\beta$  and  $\text{H}^\alpha$  kémiai eltolódásokból számított SSP értékek segítségével (Marsh 2006) vizsgáltuk a másodlagos szerkezet. Az 12B. ábrán ábrázolt eredmény alapján is egyértelmű, hogy az MPT rendezetlen szerkezetű, hiszen az SSP értékek abszolút értékek szinte végig 0,3 alatt marad. Ettől kicsit eltér a középső D1908–K1918 régió, ahol az SSP-értékek 0,3-0,4 közötti értékűek, vagyis ez a szakasz erősebb helikális hajlamot mutat. Ezzel összhangban van az a tény, hogy ez a régió a teljes NMIIA-ban a coiled coil szerkezeti elem része, továbbá az S100A4-MPT komplex ismert szerkezeteiben (Kiss 2012, Elliott 2012) amfipatikus  $\alpha$ -hélixet képez.



**1893YRKLQRELEDATETADAMNREVSSLKNKLRGDLPFVPRRMARK1937**

12. ábra (A) Az MPT asszignált  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ -HSQC-spektruma (a jelazonosítás csak részlegesen van feltüntetve a jelsűrűség miatt, de a teljes asszignáció elérhető a BMRB 25992 sorszámon). (B) A kémiai eltolódásokból számolt SSP értékek az MPT egyes aminosavaira, (C) a 283–310 K között mért hőmérsékletfüggésből számított hőmérsékleti koeficiensek az MPT aminosav szekvenciája mentén, (D) az Eisenberg-féle hidrofobicitási indexek értéke az MPT egyes aminosavaira. Az ábrák alatt az MPT szekvenciája látható.

A HSQC-spektrum hőmérsékletfüggése alapján a hőmérsékleti koeficienseket is meghatároztam a jelekre (12C. ábra). Megfigyelhető, hogy a vizsgált  $^1\text{H}$  kémiai eltolódások hőmérsékletfüggése lineáris szinte az összes jelre, s a koeficiensek átlagosan relatíve nagy negatív értékűek, mindössze 4 aminosav esetében haladják meg a -4,5 ppb/K értéket (ezek E1899, M1910, N1911, D1925). Ez azt jelenti, hogy az amid H atomok nem vesznek részt intramolekuláris hidrogénkötésben (Baxter 1997) – ami egy újabb bizonyíték az MPT rendezetlenségére. A középső M1910–R1922 régió – ez közel azonos az SSP értékek alapján meghatározott középső inherens helicitású szakasszal – hőmérsékleti koeficiensei az átlagosnál nagyobb értékűek (e szakasz átlagértéke -5,8 ppb/K, míg a teljes fragmensre számolt átlagérték -6,8 ppb/K), ami azt jelenti, hogy ez a régió merevebb a peptid egészénél, ami megerősíti, hogy rendezettebb hajlamú a molekula többi részénél. Az ezt követő nagyrészt a két prolin közé eső

L1926–V1930 szakasz hőmérsékleti koeficiensei viszont jelentősen nagyobb negatív értékűek (-9,3 ppb/K az átlaguk) a teljes átlaghoz képest. E régió nevezhető valamelyest hidrofóbnak a fragmens többi részével ellentétben, ahogy ez az aminosav szekvencia alapján számolt Eisenberg-féle hidrofobicitási indexekből (Eisenberg 1984) is kiderül (12D. ábra). E két tény együttesen arra utal, hogy ez a két prolin közti régió egyfajta kis hidrofób magot képezhet, amely az S100A4 fehérjével való komplexképződés során a rendezetlenből rendezetté (hélix szerkezetűvé) való átalakulást segítheti elő, ami az N-terminális felé szomszédos, már eleve helikális hajlamot mutató régió hélixszé rendeződésével indul el.

### 6.1.5. Következtetések

A bemutatott kutatások eredményeinek ismeretében többirányú konklúziót vonhatunk le az S100A4-NMIIA komplex képződésének mechanizmusára, az S100A4 kötött állapotbeli  $\text{Ca}^{2+}$ -affinitásának növekedésére és az S100A4 dimer stabilitásának változására nézve.

Az NMIIA fragmens, az MPT szabad állapotának szerkezeti elemzése során kiderült, hogy ez egy rendezetlen szerkezetű peptid, amely a középső régiójában naszcens helicitást mutat mind a kémiai eltolódások alapján számolt másodlagos szerkezeti valószínűségek, mind a hőmérsékleti koeficiensek értékei alapján. Előbbi alapján D1908–K1918, utóbbi alapján az M1910–R1922 régió ez – de mivel a határok meghúzása valamelyest önkényes, ez a két eredmény jó összhangot mutat. A rendezetlenből rendezetté való átalakulásra kétféle mechanizmust javasolnak az irodalomban: a konformációs szelekció és az indukált feltekeredés modelljét (Boehr 2009, Csermely 2010, Marsh 2012). A vizsgálatunkból megállapíthatjuk, hogy a konformációs szelekció modell szerint történik az MPT esetében a feltekeredés, hiszen az inherens helicitású középső szakasz jelenléte azt jelenti, hogy ugyan az MPT molekula-sokaságban az átlagos szerkezet rendezetlen, bizonyos arányban mégis részlegesen feltekeredett dinamikus hélixek is találhatóak ebben (amelyek folytonosan fel-le tekerednek). E hélixek populációjának aránya növekszik meg a komplexképződés hatására, mivel az S100A4 kötőrégiója hélix szerkezeteket képes megkötni (Badyal 2011, Ramagopal 2013, Duelli 2014). A preformált hélix jelenléte a miozinfrafragmensben egy további következtetésre is okot ad: valószínűsíthető, hogy a teljes hosszúságú NMIIA fehérje kötődése során a coiled coil szerkezet nem tekeredik le teljes mértékben, azaz nem szükséges teljesen rendezetlenné válnia ahhoz, hogy kialakuljon belőle az S100A4-gyel képzett komplexben az egyszálú hélix szerkezet, és ez lecsökkenti az entrópiaváltozásból fakadó tagot a kötődés szabadentalpia-változásában, ami hozzájárul a szokatlanul erős komplex létrejöttéhez, amelynek  $K_d$  értéke 0,1 nM körüli (Duelli 2014). További érdekes megfigyelés, hogy a középső inherens helicitású szakasz N-terminális határán található az A1907 aminosav, amelyről kimutatták, hogy szerepet játszik az S100A4 izoforma-specifikus

kötődésében a nemizom-miozinokhoz. Ugyanis az S100A4 csak az NMIIA és NMIIIC izoformához kötődik, amelyek esetében ebben a pozícióban alanin van, míg egyáltalán nem kötődik az NMIIIB izoformához, ahol ugyanitt aszparagin található (Kiss 2016). Ez is mutatja, hogy az NMIIA kötőrégióját tartalmazó MPT peptiden belül az általunk kimutatott naszcens helicitású középső szakasznak kiemelt szerepe van az S100A4-hez való kötődésben.

A következő eredmény az S100A4  $\text{Ca}^{2+}$ -affinitás növekedésének magyarázatához kötődik. Fontos megjegyezni, hogy ismert jelenség sok EF-kézt tartalmazó fehérje esetében, hogy a célfehérjékhez való kötődésükkel párhuzamosan jelentősen növekszik a  $\text{Ca}^{2+}$ -kötésük affinitása (Mirzoeva 1999, Liriano 2012). Az S100 család tagjai körében is hasonló a megfigyelés: a  $\text{Ca}^{2+}$ -affinitás általában a  $\mu\text{M}$ -os tartományba esik, és az interakciós partner jelenlétében jelentős növekedés következhet be. Az S100B TRTK-val alkotott komplexe esetében ötszörös a növekedés (Liriano 2012), az S100A1 RyR-kötése esetében 300-szoros (Wright 2008b), és az S100A4 NMIIA-val alkotott komplexe esetében már közel 10000-szeres lehet. Ez utóbbi esetben az EF2-kéz  $\text{Ca}^{2+}$ -kötésének mikroszkopikus  $K_d$  értéke szabad állapotban  $5 \mu\text{M}$ , ami komplexben  $0,5 \text{ nM}$  értékre változik (Elliott 2012). E változások magyarázatára eddig háromféle modell született (Liriano 2012): a direkt szerkezeti változásra alapuló modell, a zárt (apo) és a nyitott ( $\text{Ca}^{2+}$ -kötött) állapot közötti egyensúlyra alapuló modell, valamint a „célfehérje kötődés és funkcionális feltekeredés” modell. Az első megközelítést kizárja, hogy nem találtunk jelentős szerkezeti változást sem a kémiai eltolódások elemzése (SSP értékek), sem a röntgenszerkezetek EF-kéz aminosavai térszerkezetének összevetése során. (Kivéve, hogy a H2 hélix egy részében csökken a helikális hajlam valószínűsége, illetve a H4 hélix meghosszabbodik – azonban ezek a változások nem a  $\text{Ca}^{2+}$ -kötőhelyek közelében történnek). A második modellt is kizárhatjuk, mert nem találtunk lassú csere folyamatot jellemző  $R_{ex}$  paramétereket az EF-kéz  $\text{Ca}^{2+}$ -kötő aminosavaiban, sőt az MPT korábbi tanulmányok eredményeivel párhuzamban nem képes kötődni az apo-S100A4-hez  $\text{Ca}^{2+}$  ionok hiányában (Malashkevich 2008), így nem valószínű, hogy a két állapot között létezne kémiai egyensúly.

Így akkor érdemes megvizsgálunk részletesebben a harmadik modellt, amelynek lényege a konformációs szelekcióra alapuló indukált illeszkedés („*induced fit*”). E szerint a célfehérje kötődése eltolja a konformációs egyensúlyt a nyitott, nagy  $\text{Ca}^{2+}$ -affinitású állapotok felé az által, hogy lecsökkenti a molekula egészének mozgásait, azaz csökkenti dinamikáját. Az általunk kimutatott eredményekben valóban ez az effektus jelentkezik, hiszen az MPT-kötés hatására többszintű mozgások csökkenését tapasztaltuk: a H1 hélixben a lassú mozgások megszűnnek ( $R_{ex}$  paraméterek hiánya a komplexben), a gyors mozgások arányának csökkenése pedig az S100A4 egészére átlagolt  $S^2$ -értékek enyhe növekedésében (ezt legszembetűnőbben a konformációs entrópia változásának negatív értékében látszik), valamint ezen belül az A-lánc EF2-kéz

aminosavainak jelentősen merevebbé válásában jelentkezik – összhangban a röntgenszerkezetek B-faktorai alapján elvégzett vizsgálattal. Mindemellett B-lánc EF1-kéz aminosavainak flexibilisebbé válása is megjelenik, ami lokálisan ellentmond a merevség növekedésének, de a globális képen nem változtat, csak azt mutatja, hogy összetett dinamikai változások történnek a komplexképződés során. Ezek alapján tehát kijelenthetjük, hogy az S100A4 esetében a „célfehérje kötődés és funkcionális feltekeredés” modell magyarázza a  $\text{Ca}^{2+}$ -affinitás növekedését. Ez összhangban van azzal a ténnyel, hogy az S100B TRTK-peptidhez való kötődése következtében megjelenő  $\text{Ca}^{2+}$ -affinitás növekedést ugyanezzel a mechanizmussal magyarázták (Liriano 2012), habár ott sokkal kisebb változás mértéke.

A vizsgálatunk következő aspektusa az S100A4 H1 hélixét érinti, amely a dimer stabilizálásban játszik szerepet, hiszen az X-típusú négyláncú hélixköteg része (amely a H1–H4–H1'–H4' hélixeket tartalmazza). Érdekes módon a komplexképződés során a kötőzsebet képző L2 hurok, H3 és H4 hélixek mellett a kémiai eltolódás perturbáció a H1 hélixben is megjelenik szignifikánsan, noha ez az S100A4 molekula kötőzsebbel ellentétes oldalán helyezkedik el. Ez a változás tehát csak allosztérikus hatás lehet. A dinamikai vizsgálat során pedig a lassú időskálájú mozgások megszűnését tapasztaltuk a H1 hélixben a komplexképződés hatására. Mindezek a változások összefüggenek egymással, és valószínűsíthetően az S100A4 dimer stabilitásának növekedésével is. Korábban kimutatták ugyanis, hogy az S100A4 dimer aránylag kis stabilitású szabad állapotban ( $K_d = 4 \mu\text{M}$ ), és a  $\text{Ca}^{2+}$ -kötés erősíti a dimerizációra való hajlamot (Tarabykina 2001). Ezek és a saját munkám eredményei alapján megállapíthatjuk, hogy a célfehérje kötődése allosztérikus változások révén a H1 hélix mozgásainak megszűnését okozva az addig lazább dimer stabilitásának növekedését eredményezi, s mivel az egész fehérje egy csatolt rendszert képez, az EF-kéz régiók mobilitásának változása is összefüggésben állhat mindezzel. Az S100 egy másik tagja, az S100B esetében is megfigyeltek hasonló jellegű változásokat: a H1 hélixben ott is megszűnik a lassú mozgás a kötőpartnerrel való interakció folytán (a szabad állapotban mért  $R_{ex}$  paraméterek nem jelennek meg a kötött állapotban) (Liriano 2012). Ugyanakkor ez a dimer stabilitására nem lehet jelentős ez hatással, mert az S100B dimerek már szabad állapotban is nagy stabilitásúak ( $K_d < 1 \text{ nM}$ ) – ellentétben az S100A4 esetében tapasztaltakkal (Drohat 1997).

A két említett dinamikai effektust, a  $\text{Ca}^{2+}$ -affinitás növekedését és a H1 hélixek lassú időskálájú mozgásának megszűnését molekuladinamikai szimulációkkal lehet atomi szinten még jobban megérteni – így el is kezdtük Dr. Gáspári Zoltánnal és Kovács Bertalannal együttműködve az S100A4 és S100A4-MPT komplex MD-szimulációs vizsgálatát a kísérleti úton meghatározott rendparamétereket felhasználva (a projekt még folyamatban van).



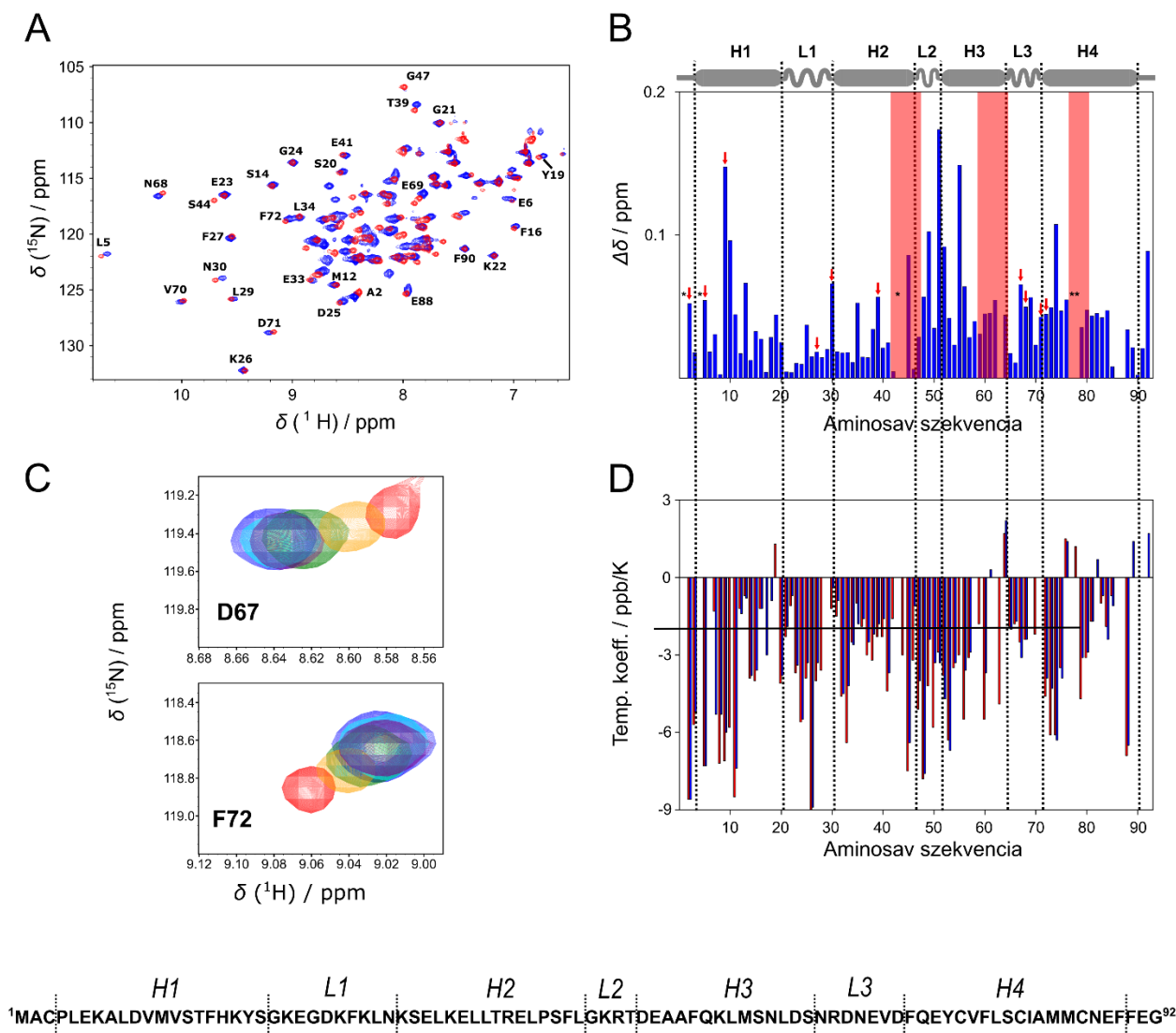
## 6.2. Az S100A4 ezrinnel alkotott komplexe

Ebben a kutatásban az S100A4 és a humán ezrin kölcsönhatását vizsgáltuk az NMR spektroszkópia mellett különböző biokémiai és sejtes mérésekkel. Az én feladatom ezen belül az volt, hogy NMR spektroszkópia segítségével vizsgáljam, hogy az ezrin két fő doménje, a C-ERMAD és az N-ERMAD milyen kölcsönhatásba lépnek külön-külön és együttesen az S100A4 fehérjével.

### 6.2.1. Az S100A4 és a C-ERMAD komplexének jellemzése

A biokémiai kísérletek bizonyították, hogy a C-ERMAD kötődik az S100A4-hez. ECD spektroszkópiai mérések alapján pedig egyértelművé vált, hogy a C-ERMAD domén szabad állapotban rendezetlen szerkezetű, és a kötődés után rendezett, helikális szerkezetet vesz fel a komplexben. Tehát rendezetlen-rendezett átalakulás történik a szerkezetével, ahogy láttuk korábban az MPT esetében. A kialakult komplex vizsgálatához  $^{15}\text{N}$ -S100A4 $\Delta$ 9-et használtam (itt szükség volt a 89-92. aminosavakra is a kötődéshez, ezért nem volt elég az S100A4 $\Delta$ 13 az MPT-komplexszel ellentétben). A kinetikai mérések azt mutatták, hogy a rövidített S100A4-hez ugyanúgy kötődik a C-ERMAD, mint a teljes hosszúságú vadtypushoz. A szabad S100A4 $\Delta$ 9  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ -HSQC spektrumának jelhozzárendelését a korábban mért S100A4 $\Delta$ 13 asszignációja, valamint 3D TOCSY-HSQC és 3D NOESY-HSQC spektrumok segítségével végeztem el. Így 87 keresztcsúcsot sikerült meghatározni a lehetséges 92-ből – a hiányzók a két prolin P4 és P43, valamint a M1, C86 és N87, amelyeket nem sikerült egyértelműen azonosítani. A C-ERMAD-ot lépésenként adtuk hozzá a  $^{15}\text{N}$ -jelölt S100A4 $\Delta$ 9 dimerhez, és a titrálás során minden lépésben asszignáltam a spektrumot. A kiindulási és a végállapot jelhozzárendelését a BMRB adatbázisban 26946. és 26956. sorszámok alatt publikáltam. A két spektrum egymásra helyezve látható a 13A. ábrán.

A titrálás minden lépésében kiszámítottam a kombinált kémiai eltolódás-változásokat minden aminosavra, és kiválasztottam néhány gyors cserében részt vevő tíz olyan aminosavat a fehérje különböző régióiból, amelyek jó illesztésre adtak lehetőséget (A2, L5, L9, F27, N30, T39, D67, N68, D71, F72) – két példa látható az 13C. ábrán. Ezekre globális illesztést végeztem, s az így kapott érték a  $K_d$ -re vonatkozóan  $10,5 \mu\text{M}$ , míg az  $n$ -re  $0,67$  lett. Az így nyert disszociációs állandó jó nagyságrendi egyezést mutat a szintén e projekt keretében mért fluoreszcens polarizációs ( $3,4 \pm 0,1 \mu\text{M}$ ) és kompetitív fluoreszcens polarizációs mérésekkel ( $5,3 \pm 0,5 \mu\text{M}$ ) kapott eredményekkel. A sztöchiometriai együttható értéke sokkal pontatlanabb eredményt ad, hiszen mindenképp egész számhoz közeli értéket kellene kapnunk. Ez a  $K_d$  illesztésre vonatkozó



13. ábra (A) A S100A4Δ9 dimer (piros) és az S100A4Δ9–C-ERMAD komplex (kék) <sup>1</sup>H, <sup>15</sup>N-HSQC spektrumai egymásra illesztve (csak részleges asszignáció van feltüntetve az átláthatóság miatt). (B) A Δδ értékek az S100A4Δ9 fehérje spektrumán a C-ERMAD hozzáadása hatására. A piros sávok mutatják a három jelkiszéledéssel bíró régiót (a jelek félértékiséssége a <sup>1</sup>H dimenzióban nagyobb, mint az átlagos érték 150%-a). A csillaggal jelölt aminosavakat nem lehetett egyáltalán detektálni vagy nem egyértelmű az asszignációjuk. A másodlagos szerkezeti elemek a grafikon tetején találhatóak. A piros nyilak azokat az aminosavakat jelölik, amelyeket a titrálás során felhasználtam a *K<sub>a</sub>*-kiszámításához. (C) A titrálás bemutatása két példán, a D67 és F72 jelein. A C-ERMAD : S100A4Δ9 dimer aránya folyamatosan változva a vöröstől a kék felé: 0,00; 0,28; 0,56; 0,83; 1,11; 1,67. (D) A hőmérsékleti koeficiensek értéke aminosavanként a szabad S100A4Δ9 (piros) és az S100A4Δ9–C-ERMAD komplex (kék) esetében egymással összehasonlítva. Az intramolekuláris hidrogénkötések a -4,5 ppb/K érték feletti értékek (vastag vízszintes vonallal jelölve) esetében jelennek meg. Az ábra az S100A4Δ9 szekvenciája látható az expressziós maradékGSH nélkül.

modell határait is jelzi (inkább nagyságrendet lehet vele becsülni, mintsem pontosabb értéket), továbbá fakadhat abból is, hogy a kinetikai görbét nem az összes jelre illeszttem, hanem csak kiválasztott tíz jelre.

A végállapotból számolt kémiai eltolódás-változások alapján az S100A4 $\Delta$ 9-C-ERMAD komplex szerkezetére vonatkozó megállapításokat is tehetünk (a kapott értékek az aminosav szekvencia mentén ábrázolva a 13B. ábrán láthatók). A komplexképződés hatására a H1, H3, H4 hélixek és az L2 hurok kémiai eltolódásai változtak a legjobban – hasonlóképpen a korábban vizsgált S100A4 $\Delta$ 13-MPT komplexhez. Ez azt jelenti, hogy a várt módon a C-ERMAD az S100A4 ismert kötőzsebében található (L2, H3, H4), és emellett a H1 hélix ismét váratlanul hasonló nagyságrendű változást mutat. Ugyanakkor az eltolódás-változások abszolútértékei átlagosan kisebbek a C-ERMAD esetében az MPT-hez képest, ami a közel négy-öt nagyságrenddel gyengébb kötődés miatt lehet. A keletkező komplex jelei nagyobb félértékszélességűek a szabad állapotú fehérje jeleihez viszonyítva, amely jelkiszélesedés a komplex nagyobb méretével (így nagyobb globális korrelációs idejével, s ebből fakadó kisebb translációs relaxációs idejével) magyarázható. Ezentúl három régióban az átlagosnál jelentősebb jelkiszélesedés tapasztalható: L42–G47, L68–S64 és V77–S80 (ráadásul az S44, D63, V77, F78 jelek teljesen beolvadnak a zajszintbe, így egyáltalán nem detektálhatók) – ezeket a régiókat pirossal jeleztem az 13B. ábrán. A jelkiszélesedés oka feltehetően a közepes időskálájú cserefolyamatok jelenléte – a szabad és kötött állapot között. Ez arra utal, hogy az említett szakaszokon gyengébb lehet a kötődése a C-ERMAD-nak, mivel itt a szabad és a kötött állapotú fehérje együttesen jelen van, s ezzel magyarázható a cserefolyamatok ilyen jellegű megjelenése a spektrumon.

A C-ERMAD kötődésének eredményeként bekövetkező szerkezeti változások jellemzésére megvizsgáltam az amid protonok kémiai eltolódásainak hőmérsékletfüggését (13D. ábra). A szabad és a kötött állapot hőmérsékleti koefficienseit összevetve megállapítható, hogy nincs jelentős eltérés a két állapot között, ami azt mutatja, hogy – összhangban az ECD mérésekkel – nem történik jelentős szerkezeti változás az S100A4 molekulában a C-ERMAD kötődése folytán hasonlóan az MPT-komplexhez. A 3. táblázat tartalmazza azokat az aminosavakat, amelyeknél a komplex képződése folytán megszűnik vagy létrejön egy új hidrogénkötés (azaz a koefficiens  $-4,5$  ppb/K érték alattiról afölöttire változik vagy fordítva). Ebből jól látható, hogy a legtöbb változás a H3 és H4 hélixben történik – ahol a kötőhely is található. Érdekesség, hogy a H1 hélixben is kiemelkedő a változás (két aminosav esetében intramolekuláris hidrogénkötés szűnik meg és ugyanígy kettő esetében újabb jön létre). Ez egy újabb eddigiektől független információ arra nézve, hogy a H1 hélix a kötőpartnerekkel való kölcsönhatás során változáson megy keresztül, noha a fehérje kötőzsebbel ellentétes oldalán található. Így nagy valószínűséggel ez is allosztérikus hatásnak tekinthető.

Másodlagos szerkezet	H-kötés megszűnik	új H-kötés létrejön
H1 hélix	K7, Y19	H17, K18
L1 hurok	K28	–
H2 hélix	L42	E33
L2 hurok	–	T50
H3 hélix	E52, F55, M59	Q56, S60
L3 hurok	V70	–
H4 hélix	–	F72, Q73, L79, F89, G92

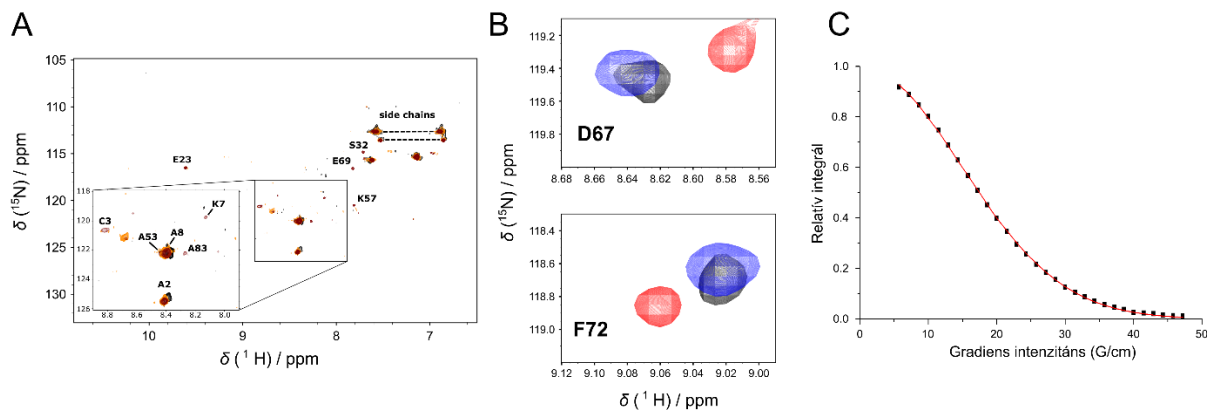
3. táblázat: A hőmérsékleti koefficiensek értékének összehasonlítása a szabad S100A4 $\Delta$ 9 dimer és az S100A4 $\Delta$ 9–C-ERMAD komplex esetében: a táblázatban az eltérések, azaz komplexképződés hatására létrejövő változások vannak feltüntetve az egyes szerkezeti elemekben: a megszűnő és a létrejövő hidrogénkötések.

### 6.2.2. Keletkezik-e N-ERMAD–S100A4–C-ERMAD harmadlagos komplex?

Az N-ERMAD–S100A4–C-ERMAD harmadlagos komplex létezésének eldöntése HSQC-spektrumok és diffúziós mérések alapján történhet.

Az első megközelítés esetében az S100A4 $\Delta$ 9–N-ERMAD komplexhez adtam C-ERMAD-ot először S100A4 $\Delta$ 9-dimer : N-ERMAD : C-ERMAD = 1:1:1, majd további C-ERMAD hozzáadására végül 1:1:2 arányban (az S100A4 $\Delta$ 9-molekula volt <sup>15</sup>N-jelölt, míg a partnerek izotópjelöletlenek). Mivel az S100A4 $\Delta$ 9–N-ERMAD komplex mérete összesen 58 kDa, a harmadlagos komplexé 66 kDa lenne, ezek keresztcsúcsai a HSQC-spektrumon már nem detektálhatók (a nagy méretből fakadóan lelassul a globális korrelációs idő, ami a  $T_2$  relaxációs idő lecsökkenéséhez vezet olyan mértékben, hogy teljesen kiszélesednek a jelek a spektrumon). Ezt így is tapasztaltam az az S100A4 $\Delta$ 9–N-ERMAD komplex esetében, ahol összesen néhány keresztcsúcs jelent meg a HSQC-spektrumon – egyszersmind ez a tény is bizonyítja az N-ERMAD kötődését az S100A4 $\Delta$ 9-hez. Viszont miután egyszeres, majd kétszeres ekvivalens mennyiségű C-ERMAD-ot adtam a rendszerhez, egyre több jel jelent meg spektrumon, ráadásul ott, ahol az S100A4 $\Delta$ 9–C-ERMAD komplex jeleit találhatók a korábbi mérés alapján (lásd 14A. ábra). Ez a tapasztalat arra utal, hogy nem harmadlagos komplex jön létre a három molekula között, hanem külön S100A4 $\Delta$ 9–N-ERMAD komplex és S100A4 $\Delta$ 9–C-ERMAD komplexek keletkeznek, amelyek keverékének spektrumát detektáljuk, hiszen a maradék jeleknek is ki kellett volna szélesedniük, ha egy még nagyobb harmadlagos komplex keletkezett volna.

