

XXXI. Országos Tudományos Diákköri Konferencia

— Kémiai és Vegyipari Szekció —

DUDÁS ERIKA

Vegyész MSc I. évfolyam

**Rendezetlen fehérjefragmensek
NMR spektroszkópiai vizsgálata:
másodlagos kémiai eltolódások
és transzlációs diffúzió**

Témavezető:

Dr. Bodor Andrea
egyetemi adjunktus

ELTE Analitikai Kémiai Tanszék

2012



E ö t v ö s L o r á n d
Tudományegyetem
Természettudományi Kar

Tartalomjegyzék

Rövidítésjegyzék.....	3
1. Bevezetés	4
2. Irodalmi háttér.....	5
2.1. A szerkezet-funkció nézet fejlődése és megdöntése.....	5
2.2. A rendezetlen fehérjék jellemzői és jelentőségük.....	6
2.3. A MAPK rendszer	10
3. Elméleti háttér	12
3.1. Homonukleáris 2D NMR mérések.....	12
3.2. Heteronukleáris 2D NMR mérések.....	16
3.3. A rendezetlenséget jellemző NMR paraméterek	17
3.4. Rendezetlen fehérjék spektrumainak asszignációja.....	18
4. Célkitűzések.....	22
5. Alkalmazott módszerek.....	24
5.1. A rendezetlenség in silico predikciója	24
5.2. CD mérések	24
5.3. NMR mérések.....	25
6. Eredmények és következtetések.....	27
6.1. Rendezetlenség in silico predikciója	27
6.2. CD spektroszkópia.....	28
6.3. NMR spektroszkópia	30
6.3.1. Mérések vizes oldatban.....	30
6.3.2. Mérések denaturáló közegben	37
6.3.3. Transzlációs diffúziós mérések.....	41
7. Összefoglalás.....	45
8. Köszönetnyilvánítás.....	46
9. Függelék	47
10. Irodalomjegyzék.....	52

Rövidítések

ALS	amiotróp laterális szklerózis (Amyotrophic Lateral Sclerosis)
COSY	korrelációs spektroszkópia (CORrelation SpectroscopY)
DOSY	Diffusion Ordered Spectroscopy
ERK	extracelluláris szignál-regulált kináz (Extracellular signal-Regulated protein Kinases)
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
JNK	c-Jun N-terminális kináz (Jun N-terminal Kinase)
MAPK	mitogén aktivált fehérjekináz (Mitogen Activated Protein Kinase)
MAPKAPK	mitogén aktivált fehérjekináz aktivált fehérjekináz (Mitogen Activated Protein Kinase Activated Protein Kinase)
MK	MAPK-aktivált fehérjekináz (MAPK Activated Protein Kinase)
MNK	MAPK interakciós kináz (MAPK Interacting Kinase)
NFAT	aktivált T-sejt nukleáris faktora (Nuclear Factors of Activated T-cells)
NOE	mag-Overhauser-hatás (Nuclear Overhauser Effect)
NOESY	mag-Overhauser-spektroszkópia (Nuclear Overhauser Effect SpectroscopY)
PFG	Pulsed Field Gradient
PGSE	Pulsed-Gradient Spin-Echo
RDC	reziduális dipoláris csatolás (Residual Dipolar Coupling)
RSK	p90 riboszomális S6 kináz (Ribosomal Protein S6)
SAXS	Small-Angle X-ray Scattering
TOCSY	teljes korrelációs spektroszkópia (TOtal Correlation SpectroscopY)

1. Bevezetés

A rendezetlen fehérjék (Intrinsically Disordered Proteins, IDP-k) nagy gyakorisággal fordulnak elő az élővilágban, jellemzésük azonban még meglehetősen hiányos. 10-15 évvel ezelőtt az ötlet, hogy egy fehérje 3D szerkezet nélkül is rendelkezhet specifikus funkcióval, nevetségesnek tűnhetett, ma azonban a rendezetlen fehérjék és régiók a modern fehérjetudomány egyik legérdekesebb és legvonzóbb kutatási területévé nőttek ki magukat.

Az elmúlt évtizedben bebizonyosodott, hogy a fehérjék jelentős hányada funkcionális formájában nem feltekeredett, mégis kulcsszerepet játszik számos sejt folyamatban, beleértve a szignálátadást (signaling), a sejt ciklus-szabályzást (cell cycle control), a molekuláris felismerést, a transzkripciót és a replikációt. A rendezetlen fehérjékhez köthető továbbá több neurodegeneratív betegség (pl. Alzheimer-kór, Parkinson-kór, Huntington-kór) és a rák bizonyos típusainak kialakulása is.

A rendezetlen fehérjék szerkezeti tulajdonságainak felderítésére számos módszer alkalmazható. Az aminosavak kapcsolódási sorrendjén alapuló becsléseket kaphatunk a különböző bioinformatikai szerkezetpredikciós eljárások (IUPred, PONDR, DisPred, stb.) segítségével. Sokféle oldatfázisú spektroszkópai módszer is felhasználható, beleértve a cirkuláris dikroizmust (CD), a fluoreszcens Fourier transzformációs infravörös és az elektron paramágneses rezonancia (EPR) spektroszkópiát, de két további technika kiemelkedően sok szerkezeti adatot szolgáltat: az egyik a kisszögű röntgenszórás (SAXS), a másik pedig a mágneses magrezonancia (NMR).

Munkánk során öt, a Mitogén Aktivált Fehérjekináz (MAPK) rendszerhez tartozó rendezetlen fehérjefragmens szerkezetét vizsgáltuk NMR spektroszkópia segítségével. Arra a kérdésre kerestük a választ, milyen szerkezeti okokra vezethetők vissza a rendszerben tapasztalt eltérő jellegű – specifikus és promiszkuus – kötődések. Vizsgálataink részét képezték még denaturáló közegű és transzlációs diffúziós mérések is.

A MAPK jelátviteli rendszer különféle kulcsfontosságú sejt folyamatokat (sejtnövekedés, sejtosztódás, stresszfolyamatok, sejthalál) szabályoz, emiatt nagy jelentőséggel bír, hogy minél több információt nyerjünk a rendszer felépítéséről, így tagjainak működéséről és szerkezetéről is.

2. Irodalmi háttér

2.1. A szerkezet-funkció nézet fejlődése és megdöntése

A fehérjék funkciója és szerkezete közti összefüggésekről alkotott nézeteink az elmúlt száz évben többször is módosultak. Először a szerkezet-funkció paradigma látott napvilágot és vált uralkodóvá. Fischer 1894-ben α - és β -glükózidok hidrolízisét vizsgálta invertáz és emulzin enzimek felhasználásával, és arra a következtetésre jutott, hogy az enzim és a cukor úgy illeszkednek egymáshoz, mint kulcs a zárba¹. 1936-ban Mirsky és Pauling megfigyelték, hogy a pepszin enzimaktivitása csökken a denaturációjával, illetve hogy sok natív fehérje a denaturáltakkal ellentétben kristályosítható. Arra a következtetésre jutottak, hogy a natív fehérjék egyik legfontosabb tulajdonsága a jól definiált szerkezet, míg a denaturált fehérjékre a szerkezet hiánya jellemző².

A következő évtizedben számos kísérletben vizsgálták a fehérjék denaturációját, és ezek a kísérletek alátámasztották a funkció-szerkezet nézetet.

1950-ben Karush arról számolt be, hogy a szérumban albumin ligandkötőhelyei nagyszámú, egymással egyensúlyban lévő, azonos energiájú konfigurációval rendelkeznek, amelyek közül a kölcsönhatás során a partner molekulához legjobban illeszkedő szerkezet stabilizálódik. Karush ezzel megjósolta a „konfigurációs alkalmazkodás” (configurational adaptability) jelenségét³, amit tőle függetlenül Koshland is megtett, de ő „indukált illeszkedés” (induced fit)-nek nevezte a folyamatot^{4,5}. Felvetődött az ötlet, hogy a fehérje csak egy szerkezeti változás után válik képessé a feladata ellátására.

Ennek első bizonyítéka egy 1978-as kísérlet lett, melynek során hexokináz enzim és glükóz kölcsönhatását vizsgálták, és azt találták, hogy a szubsztrát megkötése során a hexokináz doménjei nagymértékben elmozdultak⁶. Ez megfelel az indukált illeszkedésnek.

A kutatók arra is felfigyeltek, hogy a röntgenkristallográfiával vizsgált fehérjék egyes, fontos biológiai szereppel bíró szegmensei hiányoznak az elektronsűrűség-térképről, amit kezdetben kristályhibáknak vagy a nem megoldott fázisproblémának tulajdonítottak, később azonban bebizonyosodott, hogy ezek a szegmensek azért nem szórják a röntgensugarakat, mert helyzetük folyamatosan változik, tehát rendezetlenek.

1978-ban, ugyanabban az évben, mikor a röntgenkrisztallográfiával felfedezték a funkcionális rendezetlenséget, NMR-mérések után megállapították, hogy a hiszton H5 funkcionális vége rendezetlen⁷. A meglepetés erejével hatott azon funkcionális fehérjék felfedezése, melyek szerkezete teljes mértékben rendezetlen.

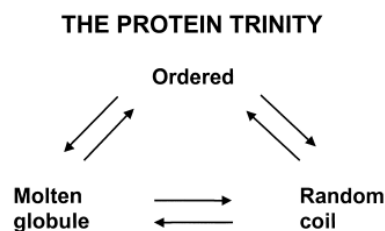
Az új fehérjetípust többféle elnevezéssel illették: hajlékony, mobilis, részben feltekeredett, natívan denaturált, natívan letekeredett, kaméleon, 4D, táncoló fehérje, stb., de a Dunker által megalkotott „belsőleg rendezetlen fehérje” kifejezés⁸ a többinél lényegesen elterjedtebbé vált.

A fehérjetudomány új területe, a rendezetlen fehérjéké tehát megdőntötte a szerkezet-funkció paradigmát, és rövid idő alatt az érdeklődés középpontjába került.

2.2. A rendezetlen fehérjék jellemzői és jelentőségük

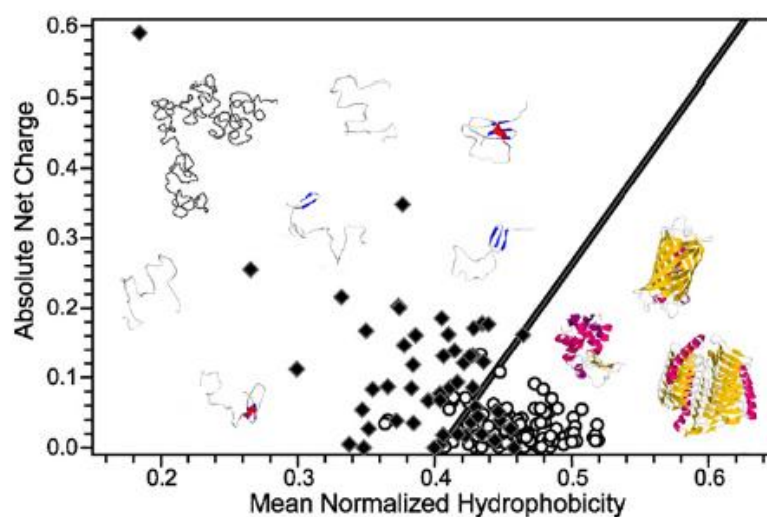
Uversky szerint a rendezetlen fehérjék története Hamupipőkééhez hasonlít: a szegény, árva lányt (az IDP-ket) mindaddig elnyomták és a háttérbe szorították, míg elő nem került a kis üvegcipellője (a biológiai szerep és az előfordulás gyakorisága), onnantól aztán egy csapásra az érdeklődés középpontjába került és rövid idő alatt nagy népszerűsége tette szert⁹.

Miben is különböznek ezek a nem hagyományos fehérjék a hagyományosaktól? Nem rendelkeznek másodlagos és harmadlagos szerkezettel, mégis fontos biológiai feladatokat látnak el. Dunker és munkatársai ezt figyelembe véve 2001-ben megalkották a „Fehérje Szentháromság” fogalmát, mely szerint a fehérjének három natív állapota is létezik, és a funkciója ezekből az állapotokból, illetve az állapotok közti átmenetekből származtatható. A három állapot: rendezett, „molten globule” és „random coil”¹⁰. Uversky 2002-ben javasolta a modell kibővítését egy negyedik állapottal, az ún. „pre-molten globule”-l¹¹.



1. ábra. A fehérjék három natív állapota, a nyilakkal jelölt átmenetekkel.

Az IDP-k további jellemzője az alacsony hidrofobicitás és a nagy nettó töltés. Előbbi okozza az esetükben tapasztalható csekély kompaktációs hajtóerőt, míg utóbbi az erős elektrosztatikus tasztításukat magyarázza. A 2. ábrán a hidrofobicitás - nettó töltés grafikonon jól látszik, hogy éles vonallal elkülöníthető a kompakt globuláris és a rendezetlen fehérjék régiója.



2. ábra. Az ún. Uversky-plot, mely a nettó töltést ábrázolja a hidrofobicitás függvényében. A vastag fekete vonal választja el a rendezetlen fehérjék régióját, mely a vonaltól balra található, illetve a kompakt globulárisakét, mely a vonaltól jobbra van.

A rendezetlenség a szekvenciában van kódolva. A rendezetlen fehérjékben gyakoriak az ún. „rendezetlenség-támogató” aminosavak: Arg, Gly, Gln, Ser, Glu, Lys, Pro; míg a „rendezettség-támogató” aminosavak - Ile, Leu, Val, Trp, Tyr, Phe, Cys, és Asn – csak kis mennyiségben fordulnak elő. Nagy mennyiségben tartalmaznak prolint, ami gátolja a másodlagos szerkezeti elemek létrejöttét.

Az első rendezetlen fehérjék szerkezetének meghatározása után valószínűtlennek tűnt, hogy nagy természetes gyakorisággal rendelkezzenek, a modern bioinformatikai kutatások szerint azonban az eukarióta fehérjék 25-30%-a többnyire rendezetlen és több mint felük hosszú rendezetlen régiókat tartalmaz¹². Az előfordulás ilyen mértékű gyakoriságából következnek a fontos biológiai feladatok.

Viselkedésük alapján az IDP-ket hat nagy funkcionális csoportba sorolták: asszemblerek, chaperonok, „display site”-ok, effektorok, entrópikus láncok, scavengerek^{13,14}, és huszonnyolcféle funkciót rendeltek hozzájuk¹⁵. Nagy specificitású, kis affinitású kölcsönhatásaik miatt fontos szereppel bírnak a szabályozási, felismerési és szignálátadási folyamatokban.

A fehérje kölcsönhatási hálózatokban elfoglalt központi helyük és fontos biológiai feladataik miatt közrejátszanak többféle betegség – rák, kardiovaszkuláris és neurodegeneratív betegségek, amiloidózis – kialakulásánál is. Erre a megállapításra épül a D² elmélet: „disorder in disorder”, vagyis a fehérjék rendezetlensége okozhatja az emberi szervezet rendellenes működését¹⁶.

A napjainkban is zajló kutatásoknak köszönhetően a rendezetlen fehérjék területén felgyorsult az átmenet, melynek során a kvalitatív megfigyelésekből kvantitatív szerkezeti modellek épülnek fel. Az átmenet legfontosabb alappillérei:

Fejlettebb bioinformatikai eszközök az IDP-k rendezetlenségének előrejelzéséhez. Az IDP-k funkciójának és/vagy funkcionális oldalainak előrejelzése nehéz feladat, az utóbbi időben azonban jelentős előrelépés történt e téren, mely azon a megfigyelésen alapszik, hogy az IDP-k kölcsönhatásait a lineáris motívumaik határozzák meg¹⁷. Mivel a lineáris motívumok 3-15 aminosav hosszúságúak, kevés szekvenciális információt hordoznak, és rendezetlenségük előrejelzése csupán a szekvencia alapján számos hibával terhelt. Az előrelépést e téren az olyan tartalomszűrők használatának kezdete jelentette, melyek figyelembe veszik a közös kölcsönható partnerrel vagy evolúciós múlttal rendelkező fehérjék motívumainak egyezését.

Szabad és kötött állapotbeli szerkezetük és dinamikájuk leírása egészen a molekuláris szintig. Számos megfigyelés támasztja alá, hogy az IDP fő feladata a kötődés egy partnerhez és az ezzel egyidejű feltekeredés¹⁸. Ez a megállapítás azonban jelentős egyszerűsítést hordoz, ugyanis az IDP szinte sosem válik teljesen rendezetté a kötött állapotában, és gyakran a rendezetlenül maradt régiók játszanak kulcsszerepet a

funkciójának ellátásában¹⁹. Ez a bolyhosságnak (fuzzyness) nevezett jelenség tulajdonképpen a szerkezeti rendezetlenség kiterjedése a kötött állapotra.

