

dc_1980_21
dc_1980_21

Az NMR spektroszkópia sokszínűsége
fehérjék és kismolekulák világában

Bodor Andrea

MTA doktori értekezés tézisei



ELTE
EÖTVÖS LORÁND
TUDOMÁNYEGYETEM

Eötvös Loránd Tudományegyetem

Kémiai Intézet

2022

dc_1980_21

Bevezetés, célkitűzések

A mágneses magrezonancia, vagy NMR (Nuclear Magnetic Resonance) spektroszkópia napjainkra számos tudományterületen elterjedt technikává nőtte ki magát. A kezdeti fizikai, szerves kémiai alkalmazásokon túl fontos eszköze lett szerkezeti biológiai, gyógyszeripari kutatásoknak, és egyaránt jelen van környezetkémiai, élelmiszeripari, minőség-ellenőrzési alkalmazásokban is. Minden területen a megfelelően megválasztott mérési módszer, annak beállítása, fejlesztése, és az eredmények szakszerű kiértékelése már önmagában is nagy feladatot jelent, ahol a legjobb válasz megtalálásához szükség van az NMR spektroszkópus szakértelemére.

A természettudományos kutatások fontos mérföldkövei közé tartozik a biológiai rendszerek működésének, a betegségek kialakulásának megértése; lehetséges gyógymódok keresése; hatóanyag molekulák tesztelése. A modern gyógyszerkutatás fő iránya a célzott terápia, melynek leggyakoribb gyógyszer-célpontjai a fehérjék. A klasszikus globuláris rendszerek mellett ma már a figyelem a másodlagos, harmadlagos szerkezettel nem bíró rendezetlen fehérjék (IDP – Intrinsically Disordered Protein) fele is irányul. Mindezen biomolekulák jellemzése *in vitro* körülmények mellett elengedhetetlen, és az NMR spektroszkópiának ezen a téren kiemelt szerep jut. A módszer lehetőségeit tekintve két módon is tud információt szolgáltatni: *globálisan* jellemzi a teljes molekulát – például a hidrodinamikai paramétereken keresztül, és *lokálisan* atomi szinten jellemzi az adott környezetet. Ez utóbbi jelenti a nagy előnyét, hiszen az oldatfázisú mérések nem csak szerkezeti szempontból, de dinamikailag, az oldatbeli mozgások elemzésével is képes a rendszer leírását szolgáltatni. Az így kapott információk közelebb visznek a fehérje működésének megértéséhez és kulcsfontosságú ismeretek a fehérje-kismolekula, fehérje-fehérje, illetve fehérje-membrán kölcsönhatások jellemzése szempontjából.

Mindemellett napjaink fontos kérdései közé tartozik a fosszilis üzemanyagok helyettesítése és a környezetszennyezés csökkentése is. Nagy erőfeszítéseket tesznek megoldások keresésére, melyek során az alap kutatásoknak is kitüntetett szerep jut. A komplex kérdéskörök megválaszolása ebben az esetben sem korlátozódik feltétlenül egy tudományág kutatási területére. A biomasza átalakításának lehetőségeit megfelelő

modellvegyületek használatával, laboratóriumi körülmények között, NMR mérésekkel alátámasztott atomi szintű jellemzéssel lehet vizsgálni. A „zöldebb” oldószerek keresése és bevezetése esetén lényeges szempont, hogy a kémiai reakciók lejátszódása a szokásos oldószerekben tanúsított viselkedéssel azonos legyen. A reakciók mechanizmusának leírásához ismerni kell a képződött intermediereket, a katalizátor szerepét, hiszen ezen tudás birtokában lehet hatékonyabbá alakítani a rendszereket. Ilyen típusú kérdésekben, a nem szokványos NMR spektroszkópiai módszerek kiemelt szerepet játszhatnak.

Kutatásaim a felsorolt kérdésköröket érintették és elsősorban NMR spektroszkópusként több célt tartottam szem előtt. Egyfelől törekedtem arra, hogy általánosan is alkalmazható módszereket dolgozzak ki, másfelől próbálkoztam azzal, hogy egy adott területen jól bevált, rutinszerű méréseket hogyan lehetne más területen meghonosítani. Amennyiben adott biológiai rendszer megismerése a cél, hogyan lehet egy minél teljesebb jellemzést megadni, esetleg milyen új mérési módszereket érdemes használni, vagy kifejleszteni. Az NMR spektroszkópia nyújtotta egyedi lehetőségeket kihasználva olyan megoldásokat kerestem, amelyek viszonylag rövid mérési idő alatt biológiai rendszerekről információt szolgáltatnak, másfelől új mérési módszerek bevezetésével igyekeztem bővíteni a fehérjék viselkedésének megismerését. Amennyiben adott kérdések megválaszolására egy technika nyújtotta lehetőségek nem elegendőek és társ-módszereket kell alkalmazni, külön figyelmet fordítottam arra, hogy adott technikák milyen módon ötvözhetőek optimálisan. Ezeket szem előtt tartva az alábbi célokat fogalmaztam meg:

1. Az NMR spektroszkópia *globális* paramétereinek alkalmazhatóságát tekintve célul tűztem ki, hogy szisztematikusan elvégzett translációs diffúziós mérésekkel; megfelelően megválasztott, jól jellemzett globuláris és rendezetlen fehérjéket felhasználva empirikus *D-M* esetleg $r_{\text{H-N}}$ összefüggéseket határozzak meg. Olyan kérdésekre kerestem válaszokat, hogy vajon ilyen mérésekkel megkülönböztethetővé válnak-e a globuláris és rendezetlen fehérjék? A tipikus biomolekulás körülmények mellett alkalmazható-e a Stokes- Einstein egyenlet? Milyen alkalmazásai lehetnek ezen összefüggéseknek?