A másik módszer esetében diffúziós NMR mérések segítségével külön-külön meghatároztuk a szabad S100A4 $\Delta$ 9-dimer (22 kDa), az S100A4 $\Delta$ 9–C-ERMAD (30 kDa) és az S100A4 $\Delta$ 9–N-ERMAD (58 kDa) komplexek transzlációs diffúziós együtthatóját



**14. ábra:** (A) Az 1:1 arányú S100A4Δ9-N-ERMAD komplex (fekete), majd C-ERMAD kétlépcsős hozzáadása után a három fehérjére nézve a felsorolás sorrendjében 1:1:1 (narancs) és 1:1:2 (bordó) arányú S100A4Δ9, N-ERMAD, C-ERMAD keverékek  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ -HSQC spektrumai egymásra illesztve. (B) A D67 és F72 keresztcsúcsai kinagyítva: piros színnel a szabad S100A4Δ9, kék színnel a S100A4Δ9-C-ERMAD komplex jelei, míg feketével az S100A4Δ9 : N-ERMAD : C-ERMAD 1:1:2 arányú keverékének jelei. (C) Egy tipikus translációs diffúziós görbe, amely a S100A4Δ9-C-ERMAD komplex 1,892-1,276 ppm régiója összintegráljának diffúziós NMR-rel mért lecsengésére illeszttem. Az egyes pontok a mért integrálok, a piros folytonos vonal pedig a Stejskal-Tanner-egyenlet alapján illesztett görbe.

300 K hőmérsékleten. A következő értékeket kaptuk:  $10,5 \pm 1,1 \cdot 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$ ,  $8,78 \pm 0,3 \cdot 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$  és  $6,31 \pm 0,2 \cdot 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$ . Mivel a diffúziós mérések során az 1D  $^1\text{H}$ -NMR spektrumot használjuk, sőt annak CH-régióját, ezért a nagyobb méretű komplexeknek is detektáljuk a jeleit, amelyek felhasználásával tudjuk mérni, majd számolni a translációs diffúziós együtthatót. A Stokes-Einstein egyenlet értelmében minél nagyobb a molekulaméret, annál kisebb a diffúziós együttható, ahogy ezt a mért eredményekből is látjuk. Ezután a C-ERMAD-ot adtam az S100A4Δ9-N-ERMAD-komplexhez minden fehérjére nézve 1:1:1 arányban (S100A4Δ9 dimerre számolva), és ebben a rendszerben a diffúziós együttható értéke  $7,82 \pm 0,4 \cdot 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$ , ami az S100A4Δ9-N-ERMAD és az S100A4Δ9-C-ERMAD komplex esetében mért értékek közé esik. Ez azt jelenti, hogy a két komplex keverékét mérjük és nem egy N-ERMAD-S100A4-C-ERMAD komplex diffúziós együtthatóját, mert ennek értéke a S100A4Δ9-N-ERMAD komplexhez képest is kisebbnek kellene lennie a méretnövekedés miatt.

### 6.2.3. Következtetések

Összefoglalva az NMR spektroszkópia segítségével tett megállapításokat, elmondhatjuk, hogy kétféle NMR megközelítéssel is bizonyítani lehet, hogy ugyan az S100A4 fehérje kötődik külön-külön a C-ERMAD-hoz és az N-ERMAD-hoz is, de nem jön létre

N-ERMAD–S100A4–C-ERMAD harmadlagos komplex, hanem a két komplex keveréke jelenik meg, ha jelen van mindkettő ezrin-fragmens az oldatban. Sejtes körülmények között ez azt jelenti, hogy egy ezrin molekula két S100A4 dimerrel is kölcsönhatásba tud lépni az N- és C-terminális doménjével külön-külön. Az C-ERMAD szerkezete az MPT-hez hasonlóan rendezetlenből rendezett, mégpedig helikális szerkezetű lesz, viszont a kialakuló komplex 5-6 nagyságrenddel gyengébb az S100A4-MPT komplexhez képest, ahogy ez az S100A4 HSQC spektrumának titrálási adataiból is kiszámítható (a  $K_d$  10  $\mu$ M körüli érték, szemben az MPT-komplex 0,1 nM körüli értékével). Ez megnyilvánul abban is, hogy különböző cserefolyamatok jelenléte tapasztalható a HSQC-spektrumon, ami miatt az aszimmetrikus komplex képződése ellenére nem jellemző a jelkettőződés, sőt egyes aminosavak teljesen kiszélesednek a komplex spektrumán. A kombinált kémiai eltolódás-perturbáció adatokból megállapítható, hogy az S100A4 ismert kötőhelyére kötődik a C-ERMAD (főként az L2, H3 és H4 régiók érintettek). Ugyanakkor a H1 hélix is jelentős eltolódásváltozást szenved az MPT-komplexhez hasonlóan. A szabad és kötött állapotú S100A4 amid protonjai kémiai eltolódásának 278–323 K tartományon mért hőmérsékletfüggésének összehasonlításából megállapítottam, mely esetben szűnik meg vagy jön létre új intramolekuláris hidrogénkötés, és a kötőregió mellett a H1 hélix ebben jelentősebben érintett, mint a molekula többi régiója, ami szintén allosztérikus hatásnak köszönhető.

### 6.3. Az S100A4 és a p53TAD komplexe

Ebben a projektben a p53 transzaktivációs doménjének (p53TAD) S100A4 fehérjével alkotott komplexének szerkezetét és dinamikai tulajdonságait vizsgáltuk NMR spektroszkópia és molekuladinamikai (MD) szimuláció együttes használatával. A kristályosítási próbálkozások korábban nem vezettek sikerre, így röntgenszerkezetet nem sikerült előállítani. Később a két fehérjéből és egy harmadik partnerrel, az annexin A2-vel készült fúziós fehérjét sikerült kristályosítani egyedül, azonban ebben a röntgenszerkezetben sem detektálható a p53TAD-domén minden régiója annak mozgékonyága miatt.

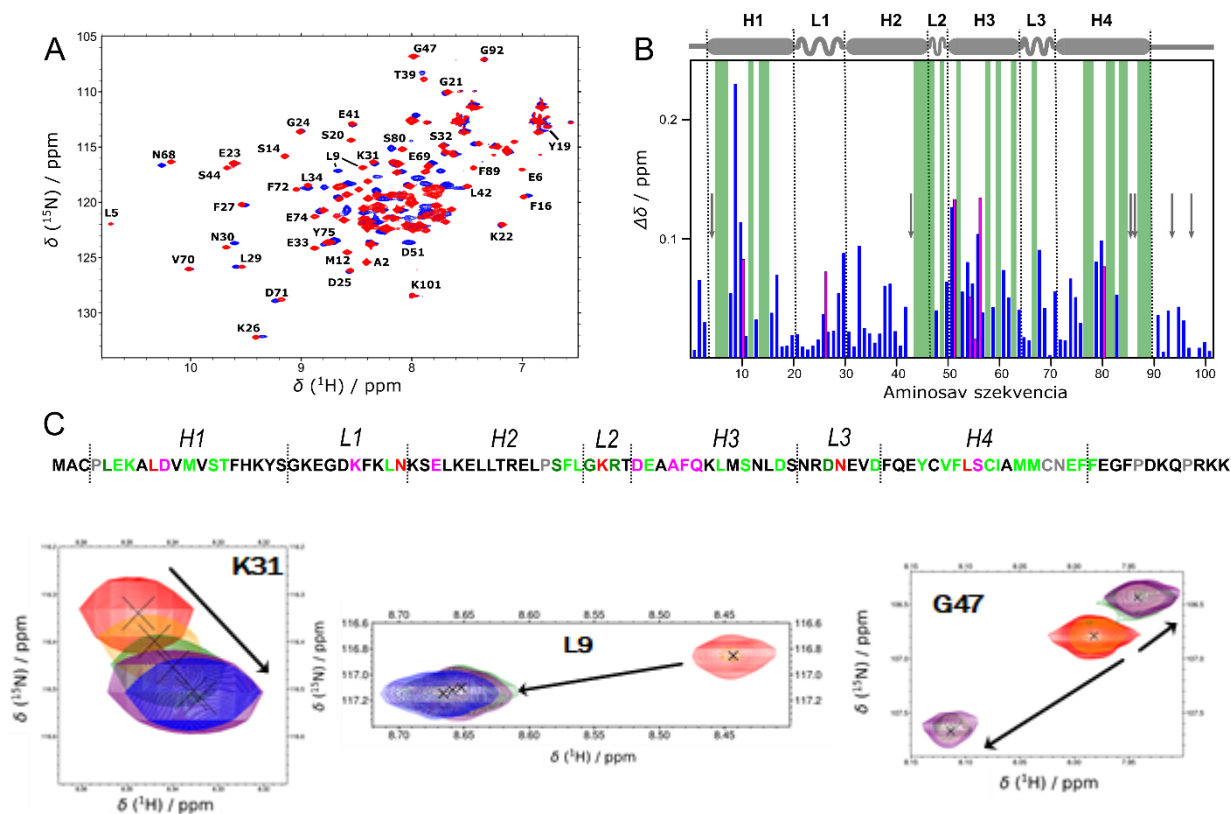
A projektben az S100A4 oldaláról megvalósuló vizsgálat és a p53TAD dinamikai méréseinek kiértékelése és analízise volt az én feladatom, illetve az MD-szimuláció eredményének NMR adatokkal való összehasonlítását a kémiai eltolódások és a dinamikai adatok alapján is megvizsgáltam.

#### 6.3.1. A komplexképződés hatásai az S100A4 molekulára

Az S100A4 oldaláról történő vizsgálódáshoz  $^{15}\text{N}$ -jelölt teljes hosszúságú, vad típusú humán S100A4 fehérjét használtunk, amelyhez több részletben, lépcsőzetesen titrálva adtuk a jelöletlen humán p53TAD molekulát. A kiindulási spektrum asszignációját a korábban általam mért S100A4 $\Delta$ 9, valamint egyéb irodalmi adatok alapján végeztem el (Elliott 2012, Cho 2015, Pálffy 2016). A végső kötött állapot és a szabad állapotról készült HSQC-spektrum egymásra helyezve látható a 15A. ábrán. A kémiai eltolódások perturbációját a korábban ismertetett módon kiszámoltam és ábrázoltam a szekvencia függvényében a (15B. ábra). A kombinált kémiai eltolódás-változások alapján a leginkább érintett régiók a L2 hurok és a H3 és H4 hélix, ahogy várható is (a kötőzseb által érintett régiók hasonlóan a többi komplexhez). Ezek mellett itt is jelentősebb perturbációt mutat a H1 hélix.

Jól látható, hogy az eltolódó jelek különböző viselkedést mutatnak a kémiai csere szempontjából: mind a gyors, mind a közepes, mind a lassú csere esete megfigyelhető a szabad és kötött állapotok között (az egyes aminosavak cseretípusa látható a 15C. ábrán). Sőt, némelyik jelkettőződést mutat, míg másokból csak egyetlen jelenik meg, ami mutatja, hogy az aszimmetria is részben detektálható az S100A4 spektrumán, hiszen ez a komplex is egy átkaroló komplex a korábbiakhoz hasonlóan. A cserejelenségeknek ilyen szinten változatos megjelenésében viszont különbözik a másik két általam vizsgált S100A4-komplextől.

A titrálás egyes lépéseiben kapott kombinált kémiai eltolódásokból ebben az esetben is kiszámoltam a komplex kötődési állandóját. Itt is kiválasztottam tíz olyan aminosavat a fehérje különböző régióiból, amelyek jó illesztésre adtak lehetőséget (C3, E23, K28, L29, L34, K35,



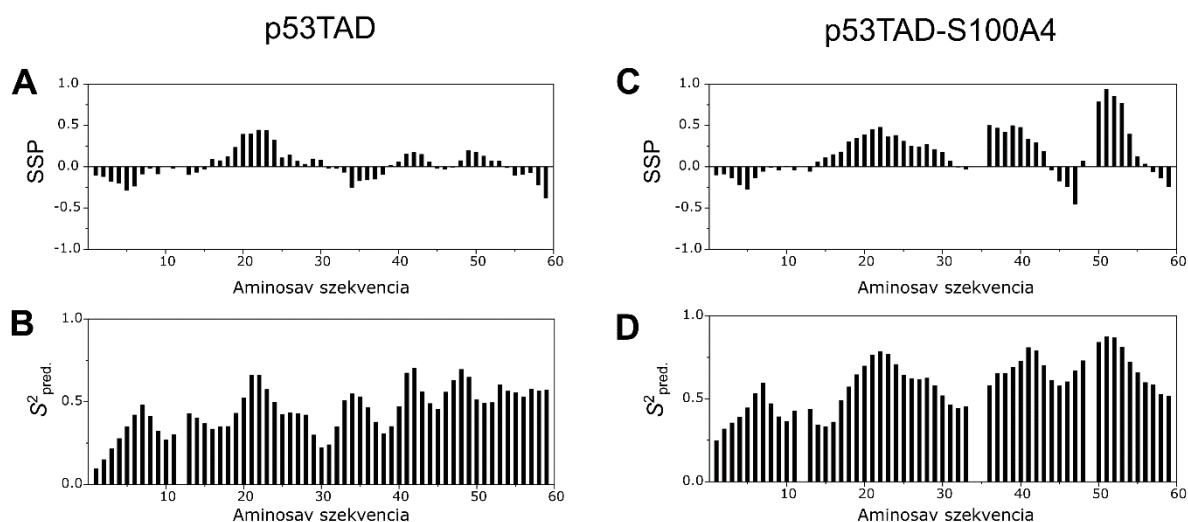
15. ábra: (A) Az S100A4  $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC spektruma szabad (vörös) és komplex formában a jelöletlen p53TAD fragmenssel (kék). (B) A komplexképződés során mérhető változások ( $\Delta\delta$  értékek) ábrázolva a szekvencia mentén (kék színnel az egyes aminosavak, és ahol jelkettőződés van, a másik jelre vonatkozó érték magenta színnel). A zöld színű régiók esetében nincsenek detektálható jelek kiszélesedés miatt. A szürke nyilak mutatják azokat az aminosavakat, amelyek nem detektálhatók (prolinok vagy átfedő jelek miatt nem lehetett asszignálni). Az S100A4 másodlagos szerkezete pedig a grafikon felett látható (H1-H4 hélixek és az L1-L3 hurkok, valamint a C-terminális rendezetlen farok). (C) Az egyes aminosavak különböző időskálájú cserefolyamatai ábrázolva az S100A4 szekvenciáján: lassú csere egy jellel (vörös) vagy kettőzött jellel (magenta), közepes csere (legtöbbször jelkiszélesedést okoz) egy jellel (világos zöld) vagy kettőzött jellel (sötét zöld), és gyors csere (csak egy jel jelenik meg, színezés: fekete). Azok az aminosavak, amelyek nem detektálhatók vagy nem asszignálhatók, szürke színnel vannak jelölve. A szekvencia alatt három példa a különböző cseretípusokra a  $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC spektrum kinagyított részletein: K31 gyors csere, L9: lassú csere, G47: lassú csere jelkettőződéssel (vörös: szabad állapot, lila: a titrálás során egy közbenső állapot, kék: a végső állapot).

E41, E69, Y75, K100). A kapott érték a  $K_d$ -re vonatkozóan  $6,7 \mu\text{M}$ . míg az  $n$ -re 1,00. Ezek összhangban vannak a korábban ITC-vel mért eredményekkel ( $2,1 \pm 0,6 \mu\text{M}$  az így mért  $K_d$  és 1:1 a sztöchiometriai arány az S100A4 dimer és p53TAD komplexben).

### 6.3.2. A p53TAD szerkezeti-dinamikai predikciója a kémiai eltolódások alapján

A p53TAD domén szerkezeti és dinamikai tulajdonságainak predikcióját a munkatársaktól kapott asszignáció alapján történt. Szabad és kötött állapotban az SSP értékek segítségével





**<sup>1</sup>MEEPQSDPSVEPPLSQETFSDLWKLLPENNVLSPLPSQAMDDLMLSPDDIEQWFTEDPGP<sup>60</sup>**

**16. ábra: A másodlagos szerkezet és a gerincdinamika predikciója a kémiai eltolódások alapján a p53TAD domén (A)-(B) szabad és (C)-(D) S100A4-kötött állapotában. A másodlagos szerkezeti elemek valószínűségét az SSP értékek jellemzik, a rendparaméterek becslése pedig a random coil index (RCI) alapján történt. Az ábrák alatt a használt p53TAD fragmens szekvenciája látható (az expressziós maradék N-terminális GS aminosavak nincsenek feltüntetve).**

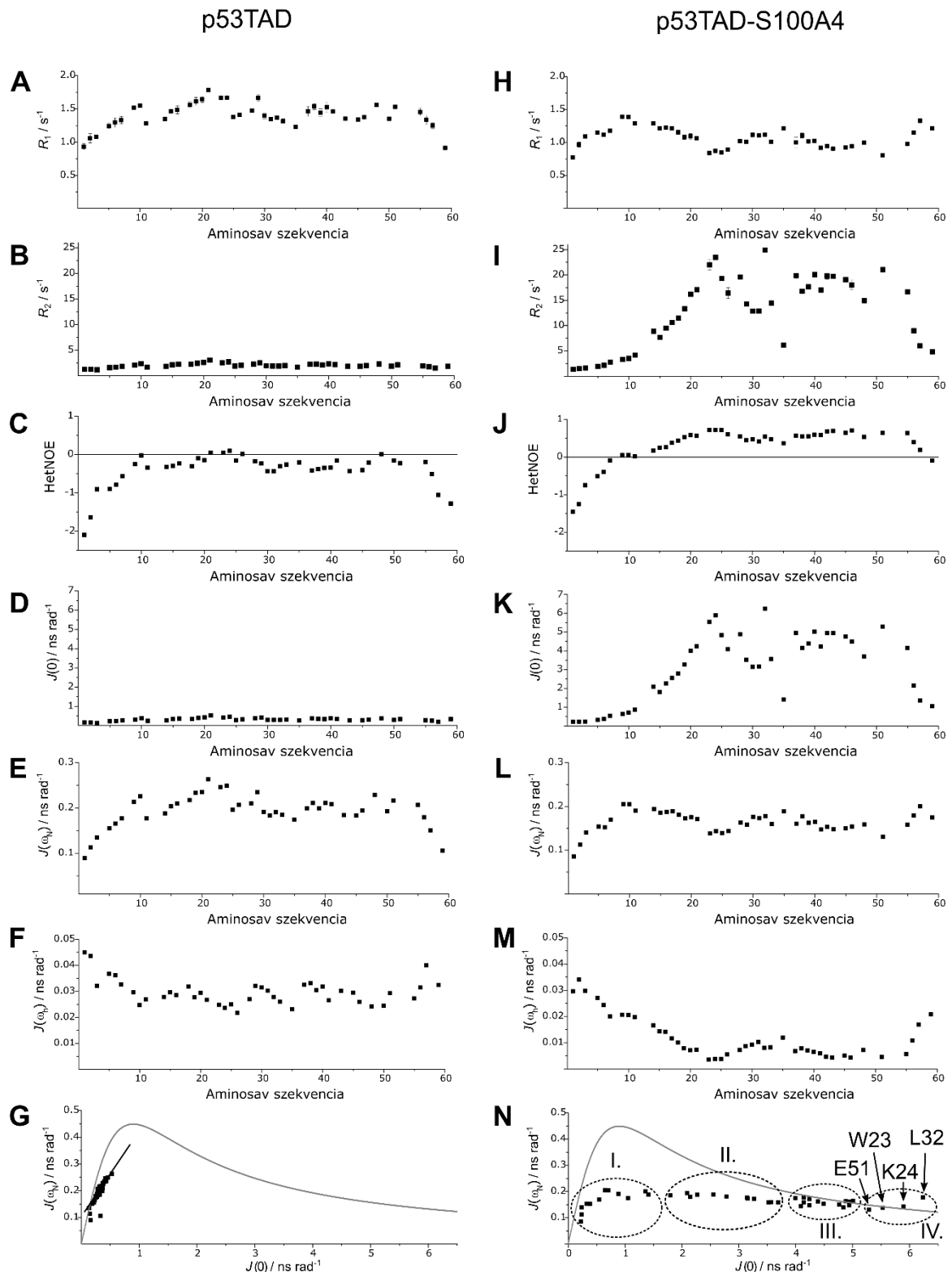
vizsgálható a másodlagos szerkezet valószínűsége (Marsh 2006), amelyekhez a mért  $C^\alpha$ ,  $C^\beta$  and  $H^\alpha$  kémiai eltolódásokat használtam fel (16A. és 16C. ábra). A szabad állapotban a kapott értékek 0 körüliek, tehát rendezetlen szerkezetű a fehérje. Inherens helicitás figyelhető meg a Q16–N30, továbbá gyengébb módon az A39–M44 és a D48–W53 régiókban. Az S100A4-komplexben a p53TAD domén SSP értékei szignifikáns módon növekednek: rendezetlenből rendezetté válik, de csak részlegesen. Három helikális jellegű régió alakul ki: L14–V31, P36–L43 és I50–T55. E három szakasz helicitása már inherens módon megjelent a szabad állapotban is. Az N-terminális régió (M1–L14), illetve a hélixek közötti hurok szakaszok továbbra is rendezetlen szerkezetűek maradnak. A szabad és kötött állapot mozgékonyágát a kémiai eltolódásokból számított random coil index (RCI) alapján prediktált  $S^2$ -értékekkel becsülhető (16B. és 16D. ábra). A másodlagos szerkezetbecsléshez hasonlóan a szabad p53TAD domén jellemzően flexibilis, míg a kötött állapotban jelentősen merevebbé válnak egyes részei – ebből is a három merevebb szakasz emelkedik ki.

### 6.3.3. A komplexképződés dinamikai hatásai a p53TAD-molekulára

A szabad és a kötött állapotú p53TAD molekula gerincdinamikai a szokásos gyorsdinamikai mérésekkel végeztük. A szabad állapotban a prolinokon kívül további néhány aminosavra nem lehet meghatározni megbízhatóan a paramétereket a spektrális átfedések miatt (E17, L22, D42,

M44, D49, Q52, W53, F54). A végeredményben megkapott dinamikai a 17A-C. ábrán láthatók. A kötött formában a prolinokon kívül néhány másik aminosav esetében a kiszélesedett jelek miatt, így az asszignáció hiányában nem lehetett dinamikai paramétereket kiszámolni (D49, I50, Q52, F54), további néhány a spektrális átfedések miatt itt is hiányzik (L22, M44, W53) – az eredmények a 17H-J. ábrán láthatók. A kapott paraméterek átlagértékeit, valamint szélsőértékeit a 4. táblázat tartalmazza. Míg a longitudinális relaxációs paraméterekben nincs igazán jelentős eltérés, a transzverzális relaxációs és a heteronukleáris NOE értékekben szembetűnő változást vehetünk észre: a komplexképződés hatására jelentékeny növekedés tapasztalható – pontosabban az első 13 aminosavat követően a szekvencia mentén egy fokozatos növekedés után (átmeneti szakasz) válnak nagy értékűvé az illesztett értékek. Ez egyértelműen bizonyítja a p53TAD domén C-terminális részének rendezetlenből rendezetté válását (a helikális szakaszok megjelenése miatt), amely az S100A4 fehérjével való komplexképződés hatására következik be. Ugyanakkor az N-terminális része változatlanul rendezetlen marad, vagyis nem vesz részt a komplexképződésben. Mindez a kémiai eltolódásokból készült predikcióval jó összhangot mutat.

A mért gerincdinamikai adatokat elsőként a redukált spektrális sűrűség-analízis segítségével elemeztem. Az adatok a 17. ábrán láthatók a szekvencia mentén, az átlagértékeket szintén a 4. táblázat tartalmazza. A  $J(0)$  által jellemzett lassú mozgások aránya jelentősen megnő a kötött formában (az átlagérték majdnem tízszeresére növekszik), míg a gyorsmozgások jellemzésére használt  $J(\omega_h)$  aránya határozott csökkenést mutat (az átlagérték harmadára csökken), ezzel szemben a közepes mozgásokat jellemző  $J(\omega_N)$  értékek közel hasonlóak maradnak. Ez is egyértelműen mutatja a rendezett szerkezet megjelenését a komplexben. A részletesebb elemzésben segít a térképezés módszere: a  $J(0)$ - $J(\omega_N)$  értékeket tartalmazó grafikonok a 17G. és 17N. ábrán található. A szabad állapotban a rendezetlenséget bizonyítja, hogy az alacsony frekvenciájú területre csoportosul az összes aminosav értéke, míg a kötött állapotban a vízszintes tengely mentén sokkal szélesebb tartományban helyezkednek el. Utóbbiban az „egymozgás” görbéhez viszonyított elhelyezkedésük alapján az aminosavaknak négy különálló csoportját tudjuk megkülönböztetni, amelyek fel is vannak tüntetve az ábrán. Az I. klaszterbe tartoznak a főként N- és C-terminálison elhelyezkedő nagymozgékonyaságú aminosavak (M1, E2, E3, Q5, S6, D7, S9, V10, E11, L35 – ez kivétel: két merevebb szakasz között található –, valamint D57, G59), a II. klaszterbe a fehérjén belüli mozgékony aminosavak (L14, S15, Q16, E17, T18, F19, N29, N30, V31, S33, D48, E56) – ide tartozik a rendezetlen N-terminális és a C-terminális rendezett szakasz közötti átmeneti, valamint a helikális régiók közötti hurokrégiók, a III. klaszterbe sorolható a megjelenő helikális szakaszok merev aminosavai (S20, D21, L25, L26,



17. ábra: A mért, majd illesztett  $^{15}\text{N}$ -relaxációs adatok a szabad p53TAD (A-G) és a p53TAD-S100A4 komplexre (H-N): fentről lefelé az  $R_1$ ,  $R_2$  relaxációs állandók és a heteronukleáris NOE értékek a szekvencia mentén. A redukált spektrális sűrűség-elemzésből kapott értékek esetében pedig (D, K) a lassú mozgásokat jellemző  $J(0)$ , (E, L) a közepes mozgásokat jellemző  $J(\omega_n)$  és (F, M) a gyors mozgásokra jellemző  $J(\omega_h)$  értékek az aminosav szekvencia mentén, valamint (G, N) a redukált spektrális sűrűség-térképezés  $J(0)$ - $J(\omega_n)$  grafikonjai.

Mért és számolt paraméterek		szabad p53TAD	p53TAD-S100A4
$R_1 / s^{-1}$	átlag	1,40	1,07
	min. → max.	0,91→1,79	0,77→1,39
$R_2 / s^{-1}$	átlag	2,04	12,65
	min. → max.	1,18→3,05	1,36→24,94
HetNOE	átlag	-0,41	-0,48 <sup>(M1-P13)</sup> 0,50 <sup>(L14-P60)</sup>
	min. → max.	-2,09→0,09	-1,45→0,05 <sup>(M1-P13)</sup> -0,10→0,72 <sup>(L14-P60)</sup>
$J(0) / ns \text{ rad}^{-1}$	átlag	0,31	3,09
$J(\omega_N) / ns \text{ rad}^{-1}$	átlag	0,19	0,16
$J(\omega_h) / ns \text{ rad}^{-1}$	átlag	0,03	0,01
$\tau_c / ns$	illesztett / átlag	2,56	10,1

4. táblázat: A szabad p53TAD és ennek S100A4-komplexének mért és az ebből számolt gerincdinamikai paraméterek átlagértéke és szélsőértékei. (A HetNOE esetében a komplexben az átlag és a szélsőértékek két külön szakaszban van feltüntetve, mert a molekula e két régiója jelentősen különbözik: az első rendezetlen marad, a második válik rendezett szerkezetűvé, és ebben az esetben a kettőt nem érdemes együttesen átlagolni ellentétben az  $R_1$  és  $R_2$  értékekkel, ahol a teljes rendszerre számolt átlag esetében is jól látható a változás). A  $\tau_c$  paraméter esetében esetében a szabad állapotban a Lefèvre-egyenes illesztéséből, míg a kötött állapotban az  $R_2/R_1$  értékek átlagaiból számolt érték látható.

E28, S37, Q38, A39, M40, D41, D42, L43, L45, S46, T55), és végül a IV. szakasz tartalmazza a legmerevebb (E51) vagy valószínűsíthetően konformációs cserével bíró aminosavakat (ezek a „egymozgás” görbén kívülre kerülnek: W23, K24, L32). Ezeket az eredményeket úgy összegezhethetjük a kémiai eltolódásokból prediktált szerkezeti információkkal együtt, hogy a p53TAD fragmens S100A4 fehérjével alkotott komplexében a hosszabb N-terminális régió (M1–P13), valamint a rövid C-terminális vég (E56–P60) egyáltalán nem vesz részt a komplexképzésben, a kötő régió pedig három elkülönülő helikális szakaszt tartalmaz: S20–E28, S37–S46 és E51–T55. A kialakuló hélixjellegű régiók között mozgékony hurokrégiók találhatók (N29–L35 és D48–I50), míg az L14–F19 szakasz egyfajta összekötőként átmenetet képez dinamikai szempontból a mozgékony N-terminális és a merevebb első hélix között. Konformációs csere megjelenése várható az első hélix két (W23 és K24), valamint a második flexibilis hurok egy aminosavának (L32) esetében.