Sejten belüli vizsgálati módszerek kifejlesztése, melyek lehetővé teszik a szerkezet és a funkció in vivo jellemzését. Az IDP-k sejten belüli működésének és viselkedésének megértését nehezíti az extrém makromolekula-koncentráció miatti zsúfoltság és a kölcsönható partnerek, melyek erősen támogatják a feltekeredett állapotot. Természetes környezetben (sejten belül) történő megfigyelésükhöz a sejten belüli NMR mérések ígéretes módszernek tűnnek, viszont fokozott körültekintés szükséges ahhoz, hogy ne generáljunk félrevezető adatokat az in vivo NMR kísérletek során.

Kismolekulás inhibitorok létrehozása, melyek megtámadják az IDP-t és a kölcsönható partnerét is. A p53 és az alfa-szinuklein kedvelt célpontok a gyógyszerkutatásban. Mivel a rendezetlen fehérjék kötő zsebei hasonlítanak az enzimek aktív oldalaihoz, az IDP-k kölcsönható partnereit támadható fehérjékként tartották számon. Nemrégiben nagy visszhangot váltott ki az a megfigyelés, hogy maguk az IDP-k is támadhatók kismolekulákkal²⁰. Mivel e fehérjék fontos szerepet játszanak különböző betegségek kialakulásánál, a lehetőség, hogy megakadályozzák ilyesféle működésüket, a gyógyszerkutatás új fejezetét nyithatná meg.

Az átmenet alappillérei között említettekén kívül még számos módszerrel – röntgenkrisztallográfia, cirkuláris dikroizmus spektroszkópia (CD), proteáz lebontás, kisszögű röntgenszórás (SAXS), – próbálták vizsgálni a fehérjék rendezetlenségét, természetesen mindnek megvannak a maga előnyei és hátrányai.

Az alkalmazható módszerek közül kiemelkedik az NMR spektroszkópia, mivel gyors és hatékony, valamint segítségével több nagyságrendet átfogó időskálán mérhetünk atomi méretű felbontásban. További előnye, hogy kristályosítás nélkül, oldatfázisban elvégezhetők a mérések. A rendezetlenség átmeneti jellege és korlátozott kiterjedése az előbbieken felsorolt technikákkal szemben az NMR kísérleteknél nem jelent gondot. NMR mérések eredményei alapján az 1978-as áttörés óta számos cikk jelent meg a rendezetlen fehérjék dinamikájáról²¹, biofizikai²² és atomi szintű jellemzéséről²³, a szerkezetüket jellemző paramétereikről^{24,25}, és a kutatók napjainkban is újabb és újabb mérés technikai változtatással – kriofejes és protonmentes mérések²⁶, pulzusszekvenciabeli újítások²⁷ – állnak elő, így a felvett spektrumok egyre jobb felbontással rendelkeznek, és egyre pontosabb információkkal szolgálnak.

2.3. A MAPK rendszer

A Mitogén Aktivált Fehérjekináz (MAPK) kaszkádok evolúciósan megőrződött, sejten belüli jeltovábbító útvonalak, melyek sokféle sejten kívüli ingerre adnak választ, és számos alapvető sejtfolymatot irányítanak, beleértve a növekedést, az osztódást, a differenciálódást, a mozgásképeséget, a stresszválaszt, a túlélést és az apoptózist. Napjainkig négy különböző MAPK kaszkádot azonosítottak, és MAPK összetevőik szerint nevezték el őket: sejten kívüli jel vezérelte kináz 1 és 2 (extracellular sign-regulated kinase, ERK1/2), c-Jun N-terminális kináz (JNK), p38 és ERK5. Kóros szabályozás esetén a MAPK kaszkádok számos betegség kialakulásánál játszanak kulcsszerepet: diabétesz, rák, fejlődési rendellenességek, neurodegeneratív betegségek, Alzheimer- és Parkinson-kór, ALS (amiotróp laterális szklerózis), lisszenkefalitisz, gyulladásos és autoimmun betegségek.

A Mitogén Aktivált Fehérjekináz Aktivált Fehérjekinázok specifikus komplexet képeznek aktiváló MAPK-jaikkal rövid lineáris dokkoló motívumokon keresztül. Valószínűsíthető, hogy ezek a lineáris motívumok különbséget tesznek különböző fehérje-fehérje kölcsönható árkok között, ha szerkezetet vesznek fel, amelyet ún. H-híd kapcsok (staples) stabilizálnak. Ez a megfigyelés lehetővé tenné olyan fehérjegyógyszerek kifejlesztését, melyek specifikusan gátolnák a sejten belüli jelátadást. A korábban megfigyelt klasszikus, strukturális domének között megvalósuló fehérje-fehérje kölcsönhatásokkal szemben ebben a rendszerben fehérje-peptid típusú kölcsönhatások jönnek létre: példaként említhetjük transzkripciós faktorok és MAPKAPK-ok foszforilálását²⁸. A MAPKAPK-ok MAPK-ok általi aktiválása C-terminális dokkoló motívumaiktól függ; számos tanulmány készült már arról, hogy ez a régió közvetíti a MAPK dokkoló árkához történő kötődést ERK vagy p38 MAPK-oknál, és ez a kapcsolat nélkülözhetetlen a MAPKAPK-ok *in vivo* aktiválásához^{29,30}.

Az emlősökben három stressz-reszponzív MAPKAPK található (MK 2, 3, 5), két MNK (1, 2) és MSK (1, 2), melyek a stressz és mitogén ingerek közvetítéséért felelősek, valamint négy RSK (1-4), melyek főként a mitotikus és növekedési válaszok továbbításában vesznek részt. Az MK-k aktiválása a p38-as MAPK-októl függ. Ennek a biokémiai specificitásnak megfelelően főleg stressz-válaszok közlésében játszanak szerepet, például ozmotikus stressz ellensúlyozásánál³¹. A két MNK-ból álló második kinázcsoportot egyaránt aktiválhatják stressz ingerek vagy mitogének; a p38-aknak és

az ERK-knak is szubsztrátjai. Az MNK-k hozzájárulnak a transzláció általános szabályzásához is. A harmadik csoportot a négy RSK alkotja: valószínűleg a növekedési válaszokat közvetítik, és az ERK MAPK-ok szubsztrátjai³².

Egyre inkább elfogadottá válik az a vélekedés, hogy a lineáris motívumok fontos elemei a jelátadó fehérjék közti huzalozásnak és a fehérje-peptid kölcsönhatások ígéretes gyógyszer-célpontra válnak³³. A különböző MAPK családok dokkoló árkai szekvenciálisan nagymértékű hasonlóságot mutatnak, ezért feltételezték, hogy a rendszerben megfigyelhető specifikus kötődések a szubsztrátok lineáris dokkoló motívumaihoz kapcsolódnak. Garai és munkatársai azt vizsgálták, a MAPK-ok milyen szerkezeti különbségeik alapján tudnak különbséget tenni a dokkoló motívumok között. Eredményeiket felhasználva sikeresen beavatkoztak a MAPK rendszer specificitási viszonyaiba, például úgy változtattak meg egy JNK1-specifikus peptidet, hogy az a későbbiekben már p38 α -hoz és ERK2-höz is kötődött³⁴.

Ez az alap ígéretesnek tűnik a gyógyszerkutatásban a sejtes jelátadó rendszerek elemeinek precíz célzásához.

3. Elméleti háttér

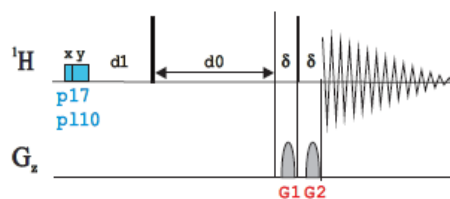
A rendezetlen szegmensek gyakran csak kis hányadát teszik ki a teljes fehérjének, így nehéz őket olyan módszerekkel vizsgálni, melyek a teljes másodlagos szerkezettartalmat mérik (CD, IR). Ezen szegmensek megfigyelésére és leírására valószínűleg az oldat NMR a legalkalmasabb technika. Az elmúlt 15 év során az NMR spektroszkópia a flexibilis rendszerek tanulmányozásának kulcsfontosságú módszerévé vált, és jelentős mennyiségű fontos információt szolgáltatott a letekeredett állapotról.

Bár az 1D spektrumok is szolgálnak kvalitatív információval, az igazi áttörés a fehérjék szerkezetének kutatásában a 2D mérés technika kidolgozásának és elterjedésének köszönhető.

3.1. Homonukleáris 2D NMR mérések

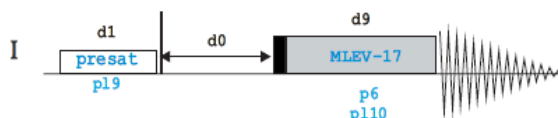
Jelzetlen, kisebb méretű fehérjéknél alkalmazzuk a 2D homonukleáris méréseket, melyeknél egy 90° -os gerjesztő pulzus és az adatgyűjtés ideje közé egy t_1 evolúciós időt iktatunk be, mely alatt különböző pulzusszekvenciák segítségével az egymás környezetében lévő spinek között kapcsolatot hozunk létre pl. koherencia vagy polarizáció transzferrel. Az egyes spinek a környező spinek állapotaival modulálódnak. Így a FID (Free Induction Decay) detektálása alatt (t_2) a spin környezetéről is nyerhetünk információt. A Fourier transzformációt az $F_1(t_1)$ direkt és $F_2(t_2)$ indirekt dimenziókban is elvégezhetjük, így kapható az $F_1(\omega_1)$, $F_2(\omega_2)$ 2D spektrum. A spektrumból közvetlenül nem nyerhető szerkezeti információ, de felhasználásával következtethetünk az atommagok közötti kapcsolatokra.

A 2D COSY (COrrrelation SpectroscopY) a legegyszerűbb 2D mérés, melynek alapja a közvetlen J-csatolásban lévő spinek közti polarizációátadás, információval szolgál a kémiai eltolódások korrelációjáról. Egy COSY spektrumban a keresztcsúcsok azon protonok között figyelhetők meg, melyek egymással kötésben lévő atomokhoz kapcsolódnak.



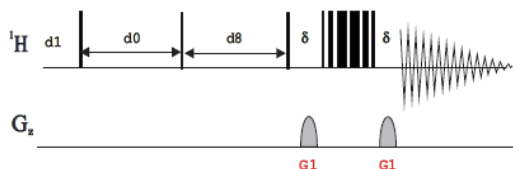
3. ábra. COSY kísérlet pulzusszekvenciája.

A 2D *TOCSY* (*Total Correlation Spectroscopy*) kísérlettel a pontos topológiától függetlenül meghatározhatjuk a teljes spinrendszert. A legfontosabb paraméter ennél a mérésnél a keverési idő hossza. Egyre hosszabb keverési időket használva egy méréssorozatnál, lehetőségünk nyílik megfigyelni a teljes spinrendszeren keresztülvezető kapcsolódási utakat. A TOCSY spektrum protonok teljes korrelációját létrehozó spektrum, az összes, egy spinrendszerhez tartozó proton keresztcsúcsot ad, így segítve pl. az aminosavak spinrendszereinek azonosítását.



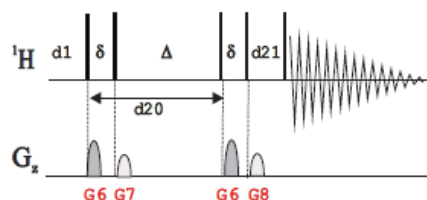
4. ábra. TOCSY kísérlet pulzusszekvenciája.

A 2D *NOESY* (*Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy*) lehetővé teszi, hogy egyetlen kísérlettel megkapjuk az összes NOE-információt egy molekulában, és nem szükséges hozzá a molekuláris szerkezet előzetes ismerete. A nukleáris Overhauser effektus (NOE) egy téren át ható dipol-dipol relaxáció, melynek során az egymástól 3-6 Å távolságban lévő atommagok keresztrelaxációja kölcsönösen befolyásolja a mágneses környezetüket, így a NOESY spektrumban detektálható jelet adnak. A spektrum felhasználható asszignációhoz és távolsági kényszerfeltételek meghatározásához.



5. ábra. NOESY kísérlet pulzusszekvenciája.

A DOSY (Diffusion Ordered SpectroscopY) kísérletek segítségével egyszerűen mérhető a molekulák méretétől, alakjától, és a közeg viszkozitásától függő translációs diffúziós állandó.

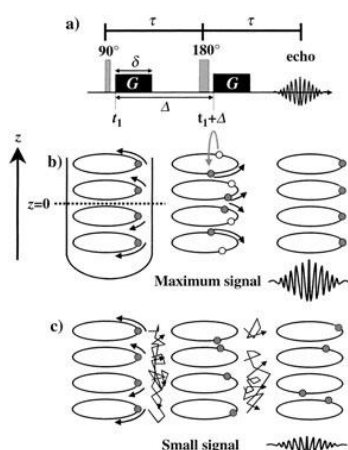


6. ábra. DOSY kísérlet pulzusszekvenciája.

A diffúziós állandó méréséhez leggyakrabban a PGSE (Pulsed Gradient Spin Echo) NMR kísérletet használjuk, mely a Hahn-echo pulzusszekvencia egy módosított változata. A kísérlet kezdetén a mágnesezettség a z-tengely mentén helyezkedik el, majd egy 90°-os pulzust követően az x-y síkba billen. A t_1 időpillanatban egy δ hosszúságú, G erősségű gradiens pulzust adunk ki, melynek eredményeként a spinek fáziseltolódást szenvednek az első τ periódus végére. A következő lépés a 180°-os pulzus alkalmazása, melynek hatására a precesszáció és a fázisszög előjele az ellentettjére változik. $t_1 + \Delta$ időpillanatban egy második gradiens pulzust adunk ki, mely az elsővel megegyező erősségű és hosszúságú.

Amennyiben a spinek nem végeznek z-tengely menti translációs mozgást, vagyis nincs diffúzió, a spinek fáziseltolódása egyenlő nagyságú az első és a második τ periódus után. Ennélfogva a két gradiens pulzus hatása kioltja egymást, minden spin refókuszálódik, és maximális intenzitású jelet kapunk.

Diffúzió esetén azonban az egyes spinek fáziseltolódásainak első τ periódus utáni nagysága nem egyenlő a második τ periódus utániakkal. Ennek az a magyarázata, hogy a diffúzió miatt a molekulák t_1 és $t_1 + \Delta$ időpillanatokban z tengely mentén más-más helyen lesznek és eltérő mágneses mezőt érzékelnek, és így ezekben a periódusokban a spinek különböző szögsebességekkel precesszálnak. Diffúzió esetén tehát a fázisszög megnő, az echo-jel pedig ennek megfelelően lecsökken. Belátható, hogy gyorsabb diffúziós mozgás esetén a spinek refókuszálása kisebb, így pedig az echo-jel is kisebb, továbbá minél erősebb gradiens pulzust adunk ki (a gradiens hosszát állandónak választva), annál kisebb jelintenzitást kapunk.

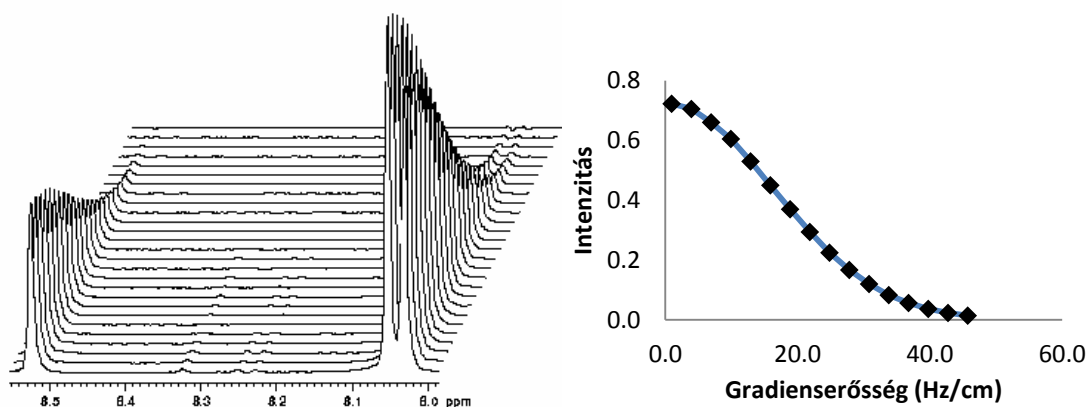


7. ábra. a.) PGSE kísérlet pulzusszekvenciája. Fáziseltolódás és jelintenzitás alakulása b.) diffúzió nélkül és c.) diffúzió mellett.

A translációs diffúziós állandó meghatározásánál a gradiens erősségét változtatjuk, és a Stejskal-Tanner-formula (1) szerint illesztést végzünk a gradienserősség növekedésének függvényében csökkenő jelintenzitásokkal.

$$I = I_0 \exp \left[-D_t \gamma^2 \delta^2 G^2 \left(\Delta - \frac{\delta}{3} \right) \right] \quad (1)$$

ahol I a jelintenzitás, I_0 a kezdeti jelintenzitás, D_t a translációs diffúziós állandó, G a gradienserősség, δ a gradiens időtartama, Δ pedig a két gradiens pulzus között eltelt idő.