2. A rendezetlen fehérjék atomi szintű jellemzése elsősorban fiziológias körülmények mellett releváns. Ilyen vizsgálatoknál a jól bevált $^1\text{H}^{\text{N}}$ - detektálás mellett egyéb módszerek szükségesek. Elgondolásom szerint egy megoldást a $^1\text{H}^{\alpha}$ - detektált módszerek jelentenének, és első lépésben célul tűztem ki egy szelektív, mindkét dimenzióban a lehetséges maximális lecsatolást biztosító 2D korrelációs mérés megtervezését. Egy általánosságban bevezetendő új pulzus-szekvencia akkor lehet sikeres, ha a biológiai minta készítésekor nem kell a mintát D_2O -ban oldani, tehát a szekvenciának megfelelő vízelnyomást kell biztosítania, így az 5-10% D_2O tartalmú minták vizsgálatát lehetővé teszi.

3. A konformációs heterogenitáshoz nagymértékben hozzájárul prolin *cisz-transz* izomerek kimutatása a rendezetlen fehérjék viselkedésének megismerésének újabb lehetőségét rejti. Az akár kis mennyiségben jelenlevő izomerek egyértelmű azonosítására prolin szelektív pulzusszekvenciák tervezését tűztem célul, és modellrendszerként a p53TAD¹⁻⁶⁰ régióját választottam. Arról is meg szerettem volna győződni, hogy a $^1\text{H}^{\alpha}$ - detektált módszerek segítségével a kialakuló *cisz-transz* prolin egyensúlyt vajon egy prolin közelében történő posztranszlációs folyamat megzavarja-e és ezt sikerül-e kimutatni?

4. A *cisz-transz* prolin egyensúly kialakulásánál változó mennyiségben jelenlevő *cisz* izomer kialakulásának okait szerettem volna megvizsgálni. Az okok közül először is azt akartam körbejárni, vajon a prolin szomszédságában levő aminosavak természete hogyan befolyásolja a *cisz* izomer jelenlétét?

5. A funkcionális megismerés végett egy másik célom a rendezetlen a p53TAD¹⁻⁶⁰ régiójának szerkezeti hajlamainak és dinamikai viselkedésének megismerése volt, szabad, illetve S100A4 fehérjéhez kötött állapotban. Hogy lehet a kialakult komplexet jellemezni?

6. A metasztázis marker Ca^{2+} -kötő homodimer S100A4 fehérje egy másik partnere a miozin IIA fragmens. Ezen kölcsönhatás leírását tűztem ki célul, mindkét kötőpartner oldaláról vizsgálódva, olyan kérdésekre is választ keresve, hogyan és hol történik a rendezetlen-rendezett átalakulás? A szerkezeti és dinamikai információk fényében a Ca^{2+} - affinitás változásáról lehet-e következtetéseket levonni? A miozin coiled-coilok esetében milyen

jelentősége van a foszforilációnak, illetve az S100A4 kölcsönhatás felelős-e a filamentumok széteséséért?

7. A homodimer fehérjék témakörben olyan célokat is megfogalmaztam, vajon a dinein könnyű lánc (DLC) rendelkezik-e „kargó/kötő” tulajdonságokkal? A miozin Va szakasszal történő kölcsönhatása során lehet-e olyan körülményeket teremteni, hogy a két ekvivalens kötőzsebet különböző partner foglalja el, ez által lehetővé téve az ún. „kargó/kötő” szállítást? Detektálható-e a miozin Va esetében rendezetlen-rendezett átmenet, illetve vannak-e másodlagos kötőhelyek?

8. A tubulin polimerizáció promotor (TPPP25) fehérje irodalomban kevésbé ismert szerkezeti jellemzését tűztem ki célul, továbbá a fehérje funkcióinak feltérképezéséhez a GTPáz aktivitás, illetve a Zn^{2+} kötődés lehetőségeire szerettem volna rávilágítani.

9. NMR spektroszkópusként foglalkoztatott az a kérdés, vajon egyszerű ^{31}P NMR mérések segíthetnek-e a biológiai rendszerek viselkedésének leírásában? Egy jó példának mutatkozott a korábbi TPPP25 GTPáz aktivitás vizsgálata mellett a dUTPáz mechanizmusának feltérképezése Mg^{2+} fémion jelenlétében és hiányában. Ugyanakkor felmerült a kérdés, vajon kis mennyiségben jelen levő szennyező kimutatása, átalakítása, hogyan befolyásolja egy biológiai kölcsönhatás menetét?

10. Érdeklődve tanulmányozom a bicella membránmimetikumok és peptidek kölcsönhatását. Ebben a témakörben olyan kérdések megválaszolására vállalkoztam, mint: feszültségfüggő ioncsatorna szakaszok konkrét esetében a ^{13}C relaxációs mérések mit árulnak el a kettős rétegben való elhelyezkedésről? Milyen módszerrel dönthető el egyszerűen, hogy a peptid felületaktív, vagy transzmembrán elhelyezkedésű? Mit mondanak a ^{31}P NMR relaxációs vizsgálatok? Transzlációs diffúziós 1H NMR mérések és SAXS szórásgörbék alapján történő vizsgálatok tudnak-e erre érdemben válaszolni?

11. Izgalmas dolog az egyszerű, klasszikus NMR mérésekből lényeges következtetésekre jutni nem-szokványos körülmények mellett. „Zöldebb” szerves kémiai folyamatok vizsgálatában szerettem volna ezekre rávilágítani, így célul tűztem ki, vajon alkalmazható-e sikerrel a nagynyomású NMR technika biomassza átalakulás monitorizálására? A modellreakciók milyen módon játszódnak le ionos folyadékokban? Kis hőmérsékletű

mérésekkel hogyan lehet feltérképezni a reakció intermediereket, és megadható-e egy reakciómechanizmus?