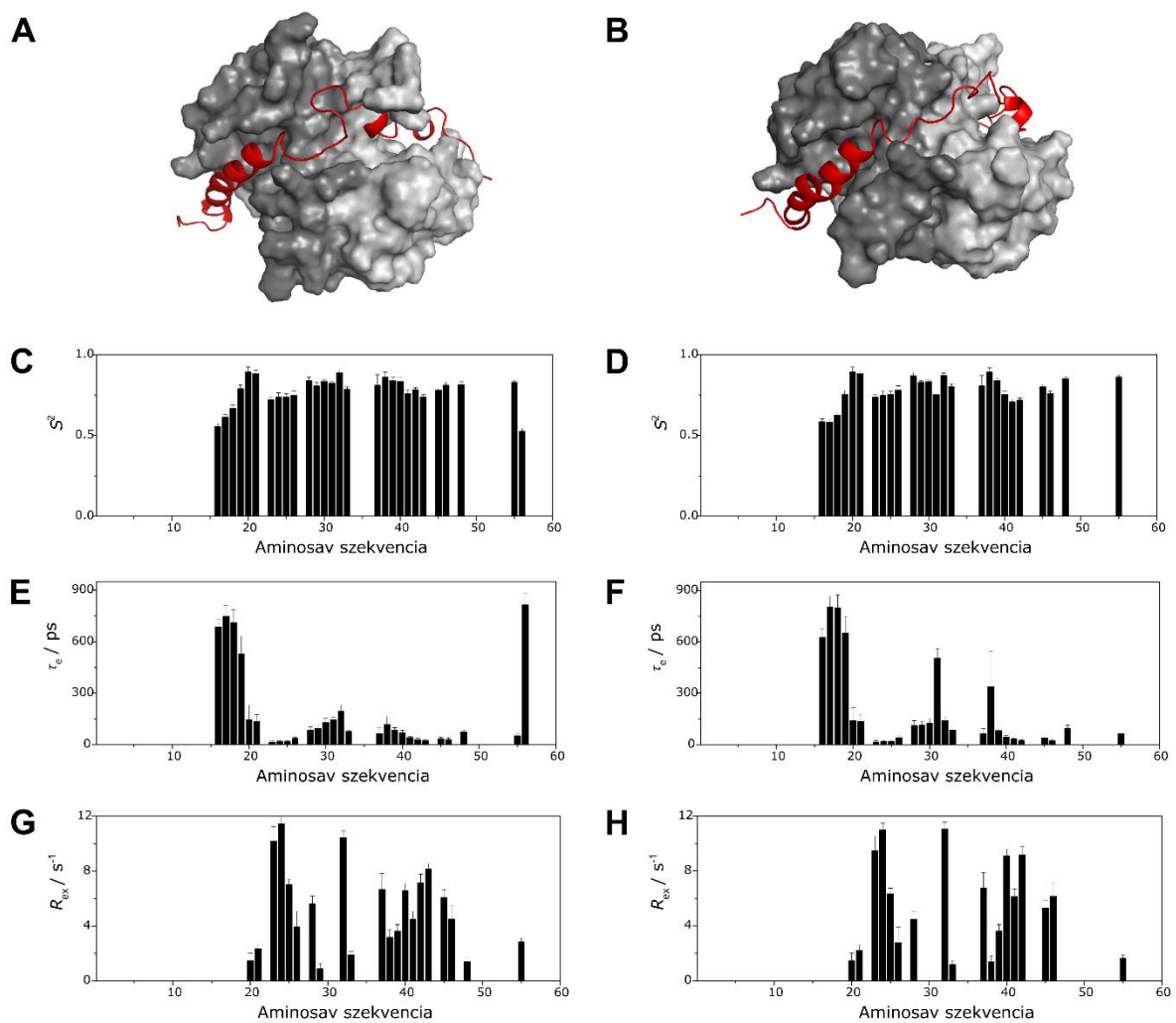
További jellemzőket is megállapíthatunk a molekulák véletlenszerű bukdácsoló mozgására vonatkozóan. A szabad állapotú p53TAD esetében a Lefèvre és munkatársai által közölt egyenlet alapján (Lefèvre 1996) a térképezés során kapott pontokra illesztett egyenes egyenletéből

kiszámíthottam a globális korrelációs időt ( $\tau_c$ ) és a gyorsabb belső mozgásokat jellemző belső korrelációs időt (az N- és C-terminális gyorsmozgású aminosavakat, M1–E3 és G59, kihagytam az illesztésből). Az így kapott  $\tau_c$  értéke 2,56 ns. Mivel ez a módszer a rendezett fehérjékre nem működik, a komplex esetében a globális korrelációs időt az  $R_2/R_1$  hányados alapján becsültem. Az egyes aminosavakra kiszámított értékeket átlagoltam a teljes molekulára úgy, hogy a mozgékony M1–P13 szakaszt kihagytam a számításból, így 10,1 ns lett az eredmény. A globális korrelációs idő tehát közel négyszerére növekedett, ami az S100A4 dimerrel létrejött komplex nagyobb méretének (és így lassabb bukdácsoló mozgásának) tudható be.

Mint hogy a rendezett fehérjék esetében a mozgások pontosabb leírását általában a Lipari-Szabó modellfüggetlen analízis teszi lehetővé, ezt felhasználva igyekeztem a komplex mozgásait részletesebben analizálni. Ismét axiálisan anizotróp közelítést használtam az MPT-komplexhez hasonló módon, és ehhez az MD-szimulációból kapott két szerkezetek átlagszerkezetét használtam fel. Az MD-szimuláció kiindulási szerkezete több, korábban meghatározott S100A4-komplex szerkezetből származó információ együttes figyelembevételével készült (az S100A4-MPT és az S100A4-annexin A2 szerkezetek, valamint kisszögű röntgenszórásból kapott S100A4-p53TAD feltételezhető alakja és az S100A4-p53TAD fúziós fehérjéről mért röntgenszerkezet részleges adatai felhasználásával). Ezek alapján a több kiindulási szerkezetből indított MD-szimuláció közül az NMR mérésekből meghatározott NOE alapú 15 távolság-kényszerfeltételnek végül két különböző sokaság felelt meg legjobban, amelyek együttesen írják le megfelelő pontossággal a komplexet. Ezek a továbbiakban 1. és 2. számmal jelölt szerkezetek az S100A4 C-terminális farokrégiójának állásában és a p53 hélixtartalmában különböznek (a 18A-B. ábra).

A Lipari-Szabó analízist a két szerkezet felhasználásával külön-külön elvégeztem, ennek eredményét a két esetre nézve együttesen kell értelmezni. Nem lehetett modellt illeszteni a következő aminosavakra: M1–S15, L35, E51, D57, G59 az 1. szerkezet esetében, és M1–S15, L35, L43, E56, D57, G59 a 2. szerkezet esetében. Ennek lehetséges okai között említhetjük a nagymértékű mozgékonytságot vagy az olyannyira összetett mozgásokat, amelyekhez az 5. típusú modell sem tartalmaz elég illeszthető paramétert, vagy az MD-ből kapott modellben is lehet hiba. A többi aminosavra kapott eredmény a 18. ábrán látható. A két eredmény nem különbözik jelentősen, csak lokális különbségek detektálhatók. A globális korrelációs idő mindkét esetben jó egyezést mutat a közelítéssel számolt értékkel (10,0 ns lett mindkét esetben). Az anizotrópia mértékét jellemző paraméter a  $D_{\parallel}/D_{\perp}$  jelentősen különbözik a két szerkezetben: a 2. esetben sokkal kisebb ez az érték (0,65) az 1. szerkezethez képest (0,83). A kapott rendparaméterek értékei hasonlóak a két szerkezetben (mindkét esetben 0,78 az átlagértékük, illetve

az 1. szerkezetre számolt esetben 0,53–0,89 közötti, míg a 2. szerkezetre számolt esetben 0,58–0,89 közötti értékek). A legtöbb aminosav esetében a 4. vagy 5. számú modellt lehetett illeszteni, ami azt jelenti, hogy a p53TAD domén mozgása a komplexben is összetett (sok paraméter szükséges a leíráshoz). Ez azt látszik alátámasztani, hogy a kvantitatív kiértékelés megbízhatósága megkérdőjelezhető. Ez magyarázhatja azt is, hogy a kémiai eltolódásokból prediktált rendparaméterek sem mutatnak igazán jó egyezést a kísérletileg meghatározottakkal: a hélixek közötti mobilis régiókra kapott rendparaméterek értékei jelentősen nagyobbak a predikcióhoz képest. Mégis megállapíthatjuk, hogy az S20–T55 szakasz válik merevebbé a többi régióhoz képest – a kialakuló helikális jellegű szakaszok határait viszont e módszer alapján nehéz



**18. ábra:** A p53TAD-S100A4 komplex MD-szimulációból kapott legnagyobb populációjú átlagszerkezetei: (A) 1. és (B) 2. szerkezet. Sötét szürke színnel az S100A4 A-lánca, világosabb szürke színnel a B-lánca (felületet ábrázoló ábra), a p53 piros színnel látszik. Ezek felhasználásával készült Lipari-Szabó modelfüggetlen analízis a komplexbeli p53TAD-ról: a kapott (C) és (D)  $S^2$ , (E) és (F)  $\tau_e$  és (G) és (H)  $R_{ex}$  paraméterek az 1. szerkezetre (C, E, H) és a 2. szerkezetre (D, F, H) számítva. A két eredmény nem különbözik jelentősen, csak lokálisan.

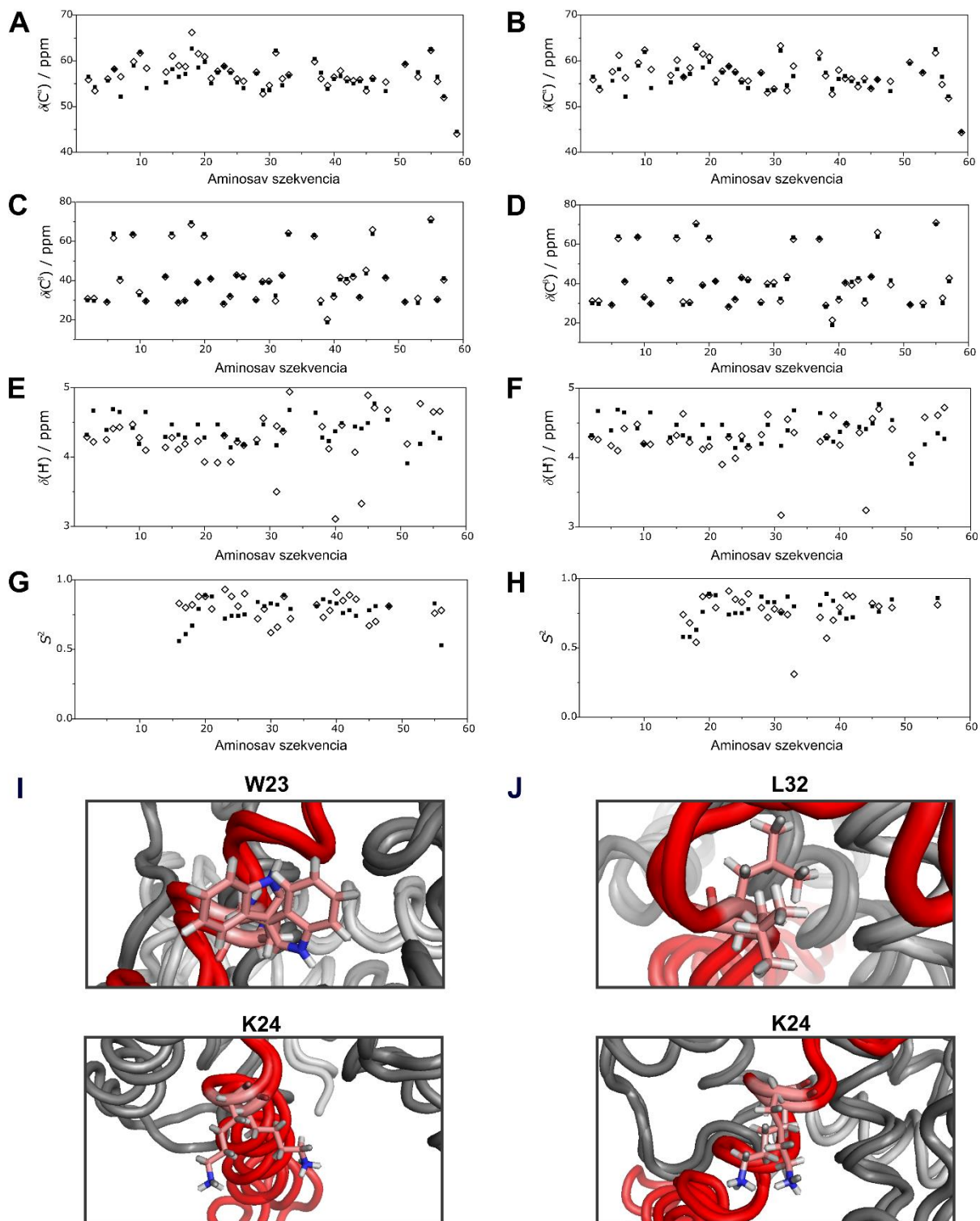
lenne meghatározni. A gyors belső mozgásokra jellemző  $\tau_e$  paraméterek főként az első hélixben jelentősek mindkét szerkezetben, de megjelennek a többi középső régiókhöz tartozó aminosavak esetében is. A legnagyobb  $R_{ex}$  értékek a redukált spektrális sűrűség módszerével meghatározott IV. klaszterhez tartozó aminosavak esetében jelentkeznek (W23, K24, L32) – kivéve az E51-et, amelyre nem lehetett modellt illeszteni.

Az S100A4-MPT komplex vizsgálata során láthattuk, hogy egy merevebb szerkezetű fehérje esetében a fehérje-fehérje komplexre is kiválóan használható a Lipari-Szabó modellfüggetlen analízis – és még sok irodalmi példát lehetne említeni. A S100A4-p53TAD komplex esetében e megközelítés kvantitatív eredménye mégis megkérdőjelezhető, inkább kvalitatív képet kaphatunk ezen keresztül. Ez a tény önmagában is a komplex összetett, nehezen leírható mozgásaira utal.

#### *6.3.4. Az MD-szimuláció és az NMR eredményeinek összevetése*

Végül az MD-szimuláció eredményeképpen előállított két szerkezeti sokaságot és az NMR segítségével mért adatokat vettem össze – ez validálhatja az MD-szimulációval kapott szerkezeteket. A mért  $C^\alpha$ ,  $C^\beta$  és  $H^\alpha$  kémiai eltolódások értékei és az 1. szerkezet klaszterezett szerkezetei közül az 1-83. klaszterek, a 2. szerkezet esetében pedig a 1-106. klaszterekből felépülő „sokaságokból” – ezek a teljes sokaság 95%-át fedik le – számolt adatok alapján végeztem el az összehasonlítást a CoNSEnsX+ webszerverrel. A számított és mért értékeket együtt tartalmazó grafikonok a 19A-H. ábrán láthatók. A C-atomok eltolódásai igen jó korrelációt mutatnak mindkét szerkezet esetében, különösen az S20 aminosav utáni C-terminális régióban (a teljes szekvenciára számolt korrelációs együtthatók az 1. és 2. szerkezetre nézve: 0,916 és 0,925 a  $C^\alpha$ , míg 0,997 és 0,997 a  $C^\beta$  kémiai eltolódások esetében), ami azt jelenti, hogy az MD-szerkezetek elfogadható modellt jelentenek szerkezeti szempontból.

A  $H^\alpha$  kémiai eltolódások nem mutatnak ilyen jó korrelációt: 0,503 és 0,545 a korrelációs együttható értéke, ráadásul a V31, M40 és M44 aminosavak esetében a számított értékek nem reálisak (3,1 és 3,5 ppm közötti értékek, amelyek nagyon valószínűtlenek – a mért értékek várható módon a 4,0-4,5 ppm tartományba esnek). Ennek az lehet a magyarázata, hogy a hidrogén atomok kémiai eltolódása nem csak a szerkezettől, hanem sok egyéb tényezőtől is függhet ebben az esetben. A sokaságokból számított rendparaméterek viszont jelentősen eltérnek az illesztett értékektől. Ennek oka lehet az, hogy a kísérleti adatokra illesztett rendparaméterek eleve nem voltak elég pontosak (hiszen láttuk a Lipari-Szabó modellfüggetlen analízis kvantitatív eredménye elve megkérdőjelezhető volt), s emellett az MD-szerkezeti sokaságok sem írják le megfelelően a rendszert dinamikai szempontból. Mivel ennél sokkal jobb egyezést is lehet kapni



19. ábra: Az MD-szerkezeti sokaságok és az NMR adatok összehasonlítása a ConNSEnsX<sup>+</sup> szoftverrel a p53TAD-S100A4 komplex esetében. A sokaságokból számított (üres rombusz) és kísérleti úton meghatározott (fekete négyzet) kémiai eltolódások (A), (B) a C<sup>α</sup>, (C), (D) a C<sup>β</sup> és a (E), (F) H<sup>α</sup> atomokra, valamint (G), (H) az S<sup>2</sup> rendparaméterekre az 1. szerkezetre (A, C, E, G) és a 2. szerkezetre (B, D, F, H) kiszámolt görbék. A nagy R<sub>ex</sub> értékkel rendelkező aminosavak két állapota az (I) 1. szerkezet (W23, K24) és a (J) 2. szerkezet (K24 és L32) esetében. Piros színnel a p53 lánc, szürke színnel az S100A4 láncjai és halványpirossal a kiemelt aminosavak láthatók.



a szimulált és mért adatok között más esetben (egy példa Czajlik 2017), ez a gyenge egyezés is valószínűleg a p53-S100A4 komplex összetett és nehezen leírható mozgásaira utal.

Ezek mellett a kvantitatív összehasonlítások mellett egy kvalitatív jellegű összevetést is tehetünk, ami erősíti az MD-szerkezetek megbízhatóságát: ha megvizsgáljuk a három legjelentősebb  $R_{ex}$  értékkel jellemzett aminosavat (W23, K24 és L32) a szerkezeti sokaságokban, azt láthatjuk, hogy az 1. szerkezetben a W23 és a K24 aminosavak a klaszterekben több határozottan eltérő térállást vesznek fel, míg a 2. szerkezetben ugyanez elmondható a K24 és L32 aminosavakra (19I-J. ábra). Tehát ez a megfigyelés az MD-modellek megbízhatóságát növeli, és egyben rámutat arra, hogy a két különböző szerkezet csak együttesen írja le megfelelően a p53TAD-S100A4 komplex szerkezetét.

### 6.3.5. Következtetések

A p53TAD-S100A4 komplexet mindkét kölcsönható partner oldaláról jellemeztük NMR spektroszkópiával. Az S100A4 oldaláról végzett vizsgálat során megállapítottam, hogy a p53TAD a C-ERMAD-hoz hasonló módon közel 4-5 nagyságrenddel gyengébben kötődik az S100A4-hez, mint az MPT, hiszen a titrálásból adódó  $K_d$  értéke 6,7  $\mu\text{M}$ -nak adódott (összhangban az ITC alapú mérésekkel). A gyengébb kötődés is lehet az oka annak, hogy kisebb kémiai eltolódás-változások jelentkeznek az S100A4  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ -HSQC spektrumán, mint az MPT-komplex esetében – szintén a C-ERMAD-komplexhez hasonló módon. Emellett viszont az S100A4 jól ismert kötőrégiójába kötődik a p53TAD, hiszen a többi esetben is tapasztalt módon az L2, H3 és H4 régiók eltolódás-változásai a legjelentősebbek. Mindemellett a másik két komplexhez hasonlóan a H1 hélix is átlagosnál jelentősebb az eltolódások változásai – ami a korábbi ismeretek fényében itt is valószínűleg allosztérikus effektus. A hasonló nagyságrendű kötődési állandóval bíró C-ERMAD-komplexhez képest a p53TAD hatására az S100A4 keresztcsúcsain bekövetkező perturbációk sokkal változatosabbak: gyors, közepes és lassú cserét mutató jelek egyaránt előfordulnak, sőt némelyik esetben jelkettőződés is tapasztalható, bár nem az összes jel esetében. Ezzel összhangban sokkal több szakaszon tapasztaltunk nem detektálható, kiszélesedő jeleket a komplex spektrumán (közepes időskálájú cserére utalnak ezek a szakaszok) a C-ERMAD-komplexhez képest – szinte minden átlagosnál nagyobb eltolódás-változást mutató régióban. Ezekből egyrészt következik, hogy a p53TAD-komplex is aszimmetrikus az MPT-komplexhez hasonlóan, viszont nemcsak gyengébb a p53TAD kötődése, hanem dinamikusabb is a keletkező komplex a másik kettőhöz képest.

A p53TAD oldaláról szerzett információk tovább finomítják a komplexről szerzett képünket. A kémiai eltolódásokból számolt SSP és RCI alapján prediktált  $S^2$  értékek, valamint a

dinamikai mérésekre alapuló redukált spektrális sűrűség térképezés módszere alapján a p53TAD szabad állapotban rendezetlen szerkezetű (azaz IDP). Három inherens helicitású régióval rendelkezik: Q16–N30, A39–M44 és D48–W53. Ezek közül az első a TAD1 szubdoménhoz tartozik, míg a másik kettő a TAD2-höz. A korábbi NMR-rel végzett vizsgálattal ez jó összhangot mutat, ugyanis a T18–L26, M40–M44 és D48–W53 szakaszok inherens helicitását mutatták ki (Lee 2000) – bár a két mérés hőmérséklete eltérő (mi 313 K-en, Lee és munkatársai 298 K-en mérték a p53TAD-ot). Az S100A4 hatására a p53TAD a komplexben részlegesen rendezetté válik – ahogy ez a kémiai eltolódásokból is prediktálható, de a dinamikai mérések elemzése alapján egyértelműen kijelenthető: az  $R_2$  és HetNOE értékek jelentősen növekednek a komplexben a szabad állapothoz képest, ugyanakkor nem az egész fragmensben. Ez a rendezetlenből rendezett átmenet a másik két komplexben is megfigyelhető volt az S100A4 kötőpartnerei esetében, és a p53TAD is helikális jellegűvé válik (összhangban azzal az ismert ténnyel, hogy az S100A4 kötőpartnerei jellemzően helikális szerkezetet vesznek fel a kötődés során). A komplexben kialakul három helikális jellegű szakasz a korábban inherens helicitást mutató régiókból, ezek a redukált spektrális sűrűség-elemzés alapján: S20–E28, S37–S46 és E51–T55. Ezek közül az első hélix a TAD1 szubdoménba tartozik, a másik kettő a TAD2-be (bár a szubdomének határa nem egyértelmű mindig). Az N-terminális M1–P13 és a C-terminális E56–P60 szakaszok egyáltalán nem vesznek részt a komplex kialakításában. A Lipari-Szabó modellfüggetlen elemzés is kimutatta a rendezettebb régiókat, és azt is, hogy a merevség ellenére nagyon összetett mozgást mutatnak a p53TAD aminosavai (jellemzően 4. és 5. modellt lehetett rájuk illeszteni), ami miatt nem is jellemezhető megbízható módon kvantitatívan e módszerrel a komplex dinamikája. Ugyanakkor mindkét megközelítés egybehangzóan konformációs cserét mutatott ki az első hélixben található W23 és K24, valamint az utána következő hurokrégió L32 aminosavai esetében. Az MD-szimuláció eredményeként kapott két szerkezet megbízhatóságát nem csak a kémiai eltolódások, hanem e három aminosav több elkülöníthető konformációs állapotának jelenléte is megerősítette.

A p53TAD más interakciós partnerekkel való kölcsönhatása esetében is hasonló helikális jellegűvé válását tapasztalták: az MDM2-vel, a CBP és p300 fehérje több doménjével, valamint a TFIIH-val képzett komplexe esetében is (Raj 2017). Ezekben az esetekben a p53TAD egy szakaszából két amfipatikus hélix keletkezett: az első a TAD1, a másik a TAD2 régióból alakult ki. A p53TAD rendezetlenségéből fakadóan eléggé flexibilis ahhoz, hogy alkalmazkodjon a partner kötőzsebének szerkezetéhez. Az általam talált néhány kiemelt aminosav kapcsán megjegyzendő, hogy a W23-ról bizonyították, hogy fontos szereplője az Mdm2-vel képzett komplexnek (az L22-vel együtt, amit a spektrális átfedések miatt nem tudtam vizsgálni)

(Hu 2006), míg a W23 és K24 együtt az adenovírus E1B fehérjéjével képzett komplexben játszanak jelentős szerepet (Lin 1994), az E51 szerepe pedig a TFIIH-val alkotott komplex esetében fontos (Di Lello 2006). Viszont az általam tapasztalt konformációs csere jelensége ezen aminosavak esetében arra utalhat, hogy nem lehetnek ugyanilyen időben állandó kulcsszereplői az S100A4-hez való kötődésnek, hanem legfeljebb részben, az egyik konformációs állapotukban játszhatnak fontos szerepet.

A korábban tanulmányozott p53TAD-komplexek közül a hRPA70-p53TAD esetében vizsgálták legrészletesebben NMR segítségével a kötődés hatására bekövetkező dinamikai változásokat a p53TAD doménben (Vise 2005). Itt is tapasztalták a keresztcsúcsok kiszélesedését a komplexképződés hatására, emiatt nem 1:1, hanem 4:1 arányban (a p53TAD volt feleslegben) vizsgálták, viszont így valójában a szabad és kötött állapot keverékét tanulmányozták. A szokásos gyorsdinamikai mérések mellett  $R_{1\rho}$  méréseket is végeztek a cserefolyamatok vizsgálatára, és a mért adatokat redukált spektrális sűrűség analízissel elemezték. Mivel 298 K-en végezték a méréseket, nem érdemes a dinamikai adatok abszolút értékeit összevetni a mi 313 K-en mért adatainkkal, viszont a komplexképződés hatására bekövetkező relatív változásokat igen. A másodlagos kémiai eltolódásokból és a dinamikai adatok alapján egyértelműen látható, hogy mindössze a hRPA70-komplexben csak a TAD2 domén válik merevebbé (P36-D61), míg a TAD1 domén változatlanul rendezetlen szerkezetű marad. A mért dinamikai paraméterekben és a számított  $J(0)$  átlagértékeiben bekövetkező változások sokkal kisebbek, mint az S100A4-komplex esetében (utóbbi 1,44-szeresére változik a hRPA70-komplexben, míg az S100A4 hatására közel tízszeresére), a  $J(\omega_N)$  átlagértékei hasonló módon minimálisan változik, míg a  $J(\omega_H)$  átlagértékében is kisebb a változás (mindössze 0,9-szeresére, miközben az S100A4 hatására harmadára csökken). A HetNOE értékekben minimális változást tapasztaltak. Mindez azzal is magyarázható, hogy a 4:1 arány miatt egy részlegesen kötött állapotot tanulmányoztak. Az  $R_2$  és  $R_{1\rho}$  értékek összevetése alapján megállapított konformációs cserét mutató aminosavak a D42, L45, D48, I50 és T55, ami teljesen különbözik az általunk tapasztalathoz képest.

Egy másik interakciós partner, a CBP fehérje több doménjével is kötődik a p53TAD-hoz, amelyeket vizsgáltak NMR spektroszkópiával. A TAZ1 és TAZ2 domének p53TAD-dal alkotott komplexeinek NMR alapú szerkezetét az utóbbi években oldották meg egy érdekes ötlet felhasználásával: intein alapú fúziós módszerrel összekötötték egyrészt a vizsgálandó CBP-domént a p53TAD-doménnel, amelyek közül mindig csak az egyik volt izotópjelölt (Krois 2016). Így sikerült növelni a kötődés erősségét és a kémiai cserét a lassú csere tartományba eltolni, ami miatt az addig sok kiszélesedett és így nem detektálható jel helyett élesebb keresztcsúcsokat

kaptak, amelyek alapján megfelelő mennyiségű NOE-kényszerfeltételt tudtak gyűjteni a szerkezetszámoláshoz. Mindkét CBP-doménnel alkotott komplexről és a szabad p53TAD fragmens esetében mérték a HetNOE értékeket, és az S100A4-komplex esetében általunk mérthez nagyon hasonló eredményt kaptak. Ugyanakkor ebben az esetben is csak két helikális szakasz keletkezett a p53TAD-ból: a TAD1 szubdoménból a Q16–L25 régió helikális mindkét komplexben, míg a TAD2-ből a P47–W53 a TAZ1- és P47–T55 régió a TAZ2-domén esetében. A HetNOE értékekkel való egyezés mellett a másik két dinamikai paramétert ( $R_1$  és  $R_2$ ) alakulását nem lehet összevetni, mivel ezeket nem vizsgálták.

A CBP fehérje N-terminális doménjével, az NCBD-vel alkotott p53TAD komplex szerkezetét is vizsgálták (Lee 2010), s később megállapították, hogy ez „bolyhos” komplex (Sharma 2015), emiatt szerepel a FuzDB adatbázisban (Miskei 2017) is. Erről ugyan dinamikai mérések nem készültek, de NMR alapú szerkezetszámolást végeztek a hagyományos NOE távolságkényszerek meghatározásán túl paramágneses relaxáció növekmény (PRE) mérések eredményeinek felhasználásával. Ebben a komplexben is két hélix alakul ki a p53TAD-doménből a F19–L25 és a P47–W53 szakaszokon (a TAD1 és TAD2 szubdoménekben). Mindezek alapján láthatjuk, hogy az S100A4-komplexben a TAD1 szubdomén hasonlóan viselkedik a korábban vizsgált fehérjékhez, még ha a kialakult határai nem teljesen egyeznek ezekkel. Ugyanakkor a TAD2 a szokásostól némileg eltérő módon viselkedik az általunk tanulmányozott rendszerben, hiszen ez nem egy, hanem kettő különálló helikális szakasszá alakul.

Az S100A4, valamint a p53TAD oldaláról végzett NMR alapú szerkezeti és dinamikai információk alapján kijelenthetjük, hogy a p53TAD-S100A4 komplexben is jelentősen dinamikus marad a p53TAD domén és csak részlegesen válik rendezett szerkezetűvé. Ezzel összhangban vannak az MD-szimuláció eredményei is: épp emiatt nem lehetett csak egy modellel leírni a komplex szerkezetét, hanem két különböző modell írja le az NMR kényszerfeltételeknek megfelelően azt. Sőt, feltételezhetően ezért nem voltak sikeresek a fehérjemódosítás nélküli kristályosítási próbálkozások sem, és ezért nem lehetett röntgendiffrakcióval meghatározni a komplex szerkezetét. A fúziós fehérje formában meghatározott röntgenszerkezetben a p53TAD egyes régiói továbbra sem detektálhatók a mozgékonyág miatt. Mindezek alapján egyértelmű, hogy a p53TAD az S100A4 fehérjével a p53TAD-NCBD-hez hasonló módon dinamikus, „bolyhos” komplexet képez.