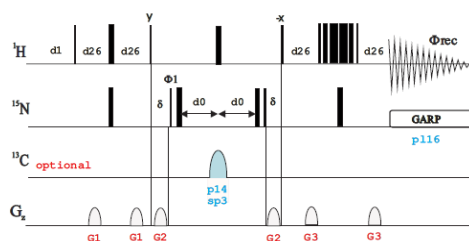


8. ábra. Bal oldalon: Diffúziós spektrum, x tengelyen a kémiai eltolódásokkal, y tengelyen a gradienserősséggel, z tengelyen pedig a jelintenzitással. Jobb oldalon: jelintenzitás Gauss-görbe szerinti lecsengése a gradienserősség függvényében.

3.2. Heteronukleáris 2D NMR mérések

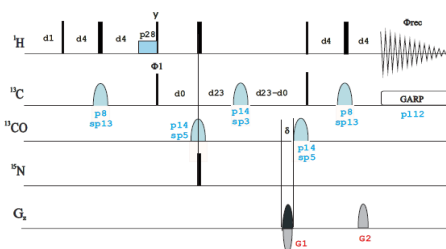
A fehérjék a protonokon kívül más NMR-aktív magokat is tartalmaznak, különösen fontosak a ^{13}C és ^{15}N atommagok, melyeket felhasználva lehetőségünk nyílik akár nagyobb (100 aminosav feletti) fehérjék szerkezetének vizsgálatára. A ^{15}N és a ^{13}C természetes gyakorisága nagyon kicsi, giromágneses állandójuk pedig lényegesen kisebb a protonokénál. Kétféle stratégiát alkalmazhatunk az érzékenységük javítására: izotópdúsítást a fehérjében vagy a jel/zaj arány javítását inverz NMR kísérletekkel, melyek során a mágnesezettség a protonokról a heteroatommagra kerül.

A legfontosabb inverz NMR kísérlet a *HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence)*, melynek pulzusszekvenciája a 9. ábrán látható.



9. ábra. 2D ^{15}N HSQC kísérlet pulzusszekvenciája.

A ^{15}N HSQC kísérlet egy NH_x csoport nitrogénatomját korreláltatja a vele kötésben lévő protonnal. A spektrum a fehérjegerinc amidprotonjainak jeleit tartalmazza, és mivel egy aminosavhoz egy gerinc $\text{H}(\text{N})$ tartozik, egy-egy HSQC jel egy aminosavhoz rendelhető. A HSQC spektrumban az aszparagin és a glutamin oldalláncának amidcsoportjai, valamint a triptofán és a hisztidin aromás $\text{H}(\text{N})$ -jai is jelt adnak. A ^{15}N HSQC-hez hasonlóan végezhető el a ^{13}C HSQC kísérlet, ennél egy CH_x csoport szénatomját korreláltatjuk a vele kötésben lévő hidrogénekkel.



10. ábra. ^{13}C HSQC kísérlet pulzusszekvenciája.

3.3. A rendezetlenséget jellemző NMR paraméterek

Többféle, NMR mérésekkel meghatározható paramétert használhatunk a rendezetlenség jellemzésére. A Reziduális Dipoláris Csatolás (RDC, Residual Dipolar Coupling) egy spinpárt összekötő internukleáris vektor helyzetéről ad információt egy külső mágneses térhez képest. A széleskörű alkalmazásnak gátat szab, hogy az RDC-kkel kapcsolatos megállapítások és következtetések a polimerfizikából ismert analitikus random coil-modellre épülnek, de ez a modell és a természetes aminosavszekvencia leírása homopolimerként nem alkalmazható egyszerűen olyan komplex heteropolimer rendszerekre, amilyenek a rendezetlen fehérjék is³⁵. A $^3J_{\text{HNH}\alpha}$ csatolási állandók kapcsolatban állnak a fehérje konformációs hajlamával, de alkalmazásukat nehezíti a szomszédos atomok illetve a fehérje fennmaradó részének befolyása az adott aminosav konformációs preferenciáira²³.

A rendezetlen szegmensek megfigyelésének leghatásosabb eszközei a kémiai eltolódások, melyek érzékenyek a környezet és a szerkezet hatásaira. A megfigyelt eltolódások eltérései egy idealizált rendezetlen állapot (az ún. random coil) eltolódásaitól felhasználhatóak az átmeneti (vagy teljesen kialakult) másodlagos szerkezet helyének és populációjának meghatározásához.

A kísérletileg megállapított kémiai eltolódások és a szekvenciakorrigált random-coil kémiai eltolódások³⁷ különbségei, azaz a Másodlagos Kémiai Eltolódások (SCS, Secondary Chemical Shift) – $\text{H}\alpha$, $\text{C}\alpha$, $\text{C}\beta$, CO , $\text{H}(\text{N})$, és $\text{N}(\text{H})$ esetében – jelzik, hogy egy adott fehérjeszekvencia rendelkezik-e valamennyi másodlagos szerkezettel, vagy sem.

$$\text{SCS} = \delta^{\text{mért}} - \delta^{\text{szekvenciakorrigált rc.}} \quad (2)$$

Amennyiben nem rendelkezik, a mért eltolódásértékek és a random coil értékek között nem figyelhető meg szignifikáns eltérés és alakulásuk a szekvencia függvényében nem mutat tendenciát (egymást követő egyértelműen pozitív vagy negatív értékek).

Egy oldatban lévő molekula diffúziós együtthatója összefüggésben van a translációs súrlódási faktorával. A Stokes-Einstein-egyenlet szerint:

$$D_t = k_B T / f_t \quad (3)$$

ahol k_B a Boltzmann-állandó, T a hőmérséklet, és gömbszerű részecskét feltételezve a translációs súrlódási faktor:

$$f_t = 6\pi\eta r \quad (4)$$

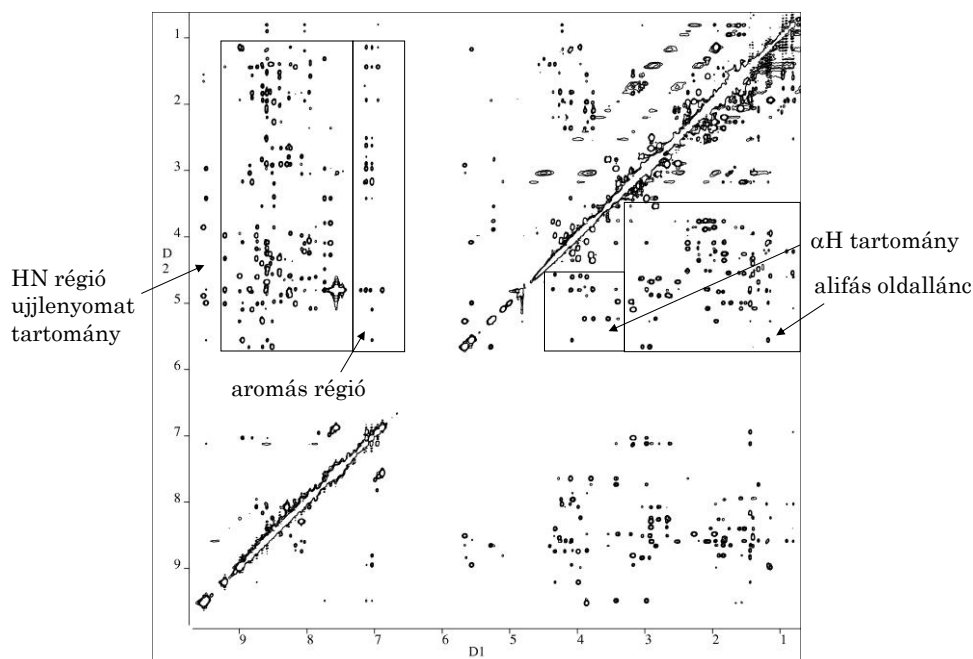
ahol r a gömb hidrodinamikai sugara, η pedig az oldószer viszkozitása. A translációs diffúziós együttható meghatározásával tehát kiszámítható a hidrodinamikai sugár, amiből következtethetünk arra, hogy a vizsgált fehérjefragmens feltekeredett, kompakt, globuláris szerkezettel rendelkezik-e, vagy inkább lazább, lassabban diffundáló „pálcikára” hasonlít.

3.4. Rendezetlen fehérjék spektrumainak asszignációja

Az NMR kémiai eltolódások érzékenyen reagálnak a fehérje konformációs együtteseiben bekövetkező apró változásokra, ezért különösen jól használhatók a letekeredett és részben feltekeredett fehérjék esetében arra, hogy jellemezzék ezek másodlagos szerkezetkialakító hajlamát.

A rendezetlen fehérjék polipeptidláncának flexibilitása és a konformációk közti gyors átmenetek eredményeképpen a legtöbb rezonancia, különösen a protonoké kicsi kémiai eltolódás diszperziót mutat. Az IDP-k aminosavegységei hasonló kémiai környezetben találhatók, ebből következően hasonló NMR-frekvenciákkal rendelkeznek, ami a ^1H -rezonanciák erőteljes átfedéséhez vezet. Emiatt, míg a feltekeredett fehérjék kétdimenziós NMR-spektrumában a jelek széles tartományt foglalnak el, az IDP-kében az amidprotonok jel-diszperziója szűk tartományban figyelhető meg³⁸.

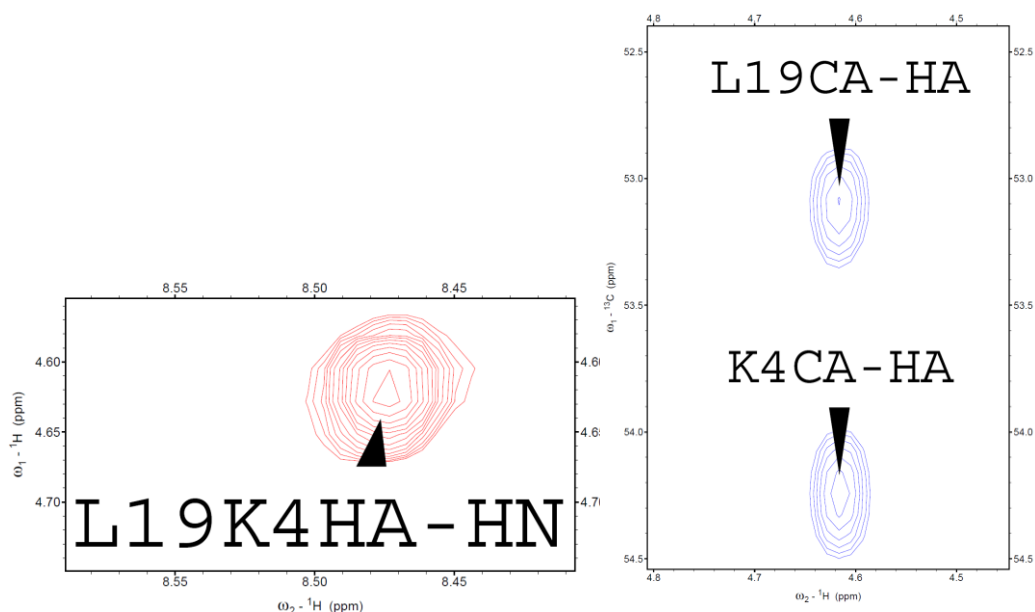
A spektrumban megkülönböztetünk amid- (vagy ujjlenyomat-), aromás és alifás régiókat, amint a 11. ábra NOESY spektrumán is látszik.



11. ábra. NOESY spektrum a megfelelő régiók jelölésével.

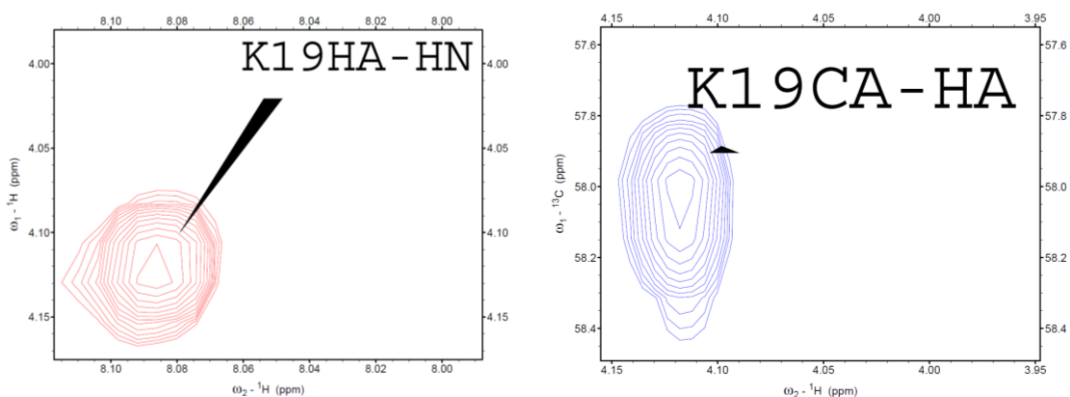
A prolinok csak az alifás régióban adnak jelet, mert nem rendelkeznek amidprotonnal. Az asszignáció során számolni kell azzal, hogy gyors mozgásuk következtében a fehérje első (esetenként első kettő) és utolsó aminosavaihoz rendelhető jelek nem vagy csak részben jelennek meg.

Az asszignáció során a TOCSY és COSY mérések alapján spinrendszereket azonosítottunk, melyek korrelációs mintázatuk és kémiai eltolódásuk alapján megfeleltethetőek egy-egy aminosavnak. Mivel az NMR méréseinket jelöletlen fehérjéken végeztük, nem állt rendelkezésünkre 3D spektrum. Így az asszignáció során a homonukleáris spektrumokkal párhuzamosan használtuk a heteronukleáris spektrumokat, ami különösen a homonukleáris spektrumban nehezen elkülöníthető jelek azonosításában jelentett segítséget.



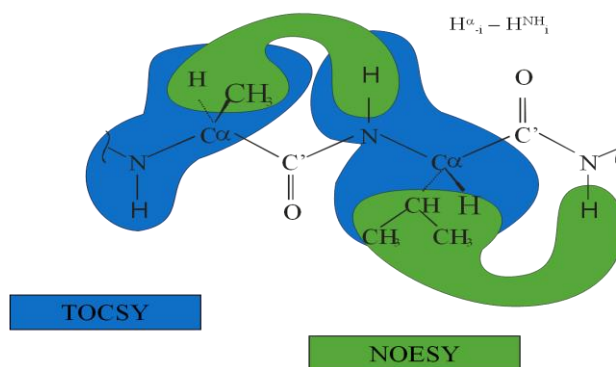
12. ábra. (a) Az RSK1 TOCSY spektrumának egy részlete. L19 és K4 együtt ad jelet, $\text{H}\alpha$ és $\text{H}(\text{N})$ kémiai eltolódásaik megegyeznek, azonban a (b) ${}^1\text{H}$ - ${}^{13}\text{C}$ HSQC spektrumban a jelek eltérő $\text{C}\alpha$ eltolódásaik miatt elkülönülnek.

A spektrumok összevetése ellenőrzésül is szolgált: Ha a TOCSY spektrum alapján meghatároztuk egy aminosav $\text{H}\alpha$ kémiai eltolódását, a ${}^{13}\text{C}$ HSQC spektrumban az adott $\text{H}\alpha$ értéknél jelet láttunk, amelynek $\text{C}\alpha$ -beli eltolódása az aminosavra jellemző értéket mutatott.



13. ábra. Bal oldalon: Az MK2 TOCSY spektrumának egy részlete. Jobb oldalon: ${}^1\text{H}$ - ${}^{13}\text{C}$ HSQC spektrum részlete. A K19 $\text{H}\alpha$ kémiai eltolódásának értéke 4,118, a ${}^1\text{H}$ - ${}^{13}\text{C}$ HSQC spektrumban az ehhez tartozó $\text{C}\alpha$ érték 58,014. (A lizin $\text{C}\alpha$ értékét 56,2-nél várjuk, az eltérés 1,814, ez valószínűleg azért ilyen nagy mértékű, mert a K19 a peptid utolsó előtti aminosava.)

A szekvenciális rendezést a NOESY spektrum alapján végeztük, amely segítséget nyújt a szomszédos spinrendszerek korreláltatásában: Keresztcsúcs figyelhető meg az (i-1)-edik aminosav $H\alpha$ -ja (illetve $H\beta$ -ja) valamint az i-edik aminosav $H(N)$ -je között. Hélix esetében a keresztcsúcs látható az (i+1)-edik, (i+2)-edik szomszéd egység $H(N)$ protonjével is. A 14. ábra azt szemlélteti, mely spektrumban milyen protonok korrelációja figyelhető meg.



14. ábra. Kék szín jelzi, hogy mely protonok között van korreláció TOCSY spektrumban, míg zöld szín mutatja, mely protonok korrelálnak NOESY-ban.