Új tudományos eredmények

A külön-külön megfogalmazott célok elérése sikeresnek bizonyult. Az eredmények között egyaránt szerepelnek általános érvényű következtetések és rendszer specifikus információk is. Az elért új, tudományos eredményeket csapatmunka keretében értük el, a továbbiakban elsősorban a saját hozzájárulásom igyekszem ismertetni. A megfogalmazott tézispontok tématerületenként a következők:

1. Globális paraméterek alkalmazhatósága

1.1. Szisztematikusan elvégzett translációs diffúziós mérésekkel, megfelelően megválasztott, jól jellemzett globuláris és rendezetlen fehérjéket felhasználva empirikus D - M és r_H - N összefüggéseket állítottam fel (Dudás 2019). Megállapítottam, hogy a globuláris fehérjék viselkedése a gömbszimmetrikus alakú molekulák viselkedéséhez közeli, a rendezetlen fehérjék pedig a szintetikus polimerekhez hasonlóan viselkednek. A linearizált $\lg D - \lg M$ összefüggések bioanalitikai célokra, feltekeredés és aggregáció vizsgálatokban használhatóak. Igazoltam továbbá, hogy tipikus biomolekulás körülmények mellett a Stokes-Einstein egyenlet alkalmazható. A publikációra érkezett hivatkozásokból kitűnik, hogy az összefüggéseket széles körben használták fel: polimerek, kismolekulák, élelmiszerek, aggregáció és qNMR vizsgálatokban. Az elvégzett munka hagyott nyitott kérdéseket, melyekre azóta is folyó kutatásokban válaszokat kerestünk/keresünk. A közölt empirikus összefüggéseket 288 K-en állítottam fel, és felmerül a kérdés, vajon más hőmérsékleten ezek mennyire érvényesek? Kimutattuk, hogy megfelelő korrekciókkal (hőmérséklet, viszkozitás) az összefüggések 298 K-en is érvényesek, de a más körülményekre való átvitelnek a lehetőségét is taglaltuk. Utánajártunk, hogy az egyenletek letekeredés tanulmányokban alkalmazhatóak-e. Gyógyszeripari felhasználások tekintetében a hatóanyag – fehérje kölcsönhatások DMSO/víz elegyekben történő tanulmányozására a globális és lokális paraméterek változását elemeztük.

1.2. A translációs diffúziós együtthatóból levonható következtetések több biológiai rendszer esetében is értékes információt szolgáltattak. Sikeresen

alkalmaztam az S100A4 homodimer fehérje Ca^{2+} ion hatására történő alakváltozásának és rendezetlen farokrégiójának a fehérje kompaktságára való hatásának vizsgálatában. Továbbá a miozin coiled-coil letekeredésében, a filamentumok foszforiláció okozta szétesésében; micellák kritikus micella képződési koncentrációjának meghatározásában; bicella rendszerek oldatbeli összetételének jellemzésére és aggregációs számok megadásában (Dudás 2020b).

2. Új pulzusszekvenciák bevezetése

2.1 Elsősorban az IDP/IDR rendszerek atomi szintű vizsgálatára kidolgoztam és bevezettem a szelektív $\text{H}\alpha$ - $\text{C}\alpha$ korrelációs SHACA – HSQC mérést. Az új $^1\text{H}^\alpha$ - detektált pulzusszekvencia mindkét dimenzióban a lehetséges maximális lecsatolást biztosítja, adatgyűjtés alatt az általunk korábban bevezetett BASEREX homo- és heteronukleáris lecsatolást tartalmazza. A SHACA – HSQC teljesítőképességét a sok prolin aminosavat tartalmazó p53TAD¹⁻⁶⁰ és a több ismétlődő motívummal rendelkező AS rendezetlen fehérjéken, valamint a globuláris ubikvitinen teszteltem. Igazoltam, hogy kiváló felbontás és érzékenység érhető el, és más, IDP rendszerek és prolin kimutatására használatos ^{13}C - detektált CON méréshez képest a mérési idő lényegesen rövidebb. További nagy előny, hogy fiziológiás körülmények mellett 5-10% D_2O tartalmú mintákkal lehet dolgozni. A mérés globuláris fehérjék esetében 100 aminosav méretű rendszerekig alkalmazható sikerrel, ennél nagyobb molekuláknál a homonukleáris lecsatolás már nem jár intenzitás növekedéssel. Ilyen kitétel a rendezetlen fehérjékre nem vonatkozik (Bodor 2020).

A felsorolt tulajdonságok alapján a SHACA-HSQC a $^1\text{H}^\alpha$ - detektált mérések referencia spektrumává válhat, beépíthető a 3D típusú mérésekbe, így az IDP rendszerek tanulmányozásában újabb fogódzót jelenthet. Saját kutatásainkban a mérést több fehérjén is sikerrel teszteltem, például a 105 aminosav hosszúságú EZH2 rendezetlen fehérjén, illetve szerencsésen beépíthető volt egy prolin szelektív 3D pulzus szekvenciába (Sebák 2022). A 2D mérés számos további alkalmazása lehetséges: biokémiai, farmakológiai célokra, poszttranszlációs módosulatok változásának követésére, metabolikus útvonalak követésére. Mi jó eredményekkel használtuk a foszforiláció okozta változások monitorizálására.