## 7. A nemizom-miozin II fragmenseinek vizsgálata

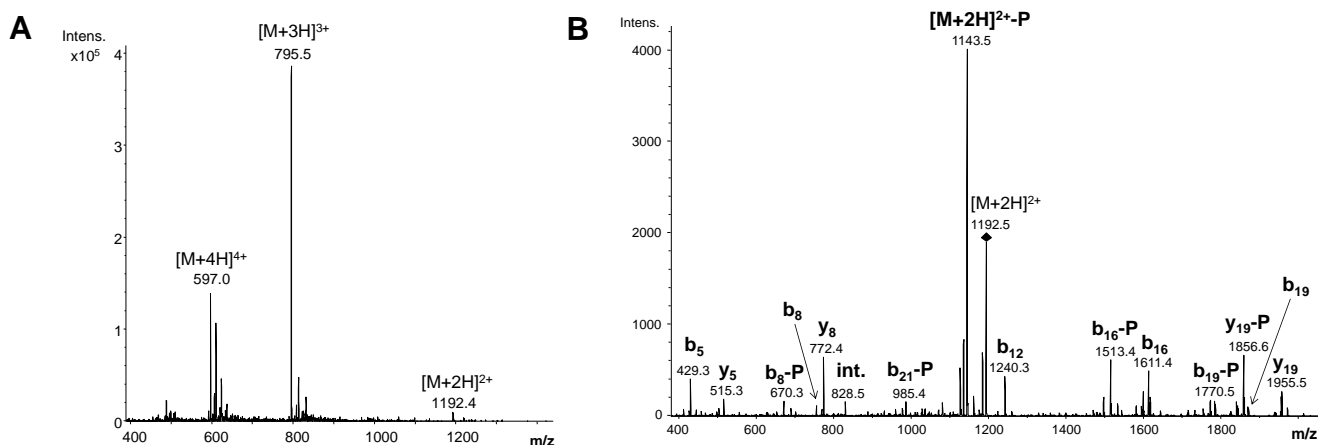
### 7.1. A foszforiláció hatásai

Ebben a kutatási projektben az NMIIA és NMIIB filamentumszétesésének S100 fehérjék és foszforiláció által megvalósuló regulációját vizsgáltuk a korábbi ellentmondásos irodalmi adatok tükrében. Ezen belül NMR spektroszkópia, MS és ECD segítségével a két fehérje C-terminális farok régióját vizsgáltuk különféle fragmenseik formájában. A CK2 kináz által történő foszforiláció hatásait elemeztük szerkezeti-dinamikai szempontok alapján. Az NMIIA esetében vizsgáltuk részletesebben, hiszen ebben az esetben vetődött fel korábban a foszforiláció hatására bekövetkező szerkezeti visszahajlás a kísérleti eredmények szerkezeti magyarázataként. Mindehhez az NMIIA-ból az M111A és M111A-P fragmenseket használtuk, valamint a coiled coil szakasz stabilitásának növelése érdekében az M111A-L és M111A-L-P mesterségesen előállított mutánsokat is. Mindehhez kontrollként a csak a teljes rendezetlen C-terminális farok régiót tartalmazó M67A-t és M67A-P-t használtuk. Az NMIIB esetében az MS és ECD mérések során az M111A-val analóg M121B-t és M121B-P-t, míg az NMR mérések során a kiméra M121AB-t és M121AB-P-t vizsgáltuk.

#### *7.1.1. A foszforilációs helyek meghatározása a tömegspektrometria alapján*

A HPLC-MS módszerrel végzett vizsgálatok alapján az M67A és az M111A esetében is egy helyen történő foszforilációt mutattunk ki: az M67A mért tömege 7504 Da (elméleti tömege: 7503 Da), az M67A-P esetében 7584 Da (az egyszeresen foszforilált elméleti tömege 7583 Da), az M111A esetében a mért tömeg 12940 Da (elméleti tömeg: 12938 Da), míg az M111A-P mért tömege 13019 Da (egyszeresen foszforilált elméleti tömege: 13018 Da). Az M121B és M121AB esetében viszont a foszforiláció több helyen is megtörtént a várható módon, ezért a foszforilált változatok esetében a nemfoszforilált eredeti fehérjén kívül egyszeres és kétszeres foszforiláció is detektálható volt. Az M121B mért tömege: 14168 Da (elméleti tömeg: 14167 Da), az M121B-P esetében a két legnagyobb csúcs 14248 Da (az egyszeresen foszforilált elméleti tömeg: 14247 Da) és 14329 Da (a kétszeresen foszforilált elméleti tömege: 14327 Da). A mért tömegek és az elméleti tömegek eltérése a mérés hibahatárán belül vannak, ezért elfogadható pontosságú eredmények ezek.

A tripszines emésztést és a foszfopeptidek dúsítását követően az M67A-P és M111A-P esetében a S1943 helyen foszforilált peptideket mutattuk ki (mivel a tripszines emésztés nem volt 100%-os hatékonyságú, ezért többféle foszforilált hasítási termék keletkezett), a legnagyobb



**20. ábra:** (A) Az M67A-P és M111A-P tripszines emésztményéből TiO<sub>2</sub>-os dúsítást követően megtalált foszfopeptid, a <sup>1937</sup>KGAGDGSDEEVDGKADGAEAKPAE<sup>1960</sup> MS spektruma. Az ESI módszerrel többféle töltöttségű ion keletkezik, ezek vannak jelölve a csúcsok felett. (B) Ugyanennek a peptidnek a tandem tömegspektruma, amely során fragmentálódik a peptid. A fekete rombuszsal az anyaion van jelölve, és -P jelzéssel a foszfát veszteséget szenvedett fragmens (ez bizonyítja a foszfát csoport jelenlétét). Az *int* egy belső fragmension, a *b* és *y* ionok szekvenciális peptidfragmensek.

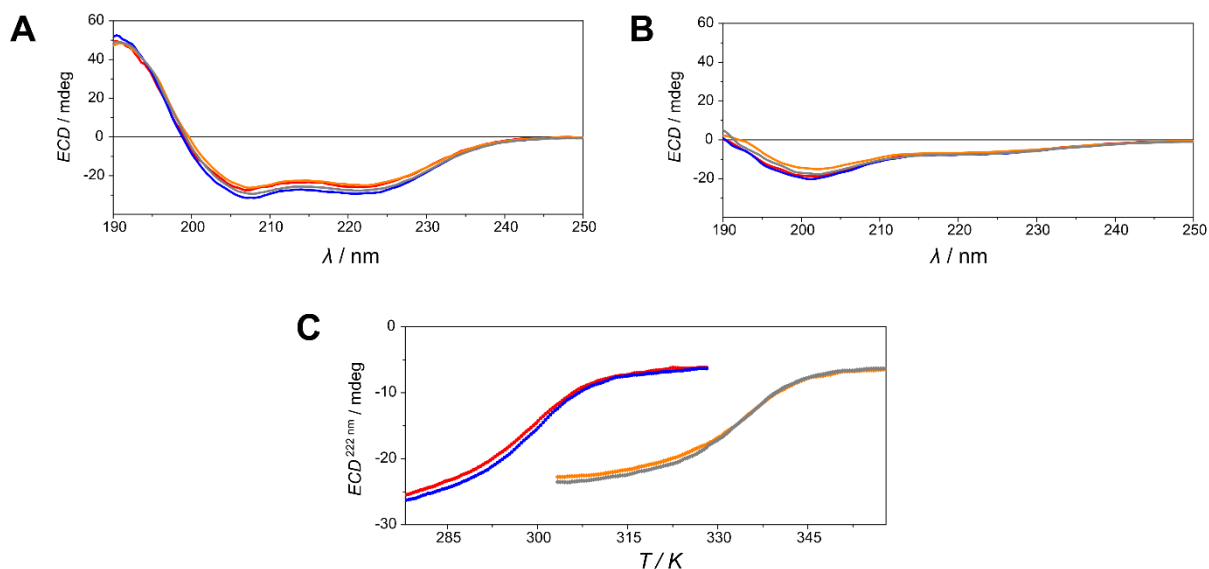
intenzitású termék szekvenciája: <sup>1937</sup>KGAGDGSDEEVDGKADGAEAKPAE<sup>1960</sup> (20A. ábra), és emellett kisebb mennyiségben még a <sup>1937</sup>KGAGDGSDEEVDGK<sup>1950</sup> és detektálható a <sup>1938</sup>GAGDGSDEEVDGKADGAEAKPAE<sup>1960</sup>. Mivel a foszforiláció szerinen vagy treonin történhet, ezért csak az S1943 lehet a foszforilált aminosav. Ezt a legnagyobb intenzitású fragmens tandem tömegspektrometriás vizsgálata is megerősítette (20B. ábra). Az M121B esetében többféle foszfopeptidet lehetett kimutatni: <sup>1964</sup>TSDVNETQPPQSE<sup>1976</sup> (ez nagyrészt egyszeresen foszforilált, de kisebb mennyiségben kétszeresen foszforilált is előfordult), <sup>1944</sup>RQLHLEGASLELSDDDTESK<sup>1963</sup> és <sup>1945</sup>QLHLEGASLELSDDDTESK<sup>1963</sup>, amelyek csak egyszeresen foszforilált formában voltak jelen. A foszforilációs helyek nem egyértelműek ezek alapján, mivel mindhárom említett peptidben több lehetséges CK2 foszforilációs hely is található. Korábbi tanulmányok alapján az S1952, S1956, T1960, S1965, S1975 mind foszforilálódik (Vicente-Manzaneres 2009), ehhez képest mi kevesebb helyet találtunk, hiszen az emésztett peptidek alapján kettő fő (R1944-K1963 és T1964-E1976 aminosavak közötti szakaszokon) és egy kisebb mértékben foszforilált helyet lehet kimutatni (az T1964-E1976 aminosavak közötti szakaszon). Elvégeztük a vizsgálatot az M121AB-P-re, és ugyanezeket a foszforilált peptideket találtuk, vagyis a kiméra fragmens ugyanolyan módon foszforilálódik, mint az M121B, ami azt jelenti, hogy használhatjuk az NMIIB modelljeként a továbbiakban.

A tömegspektrometriás mérések eredményei tehát rámutattak arra, hogy a vártnak megfelelően az NMIIA esetében csak a S1943 aminosav foszforilálódik a CK2 enzim hatására,

az NMIIB esetében viszont a vártnál kevesebb foszforilációs helyet találtunk (kettő fő és harmadik minor helyet), amelyek pontos helye a mérések alapján nem lettek egyértelműek.

### 7.1.2. A foszforiláció hatása a coiled coil stabilitására és az aggregációs készségekre

Az ECD spektroszkópai mérésekkel az M111A és M111A-P másodlagos szerkezetét és hőstabilitását vetettük össze. A coiled coil régió stabilizálása céljából készítettük az M111A-L és M111A-L-P mutánsokat is, amelyeket szintén vizsgáltunk. Mind a négy fehérje helikális szerkezetű alacsony hőmérsékleten, mivel a 278 K-en mért ECD spektrumuk jellegzetes C típusú spektrum (21A. ábra), viszont magas hőmérsékleten letekerednek és rendezetlen fehérjékre jellemző spektrumot kapunk (az M111A és M111A-P esetében 328 K-en, az M111A-L és a M111A-L-P pedig 358 K-en mért spektrumok alapján, 21B. ábra). A 222 nm-en mért értékek változásait az M111A és M111A-P esetében 278–328 K között, míg a mutánsokat nagyobb hőstabilitásuk miatt 303–358 K között mértük (21C. ábra). Mind a négy hőstabilitási görbe jellegzetesen szigmoid alakú, amely egy kétállapotú rendszerre jellemző. A natív és a foszforilált fehérjék görbéjének lefutása nagyon hasonló, a kiszámolt olvadási hőmérsékletükben sincs számottevő különbség: az M111A-nak és az M111A-P-nek 300 K, míg az M111A-L-nak és M111A-L-P-nek egyaránt 335 K az olvadási hőmérséklete. Ez azt jelenti, hogy a coiled coil szakasz hőstabilitására nincs hatással a foszforiláció. Ugyanakkor figyelemre méltó eredmény,

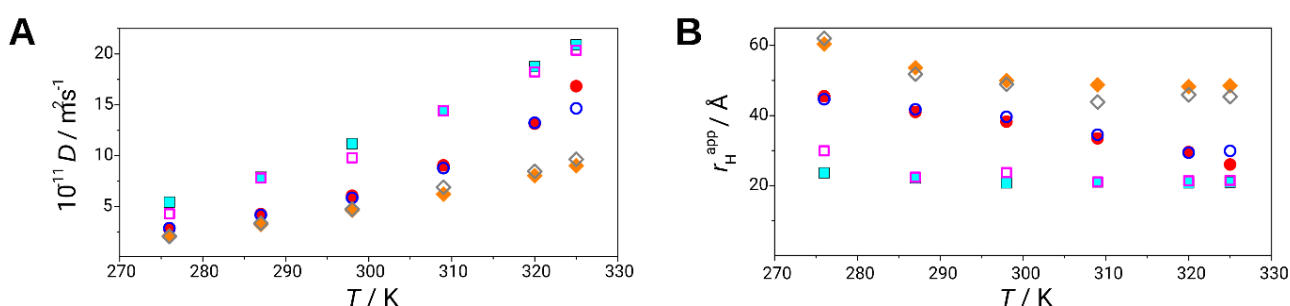


**21. ábra:** A coiled coil-t tartalmazó NMI1A fragmensek ECD spektrumai (A) alacsony (278 K) és (B) magas (328 K M111A és M111A-P esetében és 358 K M111A-L és M111A-L-P esetében) hőmérsékleten. (C) E négy fragmens felfűtési görbéje: a 222 nm-en mért ECD értékek hőmérsékletfüggése. Az ábrákon M111A piros, az M111A-P kék, M111A-L narancs, az M111A-L-P szürke színnel szerepel.

hogy mindössze három aminosav A-L cseréje milyen nagy változást okoz, hiszen az olvadási hőmérsékletek 35 K-nel nagyobbak lettek a leucin mutáns fehérjékben.

Ezt követően hőmérsékletfüggő diffúziós NMR mérésekkel is vizsgáltam ugyanezeket a miozin fragmenseket, hogy a diffúziós állandóból a Stokes-Einstein egyenlet alapján számolt látszólagos hidrodinamikai sugarak hőmérsékletfüggő változását követhessük 278–323 K között. (Mivel a coiled coil szakaszt tartalmazó fehérjék inkább rúd alakúak, semmint gömbszerűek, ezért csak egy feltételezett látszólagos hidrodinamikai sugarat kaptunk ebből, ami az eredmények egymással való összevetését teszi lehetővé és nem az abszolútértékük a mérvadó.) A 22. ábrán látható eredmények alapján elmondhatjuk, hogy a foszforiláció egyik fragmens esetében sem okoz igazán jelentős méretbeli változást egyik hőmérsékleten sem. Érdekesség, hogy a legkisebb, az M67A és M67A-P minden hőmérsékleten közel azonos méretű, ami abból fakad, hogy teljes mértékben rendezetlen szerkezetű. Az M111A és M111A-P esetében a coiled coil fokozatos letekeredése okozza a méretbeli csökkenés tendenciáját – ahogy az ECD mérések alapján is látható, hogy ebben a hőmérsékleti tartományban történik a coiled coil szerkezet fokozatos letekeredése. Az M111A-L és M111A-L-P mutánsok viszont végig feltekeredett coiled coil képeznek, ahogy az ECD eredmények mutatják. Ez a mért látszólagos hidrodinamikai sugár érték alakulásában is tükröződik, hiszen 298 K felett szinte végig azonos marad méret, és közel azonos az M111A és M111A-P 278 K-en mért értékével. Ugyanakkor 298 K alatti hőmérsékleten ennél nagyobb a mérete, ami a leucin mutáns aggregációjára utal: a coiled coilok még nagyobb aggregátummá állnak össze.

Az eredmények alapján a fragmensek aggregációs tulajdonságait is érdemes részletesebben megvizsgálni. Mivel a diffúziós állandó és a molekulatömeg közötti összefüggéseket 287 K



22. ábra: (A) A diffúziós NMR spektroszkópiával mért translációs diffúziós együtthatók (a mérési hiba 1-5% közötti minden pontnál, így nem ábrázolható) és (B) ebből számolt látszólagos hidrodinamikai sugarak alakulása 278–323 K tartományban az M67A (világos kék négyzet), az M67A-P (magenta üres négyzet), az M111A (piros kör), az M111A-P (kék üres kör), az M111A-L (narancs rombusz) és az M111A-L-P (szürke üres rombusz) esetében.



<b>Fragmens</b>	$M_{\text{elméleti}} / \text{Da}$	$10^{-11} D / \text{m}^2\text{s}^{-1}$	$r_H / \text{Å}$	$M_{\text{számolt}} / \text{Da}$	<b>Aggregáció</b> $M_{\text{számolt}} / M_{\text{elméleti}}$
<b>M67A</b>	7503	$7,89 \pm 0,04$	22,1	6784	<b>0,90</b>
<b>M67A-P</b>	7583	$7,48 \pm 0,11$	23,4	7602	<b>1,00</b>
<b>M111A</b>	12938	$4,26 \pm 0,03$	41,0	25121	<b>1,94</b>
<b>M111A-P</b>	13018	$4,18 \pm 0,05$	41,8	26087	<b>2,00</b>
<b>M111A-L</b>	13064	$3,26 \pm 0,01$	53,6	44330	<b>3,39</b>
<b>M111A-L-P</b>	13144	$3,37 \pm 0,04$	51,8	41185	<b>3,13</b>
<b>M121AB</b>	14072	$3,47 \pm 0,03$	50,3	38756	<b>2,75</b>
<b>M121AB-P</b>	14232	$4,76 \pm 0,12$	36,7	19774	<b>1,39</b>

5. táblázat: A miozinfragmensek 287 K-en mért translációs diffúziós állandóiból kiszámolt látszólagos hidrodinamikai sugár értékei és molekulatömege, amelyet az elméleti molekulatömeggel összevetve az aggregáció mértéke kiszámolható. (Az M121AB-P esetében a kétszeresen foszforilált forma elméleti molekulatömegét vettem figyelembe.)

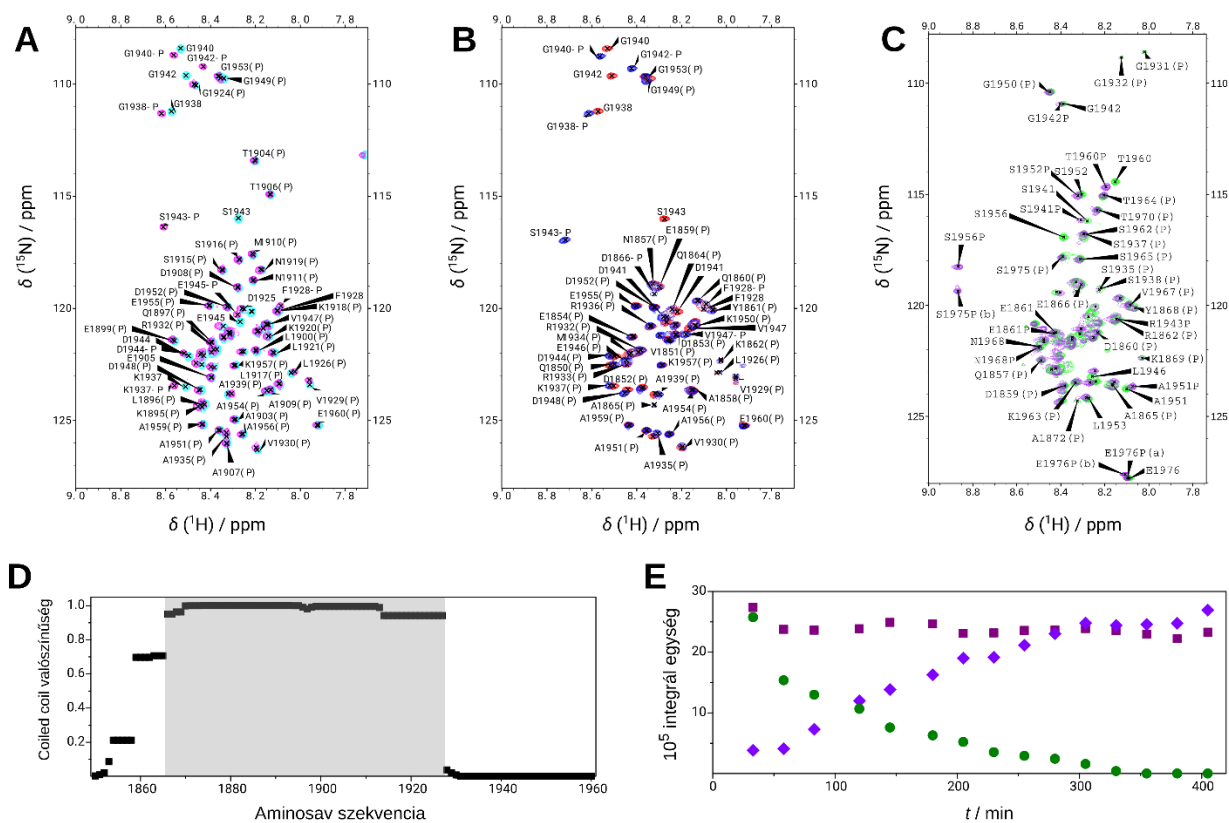
hőmérsékleten állapították meg (F Dudás 2019), ezért ezen a hőmérsékleten vettem össze a molekulatömeggel, hogy így az aggregáció mértékét megállapíthassam (5. táblázat). Az NMIIA fragmensei mellett az NMIIB fark régióját is tanulmányoztam ezen a hőmérsékleten a kiméra M121AB és M121AB-P segítségével. Az M67A és M111A fragmensek esetében pontos egyezést kaptam a rendezetlen fehérjékre megállapított összefüggés alapján (az M67A és a M67A-P monomerek, az M111A és M111A-P dimereket képez, azaz a coiled coil dimerek nem aggregálódnak), ezért a többi esetben is a rendezetlen fehérjékre számolt összefüggést használtam. Ezek alapján megállapítható, hogy az M111A-L hajlamos ezen a hőmérsékleten aggregálódni, amin a foszforiláció sem változtat sokat, ahogy látható a táblázatban. Az M121AB esetében viszont jelentős az eltérés a natív és a foszforilált forma aggregációs tulajdonságaiban: még dimereknél is kisebb a mért átlagos méret ebben az esetben, vagyis a foszforiláció hatására a coiled coil fellazul.

### 7.1.3. A fő foszforilációs helyek pontosítása NMR adatok alapján

Az M67A, M111A és M121AB, valamint ezek foszforilált változatainak  $^1\text{H}, ^{15}\text{N}$ -HSQC spektrumán a jelazonosítást sikeresen elvégeztem az általam mért TOCSY-HSQC és NOESY-HSQC spektrumok alapján (mivel ezekhez  $^{15}\text{N}$ -jelölt mintákat használtam) és az MPT

asszignációja, másrészt irodalmi adatok (Badyal 2011) segítségével (23A-C. ábra). Az M67A és az M67A-P 68 spinrendszeréből 62 azonosítása volt eredményes (csak az első két aminosav, az Y1893 és R1894, valamint az R1898 nem volt azonosítható, továbbá a P1927, P1931, P1958 prolinok nem detektálhatók). Az  $^1\text{H}$  dimenzióban kicsi a jeldiszperzió mindkét esetben, ami utal a fehérjék rendezetlen szerkezetére. Ez várható is volt, hiszen az M67A jelentős része az NMIIA C-terminális rendezetlen farokrégióját tartalmazza. Az M111A és M111A-P esetében a lehetséges 115 keresztcsúcson 48 volt detektálható a spektrumon, ezek az N- és C-terminális szakaszok jelei, a többi jel kiszélesedett (K1867–D1925 szakaszban) – ami a coiled coil szerkezet jelenlétére utal, ahogy ezt korábbi vizsgálatban is megállapították (Badyal 2011). Azt, hogy a középső kiszélesedő régió valóban coiled coil szerkezetet vesz fel, a szekvencia alapú predikció, a COILS/PCOILS szoftverrel elvégzett analízis is megerősíti: ez alapján legalább 0,94 feletti valószínűséggel coiled coil szerkezetű a K1862–R1923 szakasz (23D. ábra). Az M121AB és M121AB-P foszforilált változata esetében hasonló jelenség tapasztalható, itt is ugyanaz a coiled coil régió, mint az M111A esetében, amelynek jelei nem detektálhatók. Ebben az esetben a lehetséges 124 keresztcsúcson 50-et sikerült azonosítani. Ezen belül az M121AB C-terminális szakasza teljes egészében az NMIIB rendezetlen farok régióját tartalmazza, amely szakaszból az F1929, S1932, R1933, R1937, Q1938 és a három prolin, P1926, P1965 és P1966 kivételével az összes aminosavat sikerült azonosítani (46-ból 38-at). A detektálható jelek jeldiszperzitása az  $^1\text{H}$  dimenzióban kicsi mindegyik coiled coil tartalmazó fragmens esetében (0,6–0,7 ppm), ezért valószínűsíthetjük, hogy az NMR számára „látható” szakasz rendezetlen szerkezetű mind az N-, mind a C-terminális végeken.

A foszforiláció az M67A és M111A esetében az asszignáció alapján egyértelműen az S1943 aminosavat érinti – összhangban a tömegspektrometria eredményeivel. A foszforilált szerin keresztcsúcsának különösen az  $^1\text{H}$ -dimenziójában nő jelentősen a kémiai eltolódás értéke. A M121AB esetében viszont két foszforilált szerin keresztcsúcsát lehetett azonosítani (23C. ábra), ezek az S1956 és az S1975. A jelazonosítás eredményét megerősítette az egy éjszakán át NMR-csőben követett foszforilációs reakció kinetikája is, amelyet az M121AB esetén mértem. Az időben változó intenzitású jelek integráljainak értéke látható az idő függvényében ábrázolva az 23E. ábrán. Megállapíthatjuk, hogy az S1956 szinte azonnal foszforilálódik, viszont az S1975 ehhez képest sokkal lassabban. Ennek oka, hogy utóbbi aminosav közvetlenül a C-terminális vég előtt található, ugyanis a CK2 enzim katalitikus aktivitásában fontos szerepet játszanak a szerint követő aminosavak is, amelyek az enzim fehérje szubsztráthoz való kötődéséért felelnek. Mivel a C-terminális végen csak egyetlen ilyen aminosav található (az E1976), ezért feltételezhetően a CK2 enzim nem képes ezen a helyen olyan hatékonyan kötődni az M121AB-hoz, mint az S1956-hoz közel, ami miatt lassabb lesz a foszforiláció folyamata.



23. ábra: (A) Az M67A (világos kék) és M67A-P (magenta), (B) az M111A (piros) és M111A-P (kék), (C) az M121AB (zöld) és M121AB-P (lila)  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ -HSQC spektrumai páronként egymásra fektetve és az asszignáció feltüntetésével. Az M121AB esetében az egyszeresen ((a)-val jelölve) és kétszeres ((b)-vel jelölve) foszforilált változat egyaránt detektálható. A foszforilált változatok jelei –P jelzéssel szerepelnek a spektrumokon, míg azok a keresztcúcsok, amelyek mindkét formában ugyanolyan eltolódás értéket adnak (P) jelzéssel vannak jelölve. (D) A COILS/PCOIL szofverrel számolt predikció az M111A szekvenciája alapján az aminosavak mentén 14 aminosav ablakfüggvénnyel számolva, szürke háttérrel jelölve az a régió, amelyre a coiled coil képzés valószínűsége 0,94-nél nagyobb. (E) Az M121AB foszforilációjának követése NMR-csőben: az S1975 (zöld kör) és a foszforilált S1975-P (lila rombusz), valamint a gyorsan foszforilálódó S1956-P (bordó négyzet) keresztcúcsok integrál értékének változása az idő függvényében.

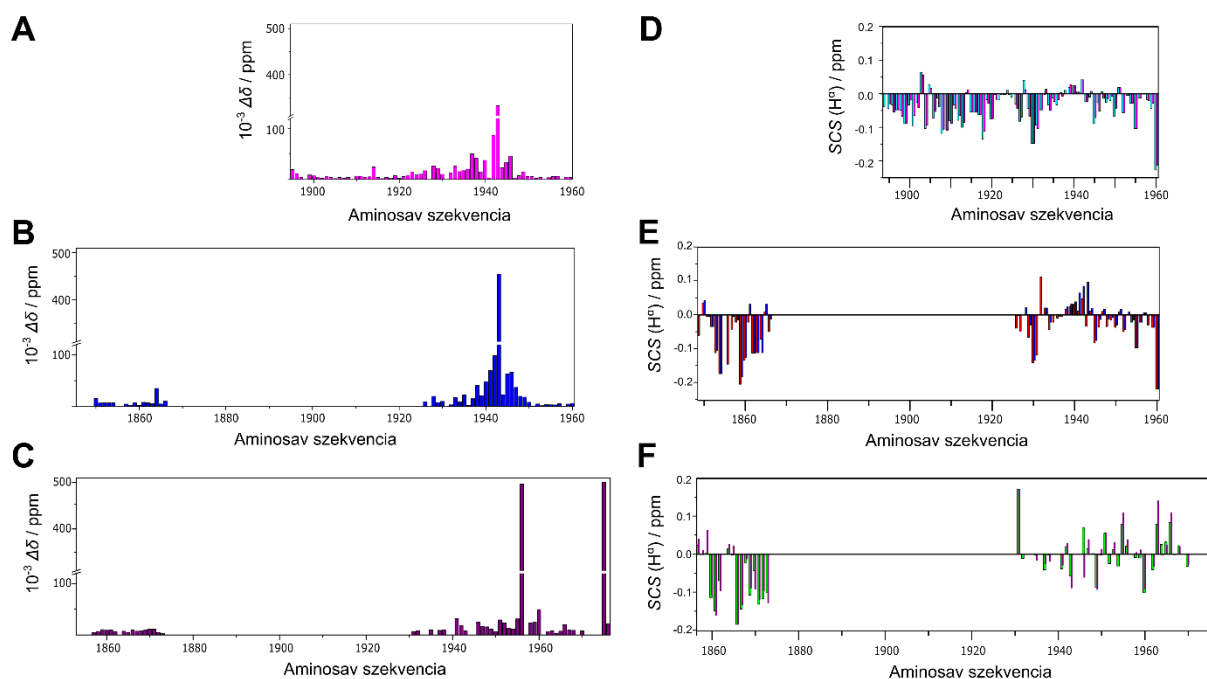
Az eredmények alapján tehát kijelenthetjük, hogy az NMII C-terminális farokrégiókon a CK2 fő foszforilációs helyei az S1943 az NMIIA és az S1956 és az S1975 aminosavak az NMIIB esetében.