A szekvenciális rendezést érdemes olyan aminosavval kezdeni, amelyből csak egy található a fehérjében, majd folytatni az őt szekvenciában megelőző és követő szomszédok azonosításával. Az asszignáció elvégzése után megállapíthatók az aminosav egységekhez tartozó kémiai eltolódások.

4. Célkitűzések

Munkánk során MAPKAPK-ok C-terminális dokkoló motívumainak különböző hosszúságú fragmenseit vizsgáltuk, melyek peptideknek is tekinthetők. (Az NFAT fragmens nem egy lineáris motívum része, hanem egy transzkripció faktor.)

A következő táblázat tartalmazza a vizsgált fehérjefragmensek aminosavszekvenciáit:

Fhérjefragmens neve	Aminosavak száma	Aminosavszekvencia
RSK1	24	PQLKPIESSILAQRRVRKLPSTTL
RSK1_S/A	24	PQLKPIEASILAQRRVRKLPSTTL
MK2	20	IKIKKIEDASNPLLLKRRKK
MNK1	19	MKLSPPSKSLARRRRALA
NFAT	14	LERPSRDHLYLPLE

1. táblázat. A vizsgált dokkoló motívumok és szekvenciális jellemzőik.

Arra a kérdésre kerestük a választ, milyen szerkezeti okokra vezethetők vissza a rendszerben megfigyelhető specifikus kötődések, melyeket a 2. táblázatban foglaltunk össze:

		MAPK		
		JNK	ERK2	p38
Szubsztrát	NFAT	+	-	-
	MK2	-	-	+
	RSK1, RSK1_S/A	-	+	-
	MNK1	-	+	+

2. táblázat. A táblázat vízszintes sorait az NFAT és a három vizsgált MAPKAPK foglalják el, míg az oszlopokban a MAPKok találhatók. A + jel arra utal, hogy az adott fehérjefragmens szubsztrátja a kináznak, a – pedig arra, hogy nem.

Célul tűztük ki azt is, hogy feltérképezzük az RSK1 és egy mutánsa, az RSK1_S/A oldatbeli formáinak különbségeit, vagyis azt, hogyan befolyásolja egy mutáció az esetlegesen megfigyelhető másodlagos szerkezetkialakító hajlamot.

Vizsgálatainkhoz a rendezetlenség jellemzésére alkalmas NMR paraméterek közül a Másodlagos Kémiai Eltolódásokat (Secondary Chemical Shift, SCS) kívántuk felhasználni, azaz a fehérjék spektrumainak asszignálása után a kémiai eltolódásokat összevetni az ideálisan rendezetlen modell fehérjé, a 'random coil' jellemző eltolódásaival. Az SCS értékeket a szekvencia függvényében ábrázolva ugyanis információt kaphatunk a rendezetlenség fehérjén belüli helyéről és mértékéről.

A méréseket denaturáló közegben (8M-os ureaoldat) is megismételtük, hogy lehetőségünk nyíljon összehasonlítani a rendezett régiókkal bíró fehérjefragmensek szerkezetét a letekeredett, tehát feltételezhetően teljes mértékben rendezetlen formájukkal. Az így mért kémiai eltolódásokat rendszerezve megkezdtük egy saját 'random coil'-adatbázis felépítését.

PFG-NMR kísérletek elvégzése után meghatároztuk az öt vizsgált fragmens translációs diffúziós állandóját és hidrodinamikai sugarát. Így lehetőségünk nyílt arra, hogy eredményeinket összehasonlíthassuk a fragmenseink mérettartományába eső rendezett és rendezetlen minifehérjék hidrodinamikai sugarával, majd levonjuk a következtetéseket a szerkezeti rendezettség/rendezetlenség és az eltérő hidrodinamikai viselkedés kapcsolatáról.

Az öt fehérjefragmens részletes vizsgálatával remélhetőleg közelebb kerülhetünk a MAPK rendszer működésének megértéséhez, ami hosszabb távon előremozdíthatná a specifikusabb inhibitorok alkalmazásán és a fehérje-fehérje kölcsönhatás gátlásán alapuló új hatóanyagtervezési stratégiát.

5. Alkalmazott módszerek

5.1. A rendezetlenség in silico predikciója

A rendezetlenség in silico előrejelzéséhez az IUPred algoritmusát használtuk³⁹. A módszer az aminosavak páronkénti kölcsönhatási energiáit becsüli meg, figyelembe véve, hogy egy adott aminosav hozzájárulása a rendezettséghez/rendezetlenséghez nem csak a kémiai tulajdonságaitól, hanem a szekvenciális környezetétől – beleértve a potenciális kölcsönható partnereket – is függ.

5.2. CD mérések

A CD spektrumok az ELTE Kémiai Intézetének Kiroptikai Szerkezetvizsgáló Laboratóriumában készültek.

Spektrumfelvételek paraméterei:

- Spektrométer: JASCO J-810
- Felvétel tartománya: 185 – 260 nm
- Mérési sebesség: 20 nm/perc
- Spektrum átlagolás: 3
- Válaszidő: 8 s
- Sáv szélesség: 1 nm
- Érzékenység: Standard
- Cella hossza: 0,01 cm

A méréseket szobahőmérsékleten végeztük. A fehérjeoldatokat mérés előtt hígítottuk, mivel az NMR-hez megfelelő peptid- illetve ureakoncentrációk CD spektrum felvételéhez túl nagyok voltak. NFAT és RSK1_S/A esetében 8-szoros, MNK1 és MK2 esetében 4-szeres hígítást alkalmaztunk.

Az oldatok koncentrációi így:

fehérjefragmens	fehérjefragmens koncentrációja (mM)
NFAT	0,79
MNK1	1,09
MK2	1,30
RSK1_S/A	0,65

3. táblázat. A CD mérésekhez felhasznált oldatok koncentrációja.

5.3. NMR mérések

Az NMR méréseket jelöletlen fehérjéken, 288 K-en, BRUKER AVANCE-III 700 MHz-es NMR spektrométer segítségével végeztük. 500 μ L oldathoz 45 μ L D₂O-t és 5 μ L DSS-t adtunk belső referenciaként. A TOCSY mérésekben az izotróp keverési idő (spinlock) jellemzően 80 ms volt, a NOESY mérésekben a τ_{mix} 100 és 180 ms között változott. A megfelelő felbontás eléréséhez egynapos mérésekre volt szükség.

mérés neve	pulzusprogram	F1	F2	NS	D1 (s)
2D COSY	cosygpprqf	512 (¹ H)	2048 (¹ H)	8	1,50
13C HSQC	hsqcctetgppsp	512 (¹³ C)	2048 (¹ H)	40	1,50
15N HSQC	fhsqcf3gpph	256 (¹⁵ N)	2048 (¹ H)	160	1,50
2D NOESY	noesygpph19	512 (¹ H)	2048 (¹ H)	32	1,50
2D TOCSY	mlevphpr.2	512 (¹ H)	2048 (¹ H)	16	1,50

4. táblázat. A felhasznált NMR kísérletek és jellemző paramétereik.

A vizsgált fehérjéket az ELTE Biokémiai Tanszékén állították elő szilárdfázisú szintézissel. A fehérjeoldatok 0,5 mL 15 mM-os Na-foszfát puffert tartalmaztak. Az egyes oldatok fehérjekoncentrációja a következőképpen alakult:

fehérje-fragment	fehérje-fragment koncentrációja (mM)
NFAT	6,3
MNK1	4,7
MK2	5,8
RSK1	6,5
RSK1_S/A	5,2

5. táblázat. Az NMR mérésekhez felhasznált oldatok koncentrációja.

A denaturáló közegben végzett mérések előtt a fehérjéket liofilizáltuk, majd 550 μ L 8 M urea-oldatot (4,806 g urea Millipore vízben feloldva, az oldat végtérfogata 10 mL) adtunk hozzájuk.

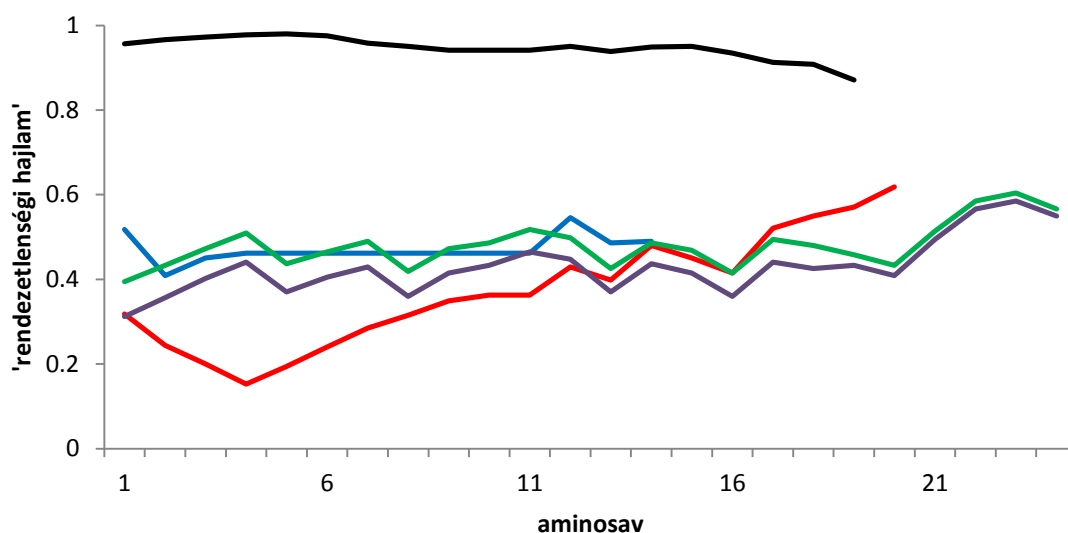
Az elkészült spektrumok processzálása a TopSpin programmal, míg az asszignáció a Sparky program segítségével történt.

A diffúziós állandók mérésekor a 2D LED pulzusprogramot használtuk (a Bruker könyvtár ledgp2s szekvenciája), és a gradienserősséget 16 vagy 32 lépésben változtattuk, a maximális gradienserősség 45,4 G/cm volt. A DOSY kísérletek során alkalmazott gradiensek hosszát jellemzően (δ) 70, 100, 125, 140, 150, 170 vagy 200 ms-nak, míg a diffúziós időt (Δ) 2, 4 vagy 6 ms-nak választottuk. A spektrumok kiértékelését a TopSpin programmal végeztük.

6. Eredmények és következtetések

6.1. Rendezetlenség in silico predikciója

A rendezetlenség in silico predikciójának alapja a rendezetlenség szekvenciabeli kódoltsága¹¹. Az öt vizsgált fehérjefragmensnél az IUPred algoritmusát használtuk, és a kapott rendezetlenségi hajlam (disorder tendency) értékeket a szekvencia függvényében ábrázolva különböző lefutású görbéket kaptunk. Az 1-hez közeli értékek a rendezetlen fehérjékre jellemzőek, a hangsúlyosan 0,5 alattiak pedig a rendezettek.



15. ábra. MNK1, MK2, NFAT, RSK1 és RSK1_S/A IUPred predikciói.

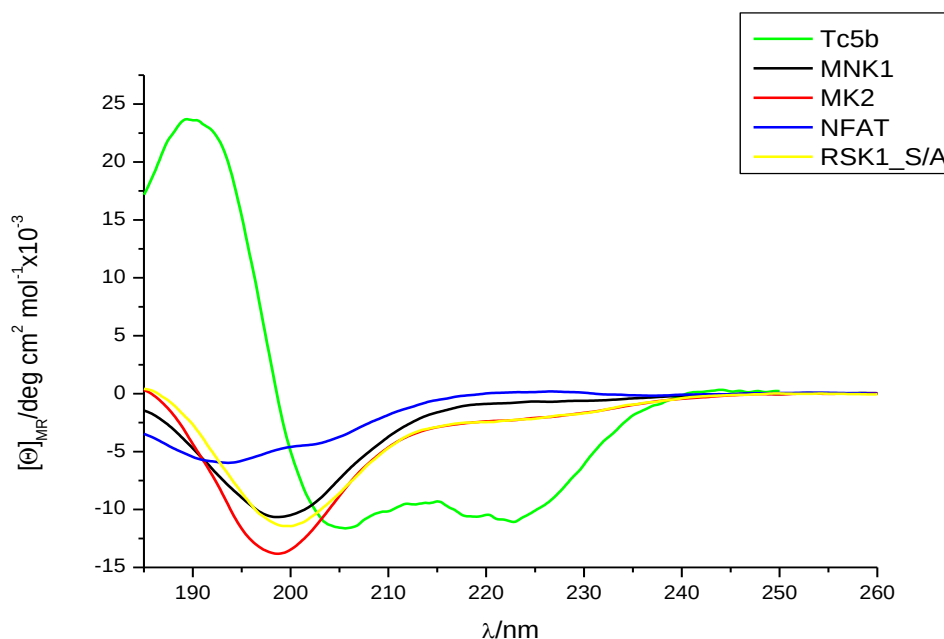
Mint a 15. ábrán is látható, az MNK1 görbéje a szekvencia teljes hosszában a 0,8-1 régióban halad, így azt várjuk, hogy a fehérje egészére a rendezetlenség lesz jellemző. Az NFAT görbéje szinte végig konstans, a rendezetlenségi hajlam a szekvencia elején illetve végén tapasztalható kis eltérés kivételével egy 0,5 közeli értéket vesz fel. Érdeemes szem előtt tartani azonban, hogy ez a fehérjefragmens jóval rövidebb a többinél. Az MK2 esetében a görbe az első 17 aminosav esetében 0,5 alatt halad, így feltételezhetjük, hogy találunk olyan régiót a fehérjében, mely rendezett. Az RSK1 esetében a rendezetlenségi hajlam a szekvencia teljes hosszában 0,5 körül ingadozik, ez alapján nem tudjuk

egyértelműen besorolni sem a rendezett, sem pedig a rendezetlen fehérjék közé. Mutánsa, az RSK1_S/A görbéjének lefutása hasonló, azzal a különbséggel, hogy utóbbi 0-hoz közelebb esik, tehát ez alapján rendezettebbnek tűnik. Bár az RSK1 és az RSK1_S/A szerkezete az in silico vizsgálat alapján nagymértékű hasonlóságot mutat, funkciójukban jelentős eltérés mutatkozik.

A szerkezetpredikció alapján a fehérjefragmensek rendezettség szerinti sorrendje a legrendezetlenebbel kezdve tehát: MNK1, NFAT, RSK1, RSK1_S/A, MK2.

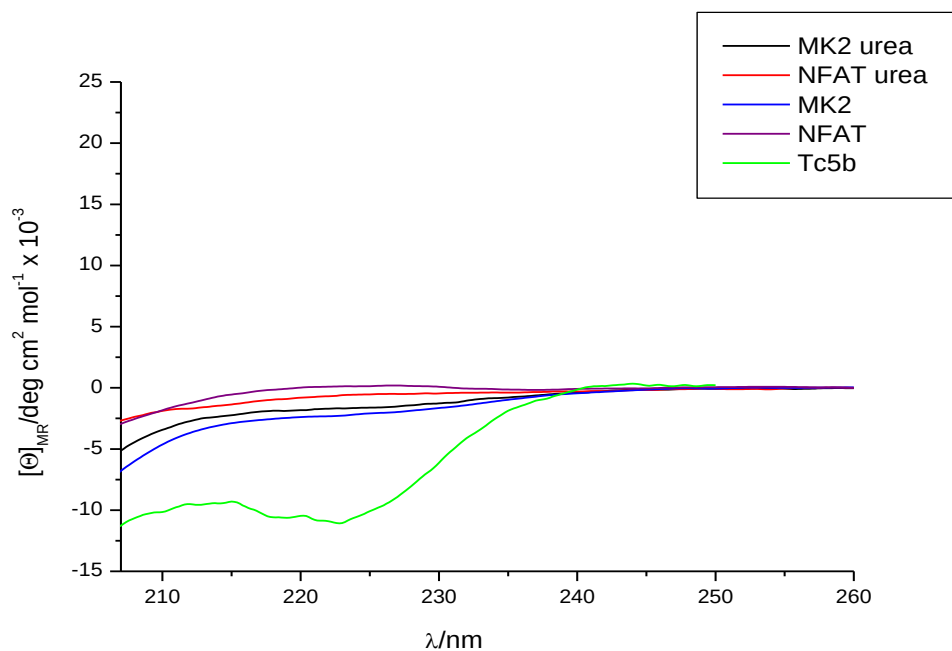
6.2. CD spektroszkópia

A fehérjefragmensek vizes oldatainál kapott CD spektrumokat valamint egy rendezett peptid, a Tc5b CD spektrumát közös grafikonon ábrázoltuk. A 16. ábrán jól látható az NFAT, az MK2, az MNK1 és az RSK1_S/A görbéjénél is a 200 nm-nél lévő negatív csúcs, mely a rendezetlen fehérjékre jellemző. A Tc5b görbéjének 225-235 nm közötti emelkedő részéhez hasonlóan az MK2 és az RSK1_S/A esetében 220-230 nm között negatív sáv figyelhető meg, amely enyhén helikális szerkezeti elem kialakulására utalhat.