2.2. A rendezetlen fehérjékben a prolin aminosav egyaránt előfordulhat *cisz-* és *transz-* izomer formájában. Jellegzetesen - de nem kizárólagosan - a spektrumban detektálható minor forma *cisz* állapotú. A két izomer biológiai funkcióban betöltött szerepe különböző lehet, ezért még hangsúlyosabban tevődik fel a kérdés, hogy a megjelenő forma melyik izomerhez tartozik. Az NMR mérés egyértelmű választ tud adni, amennyiben sikerül a prolin oldalláncának C β és C γ kémiai eltolódásait meghatározni, ugyanis ezek különbsége árulkodik az izomer típusáról. E célból két prolin szelektív, $^1\text{H}^\alpha$ - detektált, 3D-mérést vezettem be. A 3D Pro-(HCA)NCACBHA során detektált korrelációkból: H α – (C α , C β) és H δ – (C δ , C γ), a teljes prolin szénváz meghatározható. Hátránya, hogy a koherencia útvonal hosszú, ami érzékenység csökkenést jelent és a számunkra érdekes kémiai eltolódások nem direkt korreláltak. Ezen kedvezőtlen tulajdonságokat küszöböli ki a 3D-Pro(H)CBCGCAHA pulzusszekvencia, ami kis számú, a maximálisan optimált transzfer lépéseknek köszönhetően nagy érzékenységű, és a SHACA-HSQC megoldás kapcsán 3D méréstől szokatlan módon, igény szerint, elfogadható mérési idő alatt nagy felbontással is futtatható. A méréseket sikerrel teszteltem a p53TAD¹⁻⁶⁰ esetében, megállapítva, hogy a 10 fő, major prolin jel *transz* állapotú, illetve először sikerült 13 minor prolin jelet is jellemezni, melyek nagyrésze *cisz* izomer. Utánajártam, hogy a CK2 enzim hatására a Ser46 foszforilációja a Pro47 *cisz-transz* egyensúly eltolódását vonja maga után, a minor *cisz* prolin jele detektálási határ alá csökken. Ez a megállapítás a p53TAD¹⁻⁶⁰ partnereivel való kölcsönhatás leírásában igen fontos lehet.

A bevezetett mérések általánosan, bármely prolin környezet meghatározására alkalmazhatók, a kidolgozott módszer pedig a releváns prolin *cisz-transz* egyensúlyok vizsgálatát teszi lehetővé, ami más módszerekkel sokkal idő- és pénzigényesebb. Jelenleg is folyó kutatásainkban az EZH2 és a p53TAD¹⁻¹⁰⁰ prolin gazdag szakasszal hosszabbított rendezetlen fehérjék jellemzésében használjuk sikerrel izomerek meghatározására (Sebák 2022).

2.3. A prolin *cisz* izomer változó, 3-15% arányban jelenik meg, ennek egyik oka a szomszédságában jelen levő aminosavak természete. Ebből a feltevésből kiindulva összegyűjtöttem az irodalomban megtalálható azon IDP-eket, ahol a *cisz* izomerek kísérletileg meghatározott mennyiségét megadták. A rendelkezésre álló 11 rendezetlen fehérje 101 prolin $i\pm 3$ környezetében

található 595 aminosav statisztikus elemzését végeztem el, úgy, hogy az aminosavakat az oldalláncok típusa szerint 7 csoportba soroltam. Az elemzés során több szabályszerűség is megfogalmazható, így: (i) kis, <5%, *cisz*-Pro tartalom esetében az Arg és Lys aminosavak szignifikánsan többször fordulnak elő, elsősorban az $i-3$, $i-1$, $i+1$ és $i+2$ pozíciókban. Nem meglepő, hiszen ezen oldalláncoknak a prolin karbonil csoportjával történő kölcsönhatása inkább a *transz*-Pro izomer kialakulásának kedvez. (ii) >5% *cisz*-prolint tartalmazó szekvenciákban a Pro aminosav szignifikánsan gyakrabban fordul elő, elsősorban az $i-3$, $i+2$ és $i+3$ pozíciókban. Ez a poliprolin II szerkezeti elemekben megtalálható Pro-X-X-Pro és Pro-X-Pro motívumok jelenlétével magyarázható, mivel a ± 3 pozíciókban lévő prolinok stabilizálják a PPII struktúrákat. Az $i+1$ pozícióban található Pro szintén kedvező, ez azt is jelenti, hogy a *cisz*-Pro-*transz*-Pro motívumok a *transz*-Pro-*cisz*-Pro elrendeződésnél gyakoribbak. Továbbá szignifikánsan nagyobb az elektronban gazdag oldalláncok gyakorisága. Így az $i-2$ pozícióban a negatív, $i-1$ -ben a poláris és az aromás, $i+2$ -ben szintén az aromás oldalláncok a kedvezményezettek. Szignifikánsan kevesebb található viszont a pozitív töltésű aminosavakból, elsősorban az $i-1$, $i+1$ és $i+3$ pozíciókban. A szabályszerűségek jórésze a p53TAD¹⁻⁶⁰ esetében érvényes, továbbá jelenleg is folyó kutatásokban pontmutációk bevezetésével ezek helytállóságát a gyakorlatban is ellenőrizzük. Kis peptidek esetében a megfigyelések érvényesnek bizonyultak. A felállított adathalmaz folyamatos bővüléséhez az ismertett mérési módszerek is hozzájárulnak, és remélhetőleg ez a növekedő adatbázis eljut majd oda, hogy adott rendezetlen fehérje *cisz/transz*-Pro eloszlását megjósolja.