#### 7.1.4. A foszforiláció hatása a szerkezetre és dinamikára

A natív és foszforilált forma közötti kombinált kémiai eltolódás-változások ( $\Delta\delta$  értékek) azt mutatják, hogy a foszforiláció mindhárom fragmens esetében csak lokális változást eredményez: csak a foszforilációs helyek közelében jelentkezik nagyobb változás a kémiai eltolódásokban, a távolabbi régiókban viszont elhanyagolható az eltérés (24A-C. ábra). Ez a rendezetlen M67A-ra ugyanúgy igaz, mint a coiled coil tartalmazó M111A-ra és M121AB-re. Az M67A esetében a

legkisebb, az M121AB esetében pedig a legnagyobb mértékű a foszforilált szerin kémiai eltolódásának megváltozása.

A szerkezet változásáról további információt kapunk a  $H^{\alpha}$  kémiai eltolódásokból számolt másodlagos kémiai eltolódás értékek (SCS) alapján (24D-F. ábra). Ezekből is látható, hogy az M67A és M67A-P rendezetlen szerkezetű, mivel az SCS 0-hoz közeli, kis értékeket vesz fel, és az MPT-hez hasonlóan inherens helicitással rendelkezik az N-terminális K1895–R1932 szakaszon (ebből alakulna ki a coiled coil, ha hosszabb lenne a fragmens N-terminális irányban). A másik négy fragmens esetében a coiled coilhoz közeli N-terminális vég az M67A-hoz képest jelentősebb  $\alpha$ -helikális hajlamot mutat (a teljes hosszúságú fehérjében ezek a szakaszok is coiled coilt képeznének), amire az SCS értékek negatív tendenciája utal. Az M121AB és M121AB-P C-terminális régiója teljesen rendezetlen (az SCS értékek nem mutatnak tendenciát), az M111A és M111A-P esetében viszont a coiled coilt követő szakaszon ismét  $\alpha$ -helikális hajlam mutatkozik, viszont emellett a foszforilálódó szerint is tartalmazó G1938–D1944 aminosavak

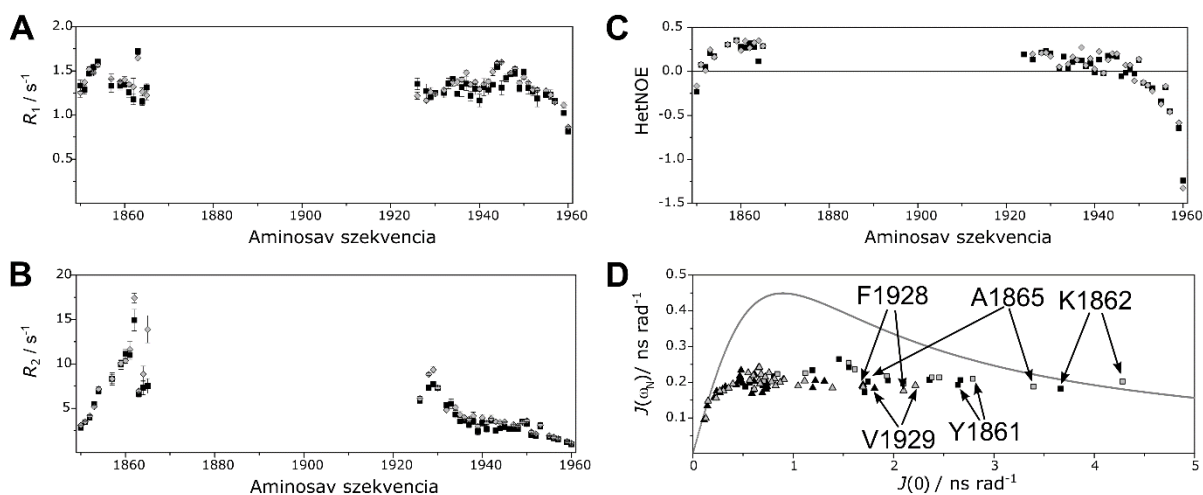


**24. ábra:** A bal oldali grafikonok a natív és foszforilált fragmensek közötti kombinált kémiai eltolódás-változást ( $\Delta\delta$ ) ábrázolják a (A) M67A, (B) M111A és (C) M121AB esetében az aminosav szekvencia mentén. A grafikonok függőleges tengelyén az átláthatóság érdekében 120 és 310 egységek között ki van hagyva az ábrázolás. Jobb oldalon a  $H^{\alpha}$  kémiai eltolódások alapján számolt másodlagos kémiai eltolódások (SCS értékek) láthatók az aminosav szekvencia mentén (D) az M67A (világos kék) és a M67A-P (magenta), (E) az M111A (piros) és M111A-P (kék), valamint (F) M121AB (zöld) és M121AB-P (lila) fragmensek esetében. A grafikonok függőlegesen úgy vannak elrendezve, hogy a szekvencia analógok éppen egymás alatt helyezkednek el.

enyhe  $\beta$ -redős hajlammal bírnak (az SCS értékek pozitív értékűek). Ez a hajlam megerősödik a foszforiláció hatására.

Megállapíthatjuk tehát, hogy a kisebb különbségek ellenére sem mutatható ki a vizsgált fragmensek esetében, hogy a foszforiláció jelentős szerkezeti változást okozna.

Ezért felvetődik a kérdés, hogy a foszforiláció a miozinfrafragmensek dinamikáját változtatja meg esetleg? Ezt a M111A és M111A-P esetében vizsgáltam a szokásos gyorsdinamikai mérésekkel. A 25A-C. ábrán és a 6. táblázatban összefoglalt eredmények azt mutatják, hogy a két fragmens között nincs szignifikáns eltérés a dinamikai viselkedés szempontjából. Érdekesség, hogy mindkét esetben a coiled coilhoz közeli aminosavak (főként az N1897–A1865 és L1926–R1933 szakaszon) transzverzális relaxációs állandója ( $R_2$ ) az átlaghoz képest megnövekedik, miközben a longitudinális relaxációs állandó ( $R_1$ ) csökken a nem detektálható coiled coilhoz közeli aminosavak esetében – erre a dinamikai jellemzőre a coiled coil szerkezeti elem vizsgálata során a következő fejezetben részletesebben is kitérünk. A HetNOE értékekben is jelentkezik a növekmény az említett régiókban, de 0,4-nél nem lesz nagyobb egyik esetben sem, ami azt mutatja, hogy nem válnak igazán merevvé ezek a szakaszok. Emiatt is hasznos a mért dinamikai értékeket együttesen értékelni, mégpedig a redukált spektrális sűrűség-analízis módszerével, minthogy ezek jól szerkezettel nem bíró, rendezetlen régiók. A 25D. ábrán bemutatott grafikon és a 6. táblázat adatai alapján látható, hogy a coiled coilhoz közeli



25. ábra: Az M111A és M111A-P dinamikai vizsgálata: (A)  $R_1$ , (B)  $R_2$  és (C) HetNOE értékek az aminosav szekvencia mentén (M111A: fekete négyzet, M111A-P: szürke rombusz). (D) Az adatok redukált spektrális sűrűség elemzése alapján készült térképezés grafikon ( $J(0)$ – $J(\omega_N)$ ) ábrázolása), ahol szürke vonal a „single motion” görbe, fekete az M111A és világos szürke az M111A-P értékei, a négyzetek az N-terminális, háromszögek a C-terminális aminosavak. A foszforiláció hatására a coiled coilal szomszédos régiókban növekszik a  $J(0)$  értéke, ezek közül példaként kiemelve látható a Y1861, A1865, K1862 az N-terminális felőli, és F1928, V1929 a C-terminális felőli szakaszból.

Mért és számolt paraméterek		M111A	M111A-P
$R_1 / s^{-1}$	átlag	1,31 <sup>(N1857-R1933)</sup> 1,31 <sup>(többi)</sup>	1,32 <sup>(N1857-R1933)</sup> 1,37 <sup>(többi)</sup>
	min. → max.	1,15→1,72 <sup>(N1857-R1933)</sup> 0,81→1,60 <sup>(többi)</sup>	1,16→1,65 <sup>(N1857-R1933)</sup> 0,86→1,60 <sup>(többi)</sup>
$R_2 / s^{-1}$	átlag	8,27 <sup>(N1857-R1933)</sup> 2,99 <sup>(többi)</sup>	9,53 <sup>(N1857-R1933)</sup> 3,35 <sup>(többi)</sup>
	min. → max.	5,36→14,9 <sup>(N1857-R1933)</sup> 0,96→6,95 <sup>(többi)</sup>	4,81→17,4 <sup>(N1857-R1933)</sup> 1,06→7,16 <sup>(többi)</sup>
HetNOE	átlag	0,23 <sup>(N1857-R1933)</sup> -0,06 <sup>(többi)</sup>	0,26 <sup>(N1857-R1933)</sup> -0,03 <sup>(többi)</sup>
	min. → max.	0,04→0,36 <sup>(N1857-R1933)</sup> -1,24→0,21 <sup>(többi)</sup>	-0,16→0,44 <sup>(N1857-R1933)</sup> -1,23→0,28 <sup>(többi)</sup>
$J(0) / ns\ rad^{-1}$	átlag	1,94 <sup>(N1857-R1933)</sup> 0,58 <sup>(többi)</sup>	2,26 <sup>(N1857-R1933)</sup> 0,66 <sup>(többi)</sup>
$J(\omega_N) / ns\ rad^{-1}$	átlag	0,20 <sup>(N1857-R1933)</sup> 0,19 <sup>(többi)</sup>	0,20 <sup>(N1857-R1933)</sup> 0,20 <sup>(többi)</sup>
$J(\omega_h) / ns\ rad^{-1}$	átlag	0,02 <sup>(N1857-R1933)</sup> 0,02 <sup>(többi)</sup>	0,02 <sup>(N1857-R1933)</sup> 0,02 <sup>(többi)</sup>

**6. táblázat:** Az M111A és M111A-P mért gerincdinamikai paraméterek és a redukált spektrális sűrűség-analízissel számolt adatok átlagértéke és szélsőértékei. Az eredmények két külön halmazban vannak feltüntetve, mert a molekula e középső régiója a coiled coil két oldalán (N1857-R1933 szakasz) és a rövid N-terminális, valamint a hosszú C-terminális régiója (Q1850-R1856 és M1934-E1960 együttesen) jelentősen különbözik egymástól.

aminosavak  $J(0)$  értéke nagyobb a natív és a foszforilált fragmensek esetében egyaránt. Az N-terminális szakaszon több a nagyobb  $J(0)$  értékkel jellemezhető mozgással bíró aminosav, míg a C-terminálison nagyobb az aminosavak flexibilitása – összhangban azzal a ténnyel, hogy a C-terminális farokrégió a teljes hosszúságú NMIIA fehérjében is rendezetlen szerkezetű. Végül megállapítható, hogy az M111A-P esetében enyhén növekszik a nevezett coiled coilhoz közeli régiók merevsége, ami a térképezés grafikonon is látható, hiszen az aminosavak nagyobb  $J(0)$  értéke miatt az M111A-P esetében nagyobb értékek felé tolódnak a pontok a vízszintes tengelyen. Ebből az is következik, hogy valószínűleg maga a detektálhatatlan coiled coil szakasz is merevebbé válik, hiszen ez történik a vele szomszédos régiókkal is. Ugyanakkor ez sem akkora változás, amely egy nagymértékű konformációváltozással, így a C-terminális régió visszahajlásával járna együtt.

Tehát végeredményben megállapíthatjuk az összes elvégzett vizsgálat, a hőstabilitás és

aggregációs tulajdonságok, valamint a szerkezeti és dinamikai elemzés alapján, hogy az M111A esetében nem történhet meg a C-terminális régió feltételezett visszahajlása, egy ilyen mértékű konformációváltáshoz nem elegendő a C-terminális vég egyetlen szerin aminosavjának foszforilációja. Ennél sokkal enyhébb effektust, inkább a coiled coil szakasz merevségének kismértékű növekedését okozza a CK2 által történő foszforiláció.

#### 7.1.5. Következtetések

A sokrétű vizsgálatokkal megállapítottuk, hogy a CK2 kináz *in vitro* az NMIIA C-terminális régióján csak a S1943 aminosavat foszforilálja, az NMIIB esetében elsődlegesen az S1956 és S1975 szerin aminosavakat. Ezt tömegspektrometria és NMR vizsgálatok együttes alkalmazásával határoztuk meg. Az NMIIA esetében ez a korábbi irodalmi adatokkal összhangban van, az NMIIB esetében viszont ennél több CK2 foszforilációs helyet mutattak ki (Vicente-Manzaneres 2009). Lehetséges, hogy sejtes környezetben vagy kisebb mértékben a többi aminosav is képes foszforilálódni, de a mi vizsgálatunk kimutatta az elsődleges foszforilációs helyeket, sőt azt is megállapítottuk a reakció időbeli követésével, hogy az S1956 sokkal gyorsabban foszforilálódik, mint az S1975.

A rendezetlen farokrégiót tartalmazó, inherens helicitással rendelkező M67A és ennek foszforilált változata, az M67A-P között semmilyen értékelhető különbséget nem találtunk sem a szerkezetben, sem aggregációs tulajdonságukban. Ez tehát azt jelenti, hogy a dimerizációt okozó coiled coil szakasszal együtt lehet a foszforiláció hatását megérteni.

Az NMIIB-t modellező kiméra fragmens, az M121AB esetében 287 K-en kimutattuk, hogy a foszforilált változat sokkal kevésbé képes az aggregációra, mint a natív forma. Ez több foszfát csoportot is tartalmaz, s így megnövekedik a negatív töltések száma, ami a natív formához képest növeli a molekulák közötti elektrosztatikus taszítást megakadályozva az aggregációt. A filamentumok összeállásának egyik kiinduló pontja az aggregáció, így érthető, hogy a foszforiláció milyen módon befolyásolja a filamentumok szétesését. Ez az effektus viszont az NMIIA fragmensek esetében nem volt kimutatható, nemcsak a vad típus, hanem a három A-L mutációt tartalmazó M111A-L esetében sem. Érdekesség viszont, hogy ez utóbbi hőstabilitása jelentősen megnőtt a mutáció hatására (+35 K a változás).

A részletes szerkezeti és dinamikai elemzés alapján megállapítottuk, hogy sem az M111A, sem az M121AB esetében nem tapasztalható szignifikáns szerkezeti változás a foszforiláció hatására, legfeljebb csak a továbbra is rendezetlen fehérjében egy lokális és enyhe  $\beta$ -redős hajlam megerősödése látszik az NMIIA foszforilált szerinjének környezetében (G1938–D1944 szakaszon). A dinamikai vizsgálatok pedig a coiled coil szakasz merevségének enyhe

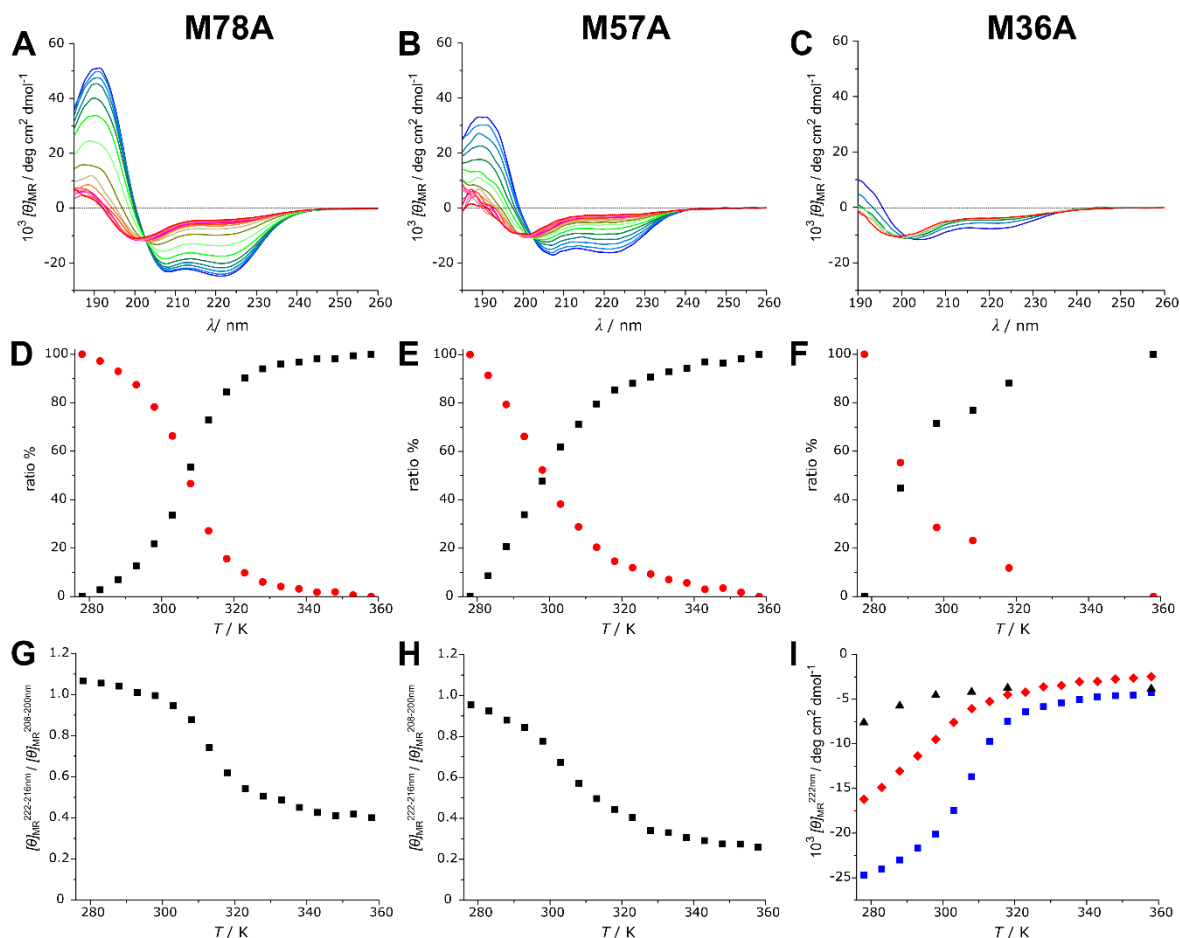
növekedését mutatták ki az NMIIA esetében. Mindezek a megfigyelések megkérdőjelezik annak a korábbi feltételezésnek a lehetőségét, hogy a rendezetlen C-terminális végen történő egyetlen foszforiláció egy jelentős konformációváltozást okozna, mégpedig a teljes C-terminális vég visszahajlását az ACD doménre így akadályozva meg a filamentumok összeállását és előidézve filamentumszétesést (Dulyaninova 2005, Dulyaninova 2013). Ehelyett a foszforiláció az NMIIA esetében csak intermolekuláris hatást okozhat, vagyis a molekulák kölcsönhatását befolyásolhatja – ezt azonban az általunk vizsgált fragmensekkel nem tudtuk kimutatni. A filamentum összeállást és szétesést ezeknél sokkal hosszabb fragmensekkel lehet csak vizsgálni, amelyek az NMR spektroszkópia számára már túl nagy méretűek. Ugyanakkor e projekt keretében biológus kooperációs partnereink vizsgálták a NMIIA és az NMIIB filamentumok tulajdonságait több fehérjekonstrukcióval és egyéb biokémiai és elektronmikroszkópos módszerre, és így sem láttak jelentős változásokat a foszforilált NMIIA esetében. Viszont az NMIIB filamentumok szétesését valóban elősegítette a foszforiláció. Ezek alapján végül megállapítottuk, hogy a filamentumok szétesésének és összeállásának regulációja az NMIIB izoforma esetében tehát elsősorban a foszforiláció, míg az NMIIA izoforma esetében S100 fehérjékkel (ezen belül is az egyik kitüntetett szereplővel, az S100A4-gyel) való kölcsönhatás. Ezzel megerősítettük az irodalomban korábban már létező feltételezést a filamentumszétesés izoforma specifikus regulációjára (Murakami 2000) és megcáfoltuk az újabb eredmények fényében született elméleteket (Dulyaninova 2013).

Mivel a foszforiláció a fehérjék egyik leggyakoribb poszttranszlációs módosítása, amely nagyon sok biokémiai folyamatban játszik fontos szerepet, így sok tanulmány született a foszforiláció hatására bekövetkező különféle szerkezeti-dinamikai hatások vizsgálatából (Nishi 2014). Ezek közül is figyelemre méltó az IDP fehérjék esetében tapasztalt változások, hiszen az általam vizsgált miozinfrafragmensek is rendezetlen szerkezetűek – legalábbis az NMR által detektált régióikban. Többek között NMR vizsgálatok révén megállapították, hogy az ilyen IDP fehérjék foszforilációja általában nagyon kevés szerkezeti változást okoz – akkor is, ha több foszforilációs hely található a fehérjén. Az SSP értékek vagy a  $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC spektrum keresztcsúcsainak kis változását figyelték meg például a HPV-16 E7 fehérje N-terminális régióján található két szomszédos szerinjének (Nogueira 2017) vagy a szintén rendezetlen *Drosophila* kromatin transzkripció faktor segítő fehérje kilenc szerinjének (Hashimoto 2013) CK2 által történő foszforilációja hatására. Főként inkább a konformációs sokaság eloszlását változtatja meg, így áttételesen a dinamikára van nagyobb hatással a foszforiláció IDP fehérjék esetében. Ezt tapasztalták például a rendezetlen szerkezetű PAGE-4 fehérje HIPK1 kináz által történő foszforilációja esetében: a módosítás megváltoztatta a konformációs preferenciákat,



és növelte a  $\beta$ -kanyar jellegű szerkezetek populációját a molekula sokaságon belül, és így megnövelte a központi régió merevségét is (He 2015). Az NMIIA fragmensének, az M111A-nak részletes vizsgálata során hasonló effektusokat figyeltünk meg mi is: a  $\beta$ -jellegű hajlam és a coiled coil szakasz merevségének növekedését tapasztaltunk, miközben a globális szerkezet és dinamika nem változott számottevően a foszforiláció következtében.





27. ábra: A három fragmens ECD spektroszkópiai elemzése: a távoli UV-tartományban (185–260 nm) ECD spektrumok hőmérsékletfüggése (A) M78A, (B) M57A és (C) M36A esetében (a spektrumok intenzitása moláris ellipticitás értékekben vannak megadva, ezért az intenzitások egymással is összevethetők). Mindhárom 278–358 K tartományban M78A és M57A esetében 5 K egységenként, míg az M36A esetében csak 278, 288, 298, 308, 318 358 K hőmérsékleten mért spektrumok egy grafikonon ábrázolva (a hőmérséklet emelésével párhuzamosan kéktől piros szín felé fokozatos átmenettel ábrázolva). A görbék CCA+ szoftverrel történő felbontása 2 bázisspektrum, az első (piros) és utolsó (fekete) alapján az (D) M78A, (E) M57A és (F) M36A esetében. Az  $\alpha$ -hélix két jellegzetes (208 nm és 222 nm körüli) minimuma arányának változása a hőmérséklettől függően (G) M78A és (H) M57A esetében. (I) A 222 nm-en mért moláris ellipticitás értékek hőmérsékletfüggése a három fragmensre ahol az M78A kék, M57A piros és az M36A fekete színnel szerepel. a desztillált vizes oldatok eredményét használtam fel, mert az oldatok nagyobb ionerőssége csökkenti az ECD mérések pontosságát.

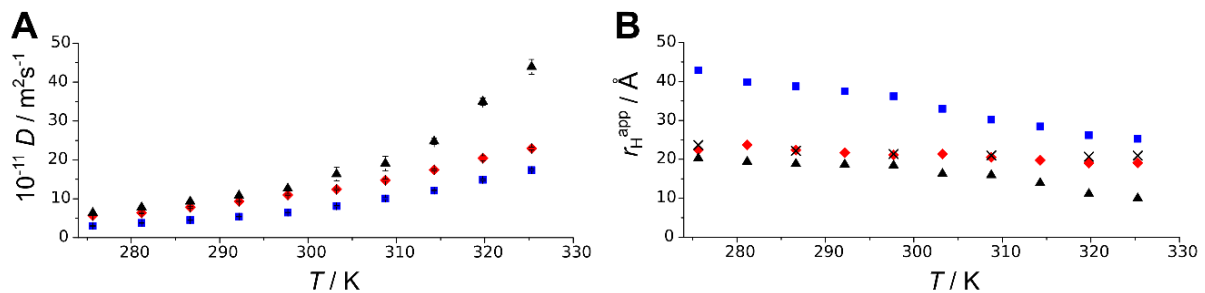
Megállapítható, hogy alacsony hőmérsékleten az M78A és M57A helikális szerkezetű (C típusú a spektrumuk), míg az M36A már ezen a hőmérsékleten is rendezetlen, de enyhe helikális jelleggel rendelkezik. Magas hőmérsékleten mindhárom rendezetlen szerkezetűvé válik (az M36A is veszít a naszcens helikális hajlamából). Visszahűtve a kiindulási 278 K hőmérsékletre az első mérésnek megfelelő spektrumot lehetett mérni, ami azt jelenti, hogy a hőmérsékletfüggő

átalakulás reverzibilis mindhárom esetben. A 278 K-en mért spektrumokon a 222 és 208 nm hullámhossznál jelentkező két minimum aránya az M78A esetében 1,1 és az M57A esetében 1,0. Ez azt jelenti, hogy mindkettő coiled coil szerkezetű (Cooper 1990, Zhou 1992), viszont ez a jelleg nem erőteljes egyik esetben sem, sőt az M57A már határesetnek tekinthető. A CCA+ szoftverrel elvégzett spektrumfelbontás alapján az átmenetről részletesebb képet kapunk. A felbontást 2, 3, 4 és 5 bázisspektrum alapján is elvégeztem külön-külön mind a három fragmens mérési sorozatára, de csak a kettő bázisspektrum használata volt értelmezhető: ebben az esetben az egyik alapspektrum a 278 K-en mért rendezett  $\alpha$ -helikális szerkezet, a másik pedig a 358 K-en mért rendezetlen szerkezet spektruma. Így e két spektrum lineáris kombinációjára bontotta fel a szoftver egy adott mérési sorozat összes spektrumát.

A két bázisspektrum koefficienséből számolt arány hőmérsékletfüggése szigmoid alakú az M78A esetében, ami a tisztán kétállapotú átalakulást mutatja (27D. ábra). Ezzel szemben az M57A-ra számolt eredmények esetében nem kapunk teljes szigmoid görbét (27E. ábra), annak első szakasza „hiányzik”, ami azt jelenti, hogy már 278 K hőmérséklet is az olvadási görbe egy közbenső pontjának tekinthető, vagyis alacsony hőmérsékleten is csak részlegesen tekinthető coiled coil szerkezetűnek. Az M36A-ra is elvégeztem a felbontást (27F. ábra), itt még erőteljesebben mutatkozik az M57A-nál tapasztalt tendencia. A coiled coil szerkezet letekeredését a helikális szerkezet két minimuma arányának hőmérsékletfüggése is jól mutatja az M78A és M57A esetében (27G-H. ábra), ami szintén szigmoid alakú kétállapotú rendszerre jellemző görbe. Ezek mellett a helikális szerkezetet jellemző szokásos olvadási görbe, a 222 nm-en mért moláris ellipticitások hőmérsékletfüggése is mutatja ugyanezeket a tendenciákat (27I. ábra). Ezen követhető az M36A inherens helicitásának elvesztése is. Az olvadási hőmérsékletek a CCA+ felbontásból meghatározott arányok hőmérsékletfüggésének inflexió pontja alapján az M78A-ra 308 K és az M57A-ra 295 K (az M36A esetében nem értelmezhető olvadási hőmérséklet fogalma, hiszen itt nem két elkülönült állapot közötti átmenet történik).

Ezekből az eredményekből látható, hogy a leghosszabb fragmens, az M78A stabil coiled coil képez, míg az M57A rövidebb és csak részben képződik belőle coiled coil alacsony hőmérsékleten, míg a legrövidebb fragmens, az M36A egyáltalán nem képes coiled coil képezni, hanem rendezetlen szerkezetű, de alacsony hőmérsékleten inherens helicitással rendelkezik. Magasabb hőmérsékleten mindhárom letekeredik és elveszíti coiled coil vagy kevés helikális jellegét is, mivel rendezetlen szerkezetűvé alakulnak át.

Hasonló módon az előzőekben tárgyalt foszforilált fragmensek tanulmányozásához, ezután translzációs diffúziós NMR mérések alapján vizsgáltam mindhárom fehérje aggregációs készségének és látszólagos hidrodinamikai sugarának alakulását a hőmérséklet függvényében



28. ábra: (A) Az M78A (kék négyzet), az M57A (piros rombusz) és az M36A (fekete háromszög) translációs diffúziós együtthatójának hőmérsékletfüggése 278–323 K tartományban, és (B) a Stokes-Einsten egyenlet alapján ebből kiszámolt látszólagos hidrodinamikai sugarak a hőmérséklet függvényében. Ez utóbbi görbén kereszttel az M67A korábban mért rendezetlen fragmens értékei is fel vannak tüntetve (fekete kereszt) az összehasonlítás céljából.