16. ábra. Négy általunk vizsgált rendezetlen fehérjefragmens és egy rendezett peptid CD spektrumai vizes oldatoknál.

A CD méréseket két fragmens esetében ureás közegben is elvégeztük, a kapott spektrumok a 17. ábrán láthatók. A teljes denaturálódás következtében az MK2 esetében laposabb lett a rendezett szerkezetre utaló negatív sáv.

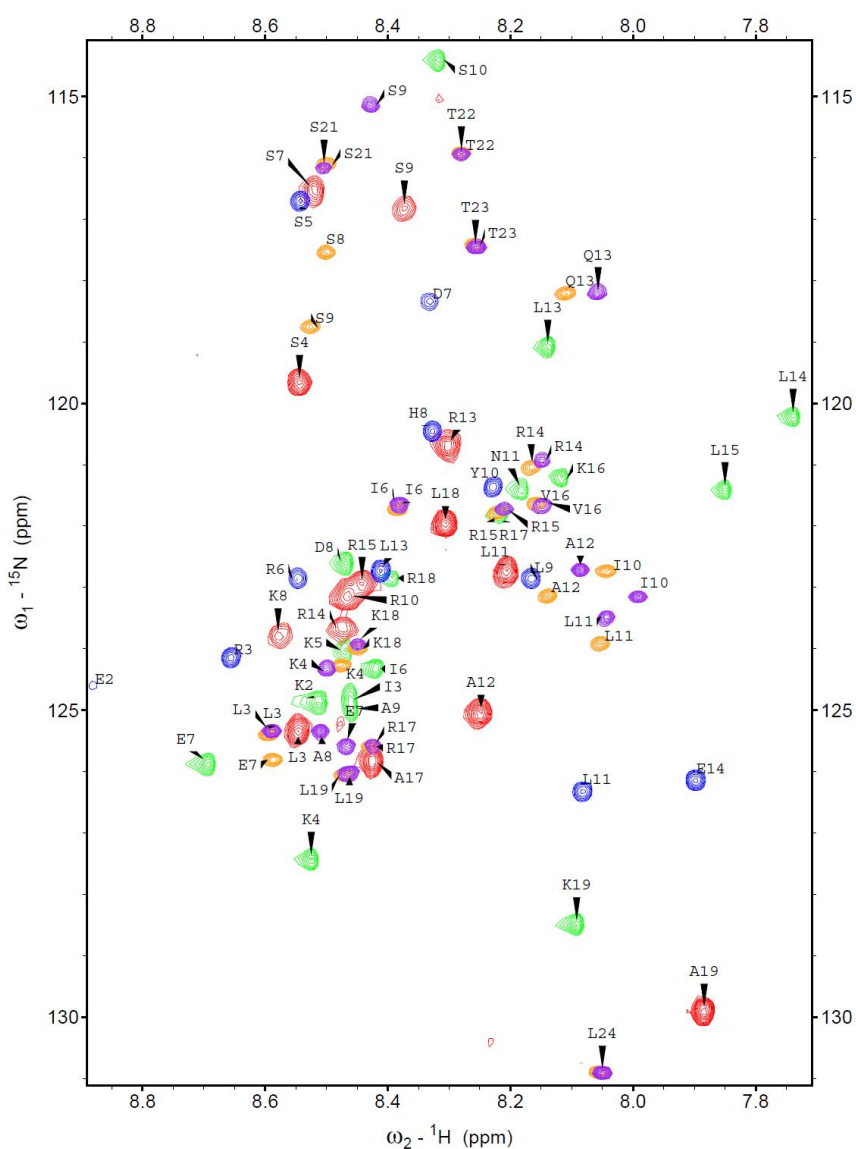


17. ábra. Rendezetlen fehérjefragmensek és egy rendezett peptid CD spektrumai.

6.3. NMR spektroszkópia

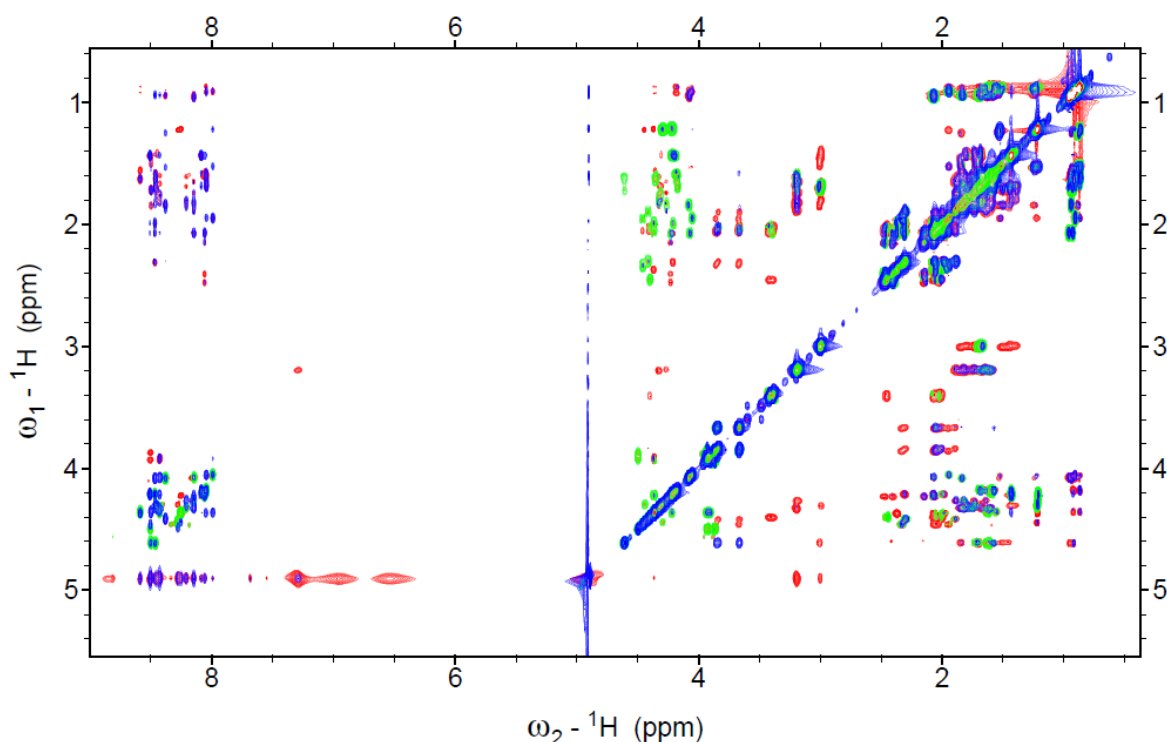
6.3.1. Mérések vizes oldatban

Az öt vizsgált fehérjefragmens asszignált ^{15}N HSQC spektrumait tekintve, melyek a 18. ábrán láthatóak, megfigyelhetjük a rendezetlen fehérjékre jellemző kis jeldiszperziót: Ha nem vesszük figyelembe a láncvégi aminosavakat, H(N) dimenzióban a jelek egy szűk 0,6 ppm szélességű sávon belül helyezkednek el, ami a rendezetlen fehérjék egyik jellemző tulajdonsága.



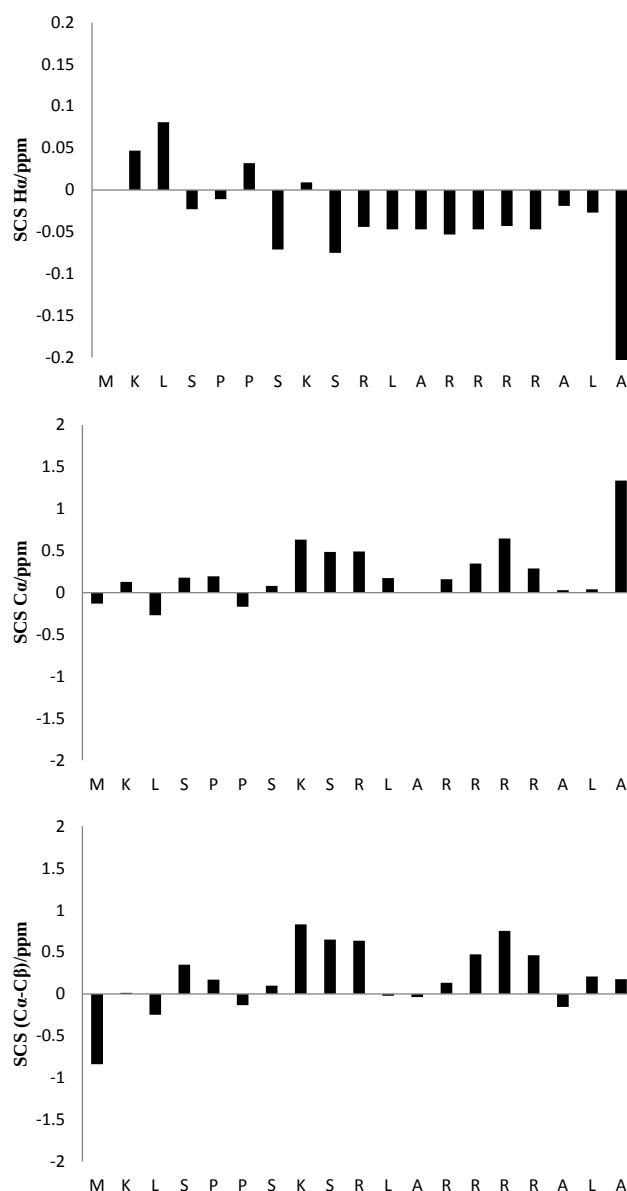
18. ábra. MK2, MNK1, RSK1, RSK1_S/A és NFAT jelöletlen mintákon, 700 MHz-en felvett, asszignált ^{15}N HSQC spektrumai.

Az asszignációt a homonukleáris spektrumok felhasználásával kezdtük (ld. 19. ábra), majd a ^1H -k kémiai eltolódásai alapján a megfelelő HSQC spektrumokból meghatároztuk a ^{15}N és ^{13}C kémiai eltolódásokat.



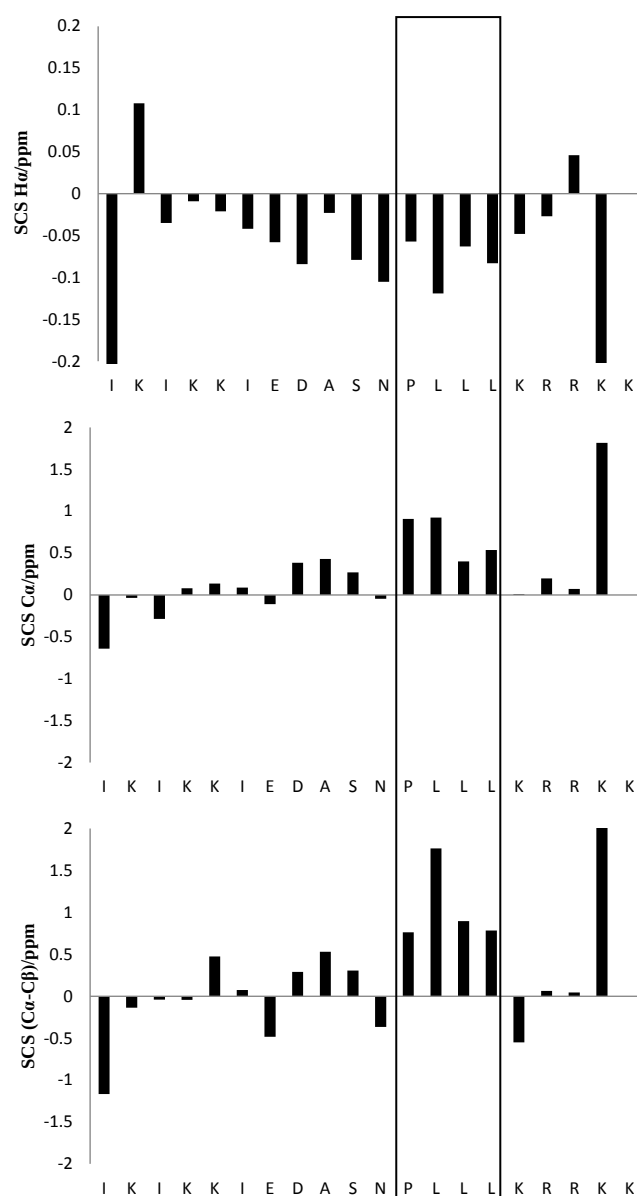
19. ábra. RSK1_S/A TOCSY, COSY és NOESY spektrumai.

Az öt vizsgált fehérjefragmens rendezetlenségének mértékét és a rendezetlen régiók helyét úgy határoztuk meg, hogy a megfelelő kémiai eltolódásaikat ($\text{H}\alpha$, $\text{C}\alpha$, $\text{C}\alpha\text{-C}\beta$) egy ideálisan rendezetlen állapotú fehérje hőmérséklet- és szekvenciakorrigált kémiai eltolódásaihoz viszonyítottuk³⁷, majd az eltéréseket a szekvencia függvényében ábrázoltuk. A kapott grafikonokon azokat a régiókat kerestük, melyeknél legalább négy egymást követő SCS érték $\text{H}\alpha$ esetében negatív, $\text{C}\alpha$ és $\text{C}\alpha\text{-C}\beta$ esetében pedig pozitív.



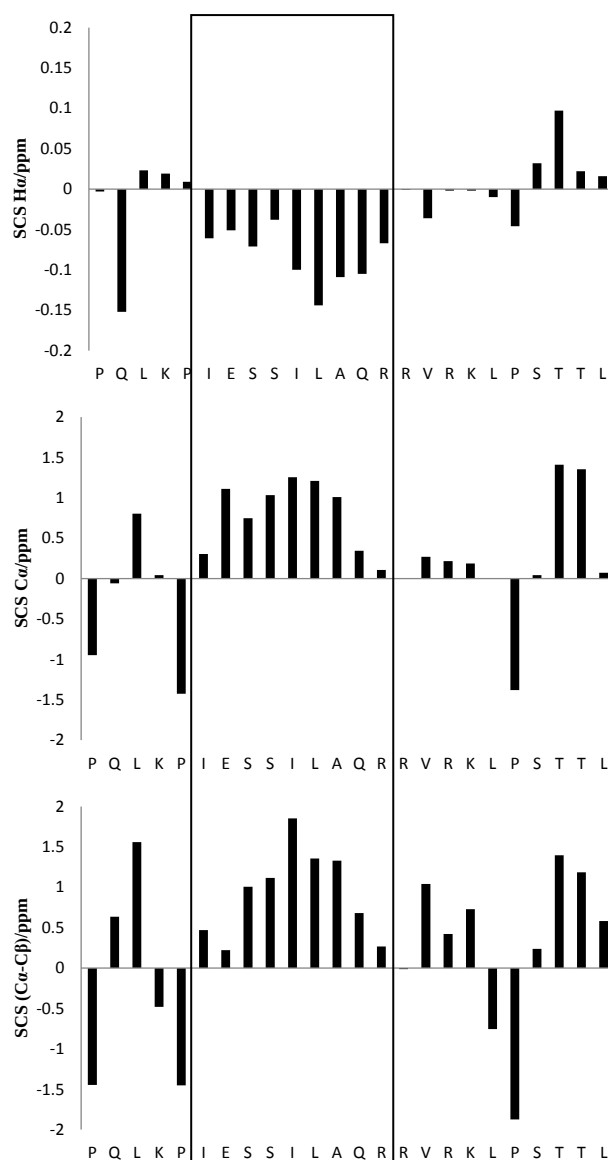
20. ábra. MNK1 szekvenciakorrigált H α (a), C α (b), C α -C β (c) másodlagos kémiai eltolódásértékei ppm-ben. Az (a) grafikonon A¹⁹ SCS értéke nagyobb, mint a tengelyen feltüntetett maximális érték.

A 20. ábra H α grafikonján jól látszik, hogy az általunk mért kémiai eltolódások a láncvégi alanin kivételével kevesebb, mint 0,1 ppm-mel térnek csak el a random coil értékektől. Csupán egy három aminosav hosszúságú szegmensnél, R¹³-R¹⁶ között fedezhetünk fel tendenciát, így azt mondhatjuk, az MNK1 fehérjefragmens egésze rendezetlen. Ez alátámasztja a szerkezetpredikciós vizsgálat eredményét.



21. ábra. MK2 szekvenciakorrigált H α (a), C α (b), C α -C β (c) másodlagos kémiai eltolódásértékei ppm-ben. Az (a) és (c) grafikonokon K¹⁹ esetében az SCS értékek nagyobbak, mint a tengelyeken feltüntetett maximális értékek.