3. Adott fehérje jellemzése, kölcsönhatások, kinetikai vizsgálatok

3.1. Elvégeztem a p53TAD¹⁻⁶⁰ doménjének szerkezeti és dinamikai vizsgálatát, megállapítottam, hogy a TAD1 régióban található F19-K24 szakasz tranziens helikális jellegű, a TAD2 szakasz M40-44 és S46-W53 részein lehet nagyon enyhe helicitást észlelni. A relaxációs adatok redukált spektrális sűrűség analízis szerinti elemzése összhangban van ezekkel a megállapításokkal, és igazolja a transzaktívációs domén rendezetlen jellegét. S100A4 fehérjével 1:1 arányú, stabil komplex képződik. A kémiai eltolódás vizsgálatokat itt is alátámasztják a dinamikai eredmények, mind azt mutatják, hogy a hosszú, mobilis N-terminális (M1-Q16) és a rövid, mobilis C-terminális (E56-P60)

szakaszok a kölcsönhatásban nem vesznek részt. Három helikális szakasz alakul ki: a TAD1-ben a T18-N29, a TAD1-TAD2 összekötésében a P36-P47 és a TAD2-ben található I50-T55, ezeket dinamikus régiók kötik össze. A komplexben a p53TAD¹⁻⁶⁰ szerkezete hibrid NMR-MD módszerekkel adható meg, a TAD1 és TAD2 régiókban hélixek alakulnak ki; a fehérje többi része túlnyomórészt rendezetlen, mobilis marad, azaz úgynevezett „bolyhos” (fuzzy) komplexet képez. Az NMR-MD módszerek ötvözte sikeres megoldásnak bizonyul nehezen tanulmányozható, elsősorban rendezetlen fehérje komplexek szerkezeti modelljének és viselkedésének leírására. Olyan esetekben tanácsos ehhez a hibrid megoldáshoz nyúlni, amikor a kristályosítás nem járható út, illetve az NMR paraméterek is elég szerények egy érdemleges szerkezetszámolás elvégzéséhez (Dudás 2020a).

További kitekintésként elmondható, hogy az atomi szintű jellemzés és a most már elérhető szerkezeti modell lehetővé teszi a fehérje-fehérje kölcsönhatás (PPI) inhibitor molekulák tervezését, és S100A4 kötődés alapú bioszenzorok fejlesztését.

3.2. Tanulmányoztam a metasztázis marker Ca²⁺-kötő homodimer S100A4 fehérje és az MPT miozin IIA fragmens kölcsönhatását mindkét kötőpartner oldaláról. Igazoltam, hogy a 45 aminosav hosszú MPT szakasz szobahőmérsékleten rendezetlen, nem alakul ki a coiled-coil szerkezet. Továbbá, a kisebb hőmérsékleten detektálható preformált hélix jelenléte azt is jelenti, hogy az eredeti hosszúságú NMIIA kötődése során a coiled-coil szerkezet nem tekeredik le teljes mértékben. Az S100A4 oldaláról végzett vizsgálatok azt mutatják, hogy a fehérje homodimer jellege a kölcsönhatás során megszűnik, az A és B monomer láncok már nem ekvivalensek. Kémiai eltolódás és dinamikai vizsgálatok alapján a kötőrégióon kívül a dimer összetartozásáért felelős H1 hélix is változást mutat. Ennek magyarázata, hogy kötőpartner hiányában a molekula egy „lélegző” mozgást végez, amit a kölcsönhatás elfojt, a szerkezet stabilabbá válik. Ez a tulajdonság az S100 család több tagjánál is kimutatható. Az eredmények tükrében megkísértem a megnövekedett Ca²⁺ affinitást is megmagyarázni. A komplex legnagyobb valószínűséggel a target kötő és funkcionális feltekeredés modell szerint alakul ki. Ez egy konformációs szelekció típusú mechanizmus a zárt (apo-) és nyílt (Ca²⁺ kötött) állapotok között, ahol a kötőpartner az egyensúlyt nagymértékben a nyílt forma fele tolja el, dinamikai változásokat eredményezve. Ezt támasztja

alá az MPT kötődés hatására történő fehérjejerinc merevedése, amire a csökkent konformációs entrópia is utal, illetve a H1 hélix lassú mozgásának kölcsönhatás következtében történő megszűnése.

Az eredmények az oldatfázisú NMR vizsgálatok fontosságára is rávilágítanak. Más módszerrel a dinamikai folyamatok atomi szintű elemzése nem lehetséges, és az információ különösen értékes, hiszen ilyen ismeretek birtokában lehet olyan inhibitorokat tervezni, fejleszteni, melyek a fehérje – partner kölcsönhatás dinamikájának a változását is utánózni képesek, és nem csupán a szerkezeti aspektusokra figyelnek (Pálfy 2016).

3.3. Különböző hosszúságú NMIIA és NMIIB izoforma szakaszok szerkezeti és foszforiláció okozta változásait tanulmányoztam. Megállapítottam, hogy az NMII filamentumok szétesésének és összeállásának szabályozása az NMIIA esetében az S100 fehérjékkel – ezek közül is elsősorban az S100A4-gyel – történő kölcsönhatás, míg az NMIIB izoformánál a foszforiláció következtében történik meg. Így egyfelől sikerült kísérleti bizonyítékokkal alátámasztani azt a feltételezést, hogy a filamentum szétesés izoforma specifikus reguláció szerint történik; illetve megcáfoltuk a nagy szerkezeti változást javasoló elméleteket (Ecsédi 2018).

3.4. A homodimer dinein könnyű lánc (DLC) és miozin Va szakasz kölcsönhatásának vizsgálata során kimutattam, hogy a szabad állapotban rendezetlen miozin peptid kötődéskor β -redő szerkezetet vesz fel, ebben az esetben is alátámasztva a rendezetlen – rendezett átalakulást. A kanonikus pozícióban Gln helyett Met aminosavat tartalmazó miozin más kötőpartnerekhez hasonlóan kötődik a DLC-hez. Speciális ^1H , ^{15}N -HSQC és ^1H , ^{13}C -CT-HSQC detektált STD mérésekkel kimutattam, hogy a kötőárkon túlnyúló szakaszok hidrofób kölcsönhatásokban vesznek részt. Ez a viselkedés a molekuláris „ragasztó” elméletet támasztja alá és a *cc* szakaszok dimerizációjának stabilizálására mutat rá. A DLC két kötőárkának „kargó/kötő” funkciója nem igazolható ebben az esetben sem, viszont azt sikerült kimutatnom, hogy 50%-os telítettségénél a két kötőárk aszimmetrikussá válik, ám a második peptid bekötődése a szimmetriát helyreállítja (Bodor 2016, Hódi 2004).