278–323 K tartományban (28. ábra). Az M78A látszólagos hidrodinamikai sugara fokozatosan csökken a hőmérséklet emelésével, ami a coiled coil letekeredésével értelmezhető. Az M57A látszólagos mérete szinte végig állandó marad, csak enyhén csökken, ez esetben ugyanis már alacsony hőmérsékleten is a kevésbé stabil coiled coil és a rendezetlen szerkezet keverékét mérjük, amelyek aránya ugyan folyamatosan változik a hőmérséklet növelésével, viszont ez nem mutatkozik meg az átlagos méret változásában. Érdekesség, hogy a rendezetlennek tekinthető M67A-val szinte teljesen megegyező méretű az M57A annak ellenére, hogy tíz aminosavval rövidebb (28B. ábra), ami csak az M57A részlegesen aggregációjával magyarázható. Az M36A viselkedése viszont váratlan, mivel hidrodinamikai sugara 300 K alatt állandó, majd afelett jelentősen csökkenő tendenciát mutat. Egy teljesen rendezetlen fehérje esetében azt várnánk, hogy a hőmérséklet növelésével nem változik a méret jelentősen – ahogy az M67A esetében is tapasztaltuk. Ez tehát arra utal, hogy az M36A – annak ellenére, hogy nem képez coiled coil szerkezetet – feltételezhetően mégis gyenge aggregációs készséget mutat alacsonyabb hőmérsékleten, ami megszűnik a hőmérséklet emelésével.

A hidrodinamikai sugár és az ECD spektrumok hőmérsékletfüggése, valamint a CCA+ szoftverrel elvégzett spektrumfelbontások megállapításaiból tehát az következik, hogy az M78A és M57A kétállapotú rendszerként jól modellezhető: a coiled coil és rendezetlen szerkezeti elemekből épülnek fel, amelyek aránya a hőmérséklet növelésével változik, ahogyan a coiled coil szerkezeti elem aránya csökken és a rendezetlen szerkezeti elemek aránya nő. Magas hőmérsékleten rendezetlenné válik szinte a teljes rendszer. Az M36A ezzel szemben nem képez coiled coil dimert alacsony hőmérsékleten sem, hanem inherens helicitással bíró rendezetlen szerkezetű, és magas hőmérsékleten ezt a gyenge helicitási hajlamát is elveszíti, miközben

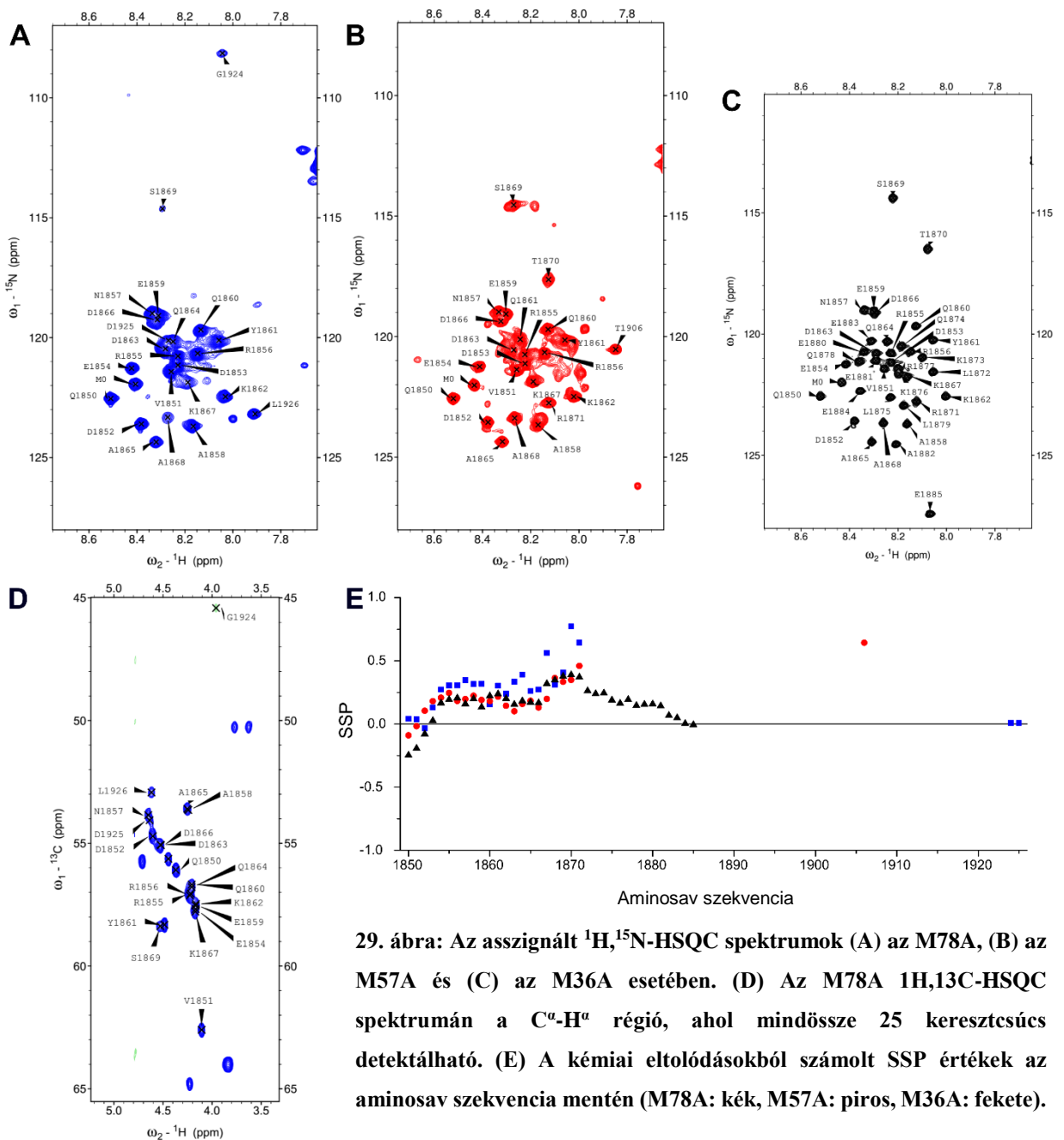
fokozatosan teljesen rendezetlen formává alakul. Az átalakulás reverezibilis mindhárom esetben.

### 7.2.2. Jelkiszélesedés a coiled coil fragmensek NMR spektrumain

A három fragmens gerinc és oldallánc kémiai eltolódásainak azonosítását elvégeztem az M78A 3D BEST-spektrumai alapján, felhasználva a korábbi eredményeket is (az M111A asszignációját). Ebben az esetben a  $^{13}\text{C}$ -eltolódásokat is meg tudtam határozni. Az M57A és M36A esetében a  $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC spektrum keresztcsúcsainak azonosítása mellett a gerinc  $\text{H}^\alpha$ -eltolódásokat határoztam meg (mivel ezekből  $^{15}\text{N}$ -jelölt minták álltak rendelkezésre).

Az M78A  $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC spektrumán mindössze 24 keresztcsúcsot lehetett azonosítani az elméletileg lehetséges 77 jelből (egy prolint tartalmaz), az M57A esetében pedig 26 keresztcsúcsot a várható 57 jelből, a többi keresztcsúcs ugyanis kiszélesedett, ezért egy részük nem is detektálható, más részük nagyon kis intenzitású, s ez nem teszi lehetővé az asszignációt. Ráadásul a  $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC spektrumok 278–323 K tartományban 5 K lépésenként mért hőmérsékletfüggésének vizsgálatából kiderült, hogy más hőmérsékleten sem jelenik meg sokkal több jel a 298 K-en mért spektrumokhoz képest. Az M36A esetében viszont mind a 36 jel azonosítható volt (29. ábra). Az  $^1\text{H}$  dimenzióban mért jeldiszperzitás mindhárom fragmensnél kis értékű (0,5–0,7 ppm), ami arra utal, hogy a detektálható aminosavak rendezetlen szerkezeti elemekben találhatók.

Az M36A nem képez coiled coil-t, ahogy az ECD eredmények alapján láttuk, hanem teljes mértékben rendezetlen szerkezetű, ezért lehet azonosítani mind a 36 jelet a  $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC spektrumon. A másik két fragmens esetében viszont a coiled coil szerkezetekre jellemző jelkiszélesedést tapasztaltuk, ahogy a hosszabb foszforiláló fragmensek esetében is láthattuk korábban. 298 K-en, a mérés hőmérsékletén a CCA+ felbontás alapján az M78A esetében 80%, míg az M57A esetében 50% a coiled coil szerkezet aránya, így várható is volt ez a jelenség. Az N-terminális régió aminosavai közül jóval több detektálható mindkét esetben (a teljes Q1850-R1871 szakasz), mint a C-terminális régióból (M78A: mindössze három, a G1924-L1926, M57A esetében pedig csak egy, a T1906), és a coiled coil szakasz felé haladva egyre csökken a detektált jelek intenzitása és növekszik félértékszélessége. Ez mutatja, hogy ezen coiled coil szerkezetek N-terminális vége fellazult, szemben a C-terminális végükkel, így a letekeredésük feltehetőleg az N-terminális irányából indul el. Ez a coiled coil predikció alapján is várható volt, hiszen az N-terminális aminosavak coiled coil-t képző valószínűsége kisebb a C-terminális régióhoz képest. Ugyanezt támasztja alá az a tény, hogy az M36A önmagában nem képes coiled coil dimer képzésére – és ez csak az említett N-terminális szakaszt tartalmazza. E megfigyelés fényében úgy értelmezhetjük a coiled coil és rendezetlen szerkezetek arányának változását



**29. ábra:** Az asszignált  ${}^1\text{H}$ ,  ${}^{15}\text{N}$ -HSQC spektrumok (A) az M78A, (B) az M57A és (C) az M36A esetében. (D) Az M78A  ${}^1\text{H}$ ,  ${}^{13}\text{C}$ -HSQC spektrumán a  $\text{C}^\alpha\text{-H}^\alpha$  régió, ahol mindössze 25 keresztcsúcs detektálható. (E) A kémiai eltolódásokból számolt SSP értékek az aminosav szekvencia mentén (M78A: kék, M57A: piros, M36A: fekete).

a hőmérséklettől függően, hogy a coiled coil szerkezet az N-terminális irányából fokozatosan letekeredik, mondhatni „rojtózódik”, ezért növekedik a rendezetlen és csökken a coiled coil szerkezet aránya a hőmérséklet növelével. Így kell tehát értelmezni a kétállapotú átalakulást, és nem úgy, hogy két forma, a teljesen rendezetlen és a teljesen coiled coil szerkezetben lévő forma egyensúlya van jelen az oldatban, amelyek populációinak aránya változik a hőmérséklet növelésével. Ugyanis ebben az esetben látnunk kellene a teljesen rendezetlen forma keresztcsúcsait is az NMR spektrumokon (különösen az M57A esetében, ahol közel 50% lenne ennek aránya a CCA+ felbontás alapján).

A kémiai eltolódásokból számolt SSP értékek alapján a három fragmens további szerkezeti jellemzőit is megvizsgálhatjuk (az M78A esetében a  $\text{C}^\alpha$ ,  $\text{C}^\beta$  és  $\text{H}^\alpha$ , a másik két fragmens esetében

csak a  $H^\alpha$  eltolódások alapján számoltam) (29E. ábra). Ezekből látható, hogy az N-terminális régió mindhárom esetben inherens helicitással rendelkező rendezetlen szakasz, de az M78A helikális jellege erőteljesebb a másik kettőnél. A coiled coil közelében várható módon az M78A és M57A egyaránt az átlagosnál nagyobb helicitási hajlammal bír. Az M36A végig rendezetlen, az SSP értékei közel azonosak az M57A értékeivel, és a középső régiójának (K1867–Q1874) megnövekszik a helicitási hajlama. Ez nem is meglepő, hiszen ez a régió a coiled coil N-terminális vége a másik két fragmensben.

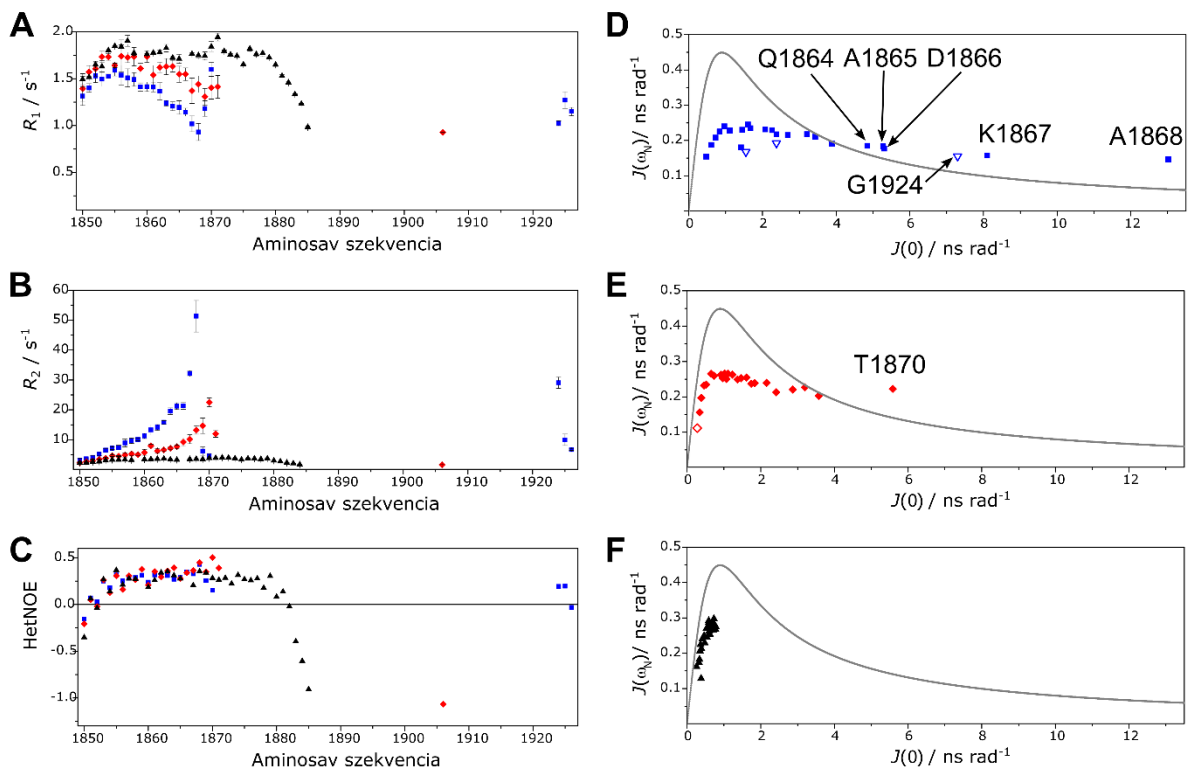
A jelek félérték szélessége több okból is megnövekedhet, amelyek közül az egyik lehetőség az, hogy az N-H atomok közepes sebességű kémiai cserefolyamatban vesznek részt. Ezt a magyarázatot kizárja az a tény, hogy az M78A  $^1H, ^{13}C$ -HSQC spektrumán a  $C^\alpha$ - $H^\alpha$  régióban mindössze 25 keresztcsúcs található a lehetséges 78 jelből (hiszen minden aminosavhoz egy  $C^\alpha$ - $H^\alpha$  keresztcsúcs tartozna) (29D. ábra). Fontos megjegyezni, hogy ezen a spektrumon sem jelenik meg sokkal több jel más hőmérsékleteken. Ez tehát azt jelenti, hogy a gerinc  $C^\alpha$ - $H^\alpha$  keretcsúcsok ugyanazt az effektust mutatják, mint az N-H keretcsúcsok. Így mindenképpen valamilyen egész molekulát érintő tulajdonság és nem csak egy lokális módon az N-H környezetekre jellemző jelenség magyarázhatja a jelek kiszélesedését.

### 7.2.3. Dinamikai vizsgálatok

A három fragmens gyorsdinamikai vizsgálatát is elvégeztem, hiszen az NMR jelek kiszélesedése gyakran dinamikai jelenségekre vezethető vissza, ugyanis a jelek félérték szélességére a transzverzális relaxációs paraméter ( $R_2$ ) különösen nagy hatással van. Ráadásul az M111A és M111A-P dinamikai vizsgálata során láthattuk, hogy a coiled coil szakasz szomszédos régióira a fehérje méretéhez képest szokatlanul nagy  $R_2$  értékek jellemzőek. A mérések eredményét ebben az esetben is a redukált spektrális sűrűség-analízis módszerével elemeztem (a 7. táblázatban és a 30. ábrán láthatók).

A dinamikai elemzés alapján is egyértelműen kiderül, hogy az M36A teljes egészében rendezetlen szerkezetű fragmens: ahogy látható a redukált spektrális sűrűség-térképezés grafikonján is, az összes aminosav esetében kis értékű a  $J(0)$ , tehát kevés a lassú mozgás aránya. Az M78A és M57A detektált aminosavai esetében az  $R_2$  értékek nagyon jelentős növekedést mutatnak, miközben az  $R_1$  értékek csökkennek a coiled coil közelében, s mindkét effektus az M78A esetében erőteljesebben mutatkozik, mint az M57A esetében. Ugyanezt tapasztaltuk az M111A és M111A-P elemzése során. (Megjegyzendő, hogy a coiled coil közvetlen szomszédságában található aminosavakra nem igaz ez a tendencia. Ennek valószínűleg a kis intenzitásukból fakadó kisebb mérési pontosság az oka, hiszen az  $R_1$  és  $R_2$  értékek kiszámítása





30. ábra: Az M78A (kék), M57A (piros) és M36A (fekete) fragmensek (A)  $R_1$ , (B)  $R_2$  és (C) HetNOE értékei az aminosav szekvencia mentén. A redukált spektrális sűrűség-elemzésből kapott  $J(0)-J(\omega_N)$  térképezés grafikonok (D) az M78A, (E) a M57A és (F) az M36A esetében. A telt jelek az N-terminális, az üres jelek pedig a C-terminális aminosavakat jelölik a (D) és (E) grafikonokon. Ugyanezekben a nagy értékű  $J(0)$ -val jellemezhető aminosavak vannak jelölve, amelyek a coiled coil szomszédságában helyezkednek el.

során egy csökkenő intenzitású exponenciális görbét kell illeszteni, és így az elve kis intenzitással rendelkező, sőt onnan tovább csökkenő görbék illesztéséből nehéz pontos és megbízható adatokat kapni.) A redukált spektrális sűrűség térképezés grafikonokon látható, hogy a coiled coilhoz közeli aminosavak jóval nagyobb  $J(0)$  értékkel rendelkeznek (30D-E. ábra), ami arra utalhatna, hogy merev régiókban találhatók. Sőt egyes aminosavakat reprezentáló pontok a szokatlanul nagy  $J(0)$  érték miatt nagyon távol esnek az „egymozgás” görbétől, s ez olyan mértékű cserejelenségre utalna, ami nem tekinthető reális feltételezésnek. Emellett, ha konformációs vagy kémiai cserejelenségek állnának a háttérben, az  $R_1$  paraméterek az átlagos értéket vennék fel, de nem ez a tapasztalat: ezeken a szakaszokon jelentős csökkenő tendenciát mutatnak. További ellentmondás, hogy a HetNOE értékek sem nagyobbak 0,50-nél ezekben a régiókban (7. táblázat), ami miatt nem tekinthetők nagyon merevnek ezek a szakaszok, hiába nagyok a  $J(0)$  értékek.

A jelenségek magyarázata inkább az  $R_2/R_1$  értékek együttes változása alapján érthető meg. E két paraméter ugyanis együtt határozza meg a globális rotációs korrelációs időt (Cavanagh 2007). Az eredmények azt mutatják, hogy a coiled coil felé közeledve egyre nagyobb az amino-

Mért és számolt paraméterek		M78A	M57A	M36A
$R_1 / s^{-1}$	átlag	1,34	1,53	1,66
	min. → max.	0,88→1,75	0,93→1,74	0,98→1,94
$R_2 / s^{-1}$	átlag	13,0	6,93	3,16
	min. → max.	2,51→51,3	1,64→22,5	1,72→4,01
HetNOE	átlag	0,20	0,18	0,09
	min. → max.	-0,50→0,43	-1,07→0,50	-1,00→0,37
$J(0) / ns \text{ rad}^{-1}$	átlag	3,14	1,56	0,54
$J(\omega_N) / ns \text{ rad}^{-1}$	átlag	0,20	0,23	0,24
$J(\omega_h) / ns \text{ rad}^{-1}$	átlag	0,02	0,02	0,02

7. táblázat: Az M78A, M57A és M36A mért gerincdinamikai paraméterei és a redukált spektrális sűrűség-analízissel számolt adatok átlagértéke és szélsőértékei.

savegységenként kiszámolható becsült  $\tau_c$  érték. Ennek a maximuma 20,8 ns az M78A és 10,6 ns az M57A esetében, amelyek egy hasonló aminosav tagszámú globuláris, gömb alakú molekulához képest jóval nagyobb értékek (gondoljunk csak például a merev szerkezetű, összesen közel 180 aminosavat tartalmazó S100A4Δ13 dimerre, amelynek ugyanezen a hőmérsékleten 11,3 ns a  $\tau_c$  értéke). A coiled coilban elhelyezkedő aminosavakra feltehetőleg még nagyobb  $R_2$  és még kisebb  $R_1$  értékeket kapnánk, ha a szomszédos, még detektálható aminosavak paramétereinek tendenciája alapján extrapoláljuk a várható értékeket.

Ebből az következik, hogy a merev coiled coil rúd egy hasonló számú aminosavból felépülő globuláris fehérjénél sokkal lassabb bukdácsoló mozgást végez az oldatban, s ezért a mozgása szempontjából lényegében úgy viselkedik, mint egy nála sokkal nagyobb méretű gömbszerű fehérje: nagy globális rotációs korrelációs idővel jellemezhető. Emiatt a transzverzális relaxáció gyors lesz (azaz  $R_2$  nagy értékű), ami viszont az NMR mérésből kapható jelek félértékszélességének jelentős növekedését eredményezi, és ezért nem detektálhatók a coiled coil szakasz aminosavai. Ezt támasztja alá az is, hogy az M78A-nál rövidebb coiled coil képező M57A esetében sokkal kisebb mértékű az  $R_1$  paraméterek csökkenésének és az  $R_2$  növekedésének tendenciája a coiled coil közelében, vagyis a kisebb és kevésbé stabil coiled coil gyorsabb bukdácsoló mozgást végez a nagyobb méretű és stabilabb, így merevebb coiled coil képező M78A-nál. Továbbá a globális mozgások magyarázhatják azt az ellentmondást is, hogy a coiled coil szerkezet két detektálható vége az  $^1\text{H}$  dimenzióban mért kis jeldiszperzitás és a relatíve kis HetNOE értékek alapján rendezetlen szerkezetűnek tekinthető, és mégsem az átlagosnál nagyobb  $R_1$  és kisebb  $R_2$  értékkel rendelkeznek, hanem éppen fordítva. A szerkezet szempontjából valóban rendezetlenek ugyanis, csak egy lassú globális mozgást végző szakaszban találhatók.

#### 7.2.4. Következtetések

Az NMIIA coiled coil régiójából készített három fragmens ECD és különféle NMR spektroszkópai módszerekkel elvégzett részletes szerkezeti, dinamikai és diffúziós vizsgálata során megállapítottuk, hogy az NMIIA Q1850-P1927 szakaszának N-terminális régiója (Q1850–R1871) lazább szerkezetű a C-terminális szakaszhoz képest. Ezt támasztja alá, hogy a legrövidebb, az N-terminális régióból mindössze öt heptádot tartalmazó M36A rendezetlen szerkezetű fehérje, amely ugyan inherens helicitással rendelkezik, de nem képes coiled coil képzésére. Továbbá az M57A is kevésbé stabil coiled coilt képez, mint a teljes szakaszt tartalmazó M78A. A hőstabilitási vizsgálatok és az NMR spektrumok alapján megállapítottuk, hogy a coiled coil fragmensek letekeredése egy N-terminális felől induló „rojtózódás” folyamatának tekinthető, és nem a teljesen rendezetlen és teljesen coiled coil szerkezetű formák populáció arányának fokozatos eltolódása történik. Sok esetben ugyanis így szokták értelmezni a kétállapotú rendszer olvadási görbéjét, ehelyett a rendezetlen és coiled coil szerkezet aránya minden egyes molekulán belül változik fokozatosan, s ez a változás tükröződik a hőmérsékletfüggő ECD spektrumokban.

Ennek a jelenségnek az a szerkezeti magyarázata, hogy a vizsgált szakasz N-terminális régiójának *a* és *d* pozícióiban kisebb méretű hidrofób aminosavak találhatók (főként alanin, sőt egy helyen hidrofil aminosav van a *d* pozícióban, az E1854 esetében), míg a C-terminális végen nagyobb arányú a nagyméretű hidrofób aminosavak (leucin, metionin és valin) előfordulása, amelyek között erősebb diszperziós kötések önnel létre, így ezek erősebb hidrofób varrat létrehozását teszik lehetővé. E pozícióbeli hidrofób aminosavak méretének jelentőségére legszemléletesebb példa a foszforilációs projektben vizsgált M111A-L mutáns esete, amelyben mindössze három alanint cseréltünk leucinra, és ennek hatására 35 K-nel nőtt az olvadási hőmérséklete. Megjegyzendő, hogy a teljes NMIIA fehérje esetében a vizsgált fragmensek N-terminális régiója egy hosszú coiled coil rúd része, így nyilvánvalóan nem indulhat el a Q1850–R1871 felől a coiled coil letekeredése, viszont ez a szakasz nyilvánvalóan lazább szerkezetű a hozzá képest C-terminális irányban elhelyezkedő régióval.

Mindezeken túl a vizsgálatunk fontos megállapítása, hogy a coiled coil szakasz azért detektálható nehezen oldatfázisú NMR spektroszkópai módszerekkel, mert a hosszú, merev coiled coil rúd bukdácsoló mozgása lassú az oldatban, azaz nagy a globális rotációs korrelációs ideje más, hasonló méretű globuláris fehérjékkel összevetve, ahogy ezt már korábban is felvetették hipotézis szintjén (Badyal 2011). Egyszerű, kvalitatív képpel élve több magyarázata lehet ennek:

- (a) A hőmérséklet a molekulák átlagos hőmozgásának energiájának eloszlását határozza meg, így egy gömbszerű és egy rúd alakú molekula azonos hőmérsékleten azonos átlagos mozgási energiával rendelkezik. Ennek a mozgási energiának egy fontos összetevője a translációs mozgás mellett a rotációs vagy forgási energia. Azonos forgási energiájú részecskék esetében a merev rúdszerű, nyújtott szerkezetű molekulának jóval nagyobb a tehetetlenségi nyomatéka ( $\theta$ ), mint egy gömb alakú molekulának, így (a hossz tengelyére merőleges irányú) forgásának szögsebessége ( $\omega$ ) szükségszerűen kisebb lesz. A forgási energiát ugyanis  $\frac{1}{2}\theta\omega^2$  képlettel lehet jellemezni, így a nagyobb tehetetlenségi nyomaték kisebb szögsebességet eredményez, ennek pedig lassabb mozgás, tehát nagyobb  $\tau_c$  korrelációs idő a következménye.
- (b) Azonos molekulatömegű fehérjék esetében a gömbszerű elrendezésben sokkal kisebb a relatív felület, mint a nyújtott, rúdszerű molekulák esetében. Ez azt eredményezi, hogy több oldószermolekulával érintkezik a rúd alakú molekula felületén, ami nagyobb közegellenállást eredményez a globális mozgásával szemben, mint a gömbalakú molekula esetében. Ez tehát lelassítja a véletlenszerű forgó mozgását is, ami szintén nagyobb  $\tau_c$  korrelációs időt eredményez.

Természetesen ezeknél sokkal összetettebb fizikai kölcsönhatások és egyéb okok is befolyásolják a molekulák bukdácsoló globális mozgását, ezt részletes vizsgálatok és számítások deríthetnek fel. Az említett effektusok ugyanakkor szerepet játszanak ebben, akár együttesen is. Mindenesetre a lassabb bukdácsoló mozgás az  $R_2$  transzverzális relaxációs állandó megnövekedését eredményezi, ami jelkiszéledést okoz az NMR spektrumban.

Ezekből következik, hogy ha NMR spektroszkópiával szeretnék tanulmányozni egy coiled coil rendszert, akkor olyan módszereket szükséges alkalmazni, mint a nagyméretű fehérjék mérései esetében: például a deuterált minta használata és/vagy nagy térerősségen alkalmazott TROSY alapú mérések, esetleg a részleges izotópjelzés segíthetnek (Foster 2007). Mindezek mellett a szilárdfázisú NMR spektroszkópia alkalmazását is érdemes lehet meggondolni, hiszen ebben az esetben a minta rendkívül gyors forgatásával küszöböljük ki a molekulák lassú globális mozgásából fakadó jelkiszéledést.

## 8. Az eredmények értékelése

Az irodalomban korábban is ismert volt, hogy az S100A4 fehérje az NMIIA-val és a p53TAD-dal komplexet képez, azonban az S100A4-p53TAD szerkezetét és a két komplex dinamikai tulajdonságait mi vizsgáltuk először. Továbbá mi mutattuk ki elsőként, hogy az S100A4 az ezrin két fő doménjével, az N-ERMAD-dal és C-ERMAD-dal is képes komplexet képezni. Az MPT-vel, a C-ERMAD-dal és a p53TAD-dal alkotott S100A4-komplexek NMR spektroszkópiával atomi szinten részletesen tanulmányozott szerkezeti és dinamikai tulajdonságai alapján kiderült, hogy az utóbbi kettő az elsőhöz hasonlóan aszimmetrikus, „átkaroló” komplexet képez, amelyben az S100A4 dimer addig ekvivalens két láncának kémiai környezetei eltérővé válnak a kötőpartner hatására. A dimer és oligomer fehérjék esetében az ilyen jellegű aszimmetrikus komplexek viszonylag ritkán fordulnak elő, általában annyi ligandumot kötnek molekulánként, ahány egységből épülnek fel (monomerenként egy kötőhelyet feltételezve). Az S100A4 fehérje aránylag nagyméretű kötőzsebe nem túlzottan specifikus – ezért is képes sok fehérjével kölcsönhatást létesíteni.