A 21. ábrán az MK2 grafikonjait tekintve észrevehető a D⁸-L¹⁵ régióban a másodlagos kémiai eltolódásértékek tendenciózus alakulása: H α -nál negatívak, C α -nál és (C α -C β)-nál pedig pozitívak. A rendezett régióra utalt az is, hogy az MK2 NOESY spektrumában nem csak (i, i-1) keresztcsúcsokat figyeltünk meg, hanem (i, i-2) illetve (i, i-3) keresztcsúcsokat is találtunk e fehérjerész aminosavai között, azonban nem eleget ahhoz, hogy ezeket szerkezetszámolásnál kényszerfeltételként felhasználhattuk volna. Megállapíthatjuk, hogy a D⁸-L¹⁵ régió helikális hajlammal rendelkezik.



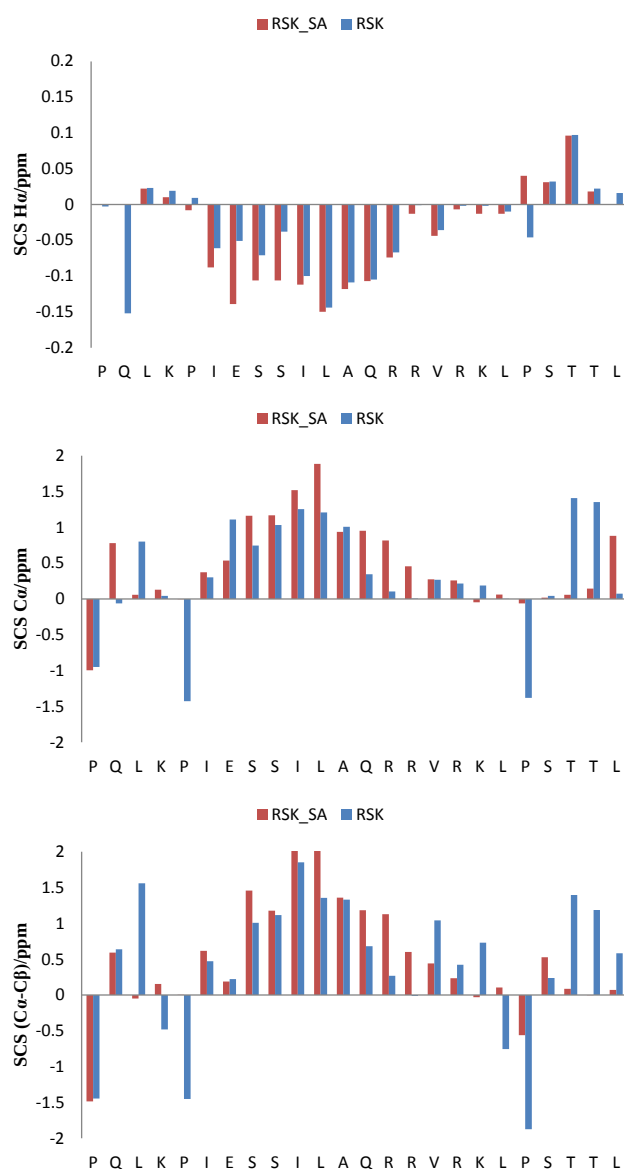
22. ábra. RSK1 szekvenciakorrigált H α (a), C α (b), C α -C β (c) másodlagos kémiai eltolódásértékei ppm-ben.

Az RSK1 grafikonjain I⁶-R¹⁴ régióban H α esetében egymást követő negatív, C α illetve (C α -C β) esetében egymást követő pozitív értékek láthatók, amelyek eltérnek a random coil állapotra jellemző adatoktól, nagyságuk a stabil α -hélixre jellemző érték 20-25%-a. Ezek alapján megállapíthatjuk, hogy az I⁶-R¹⁴ régió naszcens helicitást mutat. A többi 0-tól különböző értéknél nem fedezhetünk fel tendenciát, így megállapíthatjuk, hogy a fehérje más régióiban nem találunk másodlagos szerkezeti elemeket.

Az NFAT grafikonjai alapján megállapíthatjuk, hogy az SCS-értékek jelentős mértékben szórnak, alakulásukban nem fedezhető fel tendencia. Az NFAT tehát egy valódi rendezetlenséget mutató nagyon rövid fehérjefragmens.

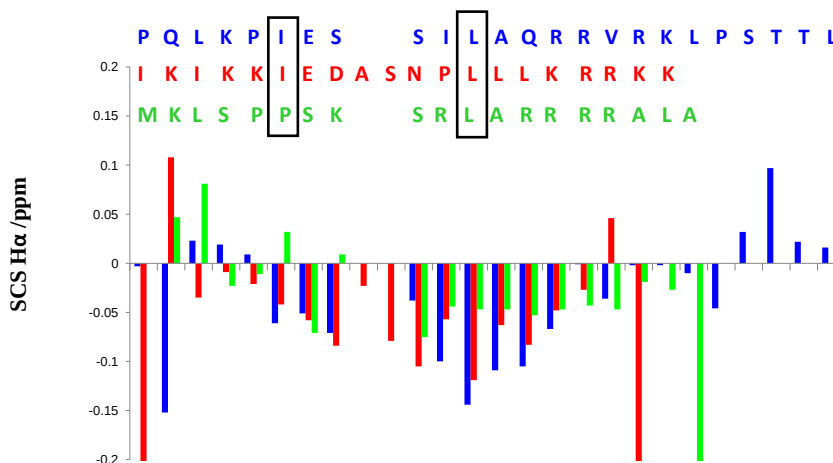
.Az RSK1_S/A esetében I⁶-R¹⁷ régióban a negatív H α értékeknek megfelelő pozitív C α és (C α -C β) másodlagos kémiai eltolódások alakulásánál is látható a tendencia, vagyis a fehérje e része naszcens helicitással rendelkezik, hasonlóan az RSK1-hez.

A 23. ábrán összehasonlítottuk az RSK1 és mutánsa, az RSK1_S/A másodlagos kémiai eltolódásait. Észrevehető, hogy egyetlen mutáció hatására a helikális hajlamot mutató régió nagyobb kiterjedésű az RSK1_S/A-ban, ugyanakkor az SCS értékek nagyságában nem láthatunk jelentős eltérést.



23. ábra. RSK1 és RSK1_S/A SCS grafikonjainak összevetése.

Eddigi eredményeink alapján tehát megállapíthatjuk, hogy az adott régiójában naszcens helicitást mutató RSK1 és RSK1_S/A az ERK2-höz, az MK2 pedig a p38 kinázhoz kötődik specifikusan. A szekvenciája teljes hosszában rendezetlen MNK1 a p38-hoz és az ERK2-höz egyaránt kötődik. A három fragmens helikális hajlamát a 24. ábrán hasonlítottuk össze.



24. ábra. Helikális hajlam változása a fekete kerettel jelölt horgonypontok között: **RSK1** > **MK2** > **MNK1**.

Ezek alapján arra következtethetünk, hogy a specifikus kötődés a naszcens szerkezetkialakító hajlammal rendelkező régiókhoz kapcsolódik, ezek hiánya pedig a promiszkuus kötődést eredményezi. Eredményeinket a 6. táblázatban foglaltuk össze. Kijelenthetjük tehát, hogy az NMR mérésekből nyerhető atomi szintű információk felhasználásával kapcsolatot tudunk teremteni a fehérjefragmensek szerkezete és biológiai funkciói között.

		MAPK		
		JNK	ERK2	p38
Szubsztrát	NFAT	+	-	-
	MK2	-	-	+ naszcens helicitás
	RSK1, RSK1_S/A	-	+ naszcens helicitás	-
	MNK1	-	+ rendezetlenség +	

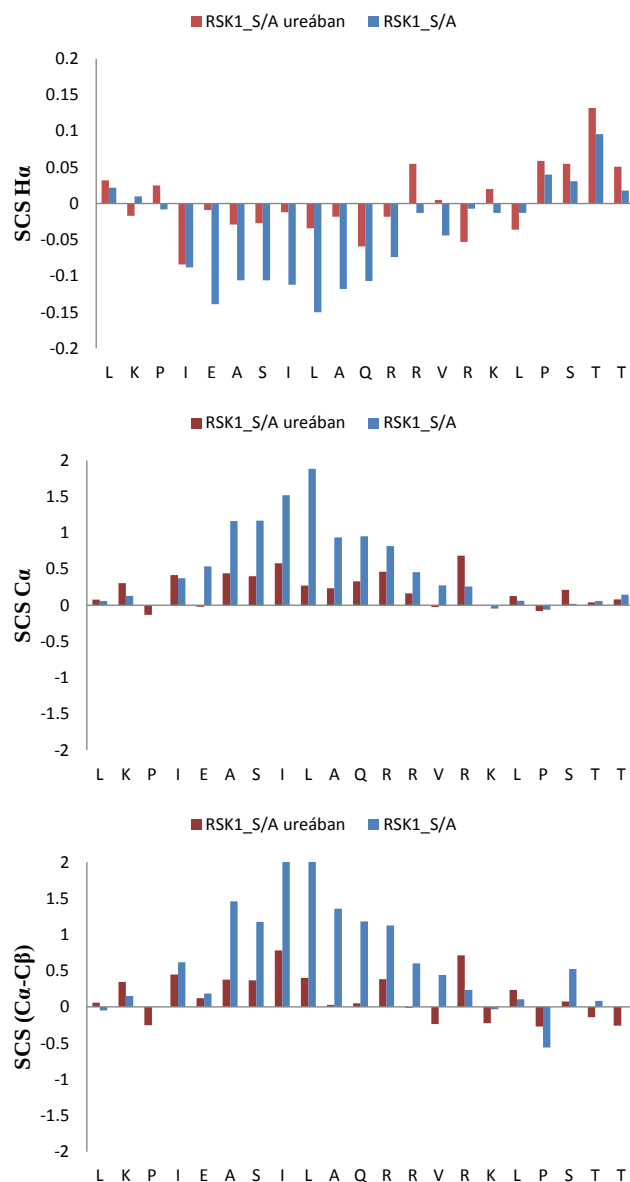
6. táblázat. A MAPK rendszer általunk vizsgált elemeinek kötődési és szerkezeti jellemzői.

6.3.2. Mérések denaturáló közegben

A denaturáló közegben (8 M ureaoldat) felvett spektrumainkban nagy intenzitással jelent meg az urea jele, ám ez nem okozott gondot a fragmensek jellemző kémiai eltolódásainak meghatározásában, mivel az amidprotonok jele más régióban keresendő. A spektrumok minősége megegyezett a vizes közegben mértékével, és bár egyes magok kémiai eltolódása kis mértékben megváltozott, az asszignációt ezekben az esetekben is el tudtuk végezni. Méréseink eredményeit az egyes vizsgált fehérjefragmenseknél összevetettük a vizes oldatoknál kapott eredményekkel.

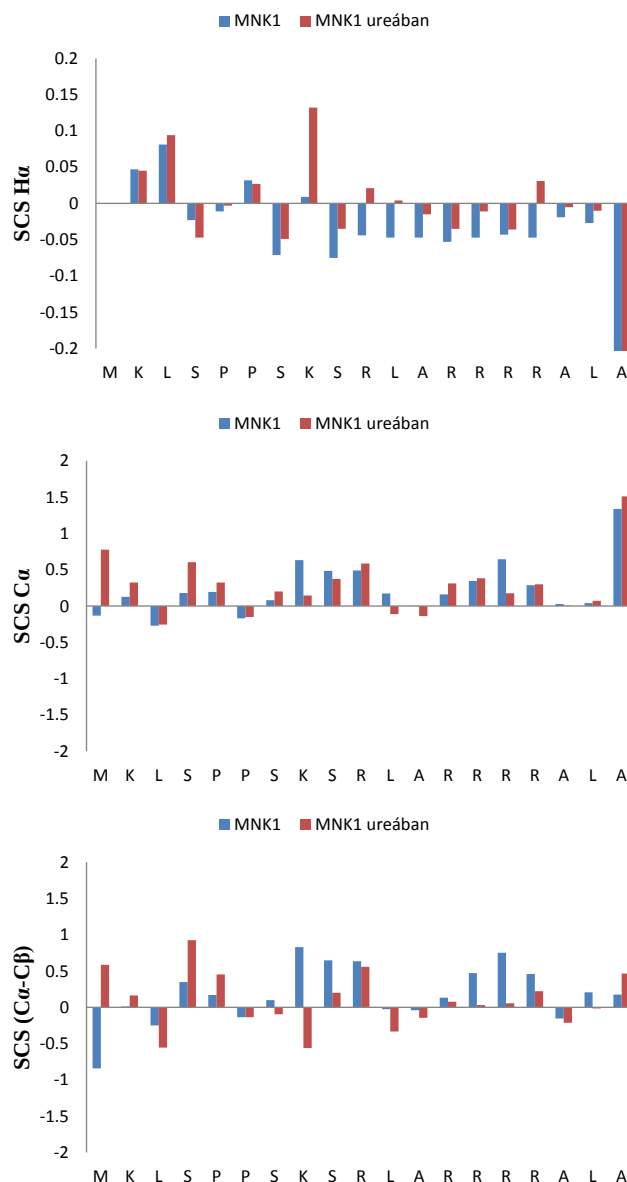
NFAT esetében azt láthatjuk, hogy a kétféle közegben elvégzett mérések eredményei között nincs számottevő különbség, kivételt csak az Y¹⁰ aminosav jelent, mert esetében a vizes oldatban kapott pozitív SCS H α érték 8 M ureában negatívnak mutatkozott, SCS C α -nál pedig ennek fordítottját tapasztaltuk. A denaturáló közegben mért kémiai eltolódások értékei jobban megközelítették a random coilra jellemzőeket, de érdekes módon még így sem egyenlők azokkal, tehát a fragmens szerkezete nem mondható teljesen rendezetlennek.

MK2 esetében az ureás közegű mérések során kapott SCS értékek lényegesen jobban megközelítik a 0-t, mint a vizes közegben kapottak. Bár előfordulnak lokális eltérések, előjelváltások egyes aminosavaknál (pl. K⁵, A⁹), mégis azt mondhatjuk, a fehérje egészét tekintve rendezetlenebb lett a kitekeredés következtében.



25. ábra RSK1_S/A vizes oldatban és ureában kapott SCS értékeinek összevetése.

A 25. ábra alapján megállapíthatjuk, hogy az RSK1_S/A másodlagos kémiai eltolódásainak értékei a kitekeredés következtében csökkentek. Ez különösen a helikális hajlamot mutató régióban szembeűnő: az ureaoldatban mért értékek az vizes oldatban mértéknél 2-3-szor kisebbek, ám észrevehető, hogy a tendencia még így is megmaradt. Tehát a naszcens helicitás még erőteljes denaturáló körűlmények között is jellemzi az RSK1_S/A-t.



26. ábra. MNK1 vizes oldatban és ureában kapott SCS értékeinek összevetése.

A rendezetlen MNK1 másodlagos kémiai eltolódásainak értékei denaturáló közegben kisebbnek bizonyultak ugyan a vizes közegben tapasztaltakénál, ám még ilyen körülmények között sem egyenlők 0-val, mint látható a 26. ábrán.

A 8 M ureában végzett kísérleteink alapján tehát arra következtethetünk, hogy a naszcens másodlagos szerkezetkialakító hajlamú régiók megőrzik ezt a tulajdonságukat, illetve arra, hogy denaturáló közegben nem érhető el a teljes rendezetlenség.

A méréseink során kapott kémiai eltolódásértékeket táblázatba foglaltuk az olyan aminosavak esetében, melyek egynél többször fordultak elő a vizsgált fragmenseinkben, így a 7. táblázat alapján összehasonlíthatjuk őket a random coil értékekkel. (Az átlagolás során nem vettük figyelembe azokat az aminosavakat, amelyek prolin előtt állnak, mert a prolin befolyásolja az előtte lévő aminosav kémiai eltolódását.)

	random coil vizes közegben			random coil 8 M ureában			random coil irodalmi		
	H α	C α	C β	H α	C α	C β	H α	C α	C β
A	4,30	52,63	19,21	4,30	52,63	19,21	4,32	52,5	19,1
D	4,58	54,53	41,42	4,58	54,53	41,42	4,64	54,2	41,1
E	4,35	56,38	30,08	4,35	56,38	30,08	4,35	56,6	29,9
I	4,13	61,39	38,70	4,13	61,39	38,70	4,17	61,1	38,8
K	4,34	56,49	33,59	4,34	56,49	33,59	4,32	56,2	33,1
L	4,31	55,19	42,40	4,31	55,19	42,40	4,34	55,1	42,4
P	4,46	63,28	32,22	4,46	63,28	32,22	4,42	63,3	32,1
R	4,34	56,25	31,07	4,34	56,25	31,07	4,34	56,0	30,9
S	4,45	58,64	64,00	4,45	58,64	64,00	4,47	58,3	63,8

7. táblázat. Random coil értékek összevetése.