3.5. Elsőként sikerült igazolnom, hogy az agy-specifikus tubulin polimerizációt segítő TPPP/p25 fehérje hosszú rendezetlen terminális

szakaszokkal rendelkezik, a szerkezettel bíró régió az NMR spektrumban molten globulaként jelenik meg, ezen aminosavak jelazonosítása nem lehetséges. A fehérje AlphaFold által megadott szerkezeténél az általam leírt rendezetlenségi információkra támaszkodtak. A fehérje funkcióinak feltérképezéséhez vizsgáltam GTP kötő funkcióját, és lehetséges GTPáz aktivitását. Mg^{2+} jelenlétében a GTP hidrolízis ^{31}P spektrumokkal való követése a k_{cat} érték kiszámítását eredményezte. Megállapítható, hogy a TPPP/p25 a kis G fehérjékéhez (Rac1, H-Ras, Rap1A, Ran) hasonló GTPáz aktivitást mutat. Továbbá igazoltam, hogy ezt az aktivitást a Zn^{2+} kationok enyhén gátolják (Zotter 2011a, Zotter 2011b).

3.6. A dUTP Mason-Pfizer majom retrovírus (MPMV) dUTPáz jelenlétében történő hidrolízis mechanizmusát és a Mg^{2+} kofaktor jelentőségét vizsgáltam. ^{31}P NMR mérések kiértékelésével igazoltam, hogy a Mg^{2+} jelenlétében történő hidrolízis során a nukleofil támadás az α foszfor atomon történik, és a folyamatra jellemző k_{cat} pszeudo-elsőrendű állandó más dUTPáz által katalizált folyamatokhoz hasonló értéket ad. Az asszociatív mechanizmust kinetikus krisztallográfiai felvételek igazolták. A fémion hiányában a hidrolízis lassabban megy végbe és az elemzés azt mutatja, hogy ebben az esetben a nukleofil támadás a β foszfor atomon történik. Az eredmények a fémion kofaktor enzimatikus foszfát észter hidrolízisben betöltött szokatlan szerepére világítanak rá, amivel ezek szerint érdemes számolni.

Az említett hidrolízis vizsgálatok egyértelműen tükrözik a pH, a közeg, és a fémion - koordináció szerepét. Ezekre egyszerű ^{31}P mérésekkel lehet rámutatni, a mérések érzékenysége a kinetikai folyamatok leírásán túlmenően megengedi a nagy jelek mellett jelen levő szennyezők kimutatását, azonosítását (Barabás 2013, Gyimesi 2008).

4. Membránmimetikumok jellemzése, peptid-bicella rendszerek

4.1. PC bicella, illetve DHPC micella és két feszültség függő K^+ csatorna transzmembrán régiójának kölcsönhatását vizsgáltam ^{13}C relaxációs mérésekkel, több térerőn. A bicella esetében a relaxációs paraméterek értékelése a szabad bicella, és a peptid-bicella rendszerekben egyaránt azt mutatja, hogy az acil lánc mentén a terminális vég fele haladva nő a mozgékonyság (csökkenő rendparaméterek), és gyorsul a lokális mozgás (csökkenő τ_{local} értékek). Annak ellenére, hogy minimálisak az eltérések,

mindkét fehérje jelenléte hatással van a DMPC lipid dinamikájára. A lipid fejsoporthoz legközelebb álló 2, de leginkább 3 környezetek nagyobb rendparaméterekkel, és szignifikánsan nagyobb korrelációs időkkal rendelkeznek, ami arra utal, hogy a peptid jelenléte csökkenti a lánc mobilitását. A terminális végen található 12 és 13 környezetekre ugyanez jellemző. Mindkét peptid nagy valószínűséggel a kettős rétegbe épült be, és az acil lánc fejsoporthoz legközelebbi részeinek mobilitását csökkenti. A mérések egyszerűek, a kiértékeléseknél ugyan több megközelítéssel kell élni, de az eljárást bármely membrán mimetikum rendszer vizsgálatára lehet használni (Biverstahl, 2009).

4.2. ^{31}P NMR spektroszkópiai méréseken alapuló egyszerű és rutinszerűen alkalmazható eljárást próbáltam kidolgozni annak eldöntésére, hogy a peptid felületaktív, vagy transzmembrán-e? Két ismert topológiájú rendszer hőmérséklet- és térerő függő relaxációs méréseit végeztem el. A T_1 mérések alapján megállapítottam, hogy a felületaktív peptid nagyobb hatással van a lipid dinamikájára, mint a transzmembrán peptid. Feltételezve, hogy a közeg izotróp és a mozgás egyetlen τ_c korrelációs idővel írható le, az Arrhenius típusú hőmérsékletfüggéséből a foszfát csoportnak a glicerol gerincéhez képest történő reorientációs aktiválási energiáját határoztam meg. A reorientációs aktiválási energia értékek a DHPC molekulára nagyobbak, mint a DMPC-re, ami a bicella felépítésében betöltött különböző szerepüknek lehet köszönhető. A transzmembrán peptid hatására aktiválási energia keveset változik és csökkenő tendenciát mutat, a felületaktív peptid hatására a változás jelentősebb és növekszik. Korábbi vizsgálatok más, hosszabb szénlánccal rendelkező bicellákra hasonló reorientációs energia értéket közölnek. Ami a T_2 relaxációs időre gyakorolt hatást illeti, azt mutattam ki, hogy a transzmembrán peptid esetén sokkal nagyobb az effektus. Ugyan kvantitatív következtetés nem vonható le, de az NMR és DLS eredmények is egyértelműen méretnövekedést, esetleges morfológiai változásokat mutatnak a transzmembrán peptid beépülésének hatására. A ^{31}P relaxációs értékek meghatározása lehet tehát egy módszer a fehérje-membrán kölcsönhatás topologikus vizsgálatára. Ugyanakkor szükség van újabb és újabb rendszerekre, hogy a modellpeptidekre megfogalmazott állításokat igazolni lehessen (Bodor 2015).