A három komplex közös jellemzője, hogy az S100A4 kötőpartnere a kötődés előtt rendezetlen, majd rendezetlen-rendezett átmenet során helikális szerkezetet vesz fel – ez általánosságban is jellemző az S100A4 kötőpartnereire. Az MPT és a p53TAD esetében kimutattuk, hogy inherens helicitással bírnak már a szabad állapotukban is, tehát feltehetően hélixképző hajlamuk és hidrofób aminosavaik megfelelő mintázata teszi lehetővé kötődésüket (a C-ERMAD esetében pedig hasonló effektus feltételezhető). Az S100A4-MPT különösen erős, 0,1 nM  $K_d$ -val jellemezhető komplex, tehát az MPT jól illeszkedik a kötőzsebbe. A C-ERMAD- és az p53TAD-komplexek erőssége ezzel szemben mindössze 1-10  $\mu$ M tartományba esnek – ezt NMR titrálásos és ITC módszerekkel egyaránt kimutattuk. Ezek tehát gyengébben kötődnek, így feltehetően a hidrofób aminosav-mintázatuk nem olyan kedvező az S100A4 kötőzsebe számára, mint az MPT esetében. Ráadásul NMR dinamikai mérések és elemzések alapján láthattuk, hogy a p53TAD kötött állapotban is részlegesen flexibilis marad, összetett és bonyolult mozgásokkal rendelkezik, emiatt nehéz ezt a komplexet kristályosítani és modellezni molekuladinamikai szimulációkkal, sőt a hagyományos Lipari-Szabó modellfüggetlen analízis sem képes igazán pontosan leírni a mozgásait. Mindezekből következik, hogy az S100A4-p53TAD „bolyhos” („fuzzy”) komplex.

A három komplex esetében az S100A4  $^1\text{H}, ^{15}\text{N}$ -HSQC spektrumán is eltérő effektusok jelentkeznek, amelyek a két lánc közötti különböző időskálájú cserejelenségekkel magyarázhatók. A cseresebességek összefüggésben állnak a komplexek eltérő affinitásával.

Ugyanis a cserefolyamatot jellemző  $k_{ex}$  paraméter az oda- és visszaalakulás sebességi együtthatójának összege, míg a  $K_d$  disszociációs állandó a kettő hányadosa. Így a kis  $K_d$ -val jellemezhető (nagy affinitású) S100A4-MPT komplex stabil, vagyis nagyon lassú a visszaalakulás sebessége, emiatt a  $k_{ex}$  relatíve kis értékű és így lassú cserét tapasztalunk: a keresztcsúcsok jól definiált módon kettőződnek, és meg is lehet határozni a legtöbb esetben, hogy melyik lánchoz melyik jel tartozik. A C-ERMAD-dal képzett komplex kevésbé stabil, ezért a visszaalakulás sebessége jóval nagyobb, így a  $k_{ex}$  is nagyobb értékű lesz: a cseresebesség a közepes és gyors tartományba esik. Ezért inkább a jelkettőződés nélküli eltolódásváltozás jellemző (gyors csere), sőt jelkiszélesedés is előfordul több régióban (közepes csere). Utóbbi egyébként a szabad és kötött állapot közötti cserére is utalhat. A p53TAD-komplex spektruma a legváltozatosabb: a jelek egy része megkettőződik, más része csak eltolódásváltozást szenved kettőződés nélkül, több régióban pedig kiszélesedést tapasztalunk: tehát gyors, közepes és lassú cserével jellemezhető aminosavak egyaránt előfordulnak a kötött állapotú S100A4 spektrumán. Ennek affinitása hasonló nagyságrendű a C-ERMAD-komplexhez, viszont sok összetett, belső mozgás jellemzi, és emiatt jelenik meg a sokféle cseresebesség egyszerre egy spektrumon.

Míndezeken túl a nemizom-miozin IIA és IIB izoformák C-terminális rendezetlen farokrégiójának CK2 által történő foszforilációját részletesen vizsgáltuk tömegspektrometriával kiegészített NMR spektroszkópiai mérések segítségével. Először mutattunk rá, hogy az NMIIIB két fő helyen foszforilálódik (S1956 és S1975) *in vitro* kísérletben, s így a többi, irodalomban korábban leírt foszforilációs hely feltehetően kisebb valószínűséggel alakul át a sejtes közegben is. Eredményeink megerősítették az NMIIA egyetlen, ismert foszforilációs helyét (S1943), és a részletes vizsgálatok alapján megállapítottuk, hogy nem történhet jelentős szerkezeti változás a foszforiláció következtében: a korábban feltételezett C-terminális régió visszahajlása az ACD doménre nem feltételezhető. Ehelyett inkább intermolekuláris kölcsönhatásokban játszhat szerepet a foszfát-csoport az NMIIA esetében, de egyéb mérések alapján inkább az S100-családdal, kiemelten pedig az S100A4-gyel való kölcsönhatás állhat az NMIIA-ból képződő filamentumok szétesésének regulációja mögött. Az NMIIIB filamentumok képződését és szétesését viszont valóban a foszforiláció szabályozhatja: ez tükröződött a foszforilált NMIIIB-t modellező fragmens gyenge aggregációs készségében, amelyet transzlációs diffúziós NMR mérésekkel mutattunk ki. Szintén először vizsgáltuk szisztematikusan és részletesen a coiled coil szerkezeti elemek esetében gyakran előforduló NMR jelkiszélesedés jelenségét több különböző hosszúságú NMIIA-fragmens használatával, valamint a coiled coil letekeredésének mechanizmusát NMR és ECD spektroszkópia együttes használatával.

Az eredményeket összegezve megállapíthatjuk, hogy több esetben is a részletes dinamikai

vizsgálat ad magyarázatot bizonyos jelenségekre akkor, amikor a szerkezetben nem mutatható ki jelentős változás. Ezt láttuk az S100A4-MPT komplex esetében, ahol a  $\text{Ca}^{2+}$ -affinitás növekedését dinamikai okokkal tudtuk magyarázni az irodalomból ismert S100B-TRTK komplexhez hasonló módon. Ez utóbbi szimmetrikus 2:2 arányú komplexet képez, s mindössze ötszörös a  $\text{Ca}^{2+}$ -affinitás növekedése, viszont az MPT-komplex esetében kiszámolható, hogy közel 10000-szeres a változás. Ez a nagy különbség a komplex sztöchiometriájára és a stabilitásbeli különbségére egyaránt visszavezethető. Ugyanígy dinamikai változás következik be a dimer összetartásáért felelős H1 hélixben: a lassú időskálájú mozgások megszűnnek a komplexképződés hatására. Ez bizonyára allosztérikus hatás, mivel a H1 hélix a kötőrégióval ellentétes oldalon található, és nem része a hidrofób kötőzsebnek. A H1 hélix általános módon is érintett lehet a komplexképzésben allosztérikus módon, hiszen a C-ERMAD és a p53TAD komplexének képződése esetében is megfigyelhető a kémiai eltolódások jelentős változása ebben a régióban, sőt a hőmérsékletfüggési vizsgálatok is ugyanezt erősítették meg. Mindezeket túl az NMIIA esetében az egyetlen foszforilációs hely hatását szerkezeti változás helyett szintén a dinamika oldaláról lehet megérteni: a coiled coil merevsége enyhén megnövekszik ebben az esetben.

Szintén dinamikai jelenség áll az NMR jelek félértékszélességének növekedése mögött is. Ezt tapasztaltuk az S100A4-N-ERMAD komplex esetében, amelynek nem voltak detektálhatók jelei (ez is bizonyította az N-ERMAD kötődését), mivel a nagy méret (58 kDa) miatt megnövekedik a komplex globális rotációs korrelációs ideje, ami a transzverzális relaxáció felgyorsulásához, végső soron a jelek kiszélesedéséhez vezet. E komplexhez több lépésben adagolt C-ERMAD hatására megjelenő jelek pedig ugyanemmiatt cáfolják az N-ERMAD-S100A4-C-ERMAD harmadlagos komplex létrejöttének lehetőségét. (Emellett a mért diffúziós állandók is megerősítik, hogy külön-külön képez komplexet az S100A4 az ezrin két doménjével.) Ezekhez hasonlóan a lassú bukdácsoló mozgás magyarázza a coiled coil szerkezeti elem esetében is azt az irodalomban ismert és általunk is tapasztalt jelenséget, hogy NMR jelei kiszélesednek és nem detektálhatók. Dinamikai vizsgálataink rámutattak arra, hogy az  $R_2/R_1$  hányados értéke jelentősen megnövekedik a coiled coil szakasz közelében lévő még detektálható jelek esetében. Ezt viszont az említett komplexekkel ellentétben nem a molekula mérete, hanem annak rúdszerű alakja okozza.

Láthatjuk tehát mindezekből, hogy az NMR spektroszkópia milyen széleskörűen használható biológiai kérdések tanulmányozására. Az is megmutatkozik ezekből az eredményekből, hogy a dinamikai ismeretek sok, egymástól különböző jelenség esetében játszhatnak fontos szerepet, amelyek oldatfázisú vizsgálata szempontjából az NMR spektroszkópia kiemelkedő vizsgálati módszer.

## 9. Kivonat

Doktori munkám során a tumormetasztázisban jelentős szerepet játszó S100A4 fehérjét és néhány komplexét, valamint a sejtváz fontos alkotói, a nemizom-miozin IIA és IIB izoforma (NMIIA és NMIIB) nehézláncának foszforilációját és a hosszú coiled coil régió C-terminális végét vizsgáltam NMR spektroszkópiával, valamint két kiegészítő módszerrel, ECD spektroszkópiával és tömegspektrometriával. Az S100A4 dimer és a NMIIA aszimmetrikus, „átkaroló” komplexének képződése során nem történik jelentős globális szerkezeti vagy dinamikai változás az S100A4 molekulában, de a  $\text{Ca}^{2+}$ -kötő EF-kéz régiók lokális gerincdinamikai változásai magyarázhatják az S100A4  $\text{Ca}^{2+}$ -affinitásának jelentős növekedését. Emellett a dimer összetartásáért felelős H1 hélixek lassú időskálájú mozgásai megszűnnek, ami allostérikus hatásnak tekinthető, s a dimerstabilitás növekedésére adhat magyarázatot. Az NMIIA fragmense rendezetlenből rendezetté válik, de már szabad állapotában is inherens helicitással rendelkezik, ami a rendkívül nagy affinitás magyarázatához járul hozzá. Az S100A4 és az ezrin két fő doménje, a C-ERMAD és az N-ERMAD kölcsönhatásának vizsgálata során kimutattam, hogy a C-ERMAD az S100A4 szokásos hidrofób kötőzsebébe kötődik aszimmetrikus módon, de a H1 hélixek allostérikus változást szenved ez esetben is. Az S100A4 külön-külön lép interakcióba a két ezrindoménnel harmadlagos komplex keletkezése nélkül. Az S100A4 és a p53 TAD doménjének aszimmetrikus komplexében az S100A4 NMR jelei változatos cserejelenségeket mutatnak. Kimutattam a p53TAD domén rendezetlenből rendezetté válása mellett azt is, hogy több régiója a komplexben is flexibilis marad, és nehezen leírható, összetett mozgásokkal rendelkezik. Mindezekből alapján „bolyhos” („fuzzy”) komplexnek tekinthetjük a képződő komplexet. Különböző fragmensek formájában vizsgáltam az NMIIA és NMIIB nehézláncának CK2 kináz által történő foszforiláció hatását a hőstabilitásra, aggregációs készségekre, szerkezetre és gerincdinamikára. Megállapítottam, hogy nem történik jelentős szerkezeti és dinamikai változás az egyetlen helyen foszforilálódó NMIIA esetében, így a korábban feltételezett C-terminális vég visszahajlása nem lehetséges, mindössze a coiled coil szakasz merevségének és a rendezetlen szakasz  $\beta$ -redős hajlamának növekedését lehetett kimutatni. Az NMIIA-val ellentétben az NMIIB esetében az elsősorban két helyen történő foszforiláció csökkenti az aggregációs hajlamot. Az NMIIA coiled coil régiójának C-terminális végét is több fragmens segítségével tanulmányoztam, és kimutattam, hogy a coiled coil szakasz letekeredése ezek esetében az N-terminális vég felől indulva fokozatosan történik. Bizonyítottam, hogy a coiled coil szakaszok NMR spektroszkópiában korábban jól ismert jelkiszélesedésének oka a rúd alakú molekula a hasonló méretű gömbszerű molekulákhoz képest lassabb bukdácsoló mozgása.



## 10. Abstract

In my doctoral thesis I studied the metastatic S100A4 protein and its several complexes as well as the phosphorylation and the C-terminal coiled coil structure of the cytoskeleton component nonmuscle myosin IIA (NMIIA) and IIB (NMIIB) heavy chains by NMR spectroscopy supplemented by ECD spectroscopy and mass spectrometry. No significant alterations were found in the global structure and dynamics in the asymmetric “hugging” complex of the S100A4 dimer and NMIIA. However, the local changes in dynamics of the EF hands could explain the elevated  $\text{Ca}^{2+}$  affinity of S100A4. Furthermore, the slow timescale motions of H1 helices involved in the dimer interface are restricted upon complex formation, which is an allosteric effect and might be accompanied by an increase in dimer stability. The NMIIA fragment undergoes disorder-to-order transition upon complex formation, yet in free form it is intrinsically disordered with inherent helicity, which might contribute to the unusually high affinity of the complex. Examination of the interaction between S100A4 dimer and the two main ezrin domains, C-ERMAD and N-ERMAD revealed that C-ERMAD binds to the conventional hydrophobic cleft in S100A4 in an asymmetric manner and allosteric changes in H1 helices were shown as well. No ternary complex between the three proteins forms, therefore S100A4 interacts with the two ezrin domains separately. NMR signals of S100A4 dimer could be found in various exchange regimes in case of asymmetric complex with p53 TAD domain. Backbone dynamics studies of the p53TAD in free and bound forms revealed its disorder-to-order transition and the remaining flexibility of several regions in the bound form. This can be characterized by very complicated and complex motions, which is an important evidence for being a fuzzy complex. Effects of NMIIA and NMIIB heavy chain phosphorylation by CK2 kinase on thermal stability, aggregation tendency, structure and backbone dynamics were investigated using several fragments. No significant structural and dynamical changes were detected in case of NMIIA phosphorylation, which occurs at only a single site, therefore C-terminus cannot fold back as hypothesized before. Instead, only a slight increase in coiled coil rigidity and disordered tail  $\beta$  sheet propensity were shown. However, aggregation tendency of NMIIB were reduced upon phosphorylation, which occurs at two main sites. The C-terminal end of the NMIIA coiled coil were studied as well by three fragments with different length. Unzipping of the studied coiled coil fragments begins from the N-terminus and occurs progressively towards the C-terminus. The reason for the well known coiled coil NMR peak broadening was shown to be the slower global tumbling causing an elevated global rotational correlation time of these rod-like structures compared to the spherical shaped molecules with similar size.

## 11. Irodalomjegyzék

- Abraham A (1961) The Principles of Nuclear Magnetism, *Clarendon Press*, Oxford, 315–316. o., 506–510. o.
- Alexa A, Lőrincz Zs (2018) Rekombináns fehérjék előállítás, tisztítás, azonosítás, *In Ezerarcú fehérjék, szerk.: Buday L, Nyitray L, Perczel A, Semmelweis Kiadó*, Budapest, 21–69. o.
- Arnesano F, Banci L, Bertini I, Fantoni A, Tenori L, Viezzoli MS (2005) Structural interplay between calcium(II) and copper(II) binding to S100A13 protein, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **44(39)**, 6341–6344.
- Austermann J, Nazmi AR, Muller-Tidow C, Gerke V (2008) Characterization of the Ca<sup>2+</sup>-regulated ezrin-S100P interaction and its role in tumor cell migration, *J. Biol. Chem.* **283(43)**, 29331–29340.
- Babu YS, Bugg CE, Cook WJ (1988) Structure of calmodulin refined at 2.2 Å resolution, *J. Mol. Biol.* **204(1)**, 191–204.
- Badyal SK, Basran J, Bhanji N, Kim JH, Chavda AP, Jung HS, Craig R, Elliott PR, Irvine AF, Barsukov IL, Kriajevska M, Bagshaw CR (2011) Mechanism of the Ca<sup>2+</sup>-dependent interaction between S100A4 and tail fragments of nonmuscle myosin heavy chain IIA, *J. Mol. Biol.* **405(4)**, 1004–1026.
- Batta Gy, Bodor A, Kövér K, Martinek T, Perczel A, Tőke O (2018a) NMR- és ESR-spektroszkópia, *In Ezerarcú fehérjék, szerk.: Buday L, Nyitray L, Perczel A, Semmelweis Kiadó*, Budapest, 203–211. o.
- Batta Gy, Bodor A, Kövér K, Martinek T, Perczel A, Tőke O (2018b) NMR- és ESR-spektroszkópia, *In Ezerarcú fehérjék, szerk.: Buday L, Nyitray L, Perczel A, Semmelweis Kiadó*, Budapest, 216–222. o.
- Batta Gy, Bodor A, Kövér K, Martinek T, Perczel A, Tőke O (2018c) NMR- és ESR-spektroszkópia, *In Ezerarcú fehérjék, szerk.: Buday L, Nyitray L, Perczel A, Semmelweis Kiadó*, Budapest, 223–224. o.
- Batta Gy, Bodor A, Kövér K, Martinek T, Perczel A, Tőke O (2018d) NMR- és ESR-spektroszkópia, *In Ezerarcú fehérjék, szerk.: Buday L, Nyitray L, Perczel A, Semmelweis Kiadó*, Budapest, 250–251. o.
- Baxter NJ, Williamson MP (1997) Temperature dependence of <sup>1</sup>H chemical shifts in proteins *J. Biomol. NMR* **9(4)**, 359–369.
- Beach JR, Hammer JA III (2015) Myosin II isoform co-assembly and differential regulation in mammalian systems, *Exp Cell Res.* **334(1)**, 2–9.
- Berjanskii MV, Wishart DS (2005) A Simple Method To Predict Protein Flexibility Using Secondary Chemical Shifts, *J. Am. Chem. Soc.* **127(43)**, 14970–14971.
- Bermel W, Bertini I, Felli IC, Lee YM, Luchinat C, Pierattelli R (2006) Protonless NMR experiments for sequence-specific assignment of backbone nuclei in unfolded proteins, *J. Am. Chem. Soc.* **128(12)**, 3918–3919.
- Bertini I, Das Gupta S, Hu X, Karavelas T, Luchinat C, Parigi G, Yuan J (2009) Solution structure and dynamics of S100A5 in the apo and Ca<sup>2+</sup>-bound states, *J. Biol. Inorg. Chem.* **14(7)**, 1097–1107.
- Bertini I, Borsi V, Cerofolini L, Das Gupta S, Fragai M, Luchinat C (2013) Solution structure and dynamics of human S100A14, *J. Biol. Inorg. Chem.* **18(2)**, 183–194.
- Best RB, Vendruscolo M (2004) Determination of protein structures consistent with NMR order parameters, *J. Am. Chem. Soc.* **126(26)**, 8090–8091.
- Bieri M, d'Auvergne EJ, Gooley PR (2011) relaxGUI: a new software for fast and simple NMR relaxation data analysis and calculation of ps-ns and μs motion of proteins, *J. Biomol. NMR.* **50(2)**, 147–155.
- Biri-Kovács B, Kiss B, Vadász H, Gógl G, Pálffy G, Török G, Homolya L, Bodor A, Nyitray L (2017) Ezrin interacts with S100A4 via both its N- and C-terminal domains, *PLoS One* **12(5)**, e0177489.
- Boehr DD, Nussinov R, Wright PE (2009) The role of dynamic conformational ensembles in biomolecular recognition, *Nat. Chem. Biol.* **5(11)**, 789–196.
- Boye K, Maelandsmo GM (2010) S100A4 and metastasis: a small actor playing many roles *Am. J. Pathol.* **176(2)**, 528–535.
- Böhlig L, Rother K (2011) One Function—Multiple Mechanisms: The Manifold Activities of p53 as a Transcriptional Repressor, *J. Biomed. Biotechnol.* **2011**, 464916.
- Braun D, Wider G, Wüthrich K (1994) Sequence-corrected 15N „random coil” chemical shifts, *J. Am. Chem. Soc.* **116(19)**, 8466–8469.
- Bresnick AR, Weber DJ, Zimmer DB (2015) S100 proteins in cancer *Nat. Rev. Cancer* **15(2)**, 96–109.
- Bresnick AR (2018) S100 proteins as therapeutic targets, *Biophys. Rev.* **10(6)**, 1617–1629.
- Burgess NC, Sharp TH, Thomas F, Wood CW, Thomson AR, Zaccari NR, Brady RL, Serpell LC, Woolfson DN (2015), *J. Am. Chem. Soc.* **137(33)**, 10554–10562.
- Candau R, Scolnick DM, Darpino P, Ying CY, Halazonetis TD, Berger SL (1997) *Oncogene* **15(7)**, 807–816.
- Camilloni C, Robustelli P, De Simone A, Cavalli A, Vendruscolo M (2012) Characterization of the conformational equilibrium between the two major substates of RNase A using NMR chemical shifts, *J. Am. Chem. Soc.* **134(9)**, 3968–3971.
- Cavanagh J, Fairbrother WJ, Palmer AG, Rance M, Skelton NJ (2007) Protein NMR Spectroscopy: Principles and Practice, 2nd ed., *Elsevier*, San Diego, 21. o.
- Cho CC, Hung KW, Gorja DR, Yu C (2015) The solution structure of human calcium-bound S100A4 mutated at four cysteine loci, *J. Biomol. NMR* **62(2)**, 233–238.

- Clark K, Middelbeek J, Lasonder E, Dulyaninova NG, Morrice NA, Ryazanov AG, Bresnick AR, Figdor CG, Leeuwen, FN (2008) TRPM7 regulates myosin IIA filament stability and protein localization by heavy chain phosphorylation, *J. Mol. Biol.* **378**(4), 790–803.
- Clore GM, Driscoll PC, Wingfield PT, Gronenborn AM (1990) Analysis of the backbone dynamics of interleukin-1 beta using two-dimensional inverse detected heteronuclear  $^{15}\text{N}$ - $^1\text{H}$  NMR spectroscopy, *Biochemistry* **29**(32), 7387–7401.
- Clore GM, 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.
- Clucas J, Valderrama F. (2014) ERM proteins in cancer progression, *J. Cell. Sci.* **127**(2), 267–275.
- Cole R, Loria JP (2003) FAST-Modelfree: a program for rapid automated analysis of solution NMR spin-relaxation data, *J. Biomol. NMR* **26**(3), 203–213.
- Cohen C, Parry DA (1990) Alpha-helical coiled coils and bundles: how to design an alpha-helical protein, *Proteins* **7**(1), 1–15.
- Cooper TM, Woody RW (1990) The effect of conformation on the CD of interacting helices: a theoretical study of tropomyosin, *Biopolymers* **30**(7–8), 657–676.
- Cox CJ, Dutta, K, Basavappa R, Zain SB, Pascal SM (2002) Sequence-specific chemical shift assignment of calcium-loaded murine S100A4, *J. Biomol. NMR* **23**(2), 153–154.
- Cuccurullo M, Schlosser G, Cacace G, Malorni L, Pocsfalvi G (2007) Identification of phosphoproteins and determination of phosphorylation sites by zirconium dioxide enrichment and SELDI-MS/MS, *J. Mass Spectrom.* **42**, 1069–1078.
- Cukier CD, Maveyraud L, Saurel O, Guillet V, Milon A, Gervais V (2016) The C-terminal region of the transcriptional regulator THAP11 forms a parallel coiled-coil domain involved in protein dimerization, *J. Struct. Biol.* **194**(3), 337–346.
- Czajlik A, Kovács B, Permi P, Gáspári Z (2017) Fine-tuning the extent and dynamics of binding cleft opening as a potential general regulatory mechanism in parvulin-type peptidyl prolyl isomerases, *Sci. Rep.* **7**, 44504.
- Csermely P, Palotai R, Nussinov R (2010) Induced fit, conformational selection and independent dynamic segments: an extended view of binding events, *Trends Biochem. Sci.* **35**(10), 539–546.
- Dahan I, Yearim A, Touboul Y, Ravid S (2012) The tumor suppressor Lg11 regulates NMII-A cellular distribution and focal adhesion morphology to optimize cell migration, *Mol. Biol. Cell.* **23**(4), 591–601.
- Daragan VA, Mayo KH (1997) Motional model analysis of protein and peptide dynamics using  $^{13}\text{C}$  and  $^{15}\text{N}$  NMR relaxation, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **31**, 63–105.
- Davies BR, Davies MP, Gibbs FE, Barraclough R, Rudland PS (1993) Induction of the metastatic phenotype by transfection of a benign rat mammary epithelial cell line with the gene for p9Ka, a rat calcium-binding protein, but not with the oncogene EJ-ras-1, *Oncogene* **8**(4), 999–1008.
- Di Lello P, Jenkins LM, Jones TN, Nguyen BD, Hara T, Yamaguchi H, Dikeakos JD, Appella E, Legault P, Omichinski JG (2006) Structure of the Tfb1/p53 complex: Insights into the interaction between the p62/Tfb1 subunit of TFIIF and the activation domain of p53, *Mol. Cell.* **22**(6), 731–740.
- van Dieck J, Teufel DP, Jaulent AM, Fernandez-Fernandez MR, Rutherford TJ, Wyslouch-Cieszynska A, Fersht AR (2009) Posttranslational modifications affect the interaction of S100 proteins with tumor suppressor p53, *J. Mol. Biol.* **394**(5), 922–930.
- Donato R (2001) S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **33**(7), 637–668.
- Donato R (2003) Intracellular and extracellular roles of S100 proteins. *Microsc. Res. Tech.* **60**(6), 540–551.
- 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.
- Drahoš L, Schlosser G, Vékey K (2018) Tömegspektrometria-alapú proteomika azonosítása, *In Ezerarcú fehérjék, szerk.: Buday L, Nyitray L, Perczel A, Semmelweis Kiadó, Budapest, 695–698. o.*
- Drohat AC, Weber DJ, Nenortas E, Beckett D (1997), *Protein Sci.* **6**(7), 1577–1582.
- Du M, Wang G, Ismail TM, Gross S, Fernig DG, Barraclough R, Rudland PS (2012) S100P dissociates myosin IIA filaments and focal adhesion sites to reduce cell adhesion and enhance cell migration, *J. Biol. Chem.* **287**(19), 15330–15344.
- Dudola D, Kovacs B, Gaspari Z (2017) CoNSEnsX+ Webserver for the Analysis of Protein Structural Ensembles Reflecting Experimentally Determined Internal Dynamics, *J. Chem. Inf. Model* **57**(8), 1728–1734.
- Duelli A, Kiss B, Lundholm I, Bodor A, Petoukhov MV, Svergun DI, Nyitray L, Katona G (2014) The C-terminal random coil region tunes the  $\text{Ca}^{2+}$ -binding affinity of S100A4 through conformational activation, *PLoS One* **9**(5), e97654.
- Dukhanina EA, Dukhanin AS, Lomonosov MY, Lukanidin EM, Georgiev GP (1997) Spectral studies on the calcium-binding properties of Mts1 protein and its interaction with target protein, *FEBS Lett.* **410**(2–3), 403–406.
- Dukhanina EA, Kabanova OD, Lukyanova TI, Shatalov YV, Yashin DV, Romanova EA, Gnuchev NV, Galkin AV,