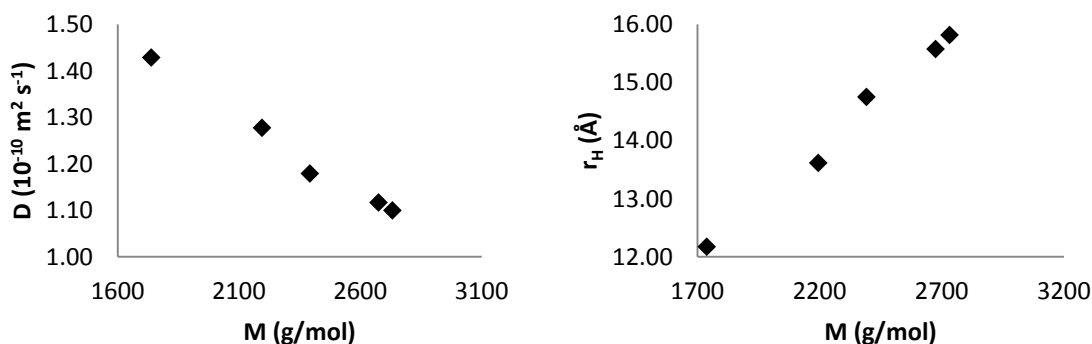
6.3.3. Transzlációs diffúziós mérések

A transzlációs diffúziós kísérleteknél a gradiens erősségét jellemzően 16 vagy 32 lépésben változtattuk, és a fehérjefragmensek alifás régiójában mért, alapvonal-korrektció utáni jelintenzitásait felhasználva a Stejskal-Tanner-formula (1) szerint illesztést végeztünk. A diffúziós állandó meghatározása után a Stokes-Einstein-egyenlet (3) alapján számítottuk a hidrodinamikai sugarat.

Az öt rendezetlen fragmens hidrodinamikai paramétereit a 8. táblázatban foglaltuk össze. Észrevehető, hogy a másodlagos kémiai eltolódások alapján hosszabb naszcens helicitást mutató régióval rendelkező RSK1_S/A hidrodinamikai sugara kisebb, mint az RSK1-é. A 27. ábrán látható, hogy a fragmensek méretének változásával hogyan alakul a diffúziós állandó és a hidrodinamikai sugár.

	D ($10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$)	r_H (Å)	AA	M (g/mol)
NFAT	$1,43 \pm 0,00$	12,18	14	1738
MNK1	$1,28 \pm 0,01$	13,62	19	2195
MK2	$1,18 \pm 0,01$	14,75	20	2392
RSK1_S/A	$1,12 \pm 0,00$	15,58	24	2675
RSK1	$1,10 \pm 0,02$	15,82	24	2732

8. táblázat. A vizsgált fehérjefragmensek diffúziós állandói és hidrodinamikai sugarai.



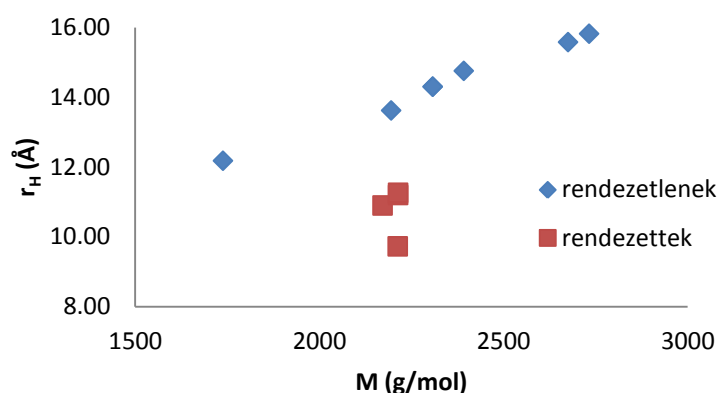
27. ábra. Az öt vizsgált fehérjefragmens (a) diffúziós állandója és (b) hidrodinamikai sugara a moláris tömeg függvényében.

A vizsgált rendezetlen fragmensek hidrodinamikai paramétereit összevetettük ugyanolyan nagyságú rendezett minifehérjék paramétereivel. A mérések eredményeit a 9. táblázatban tüntettük fel.

		D ($10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$)	r_H (Å)	M (g/mol)
rendezetlen	NFAT	1,43±0,00	12,18	1738
	MNK1	1,28±0,01	13,62	2195
	MK2	1,18±0,01	14,75	2392
	RSK1_S/A	1,12±0,00	15,58	2675
	RSK1	1,10±0,02	15,82	2732
	TC5bS14(P)Q	1,22±0,21	14,30	2308
	TC5b20(P)Q	1,22±0,06	14,30	2308
rendezett	TC5b	1,60±0,02	10,89	2171
	Tc5B_S20Q	1,79±0,19	9,72	2213
	Tc5B_S13E	1,55±0,09	11,19	2214
	Tc5B_S9E	1,55±0,01	11,26	2214

9. táblázat. Rendezett és rendezetlen minifehérjék, valamint rendezetlen fehérjefragmensek diffúziós méréseinek eredményei.

Észrevehető, hogy a rendezett minifehérjék diffúziós állandója jellemzően nagyobb, így hidrodinamikai sugaruk kisebb a rendezetlen minifehérjékénél illetve fehérjefragmensekénél. Az MNK1 és a rendezett minifehérjék moláris tömege 2200 g/mol körül van, hidrodinamikai sugaruk viszont jelentős eltérést mutat, mint a 28. ábrán is látható. A rendezett minifehérjék szerkezete kompaktabb, gömbszerű, míg a rendezetlen fehérjéket Uversky főtt spagettiszálhoz hasonlította⁴¹. Ezt bizonyítottuk a diffúziós méréseinkkel, hiszen az eredményeink alapján látható, hogy egy azonos tömeggel rendelkező gömb- illetve pálcikaszerű test közül a pálcikaszerű lassabban végez transzlációs diffúziós mozgást, mint a gömbszerű.



28. ábra. Rendezett és rendezetlen minifehérjék, valamint rendezetlen fehérjefragmensek hidrodinamikai sugara a moláris tömeg függvényében.

Az általunk meghatározott hidrodinamikai sugarakat összevetettük azokkal, melyeket két empirikus összefüggés felhasználásával kaptunk. Az első összefüggést, mely a hidrodinamikai sugár és a polipeptidlánc aminosavtagszáma közti kapcsolatot írja le, *Dobson és mtsai.* határozták meg⁴²:

$$r_H = 2,21N^{0,57} \quad (6)$$

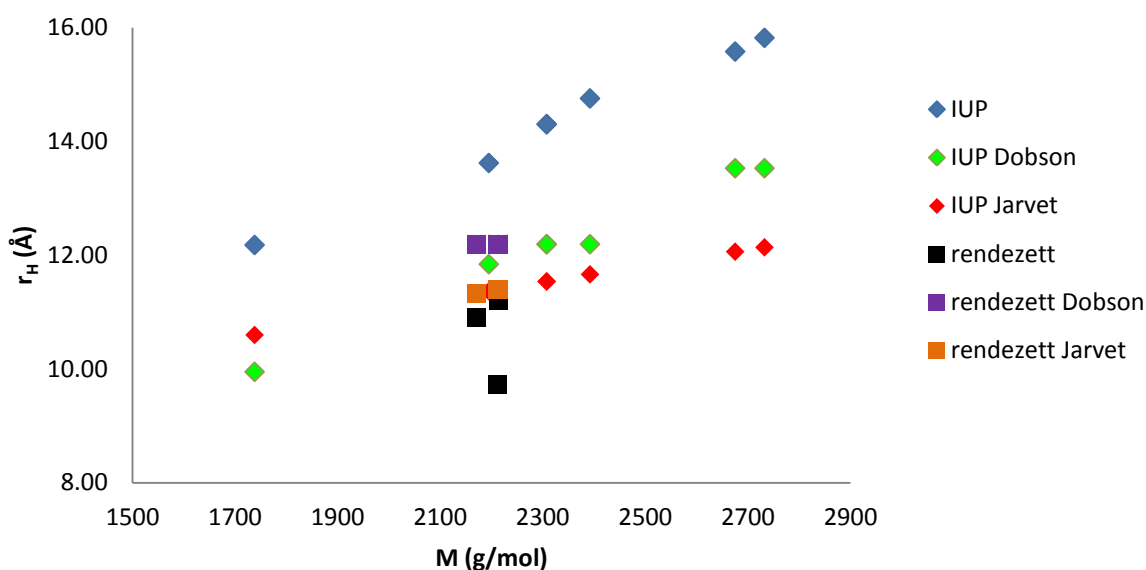
Fontos szem előtt tartani, hogy Dobsonék az 58-760 aminosavegységből felépülő fehérjéknél találtak jó egyezést.

A második összefüggés *Jarvet és mtsai.* nevéhez fűződik, és a hidrodinamikai sugár moláris tömeg szerinti alakulását adja meg⁴³:

$$r_H = 0,27M^{0,50} \quad (7)$$

Meg kell említenünk azonban, hogy Jarveték vizsgálódása kezdetben csak az Alzheimer-kór kialakulásában fontos szerepet játszó A β peptidre és ennek fragmenseire korlátozódott.

A mért és számolt értékeket a moláris tömeg függvényében ábrázoltuk. A 29. ábra alapján azt mondhatjuk, az empirikus összefüggések alapján kisebb értékeket kaptunk a rendezetlen fehérjefragmensek hidrodinamikai sugarára, mint amekkorát mértünk. A rendezett minifehérjéknél viszont a mért értékek kisebbek, mint a képletek alapján számítottak.



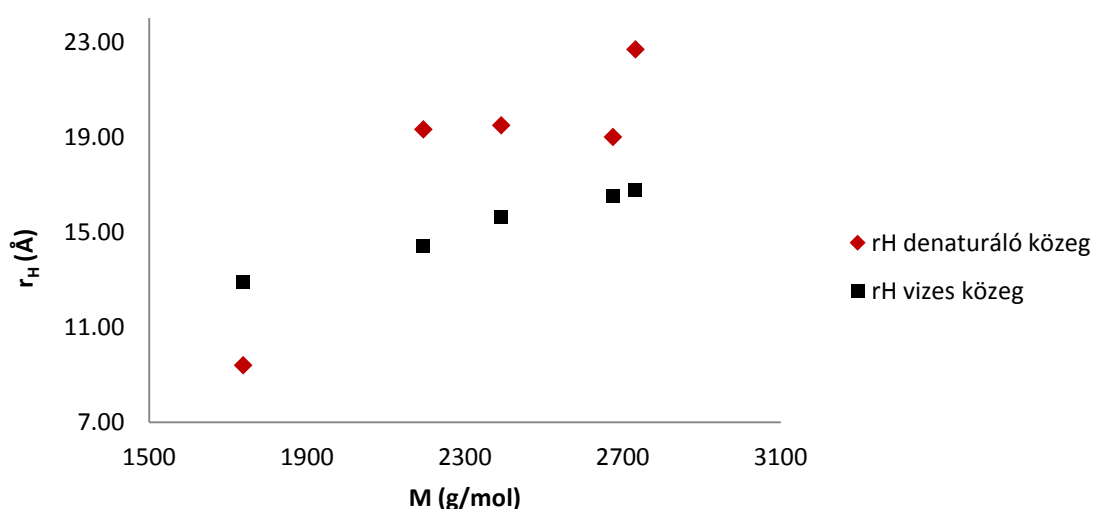
29. ábra. Empirikus összefüggések alapján számolt és NMR mérések eredményeként kapott hidrodinamikai sugarak a vizsgált minifehérjék és fehérjefragmensek moláris tömegének függvényében.

A diffúziós méréseket denaturáló közegben is elvégezve lehetőségünk nyílt arra, hogy a hidrodinamikai sugár változásával bizonyítsuk a feltételezett letekeredést. A 10. táblázat és a 30. ábra alapján láthatjuk, hogy az NFAT kivételével a fragmensek hidrodinamikai sugara nőtt a denaturáló közeg miatti letekeredés következtében.

	r_H (Å)	$r_{H, \text{denat. közeg}}$ (Å)
NFAT	12,18	9,41
MNK1	13,62	19,32
MK2	14,75	19,49
RSK1_S/A	15,58	19,00
RSK1	15,82	22,68

10. táblázat. A vizsgált fehérjefragmensek semleges és denaturáló közegben mért hidrodinamikai sugarai.

Észrevehető az is, hogy a vizes közegben kisebb hidrodinamikai sugárral rendelkező RSK1_S/A esetében a denaturáció okozta méretnövekedés kisebb mértékű ($\sim 3,5$ Å), mint az RSK1-nél (~ 7 Å). Az RSK1_S/A és az RSK1 másodlagos kémiai eltolódásai alapján arra a megállapításra jutottunk, hogy az előbbi hosszabb naszcens helicitást mutató régióval rendelkezik, mint az utóbbi. A diffúziós mérések eredményei alapján arra következtethetünk, hogy a rendezettebb RSK1_S/A adott régiója még denaturáló körülmények között sem veszítette el teljesen a helikális jellegét, illetve azt is észrevehetjük, hogy a vizes közegben kisebb rendezetlenséggel jellemezhető RSK1_S/A 8 M ureaoldatban is megőrizte ezt a tulajdonságát az RSK1-hez viszonyítva.



30. ábra. Az öt vizsgált fehérjefragmens semleges és denaturáló közegben mért hidrodinamikai sugarai a moláris tömeg függvényében.

7. Összefoglalás

Munkánk során NMR spektroszkópai méréseket végeztünk öt fehérjefragmensen annak érdekében, hogy jellemezhessük a szerkezetüket vizes illetve denaturáló közegben, és ez által következtessünk a MAPK jelátviteli rendszerben megfigyelhető specifikus kötődésük szerkezeti okára.

2D TOCSY, COSY és NOESY, valamint 2D ^{13}C és ^{15}N HSQC spektrumokat vettünk fel, majd az asszignáció elvégzése után a Másodlagos Kémiai Eltolódásokat vizsgáltuk. Az NFAT és az MNK1 esetében teljes szerkezeti rendezetlenséget állapítottunk meg, míg az MK2-nél, az RSK1-nél és mutánsánál, az RSK1_S/A-nál naszcens helicitást tapasztaltunk a fehérjefragmens adott régiójában. Arra a következtetésre jutottunk, hogy a specifikus kötődés a rendezett régiókhoz köthető, míg a promiszkus kötődés a teljes szerkezeti rendezetlenséghez.

A méréseket 8 M ureaoldatban is megismételtük, és megfigyeltük, hogy a denaturáció következtében a vizsgált fehérjék megfelelő kémiai eltolódásai a rendezetlen állapotra jellemző értékekhez közelítettek, de még ilyen körülmények között sem voltak egyenlők ezekkel.

Diffúziós méréseink alapján összehasonlítottuk közel azonos molekulatömegű rendezett minifehérjék és a vizsgált rendezetlen fragmensek hidrodinamikai sugarát, melyek közül várakozásainknak megfelelően utóbbiak bizonyultak nagyobbak. A vizes és denaturáló közegben mért hidrodinamikai sugarak összevetésével pedig láthattuk, hogy a letekeredés méretnövekedéssel jár ugyan, de a naszcens másodlagos szerkezeti elemek denaturáló közegben sem rombolhatók le teljesen.

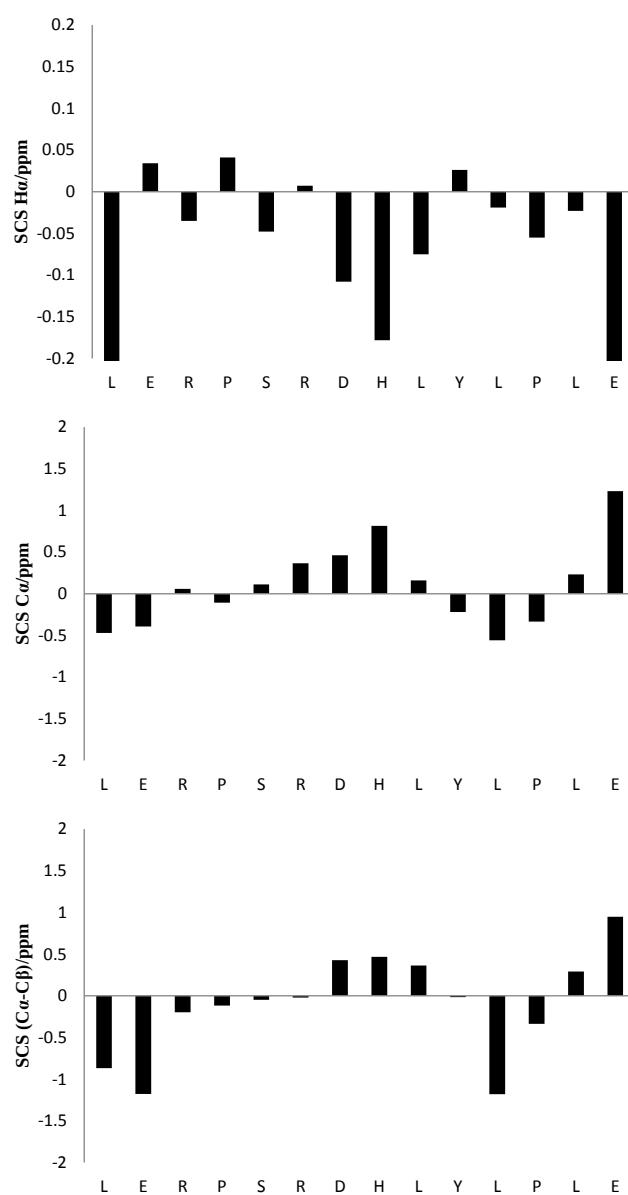
Eredményeink remélhetőleg hozzájárulnak majd a MAPK jelátviteli rendszer működésének megértéséhez, és ezáltal a különböző fontos sejtfolyamatok (sejtnövekedés, -osztódás, -halál, stresszfolyamatok) szabályzásával kapcsolatos ismereteink kibővítéséhez.