4.3. Utánajártam korábbi saját és irodalmi megállapításoknak, mely szerint bicella-peptid kölcsönhatás következménye a bicella méret- és/vagy

alakváltozása. Ismételten modell peptideket használva, ugyanazon mintán, azonos kísérleti körülmények között felvett NMR spektrumok és SAXS szórásgörbék értékelését végeztük el. Megállapítottam, hogy a translációs diffúziós ^1H NMR mérések kiválóan jelentenek a bicella oldatok pontos összetételéről, sőt, a lehetséges aggregációs számokról. A transzmembrán peptid hozzáadása a PC és a PC/PG bicella méretnövekedésével jár együtt, ezzel szemben a felületaktív molekula jelenléte nem okoz szignifikáns növekedést. A SAXS szórásgörbe illesztésére a mag – héj modell sikerességét igazoltuk. A modell illesztése során a bicella alakjára tudunk következtetni, és a tengelyek értékéből kísérleti úton meghatározott Perrin faktorokat tudunk meghatározni. A transzmembrán peptid jelenléte az oblat alakú PC bicellák hosszabb tengelyének növekedését okozzák, ami összhangban van a peptid kettősrétegbe történő beékelődésével. Felületaktív peptideknél – elvárható módon – ez a hatás nem detektálható. A két technika (NMR és SAXS) ötvözése valóban alkalmas bicella rendszerek méret- és alak-meghatározásának leírására, és az elért biztató eredmények valós rendszereken való tesztelését követően a membránmimetikum- fehérje kölcsönhatások biofizikai leírása pontosabban történhet, és a funkcionális vizsgálatokhoz jobb modellrendszerek tervezhetők (Dudás 2020b).

5. Környezeti és ipari szempontból fontos kémiai reakciók vizsgálata

5.1. A fosszilis üzemanyagokhoz való hozzáférés korlátozása, ezek egyre emelkedő ára azt eredményezi, hogy más, ígéretes lehetőségek után kell nézni. Kutásainkban a biomassza átalakításának lehetőségét vizsgáltuk. Szacharóz modellrendszert alkalmazva homogén és heterogén katalitikus reakciók megfelelő kombinációjával sikerült egyre kevesebb oxigént tartalmazó C_5 -oxigenátokat (levulinsav, GVL, 1,4-butándiol, 2-metil-THF) és alkének keverékét előállítani. A komponenseket egyszerű, klasszikus NMR technikákkal, de nem-szokványos körülmények mellett, nagynyomású mérésekkel mutattam ki. A kísérletek igazolták, hogy a biomassza átalakítása lehetséges, gazdasági szempontból pedig elsősorban a GVL biomasszából történő előállítása jelenthet mérföldkövet (Mehdi 2008).

5.2. A szerves oldószerek lecserélésének lehetőségét jelenthetik a barátságosabb, „zöldebb” oldószerek, és az ionos folyadékok jó jelölteknek számítanak. Kutásaim során 1-etil-3-metil-imidazólium-

trifluorometánszulfonát [C₂mim][TfO] közegben vizsgáltam a benzil alkohol cérium (IV) só által mediált oxidációjának lejátszódását. Ebben az esetben is rutin NMR mérésekkel, viszont szelektíven jelölt benzil alkohol használatával igazoltam, hogy az átalakulás a száraz ionos folyadékokban kvantitatívan lejátszódik, és sikerült azt is igazolni, hogy a reakció során képződő NO₂ gáz mennyisége nagymértékben befolyásolható a CAN/ionos folyadék arány beállításával (Mehdi 2007).

5.3. Sikeresen megadtam az izocianátok foszfin katalizált ciklooligomerizációjának molekuláris szintű jellemzését, -70°C-on történő mérésekkel igazoltam a képződő intermedierek szerkezetét. Az általam bemutatott hőmérsékletfüggő NMR mérések és a szelektív izotópjelölés együttes alkalmazása az a módszer, ami egy organokatalitikus ipari folyamat reakciómechanizmusának leírását és a kialakult intermedier azonosítását eredményezi. Tágabb értelemben ilyen információk birtokában lehet új katalizátorok tervezésébe fogni, ami a reakció finomhangolását és egy adott termék irányába történő eltolást eredményezheti (Pusztai 2005).

A felsorolt területeken végzett kutatások kétségkívül erőfeszítést igényelnek, hiszen több szempontból is igazolni kell azt, hogy például egy ionos folyadék megfelelő közeg-e adott reakció futtatásánál. Arra azonban nincs rálátásom, hogy egy iparilag jól bevált, nagy profitot termelő folyamat esetében az oldószercseréje a gyakorlatban valóban meg is történik-e, és ha igen, hogyan. Másfelől, a szerves kémiai folyamat tökéletesítése érdekében az alkalmazott katalizátorok cseréje vagy egy adott típus továbbiakban történő alkalmazása – főleg a reakciómechanizmus tudatában – hamarabb megvalósulhat.