- Georgiev GP, Sashchenko LP (2009) Opposite roles of metastasin (S100A4) in two potentially tumoricidal mechanisms involving human lymphocyte protein Tag7 and Hsp70, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106**(33), 13963–13967.
- Dulyaninova NG, Malashkevich VN, Almo SC, Bresnick AR (2005) Regulation of Myosin-IIA Assembly and Mts1 Binding by Heavy Chain Phosphorylation, *Biochemistry* **44**(18), 6867–6876.
- Dulyaninova NG, Bresnick AR (2013) The heavy chain has its day – Regulation of myosin-II assembly, *Bioarchitecture*, **3**(4), 77–85.
- Dutta K, Cox CJ, Alexandrov A, Huang H, Basavappa R, Pascal SM (2002a) Sequence-specific chemical shift assignment and chemical shift indexing of murine apo-Mts1, *J. Biomol. NMR* **22**(2), 181–182.
- Dutta K, Cox CJ, Huang H, Basavappa R, Pascal SM (2002b) Calcium coordination studies of the metastatic Mts1 protein, *Biochemistry* **41**(13), 4239–4245.
- Dutta K, Cox CJ, Basavappa R, Pascal SM (2008) 15N relaxation studies of Apo-Mts1: a dynamic S100 protein, *Biochemistry* **47**(29), 7637–7647.
- Ecsédi P, Kiss B, Gógl G, Radnai L, Buday L, Koprivanacz K, Liliom K, Leveles I, Vértessy B, Jeszenői N, Hetényi C, Schlosser G, Katona G, Nyitray L (2017) Regulation of the Equilibrium between Closed and Open Conformations of Annexin A2 by N-Terminal Phosphorylation and S100A4-Binding, *Structure* **25**(8), 1195–1207.
- Ecsédi P, Billington N, Pálffy G, Gógl G, Kiss B, Bulyáki É, Bodor A, Sellers JR, Nyitray L (2018) Multiple S100 protein isoforms and C-terminal phosphorylation contribute to the paralog-selective regulation of nonmuscle myosin 2 filaments, *J. Biol. Chem.* **293**(38), 14850–14867.
- Eisenberg D, Schwarz E, Komaromy M, Wall R (1984) Analysis of membrane and surface protein sequences with the hydrophobic moment plot, *J. Mol. Biol.* **179**(1), 125–142.
- Elliott PR, Irvine AF, Jung HS, Tozawa K, Pastok MW, Picone R, Badyal SK, Basran J, Rudland PS, Barraclough R, Lian L-Y, Bagshaw CR, Kriajevska M, Barsukov IL (2012) Asymmetric mode of Ca<sup>2+</sup>-S100A4 interaction with nonmuscle myosin IIA generates nanomolar affinity required for filament remodeling, *Structure* **20**(4), 654–666.
- Emberley ED, Murphy LC, Watson PH (2004) S100 proteins and their influence on pro-survival pathway in cancer, *Biochem. Cell Biol.* **82**(4), 508–515.
- Fanò G, Biocca S, Fulle S, Mariggiò MA, Belia S, Calissano P (1995) The S-100: a protein family in search of a function, *Prog. Neurobiol.* **46**(1), 71–82.
- Farkas V, Jákl I, Kardos J, Vass E (2018) Elektron- és rezgési spektroszkópia a fehérjekutatásban, *In Ezerarcú fehérjék, szerk.: Buday L, Nyitray L, Perczel A, Semmelweis Kiadó, Budapest, 277–287. o.*
- Farrow NA, Zhang O, Szabo A, Torchia DA, Kay LE (1995) Spectral density function mapping using 15N relaxation data exclusively, *J. Biomol. NMR* **6**(2), 153–162.
- F Dudás E, Bodor A (2019) A quantitative, diffusion NMR based analytical tool to distinguish folded, disordered and denatured biomolecules, *Anal. Chem.* (elfogadva), doi: 10.1021/acs.analchem.8b05617.
- Fenwick RB, van den Bedem H, Fraser JS, Wright PE (2014) Integrated description of protein dynamics from room-temperature X-ray crystallography and NMR, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **111**(4), E445–454.
- Fernandez-Fernandez MR, Veprintsev DB, Fersht AR (2005) Proteins of the S100 family regulate the oligomerization of p53 tumor suppressor, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **102**(13), 4735–4740.
- Foster MP, McElroy CA, Amero CD (2007) Solution NMR of large molecules and assemblies, *Biochemistry* **46**(2), 331–340.
- García de la Torre J, 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.
- Garrett SC, Varney KM, Weber DJ, Bresnick AR (2006) S100A4, a mediator of metastasis, *J. Biol. Chem.* **281**(2), 677–680.
- Gill ML, Byrd RA, Palmer AG III (2016) Dynamics of GCN4 facilitate DNA interaction: a model-free analysis of an intrinsically disordered region, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **18**(8), 5839–5849.
- Gingras AR, Basran J, Prescott A, Kriajevska M, Bagshaw CR, Barsukov IL (2008) Crystal structure of the Ca(2+)-form and Ca(2+)-binding kinetics of metastasis-associated protein, S100A4, *FEBS Lett.* **582**(12), 1651–1656.
- Grigorian M, Andresen S, Tulchinsky E, Kriajevska M, Carlberg C, Kruse C, Cohn M, Ambartsumian N, Christensen A, Selivanova G, Lukanidin E (2001) Tumor suppressor p53 protein is a new target for the metastasis-associated Mts1/S100A4 protein: functional consequences of their interaction, *J. Biol. Chem.* **276**(25), 22699–22708.
- Goddard TD, Kneller DG (2000) SPARKY 3., University of California, San Francisco
- Grünberg R, Nilges M, Leckner J (2006) Flexibility and Conformational Entropy in Protein-Protein Binding, *Structure* **14**(4), 683–693.
- Hashimoto M, Kodera N, Tsunaka Y, Oda M, Tanimoto M, Ando T, Morikawa K, Tate S (2013) Phosphorylation-coupled intramolecular dynamics of unstructured regions in chromatin remodeler FACT, *Biophys. J.* **104**(10), 2222–2234.
- He Y, Chen Y, Mooney SM, Rajagopalan K, Bhargava A, Sacho E, Weninger K, Bryan PN, Kulkarni P, Orban J (2015) Phosphorylation-induced Conformational Ensemble Switching in an Intrinsically Disordered Cancer/Testis Antigen, *J. Biol. Chem.* **290**(41), 25090–25102.
- Hiller S, Fiorito F, Wüthrich K, Wider G (2005) Automated projection spectroscopy (APSY), *Proc. Natl. Acad. Sci.*

- USA. **102(31)**, 10876–10881.
- Hiller S, Wasmer C, Wider G, Wüthrich K (2007) Sequence-specific resonance assignment of soluble nonglobular proteins by 7D APSY-NMR spectroscopy, *J. Am. Chem. Soc.* **129(35)**, 10823–10828.
- Hu B, Gilkes DM, Farooqi B, Sebt SM, Chen J (2006) MDMX overexpression prevents p53 activation by the MDM2 inhibitor Nutlin, *J. Biol. Chem.* **281(44)**, 33030–33035.
- Huang L, Xu Y, Cai G, Guan Z, Cai S. (2012) Downregulation of S100A4 expression by RNA interference suppresses cell growth and invasion in human colorectal cancer cells, *Oncol. Rep.* **27(4)**, 917–922.
- Inman KG, Baldissieri DM, Miller KE, Weber DJ (2001) Backbone dynamics of the calcium-signaling protein apo-S100B as determined by <sup>15</sup>N NMR relaxation, *Biochemistry* **40(12)**, 3439–3448.
- Ishigaki T, Ohki I, Utsunomiya-Tate N, Tate SI (2007) Chimeric structural stabilities in the coiled-coil structure of the NECK domain in human lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor 1 (LOX-1), *J. Biochem.* **141(6)**, 855–866.
- 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.
- Jenkinson SR, Barraclough R, West CR, Rudland PS (2004) S100A4 regulates cell motility and invasion in an in vitro model for breast cancer metastasis, *Br. J. Cancer* **90(1)**, 253–262.
- Joerger AC, Fersht AR (2008) Structural biology of the tumor suppressor p53, *Annu. Rev. Biochem.* **77**, 557–582.
- Kaplan AR, Brady MR, Maciejewski MW, Kammerer RA, Alexandrescu AT (2017) Nuclear Magnetic Resonance Structures of GCN4p Are Largely Conserved When Ion Pairs Are Disrupted at Acidic pH but Show a Relaxation of the Coiled Coil Superhelix, *Biochemistry* **56(11)**, 1604–1619.
- Kay LE (1998) Protein dynamics from NMR, *Biochem. and Cell Biol.* **76(2–3)**, 145–152.
- Keller RLJ (2004) The computer aided resonance assignment tutorial, Cantina Verlag, Goldau
- Kim EJ, Helfman DM (2003) Characterization of the metastasis-associated protein, S100A4. Roles of calcium binding and dimerization in cellular localization and interaction with myosin, *J. Biol. Chem.* **278(32)**, 30063–30073.
- Kiss B, Duelli A, Radnai L, Kékesi KA, Katona G, Nyitray L (2012) Crystal structure of the S100A4-nonmuscle myosin IIA tail fragment complex reveals an asymmetric target binding mechanism, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **109(16)**, 6048–6053.
- Kiss B, Kalmár L, Nyitray L, Pál G (2016) Structural determinants governing S100A4-induced isoform-selective disassembly of nonmuscle myosin II filaments, *FEBS J.* **283(11)**, 2164–2180.
- Koltzsch M, Neumann C, König S, Gerke V. (2003) Ca<sup>2+</sup>-dependent binding and activation of dormant ezrin by dimeric S100P, *Mol. Biol. Cell* **14(6)**, 2372–2384.
- Korzhnev DM, Karlsson BG, Orekhov VY, Billeter M (2003) NMR detection of multiple transitions to low-populated states in azurin, *Protein Sci.* **12(1)**, 56–65.
- Kriaievska MV, Cardenas MN, Grigorian MS, Ambartsumian NS, Georgiev GP, Lukanidin EM (1994) Non-muscle myosin heavy chain as a possible target for protein encoded by metastasis-related mts-1 gene, *J. Biol. Chem.* **269(31)**, 19679–19682.
- Kriaievska M, Fischer-Larsen M, Moertz E, Vorm O, Tulchinsky E, Grigorian M, Ambartsumian N, Lukanidin E (2002) Liprin beta 1, a member of the family of LAR transmembrane tyrosine phosphatase-interacting proteins, is a new target for the metastasis-associated protein S100A4 (Mts1), *J. Biol. Chem.* **277(7)**, 5229–5235.
- Krízová H, Zidek 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.
- Krois AS, Ferreón JC, Martínez-Yamout MA, Dyson HJ, Wright PE (2016) Recognition of the disordered p53 transactivation domain by the transcriptional adapter zinc finger domains of CREB-binding protein, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **113(13)**, E1853–1862.
- Lane DP (1992) Cancer. p53, guardian of the genome, *Nature* **358(6381)**, 15–16.
- Lee H, Mok KH, Muhandiram R, Park KH, Suk JE, Kim DH, Chang J, Sung YC, Choi KY, Han KH (2000) Local Structural Elements in the Mostly Unstructured Transcriptional Activation Domain of Human p53, *J. Biol. Chem.* **275(38)**, 29426–29432.
- Lee CW, Martínez-Yamout MA, Dyson HJ, Wright PE (2010) Structure of the p53 transactivation domain in complex with the nuclear receptor coactivator binding domain of CREB binding protein, *Biochemistry* **49(46)**, 9964–9971.
- Lee W, Tonelli M, Markley JL (2015): NMRFAM-SPARKY: enhanced software for biomolecular NMR spectroscopy, *Bioinformatics* **31(8)**, 1325–1327.
- Lefèvre 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.
- Leiter LM, Chen J, Marathe T, Tanaka M, Dutta A. (1996) Loss of transactivation and transrepression function, and not RPA binding, alters growth suppression by p53, *Oncogene* **12(12)**, 2661–2668.
- Li ZH, Spektor A, Varlamova O, Bresnick AR. (2003) Mts1 regulates the assembly of nonmuscle myosin-IIA, *Biochemistry* **42(48)**, 14258–14266.
- Li ZH, Bresnick AR (2006) The S100A4 metastasis factor regulates cellular motility via a direct interaction with

- myosin-IIA, *Cancer Res.* **66(10)**, 5173–5180.
- Lin J, Chen J, Elenbaas B, Levine AJ (1994) Several hydrophobic amino acids in the p53 amino-terminal domain are required for transcriptional activation, binding to mdm-2 and the adenovirus 5 E1B 55-kD protein, *Genes Dev.* **8(10)**, 1235–1246.
- Lipari G, Szabó 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, Szabó 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.
- Liriano MA, Varney KM, Wright NT, Hoffman CL, Toth EA, Ishima R, Weber DJ (2012) Target binding to S100B reduces dynamic properties and increases Ca(2+)-binding affinity for wild type and EF-hand mutant proteins, *J. Mol. Biol.* **423(3)**, 365–385.
- Lukanidin E, Sleeman JP (2012) Building the niche: the role of the S100 proteins in metastatic growth, *Semin. Cancer Biol.* **22(3)**, 216–225.
- Lum JK, Neuweiler H, Fersht AR (2012) Long-range modulation of chain motions within the intrinsically disordered transactivation domain of tumor suppressor p53, *J. Am. Chem. Soc.* **134(3)**, 1617–1622.
- Lupas A, Van Dyke M, Stock J (1991) Predicting coiled coils from protein sequences, *Science* **252(5009)**, 1162–1164.
- Lupas AN (1997) Coiled coils: new structures and new functions, *Trends Biochem. Sci.* **21(10)**, 375–382.
- Lupas AN, Bassler J (2017) Coiled coils – a model system for the 21st century, *Trends Biochem. Sci.* **42(2)**, 130–140.
- Malashkevich VN, Varney KM, Garrett SC, Wilder PT, Knight D, Charpentier TH, Ramagopal UA, Almo SC, Weber DJ, Bresnick AR (2008) Structure of Ca<sup>2+</sup>-bound S100A4 and its interaction with peptides derived from nonmuscle myosin-IIA *Biochemistry* **47(18)**, 5111–5126.
- Mandel AM, Akke M, Palmer AG III (1995) Backbone dynamics of Escherichia coli ribonuclease HI: correlations with structure and function in an active enzyme, *J. Mol. Biol.* **246(1)**, 144–163.
- Marenholz I, Heizmann CW, Fritz G (2004) S100 proteins in mouse and man: from evolution to function and pathology (including an update of the nomenclature), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **322(4)**, 1111–1122.
- Markowitz J, Rustandi RR, Varney KM, Wilder PT, Udan R, Wu SL, Horrocks WD, Weber DJ (2005) Calcium-binding properties of wild-type and EF-hand mutants of S100B in the presence and absence of a peptide derived from the C-terminal negative regulatory domain of p53, *Biochemistry* **44(19)**, 7305–7314.
- Marsh JA, Singh VK, Jia Z, Forman-Kay JD (2006) Sensitivity of Secondary Structure Propensities to Sequence Differences Between  $\alpha$ - and  $\gamma$ -synuclein: Implications for Fibrillation, *Protein Sci.* **15(12)**, 2795–2804.
- Marsh JA, Teichmann SA, Forman-Kay JD (2012) Probing the diverse landscape of protein flexibility and binding, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **22(5)**, 643–650.
- Micsonai A, Wien F, Kernya L, Lee YH, Goto Y, Réfrégiers M, Kardos J (2015) Accurate secondary structure prediction and fold recognition for circular dichroism spectroscopy, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **112(24)**, E3095–3103.
- Mishra SK, Siddique HR, Saleem M (2012) S100A4 calcium-binding protein is key player in tumor progression and metastasis: preclinical and clinical evidence, *Cancer Metastasis Rev.* **31(1–2)**, 163–172.
- Miskei M, Antal C, Fuxreiter M (2017) FuzDB: database of fuzzy complexes, a tool to develop stochastic structure-function relationships for protein complexes and higher-order assemblies, *Nucleic Acids Res.* **45(D1)**, D228–D235.
- Mirzoeva S, Weigand S, Lukas TJ, Shuvalova L, Anderson WF, Watterson DM (1999) Analysis of the functional coupling between calmodulin's calcium binding and peptide recognition properties, *Biochemistry*, **38(13)**, 3936–3947.
- Moore B (1965) A soluble protein characteristic of the nervous system, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **19(6)**, 739–744.
- Momand J, Zambetti GP, Olson DC, George D, Levine AJ (1992) The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation, *Cell* **69(7)**, 1237–1245.
- Motáčková V, Nováček J, Zawadzka-Kazimierczuk A, Kazimierczuk K, Zidek L, Sanderová H, Krásný L, Koźmiński W, Sklenář V (2010) Strategy for complete NMR assignment of disordered proteins with highly repetitive sequences based on resolution-enhanced 5D experiments, *J. Biomol. NMR* **48(3)**, 169–177.
- Murakami N, Chauhan VP, Elzinga M (1998) Two nonmuscle myosin II heavy chain isoforms expressed in rabbit brains: filament forming properties, the effects of phosphorylation by protein kinase C and casein kinase II, and location of the phosphorylation sites, *Biochemistry* **37(7)**, 1989–2003.
- Murakami N, Kotula L, Hwang YW (2000) Two distinct mechanisms for regulation of nonmuscle myosin assembly via the heavy chain: phosphorylation for MIIIB and mts 1 binding for MIIA, *Biochemistry* **39(37)**, 11441–11451.
- Nakasawa T, Takahashi M, Matsuzawa F, Aikawa S, Togashi Y, Saitoh T, Yamagishi A, Yazawa M (2005) Critical regions for assembly of vertebrate nonmuscle myosin II, *Biochemistry* **44(1)**, 174–183.
- Neal S, Nip AM, Zhang H, Wishart DS (2003) Rapid and accurate calculation of protein <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C and <sup>15</sup>N chemical shifts, *J. Biomol. NMR* **26(3)**, 215–240.
- Neisch AL, Fehon RG (2011) Ezrin, Radixin and Moesin: key regulators of membrane-cortex interactions and

- signaling, *Curr. Opin. Cell. Biol.* **23**(4), 377–382.
- Nishi H, Shaytan A, Panchenko A R (2014) Physicochemical mechanisms of protein regulation by phosphorylation, *Front Genet.* **5**, 270.
- Nogueira MO, Hošek T, Caçada EO, Castiglia F, Massimi P, Banks L, Felli IC, Pierattelli R (2017) Monitoring HPV-16 E7 phosphorylation events, *Virology* **503**, 70–75.
- Nowakowski M, Jaremko Ł, Jaremko M, Zhukov I, Belczyk A, Bierzyński A, Ejchart A (2011) Solution NMR structure and dynamics of human apo-S100A1 protein, *J. Struct. Biol.* **174**(2), 391–399.
- Nowakowski M, Ruszczyńska-Bartnik K, Budzińska M, Jaremko L, Jaremko M, Zdanowski K, Bierzyński A, Ejchart A (2013) Impact of calcium binding and thionylation of S100A1 protein on its nuclear magnetic resonance-derived structure and backbone dynamics, *Biochemistry* **52**(7), 1149–1159.
- Orre LM, Panizza E, Kaminsky VO, Vernet E, Gräslund T, Zhivotovsky B, Lehtiö J (2013) S100A4 interacts with p53 in the nucleus and promotes p53 degradation, *Oncogene*, **32**(49), 5531–5540.
- Ouderkirk JL, Krendel M (2014) Non-muscle myosins in tumor progression, cancer cell invasion and metastasis, *Cytoskeleton (Hoboken)* **71**(8), 447–463.
- Pathuri P, Vogeley L, Luecke H (2008) Crystal structure of metastasis-associated protein S100A4 in the active calcium-bound form, *J. Mol. Biol.* **383**(1), 62–67.
- Pálffy G, Kiss B, Nyitray L, Bodor A (2016) Multilevel Changes in Protein Dynamics upon Complex Formation of the Calcium-Loaded S100A4 with a Nonmuscle Myosin IIA Tail Fragment, *Chembiochem.* **17**(19), 1829–1838.
- Palmer AG III (1997) Probing molecular motion by NMR, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **7**(5), 732–737.
- Palmer AG III (2014) Chemical exchange in biomacromolecules: past, present, and future, *J. Magn. Reson.* **241**, 3–17.
- Pascual J, Pfuhl M, Walther D, Saraste M, Nilges M (1997) Solution structure of the spectrin repeat: a left-handed antiparallel triple-helical coiled-coil, *J. Mol. Biol.* **273**(3), 740–751.
- Perczel A, Park K, Fasman GD (1991) Deconvolution of the circular dichroism spectra of proteins: the circular dichroism spectra of the antiparallel beta-sheet in proteins, *Proteins* **13**(1), 57–69.
- Pocsfalvi G, Cuccurullo M, Schlosser G, Scacco S, Papa S, Malorni A (2007) Phosphorylation of B14.5a subunit from bovine heart complex I identified by titanium dioxide selective enrichment and shotgun proteomics, *Mol. Cell Prot.* **6**(2), 231–237.
- Price WS (1997) Pulsed-Field Gradient Nuclear Magnetic Resonance as a Tool for Studying Translational Diffusion: Part I. Basic Theory, *Concepts Magn. Reson.* **9**, 299–336.
- Price WS (1998) Pulsed-field gradient nuclear magnetic resonance as a tool for studying translational diffusion: Part II. Experimental aspects, *Concepts Magn. Reson.* **10**, 197–237.
- Raj N, Attardi LD (2017) The Transactivation Domains of the p53 Protein, *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **7**(1), a026047.
- Ramagopal UA, Dulyaninova NG, Varney KM, Wilder PT, Nallamsetty S, Brenowitz M, Weber DJ, Almo SC, Bresnick AR (2013) Structure of the S100A4/myosin-IIA complex, *BMC Struct. Biol.* **13**, 31.
- Renzoni D, Esposito D, Pfuhl M, Hinton JC, Higgins CF, Driscoll PC, Ladbury JE (2001) Structural characterization of the N-terminal oligomerization domain of the bacterial chromatin-structuring protein, H-NS, *J. Mol. Biol.* **306**(5), 1127–1137.
- Richter B, Gsponer J, Várnai P, Salvatella X, Vendruscolo M (2007) The MUMO (minimal under-restraining minimal over-restraining) method for the determination of native state ensembles of proteins, *J. Biomol. NMR* **37**(2), 117–135.
- Rovó P, Stráner P, Láng A, Bartha I, Huszár K, Nyitray L, Perczel A (2013) Structural insights into the Trp-cage folding intermediate formation, *Chemistry* **19**(8), 2628–2640.
- Rule GS, Hitchens TK (2006) Fundamentals of Protein NMR Spectroscopy, *Springer*, Dordrecht, Hollandia, 441. o.
- Rustandi R, Vallely KM, Varlamova O, Klein MG, Almo SC, Bresnick AR, Weber DJ (2001) <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N NMR sequence-specific resonance assignments for human apo-Mts1 (S100A4), *J. Biomol. NMR* **19**(4), 381–382.
- Sattler M, Schleucher J, Griesinger C (1999) Heteronuclear multidimensional NMR experiments for the structure determination of proteins in solution employing pulsed field gradients, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **34**, 93–158.
- Schanda P, Brutscher B (2005) Very fast two-dimensional NMR spectroscopy for real-time investigation of dynamic events in proteins on the time scale of seconds, *J. Am. Chem. Soc.* **127**(22), 8014–8015.
- Schanda P, Van Melckebeke H, Brutscher B (2006) Speeding up three-dimensional protein NMR experiments to a few minutes, *J. Am. Chem. Soc.* **128**(28), 9042–9043.
- Schubert M, Labudde D, Oschkinat H, Schmieder P (2002) A software tool for the prediction of Xaa-Pro bond conformations in proteins based on <sup>13</sup>C chemical shift statistics, *J. Biomol. NMR* **24**(2), 149–154.
- Scolnick DM, Chehab NH, Stavridi ES, Lien MC, Caruso L, Moran E, Berger SL, Halazonetis TD (1997) CREB-binding protein and p300/CBP-associated factor are transcriptional coactivators of the p53 tumor suppressor protein, *Cancer Res.* **57**(17), 3693–3696.
- Sellers JR (2000) Myosins: a diverse superfamily, *Biochim. Biophys. Acta.* **1496**(1), 3–22.

- Semov A, Moreno MJ, Onichtchenko A, Abulrob A, Ball M, Ekiel I, Pietrzynski G, Stanimirovic D, Alakhov V (2005) Metastasis-associated protein S100A4 induces angiogenesis through interaction with Annexin II and accelerated plasmin formation, *J. Biol. Chem.* **280**(21), 20833–20841.
- Sharma R, Raduly Z, Miskei M, Fuxreiter M (2015) Fuzzy complexes: Specific binding without complete folding, *FEBS Lett.* **589**(19), 2533–2542.
- Sharma AK, Birrane G, Anklin C, Rigby AC, Alper SL (2017) NMR insight into myosin-binding subunit coiled-coil structure reveals binding interface with protein kinase G-1 $\alpha$  leucine zipper in vascular function, *J. Biol. Chem.* **292**(17), 7052–7065.
- Shen Y, Bax A (2013) Protein backbone and sidechain torsion angles predicted from NMR chemical shifts using artificial neural networks, *J. Biomol. NMR.* **56**(3), 227–241.
- Skinner SP, Fogh RH, Boucher W, Ragan TJ, Mureddu LG, Vuister GW (2016) CcpNmr AnalysisAssign: a flexible platform for integrated NMR analysis, *J. Biomol. NMR.* **66**(2), 111–124.
- Soussi T (2000) The p53 tumor suppressor gene: from molecular biology to clinical investigation, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **910**, 121–137.
- Tarabykina S, Scott DJ, Herzyk P, Hill TJ, Tame, JRH, Kriajevska M, Lafitte D, Derrick PJ, Dodson GG, Maitland NJ, Lukanidin EM, Bronstein IB (2001) The dimerization interface of the metastasis-associated protein S100A4 (Mts1) – In vivo and in vitro studies, *J. Biol. Chem.* **276**(26), 24212–24222.
- Tompa P, Fuxreiter M (2008) Fuzzy complexes: polymorphism and structural disorder in protein-protein interactions, *Trends Biochem. Sci.* **33**(1), 2–8.
- Uversky VN (2016) p53 Proteoforms and Intrinsic Disorder: An Illustration of the Protein Structure–Function Continuum Concept, *Int. J. Mol. Sci.* **17**(11), 1874.
- Vallely, KM, Rustandi RR, Ellis KC, Varlamova O, Bresnick AR, Weber DJ (2002) Solution structure of human Mts1 (S100A4) as determined by NMR spectroscopy *Biochemistry* **41**(42), 12670–12680.
- Vavra KC, Xia Y, Rock RS (2016) Competition between Coiled-Coil Structures and the Impact on Myosin-10 Bundle Selection, *Biophys J.* **110**(11), 2517–2527.
- Vicente-Manzanares M, Ma X, Adelstein RS, Horwitz AR (2009) Non-muscle myosin II takes centre stage in cell adhesion and migration, *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **10**(11), 778–790.
- Vise PD, Baral B, Latos AJ, Daughdrill GW (2005) NMR chemical shift and relaxation measurements provide evidence for the coupled folding and binding of the p53 transactivation domain, *Nucleic Acids Res.* **33**(7), 2061–2077.
- Williamson MP (2013) Using chemical shift perturbation to characterise ligand binding, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **73**, 1–16.
- Wood CW, Bruning M, Ibarra AA, Bartlett GJ, Thomson AR, Sessions RB, Brady RL, Woolfson DN (2014) CCBUILDER: an interactive web-based tool for building, designing and assessing coiled-coil protein assemblies, *Bioinformatics* **30**(21), 3029–3035.
- Wishart DS, Bigam CG, Holm A, Hodges RS, Sykes BD (1995) <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C and <sup>15</sup>N random coil NMR chemical shifts of the common amino acids. I. Investigations of nearest-neighbor effects, *J. Biomol. NMR* **5**(1), 67–81.
- Wright NT, Inman KG, Levine JA, Cannon BR, Varney KM, Weber DJ (2008a) Refinement of the solution structure and dynamic properties of Ca(2+)-bound rat S100B, *J. Biomol. NMR* **42**(4), 279–286.
- Wright NT, Prosser BL, Varney KM, Zimmer DB, Schneider MF, Weber DJ (2008b) S100A1 and calmodulin compete for the same binding site on ryanodine receptor, *J. Biol. Chem.* **283**(39), 26676–26683.
- Wütrich K (1990) Protein structure determination in solution by NMR spectroscopy, *J. Biol. Chem.* **265**(36), 22059–22062.
- Xiao H, Pearson A, Coulombe B, Truant R, Zhang S, Regier JL, Triezenberg SJ, Reinberg D, Flores O, Ingles CJ (1994) Binding of basal transcription factor TFIID to the acidic activation domains of VP16 and p53, *Mol. Cell. Biol.* **14**(10), 7013–7024.
- Yang D, Kay LE (1996) Contributions to conformational entropy arising from bond vector fluctuations measured from NMR-derived order parameters: application to protein folding, *J. Mol. Biol.* **263**(2), 369–382.
- Zhukov I, Ejchart A, Bierzyński A (2008) Structural and motional changes induced in apo-S100A1 protein by the disulfide formation between its Cys 85 residue and beta-mercaptoethanol, *Biochemistry* **47**(2), 640–650.
- Zhou NE, Kay CM, Hodges RS (1992) Synthetic model proteins. Positional effects of interchain hydrophobic interactions on stability of two-stranded alpha-helical coiled-coils. *J. Biol. Chem.* **267**(4), 2664–2670.
- Zimmer DB, Weber DJ (2010) The Calcium-Dependent Interaction of S100B with Its Protein Targets, *Cardiovasc. Psychiatry. Neurol.* **2010**, 728052.
- Zuiderweg ER (2002) Mapping protein-protein interactions in solution by NMR spectroscopy, *Biochemistry* **41**(1), 1–7.



## ADATLAP

### a doktori értekezés nyilvánosságra hozatalához\*

#### I. A doktori értekezés adatai

A szerző neve: **Pálfy Gyula**

MTMT-azonosító: **10054806**

A doktori értekezés címe és alcíme: **A tumormetasztázisban szerepet játszó néhány fehérje vizsgálata NMR spektroszkópiával**

DOI-azonosító<sup>46</sup>:.....

A doktori iskola neve: **Hevesy György Kémia Doktori Iskola**

A doktori iskolán belüli doktori program neve: **Szintetikus kémia, biomolekuláris kémia**

A témavezető neve és tudományos fokozata: **Dr. Bodor Andrea, PhD.**

A témavezető munkahelye: **ELTE Természettudományi Kar, Kémiai Intézet**

#### II. Nyilatkozatok

##### 1. A doktori értekezés szerzőjeként

a) hozzájárulok, hogy a doktori fokozat megszerzését követően a doktori értekezésem és a tézisek nyilvánosságra kerüljenek az ELTE Digitális Intézményi Tudástárban. Felhatalmazom a Természettudományi kar Dékáni Hivatal Doktori, Habilitációs és Nemzetközi Ügyek Csoportjának ügyintézőjét, hogy az értekezést és a téziseket feltöltse az ELTE Digitális Intézményi Tudástárba, és ennek során kitöltse a feltöltéshez szükséges nyilatkozatokat.

b) kérem, hogy a mellékelt kérelemben részletezett szabadalmi, illetőleg oltalmi bejelentés közzétételéig a doktori értekezést ne bocsássák nyilvánosságra az Egyetemi Könyvtárban és az ELTE Digitális Intézményi Tudástárban;

c) kérem, hogy a nemzetbiztonsági okból minősített adatot tartalmazó doktori értekezést a minősítés (*dátum*)-ig tartó időtartama alatt ne bocsássák nyilvánosságra az Egyetemi Könyvtárban és az ELTE Digitális Intézményi Tudástárban;

d) kérem, hogy a mű kiadására vonatkozó mellékelt kiadó szerződésre tekintettel a doktori értekezést a könyv megjelenéséig ne bocsássák nyilvánosságra az Egyetemi Könyvtárban, és az ELTE Digitális Intézményi Tudástárban csak a könyv bibliográfiai adatait tegyék közzé. Ha a könyv a fokozatszerzést követően egy évig nem jelenik meg, hozzájárulok, hogy a doktori értekezésem és a tézisek nyilvánosságra kerüljenek az Egyetemi Könyvtárban és az ELTE Digitális Intézményi Tudástárban.

##### 2. A doktori értekezés szerzőjeként kijelentem, hogy

a) az ELTE Digitális Intézményi Tudástárba feltöltendő doktori értekezés és a tézisek saját eredeti, önálló szellemi munkám és legjobb tudomásom szerint nem sértem vele senki szerzői jogait;

b) a doktori értekezés és a tézisek nyomtatott változatai és az elektronikus adathordozón benyújtott tartalmak (szöveg és ábrák) mindenben megegyeznek.

3. A doktori értekezés szerzőjeként hozzájárulok a doktori értekezés és a tézisek szövegének plágiumkereső adatbázisba helyezéséhez és plágiumellenőrző vizsgálatok lefuttatásához.

Kelt: **Budapest, 2019. február 19.**

.....  
a doktori értekezés szerzőjének aláírása

\*ELTE SZMSZ SZMR 12. sz. melléklet