8. Köszönetnyilvánítás

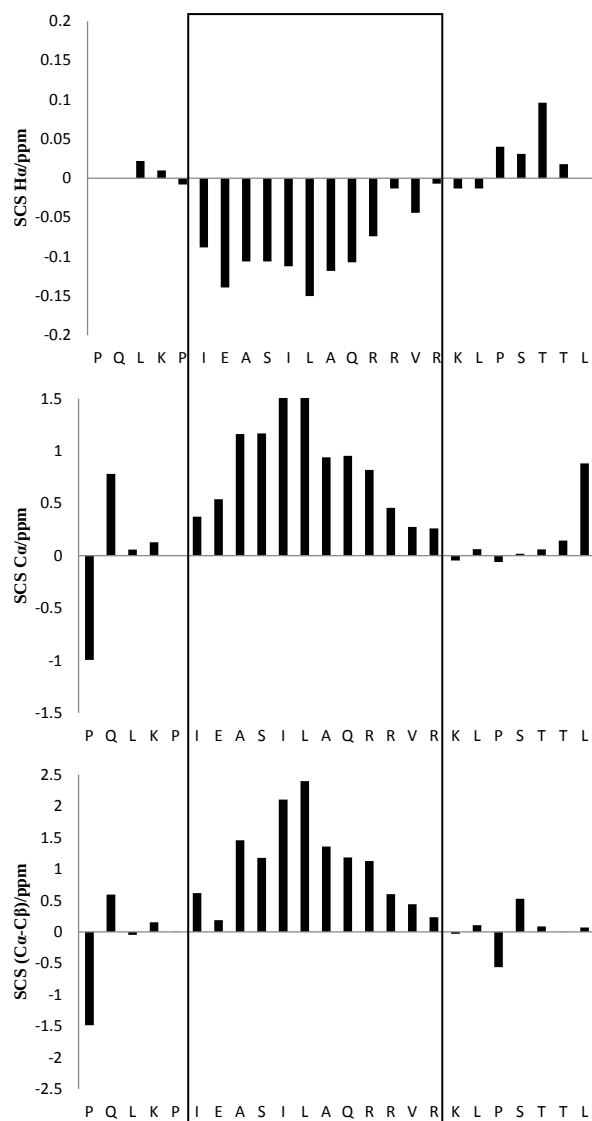
Ezúton szeretném megköszönni témavezetőmnek, Dr. Bodor Andreának azt a rengeteg türelmet és figyelmet, amellyel segítette dolgozatom elkészülését. Köszönettel tartozom Dr. Reményi Attilának a téma felvetéséért és az ELTE TTK Biokémiai tanszékének a vizsgált fehérjék előállításáért. Köszönet illeti Dr. Perczel Andrást a lehetőségért, hogy csoportjában dolgozhassak, Dr. Farkas Viktort, aki a Kiroptikai Szerkezetvizsgáló Laboratóriumban elvégezte a CD méréseket, valamint az ELTE Kémiai Intézetében működő Szerkezeti Kémiai és Biológiai Laboratórium minden tagját kisebb-nagyobb segítségéért, a jó hangulatért és teázási szokásaim megreformálásáért. Köszönöm barátaim minden építő kritikáját és az igyekezetüket, hogy szabad óráinkat kevésbé építő, de annál szórakoztatóbb módokon tölthessük el. A dolgozat nem jöhetett volna létre Földes Tamás biztatása, észrevételei és inspiráló jelenléte nélkül. Végül, de nem utolsó sorban szeretném megköszönni családomnak azt a támogatást és biztonságot, amelyet előteremtettek és fenntartottak az elmúlt 22 év során.

A projekt az Európai Unió támogatásával és az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósult meg, a támogatási szerződés száma TÁMOP 4.2.1./B-09/KMR-2010-0003.

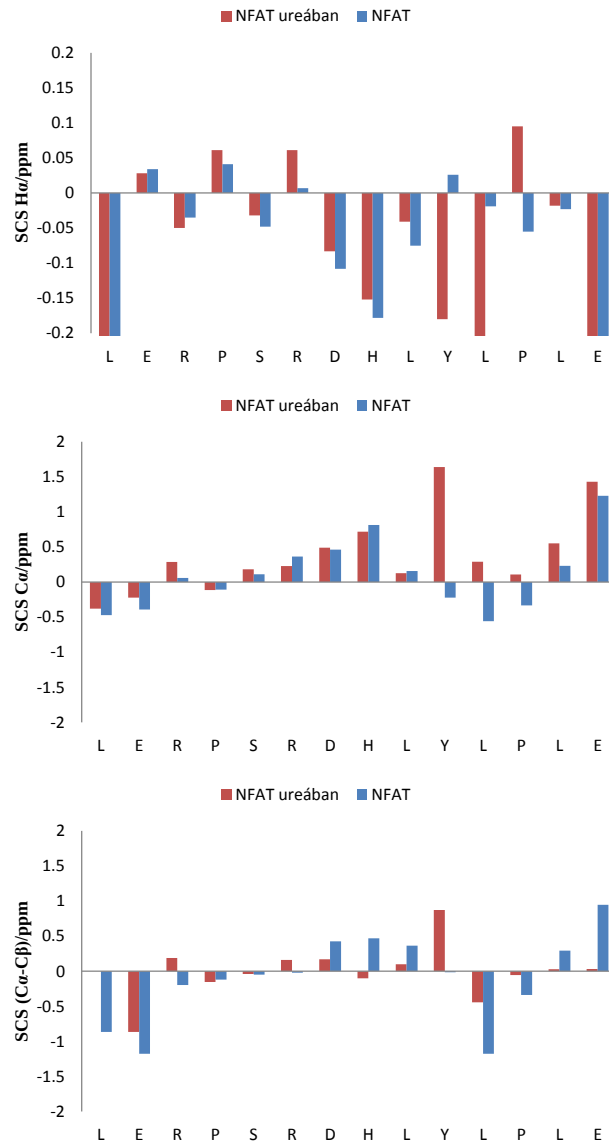
9. Függelék



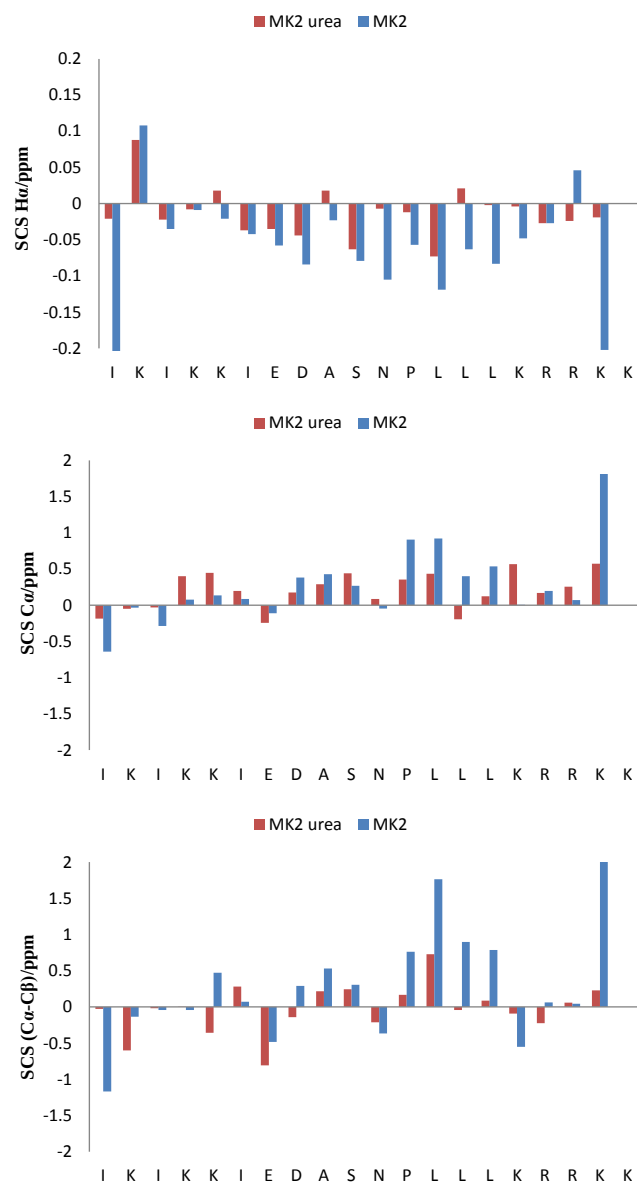
F-I. ábra. NFAT szekvenciakorrigált H α (a), C α (b), C α -C β (c) másodlagos kémiai eltolódásértékei ppm-ben. Az (a) grafikonon L¹ és E¹⁴ SCS értékei nagyobbak, mint a tengelyen feltüntetett maximális érték.



F-II. ábra. RSK1_S/A szekvenciakorrigált H α (a), C α (b), C α -C β (c) másodlagos kémiai eltolódásértékei ppm-ben.



F-III. ábra. NFAT vizes oldatban és ureában kapott SCS értékeinek összevetése.



F-IV. ábra MK2 vizes oldatban és ureában kapott SCS értékeinek összevetése.

		M (g/mol)	rH (Å)	rH _{Dobson} (Å)	rH _{Jarvet} (Å)
rendezetlen	NFAT	1738	12,18	9,95	10,59
	MNK1	2195	13,62	11,84	11,36
	MK2	2392	14,75	12,19	11,66
	RSK1_S/A	2675	15,58	13,52	12,06
	RSK1	2732	15,82	13,52	12,13
	TC5bS14(P)Q	2308	14,30	12,19	11,54
	TC5bS20(P)Q	2308	14,30	12,19	11,54
rendezett	TC5b	2171	10,89	12,19	11,33
	Tc5B_S20Q	2213	9,72	12,19	11,39
	Tc5B_S13E	2214	11,19	12,19	11,39
	Tc5B_S9E	2214	11,26	12,19	11,39

F-I. táblázat. A diffúziós mérésekkel meghatározott hidrodinamikai sugarak összevetése a Dobson- és a Jarvet-féle empirikus összefüggéseken alapuló hidrodinamikai sugarakkal.

10. Irodalomjegyzék

- ¹ Fischer, E.; *Ber. Dt. Chem. Ges.* **1894**, 27, 2985–2993.
- ² Mirsky, A. E., and Pauling, L.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1936**, 22, 439–447.
- ³ Karush, F.; *J. Am. Chem. Soc.* **1950**, 72, 2705–2713.
- ⁴ Koshland Jr., D. E.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1958**, 44, 98–104.
- ⁵ Koshland Jr., D. E.; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, 33, 2375–2378.
- ⁶ Bennett, W. S., Jr., and Steitz, T. A.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1978**, 75, 4848–4852.
- ⁷ Aviles, F. J., Chapman, G. E., Kneale, G. G., Crane-Robinson, C., and Bradbury, E. M.; *Eur. J. Biochem.* **1978**, 88, 363–371.
- ⁸ Dunker, A. K., Lawson, J. D., Brown, C. J., Williams, R. M., Romero, P., Oh, J. S., et al.; *J Mol Graph Model* **2001**, 19, 26–59.
- ⁹ Uversky, V. N.; *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **2011**, 43, 1090–1103.
- ¹⁰ Dunker, A. K., Obradovic, Z.; *The Nat Biotechnol* **2001**, 19, 805–6.
- ¹¹ Uversky, V. N.; *Natively Protein Sci* **2002**, 11, 739–56.
- ¹² Oldfield, C. J., Cheng, Y., Cortese, M. S., Brown, C. J., Uversky, V. N., Dunker, A. K.; *Biochemistry* **2005**, 44, 1989–2000.
- ¹³ Tompa, P.; *Trends Biochem Sci* **2002**, 27, 527–33.
- ¹⁴ Tompa, P.; *J Mol Struct Theochem* **2003**, 666–667, 361–71.
- ¹⁵ Dunker, A. K., Brown, C. J., Lawson, J. D., Iakoucheva, L. M., Obradovic, Z.; *Biochemistry* **2002**, 41, 6573–82.
- ¹⁶ Uversky, V. N., Oldfield, C. J., Dunker, A. K.; *Annu Rev Biophys* **2008**, 37, 215–46.

- ¹⁷ Gould, C. M., Diella, F., Via, A., Puntervoll, P., Gemund, C., Chabanis-Davidson, S., Michael, S., Sayadi, A., Bryne, J. C., Chica, C. et al.; *Nucleic Acids Res* **2009**, 38, 167–180.
- ¹⁸ Wright, P. E., Dyson, H. J.; *Curr Opin Struct Biol* **2009**, 19, 1–8.
- ¹⁹ Tompa, P., Fuxreiter, M.; *Trends Biochem Sci* **2008**, 33, 2–8.
- ²⁰ Metallo, S.J.; *Curr Opin Chem Biol* **2010**, 14, 481–488.
- ²¹ Ishima, R., and Torchia, D. A.; *Nat. Struct. Biol.* **2000**, 7, 740–743.
- ²² Eliezer, D.; *Current Opinion in Structural Biology* **2009**, 19, 23–30.
- ²³ Mittag, T., Forman-Kay, J. D.; *Current Opinion in Structural Biology* **2007**, 17, 3–14.
- ²⁴ Seavey, B. R., Farr, E. A., Westler, W. M., Markley, J. L.; *Journal of Biomolecular NMR* **1991**, 3, 217–236.
- ²⁵ Uversky, V. N., Gillespie, J. R., Fink, A. L.; *PROTEINS: Structure, Function, and Genetics* **2000**, 41, 415–427.
- ²⁶ O'Hare, B., Benesi, A. J., Showalter, S. A.; *Journal of Magnetic Resonance* **2009**, 200, 354–358.
- ²⁷ Otten, R., Wood, K., Mulder, F. A. A.; *J Biomol NMR* **2009**, 45, 343–349.
- ²⁸ Cargnello, M., and Roux, P. P.; *Micr. and Mol. Biol. Reviews* **2011**, 75, 50–83.
- ²⁹ Gavin, A. C. and Nebreda, A. R.; *Current Biol.* **1999**, 9, 281–284.
- ³⁰ Smith, J. A., Poteet-Smith, C. E., Lannigan, D. A., Freed, T. A., Zoltoski, A. J. and Sturgill, T. W.; *J. Biol. Chem.* **2000**, 275, 31588–31593.
- ³¹ Gaestel, M., *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **2006**, 7, 120–130.
- ³² Anjum, R., Blenis, J.; *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2008**, 9, 747–758.
- ³³ Petsalaki, E., Russel, R. B.; *Curr Opin Biotechnol.* **2008**, 344–50.
- ³⁴ Garai, Á., Zeke, A., Gógl, G., Tőro, I., Fördos, F., Blankenburg, H., Bárkai, T., Varga, J., Alexa, A., Emig, D., Albrecht, M., and Reményi, A.; *Sci. Signal.* **2012**, 5, ra74.

- ³⁵ Jensen, M. R., Markwick, P. R. L., Meier, S., Griesinger, C., Zweckstetter, M., Grzesiek, S., Bernadó, P., and Blackledge, M.; *Structure* **2009**, 17, DOI 10.1016/j.str.2009.08.001.
- ³⁶ Wishart, D.S., Bigam, C. G., Holm, A., Hodges, R. S., and Sykes, B. D.; *Journal of Biomolecular NMR* **1995**, 5, 67–81.
- ³⁷ Receveur-Brechot, V., Bourhis, J-M., Uversky, V. N., Canard, B., Longhi, S.; *PROTEINS: Structure, Function, and Bioinformatics* **2006**, 62, 24–45.
- ³⁸ Dosztányi, Zs., Csizmók, V., Tompa, P., and Simon, I.; *Bioinformatics* **2005**, 21, 3433–3434.
- ³⁹ Dunker, A. K., Silman, I., Uversky, V. N., and Sussman, J. L.; *Current Opinion in Structural Biology* **2008**, 18, 756–764.
- ⁴⁰ Wilkins, D. K., Grimshaw, S. B., Receveur, V., Dobson, C. M., Jones, J. A., and Smith, L. J.; *Biochemistry* **1999**, 38, 16424–16431.
- ⁴¹ Danielsson, J., Jarvet, J., Peter Damberg, P., and Gräslund, A.; *Magnetic Resonance in Chemistry* **2002**, 13, S89–S97.