Összefoglalásként elmondható, hogy az itt felsorolt módszerek, kiértékelések és megközelítések nagyszerűen tükrözik azt, hogy az NMR spektroszkópia milyen szerteágazóan tud biomolekulák és kismolekulák vizsgálata során a legkülönbözőbb felvetésekre is választ adni. Ez a kutatómunka sokszínű, számos kihívás elé állított és állít, miközben lehetőségem nyílt több tudományterülettel is megismerkedni. Ez a sokféleség segített abban, hogy ne csak a konkrét rendszerekre koncentráljak, hanem próbáljak meg általános érvényű megfogalmazásokat is tenni, és az alkalmazások körét tágítsam. A feltett kérdésekre adott válaszok közelebb visznek a rendszerek, mint egész működésének és viselkedésének

megértéséhez. A több területen elért eredmények összegzése válhat hasznosítható tudássá, legyen szó akár gyógyszertervezésről, akár a környezeti szennyezés csökkentéséről.

Az értekezés alapját képező közlemények

1. Barabás O, Németh V, **Bodor A**, Perczel A, Rosta E, Kele Z, Zagyva I, Szabadka Z, Grolmusz VI, Wilmanns M, Vértessy BG. (2013) Catalytic mechanism of α -phosphate attack in dUTPase is revealed by X-ray crystallographic snapshots of distinct intermediates, 31P-NMR spectroscopy and reaction path modelling. *Nucleic Acids Res*, 41: 10542-10555.
2. **Bodor A**, Haller JD, Bouguechtouli C, Theillet FX, Nyitray L, Luy B. (2020) Power of Pure Shift H α C α Correlations: A Way to Characterize Biomolecules under Physiological Conditions. *Anal Chem*, 92: 12423-12428.
3. **Bodor A**, Radnai L, Hetényi C, Rapali P, Láng A, Kövér KE, Perczel A, Wahlgren WY, Katona G, Nyitray L. (2014) DYNLL2 dynein light chain binds to an extended linear motif of myosin 5a tail that has structural plasticity. *Biochemistry*, 53: 7107-7122.
4. **Bodor A**, Kövér KE, Mäler L. (2015) Membrane interactions in small fast-tumbling bicelles as studied by 31P NMR. *Biochim Biophys Acta*, 1848: 760-766.
5. Biverstahl H, Lind J, **Bodor A**, Mäler L. (2009) Biophysical studies of the membrane location of the voltage-gated sensors in the HsapBK and KvAP K(+) channels. *Biochim Biophys Acta*, 1788: 1976-1986.
6. Dudás EF, Pálffy G, Menyhárd DK, Sebák F, Ecsédi P, Nyitray L, **Bodor A**. (2020a) Tumor-Suppressor p53TAD(1-60) Forms a Fuzzy Complex with Metastasis-Associated S100A4: Structural Insights and Dynamics by an NMR/MD Approach. *ChemBioChem*, 21: 3087-3095.
7. Dudás EF, Wacha A, Bóta A, **Bodor A**. (2020b) Peptide-bicelle interaction: Following variations in size and morphology by a combined NMR-SAXS approach. *Biochim Biophys Acta*, 1862.

8. Dudás EF, **Bodor A.** (2019) Quantitative, Diffusion NMR Based Analytical Tool To Distinguish Folded, Disordered, and Denatured Biomolecules. *Anal Chem*, 91: 4929–4933.
9. 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: 14850-14867.
10. Gyimesi M, Kintses B, **Bodor A**, Perczel A, Fischer S, Bagshaw CR, Málnási-Csizmadia A. (2008) The mechanism of the reverse recovery step, phosphate release, and actin activation of Dictyostelium myosin II. *J Biol Chem*, 283: 8153-8163.
11. Hódi Z, Németh AL, Radnai L, Hetényi C, Schlett K, **Bodor A**, Perczel A, Nyitray L. (2006) Alternatively spliced exon B of myosin Va is essential for binding the tail-associated light chain shared by dynein. *Biochemistry*, 45: 12582-12595.
12. Mehdi H, **Bodor A**, Lantos D, Horváth IT, De Vos DE, Binnemans K. (2007) Imidazolium ionic liquids as solvents for cerium(IV)-mediated oxidation reactions. *J Org Chem*, 72: 517-524.
13. Mehdi H, Fábos V, Tuba R, **Bodor A**, Mika LT, Horváth IT. (2008) Integration of Homogeneous and Heterogeneous Catalytic Processes for a Multi-step Conversion of Biomass: From Sucrose to Levulinic Acid, γ -Valerolactone, 1,4-Pentanediol, 2-Methyl-tetrahydrofuran, and Alkanes. *Top Catal*, 48: 49-54.
14. 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: 1829-1838.
15. Pusztai Z, Vlád G, **Bodor A**, Horváth IT, Laas HJ, Halpaap R, Richter FU. (2005) In situ NMR spectroscopic observation of a catalytic intermediate in phosphine-catalyzed cyclo-oligomerization of isocyanates. *Angew Chem Int Ed Engl*, 45: 107-110.

16. Sebák F, Ecsédi P, Bermel W, Luy B, Nyitray L, **Bodor A.** (2022) Selective (1)H(α) NMR Methods Reveal Functionally Relevant Proline cis/trans Isomers in Intrinsically Disordered Proteins: Characterization of Minor Forms, Effects of Phosphorylation, and Occurrence in Proteome. *Angew Chem Int Ed Engl*, 61: e202108361.
17. Zotter Á*, **Bodor A***, Oláh J, Hlavanda E, Orosz F, Perczel A, Ovádi J. (2011a) Disordered TPPP/p25 binds GTP and displays Mg²⁺-dependent GTPase activity. *FEBS Lett*, 585: 803-808.
18. Zotter Á, Oláh J, Hlavanda E, **Bodor A**, Perczel A, Szigeti K, Fidy J, Ovádi J. (2011b) Zn²⁺-induced rearrangement of the disordered TPPP/p25 affects its microtubule assembly and GTPase activity. *Biochemistry*, 50: 9568-9578.